

# Analiza skuteczności terapeutycznej wybranych typów kolagenu w profilaktyce i leczeniu choroby zwyrodnieniowej stawów

## Analysis of Therapeutic Effectiveness of Selected Types of Collagen in Prevention and Treatment of Degenerative Joint Disease

Wiesław Tomaszewski<sup>1(A,D,E,F)</sup>, Anna Paradowska<sup>2(B,D,F)</sup>

<sup>1</sup> Wyższa Szkoła Fizjoterapii z siedzibą we Wrocławiu, Polska

<sup>1</sup> Kardio-Med Silesia – Śląski Park Technologii Medycznych, Zabrze, Polska

<sup>2</sup> College of Physiotherapy, Wrocław, Poland

<sup>2</sup> Cardio-Med Silesia – Silesian Medical Technology Park, Zabrze, Poland

### STRESZCZENIE

Ubytek kolagenu jest zjawiskiem naturalnym w procesie starzenia organizmu, jak również potęgowanym w przypadku różnych chorób – w tym choroby zwyrodnieniowej stawów (ChZS).

W ciągu ostatnich kilkunastu lat przeprowadzono na świecie liczne i wielokierunkowe badania naukowe, których zadaniem było wyodrębnienie odpowiednich substancji zawierających w swoim składzie kolagen, wytworzenie preparatów leczniczych charakteryzujących się oczekiwaną skutecznością terapeutyczną w profilaktyce i leczeniu ChZS, bezpieczeństwem stosowania, jak również opracowaniem metod „dostarczenia” gotowego produktu do organizmu. Dokonano przeglądu i analizy najnowszej dostępnej literatury, opierając się na publikacjach ukazujących wyniki badań przeprowadzonych zgodnie z metodologią EBM (*evidence based medicine*). Zaprezentowane badania zostały usystematyzowane – od prób przeprowadzonych *in vitro* (badania laboratoryjne na zwierzętach, z wykorzystaniem metod inżynierii tkankowej w celu oceny efektów przeszczepu chrząstki, zastosowaniu różnych postaci kolagenu w przygotowaniu szkieletów itp.), do badań klinicznych, wykonanych *in vivo*.

Wydaje się, że zaprezentowane w niniejszej publikacji wyniki wielokierunkowych, najnowszych badań naukowych, które potwierdzają skuteczność terapeutyczną nowych generacji preparatów medycznych zawierających kolagen sprawią, że w kompleksowym leczeniu choroby zwyrodnieniowej stawów mogą one zająć należne im miejsce – zarówno w aspekcie działania przeciwbólowego, odzyskania sprawności funkcjonalnej, jak również wpływu na regenerację tkanek na poziomie molekularnym.

**Słowa kluczowe:** kolagen, choroba zwyrodnieniowa stawów, wiskosuplementacja

### SUMMARY

Loss of collagen is a natural development accompanying aging of the body. It may be additionally accelerated by various conditions, including osteoarthritis (OA).

Within the last two decades numerous and diverse studies have been conducted worldwide with the aim of identifying substances containing collagen, producing therapeutic preparations of expected effectiveness in the prevention and therapy of OA that would be safe to use and developing methods of delivering the final product into the body. The authors reviewed and analysed the latest available literature by selecting papers presenting the findings of studies conducted in line with the principles of Evidence-Based Medicine (EBM). The studies have been ordered from *in vitro* trials (studies on animals in the laboratory setting, use of tissue engineering methods to assess the effect of cartilage transplants, use of different collagen types for development of scaffolds etc.) to *in vivo* clinical trials.

It appears that the findings of the latest multidimensional studies presented below, which confirm the therapeutic effectiveness of new-generation injectable medical collagen preparations, will help these medical products gain their well-deserved position in the comprehensive treatment of osteoarthritis both with respect to their analgesic properties as well as their ability to enable functional recovery and stimulate regeneration of tissues at the molecular level.

**Key words:** collagen, osteoarthritis, viscosupplementation

Kolagen stanowi ok. 30% masy wszystkich białek organizmu człowieka, co daje ok. 6% całkowitej masy ciała. Występuje w większości tkanek i narządów, w tym w skórze, kościach, chrząstkach, ścięgnach, więzadłach, naczyniach krwionośnych, rogówce i in. Obrazowy przykład pokazuje, że u człowieka o wadze ok. 75 kg, 15 kg stanowią białka – w tym ok. 7,5 kg kolagen [1].

Nazwa kolagen pochodzi z języka greckiego: *colla* – klej, *genno* – rodzic. Już sama nazwa ukazuje funkcję kolagenu będącego białkiem spajającym elementy komórkowe, umożliwiającym powstanie z pojedynczych komórek, tkanek i narządów. Kolagen występujący w organizmie pozostaje w stanie ciągłej wymiany, której szybkość uzależniona jest od rodzaju tkanki i narządu. Najdłużej utrzymuje się w kościach, gdzie wymiana, w procesie degradacji i syntezy, następuje w ciągu 1 roku, a najmniej trwałe występuje w wątrobie, gdzie wymiana odbywa się co miesiąc. Kolagen jest białkiem prostym, zbudowanym wyłącznie z aminokwasów. Składa się z długich, spiralnych łańcuchów peptydowych złożonych z 19 aminokwasów, z których najważniejsze to prolina, glicyna, hydroksyprolina i hydroksylizyna, przy czym warto podkreślić, że dwa ostatnie nie występują praktycznie w innych białkach lub występują sporadycznie, w niewielkich ilościach, jak również fakt, że hydroksyprolina, jako specyficzny aminokwas, wykorzystywana jest do ilościowego oznaczania kolagenu [2,3].

Wraz z wiekiem zdolność syntezy kolagenu przez organizm maleje. Zmiany fizjologiczne zachodzące w organizmie w procesie starzenia dotyczą również tkanki łącznej, której głównym składnikiem jest kolagen, podlegający postępującemu przekształceniu z postaci rozpuszczalnej, występującej w tkance młodej, do nierozpuszczalnej. Ubytek rozpuszczalnego kolagenu jest zjawiskiem naturalnym w procesie starzenia, jak również potęgowanym w przypadku różnych chorób – w tym choroby zwyrodnieniowej stawów.

Kolagen, jak każde białko, powstaje z połączenia co najmniej 100 aminokwasów tworzących łańcuchy polipeptydowe, których skład aminokwasowy powoduje, że tworzą one spiralę przybierającą kształt przestrzenny nazwany superhelisą. Superhelisa utworzona jest z 3 łańcuchów polipeptydowych skręconych wzajemnie w kształcie trójżyłowej liny. Istotną cechą takiej budowy jest powtarzająca się sekwencja trzech reszt aminokwasowych o ogólnym wzorze -X-Y-Z-, gdzie reszty Y i Z stanowią najczęściej prolina lub hydroksyprolina wbudowane w łańcuch polipeptydowy. Związki te, powszechnie określane jako aminokwasy, w rzeczywistości są iminokwasami o budowie heterocyklicznej, zawierającymi w pierścieniu atom azotu. Dzięki temu wiązanie peptydowe utwo-

Collagen constitutes ca. 30% of the mass of all proteins in the human body, which translates into ca. 6% of the whole body mass. It is present in most tissues and body organs, including the skin, knees, cartilage, tendons, ligaments, blood vessels and cornea. To illustrate these data, in a person weighing ca. 75 kg, proteins account for 15 kg of the body and collagen represents ca. 7.5 kg [1].

The term 'collagen' originates from Greek roots: *colla* – 'glue' and *genno* – 'give birth to'. The word itself indicates the function of collagen, which is a protein binding cell elements and integrating individual cells into tissues and body organs. Collagen in the body undergoes constant turnover whose rate varies with the tissue and body organ. The collagen life-cycle is longest in the bones, where the turnover resulting from collagen degradation and synthesis is completed in one year, and shortest in the liver, with a turnover period of one month. Collagen is a simple protein, composed solely of amino acids. It is formed of long spiral peptide chains composed of 19 amino acids, the most important of which include proline, glycine, hydroxyproline and hydroxylysine. A noteworthy fact is that the last two amino acids are practically not found in other proteins or are found there only occasionally and in small amounts. For this reason, hydroxyproline is used as a specific amino acid in quantitative collagen assays [2,3].

Aging is associated with a reduction in the body's ability to produce collagen. Physiological changes taking place in the body with age also affect the connective tissue, composed predominantly of collagen, which is progressively transformed from a soluble form, found in young tissues, to an insoluble substance. The loss of soluble collagen occurs naturally as part of the aging process but it is also intensified by certain conditions, such as osteoarthritis (degenerative joint disease).

Collagen, as any other protein, is a combination of at least 100 amino acids forming polypeptide chains. Due to the specific amino acid composition of chains, they form a spiral shaped as a triple helix. The triple helix is formed of three polypeptide chains coiled together into a three-stranded rope. A significant feature of this structure is a repeated sequence of three amino acid residues forming a general pattern of -X-Y-Z-, where the Y and Z residues are most frequently proline or hydroxyproline integrated into the polypeptide chain. These compounds, commonly referred to as amino acids, are actually imino acids possessing a heterocyclic structure with a nitrogen atom in the ring. For this reason, the peptide bond between the amino acid residues has a different spatial configuration and is 'rigid' compared to bonds

zione pomiędzy resztami aminokwasowymi posiada inną konfigurację przestrzenną i jest „usztynione”, w porównaniu do wiązania łączącego inne aminokwasy. Dwie reszty iminokwasowe powtarzające się w trypletowej sekwencji łańcucha polipeptydowego, nadają mu strukturę o kształcie spirali. Trzecia reszta aminokwasowa (-X-) w łańcuchu, to część glicynowa. Glicyna posiada najmniejszą cząsteczkę ze wszystkich aminokwasów, co też wpływa na kształt całego łańcucha polipeptydowego. Trzy skręcone spiralnie łańcuchy polipeptydowe tworzą razem superhelisę i stanowią podstawę struktury molekularnej, wyróżniającą kolageny wśród innych białek. Budowa superhelisowa nie tworzy całej cząsteczki kolagenu. W poszczególnych białkach z tej grupy występują zarówno końcowe, jak i włączone pomiędzy fragmenty superhelisowe, odcinki cząsteczki pozbawione budowy superhelisy. Jednak, aby białko zostało zaliczone do grupy kolagenów, struktura superhelisowa musi dominować ilościowo w całej cząsteczce. Białka, które zawierają jedynie mały fragment cząsteczki o budowie superhelisowej, określone są jako białka kolagenopodobne. Poszczególne łańcuchy polipeptydowe tworzące cząsteczkę kolagenu są syntetyzowane w całości i są produktem odrębnych genów [4,5].

W organizmie człowieka występuje 20 typów kolagenu, z których opisano 12, a pozostałe 8 nie są jeszcze dokładnie sklasyfikowane. Specyficzna budowa kolagenu powoduje, że posiada on szczególne właściwości, które mogą się wyrażać odmiennym niekiedy oddziaływaniem na tkanki, których jest integralnym składnikiem. Zachowując elastyczność, wpływa jednocześnie na odporność i wytrzymałość działających sił ściągających i rozciągających.

Synteza kolagenu w warunkach fizjologicznych, wynikająca ściśle z uwarunkowań genetycznych, podlega także procesom epigenetycznym, regulacji hormonalnej (w głównej mierze kortyzolu, hormonów płciowych np. w okresie menopauzy), a także czynników środowiskowych, jak dieta i aktywność fizyczna. Wykazano, że rodzaj aktywności fizycznej, którą wykonuje człowiek angażując w różnym stopniu poszczególne jednostki układu mięśniowo-szkieletowego, determinuje zarówno syntezę, jak i degradację kolagenu, a także jego dystrybucję w organizmie [6,7].

Procesy metaboliczne związane z syntezą i degradacją kolagenu zachodzące w warunkach *in vivo*, podlegają zmianom na skutek fizjologicznego starzenia się organizmu, ale są w znaczącym stopniu potęgowane wpływem różnych chorób i obrażeń – w tym choroby zwyrodnieniowej stawów (ChZS), na skutek której przyspieszony rozpad kolagenu, będący patognomonicznym objawem ChZS, nie jest rekompensowany wystarczającą jego syntezą.

connecting other amino acids. The two imino acid residues repeated in the triplet sequence of the polypeptide chain afford the chain a spiral structure. The third (-X-) residue in the chain is a glycine moiety. Glycine is the smallest molecule of all amino acids, which also influences the shape of the polypeptide chain as a whole. The three spirally coiled polypeptide chains form a superhelix, which represents the basis of the molecular structure setting collagens apart from other proteins. The collagen molecule is not formed exclusively of superhelices. Individual proteins from this group contain fragments without the superhelix structure, which are found both terminally as well as between the coiled parts. However, for a protein to be classified as collagen, the superhelix needs to prevail in the molecule. Proteins with only a small fragment of a superhelix in the molecule are referred to as collagen-like proteins. Individual polypeptide chains forming a collagen molecule are synthesised as a whole and are produced by separate genes [4,5].

The human body contains 20 types of collagen, 12 of which have already been described in the literature and the remaining 8 types have not been precisely classified to date. Due to the unique structure of collagen, it displays special characteristics which may exert sometimes differing effects on the tissues whose integral part collagen constitutes. Collagen provides elasticity, while at the same time maintaining resistance and endurance to compressive and stretching forces.

The synthesis of collagen under physiological conditions, which is closely driven by genetic factors, is also dependent on epigenetic processes, hormone regulation (in particular by cortisol and sex hormones, e.g., at the menopause) and environmental factors, such as diet and physical activity. It has been demonstrated that the type of physical activity undertaken by the individual, which engages various elements of the musculoskeletal system to differing degrees, determines both synthesis and degradation of collagen as well as its distribution within the body [6,7].

Metabolic processes associated with synthesis and degradation of collagen which take place *in vivo* undergo changes as a result of physiological aging of the body but they are also strongly accelerated by various conditions and injuries, including osteoarthritis (OA), where increased degradation of collagen, a pathognomonic symptom, is not offset by sufficient synthesis of this protein.

In view of the significant role of collagen in appropriate functioning of the musculoskeletal system and disturbances of protein metabolism in OA, it seems understandable that delivery of the protein from

Z uwagi na istotną rolę kolagenu w prawidłowym funkcjonowaniu narządu ruchu i zaburzeniach jego metabolizmu występujących w ChZS, wydaje się zrozumiałe, że dostarczanie tego białka z zewnątrz może opóźnić nieuchronne procesy degeneracyjne – dążąc do zapewnienia równowagi pomiędzy fazami rozpadu (degradacji) a stymulacją syntezy na poziomie *in vivo* i suplementacją *in vitro*.

W ciągu ostatnich kilkunastu lat przeprowadzono na świecie liczne i wielokierunkowe badania naukowe, których zadaniem było wyodrębnienie odpowiednich substancji zawierających w swoim składzie kolagen, wytworzenie preparatów leczniczych charakteryzujących się oczekiwaną skutecznością terapeutyczną w profilaktyce i leczeniu ChZS, bezpieczeństwem stosowania, jak również opracowaniem metod „dostarczenia” gotowego produktu do organizmu. Aktualnie na rynku dostępne są różne preparaty kolagenowe, opracowane pod względem technologicznym i dystrybuowane przez wielu producentów, różniące się często źródłem pochodzenia substancji czynnej, biodostępnością i biowchłanianością, pełnym składem (zawartością w produkcie dodatkowych substancji czynnych), odmienną farmakokinetyką i farmakodynamiką, a także sposobem podania. W profilaktyce i leczeniu zachowawczym ChZS stosowane są, dostępne powszechnie na rynku w postaci suplementów diety, preparaty doustne w formie pojedynczej lub w połączeniu z innymi substancjami (m. in. glikozaminoglikany – chondroityna i glukozamina, hialuroniany, zestawy witaminowe i in.), aplikowane miejscowo (przezskórnice) w postaci maści, żelu lub tp., a także w postaci iniekcyjnej. Preparaty kolagenu stosowane w formie iniekcji przygotowywane są z uwzględnieniem różnych sposobów aplikacji: podskórna, śródskórna, domięśniowa, dostawowa, okołostawowa, a także okołonerwowa (preparat kolagenowy podawany w okolicy nerwu obwodowego lub korzenia nerwowego).

Dokonano przeglądu i analizy najnowszej dostępnej literatury, opierając się na publikacjach ukazujących wyniki badań przeprowadzonych zgodnie z metodologią EBM (*evidence based medicine*), tj. randomizowanych, z wykorzystaniem placebo i podwójnie ślepej próby. Zaprezentowane badania zostały usystematyzowane – od prób przeprowadzonych *in vitro* (badania laboratoryjne na zwierzętach, z wykorzystaniem metod inżynierii tkankowej w celu oceny efektów przeszczepu chrząstki, zastosowaniu różnych postaci kolagenu w przygotowaniu skafoldów itp.), do badań klinicznych, wykonanych *in vivo*.

Jak wykazały badania przeprowadzone na królikach, u których indukowano rozwój choroby zwyrodnieniowej stawu kolanowego, tripeptydy kolage-

outside in an effort to ensure balance between degradation and stimulation of synthesis at *in vivo* level and *in vitro* supplementation may delay the inevitable degenerative process.

Within the last two decades numerous and diverse studies have been conducted worldwide with the aim of identifying substances containing collagen, producing therapeutic preparations of expected effectiveness in prevention and therapy of OA that would be safe to use and developing methods of delivering the final product into the body. Currently, various collagen preparations are available on the market, produced according to known technologies and distributed by numerous manufacturers, the differences between them commonly including the source of the active substance, bioavailability and bioabsorbability, total composition (presence of additional active ingredients), pharmacokinetics and pharmacodynamics and the manner of administration. Prevention and conservative treatment of OA rely on preparations that are widely available on the market in the form of dietary supplements, preparations for oral use containing collagen as the only active ingredient or combined with other ingredients (e.g. glycosaminoglycans, such as chondroitin and glucosamine, hyaluronates, vitamin complexes), topical products (for transcutaneous use) in the form of an ointment, gel or tape? as well as injectable preparations. Injectable preparations are available for various routes of administration: subcutaneous, intramuscular, intraarticular, periarticular and perineural (collagen preparation administered to the area surrounding a peripheral nerve or nerve root).

We reviewed and analysed the latest available literature by selecting papers presenting the findings of studies conducted in line with the principles of Evidence-Based Medicine (EBM), i.e. randomised double-blind placebo-controlled studies. The studies have been ordered from *in vitro* trials (studies on animals in laboratory setting, use of tissue engineering methods to assess the effect of cartilage transplants, use of different collagen types for development of scaffolds etc.) to *in vivo* clinical trials.

As demonstrated by studies on rabbits in which knee osteoarthritis had been induced artificially, collagen tripeptides demonstrating a Gly-Xaa-Yaa sequence, administered intraarticularly, can delay degeneration of articular cartilage at its initial stages [8]. The injections were administered at weekly intervals, starting from the day of the induction of OA. Intraarticular administration of a solution of only tripeptides, obtained by hydrolysis of porcine gelatin, as well as that of tripeptides combined with hyaluronic acid delayed the degenerative process com-

nowe o sekwencji Gly-Xaa-Yaa podawane dostawo-wo, są w stanie spowolnić początkowe etapy procesu degeneracji chrząstki stawowej [8]. Iniekcji dokonywano w odstępach tygodniowych, zaczynając od dnia indukcji rozwoju choroby. Podanie dostawowe roztworu samych tripeptydów pochodzących z hydrolizy żelatyny wieprzowej, jak i tripeptydów w połączeniu z kwasem hialuronowym, opóźnia procesy degeneracyjne w obrębie stawu w porównaniu z grupą kontrolną, która otrzymywała iniekcje z solą fizjologiczną. Efekt ochronny tripeptydów wynika najprawdopodobniej z pobudzania chondrocytów do syntezy kolagenu typu II, a więc stymulacji procesów anabolicznych w obrębie chrząstki. Analiza immunohistochemiczna wykazała również, że tripeptydy nie wpływają na ilość metaloproteinazy 13 (MMP-13), głównej proteazy odpowiedzialnej za degradację kolagenu typu II w chorobie zwyrodnieniowej chrząstki stawowej.

Natomiast kowalencyjne połączenie kolagenu z poliwinylpirolidonem (PVP), pozwoliło na uzyskanie preparatu o odmiennych właściwościach fizykochemicznych i farmakologicznych niż te, jakimi charakteryzują się wyjściowe związki [9]. Kolagen-PVP, to poddana działaniu promieniowania gamma mieszanina wieprzowego atelokolagenu typu I (kolagen, który na skutek przeprowadzenia enzymatycznej hydrolizy utracił potencjalnie immunogenne, niehelikalne odcinki peptydowe znajdujące się na obu końcach cząsteczki kolagenowej) oraz PVP, syntetycznego i biokompatybilnego polimeru, stosowanego powszechnie, jako substancja wypełniająca bądź wiążąca w farmacji [10]. Często stanowi element systemu kontrolowanego uwalniania leków, stosowany jest także do modyfikacji powierzchni wyrobów medycznych lub implantów oraz w przemyśle kosmetycznym i spożywczym.

W przeprowadzonym metodą podwójnie ślepej próby, prospektywnym, kontrolowanym placebo badaniu klinicznym z randomizacją, oceniano skuteczność i bezpieczeństwo preparatu zawierającego kolagen-PVP w leczeniu choroby zwyrodnieniowej stawu kolanowego. Do badania włączono 53 pacjentów, którym zaaplikowano 12 iniekcji dostawowych o objętości 2 ml każda, przez okres 6 miesięcy. Grupa badana otrzymywała kolagen-PVP (każdorazowo 16,6 mg kolagenu), natomiast grupie kontrolnej podawano roztwór PVP w buforze cytrynianowym. Całkowity czas trwania badania wynosił 49 tygodni. Ocenę przeprowadzano przy użyciu skali VAS (ocena intensywności bólu), indeksu WOMAC oraz indeksu Lequesne'a. Analizowano także skuteczność leczenia w ocenie pacjentów oraz lekarzy, a także stosowanie leków przeciwbólowych. Preparat zawierający kopoli-

pared to a control group which received injections containing only physiological saline. The protective effect of tripeptides is probably due to stimulation of chondrocytes to produce type-II collagen, i.e. stimulation of anabolic processes in the cartilage. Immunohistochemical analysis also revealed that tripeptides did not affect the amount of matrix metalloproteinase 13 (MMP-13), the main protease responsible for degradation of type-II collagen in degenerative disease of the articular cartilage.

Covalent combination of collagen with polyvinylpyrrolidone (PVP) made it possible to produce a preparation with physicochemical and pharmacological properties different from those of the substrates [9]. Collagen-PVP is a gamma-irradiated mixture of porcine type I atelocollagen (collagen which lost its potentially immunogenic non-helical C- and N-terminal peptide segments as a result of enzymatic hydrolysis) and PVP (a synthetic and biocompatible polymer commonly used as a filler or binder in pharmacy) [10]. It is frequently used in controlled-release drug delivery systems and to modify the surface of medical products or implants as well as in the cosmetic and food industries.

A double-blind, randomised, prospective, placebo-controlled clinical trial assessed the effectiveness and safety of a collagen-PVP preparation in the treatment of knee osteoarthritis. The study enrolled 53 patients, who received 12 intraarticular injections of 2 ml each over a period of 6 months. The investigational drug arm received collagen-PVP (each dose of 16.6 mg of collagen) and a control arm was administered a PVP solution in a citrate buffer. The duration of the study was 49 weeks. The evaluation used a VAS scale for assessment of pain intensity, the WOMAC index and the Lequesne Index. The opinion of patients and doctors on the treatment effectiveness and consumption of analgesics were also analysed. The preparation containing collagen-PVP copolymer proved to be safe and well tolerated by study participants. The viscosupplementation offered significant relief from pain, as analysis of the results (WOMAC, VAS and Lequesne Index) showed significant improvement compared to the baseline scores and those in the placebo arm. The levels of CTXII (C-terminal cross-linked telopeptide of type II collagen  $\alpha$  chains), determined immunoenzymatically in the urine, increased only in the placebo group, which suggested progressive degeneration of cartilage in those patients. In the participants receiving collagen-PVP co-polymer, the levels of the CTXII marker of cartilage degradation did not change throughout the study, while the consumption of analgesics was reduced significantly compared both to the baseline and to the control arm [11].

mer kolagen-PVP okazał się bezpieczny i dobrze tolerowany przez uczestników badania. Wiskosuplementacja dostarczyła istotnej ulgi w dolegliwościach bólowych, analizując wyniki (punktacja w skali WOMAC, VAS, indeks Lequesne'a) odnotowano istotną statystycznie poprawę w porównaniu z punktacją wyjściową oraz placebo. Oznaczany immunoenzymatycznie poziom CTXII (C-końcowe usieciowane tolopeptydy łańcuchów  $\alpha$  kolagenu typu II) w moczu, wzrastał jedynie w grupie otrzymującej placebo, co sugerowało postęp w zmianach degeneracyjnych chrząstki u pacjentów należących do tej grupy. U pacjentów otrzymujących kopolimer kolagen-PVP, poziom markera degradacji chrząstki CTXII nie ulegał zmianie w czasie trwania badania, natomiast stosowanie środków przeciwbólowych uległo statystycznie istotnemu zmniejszeniu w porównaniu zarówno ze stanem wyjściowym, jak i z grupą kontrolną [11].

W celu poznania mechanizmu odpowiedzialnego za obserwowane *in vivo* efekty działania preparatu kolagen-PVP w terapii zmian zwyrodnieniowych stawu kolanowego, przeprowadzono badania polegające na sprawdzeniu wpływu stosowanego bioleku na hodowle tkankowe prowadzone *in vitro*. W tym celu od 5 pacjentów z objawową chorobą zwyrodnieniową stawu kolanowego, którzy przeszli zabieg całkowitej endoprotezoplastyki, pobrano tkankę chrzęstną oraz błonę maziową. Uzyskany materiał posłużył do założenia kokultur *in vitro*, które inkubowano przez 7 dni w obecności 1% roztworu kopolimeru kolagen-PVP. Po 1 oraz 7 dniach hodowli oceniano zawartość proteoglikanów, immunoenzymatycznie mierzono ilość uwolnionych pro- i przeciwzapalnych cytokin oraz tkankowego inhibitora metaloproteinaz 1 (TIMP-1). Oznaczano również ekspresję kolagenu typu II, oligomerycznego białka macierzy chrząstki (COMP), IL10, TNF- $\alpha$  oraz jądrowego antygenu Ki67, który ulega ekspresji w proliferujących komórkach i pozostaje obecny we wszystkich fazach cyklu komórkowego, poza fazą G0. Kolagen-PVP zwiększa proliferację chondrocytów, produkcję białek macierzy pozakomórkowej (COMP, kolagenu typ II i proteoglikanów), nasila syntezę cytokin przeciwzapalnych (IL10), jednocześnie hamując ekspresję czynników o działaniu prozapalnym, przede wszystkim IL-1 $\beta$  oraz TNF- $\alpha$ . Nie odnotowano natomiast zmian w ilości uwalnianego do pożywki inhibitora TIMP-1 w hodowlach traktowanych kolagenem-PVP, w porównaniu z wariantem kontrolnym. Zatem zastosowane połączenie kolagenu z PVP hamuje stan zapalny charakterystyczny dla chorobowo zmienionego stawu i jednocześnie sprzyja odkładaniu nowych składników macierzy pozakomórkowej, przez co wpływa korzystnie na procesy naprawcze tkanki chrzęstnej [12].

The mechanism responsible for the therapeutic effects of collagen-PVP preparation observed *in vivo* in patients with knee degeneration was investigated in studies aiming to verify the effect of the agent on *in vitro* tissue cultures. Cartilage and synovial membrane were collected from 5 patients with symptomatic knee osteoarthritis who had undergone total knee replacement. The samples were used to establish *in vitro* co-cultures, which were then incubated for 7 days in the presence of 1% solution of collagen-PVP copolymer. At 1 and 7 days of culture, the content of proteoglycans was assessed and the amounts of pro- and anti-inflammatory cytokines released as well as tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-1) were determined immunoenzymatically. The study also involved determining the expression of type II collagen, cartilage oligomeric matrix protein (COMP), IL10, TNF- $\alpha$  and nuclear antigen Ki67, which is expressed in proliferating cells and remains present at all stages of the cell cycle, except for the G0 stage. Collagen-PVP increased proliferation of chondrocytes, production of extracellular matrix proteins (COMP, type II collagen and proteoglycans) and enhanced synthesis of anti-inflammatory cytokines (IL10), simultaneously inhibiting expression of pro-inflammatory factors, in particular IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . On the other hand, there were no changes in the amount of TIMP-1 released into the medium in cultures with collagen-PVP compared to the control sample. Therefore, a combination of collagen and PVP inhibits inflammation characteristic for the osteoarthritic joint and simultaneously promotes deposition of new components of extracellular matrix, which stimulates cartilage repair [12].

Similar *in vitro* experiments were conducted to verify the effect of collagen-PVP preparation on tissue cultures derived from patients suffering from rheumatoid arthritis. In this case, a 1% solution of collagen-PVP also inhibited expression of proinflammatory cytokines and cell adhesion proteins (ICAM-1 and VCAM-1), responsible for leukocyte migration. Furthermore, it modified the cellular metabolism of collagen, increasing the amount of type III collagen produced and inhibiting the formation of tightly bound fibres of type I collagen, with the latter effect reducing fibrosis and enabling restoration of a tissue architecture similar to that of a healthy joint. The collagen-PVP combination also decreased the activity of proteolytic enzymes through such mechanisms as increasing the expression of the tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-1) [13].

Collagen, as a natural element of the structure of extracellular matrix in connective tissue, is predominantly used in tissue engineering products, such as those for tissue engineering of joints. As a perfect

Podobne doświadczenia w warunkach *in vitro* przeprowadzono sprawdzając wpływ preparatu kolagen-PVP na hodowle tkankowe pochodzące od pacjentów cierpiących na reumatoidalne zapalenia stawów. I w tym przypadku 1% roztwór kolagen-PVP wykazuje działanie hamujące ekspresję cytokin prozapalnych, jak również białek adhezji komórkowej (ICAM-1 i VCAM-1), odpowiedzialnych za zjawisko migracji leukocytów. Modyfikuje także komórkowy metabolizm kolagenu, zwiększając ilość syntezowanego kolagenu typu III, a hamując powstawanie ciasno związanych włókien zbudowanych z kolagenu typu I, przez co ogranicza proces włóknienia i umożliwia odtworzenie architektury tkanki zbliżonej do obserwowanej w zdrowym stawie. Połączenie kolagen-PVP zmniejsza również aktywność enzymów proteolitycznych, między innymi poprzez zwiększenie ekspresji tkankowego inhibitora metaloproteina 1 (TIMP-1) [13].

Kolagen, jako naturalny element strukturalny pozakomórkowej macierzy tkanki łącznej, znajduje przede wszystkim zastosowanie w opracowywanych produktach inżynierii tkankowej, w tym inżynierii tkankowej stawów. Jako idealny biomateriał powinien charakteryzować się między innymi takimi cechami, jak: pełna biodegradowalność, brak toksyczności i immunogenności, odpowiednie właściwości mechaniczne, promowanie adhezji komórek, ich proliferacji, różnicowania oraz utrzymywania właściwego fenotypu, ponadto powinien umożliwiać migrację komórek, czyli charakteryzować się odpowiednią wielkością porów sieci, jaką tworzy [14]. Kolagen spełnia większość z tych wymagań, przy czym część parametrów uzależniona jest od procesu wytwarzania biomateriału oraz sposobu i gęstości jego usieciania, jak również pochodzenia białka (gatunek zwierzęcia oraz rodzaj tkanki). Biomateriałom z udziałem kolagenu można nadawać różnorodne formy, m.in. gąbki, cienkie błony, membrany bądź hydrożelowe skafoldy [15].

Technika autologicznej implantacji chondrocytów została zapoczątkowana w latach 80-tych. Początkowo polegała na pobraniu materiału (fragmentu z warstwy pośredniej chrząstki stawowej z miejsca nieobciążanego), hodowli *in vitro* w celu namnożenia komórek, a następnie aplikacji autologicznych chondrocytów w miejscu uszkodzonym, z użyciem płatka okostnej pobranej zazwyczaj z kości piszczelowej (ACI-P). Następnie płatek okostnej zastąpiono dwuwarstwową błoną kolagenową (ACI-C), co zredukowało częstość przerastania przeszczepu. Technika mikroślamań została również połączona z biomateriałami; użycie błony kolagenowej pozwoliło na zapewnienie dobrych warunków komórkom macierzystym do chondrogenyzy [16]. Najnowsze metody

biomateriał, it should possess in particular the following characteristics: complete biodegradability, absence of toxicity or immunogenicity, appropriate mechanical properties, promotion of cell adhesion, proliferation and differentiation as well as maintenance of an appropriate phenotype and enabling migration of cells, i.e., it should be characterised by an appropriate size of pores in the network that it forms [14]. Collagen meets most of the above requirements, some of the parameters being dependent on the process of biomaterial manufacturing and the manner and density of its cross-linking as well as the source of the protein (species of the animal and type of tissue). Collagen-containing biomaterials may be produced in various forms, including sponges, thin membranes, membranes or hydrogel scaffolds [15].

The technique of autologous chondrocyte implantation dates back to the 1980s. Initially, it consisted in collecting the material (a fragment from the intermediate zone of cartilage in a non-load-bearing site), culturing it *in vitro* to increase the number of cells and then implanting autologous chondrocytes to the damaged site using a periosteal flap, usually harvested from the tibia (ACI-P). Subsequently, the periosteal flap was replaced by a bilayer collagen membrane (ACI-C), which reduced the incidence of transplant overgrowth. The microfracture technique has also been combined with biomaterials: the use of a collagen membrane ensured good conditions for chondrosynthesis for the stem cells [16]. The latest methods of treating full-thickness defects in articular cartilage include implantation of autologous chondrocytes cultured *in vitro* in a biomaterial matrix or scaffold (Matrix-induced autologous chondrocyte implantation, MACI). This is third-generation ACI [17]. The role of the scaffold is to provide a spatial framework for chondrocytes previously harvested from the patient. It ensures even distribution of chondrocytes in three dimensions [16].

Collagens that make up extracellular matrix fibres in articular cartilage most importantly include Type II, but also Type IX, X, XI, XII and XIV collagens [17,18].

Type II collagen was used as a scaffold for implantation of chondrocytes in a study conducted in rabbits. After being cultured *in vitro* for 1 week, isolated chondrocytes were suspended in a Type II collagen solution. Following the addition of a cross-linking agent (polyethylene glycol), an injection was made at the site of a full-thickness cartilage defect in the knee, without using a periosteal flap graft. Gelation took place within several minutes of application at the site of the defect; the biomaterial attached to the surrounding tissues and produced a smooth sur-

leczenia ubytków chrząstki stawowej pełnej grubości obejmują implantację autologicznych chondrocytów hodowanych *in vitro* w biomateriałowej macierzy – skafoldzie (Matrix-induced autologous chondrocyte implantation, MACI), czyli ACI trzeciej generacji [17]. Rolą skafoldu jest utworzenie przestrzennego rusztowania dla chondrocytów pobranych wcześniej od pacjenta. Zapewnia to ich równomierną dystrybucję w trójwymiarowym układzie [16].

Do kolagenów budujących włókna macierzy pozakomórkowej chrząstki stawowej należy przede wszystkim kolagen typu II, ale również obecne są typy IX, X, XI, XII oraz XIV [17, 18].

Kolagen typu II zastosowano jako rusztowanie pozwalające na implantację chondrocytów w badaniach przeprowadzonych na królikach. Izolowane chondrocyty, po tygodniowej hodowli *in vitro*, zawieszano w roztworze kolagenu typu II, dodawano związek sieciujący (glikol polietylenowy) i wstrzykiwano w miejsce ubytku chrząstki pełnej grubości w stawie kolanowym, nie stosując jednoczesnego przeszczepu płata okostnej. Biomateriał żelował w ciągu kilku minut po naniesieniu w miejsce ubytku, wiążąc się z otaczającą tkanką i dając gładką powierzchnię. Analiza po 8 tygodniach od zabiegu wykazała obecność w miejscu przeszczepu głównie tkanki szklistej oraz chondrocytów o prawidłowej morfologii. 24 tygodnie po implantacji, podlegające regeneracji miejsce zawierało głównie kolagen typu II [19].

Zaletą systemów wstrzykiwanych, czyli płynów bądź zawiesin żelujących w miejscu ubytku, jest możliwość dokładnego wypełnienia nieregularnych ubytków tkanki, jak również zmniejszenie inwazyjności samego zabiegu implantacji materiału. Ponadto technika umożliwia równomierną dystrybucję zawieszonych w biomateriale komórek oraz wygodną aplikację czynników wzrostu. Opierając się na powyższych założeniach, sprawdzono w warunkach *in vitro* czy formowany *in situ* hydrożel składający się z kolagenu typu II i hialuronianu, usieciowany pochodną glikolu polietylenowego i wzbogacony w TGFβ1, zapewni chondrocytom odpowiednie warunki do wzrostu i zachowania fenotypu. Hodowla komórek w sieci hydrożelu o testowanym składzie, sprzyjała syntezie glikozoaminoglikanów oraz ekspresji genów kolagenu typu II, a także agrekanu, charakterystycznych dla zróżnicowanych chondrocytów [20].

Powyższe rozwiązania skupiają się więc na utworzeniu przestrzennego rusztowania, struktury biodegradowalnej, odpowiednio uwodnionej i o odpowiedniej morfologii. W innych badaniach przeprowadzonych na hodowlach *in vitro* testowano działanie dodawanych innych czynników wzrostu, np. insuliny, IGF1, BMP-2 [21, 22].

face. An analysis conducted at 8 weeks showed mostly hyaline cartilage and morphologically normal chondrocytes at the site of transplantation. At 24 weeks after the implantation, the site undergoing regeneration contained mostly Type II collagen [19].

Injectable systems, that is liquids or suspensions that form gels at the site of the defect, have the advantage of allowing for thorough filling of irregular tissue defects and decreasing the invasiveness of the implantation procedure. Moreover, the technique contributes to an even distribution of cells suspended in the biomaterial and easy administration of growth factors. Based on these assumptions, an *in vitro* test was conducted to see whether a hydrogel formed *in situ*, consisting of Type II collagen and hyaluronate cross-linked with a polyethylene glycol derivative and enriched with TGF-β1, would provide chondrocytes with an environment appropriate for them to grow and maintain their phenotype. Culturing cells in the network of such hydrogel contributed to the synthesis of glycosaminoglycans and expression of the genes of Type II collagen and aggrecan, which are typical of differentiated chondrocytes [20].

Consequently, these solutions focus on the formation of a spatial scaffold, a biodegradable structure that is well hydrated and has an appropriate morphology. Other studies of *in vitro* cultures have tested the effects of adding other growth factors, e.g. insulin, IGF1, and BMP-2 [21, 22].

However, the use of Type II collagen in regenerative medicine is associated with several limitations. Firstly, this type of collagen is more expensive and difficult to obtain when compared with Type I, the most commonly used collagen type in biomedical engineering, mainly due to the lack of appropriate sources, that is materials used to isolate Type II collagen [23]. Another important issue concerns immunogenicity. Administration of allogeneic or xenogeneic Type II or XI collagen with Freund's adjuvant induces arthritis in certain animal species; this has been utilised in the development of animal models of rheumatoid arthritis. One may fear that a similar reaction might occur in humans, particularly seeing that patients with rheumatoid arthritis have antibodies that react with Type II collagen. These antibodies are also able to bind to Type II collagen of other mammalian species [24, 25].

Lower availability of Type II collagen and the risk of an immune reaction have probably been the reason for the current situation, scaffolds made of Type I or Type I and III collagen are used in clinical practice. These are isolated from such sources as bovine, porcine or calf skin, rat tails and bovine tendons [15].



Z wykorzystaniem kolagenu typu II dla potrzeb medycyny regeneracyjnej wiąże się jednak kilka ograniczeń. Po pierwsze jest on droższym i trudniejszym do uzyskania typem kolagenu w porównaniu z najpowszechniej stosowanym w inżynierii biomedycznej typem I, głównie z uwagi na brak odpowiednich źródeł – materiałów do izolacji kolagenu typu II [23]. Drugim istotnym zagadnieniem jest sprawa immunogenności. Podanie allogenicznego bądź ksenogenicznego kolagenu typu II lub XI z adiuwantem Freund'a, indukuje rozwój artretyzmu u pewnych gatunków zwierząt, co znalazło zastosowanie w opracowaniu zwierzęcych modeli badawczych reumatoidalnego zapalenia stawów. Budzi to obawy wystąpienia analogicznej reakcji u ludzi, szczególnie, że u pacjentów dotkniętych reumatoidalnym zapaleniem stawów obecne są przeciwciała reagujące z kolagenem typu II. Przeciwciała te są również zdolne do wiązania się z kolagenem typu II innych gatunków ssaków [24, 25].

Prawdopodobnie mniejsza dostępność kolagenu typu II i istnienie ryzyka wystąpienia reakcji immunologicznej zadecydowało, że w praktyce klinicznej stosowane są skafoldy wytwarzane z kolagenu typu I oraz I i III. Do źródeł, z jakich są pozyskiwane, należą: skóra wołowa, wieprzowa bądź cielęca, ogon szczurzy, ścięgno wołowe [15].

Dodatkowo, badania *in vitro* porównujące hodowle chondrocytów na matrycach zbudowanych z kolagenu typu I oraz II, dostarczyły kolejnego argumentu przemawiającego za stosowaniem biomateriałów wykonanych z kolagenu typu I. Mianowicie tempo degradacji skafoldu wykonanego z kolagenu typu I było znacznie wolniejsze, dłużej służył jako przestrzenne rusztowanie dla hodowli, charakteryzował się bardziej równomierną strukturą sieci i wytworzonych porów [8]. Inna grupa badawcza wykazała, że skafold wykonany z kolagen typu I, jest w stanie zapewnić warunki pozwalające chondrocytom na zachowanie pożądanej morfologii, aktywności syntetycznej oraz żywotności [26].

W praktyce klinicznej, w technice MACI, jedną ze stosowanych matryc jest podłoże wytworzone z kolagenu typu I i III pochodzenia wieprzowego [27]. Zaklasyfikowany jako produkt leczniczy terapii zaawansowanej (ang. *Advanced Therapy Medicinal Product*, ATMP), wskazany jest do stosowania w celu odbudowy objawowych ubytków pełnej grubości chrząstki stawu kolanowego (stopnia III i IV w zmodyfikowanej skali Outerbridge'a) o powierzchni 3-20 cm<sup>2</sup>, u dorosłych pacjentów z dojrzałym układem szkieletowym. Chondrocyty, po pobraniu od pacjenta i namnożeniu, są następnie wysiewane na skafold, przycinany podczas zabiegu przez chirurga do rozmiaru

In addition, *in vitro* studies comparing chondrocytes cultured on matrices of Type I and II collagen have provided another argument for the use of biomaterials made of Type I collagen, namely the fact that scaffolds made of Type I collagen degraded at a significantly slower rate, served as spatial scaffolds for the culture for a longer time and were characterised by a more regular structure of the network and the resultant pores [8]. Another research team showed that Type I collagen scaffolds are able to produce an environment that allows chondrocytes to maintain the desired morphology, synthetic activity and viability [26].

One of the matrices used in the MACI technique in clinical practice is a substrate of porcine Type I and III collagen [27]. Classified as an advanced therapy medicinal product (ATMP), it is indicated for reconstruction of symptomatic full-thickness knee cartilage defects (modified Outerbridge Grade III and IV) with an area of 3–20 cm<sup>2</sup> in adults with a mature skeletal system. Chondrocytes are harvested from the patient, proliferate and are then planted on the scaffold, which is cut by the surgeon during the procedure to fit the size and shape of the defect. Next, the entire system is placed at the target site and sealed with fibrin glue [16].

A randomised prospective clinical study was conducted to compare the efficacy of autologous chondrocyte implantation with a collagen membrane and matrix-induced chondrocyte implantation (ACI-C vs. MACI); its results were published in 2005. The study enrolled 91 patients with symptomatic knee cartilage damage. A total of 44 patients underwent ACI-C and 46 subjects received chondrocytes with a collagen matrix (MACI). The advantage of MACI is a more regular distribution of the implanted cells and the lack of sutures (sealing with a tissue adhesive). Moreover, the overall duration of a MACI procedure is shorter. Early results obtained at one year after the procedures showed that both techniques resulted in marked clinical improvements. The percentage of good and excellent outcomes according to the modified Cincinnati score was higher in the case of MACI, but the difference was not statistically significant. Similar results were obtained in an analysis of the scores according to a 4-point ICRS scale. The incidence of graft overgrowth in the ACI-C and MACI techniques was 9% and 6%, respectively, while the incidence of repeat surgery was 9% in both treatment groups. Biopsies conducted in some patients at one year after the procedure revealed the presence of hyaline-like cartilage or hyaline-like cartilage with elements of fibrocartilage [16].

i kształtu ubytku. Następnie całość jest umieszczana w miejscu mającym podlegać regeneracji i uszczelniana klejem fibrynowym [16].

W 2005 roku ukazały się wyniki randomizowanego prospektywnego badania klinicznego, w którym porównano skuteczność techniki implantacji autologicznych chondrocytów z błoną kolagenową oraz chondrocytów indukowanych w macierzy (ACI-C vs. MACI). Badanie objęło grupę 91 pacjentów z objawowymi uszkodzeniami chrząstki stawu kolanowego. Zabieg z zastosowaniem techniki ACI-C przeprowadzono u 44 pacjentów, natomiast u 46 uczestników badania implantowano chondrocyty z matrycą kolagenową MACI. Zaletą MACI jest zapewnienie bardziej równomiernego rozmieszczenie implantowanych komórek oraz brak szwów (uszczelnienie klejem tkankowym). Ponadto zabieg techniką MACI wymaga krótszego czasu na pełne przeprowadzenie. Wczesne, uzyskane po roku od wykonania zabiegów, wyniki pokazują, że obie techniki prowadzą do uzyskania znacznej poprawy klinicznej. Odsetek dobrych i bardzo dobrych wyników wg zmodyfikowanej skali Cincinnati był wyższy dla techniki MACI, ale nie była to różnica istotna statystycznie. Podobne wyniki osiągnięto analizując punktację wg 4-stopniowej skali ICRS. Częstość przerostów przeszczepów wynosiła 9% i 6%, odpowiednio dla techniki ACI-C i MACI, natomiast częstość powtórnej operacji 9% dla obu grup. Przeprowadzona w rok po zabiegu u części uczestników biopsja, wykazała występowanie chrząstki szklstopodobnej lub szklstopodobnej z elementami tkanki chrzęstnej włóknistej [16].

Badanie kliniczne, które obejmowało znacznie dłuższy, 15-letni, czas obserwacji po wykonaniu zabiegów techniką MACI w leczeniu uszkodzeń chrząstki stawu kolanowego wykazało, że metoda ta jest satysfakcjonująca i zapewnia długotrwałe efekty w postaci poprawy funkcji kolana oraz redukcji bólu [28].

Według metaanalizy, której wyniki ukazały się w 2016 roku, techniki stosowane w leczeniu uszkodzeń chrząstki stawu kolanowego o niższym stopniu zaawansowania, np. mikroślamania, po 2 latach od zabiegu dają zbliżone rezultaty do osiąganych przy zastosowaniu bardziej zaawansowanych technik (ACI-C, MACI, przeszczepy chrzęstno-kostne), w kategoriach częstości przeprowadzanych powtórnych operacji oraz poprawy funkcji kolana. Jednakże dłuższy, 5-10-letni okres obserwacji, dostarcza wyników przemawiających na korzyść stosowania zaawansowanych technik służących regeneracji, gdyż przynoszą one trwalsze efekty i pozwalają na uzyskanie tkanki chrzęstnej szklistej lepszej jakości i o bardziej pożądanym właściwościach [29].

A clinical study that involved a much longer follow-up period (15 years) after MACI procedures in the treatment of knee cartilage damage showed that this method is satisfactory and ensures long-term effects in the form of improved knee function and pain reduction [28].

A metaanalysis published in 2016 showed that less advanced techniques used to treat knee cartilage damage, for instance microfractures, produce at 2 years results similar to those obtained with more advanced techniques (ACI-C, MACI, osteochondral grafts) in terms of re-operation rates and knee function improvement. However, longer follow-up (5 to 10 years) provides evidence that may favour the use of advanced techniques aimed at ensuring regeneration as they produce more lasting effects and allow for obtaining hyaline cartilage of better quality and better properties [29].

The collagen medical device ChondroFiller has been used in clinical practice since 2012 to fill articular cartilage defects. Its use is not associated with concomitant cell implantation. The device is supposed to promote colonisation of the material by the patient's native cells from areas adjacent to the defect. ChondroFiller is produced from Type I rat collagen. The product is available in the form of a hydrogel or liquid that gels *in situ* after being administered to the site of damage. Patients undergo only one procedure [30,31]. The usefulness and efficacy of this method has been confirmed, for instance, in a case report published in 2016. The implantation of ChondroFiller collagen during a hip arthroscopy at the site of a Grade IV cartilage defect in a 20-year-old female athlete allowed the patient to return to full professional activity 8 months after the procedure [32].

The JOINT study, a randomised double-blind prospective clinical trial whose results were published in 2016, enrolled a group of 60 male and female subjects with symptomatic knee osteoarthritis and Kellgren and Lawrence Grade II–III radiographic changes. The patients were divided into two groups: Group A (29 patients) received an investigational collagen product MD-Knee in the form of intraarticular injections (two 2.0-ml vials). Group B (31 patients) was a control group; these subjects received one 2.5-ml vial containing a widely used medical device product with sodium hyaluronate (SUPARTZ®). The viscosupplementation procedure was administered five times at 1-week intervals in all patients. The efficacy and safety of the collagen product versus the sodium hyaluronate medical device was assessed at 3 and 6 months after the beginning of the study with the Lequesne index as the primary endpoint, while a visual analogue scale (VAS) for the evaluation of pain, use

W praktyce klinicznej od 2012 roku stosowany jest również kolagenowy wyrób medyczny ChondroFiller, służący do uzupełnień ubytków chrząstki stawowej, którego użycie nie wiąże się z jednoczesną implantacją komórek. Jego zakładane działanie opiera się na promowaniu zasiedlania materiału przez komórki pochodzące z sąsiedztwa ubytku. Chondrofiller wytwarzany jest z kolagenu typu I pochodzenia szczurzego. Wyrób dostępny jest w formie hydrożelu lub płynu, żelującego *in situ* po naniesieniu w miejsce uszkodzenia. Pacjent poddawany jest tylko jednej operacji [30,31]. Jako przykład zasadności i skuteczności wykorzystania tej metody terapii może posłużyć doniesienie z 2016 roku, opublikowane w formie *case report*. Implantacja kolagenu ChondroFiller podczas artroskopii stawu biodrowego w miejsce ubytku chrząstki IV stopnia u 20-letniej kobiety profesjonalnie uprawiającej sport, pozwoliła na powrót do pełnej aktywności zawodowej po 8 miesiącach od zabiegu [32].

Przeprowadzone metodą podwójnie ślepej próby z randomizacją, prospektywne badanie kliniczne JOINT, którego wyniki ukazały się w 2016 roku, obejmowało grupę 60 pacjentów (kobiet i mężczyzn) z objawową chorobą zwyrodnieniową stawu kolanowego i stopniem zaawansowania zmian radiologicznych na poziomie 2-3 według klasyfikacji Kellgrena-Lawrence'a. Pacjentów podzielono na dwie grupy: grupa A (29 uczestników) otrzymywała, w formie iniekcji dostawowych, badany preparat kolagenowy MD-Knee w ilości dwóch fiolek o objętości 2,0 ml. Grupie kontrolnej (grupa B, 31 uczestników) podawano powszechnie stosowany wyrób medyczny zawierający hialuronian sodowy (SUPARTZ®), w ilości 1 fioleki o objętości 2,5 ml. U wszystkich pacjentów wiskosuplementacja została przeprowadzona 5-krotnie w odstępach tygodniowych. Skuteczność i bezpieczeństwo preparatu kolagenowego w porównaniu do wyrobu medycznego zawierającego hialuronian oceniano po 3 i 6 miesiącach od rozpoczęcia badania, stosując indeks Lequesne'a jako pierwotny punkt końcowy oraz wizualną skalę analogową (VAS) dla oceny bólu, stosowanie środków przeciwbólowych i kwestionariusz oceny jakości życia SF-36, jako wtórne punkty końcowe. Terapia wiskosuplementacyjną preparatem kolagenowym pozwoliła na poprawę funkcjonalności leczonych stawów i zmniejszenie dolegliwości bólowych. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupą otrzymującą iniekcje kolagenowe oraz iniekcje z hialuronianem. W obu grupach, po 3 oraz 6 miesiącach od rozpoczęcia badania, uległy obniżeniu punktacje indeksu Lequesne'a i skali bólu VAS, w porównaniu z wartościami wyjściowymi. Stosowanie leków przeciwbólowych oraz ocena jakości życia nie różniły się

of analgesics, and the SF-36 quality of life questionnaire served as secondary endpoints. The collagen viscosupplementation produced pain reduction and improvement in the function of the joints treated. No statistically significant differences were noted between the collagen and hyaluronate arms. Both groups showed lower Lequesne index scores and VAS pain scores at 3 and 6 months as compared with baseline. The consumption of analgesics and quality of life scores did not differ between the groups at any time point. Both viscosupplements were well-tolerated and showed good safety profiles. Consequently, the collagen product resulted in clinical effects similar to those seen after the administration of the reference medical device routinely used in clinical practice. The suggested mechanism underlying the therapeutic effect observed in the patients is based on a structural role of collagen, which provides mechanical support in the joint. The protein molecular weight of MD-Knee is 300 kDa, which is equivalent to a collagen molecule in the form of a triple helix, which may form more organised structures. When hydrolysed into smaller peptides and free amino acids, collagen has nutritive properties after intraarticular administration, stimulating regeneration of the extracellular matrix of the damaged cartilage [33].

In 2016, Mitek et al. reported similar results in a study of 74 patients with joint pain treated due to knee osteoarthritis. The subjects were randomised into 2 groups. The treatment regimen in Group 1 involved intraarticular injections of 2 ml of hyaluronic acid (3 injections at 1-week intervals), while Group 2 received injections of 2 ml of a collagen preparation (5 injections at 1-week intervals). The patients were examined twice: at baseline and after the treatment (4 weeks from the last administration of hyaluronic acid or collagen). The severity of pain in the joint under treatment was assessed with an 11-point NRS. The overall functional status was assessed with WOMAC questionnaires. Treatment efficacy was assessed on the basis of differences between pre- and post-treatment scores in each scale. The study showed that intraarticular collagen injections were as effective as hyaluronic acid injections with respect to functional improvements measured with the WOMAC index in patients with knee osteoarthritis. Moreover, the collagen arm showed significantly higher pain reduction. This was highlighted as an important fact suggesting the need for further studies that will allow for determining optimum use of intraarticular collagen injections in the treatment of osteoarthritis [34].

We believe that the regimen of comprehensive OA treatment including injectable collagen preparations has virtually been developed and accepted.

pomiędzy uczestnikami badania należącymi do obu grup w żadnym z podlegających ocenie punktów czasowych. Oba preparaty wiskosuplementacyjne były dobrze tolerowane i wykazywały wysoki profil bezpieczeństwa. Stosowanie preparatu kolagenowego przynosi więc podobne efekty kliniczne, co referencyjny wyrób medyczny, rutynowo stosowany w praktyce klinicznej. Sugerowany mechanizm obserwowanego efektu terapeutycznego opiera się na strukturalnej roli kolagenu, który dostarcza mechanicznego wsparcia w obrębie stawu. Masa molekularna białka w preparacie MD-Knee wynosi 300 kDa, co odpowiada cząsteczce kolagenu w postaci potrójnej helisy, mogącej tworzyć struktury o wyższym stopniu organizacji. Natomiast po hydrolizie do mniejszych peptydów oraz wolnych aminokwasów, podany dostawowo kolagen wykazuje efekt odżywczy, stymulując regenerację macierzy pozakomórkowej uszkodzonej chrząstki [33].

Podobne wyniki uzyskał Mitek i wsp. w badaniu opublikowanym w 2016 roku, w którym poddano ocenie 74 pacjentów leczących się z powodu choroby zwyrodnieniowej stawu kolanowego, z objawami bólowymi w obrębie stawu. Badani zostali losowo podzieleni na 2 grupy. W grupie I zastosowano schemat leczenia za pomocą iniekcji dostawowych 2 ml kwasu hialuronowego (3 iniekcje w odstępach tygodniowych). W grupie II zastosowano iniekcje 2 ml preparatu kolagenowego (5 iniekcji w odstępach tygodniowych). Pacjenci byli badani dwukrotnie – przed rozpoczęciem leczenia i po jego zakończeniu (4 tyg. od ostatniego podania kw. hialuronowego lub kolagenowego). Do oceny nasilenia dolegliwości bólowych związanych z leczonym stawem użyto 11-stopniowej skali NRS. Do oceny ogólnego stanu funkcjonalnego pacjentów użyto kwestionariuszy WOMAC. Za miarę skuteczności leczenia uznano różnice między wynikami w poszczególnych skalach przed i po leczeniu. W przeprowadzonym badaniu, iniekcje dostawowe z preparatu kolagenu okazały się metodą leczenia równie skuteczną co iniekcje z kwasu hialuronowego pod względem poprawy funkcji mierzonej indeksem WOMAC u pacjentów z chorobą zwyrodnieniową stawu kolanowego. Ponadto odnotowano istotnie lepszą poprawę w zakresie redukcji dolegliwości bólowych u chorych leczonych kolagenem. Podkreślono, że jest to ważna przesłanka dla dalszych badań, które pozwolą na znalezienie optymalnego miejsca zastosowania dla iniekcji dostawowych preparatu kolagenu w schemacie leczenia choroby zwyrodnieniowej stawów [34].

W przekonaniu autorów niniejszej publikacji, schemat kompleksowego leczenia ChZS uwzględniający wykorzystanie preparatów kolagenu w formie iniekcji, został już praktycznie wypracowany i zaakceptowany.

The last 10 years have seen considerable advances in the knowledge about the biological role of collagen in human metabolism and an increasing understanding of the aetiopathogenetic and physiopathological mechanisms leading to the development of numerous disorders of the musculoskeletal system (bones, tendons, ligaments, muscles, fascia or cartilage), certainly including osteoarthritis, which is discussed in this paper. The role of collagen in OA treatment has been sufficiently demonstrated and the availability of new-generation oral, transdermal and injectable collagen-containing products has improved considerably in the last several years. While collagen products applied with “non-invasive” methods (in the form of tablets, ointment, creams etc.) have been known for many years and are widely available on the pharmaceutical market, injectable products developed with a solid and reliable scientific rationale are still not popular enough among orthopaedists or rheumatologists. However, it appears that the findings of the latest multidimensional studies presented in this paper, which confirm the therapeutic effectiveness of new-generation injectable medical collagen preparations, will help these medical products gain their well-deserved position in the comprehensive treatment of osteoarthritis both with respect to their analgesic properties as well as their ability to enable functional recovery and stimulate regeneration of tissues at the molecular level.

W okresie ostatnich 10 lat, wiedza na temat roli biologicznej kolagenu w metabolizmie ustroju człowieka rozwinęła się znacząco. Jednocześnie, coraz pełniejsze stało się zrozumienie mechanizmów etiopatogenetycznych i fizjopatologicznych prowadzących do rozwoju licznych chorób związanych z układem mięśniowo-szkieletowym, obejmujących kości, ścięgna, więzadła, mięśnie, powięźcie czy tkankę chrzęstną – w tym oczywiście chorobę zwyrodnieniową stawów będącą tematem niniejszego doniesienia. Rola kolagenu w leczeniu ChZS jest już dostatecznie udowodniona, a w ostatnich latach zwiększyła się znacząco dostępność do nowych generacji preparatów leczniczych zawierających kolagen, stosowanych doustnie, przezskórnie, a także drogą iniekcji. O ile preparaty kolagenowe aplikowane metodami „nieinwazyjnymi” (w formie tabletek, maści, kremów itp.) są znane już od wielu lat i dostępne powszechnie na rynku farmaceutycznym, to preparaty stosowane w formie iniekcji, opracowane w oparciu o rzetelną i wiarygodną podbudowę naukową, nie są jeszcze wystarczająco upowszechnione wśród specjalistów ortopedii lub reumatologii. Wydaje się jednak, że zaprezentowane w niniejszej publikacji wyniki wielokierunkowych i w pełni wiarygodnych, najnowszych, badań naukowych, które potwierdzają skuteczność terapeutyczną nowych generacji iniekcyjnych preparatów medycznych zawierających kolagen sprawią, że w kompleksowym leczeniu choroby zwyrodnieniowej stawów zajmą one należne im miejsce – zarówno w aspekcie działania przeciwbólowego, odzyskania sprawności funkcjonalnej, jak również wpływu na regenerację tkanek na poziomie molekularnym.

## PIŚMIENNICTWO / REFERENCES

1. Paoletti S. Faszien: anatomie, strukturen, techniken, spezielle osteopathie. München: Urban & Fischer; 2001.
2. Godek P. Collagen therapy in orthopedic practice. *Praktyczna Ortopedia i Traumatologia* 2016; 3: 47-54.
3. Sharif M, Kirwan J, Charni N, Sandell LJ, Whittles C, Garner P. A 5-yr longitudinal study of type IIA collagen synthesis and total type II collagen degradation in patients with knee osteoarthritis- association with disease progression. *Rheumatology (Oxford)* 2007; 46(6): 938-43.
4. Kucharz EJ. Budowa i metabolizm kolagenu oraz jego udział w chorobach kości. *Terapia* 1999; 10(81): 32-5.
5. Barley RD, Adesida AB, Bagnall KM, Jomha NM. Immunohistochemical characterization of reparative tissue present in human osteoarthritic tissue. *Virchows Arch* 2010; 456: 561-9.
6. Wang JH, Guo Q, Li B. Tendon biomechanics and mechanobiology - a minireview of basic concepts and recent advancements. *J Hand Ther* 2012; 25(2): 133-40.
7. Chen J, Wang A, Xu J, Zheng M. In chronic lateral epicondylitis, apoptosis and autophagic cell death occur in the extensor carpi radialis brevis tendon. *J Shoulder Elbow Surg.* 2010; 19(3): 355-62.
8. Naraoka T, Ishibashi Y, Tsuda E, Yamamoto E, Kusumi T, Toh S. Periodic knee injections of collagen tripeptide delay cartilage degeneration in rabbit experimental osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* 2013; 15: R32.
9. Krotzsch G, Furuzawa C. Chronic articular inflammation-modulating composition based on collagen-polyvinylpyrrolidone. *European Patent Application Bulletin* 2007; 158(3): Ep 1 743 931.
10. Kadajji VG, Betageri GV. Water soluble polymers for pharmaceutical applications. *Polymers (Basel)* 2011; 4: 1972-2009.
11. Furuzawa-Carballeda JOA, Muñoz-Chablé J, Barrios-Payán, Hernández-Pando R. Effect of polymerized-type I collagen in knee osteoarthritis. II. In vivo study. *Eur. J. Clin. Invest.* 2009; 7: 598-606.
12. Furuzawa-Carballeda JOA, Muñoz-Chablé J, Barrios-Payán, Hernández-Pando R. Effect of polymerized-type I collagen in knee osteoarthritis. I. In vitro study. *Eur. J. Clin. Invest* 2009; 7: 591-7.

13. Furuzawa-Carballeda JOA, Alcocer-Varela J, Díaz De León L. Collagen-PVP decreases collagen turnover in synovial tissue cultures from rheumatoid arthritis patients. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1999; 6: 598-602.
14. Mafi P, Hindocha S, Mafi R, Khan WS. Evaluation of biological protein-based collagen scaffolds in cartilage and musculoskeletal tissue engineering- a systematic review of the literature. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 2012; 4: 302-9.
15. Lee CH, Singla A, Lee Y. Biomedical applications of collagen. *Int. J. Pharm.* 2001; 1-2: 1-22.
16. Bartlett W, Skinner JA, Gooding CR, et al. Autologous chondrocyte implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects of the knee. *J Bone Jt. Surg* 2005; 5: 640-5.
17. Emans PJ, Peterson L. *Developing Insights in Cartilage Repair*. London: Springer-Verlag; 2014. p. 269-93. DOI 10.1007/978-1-4471-5385-6
18. Zreiqat H, Dunstan C, Rosen V. *A tissue regeneration approach to bone and cartilage repair*. Switzerland: Springer International Publishing; 2015. p. 229-54. DOI 10.1007/978-3-319-13266-2
19. Funayama A, Niki Y, Matsumoto H, et al. Repair of full-thickness articular cartilage defects using injectable type II collagen gel embedded with cultured chondrocytes in a rabbit model. *J. Orthop. Sci.* 2008; 3: 225-32.
20. Kontturi LS, Järvinen E, Muhonen V, et al. An injectable, in situ forming type II collagen/hyaluronic acid hydrogel vehicle for chondrocyte delivery in cartilage tissue engineering. *Drug Deliv. Transl. Res.* 2014; 2: 149-58.
21. Ko EC, Fujihara Y, Ogasawara T, et al. Administration of the insulin into the scaffold atelocollagen for tissue-engineered cartilage. *J. Biomed. Mater. Res.* 2011; 2: 186-92.
22. Ko EC, Fujihara Y, Ogasawara T, et al. BMP-2 embedded atelocollagen scaffold for tissue-engineered cartilage cultured in the medium containing insulin and triiodothyronine-a new protocol for three-dimensional in vitro culture of human chondrocytes. *Tissue Eng. Part C. Methods* 2012; 5: 374-86.
23. Athanasiou KA, Darling EM, Hu JC. *Articular cartilage tissue engineering. Synthesis lectures on tissue engineering*. Morgan & Claypool publishers; 2009. p. 31-54.
24. Lynn AK, Yannas IV, Bonfield W. Antigenicity and immunogenicity of collagen. *J. Biomed. Mater. Res.* 2004; 2: 343-54.
25. Magarian EM, Vavken P, Connolly SA, Mastrangelo AN, Murray MM. Safety of intra-articular use of atelocollagen for enhanced tissue repair. *Open Orthop. J.* 2012; 6: 231-8.
26. Yates KE, Allemann F, Glowacki J. Phenotypic analysis of bovine chondrocytes cultured in 3D collagen sponges: Effect of serum substitutes. *Cell Tissue Bank* 2005; 1: 45-54.
27. Kon E, Filardo G, Di Matteo B, Perdisa F, Marcacci M. Matrix assisted autologous chondrocyte transplantation for cartilage treatment: A systematic review. *Bone Joint Res* 2013; 2: 18-25.
28. Gille J, Behrens P, Schulz AP, Oheim R, Kienast B. Matrix-associated autologous chondrocyte Implantation: a clinical follow-up at 15 years. *Cartilage* 2016; 4: 309-15.
29. Riboh JC, Cvetanovich GL, Cole BJ, Yanke AB. Comparative efficacy of cartilage repair procedures in the knee: a network meta-analysis. *Knee Surgery, Sport. Traumatol. Arthrosc.* 2016: 1-14.
30. Schüttler KF, Schenker H, Theisen C, et al. Use of cell-free collagen type I matrix implants for the treatment of small cartilage defects in the knee: Clinical and magnetic resonance imaging evaluation. *Knee Surgery, Sport. Traumatol. Arthrosc.* 2014; 6: 1270-6.
31. Schneider U. Controlled, randomized multicenter study to compare compatibility and safety of ChondroFiller liquid (cell free 2-component collagen gel) with microfracturing of patients with focal cartilage defects of the knee joint. *Video J. Orthop. Surg.* 2016; 7: 1-8.
32. von Engelhardt LV, El Tabbakh MR, Engers R, Lahner M, Jerosch J. Hip arthroscopy for excision of osteoid osteoma and for the application of a collagen cartilage implant: Case report in a professional athlete, and literature review. *Technol Health Care* 2016; 6: 957-64.
33. Martin LS, Massafra U, Bizzi E, Migliore A. A double blind randomized active-controlled clinical trial on the intra-articular use of Md-Knee versus sodium hyaluronate in patients with knee osteoarthritis. *BMC Musculoskelet. Disord.* 2016; 17: 94.
34. Mitek T, Nagraba Ł, Radzimowski K, Deszczyński J. Skuteczność dwóch terapii metodą iniekcji dostawowych u pacjentów leczonych z powodu choroby zwyrodnieniowej stawu kolanowego. Kolagen vs kwas hialuronowy. *Chir.Narządów Ruchu Ortop. Pol.* 2016; 81(1): 16-21.

---

Liczba słów/Word count: 9465

Tabele/Tables: 0

Ryciny/Figures: 0

Piśmiennictwo/References: 34

Adres do korespondencji / Address for correspondence

dr hab. dr n. med. Wiesław Tomaszewski prof. WStF

04-036 Warszawa, Al. Stanów Zjednoczonych 72/176

tel./fax: (22) 834-67-72, 601 22-78-99, e-mail: w.tomaszewski@wp.pl

Otrzymano / Received

22.10.2016 r.

Zaakceptowano / Accepted

17.01.2017 r.