



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ»

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ : ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ Π. ΛΥΡΙΤΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΡΕΥΝΑΣ ΠΑΘΗΣΕΩΝ ΜΥΟΣΚΕΛΕΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ «Θ.ΓΑΡΟΦΑΛΙΔΗΣ»

ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ : ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΣΜΗΝΗ ΔΟΝΤΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΧΡΗΣΤΟΣ ΜΗΛΑΡΑΣ

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΑΥΤΟΛΟΓΩΝ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΩΝ
ΚΥΤΤΑΡΩΝ
ΣΤΗ ΧΟΝΔΡΟΓΕΝΕΣΗ**

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΙΩΑΝΝΗΣ ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΟΠΟΥΛΟΣ

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ, ΕΘΝΙΚΟΥ ΚΑΙ
ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

ΑΘΗΝΑ 2017

Βιογραφικό σημείωμα

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνοματεπώνυμο: Μηλαράς Χρήστος

Ημερομηνία γεννήσεως: 01/03/1984

Τόπος γεννήσεως: Καρδίτσα

Οικογενειακή κατάσταση: Έγγαμος

Διεύθυνση κατοικίας: Σεβαστής Καλλισπέρη 30, Χαλάνδρι , Αθήνα

Τηλέφωνο επικοινωνίας: 6942267715

E-mail: mil1384@yahoo.gr



ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

Φεβρ. 2014 – Σήμερα	Ειδικευόμενος Ορθοπαιδικής (Γ.Ν.Α. Κ.Α.Τ., Δ' Ορθοπαιδική Κλινική)
Ιούν. 2012 – Ιαν. 2014	Ειδικευόμενος Ορθοπαιδικής (Γ.Ν. Καρδίτσας, Ορθοπαιδική Κλινική)
Ιούν. 2011 – Μαρ. 2012	Ειδικευόμενος Γενικής Χειρουργικής (Γ. Ν. Τρικάλων , Β' Χειρουργική Κλινική)
Ιούν. 2010 – Μαιος 2011	Αγροτικός Ιατρός (Π.Ι. Κέδρου Καρδίτσας)
30/7/2009	Πτυχίο Ιατρικής Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Βαθμός 6,94 (Λίαν Καλώς)
Ιούνιος 2002	Απολυτήριο από το 2 ^ο Εν. Λύκειο Καρδίτσας. Βαθμός Άριστα 19.4

ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ

- Βραβείο Καλύτερης Εργασίας στο 72^ο Συνέδριο Ορθοπαιδικής Χειρουργικής και Τραυματολογίας (Αθήνα, Οκτώβριος 2016)
Συγκριτική μελέτη του θεραπευτικού αποτελέσματος μεταξύ δυο πρωτόκολλων χορήγησης τρανεξαμικού οξέος στην ελάχιστα επεμβατική ολική αρθροπλαστική ισχίου με πρόσθια προσπέλαση (AMIS)
Π. Λεπέτσος, Χ. Μηλαράς, Ι. Γιάνναρης, Χ. Χριστοφορίδης, Δ. Τζεφρώνης, Γ. Καραγιάννης, Π. Αναστασόπουλος, Γ. Μαχαιράς
- Βραβείο Καλύτερης Αναρτημένης Εργασίας στο 72^ο Συνέδριο Ορθοπαιδικής Χειρουργικής και Τραυματολογίας (Αθήνα, Οκτώβριος 2016)
Αποτελέσματα από τη χειρουργική αντιμετώπιση περιπρωθαικίων καταγμάτων μηριαίου Β1 κατά Vancouver
Π. Λεπέτσος, Ι. Γιάνναρης, Χ. Μηλαράς, Ν. Μανώλης, Π. Μαντζάνας, Γ. Καραγιάννης, Γ. Μαχαιράς

ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

- AO Trauma Course “Advanced Principles of Fracture Management”, Athens, Greece, 25 – 27/02/2016
- AO Trauma Course “Basic Principles of Fracture Management”, Athens Greece, 19 – 21/03/2015
- Athens International Elbow Course , Αθήνα 11 – 12/11/2016)
- Πρακτική Άσκηση Μικροχειρουργικής – Κλινική Χεριού Άνω Άκρου Μικροχειρουργικής, ΓΝΑ ΚΑΤ, Αθήνα (28/03/2016 εως 12/06/2016)

ΠΡΟΫΠΗΡΕΣΙΑ

Φεβρ. 2014 – Σήμερα	Ειδικευόμενος Ορθοπαιδικής (Γ.Ν.Α. Κ.Α.Τ., Δ' Ορθοπαιδική Κλινική)
Ιούν. 2012 – Ιαν. 2014	Ειδικευόμενος Ορθοπαιδικής (Γ.Ν. Καρδίτσας, Ορθοπαιδική Κλινική)
Ιούν. 2011 – Μαρ. 2012	Ειδικευόμενος Γενικής Χειρουργικής (Γ. Ν. Τρικάλων , Β' Χειρουργική Κλινική)
Ιούν. 2010 – Μαιος 2011	Αγροτικός Ιατρός (Π.Ι. Κέδρου Καρδίτσας)
Β' Εξάμηνο 2010	Εκπαιδευτής ΙΕΚ Νοσηλευτικής Χειρουργείου (Μάθημα - Στοιχεία Ψυχιατρικής – Νευρολογίας)
Α' Εξάμηνο 2001	Εκπαιδευτής ΙΕΚ Νοσηλευτικής Χειρουργείου (Μάθημα – Χειρουργικές Τεχνικές σε Επείγοντα)
Β' Εξάμηνο 2011	Εκπαιδευτής ΙΕΚ Υπηρεσιών Ασφαλείας (Μάθημα – Πρώτες Βοήθειες)

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΕΡΓΟ

Ομιλίες σε Ελληνικά Συνέδρια

1. Συγκριτική μελέτη του θεραπευτικού αποτελέσματος μεταξύ δυο πρωτόκολλων χορήγησης τρανεξαμικού οξέος στην ελάχιστα επεμβατική ολική αρθροπλαστική ισχίου με πρόσθια προσπέλαση (AMIS)

Π. Λεπέτσος, Χ. Μηλαράς, Ι. Γιάνναρης, Χ. Χριστοφορίδης, Δ. Τζεφρώνης, Γ. Καραγιάννης, Π. Αναστασόπουλος, Γ. Μαχαιράς

72ο Πανελλήνιο Ορθοπαιδικό Συνέδριο (Αθήνα, Οκτώβριος 2016)

(Βραβείο καλύτερης εργασίας του συνεδρίου)

2. Ελάχιστα επεμβατική ολική αρθροπλαστική ισχίου με πρόσθια προσπέλαση (AMIS). Βραχυπρόθεσμα αποτελέσματα σε 333 ασθενείς.

Γ. Μαχαιράς, Π. Λεπέτσος, Χ. Μηλαράς, Ι. Γιάνναρης, Δ. Τζεφρώνης, Χ. Χριστοφορίδης, Ν. Μανώλης, Π. Αναστασόπουλος

72ο Πανελλήνιο Ορθοπαιδικό Συνέδριο (Αθήνα, Οκτώβριος 2016)

3. Αποτελέσματα από την αντιμετώπιση περιπροθετικών καταγμάτων μηριαίου Β2 και Β3 κατά Vancouver

Γ. Μαχαιράς, Π. Λεπέτσος, Χ. Μηλαράς, Ν. Κυριακόπουλος, Π. Αναστασόπουλος, Ν. Σχίζας, Α. Καρράς, Κ. Τσιαμτσούρης

70ο Πανελλήνιο Ορθοπαιδικό Συνέδριο (Αθήνα, Οκτώβριος 2014)

Προφορικές Ανακοινώσεις σε Ελληνικά Συνέδρια

1. Συγκριτική μελέτη του θεραπευτικού αποτελέσματος μεταξύ δυο πρωτόκολλων χορήγησης τρανεξαμικού οξέος στην ελάχιστα επεμβατική ολική αρθροπλαστική ισχίου με πρόσθια προσπέλαση (AMIS)

Π. Λεπέτσος, Χ. Μηλαράς, Ι. Γιάνναρης, Χ. Χριστοφορίδης, Δ. Τζεφρώνης, Γ. Καραγιάννης, Π. Αναστασόπουλος, Γ. Μαχαιράς

72ο Πανελλήνιο Ορθοπαιδικό Συνέδριο (Αθήνα, Οκτώβριος 2016)

Βραβείο καλύτερης εργασίας του συνεδρίου

2. Ελάχιστα επεμβατική ολική αρθροπλαστική ισχίου με πρόσθια προσπέλαση (AMIS). Βραχυπρόθεσμα αποτελέσματα σε 333 ασθενείς.

*Γ. Μαχαιράς, Π. Λεπέτσος, **Χ. Μηλαράς**, Ι. Γιάνναρης, Δ. Τζεφρώνης, Χ. Χριστοφορίδης, Ν. Μανώλης, Π. Αναστασόπουλος*

72ο Πανελλήνιο Ορθοπαιδικό Συνέδριο (Αθήνα, Οκτώβριος 2016)

3. Ελάχιστα επεμβατική ολική αρθροπλαστική ισχίου με πρόσθια προσπέλαση (AMIS). Βραχυπρόθεσμα αποτελέσματα σε 271 ασθενείς.

*Γ. Μαχαιράς, Π. Λεπέτσος, Α. Καρράς, Π. Αναστασόπουλος, Ν. Σχίζας, Σ. Μιχαήλ, **Χ. Μηλαράς**, Κ. Τσιαμτσούρης*

71ο Πανελλήνιο Ορθοπαιδικό Συνέδριο (Αθήνα, Οκτώβριος 2015)

4. Αποτελέσματα από την αντιμετώπιση περιπροθετικών καταγμάτων μηριαίου Β2 και Β3 κατά Vancouver

*Γ. Μαχαιράς, Π. Λεπέτσος, **Χ. Μηλαράς**, Ν. Κυριακόπουλος, Π. Αναστασόπουλος, Ν. Σχίζας, Α. Καρράς, Κ. Τσιαμτσούρης*

70ο Πανελλήνιο Ορθοπαιδικό Συνέδριο (Αθήνα, Οκτώβριος 2014)

5. Ελάχιστα επεμβατική ολική αρθροπλαστική ισχίου με πρόσθια προσπέλαση (AMIS). Βραχυπρόθεσμα αποτελέσματα σε 164 ασθενείς.

*Γ. Μαχαιράς, Π. Λεπέτσος, Α. Καρράς, Π. Αναστασόπουλος, Ν. Σχίζας, Σ. Μιχαήλ, **Χ. Μηλαράς**, Κ. Τσιαμτσούρης*

70ο Πανελλήνιο Ορθοπαιδικό Συνέδριο (Αθήνα, Οκτώβριος 2014)

6. Σύνδρομο διαμερίσματος άκρου ποδός μετά από διάστρεμμα ποδοκνημικής. Αναφορά περιστατικού και ανασκόπηση της βιβλιογραφίας.

*Σ. Παπαδάκης, Π. Λεπέτσος, Ν. Σχίζας, Α. Κουτροφίνης, Π. Αναστασόπουλος, Α. Καρράς, **Χ. Μηλαράς**, Γ. Μαχαιράς*

70ο Πανελλήνιο Ορθοπαιδικό Συνέδριο (Αθήνα, Οκτώβριος 2014)

Αναρτημένες ανακοινώσεις σε Ελληνικά Συνέδρια

1. Αποτελέσματα από την αντιμετώπιση περιπροθετικών καταγμάτων μηριαίου Β1 κατά Vancouver
*Π. Λεπέτσος, Ι. Γιάνναρης, **Χ. Μηλαράς**, Ν. Μανώλης, Π. Μαντζάνας, Γ. Καραγιάννης, Γ. Μαχαιράς*
72ο Πανελλήνιο Ορθοπαιδικό Συνέδριο (Αθήνα, Οκτώβριος 2016)
Βραβείο καλύτερης αναρτημένης ανακοίνωσης
2. Προκαταρκτικά αποτελέσματα από τη χρήση του συστήματος υπερήχων χαμηλής έντασης LIPUS (Low Intensity Pulsed Ultrasound) για τη θεραπεία της μη πώρωσης ή καθυστερημένης πώρωσης αρθροδέσεων ποδοκνημικής και άκρου ποδός
*Α. Λεωνίδου, Π. Λεπέτσος, Ι. Γιάνναρης, **Χ. Μηλαράς**, Ο. Tawik, D. Gorbacev, H. Jahnic*
72ο Πανελλήνιο Ορθοπαιδικό Συνέδριο (Αθήνα, Οκτώβριος 2016)
3. Αποτελέσματα από τη χειρουργική αντιμετώπιση περιπροθετικών καταγμάτων μηριαίου C κατά Vancouver
*Π. Λεπέτσος, Ι. Γιάνναρης, **Χ. Μηλαράς**, Δ. Τζεφρώνης, Ν. Μανώλης, Π. Μαντζάνας, Γ. Μαχαιράς*
72ο Πανελλήνιο Ορθοπαιδικό Συνέδριο (Αθήνα, Οκτώβριος 2016)
4. Αποτελέσματα από την αντιμετώπιση περιπροθετικών καταγμάτων μηριαίου Β1 κατά Vancouver
*Μαχαιράς Γ., Λεπέτσος Π., Μαντζάνας Π., Γιάνναρης Ι., **Μηλαράς Χ.**, Αναστασόπουλος Π.*
35^ο Ετήσιο Συνέδριο Ο.Τ.Ε.ΜΑ.Θ (Θεσσαλονίκη, Μάιος 2016)
5. Τραυματισμοί νεύρων μετά από ελάχιστα επεμβατική ολική αρθροπλαστική ισχίου με πρόσθια προσπέλαση (AMIS)
*Γ. Μαχαιράς, Π. Χριστοφιλόπουλος, Π. Λεπέτσος, Σ. Μιχαήλ, Σ. Γαλανάκος, Π. Αναστασόπουλος, **Χ. Μηλαράς**, Κ. Τσιαμτσούρης*
71ο Πανελλήνιο Ορθοπαιδικό Συνέδριο (Αθήνα, Οκτώβριος 2015)

Μέλος Επιστημονικών Εταιρειών

1. Μέλος του Ιατρικού Συλλόγου Αθηνών
2. Τακτικό μέλος της Ελληνικής Εταιρείας Χειρουργικής Ορθοπαιδικής και Τραυματολογίας (Ε.Ε.Χ.Ο.Τ.)

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλικά: Καλή γνώση.

- First Certificate in English, University of Cambridge (1997)

Γερμανικά: Άριστη γνώση.

- Zentrale Mittelstufenprüfung, Goethe Institut (1999)

ΆΛΛΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

Άριστη γνώση και χρήση Η/Υ σε περιβάλλον Windows, προγράμματα: Ms Office, Word, Powerpoint, Internet

Περίληψη

Η χρήση των αυτόλογων μεσεγχυματικών κυττάρων στην επαγωγή της χονδρογένεσης και την αποκατάσταση των χόνδρινων βλαβών έχει ερευνηθεί εκτενώς τα τελευταία χρόνια. Κύρια πηγή αυτόλογων μεσεγχυματικών κυττάρων είναι ο μυελός των οστών, αλλά τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιούνται και άλλες πηγές όπως ο λιπώδης ιστός ενώ ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν και τα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα. Μετά τη συλλογή τους, τα αυτόλογα μεσεγχυματικά κύτταρα καλλιεργούνται με τη βοήθεια αυξητικών παραγόντων και ικριωμάτων, και εν συνεχεία τοποθετούνται στη χόνδρινη βλάβη είτε με ενδαρθρική ένεση είτε με αρθροσκοπική τοποθέτηση. Στη βιβλιογραφία υπάρχει πληθώρα πειραματικών μελετών που έχουν αξιολογήσει *in vivo* και *in vitro* την επαγωγή της χονδρογένεσης των αυτόλογων μεσεγχυματικών κυττάρων. Εντούτοις, οι προοπτικές τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες είναι ελάχιστες και πρέπει να αποκτήσουν προτεραιότητα στη μελλοντική έρευνα της κλινικής εφαρμογής των βλαστοκυττάρων.

Περιεχόμενα

Βιογραφικό σημείωμα	2
Περίληψη	2
Περιεχόμενα	3
Πίνακας Εικόνων	5
Πρόλογος	6
Εισαγωγή	7
Κεφάλαιο 1. Αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα	8
1-1. Εισαγωγή	8
1-1-1 Αρχέγονα εμβρυϊκά κύτταρα (Embryonic Stem Cells, ESCs)	8
1-1-2 Αρχέγονα κύτταρα ενηλίκων (Adult Stem Cells, ASCs)	10
1-2. Προέλευση	11
1-3. Λειτουργίες	13
1-3-1. Ιστική επιδιόρθωση	14
1-3-2. Ανοσορρύθμιση	15
1-3-3. Αγγειογένεση	16
1-4. Διαχωρισμός	16
1-5. Platelet – Rich – Plasma (PRP)	17
1-6. Εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα	18
Κεφάλαιο 2. Χονδρογένεση	20
Κεφάλαιο 3. Χρήση αυτόλογων μεσεγχυματικών κυττάρων στην επαγωγή της χονδρογένεσης	22
3-1. Προέλευση και λήψη	23
3-1-1. Μυελός των οστών	24
3-1-2. Λιπώδης ιστός	25

3-1-3. Περιφερικό αίμα	26
3-1-4. Αρθρικός υμένας	26
3-1-5. Περίοστεο	27
3-1-6. Περιοδοντικοί ιστοί	27
3-1-7. Ομφάλιος λώρος	27
3-1-8. Αμνιακό υγρό	28
3-1-9. Αμνιακός σάκος	28
3-2. Μέθοδοι επεξεργασίας	29
3-2-1. Απομόνωση	29
3-2-2. Καλλιέργεια	30
3-2-3. Διαφοροποίηση	32
3-2-4. Χρήση ικρωμάτων	34
3-2-5. Χρήση προκαλλιτεργημένων MSCs	36
3-3. Εφαρμογές	38
3-3-1 Ενδαρθρική έγχυση	38
3-3-2 Τοποθέτηση με αρθροτομή ή αρθροσκόπηση	39
3-3-3 Χρήση σε συνδυασμό με ικρίωματα	40
Κεφάλαιο 4. Ανασκόπηση βιβλιογραφίας	41
4-1. Πειραματικές μελέτες	41
4-1-1 Μελέτες in vitro	41
4-1-2 Μελέτες ex vivo	45
4-1-3 Μελέτες in vivo σε πειραματόζωα	45
4-2. Κλινικές μελέτες	51
4-2-1 Ενδαρθρική χορήγηση	52
4-2-2 Χορήγηση σε συνδυασμό με ικρίωματα	54
Κεφάλαιο 5. Συμπεράσματα	57
Βιβλιογραφία	59

Πίνακας Εικόνων

<i>Εικόνα 1. Κατηγοριοποίηση των stem cells ανάλογα με το δυναμικό διαφοροποίησης τους. ...</i>	9
<i>Εικόνα 2. Δυνατότητες διαφοροποίησης των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων. Τροποποιημένο από Uccelli et al ^[16].....</i>	12
<i>Εικόνα 3. Ανθρώπινα MSCs του μυελού των οστών, με μορφολογία παρόμοια με των ινοβλαστών. Τροποποιημένο από Wikipedia.....</i>	14
<i>Εικόνα 4. Μικροσκοπική εικόνα AT-MSCs. Τροποποιημένο από Potdar et al ^[37].....</i>	17
<i>Εικόνα 5. Ιστολογικά στάδια διαφοροποίησης χονδροκυττάρων. Τροποποιημένο από Keic et al ^[43].....</i>	20
<i>Εικόνα 6. Χονδροκύτταρο μέσα στη θεμέλια ουσία ^[44].....</i>	21
<i>Εικόνα 7. Πρωτόκολλα επεξεργασίας αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων. Τροποποιημένο από Bornes et al ^[52].....</i>	23
<i>Εικόνα 8. Απομόνωση και καλλιέργεια αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων από μυελό των οστών ^[62].....</i>	29
<i>Εικόνα 9. Προσκόλληση MSCs του λιπώδους ιστού στην πλαστική καλλιεργητική επιφάνεια ^[62].....</i>	31
<i>Εικόνα 10. Λήψη και καλλιέργεια MSCs ^[62].....</i>	32
<i>Εικόνα 11. Καλλιέργεια AT-MSC πάνω σε ικρίωμα. Τροποποιημένο από Yazdimamaghani et al ^[80].....</i>	35

Πρόλογος

Τα βλαστοκύτταρα αποτελούν αντικείμενο ενδιαφέροντος περισσότερο από κάθε άλλο πεδίο στην Βιολογία τα τελευταία χρόνια. Αυτό συμβαίνει διότι η αποκάλυψη αλλά και η αποκωδικοποίηση των μοναδικών ιδιοτήτων τους αναμένεται να βοηθήσει στην κατανόηση των βιολογικών μηχανισμών των κυττάρων και παράλληλα να οδηγήσει στην ανεύρεση δυναμικών θεραπειών με εφαρμογή στην αναγεννητική ιατρική. Με την πάροδο των χρόνων, έγινε εμφανής ο ρόλος των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων καθώς αυτά θα μπορούσαν να αποτελέσουν τη βάση για ένα πολύ αποτελεσματικό «φυσικό σύστημα επιδιόρθωσης ιστών». Απαραίτητη προϋπόθεση για αυτή τη χρήση, αποτελεί η πρόσβασή και η καθήλωση τους στο όργανο-στόχο. Σε ορισμένες περιπτώσεις αυτό μπορεί να επιτευχθεί με *in situ* χορήγηση, ενώ άλλες φορές αυτό δεν είναι δυνατό λόγω της ανατομικής θέσης του κατεστραμμένου ιστού ή της συστηματικής φύσης της ασθένειας. Έχει δειχθεί ότι τα αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα, μετά από εξωγενή χορήγηση, δρουν αποτελεσματικά σαν θεραπευτικοί παράγοντες σε μια πληθώρα πειραματικών μοντέλων τραυματισμένων ιστών.

Εισαγωγή

Είναι γνωστό ότι ο χόνδρος δεν έχει αναγεννητική ικανότητα και μία χόνδρινη βλάβη αν δεν αντιμετωπισθεί, μπορεί να επιδεινωθεί και να εξελιχθεί σε εκφύλιση του χόνδρου και οστεοαρθρίτιδα. Οι βιολογικές-αναγεννητικές θεραπείες στοχεύουν στον περιορισμό της εκφύλισης του χόνδρου και οδηγούν ανάλογα με την περίπτωση σε δημιουργία νέου χόνδρου που θα ενσωματωθεί στον ήδη υπάρχοντα. Σήμερα, τα αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα χρησιμοποιούνται με θεαματικά αποτελέσματα στην ορθοπαιδική-αθλητιατρική για αντιμετώπιση της οστεοαρθρίτιδας, των χόνδρινων βλαβών καθώς και μυϊκών, συνδεσμικών και τενόντιων τραυματισμών. Τα αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα βρίσκονται κυρίως στο μυελό των οστών αλλά και σε άλλους ιστούς όπως ο ομφάλιος λώρος και το λίπος. Είναι κύτταρα με μεγάλη ικανότητα να δημιουργούν διαφορετικούς τύπους κυττάρων για αυτό και υπάρχει ενδιαφέρον για τη χρήση τους στην αναγεννητική ιατρική και στην επαγωγή της χονδρογένεσης. Έχουν δοκιμαστεί διάφορα πρωτόκολλα μεταμόσχευσης αυτόλογων μεσεγχυματικών κυττάρων σε ανθρώπους και πειραματόζωα, με χρήση διαφόρων αυξητικών παραγόντων και βιοϋλικών ως ικριώματα, με ενθαρρυντικά κλινικά αποτελέσματα.

Κεφάλαιο 1. Αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα

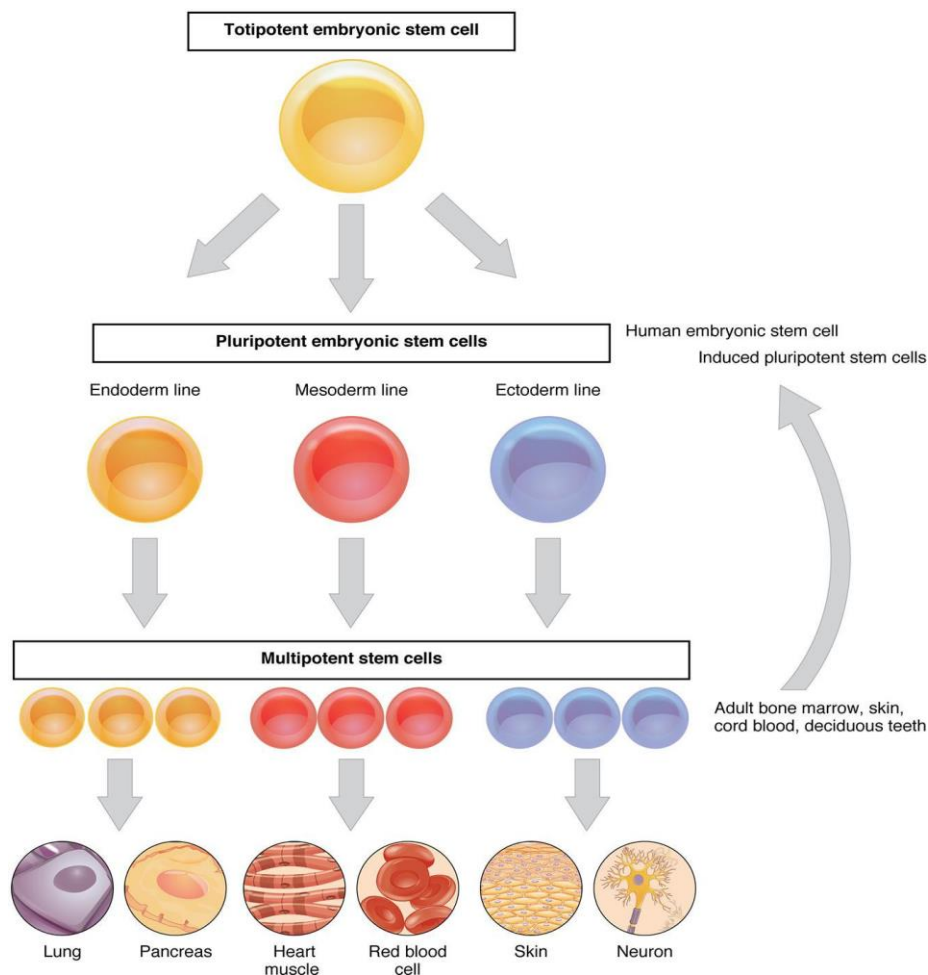
1-1. Εισαγωγή

Ο όρος **αρχέγονα κύτταρα (stem cells)** χρησιμοποιείται για μια πληθώρα κυτταρικών τύπων τα οποία διαθέτουν δύο κοινές χαρακτηριστικές ιδιότητες. Αρχικά, διαθέτουν ικανότητα απεριόριστης ή έστω παρατεταμένης αυτό-ανανέωσης και επιπλέον, έχουν την ικανότητα να παράγουν, μέσα από διαδικασίες κυτταρικής διαφοροποίησης και ασύμμετρων μιτωτικών διαιρέσεων, μια ποικιλία εξειδικευμένων κυτταρικών τύπων ^[1]. Τα αρχέγονα κύτταρα κατατάσσονται σε δύο βασικές κατηγορίες (εικόνα 1), ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο ενός οργανισμού: στα αρχέγονα εμβρυϊκά κύτταρα και στα αρχέγονα κύτταρα των ενηλίκων.

1-1-1 Αρχέγονα εμβρυϊκά κύτταρα (Embryonic Stem Cells, ESCs)

Τα **αρχέγονα εμβρυϊκά κύτταρα (embryonic stem cells – ESCs)** δημιουργούνται κατά τις πρώτες ημέρες της εμβρυϊκής ανάπτυξης στα θηλαστικά. Από το 1998 που απομονώθηκαν για πρώτη φορά τα ανθρώπινα ESCs προκάλεσαν το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας και τη συνεχή μελέτη τους. Στην αρχή είναι ολοδύναμα κύτταρα (totipotent), με δυνατότητα να δίδουν γένεση και στα τρία βλαστικά δέρματα (ενδόδερμα, μεσόδερμα και

εξώδερμα) καθώς και στα γαμετικά κύτταρα. [2]. Παράδειγμα τέτοιων κυττάρων αποτελεί το ζυγωτό, που παράγεται κατά τη σύντηξη του ωαρίου και του σπερματοζωαρίου, καθώς και τα κύτταρα που προκύπτουν από τις πρώτες διαιρέσεις του. Στη συνέχεια, καθώς προχωρά η εμβρυϊκή ανάπτυξη, χάνουν την παντοδυναμία τους, αποκτώντας λιγότερες ικανότητες διαφοροποίησης και γίνονται πολυδύναμα (pluripotent), όπως τα κύτταρα του αμνιακού υγρού, του ομφάλιου λώρου και του πλακούντα [3]. Βασικό χαρακτηριστικό των ESCs είναι η ικανότητα της αυτοανανέωσης, όπου με ασύμμετρη διαίρεση προκύπτει ένα πανομοιότυπο κύτταρο με το αρχικό και ένα κύτταρο που πρόκειται να ακολουθήσει ένα συγκεκριμένο τύπο διαφοροποίησης [4].



Εικόνα 1. Κατηγοριοποίηση των stem cells ανάλογα με το δυναμικό διαφοροποίησης τους.

1-1-2 Αρχέγονα κύτταρα ενηλίκων (Adult Stem Cells, ASCs)

Τα αρχέγονα κύτταρα των ενηλίκων (Adult Stems Cells, ASCs) γενικά είναι περισσότερο διαφοροποιημένα από τα ESCs, παρουσιάζοντας μια πολυδυναμικότητα (multipotency) που εκφράζεται ως ικανότητα διαφοροποίησης σε διάφορους εξειδικευμένους τύπους κυττάρων [1]. Πρόκειται για αδιαφοροποίητα κύτταρα που απαντούν στο σώμα του οργανισμού μετά τη εμβρυϊκή ανάπτυξη. Παραμένουν σε κατάσταση ηρεμίας, ακόμα και για πολλά χρόνια μέχρι να ενεργοποιηθούν από κάποια ασθένεια ή από τραυματισμό. Απομονώνονται από τους περισσότερους ιστούς (μυελός των οστών, περιφερικό αίμα, κερατοειδής, αμφιβληστροειδής, εγκέφαλος, σκελετικοί μύες, ήπαρ, δέρμα, λιπώδης ιστός, οδοντικός πολφός, πάγκρεας, επιθήλιο του γαστρεντερικού σωλήνα) και ανάλογα με τον ιστό διαφοροποιούνται σε κυτταρικούς τύπους που σχετίζονται γενεαλογικά με τον ιστό προέλευσης. Η διαφοροποίηση των ASCs περιορίζεται συνήθως στον ιστό στον οποίο ανευρίσκονται, όπως τα ηπατοκύτταρα στο ήπαρ και τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα στο αίμα [5]. Υπό κατάλληλες συνθήκες, όμως, μπορούν να διαφοροποιηθούν σε πολλαπλές κυτταρικές σειρές, μετατρέπόμενα σε πολυδύναμα κύτταρα [6]. Πιστεύεται ότι κυρίως χρησιμεύουν σαν αποθήκες κυττάρων, έτοιμων να κινητοποιηθούν και να διαφοροποιηθούν, ανταποκρινόμενα σε μοριακά σήματα που στοχεύουν στη φυσιολογική αναγέννηση και ομοίωση του ιστού. Χάρη σε αυτές τις πρωτοποριακές ιδιότητες τους, τα αρχέγονα κύτταρα αποτελούν ένα εντατικό πεδίο έρευνας τα τελευταία χρόνια.

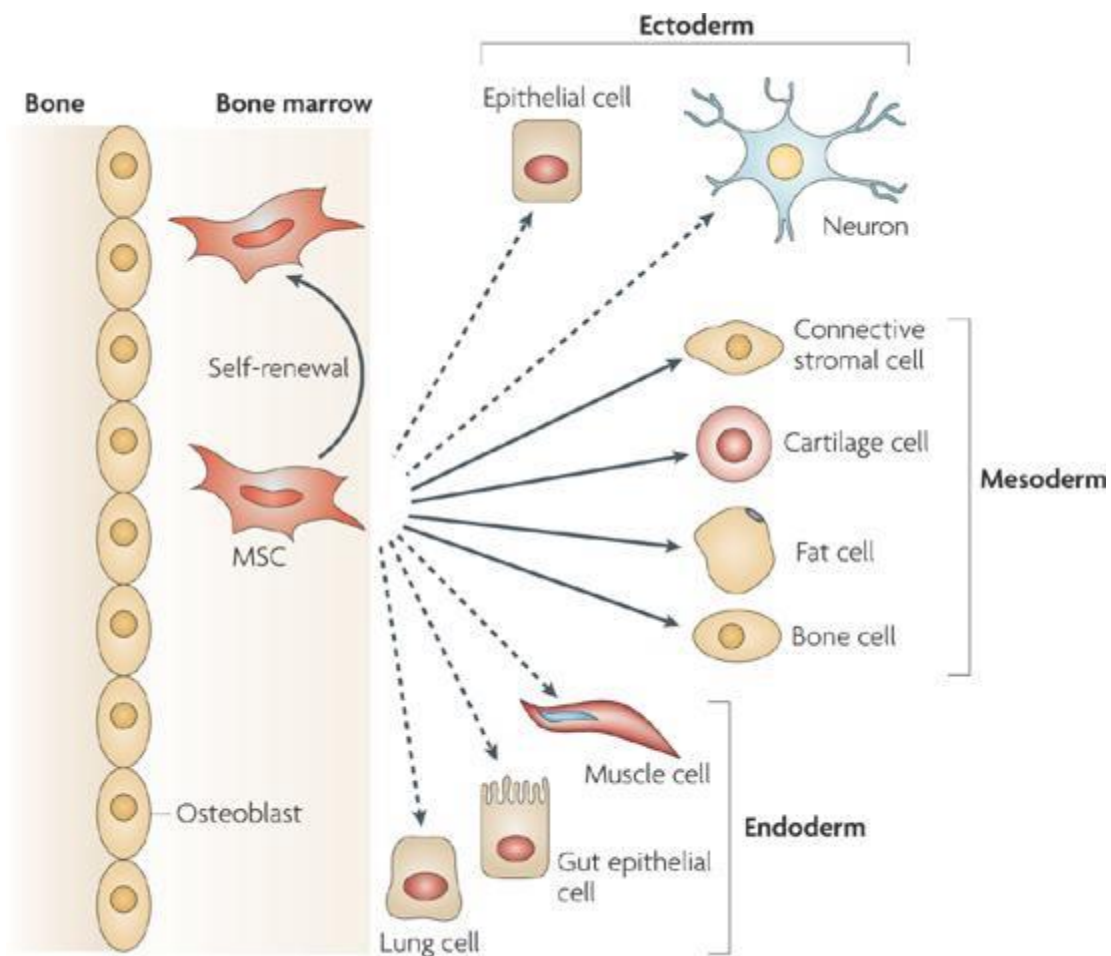
Τα ASCs, ως πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα μπορούν να πολλαπλασιάζονται και να αυτοανανεώνονται μέσα στους ιστούς χωρίς να διαφοροποιούνται για μακρά χρονικά διαστήματα (long term self renewal) και μπορούν να παράγουν ώριμους κυτταρικούς τύπους. Είναι σχετικά σπάνια μέσα στον οργανισμό και ως εκ τούτου η εντόπιση και η απομόνωση τους

είναι δύσκολη ^[7]. Επίσης, όταν αναπτύσσονται *in vitro*, δεν μπορούν να παραμείνουν αδιαφοροποίητα για μεγάλο χρονικό διάστημα. Ταυτόχρονα όμως η χρήση τους στον τομέα της έρευνας και της θεραπείας δεν θεωρείται αμφιλεγόμενη, όπως αυτή των ESCs, διότι προκύπτουν από δείγματα ιστού ενηλίκων και όχι από καταστροφή εμβρύων ^[8].

Τα ASCs υποδιαιρούνται σε δύο υποομάδες, τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (**hematopoietic stem cells, HSCs**) τα οποία δίδουν γένεση στα κύτταρα του αίματος και του ανοσοποιητικού συστήματος και τα αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα (**mesenchymal stem cells, MSCs**) από τα οποία προέρχονται τα κύτταρα του λιπώδους ιστού, των χόνδρων, τα κύτταρα του οστίτη ιστού, των μυών, ενώ συγχρόνως παρέχουν στρωματική υποστήριξη για τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα ^[9-12]. Τα MSCs ανευρίσκονται στο μυελό των οστών, στο δέρμα, στο λιπώδη ιστό και σε πολλούς άλλους ιστούς μεσεγχυματικής προέλευσης ^[13].

1-2. Προέλευση

Η κύρια πηγή ενηλίκων MSCs είναι ο μυελός των οστών. Τα MSCs αντιπροσωπεύουν ένα μικρό τμήμα (0.001-0.01% του συνολικού πληθυσμού) των εμπύρηνων κυττάρων του μυελού των οστών. Τα MSCs εδράζουν στο μυελικό στρώμα, παρέχοντας τα αναγκαία υποστηρικτικά θρεπτικά στοιχεία (κυτταροκίνες, εξωκυττάρια ουσίες, αλλά και τα διάφορα κυτταρικά στοιχεία) απαραίτητα για την φυσιολογική αιμοποίηση ^[14]. Έχουν την ικανότητα διαφοροποίησης σε διάφορα κύτταρα συνδετικού ιστού, όπως ινοβλάστες, οστεοβλάστες, χονδροκύτταρα, κύτταρα τένοντα, λιποκύτταρα και κύτταρα λείων μυϊκών ινών (εικόνα 2) ^[15].



Εικόνα 2. Δυνατότητες διαφοροποίησης των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων. Τροποποιημένο από Uccelli et al [16].

Τα MSCs ταυτοποιήθηκαν για πρώτη φορά την δεκαετία του 1960 από τον Alexander Friedenstein. Ο Friedenstein τοποθέτησε τον μυελό των οστών σε πλαστικά πιάτα καλλιέργειας και απομόνωσε ατρακτοειδή κύτταρα προσκολλημένα στο πλαστικό, τα οποία είχαν ετερογενή μορφολογία αλλά μπορούσαν να δημιουργήσουν αποικίες. Τα κύτταρα αυτά μπορούσαν επίσης να αναδημιουργήσουν τα οστά και να οδηγήσουν στην ανασύσταση του

αιμοποιητικού μικροπεριβάλλοντος, μετά από υποδόρια μεταμόσχευση. Με την πάροδο των χρόνων, πληθώρα εργαστηριακών ερευνών επιβεβαίωσε και επέκτεινε αυτά τα ευρήματα, δείχνοντας πως κύτταρα που απομονώνονται με τη μέθοδο του Friedenstein υπάρχουν και στον ανθρώπινο μυελό των οστών και μάλιστα ότι αυτά μπορούν να καλλιεργηθούν και να διαφοροποιηθούν *in vitro* σε κύτταρα της μεσεγχυματικής γενεαλογίας όπως οστεοβλάστες, χονδροκύτταρα, λιποκύτταρα και μυοβλάστες [17].

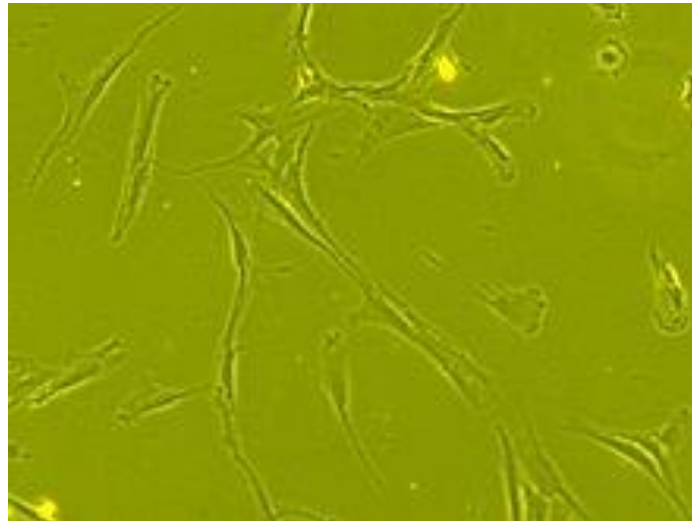
Πηγή των μεσεγχυματικών κυττάρων δεν είναι μόνο ο μυελός των οστών, αλλά και άλλοι ώριμοι ιστοί, όπως το λίπος, ο χόνδρος, το οστό, ο θύλακος των τριχών και ο υποδόριος ιστός της κεφαλής, οι περιοδοντικοί ιστοί όπως επίσης οι προ-εμβρυικοί ιστοί, πλακούντας, ομφάλιος λώρος και ο εμβρυικός μυελός των οστών. [18-26].

1-3. Λειτουργίες

Τα MSCs χαρακτηρίζονται μορφολογικά από μικρό κυτταρόπλασμα με λίγες κυτταρικές προεξοχές. Εντός του κυτταροπλάσματος εδράζει μεγάλος στρογγυλός πυρήνας με εμφανή πυρηνίσκο που περιβάλλεται από ομοιόμορφα κατανεμημένα ινίδια χρωματίνης. Ένα κύτταρο χαρακτηρίζεται ως MSC αν διαθέτει προσκολλητικές ιδιότητες σε πλαστικές επιφάνειες και έχει μορφολογία ομοιάζουσα σε ινοβλάστη. Τα καλλιεργούμενα MSCs εκφράζουν στην επιφάνειά τους τα CD73, CD90 και CD105.

Τα μυελικά MSC επηρεάζουν το τοπικό περιβάλλον τους εκκρίνοντας αυξητικούς παράγοντες, ανάμεσα στους οποίους περιλαμβάνονται οι stem cell factor (SCF), leukemia inhibitory factor (LIF), granulocyte-macrophage

colony stimulating factor (GM-CSF), vascular endothelial growth factor (VEGF) και macrophage colony stimulating factor (M-CSF). Επίσης παράγουν χημειοκίνες, όπως IL-6, IL-11, IL-15, και stromal derived factor-1 (SDF1). Ταυτόχρονα, τα MSCs εκφράζουν τα επιφανειακά αντιγόνα Stro-1, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146 και CD166 [27]. Με τον τρόπο αυτό κατευθύνουν και επηρεάζουν το κυτταρικό πεπρωμένο των γειτονικών αιμοποιητικών κυττάρων, αλλά και το δικό τους, επηρεάζοντας λειτουργίες όπως η ιστική επιδιόρθωση, η ανοσορρύθμιση και η αγγειογένεση [28].



Εικόνα 3. Ανθρώπινα MSCs του μυελού των οστών, με μορφολογία παρόμοια με των ινοβλαστών. Τροποποιημένο από Wikipedia.

1-3-1. Ιστική επιδιόρθωση

Τα MSCs συμμετέχουν στη φυσιολογική αναγέννηση και επιδιόρθωση των ιστών. Η ικανότητα τους να διαφοροποιούνται σε πολλούς τύπους

κυττάρων του συνδετικού ιστού, έχει μεγάλη προοπτική στην ιστική επούλωση και την αναγέννηση οστών και χόνδρων. Καθώς εδράζουν σε διάφορους ιστούς μπορούν να ανταποκριθούν σε τοπικές ομοιοστατικές ανάγκες ή και τραυματισμούς και να εισέλθουν σε ένα στάδιο ενεργοποίησης και πολλαπλασιασμού, με αποτέλεσμα την ιστική αναγέννηση. Πιστεύεται ότι καθώς ο αριθμός των MSCs ελαττώνεται με την πάροδο του χρόνου, η ιστική ανάπτυξη γίνεται λιγότερο αποτελεσματική σε μεγάλες ηλικίες [29].

1-3-2. Ανοσορρύθμιση

Η επίδραση των MSCs στο ανοσοποιητικό σύστημα έχει μελετηθεί εκτενώς. Είναι γνωστό ότι τα MSCs αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των Τ-λεμφοκυττάρων, προάγουν λειτουργικά τα Τ-ρυθμιστικά κύτταρα, ελέγχουν την παραγωγή TNFα από τα τύπου 1 δενδριτικά κύτταρα (DC-1), αυξάνουν την παραγωγή IL-10 από τα DC-2, ελαττώνουν την απελευθέρωση INFγ από τα βοηθητικά TH1 κύτταρα και τα κύτταρα Natural Killer cells (NK) και επάγουν την παραγωγή IL-4 από τα TH2 κύτταρα [30-31]. Εμποδίζουν την αποτελεσματική ωρίμανση των αντιγόνο-παρουσιαστικών κυττάρων καταστέλλοντας την έκφραση των συν-διεγερτικών μορίων CD40 και CD86 [32]. Τα MSCs διαφεύγουν από την αλλογενή αναγνώριση των Τ-κυττάρων, καθότι δεν εκφράζουν καθόλου επιφανειακά αντιγόνα τάξης II του κυρίου συμπλόκου ιστοσυμβατότητας (επαγόμενη έκφραση μετά από διέγερση με INFγ), ή κάποιο άλλο μόριο συν-διεγέρτη, παρότι εκφράζουν αντιγόνα τάξης I. Έτσι, δεν ανιχνεύονται από το ανοσοποιητικό σύστημα και δυνητικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ακόμα και σε ετερόλογες μεταμοσχεύσεις [33].

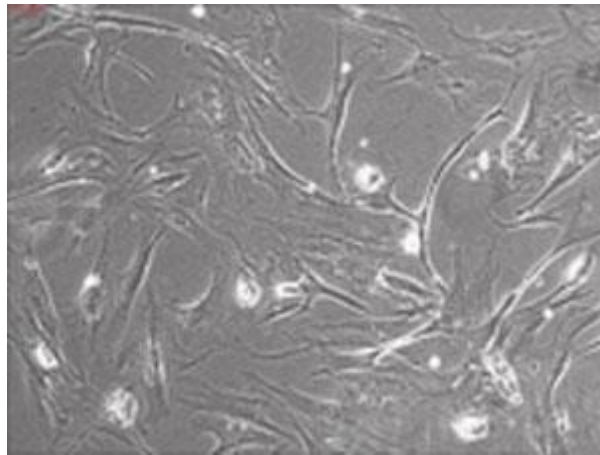
1-3-3. Αγγειογένεση

Τα MSCs βρέθηκε πως έχουν προ-αγγειογενετικές ιδιότητες, ίσως λόγω της περιαγγειακής τους θέσης και επίσης πως διαθέτουν δυναμικό διαφοροποίησης σε ενδοθηλιακά κύτταρα [15]. Έχει αποδειχθεί πως τα MSCs μπορούν να επηρεάσουν τη συμπεριφορά των ενδοθηλιακών κυττάρων και το αντίστροφο. Είναι ικανά για να προκαλέσουν νέο-αγγειογένεση *in vivo* και να σχηματίζουν τρισδιάστατες αγγειακές δομές *in vitro*. Ακόμα έχει αποδειχθεί ότι MSCs από το μυελό των οστών, εκκρίνουν VEGF ο οποίος έχει αυτοκρινικό και παρακρινικό ρόλο προάγοντας την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων [34]. Εκτός του VEGF, παράγονται και άλλοι αγγειογενετικοί παράγοντες από τα MSCs, όπως TGF- β και MMP-2 οι οποίοι συμβάλλουν στην πολύπλοκη αλληλεπίδραση MSCs και ενδοθηλιακών κυττάρων.

1-4. Διαχωρισμός

Εκτός από τον μυελό των οστών υπάρχουν και άλλες πηγές ενήλικων MSCs. Πιθανολογείται ότι υπάρχει ένα δίκτυο μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων που μεταναστεύει στους διάφορους ιστούς μέσω της αιματικής κυκλοφορίας και στην συνέχεια αποκτά κατάλληλες ιδιότητες, έτσι ώστε να συνδράμει στην διατήρηση και επιδιόρθωση του συγκεκριμένου ιστού. Παρόλη την φαινοτυπική ομοιογένεια, μπορεί να παρατηρηθεί ετερογένεια στην ικανότητα διαφοροποίησης αυτών των κυττάρων, γεγονός που σχετίζεται με τον ιστό από τον οποίο προέρχονται. Πρόσφατες μελέτες επιβεβαίωσαν ότι τα MSCs που προέρχονται από το λιπώδη ιστό (Adipose Tissue

Mesenchymal Stem Cells, ATMSCs) έχουν ανάλογο φαινότυπο με τα MSCs που προέρχονται από το μυελό των οστών (Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, BM-MSCs), καθώς και παρόμοιες χαρακτηριστικές ιδιότητες [35-36]. Εντούτοις, παράγοντες, όπως η ηλικία του δότη, ο τύπος του λιπώδους ιστού, η προέλευσή του (υποδορίως ή σπλαγχνικώς), το είδος της χειρουργικής επέμβασης και οι συνθήκες καλλιέργειας μπορούν να επηρεάσουν το δυναμικό πολλαπλασιασμού και την ικανότητα διαφοροποίησης των ATMSCs.



Εικόνα 4. Μικροσκοπική εικόνα AT-MSCs. Τροποποιημένο από Potdar et al [37].

1-5. Platelet – Rich – Plasma (PRP)

Το πλάσμα αίματος πλούσιο σε αιμοπετάλια (**Platelet-Rich Plasma, PRP**), ορίζεται ως η επίτευξη αυξημένης συγκέντρωσης αυτόλογων αιμοπεταλίων σε μικρή συγκέντρωση πλάσματος, μετά από ειδική διαδικασία και αποτελεί μια πρόσφατη βιολογική θεραπεία για τις παθήσεις του αρθρικού χόνδρου, αλλά και για διάφορες άλλες αθλητικές κακώσεις ή παθήσεις. Στα α-

κοκκία των αιμοπεταλίων βρίσκονται αποθηκευμένοι διάφοροι αυξητικοί παράγοντες, με επίδραση στο χόνδρο, όπως οι TGF- β 1, BMP-2 και BMP-7, ο IGF-1, FGF-2 και FGF-18, ο VEGF, ο EGF και ο PDGF. Οι παράγοντες αυτοί προάγουν την τοπική αγγειογένεση, ρυθμίζουν τη φλεγμονή, αναστέλλουν τα καταβολικά ένζυμα και τις κυτοκίνες, στρατολογούν τοπικά τα αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα και τους ινοβλάστες σε ανατομικές περιοχές καταστροφής ή κάκωσης και ωθούν τα γειτονικά κύτταρα να παράγουν περισσότερους αυξητικούς παράγοντες. Οι προαναβολικές και αντικαταβολικές αυτές επιδράσεις σε συνδυασμό επιδιώκουν την επαναφορά του τραυματισμένου ή νοσούντα χόνδρου στην αρχική του κατάσταση. Η τοπική χρήση PRP στο σημείο της βλάβης θεωρείται ότι απελευθερώνει όλες τις αναβολικές επιδράσεις πάνω στον χόνδρο και προάγει τη φυσική διαδικασία για το σχηματισμό νέου επιδιορθωμένου χόνδρου [38]. Επεξεργασία των MSCs του λιπώδους ιστού με PRP προάγει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίησή τους σε χονδρογενετικά κύτταρα, επάγοντας την επούλωση τραυματικών χόνδρινων βλαβών σε πειραματόζωα [39].

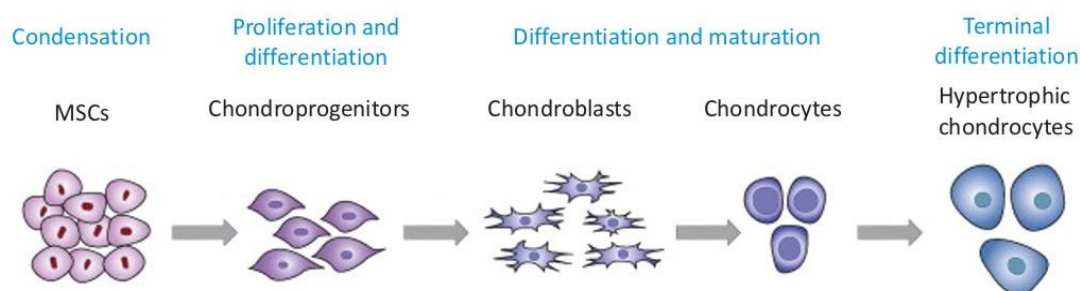
1-6. Εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα

Μια προσφάτως χαρακτηρισμένη κατηγορία βλαστικών κυττάρων είναι τα **εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (Fetal stem cells, FSCs)**, τα οποία έχουν απομονωθεί κατά την διάρκεια της κύησης ή της γέννησης του εμβρύου από πολλούς διαφορετικούς ιστούς, όπως ο πλακούντας, το αίμα ομφαλίου λώρου, η γέλη του Wharton και το αμνιακό υγρό. Τα κύτταρα αυτά πληρούν τις ιδιότητες των βλαστικών κυττάρων και χαρακτηρίζονται από προγονικό φαινότυπο με ευρύτερο δυναμικό διαφοροποίησης σε σχέση με τα αντίστοιχα ενήλικα κύτταρα [40]. Οι ιστοί αυτοί συνήθως απορρίπτονται μετά τη γέννα ή είναι εύκολα προσβάσιμοι μέσω των εξετάσεων της αμνιοκέντησης και των

χοριακών λαχνών. Τα κύτταρα αυτά, αν και παρουσιάζουν περιορισμένο δυναμικό διαφοροποίησης σε σχέση με τα ESCs, εντούτοις πλεονεκτούν των ενήλικων βλαστοκυττάρων τόσο στην ικανότητα πολλαπλασιασμού όσο και στην ικανότητα διαφοροποίησης. Συμπερασματικά, τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα αποτελούν μία νέα τάξη πολυδύναμων βλαστοκυττάρων που διαθέτουν ενδιάμεσα χαρακτηριστικά, μεταξύ εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων και των ASCs ^[41].

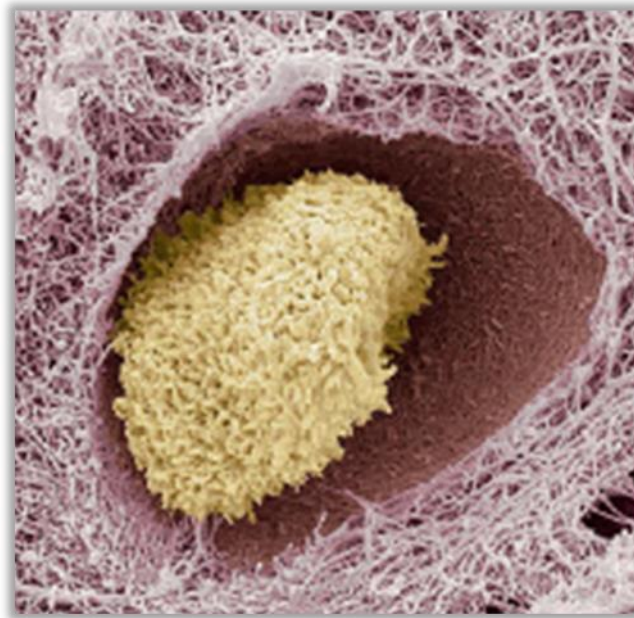
Κεφάλαιο 2. Χονδρογένεση

Ο σχηματισμός του χόνδρου αρχίζει με τη διαφοροποίηση των αστεροειδών αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων, τα οποία αφού συμπυκνωθούν, διαφοροποιούνται σε χονδροπρογονικά κύτταρα, από τα οποία προκύπτουν τα υποστρόγγυλα πρόδρομα κύτταρα του χόνδρου που ονομάζονται χονδροβλάστες (εικόνα 5). Οι μιτωτικές διαιρέσεις που ακολουθούν δημιουργούν αθροίσματα στενά τοποθετημένων χονδροβλαστών που αναπτύσσονται και ξεκινούν τη σύνθεση θεμέλιας ουσίας και ινώδους εξωκυττάριου υλικού. Η έκκριση του εξωκυττάριου υλικού παγιδεύει κάθε χονδροβλάστη στο εσωτερικό της χονδρογενούς ουσίας, διαχωρίζοντας έτσι τη μία χονδροβλάστη από την άλλη. Στη συνέχεια κάθε χονδροβλάστης υφίσταται μια ή δυο περαιτέρω μιτωτικές διαιρέσεις για το σχηματισμό μιας μικρότερης ομάδας ώριμων κυττάρων που διαχωρίζονται από μικρό ποσό εξωκυττάριου υλικού. Τα ώριμα κύτταρα του χόνδρου γνωστά ως χονδροκύτταρα, διατηρούν την ακεραιότητα της χόνδρινης μεσοκυττάριας ουσίας (εικόνα 6). Στο στάδιο της τελικής διαφοροποίησης τα χονδροκύτταρα υπερτρέφονται [42].



Εικόνα 5. Ιστολογικά στάδια διαφοροποίησης χονδροκυττάρων. Τροποποιημένο από Kelc et al [43].

Κάτω από κανονικές συνθήκες, ο μεταβολισμός του αρθρικού χόνδρου εμφανίζει μειωμένη δραστηριότητα. Οι θρεπτικές ουσίες, αλλά και τα προϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού μεταφέρονται προς και από τον αρθρικό χόνδρο, κυρίως μέσω του αρθρικού υγρού, το οποίο με τη σειρά του εξαρτάται από την αγγείωση του αρθρικού υμένα και του υποχόνδριου οστού. Η πολύ μικρή αναγεννητική ικανότητα του χόνδρου μέσα στο περιβάλλον μιας άρθρωσης που πάσχει, οδήγησε τα τελευταία χρόνια σε εντατική κλινική και εργαστηριακή έρευνα, για βιολογικές θεραπείες επιδιόρθωσης του χόνδρου.

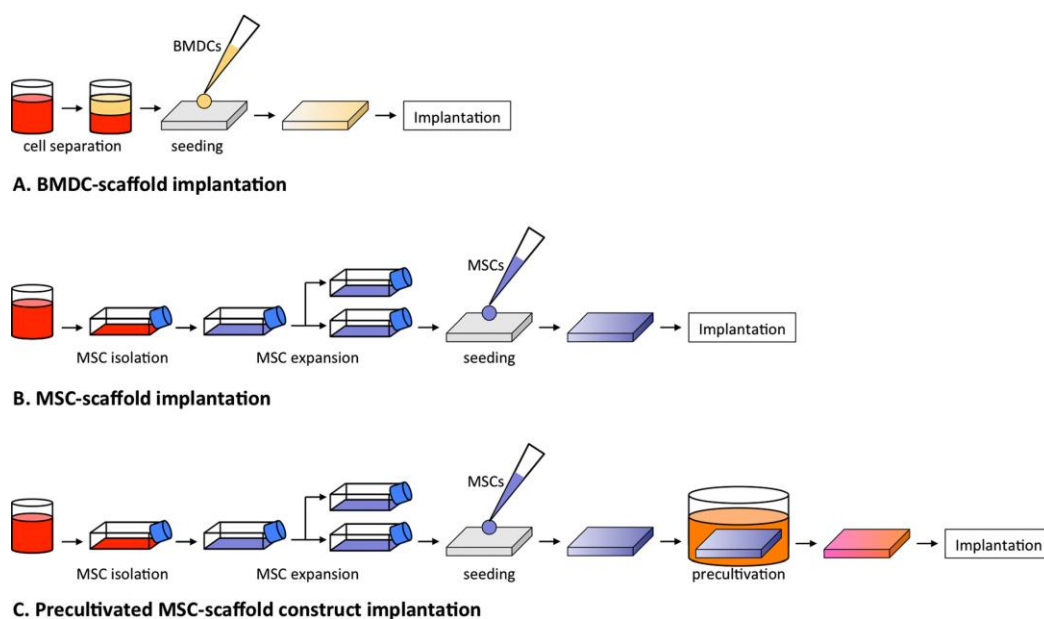


Εικόνα 6. Χονδροκύτταρο μέσα στη θεμέλια ουσία ^[44].

Κεφάλαιο 3. Χρήση αυτόλογων μεσεγχυματικών κυττάρων στην επαγωγή της χονδρογένεσης

Ο στόχος της μεταμόσχευσης των MSCs είναι να δημιουργήσει επισκευαστικό ιστό με τις ιδιότητες του υαλώδους χόνδρου που να ενσωματώνεται με τον περιβάλλοντα μητρικό οστεοχόνδρινο ιστό, περιορίζοντας ταυτόχρονα τις τοπικές και συστηματικές ανεπιθύμητες ενέργειες. Τρία γενικά πρωτόκολλα μεταμόσχευσης MSCs υπάρχουν σήμερα (εικόνα 7). Το πρωτόκολλο μεταμόσχευσης MSCs από το μυελό των οστών σε ένα βήμα, περιλαμβάνει αναρρόφηση μυελού, διαχωρισμό ενός κυτταρικού πληθυσμού εμπύρηνων κυττάρων που περιέχουν MSCs, σπορά αυτών των κυττάρων σε ένα ικρίωμα, και την εμφύτευση όλων μέσα σε μια ενιαία λειτουργική περίοδο ^[45-46]. Αποτελεί μέθοδο που απαιτεί ένα βήμα, αλλά ο αριθμός των MSCs είναι μικρός. Ένα δεύτερο πρωτόκολλο περιλαμβάνει την απομόνωση των MSCs μέσα στο εργαστήριο, *in vitro* καλλιέργεια, και σπορά σε ικρίωμα λίγο πριν από την εμφύτευση ^[47-48]. Το ικρίωμα μπορεί να σπαρθεί με MSCs κατά τη στιγμή της εμφύτευσης ή μέσα σε λίγες ημέρες μετά από μια σύντομη *in vitro* περίοδο καλλιέργειας για την προώθηση της προσκόλλησης των MSCs στα βιοϋλικά ^[49]. Η μέθοδος παρουσιάζει το πλεονέκτημα της υψηλής συγκέντρωσης MSCs αλλά η *in vitro* καλλιέργεια αυξάνει τον κίνδυνο της μόλυνσης. Το τρίτο πρωτόκολλο χρησιμοποιεί απομονωμένα MSCs που σπάρθηκαν επάνω σε ένα ικρίωμα και προκαλλιεργήθηκαν ή προδιαφοροποιήθηκαν *in vitro* επί 2 έως 3 εβδομάδες για την προώθηση της χονδρογένεσης πριν από την εμφύτευση ^[50-51]. Τα πρωτόκολλα αυτά έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία υαλώδους χόνδρου, και έχουν αποδώσει θετικά αποτελέσματα σε κλινικές μελέτες (με βάση αρθροσκοπικά, ιστολογικά και απεικονιστικά ευρήματα).

Ανεξάρτητα από το συγκεκριμένο πρωτόκολλο μεταμόσχευσης που χρησιμοποιείται, η θεραπευτική χρήση των αυτόλογων MSCs απαιτεί μια σειρά από βήματα που μπορεί να βελτιστοποιηθεί ώστε να βελτιωθεί η απόδοση της χονδρογένεσης, η ιστική ενσωμάτωση, και η κλινική έκβαση. Αυτά τα βήματα μπορεί να περιλαμβάνουν τη συλλογή των κυττάρων, την απομόνωση και την καλλιέργεια των MSCs, τη σπορά σε ικρίωμα, και την τελική τοποθέτηση των MSCs.



Εικόνα 7. Πρωτόκολλα επεξεργασίας αρχέγονων μεσεγχειματικών κυττάρων. Τροποποιημένο από Bornes et al [52].

3-1. Προέλευση και λήψη

Τα MSCs είναι παρόντα μέσα σε έναν αριθμό ιστών που μπορούν να χρησιμεύουν ως πιθανές θέσεις συγκομιδής. Μέχρι σήμερα, η βελόνα

αναρρόφηση του πνευλικού μυελού των οστών ήταν η μέθοδος της επιλογής για τη λήψη αυτόλογων μεσεγχυματικών κυττάρων. Η χρήση του περιφερικού αίματος για τη λήψη MSCs έχει επίσης αναφερθεί κλινικώς. Ο αρθρικός υμένας, το περίοστεο και ο λιπώδης ιστός είναι άλλες πηγές που έχουν αξιολογηθεί in vivo στη βιβλιογραφία. Ο λιπώδης ιστός προσφέρει το πλεονέκτημα της άφθονης διαθεσιμότητας MSCs, αλλά τα λιπώδη MSCs έχουν χαμηλότερο χονδρογενετικό δυναμικό από τα MSCs από το μυελό των οστών, το αρθρικό υγρό και το περίοστεο [36]. Τα MSCs από το μυελό των οστών και το περίοστεο έχουν μια αυξημένη οστεογενετική δυνατότητα. Αν και αυτό μπορεί να μην είναι ιδανικό για τη μηχανική του χόνδρου, θα μπορούσε να είναι πλεονέκτημα στην οστική αναγέννηση των οστεοχόνδρινων βλαβών. Ενώ οι σημερινές τεχνικές χρησιμοποιούν αυτόλογα MSCs για μεταμόσχευση, τα MSCs από τράπεζες ιστών και η αλλογενής μεταμόσχευση θα μπορούσε μια ημέρα να παρέχει μια εναλλακτική λύση. Ωστόσο, περαιτέρω έρευνα απαιτείται καθώς τα αλλογενή MSCs επάγουν την ανοσοαντίδραση [53].

3-1-1. Μυελός των οστών

Ο μυελός των οστών ήταν η πρώτη πηγή MSCs που χρησιμοποιήθηκε. Ο πλέον συνηθισμένος τρόπος απομόνωσης των μυελικών MSC είναι με μυελική αναρρόφηση από τη λαγόνιο ακρολοφία. Τα στελεχιαία κύτταρα λαμβάνονται απευθείας από τον ερυθρό μυελό της λαγόνιας ακρολοφίας, συχνά υπό γενική αναισθησία. Η διαδικασία δεν θεωρείται ιδιαίτερα παρεμβατική προς τον δότη και δεν απαιτούνται ράμματα στο σημείο της λήψης. Ανάλογα με τη γενική κατάσταση της υγείας του δότη, η όλη διαδικασία δύναται να γίνει αυθημερόν σε εξωτερικά ιατρεία ή ενδέχεται να απαιτηθεί η παραμονή του δότη για 1 - 2 ημέρες σε νοσοκομείο. Στους

ενήλικες μυελός των οστών μπορεί να ληφθεί και από το στέρνο, ενώ στα βρέφη (ηλικία 1 έως 12 μηνών) συχνά χρησιμοποιείται το οστό της κνήμης.

Πειραματικές μελέτες έδειξαν ότι, από μία μικρή ποσότητα μυελού των οστών (10 - 20ml), μπορούν να απομονωθούν μεσεγχυματικά κύτταρα (Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, BM-MSCs) και έπειτα από την καλλιέργειά τους να πολλαπλασιαστούν σε δισεκατομμύρια, λόγω της υψηλής ικανότητας διαφοροποίησής τους [54]. Εντούτοις ένα μείζον πρόβλημα του ιστού αυτού είναι το γεγονός ότι ο αριθμός των MSCs μειώνεται σημαντικά με την πάροδο της ηλικίας. Επίσης, τα BM-MSCs, όταν αναπτύσσονται *in vitro* δεν μπορούν να παραμείνουν αδιαφοροποίητα για μεγάλο χρονικό διάστημα [55]. Επιπλέον, η διαδικασία είναι επίπονη για το δότη, γεγονός το οποίο καθιστά επιτακτική την ανάγκη της αναζήτησης επαρκών εναλλακτικών πηγών των κυττάρων αυτών για αυτόλογη ή ετερόλογη θεραπευτική χρήση.

3-1-2. Λιπώδης ιστός

Μία ενήλικη πηγή MSCs που κερδίζει το ενδιαφέρον των ερευνητών όλα και περισσότερο είναι ο λιπώδης ιστός. Η περιεκτικότητα MSCs στο λιπώδη ιστό είναι 500 φορές μεγαλύτερη από το μυελό των οστών. Τα MSCs του λιπώδους ιστού (adipose tissue derived mesenchymal stem cells, AT-MSCs) απομονώνονται με μία απλή χειρουργική διαδικασία που είναι εύκολη και επαναλήψιμη. Η λήψη λίπους 1-2 gr γίνεται από την περιομφαλική χώρα με χρήση ειδικού trocar με μικρή τομή 0,5 εκατοστού με τοπική αναισθησία σε χειρουργική αίθουσα ή σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο ιατρείου. Η μέθοδος με χρήση του περιομφαλικού λίπους υπερτερεί κατά πολύ στον τελικό αριθμό των βλαστοκυττάρων σε σχέση με τη λήψη από το μυελό των οστών και χρησιμοποιείται σε βαρύτερες περιπτώσεις οστεοαρθρίτιδας και χόνδρινων

ελλειμμάτων. Τα AT-MSCs προσκολλώνται στην πλαστική καλλιεργητική επιφάνεια. Η καλλιέργεια όμως είναι ετερογενής αφού μαζί καλλιεργούνται στρωματικά κύτταρα του λιπώδους ιστού και ινοβλάστες.

3-1-3. Περιφερικό αίμα

Κυκλοφορούντα μεσεγχυματικά κύτταρα μπορούν να ληφθούν από το περιφερικό αίμα ανάλογα με τη διαδικασία λήψης των αιμοποιητικών μεσεγχυματικών κυττάρων. Χορηγούνται στο δότη συγκεκριμένα φάρμακα τα οποία διεγείρουν την απελευθέρωση MSCs από το μυελό των οστών στην κυκλοφορία του αίματος [23, 56]. Το αίμα του δότη στη συνέχεια φιλτράρεται καθώς περνάει μέσα από ενδοφλέβια γραμμή που τοποθετείται στο χέρι του, και τα MSCs κατακρατούνται, ενώ το υπόλοιπο αίμα επιστρέφει στην κυκλοφορία του δότη. Η διαδικασία αυτή είναι παρόμοια με αυτή που ακολουθείται κατά τη δωρεά αίματος ή αιμοπεταλίων. Έχει διαπιστωθεί ότι τα MSCs του περιφερικού αίματος (Peripheral Blood Mesenchymal Stem Cells, PB-MSCs) έχουν τα ίδια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά με τα BM-MSCs και επιπλέον μεγαλύτερη δυνατότητα για χονδρογενετική και λιπογενετική διαφοροποίηση [56].

3-1-4. Αρθρικός υμένας

Παρουσιάζει τη μεγαλύτερη χονδρογενετική ικανότητα με βάση in vitro μελέτες. Τα κλινικά δεδομένα είναι ελάχιστα [57].

3-1-5. Περίοστεο

Η χονδρογενετική του ικανότητα είναι αντίστοιχη του μυελού των οστών, ενώ διαθέτει παρόμοια οστεογενετική ικανότητα. Τα κλινικά δεδομένα είναι ελάχιστα ^[58].

3-1-6. Περιοδοντικοί ιστοί

Πλούσια πηγή MSCs είναι ο αναπτυσσόμενος 3^{ος} γομφίος. Μπορεί να συλλεχθεί εύκολα στην ηλικία των 8 – 10 ετών πριν την ασβεστοποίηση του.

3-1-7. Ομφάλιος λώρος

Η λήψη MSCs από τον ομφάλιο λώρο, αμέσως μετά τη γέννηση είναι μια εύκολη διαδικασία χωρίς κινδύνους. Το αίμα ομφαλίου λώρου αποτελεί μία από τις πιο καλά χαρακτηρισμένες πηγές τόσο αιμοποιητικών όσο και μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων, που προέρχονται από το νεογνό. Η πηγή αυτή μπορεί να αποτελέσει μία εναλλακτική πηγή βλαστικών κυττάρων για την κυτταρική θεραπεία, καθώς δεν προκύπτουν ηθικοί φραγμοί για την χρήση αυτού του υλικού. Η συχνότητα των MSCs στο αίμα ομφαλίου λώρου είναι εξαιρετικά μικρή, συγκεκριμένα το 0.00003% των εμπύρηνων κυττάρων, αλλά διαθέτουν μεγάλη πολλαπλασιαστική ικανότητα σε σύγκριση με MSCs

άλλων πηγών. Μελέτη των Jager et al απέδειξε την in vivo και in vitro οστική αναγέννηση από βλαστικά μεσεγχυματικά κύτταρα προερχόμενα από το αίμα του ομφάλιου λώρου. Σωματικά βλαστικά κύτταρα του ομφάλιου λώρου παρουσίασαν οστεογενετική, λιπογενετική και χονδρογενετική διαφοροποίηση [59].

3-1-8. Αμνιακό υγρό

Τα τελευταία χρόνια διερευνάται περαιτέρω ο πληθυσμός των MSCs που μπορούν να απομονωθούν από το αμνιακό υγρό (**Amniotic Fluid Mesenchymal Stem Cells, AF-MSCs**). Υπολογίζεται ότι 1 στα 100 κύτταρα που συλλέγονται από την αμνιοπαρακέντηση είναι αρχέγονο μεσεγχυματικό κύτταρο. Τα AF-MSCs μπορούν εύκολα να συλλεχθούν από το ανθρώπινο αμνιακό υγρό κατά τη διάρκεια προγραμματισμένης αμνιοπαρακέντησης κατά το δεύτερο τρίμηνο της κύησης, όπου το ποσοστό των AF-MSCs προσεγγίζει το 0,9-1,5% όλων των κυτταρικών πληθυσμών του αμνιακού υγρού. Γενικότερα, τα AF-MSCs αποτελούν μία νέα κατηγορία πολυδύναμων βλαστοκυττάρων που διαθέτουν ενδιάμεσα χαρακτηριστικά, μεταξύ ESCs και ASCs [22, 60].

3-1-9. Αμνιακός σάκος

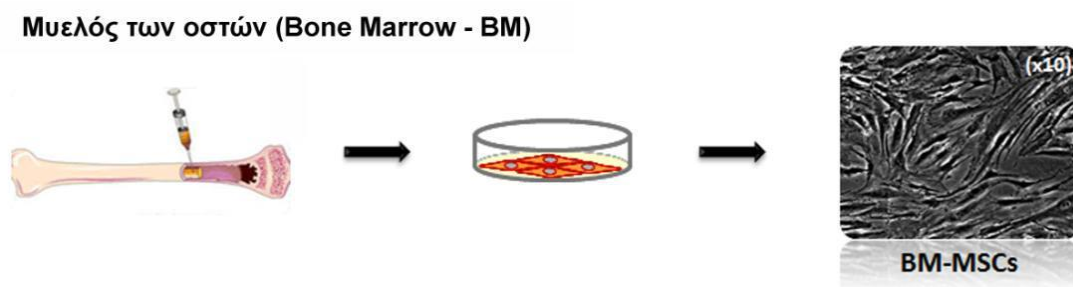
Ο αμνιακός σάκος δευτέρου και τρίτου τριμήνου της κύησης αποτελεί πρωτότυπη πηγή εμβρυϊκών MSCs, συμμετέχοντας πιθανώς και στην

παρουσία των MSCs στο αμνιακό υγρό [61]. Ο φαινότυπος των κυττάρων αυτών είναι συγκρίσιμος με τα BM-MSCs, προερχόμενα από ενήλικα άνθρωπο, ενώ η γονιδιακή τους ανάπτυξη είναι σημαντικά υψηλότερη από αυτήν των BM-MSCs.

3-2. Μέθοδοι επεξεργασίας

3-2-1. Απομόνωση

Μετά τη συλλογή του, ο ιστός τοποθετείται σε μέσο που περιέχει ορό εντός πλαστικών φιαλών καλλιέργειας και επωάζεται για έναν αριθμό ημερών [15]. Τα μονοκύρηνα κύτταρα, μερικά από τα οποία είναι MSCs, μπορεί να ποσοτικοποιηθούν και να επιστρωθούν στα 10.000 κύτταρα ανά cm^2 [22, 47].



Εικόνα 8. Απομόνωση και καλλιέργεια αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων από μυελό των οστών [62].

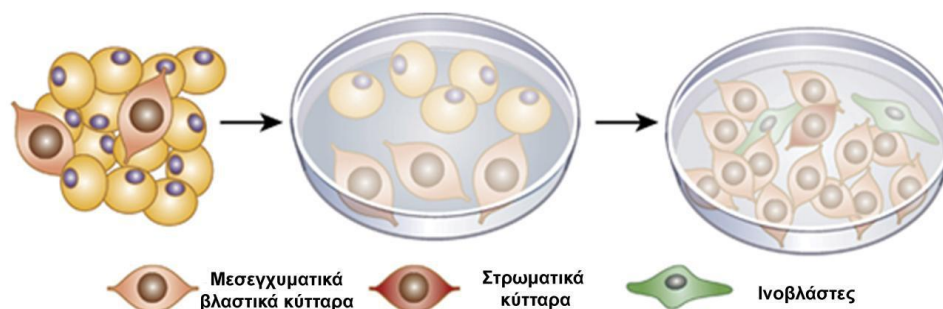
Τα MSCs απομονώνονται συνήθως από τη στοιβάδα μονοπύρηνων κυττάρων του μυελού των οστών, που προκύπτει μετά από επιστοίβαση του μυελού σε φικόλη ακολουθούμενη από φυγοκέντρηση. Η απομόνωση των MSCs λαμβάνει χώρα μέσω προσκόλλησης τους σε πλαστικό, ενώ οι άλλοι κυτταρικοί τύποι δεν προσκολλώνται και απορρίπτονται όταν αλλάζει το μέσο καλλιέργειας (εικόνα 8).

3-2-2. Καλλιέργεια

Τα μονοπύρηννα κύτταρα καλλιεργούνται στη συνέχεια σε κατάλληλο καλλιεργητικό μέσο και τα MSCs προσκολλώνται στην πλαστική καλλιεργητική επιφάνεια, έχοντας ατρακτοειδές σχήμα και μορφολογία ινοβλάστη (εικόνα 9) ^[63]. Η αντιγραφή των κυττάρων παρακολουθείται μέσω του επίπεδου της συρροής όπως παρατηρείται με το μικροσκόπιο. Μόλις επιτυγχάνεται η συρροή, χρησιμοποιούνται θρυψίνη και EDTA για να διαταράξουν την προσκόλληση, και τα MSCs εκ νέου επανατοποθετούνται εντός ενός μεγαλύτερου αριθμού φιαλών ^[64]. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται πολλαπλώς για να επιτραπεί η επέκταση των MSCs.

Μετά τη διέγερσή τους, τα πολυδύναμα μη-διαφοροποιημένα MSCs υφίστανται ασύμμετρη διαίρεση η οποία οδηγεί τη δημιουργία δυο θυγατρικών κυττάρων, εκ των οποίων το πρώτο είναι ακριβές αντίγραφο του μητρικού κυττάρου και διατηρεί την πολύ-δυναμικότητά του, ενώ το δεύτερο θυγατρικό κύτταρο διαφοροποιείται σε προγονικό κύτταρο που διαθέτει ένα πιο περιορισμένο αναπτυξιακό πρόγραμμα. Στο μοντέλο αυτό, το προγονικό κύτταρο συνεχίζει να διαιρείται ασύμμετρα, δημιουργώντας μερικώς διαφοροποιημένα κύτταρα με δυναμικό διαφοροποίησης προς 2 ή 3 κυτταρικές σειρές. Αυτά τα προγονικά κύτταρα είναι δομικά παρόμοια με τα

MSCs, αλλά διαφέρουν στο εύρος της γονιδιακής μεταγραφής γι αυτό και θα διαφοροποιηθούν αρχικά σε προγονικά κύτταρα διακριτών κυτταρικών σειρών και τελικά σε ώριμα κύτταρα με συγκεκριμένο φαινότυπο [65].



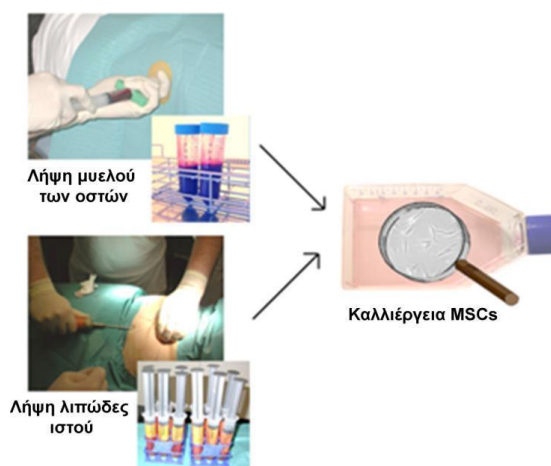
Εικόνα 9. Προσκόλληση MSCs του λιπώδους ιστού στην πλαστική καλλιεργητική επιφάνεια [62].

Γενικά τα MSCs αναπτύσσονται σε κάποιο βασικό θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με 10% v/v ορό εμβρύου αγελάδος (FCS). Συνήθως μέσα στις πρώτες 15 μέρες της *in vitro* ανάπτυξης, τα αιμοποιητικά κύτταρα, που δεν είναι προσκολλώμενα, απομακρύνονται πλήρως από την καλλιέργεια μετά από διαδοχικές ανανεώσεις του θρεπτικού μέσου.

Αν και ένας μεγαλύτερος αριθμός επαναλήψεων δίδει ένα μεγαλύτερο αριθμό των συνολικών MSCs διαθέσιμων για εμφύτευση, πολλαπλασιασμό και χονδρογενετική διαφοροποίηση, τα κύτταρα αυτά μπορεί να χαθούν μετά από πολλές επαναλήψεις [66]. Αυτά τα κύτταρα στη συνέχεια προορίζονται να υποστούν οστεογένεση [67]. Ως αποτέλεσμα, τα MSCs συνήθως καλλιεργούνται μέσω δύο έως τριών επαναλήψεων. Δεδομένου ότι η αναλογία των MSCs εντός του μυελού των οστών υπολογίζεται σε μία στις 10.000 κύτταρα, η αύξηση των MSCs είναι επωφελής και πρέπει να βελτιστοποιηθεί

ώστε να εξασφαλιστεί η επαρκής απόδοση καθαρών MSCs, διαθέσιμων για εμφύτευση.

Η χρήση FGF-2 ή bFGF ως μέσο καλλιέργειας αυξάνει το ρυθμό ανάπτυξης των MSCs διατηρώντας την πολυδυναμικότητά τους [68]. Περαιτέρω, έχει αποδειχθεί ότι ο FGF-2 αυξάνει την έκφραση των γονιδίων του κολλαγόνου και των πρωτεογλυκανών και την παραγωγή γλυκοζαμινογλυκανών [69]. Η υποξία κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας MSCs αυξάνει επίσης το χονδρογενετικό δυναμικό [70].



Εικόνα 10. Λήψη και καλλιέργεια MSCs [62]

3-2-3. Διαφοροποίηση

Αφού τα MSCs καλλιεργηθούν, διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες, χονδροκύτταρα, λιποκύτταρα και σκελετικά μονοκύτταρα [15, 71]. Επιπρόσθετα, μελέτες έχουν δείξει ότι τα MSCs εκτός από ιστούς μεσοδερμικής προέλευσης μπορούν να διαφοροποιηθούν *in vitro* σε κύτταρα που προέρχονται από

άλλες εμβρυϊκές στοιβάδες όπως σε νευρικά κύτταρα, ηπατοκύτταρα, καρδιακά κύτταρα, σκελετικά κύτταρα και επιθηλιακά κύτταρα του δέρματος, του πνεύμονα, του εντέρου και του σπλήνα [72]. Ανάλογα με τον ιστό προέλευσης, τα MSCs έχουν μεγαλύτερο δυναμικό να διαφοροποιηθούν προς το αντίστοιχο είδος κυττάρων π.χ. οστεοβλάστες εάν προέρχονται από το μυελό των οστών και λιποκύτταρα εάν προέρχονται από το λιπώδη ιστό.

Η ικανότητα πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των MSCs εξαρτάται από πολλούς συστηματικούς και τοπικούς παράγοντες, όπως είναι η διατροφή, η ορμονική ισορροπία των παραγόντων του κυττάρου, η σύστασή τους σε οξυγόνο, ο ρόλος των κυτοκινών, το pH και διάφορες μηχανικές δυνάμεις. Αυτοί οι παράγοντες επιδρούν στην ικανότητα παραγωγής του κυττάρου, καθορίζοντας την εξέλιξή του από αδιαφοροποίητο κύτταρο σε υψηλής διαφοροποίησης κύτταρο, όπως τα χονδροκύτταρα και τα οστεοκύτταρα [73]. Τα MSCs χαρακτηρίζονται από δείκτες κυτταρικής επιφανείας, οι οποίοι κάτω από κατάλληλες συνθήκες μπορούν να επάγουν την διαφοροποίησή τους σε οστό, χόνδρο, μυ και λίπος.

Η βιολογική ιδιότητα – μοναδική για τα MSCs είναι η διαφοροποίησή τους προς τους τρεις ιστούς μεσεγχυματικής προέλευσης. Διαφοροποίηση σε οστεοβλάστες επιτυγχάνεται με επώαση των κυττάρων με φωσφογλυκερόλη, ασκορβικό οξύ και δεξαμεθαζόνη. και μπορεί να αποδειχθεί μετά από χρώση με Alizarin Red ή με χρώση von Kossa (χρώση αλκαλικής φωσφατάσης-νιτρικού αργύρου). Κάτω από αυτές τις συνθήκες τα κύτταρα αποκτούν μορφολογία οστεοβλαστών, με αυξημένη ενεργότητα αλκαλικής φωσφατάσης και εναποθέτουν μεταλλοποιημένη εξωκυττάρια ουσία πλούσια σε ασβέστιο. Διαφοροποίηση σε λιποκύτταρα επιτυγχάνεται παρουσία iso-butyl-methyl xanthine και ανευρίσκεται αξιόπιστα με χρώση Oil Red O. Τα διαφοροποιημένα λιποκύτταρα, παράγουν μεγάλα κυστίδια με ουδέτερα λίπη. Για την διαφοροποίηση σε χονδροβλάστες απαιτείται τρισδιάστατη καλλιέργεια και θρεπτικό που περιέχει κάποιο μέλος της υπερ-οικογένειας του TGFβ (συνήθως TGFβ1, TGFβ3 ή BMP2) καθώς και Alcian Blue ή

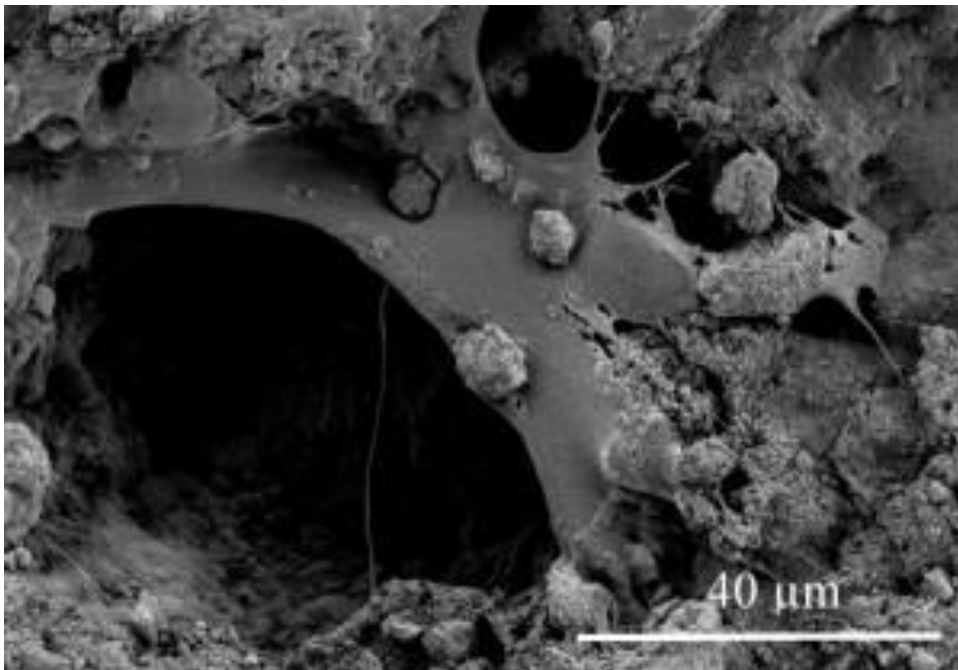
ανοσοϊστοχημική χρώση για κολλαγόνο τύπου II. Τότε τα κύτταρα χάνουν την ατρακτοειδή μορφολογία τους και σύντομα εκφράζουν στοιχεία εξωκυττάριας ουσίας του περιαρθρικού χόνδρου, όπως aggrecans και κολλαγόνο τύπου II [74].

3-2-4. Χρήση ικριωμάτων

Όταν αναπτύσσονται *in vitro*, τα MSCs σταδιακά χάνουν την ικανότητά τους για διαφοροποίηση προς τους συνήθεις τύπους κυττάρων μετά από έναν αριθμό ανακαλλιεργειών. Ωστόσο, όταν καλλιεργούνται πάνω σε ένα ικριώμα, τα MSCs διατηρούν την ικανότητά τους για διαφοροποίηση σε οστεοβλάστες, λιποκύτταρα και χονδροβλάστες για περισσότερο χρόνο από τα κύτταρα που καλλιεργούνται στην πλαστική επιφάνεια [37, 75-77]

Για την προαγωγή της χονδρογένεσης, τα καλλιεργημένα MSCs μπορούν εκ νέου να καλλιεργηθούν σε ικριώματα (πολυμερή, σφαιρίδια αλγινικού, σπόγγοι κολλαγόνου, υδρογέλες, μικροσφαιρίδια). Οι μήτρες βιοϋλικών παρέχουν ένα πλαίσιο για τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση MSC [37], και τη στερέωση τους σε τρισδιάστατες δομές ικανές για την πλήρωση των χόνδρινων ελλειμμάτων (εικόνα 11). Η συντριπτική πλειοψηφία των προ-κλινικών και κλινικών μελετών έχει χρησιμοποιήσει μήτρες, όπως γέλες ή πάστες που αποτελούνται από κολλαγόνο ή ινώδες πλούσιο σε αιμοπετάλια, οι οποίες είναι χυτεύσιμες ουσίες εντός των οποίων τα κύτταρα αιωρούνται [45, 49]. Πορώδη ικριώματα κατασκευασμένα από υλικά όπως το κολλαγόνο και το υαλουρονικό χρησιμεύουν ως εύπλαστες δομές σαν αφρός, στις οποίες προσκολλώνται MSCs κατά τη στιγμή της σποράς [51] και αποτελούν τις δύο πιο συχνά χρησιμοποιούμενες κατηγορίες ικριωμάτων για την παραγωγή χόνδρου. Ικριώματα σπαρμένα με κύτταρα σε πολλαπλές

στρώσεις, κατασκευασμένα για οστεοχόνδρινες βλάβες έχουν δείξει θετικά αποτελέσματα σε μελέτες σε ζώα ^[78]. Ικρίωμα τριών στρωμάτων από κολλαγόνο και υδροξυαπατίτη έχει δοκιμαστεί σε ανθρώπους, αλλά χρησιμοποιήθηκε ελεύθερο χωρίς εμφύτευση MSCs. Υπάρχει δυνατότητα για χρήση αυτού του προϊόντος, σε συνδυασμό με MSCs στο μέλλον ^[79]. Συνδυασμοί τζελ σπαρμένων με MSCs και ικρίωματα έχουν έχουν χρησιμοποιηθεί σε ορισμένες μελέτες in vivo.



Εικόνα 11. Καλλιέργεια AT-MSC πάνω σε ικρίωμα. Τροποποιημένο από Yazdimamaghani et al ^[80].

Έχει διαπιστωθεί ότι το καλύτερο ικρίωμα για την ανάπτυξη ενός ιστού είναι η εξωκυττάρια ουσία αυτού του ιστού. Για αυτό το λόγο, γίνονται προσπάθειες ώστε τα τεχνητά ικρίωματα να μπορούν να μιμηθούν τις ιδιότητες της εξωκυττάριας ουσίας, όσο αυτό είναι δυνατό. Ανάλογα με το

υλικό κατασκευής, τα ικριώματα χωρίζονται σε φυσικά ή συνθετικά. Τα φυσικά υλικά που χρησιμοποιούνται, τροποποιούνται για να δώσουν πορώδη ικριώματα. Τέτοια υλικά είναι: οι αλλογενείς ή ξενογενείς εξωκυττάριας μήτρες, ανόργανα κεραμικά όπως φωσφορικά άλατα του ασβεστίου και οργανικά πολυμερή όπως πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, λιπίδια και πολυνουκλεοτίδια. Τα φυσικά βιοϋλικά έχουν εξαιρετική βιοσυμβατότητα, οπότε επιτρέπεται η βέλτιστη προσκόλληση και ανάπτυξη των κυττάρων. Μειονεκτούν όμως στο ότι έχουν μικρή φυσική και μηχανική σταθερότητα και στο ότι μπορεί να εμφανίσουν ανοσογονικότητα. Τα συνθετικά υλικά, όπως οι βιοϋαλοι και τα συνθετικά πολυμερή, αναιρούν τα μειονεκτήματα των φυσικών υλικών, όμως παρουσιάζουν προβλήματα βιοσυμβατότητας.

Η πυκνότητα σποράς των MSCs δεν έχει αναφερθεί σαν ρουτίνα μέχρι σήμερα σε κλινικές μελέτες. Σε *in vivo* μελέτες σε πειραματόζωα, έχουν αναφερθεί πυκνότητες MSCs από 10 έως 48 εκατομμύρια κύτταρα ανά cm^3 ικριώματος [51, 78]. Η βέλτιστη πυκνότητα σπαρμένων MSCs ανά μονάδα όγκου παραμένει άγνωστη.

3-2-5. Χρήση προκαλλιεργημένων MSCs

Διάφορες *in vitro* τεχνικές καλλιέργειας έχουν διευκρινιστεί ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την προώθηση της δημιουργίας του υαλώδους χόνδρου εντός προκαλλιεργημένων κατασκευασμάτων MSCs-ικριώματος. Χημικοί μεσολαβητές όπως TGF- β και δεξαμεθαζόνη τοποθετούνται με μέσα καλλιέργειας για διέγερση της χονδρογένεσης [64]. Αρκετοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των BMP-2, BMP-4 και BMP-6 και IGF-1 μπορεί να χρησιμοποιείται επιπλέον για να ενισχύουν τη χονδρογένεση [81]. Το ασκορβικό οξύ χρησιμεύει ως συμπαράγοντας στην υδροξυλίωση των

αμινοξέων στο κολλαγόνο, και χρησιμοποιείται συνήθως μέσα σε καλλιεργητικά μέσα που προάγουν τη χονδρογένεση ^[82].

Η πίεση του οξυγόνου κατά τη διάρκεια της προκαλλιέργειας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ρυθμιστεί η χονδρογένεση. Η υποξική έκθεση βρέθηκε να αυξάνει την εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας σε ικριώματα και τη γονιδιακή έκφραση κολλαγόνου II, αγγρεκάνης και SOX9 ^[83]. Συν-καλλιέργεια των MSCs με χονδροκύτταρα προωθεί τη δημιουργία του χόνδρου ενώ παρατηρείται αυξημένη εναπόθεση γλυκοζαμινογλυκανών και γονιδιακής έκφρασης του κολλαγόνου τύπου II ^[84]. Ο σχηματισμός αρθρικού χόνδρου μπορεί να αυξηθεί με μηχανική διέγερση κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας μέσω υδροστατικής πίεσης ή υπερήχων. Η υδροστατική πίεση σε συνεχή και κυκλική μορφή αυξάνει την εναπόθεση θειικών ομάδων στις γλυκοζαμινογλυκάνες της μήτρας από χονδροκύτταρα καλλιεργούμενα σε ικριώματα κολλαγόνου ^[85]. Επιπλέον, υπέρηχοι χαμηλής έντασης βελτιώνουν την ιστολογική χονδρογενετική μορφολογία, την περιεκτικότητα σε γλυκοζαμινογλυκάνες και κολλαγόνο II, καθώς και τη γονιδιακή έκφραση κολλαγόνου τύπου II, αγγρεκάνης και SOX9 ^[86].

Τα MSCs του μυελού των οστών έχουν την τάση να εισέρχονται σε μία οστεογενετική οδό, γεγονός που δεν είναι ιδανικό για την εμβιομηχανική του αρθρικού χόνδρου ^[67]. Κατά τη διάρκεια της προκαλλιέργειας, το μονοπάτι της οστεογένεσης μπορεί να απομονωθεί χρησιμοποιώντας μια ποικιλία μεθόδων. Έχει αποδειχθεί ότι το πεπτιδίο PTHrP μειώνει την έκφραση του γονιδίου του κολλαγόνου X και τη δραστηριότητα της αλκαλική φωσφατάσης ^[87]. Υποξική καλλιέργεια των MSCs κατέστειλε σημαντικά την έκφραση του κολλαγόνου X σε σχέση με το νορμοξική καλλιέργεια ^[70]. Τέλος, συν-καλλιέργεια των MSCs με χονδροκύτταρα ελαττώνει την οστεογένεση με βάση την ποσοτικοποίηση οστεοκαλσίνης ^[88].

3-3. Εφαρμογές

3-3-1 Ενδοαρθρική έγχυση

Η ενδοαρθρική έγχυση MSCs είναι μια πολλά υποσχόμενη θεραπεία για τα τραυματικά χόνδρινα και οστεοχόνδρινα ελλείμματα. Η ένεση MSCs προσφέρει το πλεονέκτημα της ελάχιστης παρέμβασης, αλλά η διασπορά των MSCs και η έλλειψη εστίασης αυτών των κυττάρων στις χόνδρινες βλάβες καθιστά αυτή τη μέθοδο λιγότερο ελκυστική από τις τεχνικές άμεσης εμφύτευσης. Έχουν διεξαχθεί αρκετές προκλινικές μελέτες, αλλά ελάχιστες κλινικές μελέτες που να αξιολογούν την ενδοαρθρική έγχυση MSCs. Η τρέχουσα βιβλιογραφία υποστηρίζει την εφαρμογή μικροκαταγμάτων ή υποχόνδριων τρυπανισμών σε συνδυασμό με εβδομαδιαίες ενέσεις MSCs και υαλουρονικού κατά τη διάρκεια των πολλαπλών εβδομάδων [89-91]. Αυτό το πρωτόκολλο αυξάνει την πιθανότητα σποράς της χόνδρινης βλάβης με MSCs από την έγχυση και τον υποχόνδριο μυελό.

3-3-2 Τοποθέτηση με αρθροτομή

Έχουν χρησιμοποιηθεί ανοικτές ή αρθροσκοπικές χειρουργικές προσεγγίσεις για την πρόσβαση στα χόνδρινα ή οστεοχόνδρινα ελλείμματα γόνατου ή αστράγαλου κατά τη διάρκεια των διαδικασιών εμφύτευσης MSCs [45, 49]. Ο κατεστραμμένος αρθρικός χόνδρος καθαρίζεται ως το υποχόνδριο οστό και τα άκρα αφαιρούνται μέχρι να φανεί το χείλος του υγιούς αρθρικού χόνδρου. Στον καθορισμό ενός χόνδρινου ελλείμματος πλήρους πάχους, έχει χρησιμοποιηθεί τρυπανισμός του ανέπαφου υποχόνδριου οστού από διάφορους ερευνητές, σε μια προσπάθεια να διεγείρουν την εισροή κυττάρων και μεσολαβητών στη ζώνη επισκευής, ενώ άλλες ομάδες έχουν αφήσει το υποχόνδριο ανέπαφο [52]. Κατά τη στιγμή της εμφύτευσης, μπορεί να αλλάξει το μέγεθος των εμφυτευμάτων με κατάλληλα εργαλεία για να χωρέσει εντός των ορίων της βλάβης [45].

Η κόλλα ινώδους ή αυτόλογης ινώδους γέλης πλούσιας σε αιμοπετάλια μπορεί να εφαρμοστεί εντός της χόνδρινης βλάβης, επικαλύπτοντας το εμφύτευμα MSCs ώστε να αυξήσει η στερέωση του εμφυτεύματος. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν ράμματα για την αγκύρωση των εμφυτευμάτων με τον περιβάλλοντα μητρικό χόνδρο [92]. Αυτόλογα περισοτικά flaps ή μεμβράνες βιοϋλικών έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για να αποτραπεί η διαρροή των MSCs [47]. Έχει δειχθεί ότι τα περισοτικά flaps μπορούν να σχηματίσουν επιφανειακή ινώδη καλύμματα που περιβάλλουν το νεοσχηματιζόμενο υαλώδη χόνδρο. Σε γενικές γραμμές, δεν συνιστάται για χρήση σε συνδυασμό με ικρίωματα, αλλά μπορεί να χρησιμοποιούνται κομίζοντας MSCs εντός των χόνδρινων βλαβών όταν δεν χρησιμοποιούνται ικρίωματα [47].

Τα MSCs μπορεί να εμφυτεύονται μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με μια μήτρα βιοϋλικών. Τα MSCs που εμφυτεύονται καλυπτόμενα από ένα περισοτικό flap έχουν καλά αποτελέσματα [47].

3-3-3 Χρήση σε συνδυασμό με ικρίωματα

Η πλειοψηφία της τρέχουσας βιβλιογραφίας έχει επικεντρωθεί στο ικρίωμα που χρησιμοποιείται στη μεταμόσχευση MSCs. Τρεις γενικοί τύποι ικριωμάτων έχουν εμφυτευθεί:

- MSCs του μυελού τοποθετημένα σε ικρίωματα βιοϋλικών ^[93]
- Απομονωμένα και καλλιεργημένα MSCs, τοποθετημένα πάνω σε ικρίωμα ^[49]
- Προκαλλιεργημένες κατασκευές από MSCs που καλλιεργήθηκαν in vitro σε ικρίωματα πριν από την εμφύτευση ^[50]

Και τα 3 πρωτόκολλα είναι ικανά να προκαλέσουν πλήρωση της χόνδρινης βλάβης με ιστό παρόμοιο με υαλώδη χόνδρο που ενσωματώνεται με το γειτονικό ιστό, ενώ το καθένα έχει μοναδικά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Τα δύο πρώτα πρωτόκολλα έχουν μελετηθεί σε κλινικές και προκλινικές μελέτες και έχουν οδηγήσει σε θετικά λειτουργικά, αρθροσκοπικά, ιστολογικά και ακτινολογικά αποτελέσματα στους 48 μήνες σε ασθενείς με τραυματική, εστιακή χόνδρινη και οστεοχόνδρινη βλάβη γόνατος και αστραγάλου ^[47, 93-94]. Το τρίτο πρωτόκολλο, έχει διερευνηθεί μόνο σε προ-κλινικά μοντέλα, αλλά θα πρέπει να ελεγχθεί και κλινικά, δεδομένου ότι, in vitro, παράγει ανώτερα ιστολογικά αποτελέσματα ^[50].

Κεφάλαιο 4. Ανασκόπηση βιβλιογραφίας

4-1. Πειραματικές μελέτες

4-1-1 Μελέτες in vitro

Η επαγόμενη από τα MSC χονδρογένεση μπορεί να επαχθεί σε απλά in vitro μοντέλα που αποτελούνται από κυτταρικές μονοστοιβάδες ή κυτταρικά συσσωματώματα, σφαιρίδια, μικρομάζες, ή καλλιέργειες φρεατίων που περιέχουν πολλαπλά στρώματα MSCs και εξωκυττάριας ουσίας [15]. Συνάθροιση κυττάρων υψηλής πυκνότητας επιτεύχθηκε μέσω της χρήσης φυγοκέντρησης η οποία τοποθετεί τα κύτταρα σε ένα τρισδιάστατο περιβάλλον που προάγει την κυτταρική αλληλεπίδραση, μιμούμενη την κυτταρική συμπύκνωση των μεσεγχυματικών κυττάρων κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης του χόνδρου και του σχηματισμού της εξωκυττάριας ουσίας [64]. Εναλλακτικά, έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα βιοϋλικά ως ικριώματα πάνω στα οποία διαφοροποιούνται τα MSCs. Τα MSCs που είναι ενσωματωμένα εντός κολλαγόνου, και τζελ αγαρόζης, χιτοζάνης και υαλουρονικού σχηματίζουν ιστικά συσσωματώματα που περιέχουν χονδροκύτταρα και χόνδρινης εξωκυττάριας ουσίας [95]. Τα πορώδη ικριώματα που σπέρνονται με MSCs και αποτελούνται από κολλαγόνο, υαλουρονικό οξύ, μετάξι, αποκυτταριωμένη χόνδρινη εξωκυττάρια ουσία, πολυγλυκολικό οξύ και πολυγαλακτικό οξύ δημιουργούν ιστό που μοιάζει ιστολογικά με υαλώδη χόνδρο [81].

4-1-1-1 Ρόλος των αυξητικών παραγόντων στην επαγωγή της χονδρογένεσης των MSCs

Εκτός από τον TGF-β, έχουν μελετηθεί και άλλοι αυξητικοί παράγοντες στην επαγωγή της χονδρογένεσης. Οι Varas et al καλλιέργησαν BM-MSCs με TGF-β1, TGF-β3 και FGF-2 για 21 μέρες σε σφαιρίδια και διαπίστωσαν αύξηση της γονιδιακής έκφρασης κολλαγόνου II, αγκρεκάνης και SOX-9. Η προσθήκη FGF-2 προκάλεσε αύξηση της γονιδιακής έκφρασης ιντεγκρίνης 10 και ελάττωση της έκφρασης ιντεγκρίνης 11 ^[101]. Μελέτη των Indrawatta et al διαπίστωσε ότι η in vitro επαγωγή της χονδρογένεσης των BM-MSCs μέσω συνδυαστικής χορήγησης IGF-1, BMP-6 και TGF-β3 σε σφαιρίδια επέφερε αύξηση της γονιδιακής έκφρασης και της πρωτεϊνοσύνθεσης κολλαγόνου II και αγκρεκάνης. Η μεμονωμένη χορήγηση BMP-6 δεν είχε καμία επίδραση στη χονδρογένεση ^[102]. Σε αντίστοιχη έρευνα, οι Mwale et al υποστήριξαν ότι η συγχορήγηση δεξαμεθαζόνης μαζί με IGF-I, TGF-β1 και TGF-β3 βελτιστοποιεί τη χονδρογένεση των BM-MSCs αυξάνοντας τη γονιδιακή έκφραση έκφρασης κολλαγόνου II, κολλαγόνου X και αγκρεκανών ^[103].

Οι Kim et al καλλιέργησαν BM-MSCs και AT-MSCs με BMP-7, TGF-β2 και PTHrP για 14 μέρες σε σφαιρίδια και διαπίστωσαν αύξηση της γονιδιακής έκφρασης κολλαγόνου II, SOX-9 και RUNX2 ^[104]. Σε άλλη μελέτη, οι ίδιοι συγγραφείς υποστήριξαν ότι ο καλύτερος συνδυασμός επαγωγής της χονδρογένεσης των BM-MSCs και AT-MSCs είναι η συγχορήγηση TGF-β2 και BMP-7 ^[105]. Οι Sekiya et al καλλιέργησαν BM-MSCs με BMP-6 και TGF-β3 για 21 μέρες σε σφαιρίδια και διαπίστωσαν αύξηση της γονιδιακής έκφρασης κολλαγόνου II, κολλαγόνου X και SOX-9 ^[106]. Σε άλλη μελέτη, οι ίδιοι συγγραφείς υποστήριξαν ότι η BMP-2 είναι πιο αποτελεσματικός προαγωγός της χονδρογένεσης των BM-MSCs και AT-MSCs σε σχέση με τις BMP-4 και BMP-6 ^[107]. Παρομοίως, οι Noth et al, υποστήριξαν ότι η BMP-2 είναι αποτελεσματική στην επαγωγή της χονδρογένεσης ^[108]. Αντίθετα, σε

αντίστοιχη έρευνα, οι Weiss et al υποστήριξαν ότι μεμονωμένη χορήγηση BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, FGF-1, FGF-2 και IGF-I δεν επάγει τη χονδρογένεση των BM-MSCs [109].

Ο ρόλος της TGF-β στην επαγωγή της χονδρογένεσης των MSCs έχει μελετηθεί εκτενώς. Μελέτη των Wang et al διαπίστωσε ότι η in vitro επαγωγή της χονδρογένεσης των BM-MSCs μέσω του TGF-β3 σε σφαιρίδια και ικρίωμα silk fibroin επέφερε αύξηση της γονιδιακής έκφρασης κολλαγόνου II, SOX9, και κολλαγόνου X και αύξηση της πρωτεοσύνθεσης πρωτεογλυκανών και κολλαγόνου II [96]. Αντιστοίχως, μελέτη των Miyanishi et al διαπίστωσε ότι η in vitro επαγωγή της χονδρογένεσης των BM-MSCs μέσω του TGF-β3 σε σφαιρίδια και διαλείπουσα υδροστατική πίεση επέφερε αύξηση της γονιδιακής έκφρασης κολλαγόνου II, SOX9, και κολλαγόνου X και αύξηση της πρωτεοσύνθεσης πρωτεογλυκανών και κολλαγόνου II [97]. Οι Pelttari et al καλλιέργησαν BM-MSCs με TGF-β3 για 14, 28 και 42 μέρες και διαπίστωσαν αύξηση της γονιδιακής έκφρασης κολλαγόνου II, κολλαγόνου X, κολλαγόνου XI και MMP-13, καθώς και αύξηση της πρωτεϊνικής σύνθεσης κολλαγόνου II και κολλαγόνου X [98]. Οι Murdoch et al καλλιέργησαν BM-MSCs με TGF-β3 για 28 μέρες σε δίσκους φρεατίων (transwell disks) και διαπίστωσαν αύξηση της γονιδιακής έκφρασης κολλαγόνου II, κολλαγόνου X, κολλαγόνου XI και MMP-13, καθώς και αύξηση της πρωτεϊνικής σύνθεσης κολλαγόνου II και αγκρεκάνης [99].

Μελέτη των Melhorn et al διαπίστωσε ότι η in vitro επαγωγή της χονδρογένεσης των BM-MSCs και AT-MSCs μέσω του TGF-β1 σε σφαιρίδια αλγινικού για 14 και 21 μέρες επέφερε αύξηση της γονιδιακής έκφρασης κολλαγόνου II, αγκρεκάνης, και κολλαγόνου X και αύξηση της πρωτεοσύνθεσης και κολλαγόνου II και X [35]. Οι Barry et al σύγκριναν τους αυξητικούς παράγοντες TGF-β1, TGF-β2 και TGF-β3 στην επαγωγή της χονδρογένεσης των BM-MSCs και διαπίστωσαν ότι οι TGF-β2 και TGF-β3 είναι πιο αποτελεσματικοί από τον TGF-β1 [73]. Μελέτη των Karlsson et al διαπίστωσε ότι η in vitro επαγωγή της χονδρογένεσης των BM-MSCs μέσω

του TGF-β1 σε σφαιρίδια για 7, 14 και 21 μέρες επέφερε αύξηση της γονιδιακής έκφρασης κολλαγόνου II, SOX-9, και κολλαγόνου X και αύξηση της πρωτεοσύνθεσης πρωτεογλυκανών. Διαπιστώθηκε ότι η χονδρογένεση επηρεάζεται από την ηλικία των δοτών ^[100].

4-1-1-2 Ρόλος της υποξίας στην επαγωγή της χονδρογένεσης των MSCs

Έχει διαπιστωθεί ότι η καλλιέργεια MSCs σε συνθήκες υποξίας προάγει τη χονδρογένεση. Οι Merceron et al καλλιέργησαν AT-MSCs με TGF-β1 για 28 μέρες σε υποξικές και νορμοξικές συνθήκες και διαπίστωσαν ότι σε υποξικές συνθήκες η αύξηση της γονιδιακής έκφρασης κολλαγόνου II και SOX9 συνέβαινε νωρίτερα από τις νορμοξικές συνθήκες ^[110]. Οι Khan et al καλλιέργησαν BM-MSCs με IGF-I και TGF-β3 για 14 μέρες σε υποξικές και νορμοξικές συνθήκες και διαπίστωσαν ότι σε υποξικές συνθήκες παρατηρήθηκε αύξηση της γονιδιακής έκφρασης κολλαγόνου II, κολλαγόνου XI και αγκρεκανών καθώς και εναπόθεση πρωτεογλυκανών ^[111]. Επιπρόσθετα, έρευνα των Ronziere et al υποστήριξε η υποξία (τάση O₂ 2%) είναι μια σημαντική παράμετρος ρύθμισης της χονδρογένεσης πριν το στάδιο της υπερτροφίας ^[112].

4-1-2 Μελέτες ex vivo

Τα χόνδρινα και οστεοχόνδρινα μοντέλα επιτρέπουν την αξιολόγηση της ιστικής επιδιόρθωσης του χόνδρου σε προσομοιωμένα χόνδρινα ελλείμματα σε ελεγχόμενα in vitro περιβάλλοντα. Χοίρεια MSCs ενσωματωμένα σε γέλη αγαρόζης που εμφυτεύθηκαν σε χόνδρινες βλάβες έδειξαν μια αφθονία κολλαγόνου τύπου II και γλυκοζαμινογλυκανών μετά από καλλιέργεια 6 εβδομάδων [95]. Παρομοίως, ανθρώπινα MSCs ενσωματωμένα σε αλγινικό πήκτωμα και εμφυτευμένα εντός οστεοχόνδρινου εκφυτεύματος για 4 εβδομάδες είχαν γονιδιακή έκφραση κολλαγόνου II και παραγωγή γλυκοζαμινογλυκανών συμβατή με υαλώδη χόνδρο [113]. Πηκτώματα σπαρμένα με MSCs εμφάνισαν ελάχιστη ενοποίηση με το περιβάλλοντα εκφύτευμα χόνδρου μετά από καλλιέργεια 6 εβδομάδων [95]. Αυτό μπορεί να οφείλεται, εν μέρει, στην απουσία επαρκούς χρόνου αναδιαμόρφωσης ή in vivo παραγόντων, όπως η μηχανική διέγερση, που απαιτούνται για την επίτευξη της ενσωμάτωσης [114].

4-1-3 Μελέτες in vivo σε πειραματόζωα

Ζωικά μοντέλα παρέχουν προκλινική in vivo αξιολόγηση της χρήσης των MSCs στη χονδρογένεση. Αρχίζοντας με το έργο των Wakitani et al το 1994 [115], τεχνικές βασισμένες στα αυτόλογα μεσεγχυματικά κύτταρα έχουν θετικά αποτελέσματα στην αναγέννηση του αρθρικού χόνδρου σε αρκετές μικρές μελέτες σε ζώα όπως κουνέλια και αρουραίους. Διάφορα πρωτόκολλα ένεσης και μεταμόσχευσης MSC έχουν χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία

προσομοιωμένων, εστιακών χόνδρινων και οστεοχόνδρινων ελλειμμάτων σε μεγάλα ζώα όπως πρόβατα, αίγες, χοίρους και άλογα.

4-1-3-1 Ενδαρθρική χορήγηση

Ενδαρθρική ένεση MSCs σε γόνατα κουνελιού που περιείχαν οστεοχόνδρινα ελλείμματα στη μηριαία τροχιλία οδήγησε στην επανακάλυψη των ελλειμμάτων με ινώδη ιστό που απέτυχε να αναδιαμορφωθεί σε υαλώδη χόνδρο επί 24 εβδομάδες. Αντιθέτως, MSCs που εμφυτεύτηκαν απευθείας εντός της θέσης του ελλείμματος παρήγαγαν ιστό ομοιάζοντα με χόνδρο (cartilage-like tissue) που αναδιαμορφώθηκε με το χρόνο παράγοντας χόνδρινα και οστικά συστατικά παρόμοια με τον περιβάλλοντα μητρικό οστεοχόνδρινο ιστό ^[116]. Σε μια άλλη μελέτη, MSCs που εγχύθηκαν σε συνδυασμό με υαλουρονικό σε γόνατα χοίρου με χόνδρινα ελαττώματα μερικού πάχους, είχαν ως αποτέλεσμα την καλή κάλυψη του ελλείματος με υαλώδη χόνδρο στις 12 εβδομάδες μετά την ένεση ^[117].

Άλλες ερευνητικές ομάδες έχουν εφαρμόσει ένεση MSCs σε συνδυασμό με υποχόνδριους τρυπανισμούς ή μικροκατάγματα. Διαδοχικές εβδομαδιαίες ενέσεις MSCs μετά υποχόνδριους τρυπανισμούς για θεραπεία προσομοιωμένων χόνδρινων ελλειμμάτων του άπω μηριαίου σε αίγες, παρήγαγαν ολοκληρωμένο ιστό συμβατό με υαλώδη χόνδρο μετά από 6 μήνες ^[91]. Σε ένα παρόμοιο μοντέλο, οι Saw et al, χρησιμοποίησαν ένεση από κυτταρικά προϊόντα από αναρρόφηση μυελού ένεση σε συνδυασμό με υαλουρονικό οξύ εβδομαδιαίως. Διαπίστωσαν βελτιωμένη συγκέντρωση πρωτεογλυκανών και κολλαγόνου τύπου II εντός των χόνδρινων ελλειμμάτων της μηριαίας τροχιλίας σε σύγκριση με τη μεμονωμένη λήψη υαλουρονικού ^[90]. Οι Nam et al μελέτησαν την εμφύτευση καλλιεργημένων BM-MSCs σε 18

αίγες με χόνδρινη βλάβη έσω μηριαίου κονδύλου, 2 εβδομάδες μετά από υποχόνδριους τρυπανισμούς. Μετά από follow-up 6 μηνών, διαπίστωσαν την κάλυψη των χόνδρινων βλαβών με λείο ιστό που ενσωματώθηκε στον περιβάλλοντα χόνδρο, με αυξημένη περιεκτικότητα σε πρωτεογλυκάνες, γλυκοζαμινογλυκάνες και κολλαγόνο τύπου II ^[91]. Οι Saw et al μελέτησαν την εμφύτευση καλλιεργημένων BM-MSCs μαζί με υαλουρονικό σε 15 αίγες με χόνδρινη βλάβη μηριαίας τροχιλίας, 1 εβδομάδα μετά από υποχόνδριους τρυπανισμούς. Μετά από follow-up 6 μηνών, διαπίστωσαν την κάλυψη των χόνδρινων βλαβών με λείο ιστό που ενσωματώθηκε στον περιβάλλοντα χόνδρο, με αυξημένη περιεκτικότητα σε πρωτεογλυκάνες, γλυκοζαμινογλυκάνες και κολλαγόνο τύπου II ^[90]. Σε αντίθεση με αυτά τα ευρήματα, οι McIlwraith et al δεν βρήκαν καμία διαφορά μεταξύ του υαλουρονικού και του συνδυασμό υαλουρονικού-MSCs σε αρκετές ιστολογικές και ακτινολογικές παραμέτρους, και την ποσότητα γλυκοζαμινογλυκανών στο 1 έτος σε άλογα που έλαβαν ένεση MSCs και μικροκατάγματα ^[118]. Πρόσφατη μελέτη των Latief et al έδειξε ότι τα διαφοροποιημένα χονδροκύτταρα έχουν καλύτερη επιβίωση και αναγεννητικό δυναμικό από τα AT-MSCs σε ζωικό μοντέλο οστεοαρθρίτιδας ^[120].

Ένα πιθανό μειονέκτημα της ενδοαρθρικής ένεσης αφορά τη διασπορά των κυττάρων, λόγω της έλλειψης εστίασης του περιεχόμενου της ένεσης σε μία θέση ελλείμματος, και το δυναμικό για μια ανεπαρκή ποσότητα σπαρμένων κυττάρων που απαιτούνται για την αναγέννηση. Η χρήση μαγνητικής σήμανσης των κυττάρων και ενός εξωτερικού μαγνήτη έχει προταθεί ως μια ελάχιστα επεμβατική μέθοδος για να επικεντρώθει η ένεση MSCs στις χόνδρινες βλάβες. Σε γόνατα μίνι-χοίρου, MSCs σημασμένα με ferumoxide κατευθύνθηκαν πάνω από τις χόνδρινες βλάβες επιγονατίδας με μαγνήτη για 10 λεπτά μετά την ένεση και προκάλεσαν ανώτερα αρθροσκοπικά και ιστολογικά scores από μια ένεση που κατευθύνθηκε από τη βαρύτητα ^[119].

4-1-3-2 Εμφύτευση σε συνδυασμό με ικρίωματα

Διάφορες κατασκευές για εμφύτευση MSCs έχουν προταθεί στην προκλινική βιβλιογραφία. Ένα τρισδιάστατο εμβιομηχανικό κατασκεύασμα χωρίς ικρίωμα (Scaffold-free, 3D tissue-engineered construct, TEC) που προέρχεται από μονοστιβάδες διαφοροποιημένων MSCs έχει ερευνηθεί [70,74]. Σε 6 μήνες, TEC που εμφυτεύθηκε σε χόνδρινες βλάβες μηριαίων κονδύλων δημιούργησαν επιδιορθωτικό ιστό με επιφανειακή ινώδη επιφάνεια και εν τω βάθει στιβάδα ομοιάζουσα με αρθρικό χόνδρο [121].

Μεταμόσχευση μητρών σπαρμένων με MSC αποτελούμενων από κολλαγόνο, πολυγλυκολικό οξύ, πολυγαλακτικό οξύ, πολυκαπρολακτόνη, φιμπρίνη, χιτοζάνη, αλγινικό, μετάξι, αφαλατωμένη εξωκυττάρια ουσία οστού, και φωσφορικό ασβέστιο πραγματοποιήθηκε με επιτυχία σε αρκετές άλλες μελέτες μικρών και μεγάλων ζώων. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, παρατηρήθηκε πλήρωση των βλαβών με υαλώδη χόνδρο στις 4 – 24 εβδομάδες μετά τη μεταμόσχευση. Σε κάποιες μελέτες παρατηρήθηκε οστική αναγέννηση εντός του οστεώδους στοιχείου των οστεοχόνδρινων ελαττωμάτων [52].

Η εμφύτευση μητρών σπαρμένων με MSCs που είχαν προκαλλιεργηθεί *in vitro* για 2 - 3 εβδομάδες πριν από την εμφύτευση είναι ένα εναλλακτικό πρωτόκολλο επαγωγής της χονδρογένεσης. Οι Zscharnack et al έδειξαν ότι προκαλλιεργημένα τζελ κολλαγόνου σπαρμένα με MSCs που εμφυτεύθηκαν μέσα σε οστεοχόνδρινα ελλείμματα προβάτων προκάλεσαν καλύτερη επιδιόρθωση των ιστών από μη προκαλλιεργημένα τζελ στους 6 μήνες μετά την εμφύτευση [50]. Οι Marquass et al είχαν παρόμοια ευρήματα μετά από 1 έτος και, επίσης, έδειξε ότι προκαλλιεργημένα MSCs είχαν καλύτερα ιστολογικά αποτελέσματα από προκαλλιεργημένα χονδροκύτταρα (MACI) [122].

Μεσεγγυματικά κύτταρα από το μυελό των οστών σπάρθηκαν επί πηκτών κολλαγόνου και συγκρίθηκαν με μεμονωμένα MSCs από τους Zhang et al. Μετά από 2 μήνες και οι δύο τύποι κυττάρων παρήγαγαν ιστολογικά και μακροσκοπικά ισοδύναμο ιστό με υαλώδη χόνδρο μέσα σε χόνδρινο έλλειμμα μηριαίας τροχιλίας χοίρων ^[94]. Σε άλλη μελέτη εκτιμήθηκε η συν-μεταμόσχευση αυτόλογων χονδροκυττάρων και MSCs μέσα σε κόλλα ινικής σε κασίκα χόνδρινη βλάβη μηριαίου κονδύλου αιγών. Αυτή η τεχνική έδειξε ανώτερη πλήρωση του ελλείμματος, αυξημένη ιστολογική βαθμολόγηση στο σύστημα O'Driscoll και παρήγαγε αυξημένη ποσότητα γλυκοζαμινογλυκανών σε σύγκριση με τα μικροκατάγματα ^[123].

Οι μελέτες σε ζώα έχουν αποφέρει θετικά προ-κλινικά αποτελέσματα που υποστηρίζουν και κατευθύνουν τη χρήση των MSCs σε ανθρώπους για την επαγωγή της χονδρογένεσης. Συγκεκριμένες τεχνικές όπως η ενδοαρθρική ένεση και η μεταμόσχευση MSCs, έχουν μελετηθεί εκτενώς. Άλλες τεχνικές όπως η τρισδιάστατη κατασκευή χωρίς ικρίωμα, η μαγνητικά καθοδηγούμενη έγχυση MSC, η συν-μεταμόσχευση MSCs και χονδροκυττάρων, και η χρήση προκαλλιεργημένων MSCs έχουν χρησιμοποιηθεί σε πειραματόζωα.

Οι Guo et al μελέτησαν την εμφύτευση BM-MSCs σε ικρίωμα TCP σε 28 αιγοπρόβατα με οστεοχόνδρινη βλάβη έσω μηριαίου κονδύλου. Μετά από follow-up 6 μηνών, διαπίστωσαν την ύπαρξη λείου ιστού που ενσωματώθηκε στον περιβάλλοντα φυσιολογικό ιστό. Ιστολογικά, διαπιστώθηκε περιεκτικότητα πρωτεογλυκανών και κολλαγόνου τύπου II συμβατή με υαλώδη χόνδρο. Η περιεκτικότητα του νεοσχηματισθέντος ιστού σε γλυκοζαμινογλυκάνες ήταν στο 89% του φυσιολογικού χόνδρου ^[124]. Οι Wayne et al μελέτησαν την εμφύτευση BM-MSCs σε ικρίωμα PLA σε 10 σκύλους με οστεοχόνδρινη βλάβη έσω και έξω μηριαίου κονδύλου. Μετά από follow-up 1,5 μηνών, διαπίστωσαν την κάλυψη των χόνδρινων βλαβών με υαλώδη χόνδρο και ινοχόνδρινο ιστό που ενσωματώθηκε στον περιβάλλοντα χόνδρο ^[51]. Οι Ando et al μελέτησαν την εμφύτευση MSCs από αρθρικό υμένα σε ικρίωμα TEC σε 9 σκύλους με χόνδρινη βλάβη έσω μηριαίου κονδύλου.

Μετά από follow-up 6 μηνών, διαπίστωσαν την κάλυψη των χόνδρινων βλαβών με λείο ιστό πλούσιο σε κολλαγόνο τύπου II και πρωτεογλυκάνες, με παρόμοιες εμβιομηχανικές ιδιότητες με το φυσιολογικό χόνδρο ^[125]. Οι Shinomura et al μελέτησαν την εμφύτευση MSCs από αρθρικό υμένα σε ικρίωμα TEC σε 13 χοιρίδια με χόνδρινη βλάβη έσω μηριαίου κονδύλου. Μετά από follow-up 6 μηνών, διαπίστωσαν την κάλυψη των χόνδρινων βλαβών με ιστό πλούσιο πρωτεογλυκάνες, με υψηλά ιστολογικά scores και παρόμοιες εμβιομηχανικές ιδιότητες με το φυσιολογικό χόνδρο ^[121]. Οι Wegener et al μελέτησαν την εμφύτευση BM-MSCs σε κόλλα ινικής και ικρίωμα PGA σε 9 πρόβατα με χόνδρινη βλάβη έσω μηριαίου κονδύλου. Μετά από follow-up 3 μηνών, διαπίστωσαν την κάλυψη των χόνδρινων βλαβών με ιστό με χαρακτηριστικά μεταξύ ινώδους και υαλώδους χόνδρου ^[126-127].

Οι Fu et al συνέκριναν τη χονδρογενετική δυνατότητα των MSCs που προέρχονται από το περιφερικό αίμα (Peripheral Blood Mesenchymal Stem Cells, PB-MSCs) με τα MSCs του μυελού των οστών (BM-MSCs). Αφού έσπειραν τα MSCs πάνω σε ικρίωμα DBM και τα τοποθέτησαν σε χόνδρινες βλάβες γονάτων σε κουνέλια N. Ζηλανδίας, διαπίστωσαν ότι τα PB-MSCs δεν διέφεραν από τα BM-MSCs στη μορφολογία, ανοσοφαινότυπο και ικανότητα επισκευής χόνδρινων βλαβών. Επιπλέον, τα BM-MSCs παρουσίασαν μεγαλύτερη οστεογενετική δυναμική ενώ τα PB-MSCs είχαν μεγαλύτερη δυνατότητα για χονδρογένεση και λιπογένεση ^[56].

Πειράματα σε σκύλους και σε ποντίκια, απέδειξαν ότι αυτόλογα μεσεγχυματικά κύτταρα, τοποθετημένα σε εκμαγεία, μπορούν να δώσουν οστική αναγέννηση σε μεγάλο οστικό έλλειμμα ^[128-129]. Επίσης, σε πείραμα που έγινε σε σκύλο με μεγάλο οστικό έλλειμμα μηριαίου οστού, αποδείχθηκε ότι τα αυτόλογα μεσεγχυματικά κύτταρα έχουν τη δυνατότητα να παράγουν οστίτη ιστό στο έλλειμμα, αφού τοποθετήθηκαν σε υπόβαθρο υδροξυαπατίτη, χωρίς να χρησιμοποιηθούν ανοσοκατασταλτικές θεραπείες ^[130]. Αυτό δείχνει ότι τα μεσεγχυματικά κύτταρα δεν απορρίπτονται, διότι στην επιφάνεια τους τα κύτταρα αυτά δε φέρουν χαρακτηριστικά απόρριψης από το δέκτη ιστό.

Έχουν ένα χαρακτηριστικό ανοσοφαινότυπο και ειδικούς δείκτες στην κυτταρική επιφάνειά τους, τους SH-2, SH-3, SH-4, ενώ είναι αρνητικοί σε αιμοποιητικούς δείκτες, όπως CD34 και CD45 [131-133].

4-2. Κλινικές μελέτες

Αυξανόμενος αριθμός κλινικών στοιχείων υποστηρίζει την εμφύτευση αυτόλογων MSCs ως μια αποτελεσματική θεραπεία για την τραυματική βλάβη χόνδρινων βλαβών, μέσω της επαγωγής της χονδρογένεσης. Κύτταρα προερχόμενα από αναρροφήσεις αυτόλογου μυελού των οστών από τη λαγόνια ακρολοφία έχουν χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία εστιακών τραυματικών χόνδρινων ελλειμμάτων μηριαίου, κνήμης και επιγονατίδας, διαχωριστικής οστεοχονδρίτιδας, σηπτικής αρθρίτιδας και μονοδιαμερισματικής οστεοαρθρίτιδας. Μετά την αναρρόφηση, τα MSCs απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν μέσα στο εργαστήριο για 2 - 3 εβδομάδες και εμφυτεύθηκαν μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με μήτρες βιοϋλικών.

Εναλλακτικά, σε άλλες μελέτες, συμπύκνωμα MSCs προερχόμενο από αναρρόφηση μυελού των οστών, διαχωρίστηκε χρησιμοποιώντας συστήματα φυγοκέντρησης. Αυτές οι συλλογές περιείχαν μια ποικιλία κυτταρικών τύπων από το χώρο του μυελού των οστών, μερικά από τα οποία ήταν MSCs. Αυτά τα MSCs εμφυτεύθηκαν αμέσως σε συνδυασμό με μήτρες σε χόνδρινες βλάβες κατά την ίδια λειτουργική περίοδο με την αναρρόφηση. Μήτρες που χρησιμοποιούνται σε αυτές τις μελέτες περιλαμβάνουν πλούσιο σε αιμοπετάλια πήγματος ινώδους, τζελ κολλαγόνου και ικρίωματα αποτελούμενα από κολλαγόνο, υαλουρονικό οξύ και πολυγλυκολικό οξύ. Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα MSCs σπάρθηκαν επάνω σε ικρίωμα ή μήτρα γέλης για εμφύτευση. Έχουν περιγραφεί διάφοροι συνδυασμοί των

ικριωμάτων και πηκτωμάτων εμπλουτισμένων με κύτταρα. Μερικά πρωτόκολλα περιελάμβαναν την εμφύτευση των κυττάρων μέσα σε τζελ, καλυπτόμενα με μεμβράνες βιοϋλικών.

4-2-1 Ενδοαρθρική χορήγηση

Με βάση τα διαθέσιμα στοιχεία, η εμφύτευση αυτόλογων MSCs φαίνεται να είναι μια επιτυχημένη θεραπεία για τα εστιακά τραυματικά χόνδρινα και οστεοχόνδρινα ελλείμματα. Τα κλινικά αποτελέσματα βελτιώθηκαν με το χρόνο, 24 μήνες μετά την εμφύτευση, στην πλειονότητα των ασθενών με εστιακά τραυματικά χόνδρινα και οστεοχόνδρινα ελλείμματα γόνατος και αστραγάλου ^[52]. Αυτά τα θετικά αποτελέσματα δεν ισχύουν σε ασθενείς με πιο προχωρημένη εκφυλιστική ασθένεια. Σε μία μελέτη που επικεντρώθηκε στην αντιμετώπιση της μονοδιαμερισματικής οστεοαρθρίτιδας γόνατος, τα αποτελέσματα ήταν ισοδύναμες μεταξύ της ομάδας μεταμόσχευσης MSC και της ομάδας ελέγχου άνευ κυττάρων σε 24 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε ταυτόχρονη υψηλή οστεοτομία της κνήμης ^[134].

Υπάρχει μια σχετική έλλειψη βιβλιογραφικής αξιολόγησης στα κλινικά αποτελέσματα πέραν των 24 μηνών σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με μεταμόσχευση MSCs για τις εστιακές βλάβες αρθρικού χόνδρου. Μία ερευνητική ομάδα μελέτησε τα αποτελέσματα μέχρι και 48 μήνες και παρατήρησε μια μικρή μείωση στα κλινικά scores στους 36 και 48 μήνες σε σύγκριση με 24 μήνες μετά την μεταμόσχευση MSCs ^[45]. Υπάρχει μια μελέτη που αναφέρει την ασφάλεια της μεταμόσχευσης MSCs έως 137 μήνες μετά τη χειρουργική επέμβαση, αν και άλλα κλινικά αποτελέσματα δεν αξιολογήθηκαν ^[135].

Η μαγνητική τομογραφία και η αρθροσκόπηση έχουν δείξει ότι ο αναγεννώμενος ιστός που προέρχεται από την μεταμόσχευση MSCs περιέχει υαλώδη χόνδρο και ενσωματώνεται με τον περιβάλλοντα μητρικό ιστό εντός 24 μηνών από την εμφύτευση. Η ποιότητα του χόνδρου σχετίζεται με τα κλινικά αποτελέσματα, την ακεραιότητα εμφυτεύματος – χόνδρου και το ποσοστό της πλήρωσης του ελλείμματος ^[45]. Σε ορισμένες περιπτώσεις, έχει παρατηρηθεί υπερτροφικός χόνδρος σε αρθροσκόπηση, αλλά μετά από αρθροσκοπικό χειρουργικό καθαρισμό του ιστού προέκυψε υγιής ιστός ^[45]. Σε οστεοχόνδρινες βλάβες, το υποχόνδριο οστό φαίνεται να απαιτεί μεγαλύτερο διάστημα για την αναδιαμόρφωση από ότι ο χόνδρος. Οι Giannini et al διαπίστωσαν ανώμαλη υποχόνδριο δομή και διαχωρισμένες οστεοχόνδρινες διασυνδέσεις σε μαγνητική τομογραφία στους 24 μήνες μετά από θεραπεία οστεοχόνδρινων βλαβών του αστραγάλου ^[45].

Η ιστολογική ανάλυση των βιοψιών των παραγόμενων ιστών ήταν συμβατή με τα ευρήματα της αρθροσκόπησης και της μαγνητικής τομογραφίας ^[52]. Έχει αναφερθεί έντονη χρώση πρωτεογλυκανών που περιβάλλει τα διαφοροποιημένα χονδροκύτταρα ^[136]. Επιπλέον, ο νεοπαραγόμενος ιστός συχνά περιείχε μέτρια έως μεγάλη ποσότητα κολλαγόνου II με μικρότερες ποσότητες κολλαγόνου I υποστηρίζοντας την παρουσία φαινότυπου υαλώδη χόνδρου ^[47]. Έχει επίσης περιγραφεί μικτός ινοχόνδρινος ιστός, αλλά σε ένα σχετικά μικρότερο αριθμό ασθενών ^[48].

Κάποιες κλινικές μελέτες έχουν συγκρίνει τη μεταμόσχευση MSCs από το μελό των οστών με τη μεταμόσχευση χονδροκυττάρων. Τα κλινικά αποτελέσματα ήταν παρόμοια ενώ τα ιστολογικά, ακτινολογικά και αρθροσκοπικά ευρήματα έδειξαν ότι και οι δύο διαδικασίες ήταν σε θέση να επαναπληρώσουν τα χόνδρινα ελλείμματα με υαλώδη χόνδρο που ενσωματώνεται γύρω από το μητρικό χόνδρο ^[46-47]. Οι Nejadnik et al, σε προοπτική συγκριτική μελέτη, μελέτησαν 72 χόνδρινες βλάβες γόνατος σε ασθενείς μέσης ηλικίας 44 ετών. Σε 36 ασθενείς εμφυτεύθηκαν BM-MSCs καλυμμένα με περιοστικό flap, ενώ στους υπόλοιπους 36 έγινε εμφύτευση

αυτόλογων χονδροκυττάρων. Σε μέσο follow-up 24 μηνών, τα αρθροσκοπικά, ιστολογικά, κλινικά και ακτινολογικά ευρήματα ήταν παρόμοια και για τις 2 ομάδες ^[47]. Μία μελέτη έχει αναφέρει τα αποτελέσματα της ενδοαρθρικής ένεσης MSCs για εστιακά χόνδρινα ελλείμματα. Σε μια τυχαίοποιημένη έρευνα, αυτόλογα MSCs περιφερικού αίματος εγχύθηκαν με υαλουρονικό εβδομαδιαίως για 5 εβδομάδες μετά από υποχόνδριους τρυπανισμούς σε ασθενείς με χόνδρινες βλάβες του μηριαίου κονδύλου, κνημιαίου plateau, επιγονατίδας και μηριαίας τροχιλίας. Η ιστολογική αξιολόγηση σε 18 μήνες, έδειξε την παρουσία υαλώδη χόνδρου σε ασθενείς που έλαβαν MSCs. Επιπλέον, τα κλινικά και ιστολογικά αποτελέσματα ήταν σημαντικά καλύτερα σε συμμετέχοντες που έλαβαν MSCs και υαλουρονικό σε σχέση με εκείνους που έλαβαν μόνο υαλουρονικό ^[89].

4-2-2 Χορήγηση σε συνδυασμό με ικρίωματα

Αδιαφοροποίητα MSCs σε ικρίωμα κολλαγόνου θα μπορούσαν να παράσχουν έναν ασφαλή τρόπο για την άσηπτη αποκατάσταση μηνίσκου σε ορισμένους ασθενείς. Οι Whitehouse et al ενσωμάτωσαν MSCs επί ενός ικρίωματος κολλαγόνου σε ιστό μηνίσκου ιστών, για χρήση ως κυτταρική θεραπεία για τους ασθενείς με ρήξη μηνίσκου. Απομονώθηκαν αυτόλογα MSCs από βιοψία οστού (λαγόνια ακρολοφία) και σπάρθηκαν σε ικρίωμα κολλαγόνου. Το προκύπτον ικρίωμα τοποθετήθηκε στον μηνίσκο 5 ασθενών. Οι συγγραφείς παρατήρησαν σημαντική κλινική βελτίωση σε επαναλαμβανόμενες αναλύσεις. Στους 24 μήνες, 3 ασθενείς ήταν ασυμπτωματικοί χωρίς ενδείξεις ρήξης σε μαγνητική τομογραφία. Μηνισκεκτομή απαιτήθηκε σε δύο ασθενείς λόγω ρήξης εκ νέου περίπου 15 μήνες μετά την εμφύτευση. Δεν υπήρχαν άλλες ανεπιθύμητες ενέργειες ^[137].

Οι Kuroda et al ανέφεραν περιστατικό με τραυματική χόνδρινη βλάβη 6 cm² στο οποίο εμφυτεύθηκαν BM-MSCs σε γέλη κολλαγόνου τύπου I και ικρίωμα κολλαγόνου, καλυμμένα με περισστικό flap. Σε follow-up 12 μηνών παρατηρήθηκε αρθροσκοπικά σταθερός και λείος ιστός που κάλυψε τη χόνδρινη βλάβη με ιστολογικά χαρακτηριστικά υαλώδους και ινώδους χόνδρου. Ο ασθενής επέστρεψε στο προηγούμενο επίπεδο δραστηριότητας [49]. Οι Buda et al, σε αναδρομική έρευνα, μελέτησαν 20 οστεοχόνδρινες βλάβες σε ασθενείς μέσης ηλικίας 28 ετών, στους οποίους εμφυτεύθηκαν BM-MSCs σε ικρίωμα υαλουρονικού μαζί με platelet-rich fibrin. Σε μέσο follow-up 59 μηνών, παρατηρήθηκε αρθροσκοπικά καλή κάλυψη του ελλείμματος, με ιστολογικά ευρήματα χόνδρου ομοιάζοντος με υαλώδους. Στη μαγνητική τομογραφία παρατηρήθηκε πλήρης ενσωμάτωση στο 76% των ασθενών [122]. Σε άλλη αναδρομική έρευνα των Haleem et al, μελετήθηκαν 5 χόνδρινες βλάβες σε ασθενείς μέσης ηλικίας 25 ετών, στους οποίους εμφυτεύθηκαν BM-MSCs σε κόλλα ινικής, καλυπτόμενα από περισστικά flaps. Σε follow-up 12 μηνών, παρατηρήθηκε αρθροσκοπικά, λείος ιστός με πλήρη κάλυψη του ελλείμματος στο 60% των ασθενών και καλά κλινικά αποτελέσματα [138]. Οι Gobbi et al, σε αναδρομική έρευνα, μελέτησαν 15 χόνδρινες βλάβες γόνατος σε ασθενείς μέσης ηλικίας 48 ετών, στους οποίους εμφυτεύθηκαν BM-MSCs σε συνδυασμό με batroxobin και ικρίωμα από κολλαγόνο τύπου III για το σχηματισμό θρόμβου. Σε follow-up 24 - 38 μηνών, παρατηρήθηκε αρθροσκοπικά κάλυψη των χόνδρινων βλαβών με λείο ιστό χωρίς υπερτροφικά στοιχεία με ιστολογικά ευρήματα υαλώδους και ινώδους χόνδρου. Στη μαγνητική τομογραφία παρατηρήθηκε πλήρης ενσωμάτωση στο 93% των ασθενών [136]. Οι Kasemkijwattana et al, σε μικρή αναδρομική έρευνα, μελέτησαν 2 χόνδρινες βλάβες έξω μηριαίου κονδύλου σε ασθενείς ηλικίας 24 – 25 ετών, στους οποίους εμφυτεύθηκαν BM-MSCs σε ικρίωμα κολλαγόνου I μαζί με κόλλα ινικής, και καλυμμένα από περισστικό flap. Σε follow-up 10 – 26 μηνών, παρατηρήθηκε αρθροσκοπικά καλή και σταθερή κάλυψη των ελλειμμάτων, με καλή ενσωμάτωση στο φυσιολογικό χόνδρο και καλά κλινικά αποτελέσματα [139].

Οι Gigante et al, ανέφερε περιστατικό ηλικίας 37 ετών με χόνδρινο έλλειμμα έσω μηριαίου κονδύλου, στο οποίο εμφυτεύθηκαν BM-MSCs σε κόλλα ινικής καλυμμένα από μεμβράνη κολλαγόνου, σε συνδυασμό με τη δημιουργία μικροκαταγμάτων. Σε follow-up 24 μηνών, στη μαγνητική τομογραφία παρατηρήθηκε πλήρης κάλυψη της βλάβης χωρίς οστικό οίδημα. Κλινικά, ο ασθενής ήταν ασυμπτωματικός και είχε επιστρέψει στις φυσιολογικές του δραστηριότητες ^[140]. Σε άλλη αναδρομική έρευνα των Enea et al, μελετήθηκαν 9 χόνδρινες βλάβες σε ασθενείς μέσης ηλικίας 48 ετών, στους οποίους εμφυτεύθηκαν BM-MSCs σε κόλλα ινικής, καλυπτόμενα από μεμβράνη PGA-HA. Σε μέσο follow-up 22 μηνών, παρατηρήθηκε αρθροσκοπικά, λείος ιστός ομοιάζων με υαλώδη χόνδρο. Στη μαγνητική τομογραφία, παρατηρήθηκε πλήρης κάλυψη του ελλείμματος στο 100% των ασθενών με ήπιες υποχόνδριες ανωμαλίες. Παρατηρήθηκε υπερτροφία σε έναν ασθενή. Τα κλινικά αποτελέσματα βελτιώθηκαν σε σχέση με την προεγχειρητική κατάσταση των ασθενών ^[141]. Οι Giannini et al, σε αναδρομική έρευνα, μελέτησαν 49 χόνδρινες βλάβες αστραγάλου σε ασθενείς μέσης ηλικίας 28 ετών, στους οποίους εμφυτεύθηκαν BM-MSCs σε συνδυασμό με πάστα κολλαγόνου, σπαρμένα σε ικρίωμα υαλουρονικού. Σε follow-up 48 μηνών, παρατηρήθηκε στη μαγνητική τομογραφία πλήρης κάλυψη των βλαβών στο 45% των ασθενών, υπερτροφικά στοιχεία στο 45% των ασθενών, διάσπαση του υποχονδρίου στο 65% των ασθενών, ενώ το 78% των βλαβών καλύφθηκε με υαλώδη χόνδρο. Οι ασθενείς επέστρεψαν στα επίπεδα της προτραυματικής αθλητικής δραστηριότητας σε ποσοστό 78% ^[45].

Κεφάλαιο 5. Συμπεράσματα

Αυτήν την περίοδο υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον διερεύνησης της πιθανής χρήσης των αυτόλογων μεσεγχυματικών κυττάρων στην αναπλαστική ιατρική και ιδιαίτερα στην επιδιόρθωση κατεστραμμένου οστού και χόνδρου [3]. Η μεταμόσχευση αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων είναι μια υποσχόμενη θεραπεία των χόνδρινων βλαβών, μέσω της επαγωγής της χονδρογένεσης. Παρότι δεν υπάρχει σαφές καθορισμένο πρωτόκολλο, πολλές διαφορετικές τεχνικές έχουν παράγει ιστό που μοιάζει με υαλώδη χόνδρο που ενσωματώνεται στους περιβάλλοντες ιστούς. Κλινικές μελέτες έχουν αναφέρει θετικά αποτελέσματα από τη μεταμόσχευση αυτόλογων αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων σε follow-up 12 – 48 μηνών. Χρειάζονται περαιτέρω μακροπρόθεσμες μελέτες που να διαλευκάνουν περισσότερο το ρόλο των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων στην επαγωγή της χονδρογένεσης καθώς και για τη διαμόρφωση ενιαίου αλγόριθμου για την προέλευση των βλαστοκυττάρων, την απομόνωση, την καλλιέργεια, και την χρήση των κατάλληλων ικριωμάτων για την επαγωγή της χονδρογένεσης και την παραγωγή νέου χόνδρου.

Τα συμπεράσματα της παρούσας διπλωματικής συνοψίζονται στα κάτωθι:

1. Τα MSCs αποτελούν εύκολη και οικονομική πηγή προέλευσης χονδρογενετικών κυττάρων σε σύγκριση με τα αυτόλογα χονδροκύτταρα.
2. Τα MSCs λαμβάνονται και απομονώνονται γρήγορα και με εύκολο τρόπο διεγχειρητικά και εφαρμόζονται στον ίδιο χειρουργικό χρόνο στην περιοχή της βλάβης σε αντίθεση με τα αυτόλογα χονδροκύτταρα που απαιτούν εργαστηριακές μεθόδους απομόνωσης και καλλιέργειας , καθώς και δεύτερο χειρουργείο για την εφαρμογή τους.

3. Τα αποτελέσματα από την εμφύτευση των MSCs με ικρίωματα και με αρθροτομή ή αρθροσκόπηση απευθείας στη βλάβη είναι ανώτερα από ενδοαρθρική διαδερμική έγχυση.
4. Ο αναπτυσσόμενος χόνδρινος ιστός από τα MSCs έχει την ίδια ποιότητα με αυτόν που αναπτύσσεται από τα αυτόλογα χονδροκύτταρα (ινώδης χόνδρος).
5. Ο αναπτυσσόμενος χόνδρινος ιστός από τα MSCs έχει την ίδια ποιότητα με αυτόν που αναπτύσσεται από αντίστοιχες μεθόδους έγχυσης ή τοποθέτησης βλαστοκυττάρων.
6. Τα ιστολογικά αποτελέσματα από πειραματικές μελέτες παραμένουν ανώτερα από τις αντίστοιχες κλινικές μελέτες και απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση της διαφοροποίησης των πειραματικών μοντέλων από τα κλινικά μοντέλα.

Βιβλιογραφία

1. Alison MR, Islam S, (2009), Attributes of adult stem cells. *J Pathol.* **217**(2): pp. 144-60.
2. Pera MF, Reubinoff B, Trounson A, (2000), Human embryonic stem cells. *J Cell Sci.* **113 (Pt 1)**: pp. 5-10.
3. Deans RJ, Moseley AB, (2000), Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol.* **28**(8): pp. 875-84.
4. Wray J, Kalkan T, Smith AG, (2010), The ground state of pluripotency. *Biochem Soc Trans.* **38**(4): pp. 1027-32.
5. Caplan AI, (1994), The mesengenic process. *Clin Plast Surg.* **21**(3): pp. 429-35.
6. Verfaillie CM, (2002), Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol.* **12**(11): pp. 502-8.
7. Shanthly N, Aruva MR, Zhang K, Mathew B, Thakur ML, (2006), Stem cells: a regenerative pharmaceutical. *Q J Nucl Med Mol Imaging.* **50**(3): pp. 205-16.
8. Bajada S, Mazakova I, Richardson JB, Ashammakhi N, (2008), Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med.* **2**(4): pp. 169-83.
9. He Q, Wan C, Li G, (2007), Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood. *Stem Cells.* **25**(1): pp. 69-77.
10. Shizuru JA, Negrin RS, Weissman IL, (2005), Hematopoietic stem and progenitor cells: clinical and preclinical regeneration of the hematolymphoid system. *Annu Rev Med.* **56**: pp. 509-38.
11. Barry FP, Murphy JM, (2004), Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol.* **36**(4): pp. 568-84.
12. Bernardo ME, Locatelli F, Fibbe WE, (2009), Mesenchymal stromal cells. *Ann N Y Acad Sci.* **1176**: pp. 101-17.

13. Verfaillie CM, (2005), Multipotent adult progenitor cells: an update. *Novartis Found Symp.* **265**: pp. 55-61; discussion 61-5, 92-7.
14. Taichman RS, (2005), Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood.* **105**(7): pp. 2631-9.
15. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR, (1999), Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* **284**(5411): pp. 143-7.
16. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V, (2008), Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol.* **8**(9): pp. 726-36.
17. Friedenstein AJ, Piatetzky S, II, Petrakova KV, (1966), Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol.* **16**(3): pp. 381-90.
18. Roufosse CA, Direkze NC, Otto WR, Wright NA, (2004), Circulating mesenchymal stem cells. *Int J Biochem Cell Biol.* **36**(4): pp. 585-97.
19. Trubiani O, Di Primio R, Traini T, Pizzicannella J, Scarano A, Piattelli A, Caputi S, (2005), Morphological and cytofluorimetric analysis of adult mesenchymal stem cells expanded ex vivo from periodontal ligament. *Int J Immunopathol Pharmacol.* **18**(2): pp. 213-21.
20. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, de Groot-Swings GM, Claas FH, Fibbe WE, Kanhai HH, (2004), Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells.* **22**(7): pp. 1338-45.
21. Erices A, Conget P, Minguell JJ, (2000), Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol.* **109**(1): pp. 235-42.
22. in 't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Kruisselbrink AB, van Bezooijen RL, Beekhuizen W, Willemze R, Kanhai HH, Fibbe WE, (2003), Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica.* **88**(8): pp. 845-52.

23. Bieback K, Kern S, Kluter H, Eichler H, (2004), Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells*. **22**(4): pp. 625-34.
24. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH, (2001), Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. **7**(2): pp. 211-28.
25. Alsalameh S, Amin R, Gemba T, Lotz M, (2004), Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum*. **50**(5): pp. 1522-32.
26. Bosch P, Musgrave DS, Lee JY, Cummins J, Shuler T, Ghivizzani TC, Evans T, Robbins TD, Huard, (2000), Osteoprogenitor cells within skeletal muscle. *J Orthop Res*. **18**(6): pp. 933-44.
27. Conget PA, Minguell JJ, (1999), Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol*. **181**(1): pp. 67-73.
28. Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, Jones SP, Roberts I, (2006), The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev*. **20**(3): pp. 161-71.
29. Stolzing A, Scutt A, (2006), Age-related impairment of mesenchymal progenitor cell function. *Aging Cell*. **5**(3): pp. 213-24.
30. Aggarwal S, Pittenger MF, (2005), Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. **105**(4): pp. 1815-22.
31. Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F, (2005), Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*. **105**(7): pp. 2821-7.
32. Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, Mao N, (2005), Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. **105**(10): pp. 4120-6.
33. Noel D, Djouad F, Bouffi C, Mrugala D, Jorgensen C, (2007), Multipotent mesenchymal stromal cells and immune tolerance. *Leuk Lymphoma*. **48**(7): pp. 1283-9.

34. Mayer H, Bertram H, Lindenmaier W, Korff T, Weber H, Weich H, (2005), Vascular endothelial growth factor (VEGF-A) expression in human mesenchymal stem cells: autocrine and paracrine role on osteoblastic and endothelial differentiation. *J Cell Biochem.* **95**(4): pp. 827-39.
35. Mehlhorn AT, Niemeyer P, Kaiser S, Finkenzeller G, Stark GB, Sudkamp NP, Schmal H, (2006), Differential expression pattern of extracellular matrix molecules during chondrogenesis of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *Tissue Eng.* **12**(10): pp. 2853-62.
36. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T, (2005), Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum.* **52**(8): pp. 2521-9.
37. Potdar P, Sutar J, (2010), Establishment and molecular characterization of mesenchymal stem cell lines derived from human visceral & subcutaneous adipose tissues. *J Stem Cells Regen Med.* **6**(1): pp. 26-35.
38. Xie X, Zhang C, Tuan RS, (2014), Biology of platelet-rich plasma and its clinical application in cartilage repair. *Arthritis Res Ther.* **16**(1): pp. 204.
39. Van Pham P, Bui KH, Ngo DQ, Vu NB, Truong NH, Phan NL, Le DM, Duong TD, Nguyen TD, Le VT, Phan NK, (2013), Activated platelet-rich plasma improves adipose-derived stem cell transplantation efficiency in injured articular cartilage. *Stem Cell Res Ther.* **4**(4): pp. 91.
40. Abdulrazzak H, Moschidou D, Jones G, Guillot PV, (2010), Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues. *J R Soc Interface.* **7 Suppl 6**: pp. S689-706.
41. Pappa KI, Anagnou NP, (2009), Novel sources of fetal stem cells: where do they fit on the developmental continuum? *Regen Med.* **4**(3): pp. 423-33.
42. Goldring MB, (2012), Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* **4**(4): pp. 269-85.
43. Kelc R, Naranda J, Kuhta M, Vogrin M. Novel Therapies for the Management of Sports Injuries 2013.
44. <http://www.sciencephoto.com>.

45. Giannini S, Buda R, Battaglia M, Cavallo M, Ruffilli A, Ramponi L, Pagliuzzi G, Vannini F, (2013), One-step repair in talar osteochondral lesions: 4-year clinical results and t2-mapping capability in outcome prediction. *Am J Sports Med.* **41**(3): pp. 511-8.
46. Giannini S, Buda R, Cavallo M, Ruffilli A, Cenacchi A, Cavallo C, Vannini F, (2010), Cartilage repair evolution in post-traumatic osteochondral lesions of the talus: from open field autologous chondrocyte to bone-marrow-derived cells transplantation. *Injury.* **41**(11): pp. 1196-203.
47. Nejadnik H, Hui JH, Feng Choong EP, Tai BC, Lee EH, (2010), Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus autologous chondrocyte implantation: an observational cohort study. *Am J Sports Med.* **38**(6): pp. 1110-6.
48. Wakitani S, Nawata M, Tensho K, Okabe T, Machida H, Ohgushi H, (2007), Repair of articular cartilage defects in the patello-femoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation: three case reports involving nine defects in five knees. *J Tissue Eng Regen Med.* **1**(1): pp. 74-9.
49. Kuroda R, Ishida K, Matsumoto T, Akisue T, Fujioka H, Mizuno K, Ohgushi H, Wakitani S, Kurosaka M, (2007), Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage.* **15**(2): pp. 226-31.
50. Zscharnack M, Hepp P, Richter R, Aigner T, Schulz R, Somerson J, Josten C, Bader A, Marquass B, (2010), Repair of chronic osteochondral defects using predifferentiated mesenchymal stem cells in an ovine model. *Am J Sports Med.* **38**(9): pp. 1857-69.
51. Wayne JS, McDowell CL, Shields KJ, Tuan RS, (2005), In vivo response of polylactic acid-alginate scaffolds and bone marrow-derived cells for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng.* **11**(5-6): pp. 953-63.
52. Bornes TD, Adesida AB, Jomha NM, (2014), Mesenchymal stem cells in the treatment of traumatic articular cartilage defects: a comprehensive review. *Arthritis Res Ther.* **16**(5): pp. 432.

53. Mukonoweshuro B, Brown CJ, Fisher J, Ingham E, (2014), Immunogenicity of undifferentiated and differentiated allogeneic mouse mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng.* **5**: pp. 2041731414534255.
54. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV, (1987), Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet.* **20**(3): pp. 263-72.
55. Rao MS, Mattson MP, (2001), Stem cells and aging: expanding the possibilities. *Mech Ageing Dev.* **122**(7): pp. 713-34.
56. Fu WL, Zhou CY, Yu JK, (2014), A new source of mesenchymal stem cells for articular cartilage repair: MSCs derived from mobilized peripheral blood share similar biological characteristics in vitro and chondrogenesis in vivo as MSCs from bone marrow in a rabbit model. *Am J Sports Med.* **42**(3): pp. 592-601.
57. Koga H, Muneta T, Ju YJ, Nagase T, Nimura A, Mochizuki T, Ichinose S, von der Mark K, Sekiya I, (2007), Synovial stem cells are regionally specified according to local microenvironments after implantation for cartilage regeneration. *Stem Cells.* **25**(3): pp. 689-96.
58. Li Q, Tang J, Wang R, Bei C, Xin L, Zeng Y, Tang X, (2011), Comparing the chondrogenic potential in vivo of autogeneic mesenchymal stem cells derived from different tissues. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* **39**(1): pp. 31-8.
59. Jager M, Sager M, Knipper A, Degistirici O, Fischer J, Kogler G, Wernet P, Krauspe R, (2004), [In vivo and in vitro bone regeneration from cord blood derived mesenchymal stem cells]. *Orthopade.* **33**(12): pp. 1361-72.
60. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM, (2001), Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood.* **98**(8): pp. 2396-402.
61. Priest RE, Marimuthu KM, Priest JH, (1978), Origin of cells in human amniotic fluid cultures: ultrastructural features. *Lab Invest.* **39**(2): pp. 106-9.
62. Τροχάτου Ο. Μελέτη του ρόλου των microRNAs στη ρύθμιση των μηχανισμών αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης των μεσεγχυματικών

βλαστικών κυττάρων του αμνιακού υγρού. Αθήνα: Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών; 2013.

63. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ, (2000), Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**(7): pp. 3213-8.

64. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU, (1998), In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res.* **238**(1): pp. 265-72.

65. Baksh D, Song L, Tuan RS, (2004), Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med.* **8**(3): pp. 301-16.

66. Banfi A, Muraglia A, Dozin B, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Quarto R, (2000), Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. *Exp Hematol.* **28**(6): pp. 707-15.

67. Banfi A, Bianchi G, Notaro R, Luzzatto L, Cancedda R, Quarto R, (2002), Replicative aging and gene expression in long-term cultures of human bone marrow stromal cells. *Tissue Eng.* **8**(6): pp. 901-10.

68. Martin I, Muraglia A, Campanile G, Cancedda R, Quarto R, (1997), Fibroblast growth factor-2 supports ex vivo expansion and maintenance of osteogenic precursors from human bone marrow. *Endocrinology.* **138**(10): pp. 4456-62.

69. Khan WS, Tew SR, Adesida AB, Hardingham TE, (2008), Human infrapatellar fat pad-derived stem cells express the pericyte marker 3G5 and show enhanced chondrogenesis after expansion in fibroblast growth factor-2. *Arthritis Res Ther.* **10**(4): pp. R74.

70. Adesida AB, Mulet-Sierra A, Jomha NM, (2012), Hypoxia mediated isolation and expansion enhances the chondrogenic capacity of bone marrow mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther.* **3**(2): pp. 9.

71. Smith JR, Pochampally R, Perry A, Hsu SC, Prockop DJ, (2004), Isolation of a highly clonogenic and multipotential subfraction of adult stem cells from bone marrow stroma. *Stem Cells.* **22**(5): pp. 823-31.

72. Prockop DJ, (1997), Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. **276**(5309): pp. 71-4.
73. Barry F, Boynton RE, Liu B, Murphy JM, (2001), Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res*. **268**(2): pp. 189-200.
74. Prockop DJ, (2007), "Stemness" does not explain the repair of many tissues by mesenchymal stem/multipotent stromal cells (MSCs). *Clin Pharmacol Ther*. **82**(3): pp. 241-3.
75. Matsubara T, Tsutsumi S, Pan H, Hiraoka H, Oda R, Nishimura M, Kawaguchi H, Nakamura K, Kato Y, (2004), A new technique to expand human mesenchymal stem cells using basement membrane extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun*. **313**(3): pp. 503-8.
76. Mauney JR, Volloch V, Kaplan DL, (2005), Role of adult mesenchymal stem cells in bone tissue engineering applications: current status and future prospects. *Tissue Eng*. **11**(5-6): pp. 787-802.
77. Mauney JR, Volloch V, Kaplan DL, (2005), Matrix-mediated retention of adipogenic differentiation potential by human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells during ex vivo expansion. *Biomaterials*. **26**(31): pp. 6167-75.
78. Shao X, Goh JC, Hutmacher DW, Lee EH, Zigang G, (2006), Repair of large articular osteochondral defects using hybrid scaffolds and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rabbit model. *Tissue Eng*. **12**(6): pp. 1539-51.
79. Filardo G, Kon E, Perdisa F, Di Matteo B, Di Martino A, Iacono F, Zaffagnini S, Balboni F, Vaccari V, Marcacci M, (2013), Osteochondral scaffold reconstruction for complex knee lesions: a comparative evaluation. *Knee*. **20**(6): pp. 570-6.
80. Yazdimamaghani M, Razavi M, Mozafari M, Vashae D, Kotturi H, Tayebi L, (2015), Biomineralization and biocompatibility studies of bone conductive scaffolds containing poly(3,4-ethylenedioxythiophene):poly(4-styrene sulfonate) (PEDOT:PSS). *J Mater Sci Mater Med*. **26**(12): pp. 274.

81. Matsuda C, Takagi M, Hattori T, Wakitani S, Yoshida T, (2005), Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Chondrocytes for Construction of Three-dimensional Cartilage Tissue. *Cytotechnology*. **47**(1-3): pp. 11-7.
82. Schwarz RI, Kleinman P, Owens N, (1987), Ascorbate can act as an inducer of the collagen pathway because most steps are tightly coupled. *Ann N Y Acad Sci*. **498**: pp. 172-85.
83. Munir S, Foldager CB, Lind M, Zachar V, Soballe K, Koch TG, (2014), Hypoxia enhances chondrogenic differentiation of human adipose tissue-derived stromal cells in scaffold-free and scaffold systems. *Cell Tissue Res*. **355**(1): pp. 89-102.
84. Acharya C, Adesida A, Zajac P, Mumme M, Riesle J, Martin I, Barbero A, (2012), Enhanced chondrocyte proliferation and mesenchymal stromal cells chondrogenesis in coculture pellets mediate improved cartilage formation. *J Cell Physiol*. **227**(1): pp. 88-97.
85. Mizuno S, Tateishi T, Ushida T, Glowacki J, (2002), Hydrostatic fluid pressure enhances matrix synthesis and accumulation by bovine chondrocytes in three-dimensional culture. *J Cell Physiol*. **193**(3): pp. 319-27.
86. Lai CH, Chen SC, Chiu LH, Yang CB, Tsai YH, Zuo CS, Chang WH, Lai WF, (2010), Effects of low-intensity pulsed ultrasound, dexamethasone/TGF-beta1 and/or BMP-2 on the transcriptional expression of genes in human mesenchymal stem cells: chondrogenic vs. osteogenic differentiation. *Ultrasound Med Biol*. **36**(6): pp. 1022-33.
87. Kafienah W, Mistry S, Dickinson SC, Sims TJ, Learmonth I, Hollander AP, (2007), Three-dimensional cartilage tissue engineering using adult stem cells from osteoarthritis patients. *Arthritis Rheum*. **56**(1): pp. 177-87.
88. Mo XT, Guo SC, Xie HQ, Deng L, Zhi W, Xiang Z, Li XQ, Yang ZM, (2009), Variations in the ratios of co-cultured mesenchymal stem cells and chondrocytes regulate the expression of cartilaginous and osseous phenotype in alginate constructs. *Bone*. **45**(1): pp. 42-51.
89. Saw KY, Anz A, Siew-Yoke Jee C, Merican S, Ching-Soong Ng R, Roohi SA, Ragavanaidu K, (2013), Articular cartilage regeneration with

autologous peripheral blood stem cells versus hyaluronic acid: a randomized controlled trial. *Arthroscopy*. **29**(4): pp. 684-94.

90. Saw KY, Hussin P, Loke SC, Azam M, Chen HC, Tay YG, Low S, Wallin KL, Ragavanaidu K, (2009), Articular cartilage regeneration with autologous marrow aspirate and hyaluronic Acid: an experimental study in a goat model. *Arthroscopy*. **25**(12): pp. 1391-400.

91. Nam HY, Karunanithi P, Loo WC, Naveen S, Chen H, Hussin P, Chan L, Kamarul T, (2013), The effects of staged intra-articular injection of cultured autologous mesenchymal stromal cells on the repair of damaged cartilage: a pilot study in caprine model. *Arthritis Res Ther*. **15**(5): pp. R129.

92. Steinwachs M, Peterson L, Bobic V, Verdonk P, Niemeyer P, (2012), Cell-Seeded Collagen Matrix-Supported Autologous Chondrocyte Transplantation (ACT-CS): A Consensus Statement on Surgical Technique. *Cartilage*. **3**(1): pp. 5-12.

93. Giannini S, Buda R, Vannini F, Cavallo M, Grigolo B, (2009), One-step bone marrow-derived cell transplantation in talar osteochondral lesions. *Clin Orthop Relat Res*. **467**(12): pp. 3307-20.

94. Zhang Y, Wang F, Chen J, Ning Z, Yang L, (2012), Bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus bone marrow nucleated cells in the treatment of chondral defects. *Int Orthop*. **36**(5): pp. 1079-86.

95. Vinardell T, Thorpe SD, Buckley CT, Kelly DJ, (2009), Chondrogenesis and integration of mesenchymal stem cells within an in vitro cartilage defect repair model. *Ann Biomed Eng*. **37**(12): pp. 2556-65.

96. Wang Y, Kim UJ, Blasioli DJ, Kim HJ, Kaplan DL, (2005), In vitro cartilage tissue engineering with 3D porous aqueous-derived silk scaffolds and mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. **26**(34): pp. 7082-94.

97. Miyanishi K, Trindade MC, Lindsey DP, Beaupre GS, Carter DR, Goodman SB, Schurman DJ, Smith RL, (2006), Dose- and time-dependent effects of cyclic hydrostatic pressure on transforming growth factor-beta3-induced chondrogenesis by adult human mesenchymal stem cells in vitro. *Tissue Eng*. **12**(8): pp. 2253-62.

98. Pelttari K, Winter A, Steck E, Goetzke K, Hennig T, Ochs BG, Aigner T, Richter W, (2006), Premature induction of hypertrophy during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells correlates with calcification and vascular invasion after ectopic transplantation in SCID mice. *Arthritis Rheum.* **54**(10): pp. 3254-66.
99. Murdoch AD, Grady LM, Ablett MP, Katopodi T, Meadows RS, Hardingham TE, (2007), Chondrogenic differentiation of human bone marrow stem cells in transwell cultures: generation of scaffold-free cartilage. *Stem Cells.* **25**(11): pp. 2786-96.
100. Karlsson C, Brantsing C, Svensson T, Brisby H, Asp J, Tallheden T, Lindahl A, (2007), Differentiation of human mesenchymal stem cells and articular chondrocytes: analysis of chondrogenic potential and expression pattern of differentiation-related transcription factors. *J Orthop Res.* **25**(2): pp. 152-63.
101. Varas L, Ohlsson LB, Honeth G, Olsson A, Bengtsson T, Wiberg C, Bockermann R, Jarnum S, Richter J, Pennington D, Johnstone B, Lundgren-Akerlund E, Kjellman C, (2007), Alpha10 integrin expression is up-regulated on fibroblast growth factor-2-treated mesenchymal stem cells with improved chondrogenic differentiation potential. *Stem Cells Dev.* **16**(6): pp. 965-78.
102. Indrawattana N, Chen G, Tadokoro M, Shann LH, Ohgushi H, Tateishi T, Tanaka J, Bunyaratvej A, (2004), Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell. *Biochem Biophys Res Commun.* **320**(3): pp. 914-9.
103. Mwale F, Stachura D, Roughley P, Antoniou J, (2006), Limitations of using aggrecan and type X collagen as markers of chondrogenesis in mesenchymal stem cell differentiation. *J Orthop Res.* **24**(8): pp. 1791-8.
104. Kim YJ, Kim HJ, Im GI, (2008), PTHrP promotes chondrogenesis and suppresses hypertrophy from both bone marrow-derived and adipose tissue-derived MSCs. *Biochem Biophys Res Commun.* **373**(1): pp. 104-8.
105. Kim HJ, Im GI, (2009), Combination of transforming growth factor-beta2 and bone morphogenetic protein 7 enhances chondrogenesis from

adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*. **15**(7): pp. 1543-51.

106. Sekiya I, Vuoristo JT, Larson BL, Prockop DJ, (2002), In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**(7): pp. 4397-402.

107. Sekiya I, Larson BL, Vuoristo JT, Reger RL, Prockop DJ, (2005), Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. *Cell Tissue Res*. **320**(2): pp. 269-76.

108. Noth U, Rackwitz L, Heymer A, Weber M, Baumann B, Steinert A, Schutze N, Jakob F, Eulert J, (2007), Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen type I hydrogels. *J Biomed Mater Res A*. **83**(3): pp. 626-35.

109. Weiss S, Hennig T, Bock R, Steck E, Richter W, (2010), Impact of growth factors and PTHrP on early and late chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol*. **223**(1): pp. 84-93.

110. Merceron C, Vinatier C, Portron S, Masson M, Amiaud J, Guigand L, Cherel Y, Weiss P, Guicheux J, (2010), Differential effects of hypoxia on osteochondrogenic potential of human adipose-derived stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. **298**(2): pp. C355-64.

111. Khan WS, Adesida AB, Tew SR, Lowe ET, Hardingham TE, (2010), Bone marrow-derived mesenchymal stem cells express the pericyte marker 3G5 in culture and show enhanced chondrogenesis in hypoxic conditions. *J Orthop Res*. **28**(6): pp. 834-40.

112. Ronziere MC, Perrier E, Mallein-Gerin F, Freyria AM, (2010), Chondrogenic potential of bone marrow- and adipose tissue-derived adult human mesenchymal stem cells. *Biomed Mater Eng*. **20**(3): pp. 145-58.

113. de Vries-van Melle ML, Narcisi R, Kops N, Koevoet WJ, Bos PK, Murphy JM, Verhaar JA, van der Kraan PM, van Osch GJ, (2014), Chondrogenesis of mesenchymal stem cells in an osteochondral environment is mediated by the subchondral bone. *Tissue Eng Part A*. **20**(1-2): pp. 23-33.

114. Darling EM, Athanasiou KA, (2003), Biomechanical strategies for articular cartilage regeneration. *Ann Biomed Eng.* **31**(9): pp. 1114-24.
115. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM, (1994), Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* **76**(4): pp. 579-92.
116. Koga H, Shimaya M, Muneta T, Nimura A, Morito T, Hayashi M, Suzuki S, Ju YJ, Mochizuki T, Sekiya I, (2008), Local adherent technique for transplanting mesenchymal stem cells as a potential treatment of cartilage defect. *Arthritis Res Ther.* **10**(4): pp. R84.
117. Lee KB, Hui JH, Song IC, Ardany L, Lee EH, (2007), Injectable mesenchymal stem cell therapy for large cartilage defects--a porcine model. *Stem Cells.* **25**(11): pp. 2964-71.
118. McIlwraith CW, Frisbie DD, Rodkey WG, Kisiday JD, Werpy NM, Kawcak CE, Steadman JR, (2011), Evaluation of intra-articular mesenchymal stem cells to augment healing of microfractured chondral defects. *Arthroscopy.* **27**(11): pp. 1552-61.
119. Kamei G, Kobayashi T, Ohkawa S, Kongcharoensombat W, Adachi N, Takazawa K, Shibuya H, Deie M, Hattori K, Goldberg JL, Ochi M, (2013), Articular cartilage repair with magnetic mesenchymal stem cells. *Am J Sports Med.* **41**(6): pp. 1255-64.
120. Latief N, Raza FA, Bhatti FU, Tarar MN, Khan SN, Riazuddin S, (2016), Adipose stem cells differentiated chondrocytes regenerate damaged cartilage in rat model of osteoarthritis. *Cell Biol Int.* **40**(5): pp. 579-88.
121. Shimomura K, Ando W, Tateishi K, Nansai R, Fujie H, Hart DA, Kohda H, Kita K, Kanamoto T, Mae T, Nakata K, Shino K, Yoshikawa H, Nakamura N, (2010), The influence of skeletal maturity on allogenic synovial mesenchymal stem cell-based repair of cartilage in a large animal model. *Biomaterials.* **31**(31): pp. 8004-11.
122. Marquass B, Schulz R, Hepp P, Zscharnack M, Aigner T, Schmidt S, Stein F, Richter R, Osterhoff G, Aust G, Josten C, Bader A, (2011), Matrix-associated implantation of predifferentiated mesenchymal stem cells versus

articular chondrocytes: in vivo results of cartilage repair after 1 year. *Am J Sports Med.* **39**(7): pp. 1401-12.

123. Bekkers JE, Tsuchida AI, van Rijen MH, Vonk LA, Dhert WJ, Creemers LB, Saris DB, (2013), Single-stage cell-based cartilage regeneration using a combination of chondrons and mesenchymal stromal cells: comparison with microfracture. *Am J Sports Med.* **41**(9): pp. 2158-66.

124. Guo X, Wang C, Zhang Y, Xia R, Hu M, Duan C, Zhao Q, Dong L, Lu J, Qing Song Y, (2004), Repair of large articular cartilage defects with implants of autologous mesenchymal stem cells seeded into beta-tricalcium phosphate in a sheep model. *Tissue Eng.* **10**(11-12): pp. 1818-29.

125. Ando W, Tateishi K, Hart DA, Katakai D, Tanaka Y, Nakata K, Hashimoto J, Fujie H, Shino K, Yoshikawa H, Nakamura N, (2007), Cartilage repair using an in vitro generated scaffold-free tissue-engineered construct derived from porcine synovial mesenchymal stem cells. *Biomaterials.* **28**(36): pp. 5462-70.

126. Wegener B, Schrimpf FM, Bergschmidt P, Pietschmann MF, Utzschneider S, Milz S, Jansson V, Muller PE, (2010), Cartilage regeneration by bone marrow cells-seeded scaffolds. *J Biomed Mater Res A.* **95**(3): pp. 735-40.

127. Wegener B, Schrimpf FM, Pietschmann MF, Milz S, Berger-Loehr M, Bergschmidt P, Jansson V, Muller PE, (2009), Matrix-guided cartilage regeneration in chondral defects. *Biotechnol Appl Biochem.* **53**(Pt 1): pp. 63-70.

128. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE, (1997), Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem.* **64**(2): pp. 278-94.

129. Bruder SP, Kurth AA, Shea M, Hayes WC, Jaiswal N, Kadiyala S, (1998), Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* **16**(2): pp. 155-62.

130. Kon E, Muraglia A, Corsi A, Bianco P, Marcacci M, Martin I, Boyde A, Ruspantini I, Chistolini P, Rocca M, Giardino R, Cancedda R, Quarto R,

(2000), Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J Biomed Mater Res.* **49**(3): pp. 328-37.

131. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, Santarlasci V, Mazzinghi B, Pizzolo G, Vinante F, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F, (2006), Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* **24**(2): pp. 386-98.

132. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM, (2002), Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature.* **418**(6893): pp. 41-9.

133. Krampera M, Pasini A, Rigo A, Scupoli MT, Tecchio C, Malpeli G, Scarpa A, Dazzi F, Pizzolo G, Vinante F, (2005), HB-EGF/HER-1 signaling in bone marrow mesenchymal stem cells: inducing cell expansion and reversibly preventing multilineage differentiation. *Blood.* **106**(1): pp. 59-66.

134. Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, Saito M, Murata N, Yoneda M, (2002), Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage.* **10**(3): pp. 199-206.

135. Wakitani S, Okabe T, Horibe S, Mitsuoka T, Saito M, Koyama T, Nawata M, Tensho K, Kato H, Uematsu K, Kuroda R, Kurosaka M, Yoshiya S, Hattori K, Ohgushi H, (2011), Safety of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation for cartilage repair in 41 patients with 45 joints followed for up to 11 years and 5 months. *J Tissue Eng Regen Med.* **5**(2): pp. 146-50.

136. Gobbi A, Karnatzikos G, Scotti C, Mahajan V, Mazzucco L, Grigolo B, (2011), One-Step Cartilage Repair with Bone Marrow Aspirate Concentrated Cells and Collagen Matrix in Full-Thickness Knee Cartilage Lesions: Results at 2-Year Follow-up. *Cartilage.* **2**(3): pp. 286-99.

137. Whitehouse M, Howells N, Parry M, Austin E, Kafienah W, Brady K, Goodship A, Eldridge J, Blom A, Hollander A, (2016), Repair of Torn Avascular Meniscal Cartilage Using Undifferentiated Autologous Mesenchymal Stem Cells: From In Vitro Optimization to a First-in-Human Study. *Stem Cells Translational Medicine*. pp.
138. Haleem AM, Singergy AA, Sabry D, Atta HM, Rashed LA, Chu CR, El Shewy MT, Azzam A, Abdel Aziz MT, (2010), The Clinical Use of Human Culture-Expanded Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Transplanted on Platelet-Rich Fibrin Glue in the Treatment of Articular Cartilage Defects: A Pilot Study and Preliminary Results. *Cartilage*. **1**(4): pp. 253-61.
139. Kasemkijwattana C, Hongeng S, Kesprayura S, Rungsinaporn V, Chaipinyo K, Chansiri K, (2011), Autologous bone marrow mesenchymal stem cells implantation for cartilage defects: two cases report. *J Med Assoc Thai*. **94**(3): pp. 395-400.
140. Gigante A, Cecconi S, Calcagno S, Busilacchi A, Enea D, (2012), Arthroscopic knee cartilage repair with covered microfracture and bone marrow concentrate. *Arthrosc Tech*. **1**(2): pp. e175-80.
141. Enea D, Cecconi S, Calcagno S, Busilacchi A, Manzotti S, Kaps C, Gigante A, (2013), Single-stage cartilage repair in the knee with microfracture covered with a resorbable polymer-based matrix and autologous bone marrow concentrate. *Knee*. **20**(6): pp. 562-9.
142. Undale AH, Westendorf JJ, Yaszemski MJ, Khosla S, (2009), Mesenchymal stem cells for bone repair and metabolic bone diseases. *Mayo Clin Proc*. **84**(10): pp. 893-902.
143. Chen Y, Shao JZ, Xiang LX, Dong XJ, Zhang GR, (2008), Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. *Int J Biochem Cell Biol*. **40**(5): pp. 815-20.
144. Panetta NJ, Gupta DM, Quarto N, Longaker MT, (2009), Mesenchymal cells for skeletal tissue engineering. *Panminerva Med*. **51**(1): pp. 25-41.

145. Slater BJ, Kwan MD, Gupta DM, Panetta NJ, Longaker MT, (2008), Mesenchymal cells for skeletal tissue engineering. *Expert Opin Biol Ther.* **8**(7): pp. 885-93.