



**UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA**



**DIPARTIMENTO  
DI INGEGNERIA  
DELL'INFORMAZIONE**

**DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE  
CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA**

**“TRAPIANTO DI CONDROCITI AUTOLOGHI: CONFRONTO TRA  
DIVERSE TECNICHE DI RIPARAZIONE DELLA CARTILAGINE  
ARTICOLARE DEL GINOCCHIO”**

**Relatore: Prof. Andrea Bagno**

**Laureanda: Alice Turrini**

**ANNO ACCADEMICO 2022 – 2023**

**Data di laurea 19/07/2023**



# INDICE

<b>ABSTRACT .....</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUZIONE .....</b>	<b>7</b>
<b>1. L'ARTICOLAZIONE DEL GINOCCHIO .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1 Anatomia dell'articolazione .....</b>	<b>9</b>
1.1.1 Ossa e muscoli coinvolti .....	9
1.1.2 I menischi .....	10
1.1.3 La capsula articolare.....	11
1.1.4 I legamenti .....	11
<b>1.2 Il tessuto cartilagineo.....</b>	<b>11</b>
1.2.1 Composizione e caratteristiche.....	12
1.2.2 Funzione e comportamento .....	12
1.2.3 Le ridotte capacità rigenerative di questo tessuto .....	14
<b>2. CAUSE DI LESIONI DEL TESSUTO.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Patologie.....</b>	<b>17</b>
3.1.1 Osteoartrite .....	17
2.1.2 Osteocondrite dissecante .....	19
2.1.3 Condromalacia rotulea .....	21
<b>2.2 Traumi .....</b>	<b>23</b>
<b>3. IL TRAPIANTO DI CONDROCITI AUTOLOGHI.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1 Soluzioni tradizionali alle lesioni cartilaginee .....</b>	<b>25</b>
<b>3.2 Le tecniche per il trapianto di condrociti autologhi .....</b>	<b>28</b>
3.2.1 MACI .....	31
3.2.2 Hyalograft®-C .....	32
3.2.3 BioSeed®-C .....	33
<b>4. CASI DI STUDIO.....</b>	<b>35</b>
<b>4.1 MACI case study .....</b>	<b>36</b>
4.1.1 Descrizione delle procedure .....	36
4.1.2 Risultati e considerazioni .....	37
<b>4.2 Hyalograft®-C case study .....</b>	<b>39</b>
4.2.1 Descrizione delle procedure .....	39

4.2.2 Risultati e considerazioni.....	41
<b>4.3 BioSeed®-C case study .....</b>	<b>43</b>
4.3.1 Descrizione delle procedure .....	43
4.3.2 Risultati e considerazioni.....	44
<b>4.4 Confronto dei risultati.....</b>	<b>47</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>51</b>

## **ABSTRACT**

La lesione della cartilagine articolare del ginocchio è una condizione molto comune che può interessare individui di qualsiasi fascia di età. Le cause sono molteplici: principalmente si tratta di patologie degenerative che provocano la degradazione del tessuto e che si sviluppano in individui geneticamente predisposti; i danni però possono anche essere causati da traumi che riguardano l'intera articolazione. Per via della caratteristica di questo particolare tessuto connettivo di non essere in grado di autorigenerarsi, la cartilagine articolare una volta danneggiata va incontro a deterioramento progressivo. Esistono molteplici tecniche che permettono di ovviare a questo problema, tra le più innovative si possono individuare delle procedure sviluppate dall'ingegneria tissutale che si basano sull'impiego di condrociti autologhi affiancato all'utilizzo di supporti tridimensionali, con l'obiettivo di indurre la rigenerazione di un tessuto cartilagineo con caratteristiche analoghe a quelle della cartilagine da riparare. Le tecniche si differenziano principalmente per il materiale di cui si compone il supporto, in particolare in questo elaborato vengono confrontate: MACI, Hyalograft-C e BioSeed-C. Queste tecniche prevedono l'utilizzo di scaffold composti rispettivamente di collagene, acido ialuronico e materiale polimerico. La comparazione viene sviluppata mediante l'analisi dei dati di follow-up ottenuti da studi che prevedono l'osservazione di gruppi di soggetti sottoposti alle diverse procedure.



## INTRODUZIONE

L'articolazione del ginocchio è inevitabilmente da considerare una delle più grandi e importanti all'interno del corpo umano; infatti, su di essa grava tutto il peso corporeo e soprattutto è la principale giuntura che permette la locomozione. Al contempo però, per la sua struttura e libertà di movimento, è intuibile che sia altamente esposta al rischio di lesioni soprattutto nei soggetti più attivi, quindi solitamente i più giovani, ma anche in individui più anziani a causa dell'indebolimento dei tessuti. I danni che possono essere causati da traumi nell'articolazione del ginocchio riguardano principalmente due elementi: legamenti e cartilagine. Nel caso specifico della cartilagine, vi è un altro fattore da considerare che ne può compromettere l'incolumità, ovvero le molto comuni patologie degenerative; queste colpiscono principalmente i soggetti più anziani e predisposti geneticamente, ma possono anche essere la conseguenza del progressivo deterioramento del tessuto a seguito di un trauma subito. Il problema principale in questi casi è che il tessuto cartilagineo articolare, oltre ad essere soggetto a degradazione progressiva, a differenza della maggior parte degli altri tessuti è molto scarsamente vascolarizzato, di conseguenza ha capacità rigenerative estremamente basse, pressoché nulle; quindi, senza l'intervento esterno, una lesione al tessuto può portare solo a peggioramento e ad ulteriori danni ad altri componenti dell'articolazione. Per ovviare a questa condizione clinica, nel tempo sono state sviluppate diverse tecniche, ma la ricerca continua a progredire poiché le soluzioni attualmente applicate sul fronte clinico comportano non pochi svantaggi. Bisogna considerare infatti che si tratta di tecniche che possono rivelarsi molto invasive, come la sostituzione protesica parziale o totale del ginocchio; oppure possono risultare meno invasive ma sono anche meno efficaci; infatti, la maggior parte porta alla produzione di un tessuto di riparazione fibrocartilagineo non adeguatamente performante e non funzionale alle esigenze dell'area in questione; altre ancora sono soggette a rischio di rigetto da parte dell'organismo.

L'ingegneria tissutale ha cercato di superare queste problematiche mediante l'impiego di cellule cartilaginee autologhe, quindi provenienti dal soggetto stesso, ed in particolare gli studi sviluppati hanno portato alla conclusione che l'efficacia di questa tecnica può essere incrementata introducendo l'utilizzo di supporti tridimensionali specifici che mediano sia il differenziamento cellulare alla base della rigenerazione del tessuto, sia l'introduzione in sito del composto di riparazione. Esistono diverse tipologie di materiali che si sono rivelate adatte a svolgere questa funzione per le loro specifiche caratteristiche: è possibile valutare la loro efficacia ed eventualmente svilupparne un confronto mediante l'analisi di dati raccolti da studi condotti su gruppi di pazienti sottoposti a queste nuove tecniche.





# 1. L'ARTICOLAZIONE DEL GINOCCHIO

## 1.1 Anatomia dell'articolazione

L'articolazione del ginocchio (o tibiofemorale) è una tipologia di articolazione chiamata diartrosi, ovvero una giuntura in cui si incontrano le estremità di due ossa racchiusa in una membrana sinoviale. È la più grande diartrosi presente nel corpo umano e coinvolge i due condili femorali e la superficie articolare tibiale. Quella del ginocchio ha inoltre la caratteristica di essere un'articolazione ginglymo angolare, il che significa che è in grado di compiere solo due tipi di movimento, cioè, flessione ed estensione; tuttavia, nella situazione in cui il ginocchio è flesso, è permessa anche una minima rotazione. All'interno di questa giuntura si forma anche l'articolazione femoro-rotulea piana tra la superficie posteriore della rotula e la faccia patellare del femore [1].

### 1.1.1 Ossa e muscoli coinvolti

L'articolazione del ginocchio rappresenta la giunzione tra la regione femorale (coscia) e quella crurale (gamba propriamente detta). La prima comprende principalmente l'osso del femore e i muscoli quadricipite femorale e ischiocrurali (ovvero semimembranoso, bicipite femorale e semitendinoso), che rispettivamente rappresentano la parte anteriore e quella posteriore della coscia; mentre nella seconda sono comprese principalmente le ossa tibia (medialmente) e fibula (lateralmente).

L'osso del femore è coinvolto nell'articolazione con la sua estremità inferiore, dove sono presenti gli epicondili mediale e laterale che, con le linee sopracondiloidee, rappresentano i punti di ancoraggio dei muscoli e di alcuni legamenti del ginocchio. In particolare, l'estremità distale dell'osso è formata dai condili mediale e laterale e dalla fossa intercondiloidea, posta nel mezzo, che partecipano muovendosi sulla superficie superiore della tibia durante i movimenti di flessione ed estensione del ginocchio. Tra le regioni femorale e crurale è inoltre presente la patella (o rotula) che è un osso sesamoide (ovvero un osso di piccole dimensioni caratterizzato da una forma rotonda o ovale), e si trova racchiuso nel tendine del ginocchio stesso; infatti, si ha che il tendine del quadricipite femorale si sviluppa dal muscolo alla patella e, prendendo il nome di legamento patellare, procede dalla patella alla tibia. I retinacoli laterale e mediale della rotula sono infatti estensioni del tendine del muscolo quadricipite femorale, che è il responsabile principale della stabilizzazione del ginocchio nella parte frontale, mentre nella parte laterale esso è stabilizzato dal tendine del muscolo semimembranoso; di conseguenza una maggiore forza sviluppata in questi muscoli riduce il rischio di danni all'articolazione stessa [1]. Patella e femore infine sono in relazione attraverso la superficie patellare del femore e quella posteriore della patella.

Guardando la regione crurale si hanno invece le ossa della tibia nella parte mediale, molto più grande e resistente, che è responsabile del sostegno del peso corporeo in questa zona; e della fibula nella parte laterale. Anche nella tibia sono presenti i condili mediale e laterale ma si trovano nella zona superiore, per poi articolarsi con quelli del femore, e sono intervallati dall'eminanza intercondiloidea. I muscoli della coscia, infine, grazie ai quali avviene l'estensione del ginocchio, si ancorano alla tibia nella tuberosità tibiale. (Figura 1.1)

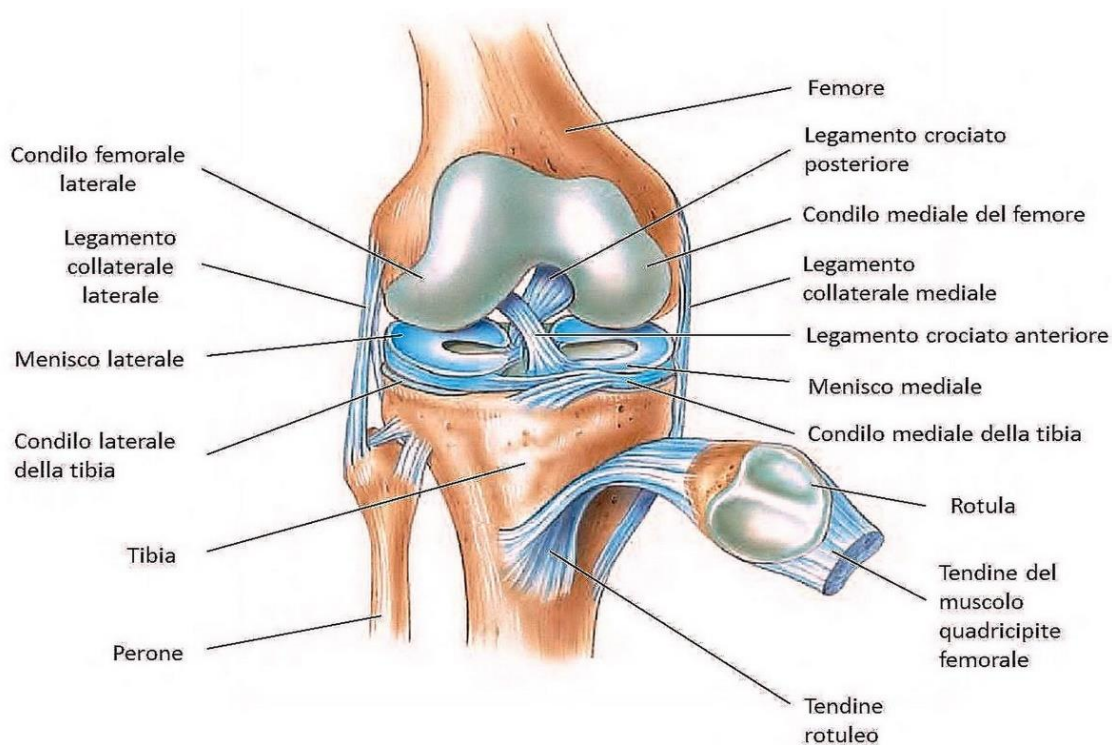


Figura 1.1: vista d'insieme degli elementi dell'articolazione del ginocchio [25].

### 1.1.2 I menischi

Dove i condili femorali sono in contatto con quelli tibiali, è presente una sproporzione tra le due superfici che non combaciano perfettamente in termini di forma. Per ovviare a questa discontinuità sono presenti due menischi, mediale e laterale, ovvero due elementi cartilaginei: il primo ha forma di “C” e il secondo è quasi circolare con caratteristiche a metà tra quelle della cartilagine fibrosa e quelle della cartilagine ialina [2]. Questi due componenti sono posizionati sull'eminanza intercondiloidea della tibia ma non sono fissi; infatti, si spostano leggermente avanti e indietro durante la flessione, l'estensione e le lievi rotazioni del ginocchio. I due menischi hanno quindi la funzione di stabilizzare le oscillazioni del femore sulla tibia, ma anche di assorbire il colpo del peso corporeo sul ginocchio, e sono collegati da un legamento trasverso [1] (Figura 1.1).

### *1.1.3 La capsula articolare*

L'articolazione del ginocchio è avvolta ai lati posteriore e laterale del legamento patellare e ai retinacoli della rotula dalla capsula articolare. Essa è innestata sui margini dei condili tibiali e dei condili femorali e rappresenta lo strato di rivestimento esterno. Quello interno invece è formato dalla membrana sinoviale, la quale aderisce ai menischi sdoppiandosi e contorna i legamenti crociati posteriori, che rimangono quindi all'esterno della membrana (extrasinoviali), ma all'interno della capsula (intracapsulari) [1,2].

### *1.1.4 I legamenti*

Con la funzione di limitare i movimenti delle ossa in modo da stabilizzare l'articolazione, sono presenti i legamenti. Nella regione posteriore (poplitea) del ginocchio, in particolare, si distinguono legamenti intracapsulari e legamenti extracapsulari. Tra gli extracapsulari si possono individuare il legamento popliteo obliquo, estensione del muscolo semimembranoso che dal condilo mediale della tibia si inserisce sul condilo laterale del femore; il legamento popliteo arcuato è invece formato da due fasci che vanno uno verso il condilo laterale del femore (superiormente) e l'altro alla testa della fibula (inferiormente); il legamento collaterale laterale (fibulare) si estende dall'epicondilo laterale del femore alla testa della fibula, mentre il legamento collaterale mediale (tibiale), a differenza del precedente, aderisce alla capsula articolare e si sviluppa a partire dall'epicondilo mediale del femore fino alla faccia mediale della tibia. Gli ultimi due sono responsabili di bloccare la rotazione del ginocchio quando in estensione.

I due legamenti intracapsulari sono invece collocati in profondità nell'articolazione, all'interno della capsula articolare appunto, e circondati dalla membrana sinoviale, rimangono però esterni alla cavità sinoviale. Questi legamenti formano una X, motivo per cui sono detti "legamenti crociati" anteriore e posteriore a seconda dell'intersezione distale sulla tibia (non per la loro posizione rispetto al femore). Il legamento crociato anteriore va dall'area intercondilare anteriore della tibia alla faccia mediale del condilo laterale del femore, mentre il legamento crociato posteriore dall'area intercondilare posteriore fino alla faccia laterale del condilo mediale. Questi legamenti hanno il compito di impedire i movimenti a cassetto, ovvero lo scivolamento avanti e indietro tra femore e tibia [1,2].

## **1.2 Il tessuto cartilagineo**

Interposto tra le due ossa principali dell'articolazione del ginocchio, ovvero femore e tibia, si trova un disco composto da tessuto cartilagineo, con la funzione di attenuare e lubrificare i movimenti evitando il contatto diretto tra due superfici di tessuto osseo.

### 1.2.1 Composizione e caratteristiche

La cartilagine è costituita da un tipo particolare di tessuto connettivo, fa parte dei tessuti connettivi di sostegno o scheletrici. Le cellule presenti nella cartilagine sono i condrociti (o cellule cartilaginee), che si trovano all'interno di lacune o cavità, e sono circondati da un'abbondante matrice extracellulare molto compatta e consistente composta da fibre immerse in una matrice amorfa (Figura 1.2). Questa, a differenza delle altre tipologie di tessuto connettivo, è una matrice amorfa solida (peso secco: 40% collagene, 35-37% proteoglicani, 14% altre proteine, tra cui glicoproteine). Nei mammiferi la cartilagine forma la maggior parte dello scheletro durante lo sviluppo e viene poi sostituita da tessuto osseo: negli adulti, infatti, essa rimane soltanto sulle superfici delle articolazioni (con ruolo di lubrificazione), nello scheletro di sostegno dell'orecchio esterno, del naso, della laringe, della trachea, dei bronchi mantenendo il suo ruolo di tessuto di sostegno. Nella cartilagine non sono presenti fibre nervose né vasi, ma è ricoperta in superficie da un tessuto connettivo fibroso denso chiamato pericondrio molto perfuso, che è assente però nella cartilagine articolare. La nutrizione del tessuto cartilagineo avviene proprio grazie a questo strato altamente vascolarizzato per diffusione di sostanze attraverso la matrice gelificata che lo compone [5].

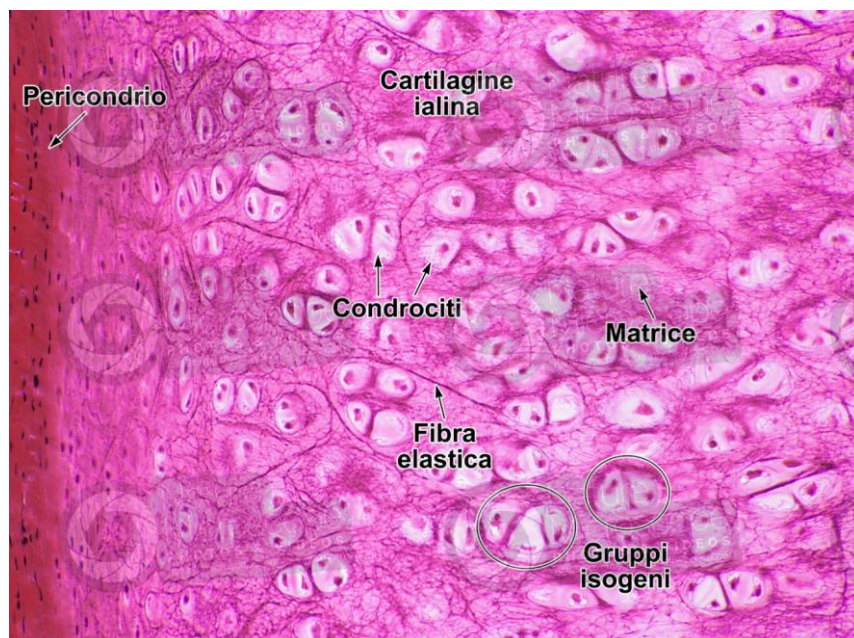


Figura 1.2: cartilagine ialina, sono evidenziati i vari componenti descritti [23].

### 1.2.2 Funzione e comportamento

Si distinguono tre tipi di cartilagine in base alla quantità e al tipo di fibre che, con la sostanza amorfa, formano la matrice extracellulare: da questo dipendono soprattutto le caratteristiche e

il comportamento meccanico delle diverse tipologie di tessuto cartilagineo, motivo per cui differenti tipi di cartilagine si possono trovare in zone diverse del corpo umano [2].

La distinzione viene fatta tra cartilagine ialina, cartilagine elastica e cartilagine fibrosa; in particolare nelle articolazioni si trova la cartilagine ialina (Figura 1.2), che è il tipo di cartilagine più diffuso: nel feto forma l'intero scheletro e nell'adulto ricopre le superfici articolari, costituisce le cartilagini costali, gli anelli della trachea, le cartilagini dei bronchi, del naso e gran parte di quelle della laringe. La composizione di questo tipo di cartilagine è: 65% di acqua, 15% di collagene di tipo II, 15% di proteoglicani e 5% di condrociti. Le cellule cartilaginee (che sono dette condroblasti nel feto e condrociti nell'adulto) sono immerse nella sostanza intercellulare, hanno forma globosa e si trovano imprigionate all'interno delle lacune. Nella stessa lacuna in realtà è possibile trovare due o più cellule a formare quello che viene chiamato gruppo isogeno, dovuto al differenziamento di una cellula, la quale però si trovava già imprigionata all'interno della matrice. La sostanza amorfa di questo tessuto è composta principalmente da acqua (circa 80% del peso) che è libera di entrare ed uscire per permettere alla cartilagine di assecondare la pressione cui viene sottoposta. La regolazione del fluido e della concentrazione di elettroliti nella matrice avviene principalmente grazie alla presenza di aggregati di proteoglicani. Questi ultimi sono complessi formati da un lungo filamento di acido ialuronico sul quale si innestano molecole composte a loro volta da un asse proteico (detto core), al quale sono unite in maniera covalente catene laterali di glicosamminoglicani (GAGs) (Figura 1.3).

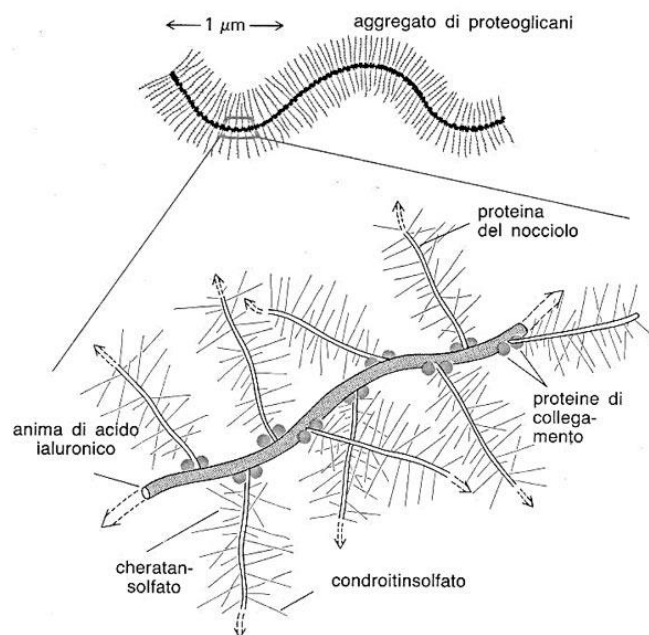


Figura 1.3: aggregati di proteoglicani [24].

La gestione della quantità di fluido presente è dovuta ad un meccanismo che prevede il bilanciamento delle cariche negative dei proteoglicani da parte dell'alta concentrazione di cationi nel fluido della matrice extracellulare. È proprio questa particolare composizione, insieme alla presenza di fibre di collagene, che conferisce l'elevata elasticità e resistenza, soprattutto in compressione, tipiche di questo tipo di cartilagine. La parte fibrosa della matrice è formata appunto da fibre di collagene di tipo II e permette al tessuto di sopportare i carichi, e quindi le pressioni, elevati a cui viene sottoposto: questa componente, insieme alla sostanza amorfa descritta precedentemente, forma una matrice extracellulare gelificata compatta ed omogenea. Nonostante la sua nota resistenza e flessibilità, quella ialina è la tipologia di cartilagine più debole e facilmente danneggiabile tra le tre [4].

### *1.2.3 Le ridotte capacità rigenerative di questo tessuto*

Le cellule con ruolo chiave nella formazione e accrescimento del tessuto cartilagineo sono i condroblasti, ovvero cellule facenti parte della classe dei fibroblasti, di forma rotondeggiante e caratterizzati da una elevata attività metabolica. Queste cellule danno origine al tessuto cartilagineo poiché la loro attività consiste nel replicarsi e contemporaneamente secernere la matrice extracellulare in cui rimangono immerse. Quando poi la matrice solidifica, le cellule vengono bloccate al suo interno e formano inevitabilmente le lacune; una volta terminata la loro attività, i condroblasti diventano cellule quiescenti e diminuiscono di dimensione prendendo il nome di condrociti.

Come si può notare analizzandone la composizione, quella di cui si parla è una tipologia di tessuto particolarmente idratata e il motivo è che non è vascolarizzata perché i condrociti producono una sostanza chimica che contrasta la formazione di vasi; quindi, la cartilagine ha come unico mezzo di trasporto di nutrienti e di sostanze di rifiuto la diffusione attraverso la matrice extracellulare. Il pericondrio fibroso che la separa dagli altri tessuti, inoltre, è formato a sua volta da due strati: strato fibroso esterno, ossia uno strato di tessuto connettivo denso irregolare con funzione di sostegno e protezione che le permette di aderire alle strutture circostanti, e uno strato cellulare profondo responsabile della crescita e del mantenimento della cartilagine [4].

I meccanismi di crescita della cartilagine sono due:

- crescita per apposizione: le cellule staminali dello strato cellulare del pericondrio si differenziano in condroblasti i quali iniziano a produrre la sostanza intercellulare, e dopo essere rimasti immersi completamente nella matrice si differenziano in condrociti. Con questa modalità la cartilagine cresce per aggiunte che vengono fatte direttamente in superficie;

- crescita interstiziale: in questo caso la divisione avviene a partire dai condrociti della matrice stessa in cellule figlie, che in questo modo producono ulteriore matrice accrescendo la cartilagine dall'interno.

Nell'adulto però nessuno di questi due meccanismi di crescita avviene, perché nella cartilagine dell'adulto sono presenti solo cellule in forma di condrociti. Per questa ragione, nel momento in cui il tessuto cartilagineo va incontro ad una lesione o in generale ad un danno, il corpo umano non è in grado di ripararlo con la conseguente perdita di funzione e generale lesione non auto-reversibile dell'articolazione [3].





## **2. CAUSE DI LESIONI DEL TESSUTO**

Le cause che possono portare ad una lesione o in generale ad un difetto del tessuto cartilagineo sono diverse e di varia origine. Quelle che, più comunemente, inducono a cercare rimedio nel trapianto di condrociti autologhi sono alcuni tipi di patologie e traumi.

### **2.1 Patologie**

Tra le patologie le principali a cui si cerca di porre rimedio avvalendosi delle tecniche che verranno descritte in seguito, sono in particolare: l'osteoartrite, l'osteocondrite dissecante e la condromalacia rotulea.

#### *3.1.1 Osteoartrite*

L'osteoartrite è la patologia cronica che più comunemente colpisce le articolazioni, ma soprattutto è una delle poche problematiche croniche, relative all'invecchiamento, per cui ancora non sono state sviluppate soluzioni comprovate che riducano il rischio o l'avanzamento della malattia. È una patologia che può colpire tutte le articolazioni, piccole, medie o grandi, ma si presenta principalmente in quella del ginocchio. Le donne, inoltre, sono più soggette a riscontrare l'osteoartrite al ginocchio in confronto agli uomini, rispettivamente si parla di circa il 13% e circa il 10 % degli over 60.

Come si è detto nel capitolo precedente, il ginocchio è l'articolazione sinoviale più grande del corpo umano e comprende principalmente: cartilagine (sia quella presente nei menischi sia la classica cartilagine articolare), alcune specifiche zone delle ossa interessate, legamenti, patella e membrana sinoviale. Quest'ultima in particolare è responsabile della produzione del liquido sinoviale, ovvero un fluido che ha la funzione di lubrificare l'articolazione e al contempo di alimentare la cartilagine. Tuttavia, spesso l'ampio utilizzo e il carico a cui viene sottoposta l'articolazione del ginocchio possono essere causa di stress nel tessuto cartilagineo. I condrociti presenti nella cartilagine ialina sono in grado di percepire variazioni nella tipologia di stress meccanico attraverso particolari recettori; queste specifiche condizioni portano alla regolazione del rilascio di enzimi responsabili del catabolismo cartilagineo e inibizione della produzione di alcuni elementi della matrice. Una volta che la cartilagine viene danneggiata, non è possibile che avvenga una riparazione da parte dell'organismo stesso, poiché questa tipologia di tessuto non ha le caratteristiche adatte; di conseguenza la lesione procede solo peggiorando progressivamente. Caricare o sovraccaricare l'articolazione in cui la cartilagine è danneggiata può causare osteoartrite.

Lo sviluppo e l'individuazione della patologia possono richiedere molto tempo, anche anni, e può essere individuata a livello radiografico o clinico. Per quanto riguarda la caratterizzazione

a livello radiografico ci sono diversi metodi: il più comune è il sistema di classificazione radiografica Kellgren-Laurence (KL), che definisce cinque livelli di osteoartrite, da 0 a 4, in base alla gravità della condizione (Figura 2.1).



Figura 2.1: esempio dei 5 livelli di osteoartrite secondo il metodo KL [6].

In realtà, però, si tratta di una patologia che può attraversare varie fasi e mostrare un peggioramento nel tempo accompagnato dall'aumento dell'intensità dei sintomi. L'osteoartrite, infatti, consiste in una graduale degradazione della cartilagine associata alla perdita di condrociti e a cambiamenti fenotipici, tra cui la formazione di agglomerati e l'attivazione di differenziazione catabolica fenotipica e ipertrofica. Il conseguente rimodellamento dell'osso subcondrale porta poi allo sviluppo di vasi sanguigni in specifiche strutture (i canali vascolari), che contengono osteoblasti e terminazioni nervose (Figura 2.2).

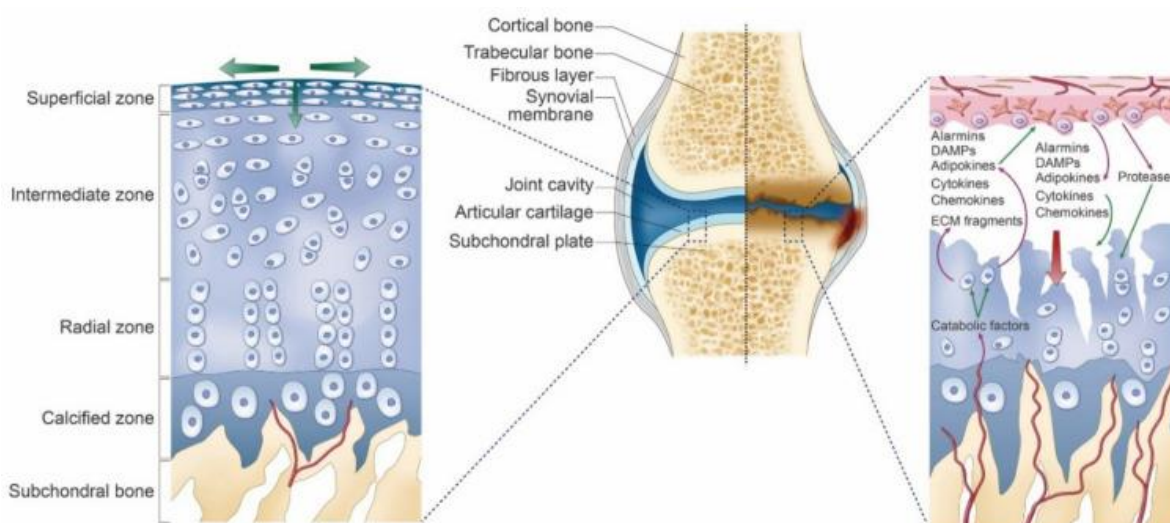


Figura 2.2: confronto tra cartilagine sana e cartilagine affetta da osteoartrite con lo sviluppo di vasi [6].

In una cartilagine sana i condrociti vivono in una condizione di ipossia, per l'assenza di vasi, e questo è molto importante per la loro sopravvivenza e funzionalità; inoltre, la formazione di vasi all'interno del tessuto cartilagineo porta ad uno squilibrio dell'omeostasi della cartilagine. In questo modo le continue stimolazioni dei condrociti li portano a modificare il proprio fenotipo ed esprimere un sottoinsieme di fattori, che agiscono come fattori paracrini che danno inizio ad una progressiva disaggregazione della cartilagine, fino ad arrivare al liquido sinoviale e innescare il processo infiammatorio [6].

Le cause principali che portano a sviluppare l'osteoartrite sono soprattutto: invecchiamento, predisposizione genetica, sindrome metabolica o traumi al tessuto. Ad aumentare il rischio di sviluppare la patologia si aggiungono fattori come: l'obesità, il fatto di aver subito operazioni chirurgiche in precedenza e professioni che richiedono frequentemente flessione del ginocchio e sollevamento di pesi [7].

### *2.1.2 Osteocondrite dissecante*

L'osteocondrite dissecante è anch'essa causa di disturbi legati all'articolazione del ginocchio, ma, a differenza della patologia appena descritta, colpisce principalmente pazienti scheletricamente immaturi; tuttavia, può presentarsi anche in soggetti adulti e può portare al successivo sviluppo di osteoartrite. Per questo motivo si distinguono "juvenile OCD" e "adult OCD" in base al fatto che il paziente abbia o meno concluso la fase dello sviluppo. Questa patologia è caratterizzata dalla presenza di corpi nella zona osteocondrale, dovuti al distacco di frammenti di osso subcondrale, all'interno dell'articolazione, che portano ad una condizione dolorosa e dannosa per la cartilagine [8].

La fascia di età maggiormente colpita da questo tipo di malattia è quella tra i 12 e i 19 anni, ma sono frequenti anche i casi tra i 6 e gli 11 anni; inoltre, si nota che i pazienti di sesso maschile sono più soggetti di quelli di sesso femminile a sviluppare osteocondrite dissecante. La maggior parte dei soggetti colpiti sono atleti e il sito di sviluppo è solitamente il condilo femorale mediale nella superficie laterale [8,9].

Le cause non sono certe ma se ne individuano almeno quattro che con maggior probabilità possono portare a questa condizione, ovvero: trauma/microtrauma, ischemia, ereditarietà e idiopatia; nella maggior parte dei casi però, probabilmente, si tratta di una combinazione di più fattori [8].

### Trauma

È la causa più frequente e riguarda il fatto che, dopo il trauma, lo stress ripetitivo che si verifica su un ginocchio immaturo, soprattutto a livello del condilo femorale mediale, può causare

ulteriore stress nella zona subcondrale che interferisce con la guarigione ossea trabecolare. Le fasi successive possono portare ad una separazione della zona di contatto tra osso e cartilagine articolare con un allentamento parziale della regione osteocondrale coinvolta.

### Ischemia

Scarsa vascolarizzazione e ischemia possono anch'esse portare a osteocondrite dissecante. Alcuni studi infatti hanno individuato possibili differenze nel pattern vascolare delle zone soggette a questa patologia. Questo particolare tipo di morfologia dell'articolazione, in aggiunta a traumi ripetuti concentrati nella specifica area in questione, possono innescare episodi di ischemia con conseguente sviluppo di osteocondrite dissecante.

### Genetica

Sono stati fatti alcuni studi anche sulla possibile connessione di questa patologia ad una causa genetica; tuttavia, questo rimane un fattore scarsamente studiato da questo punto di vista. Si pensa ad un possibile sviluppo della malattia causato da un'alterazione della sintesi della matrice da parte dei condrociti, che può causare un accumulo di reticolo endoplasmatico, che a sua volta porta ad una ossificazione improvvisa della cartilagine. Il fatto, poi, che siano stati individuati casi di gemelli omozigoti che presentano lo stesso tipo di disturbo, porta a pensare alla possibile presenza di una componente genetica [8].

Nel caso di osteocondrite dissecante, inoltre, sono stati definiti diversi stadi per classificare la gravità della condizione del paziente. Gli stadi di avanzamento della classificazione radiografica sono definiti come Ia, Ib, IIa, IIb, III, IV (Figura 2.3). In particolare, al primo stadio (Ia) il difetto si nota come una zona ben definita con contorni inspessiti e leggermente più opachi rispetto al resto, ma è visibile solo tramite risonanza magnetica; alla fase Ib invece il difetto contiene calcificazioni, solitamente multiple; allo stadio IIa, poi, gli aggregati si notano come zone dense e irregolari distaccate dalla zona di appartenenza da una linea di maggiore intensità. Lo stadio IIb è caratterizzato da aggregati che mostrano invece una fessura corta ma molto visibile di separazione dalla zona circostante; nella fase III si presenta un anello sclerotico visibile a livello radiografico che descrive la lesione separandola dal resto dell'osso sano; la lesione assume una conformazione lamellare e appare disgiunta dalla superficie del condilo, ma comunque ancorata al letto; in questa fase la cartilagine appare ancora intatta se osservata con le tecniche di imaging non invasive. Infine, allo stadio IV i frammenti si presentano come corpi liberi, completamente distaccati dalla sede, all'interno della cavità articolare: qui si notano fenomeni di indebolimento e alterazione delle proprietà meccaniche della cartilagine, che,

continuando a subire carico meccanico, inizia anch'essa a mostrare segni di separazione che procedono poi con un progressivo peggioramento [9].

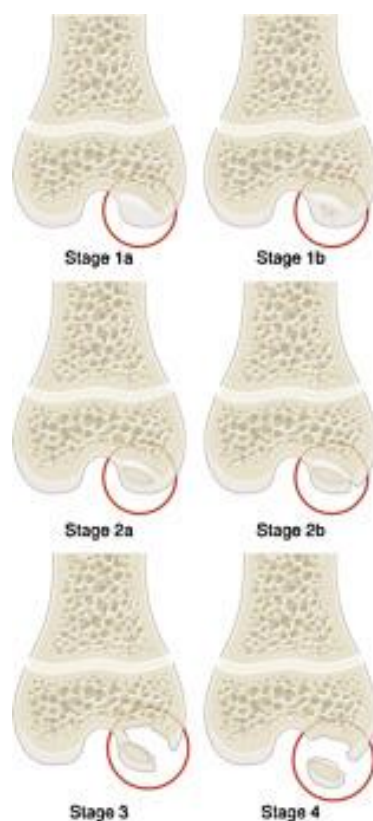


Figura 2.3: i diversi stadi di avanzamento dell'osteochondrite dissecante [9].

### 2.1.3 Condromalacia rotulea

La condromalacia rotulea (o condropatia rotulea), infine, è una delle maggiori cause di dolore articolare al ginocchio nei soggetti più giovani. Il termine condromalacia deriva dalle parole greche *chondros*, che significa “cartilagine”, e *malakia*, ovvero “indebolimento”. Si tratta infatti proprio dell’indebolimento della cartilagine articolare presente sulla superficie posteriore della patella, che può portare di conseguenza alla lesione ed erosione del tessuto [10]. Questa rappresenta una delle principali patologie dell’articolazione tibiofemorale, insieme alla sindrome di compressione laterale della rotula e alla già descritta osteoartrite, che porta l’individuo ad avvertire dolore anteriore al ginocchio (anterior knee pain, AKP) [11]. Nonostante si tratti di una patologia molto comune tra i giovani sportivi, soprattutto nelle donne, può colpire anche altre tipologie di soggetti, sia da sola sia in concomitanza con altri disturbi di questa articolazione; tuttavia, rimane un grande impedimento per chi pratica sport poiché è causa di una fastidiosa condizione invalidante [10].

Oltre al dolore della parte anteriore del ginocchio, la condromalacia rotulea si associa ad un visibile cambiamento fisico nella cartilagine in questione: lo spessore e l’integrità della

cartilagine ialina determina ovviamente l'incolumità della patella. Mentre in condizioni normali essa dovrebbe apparire bianca-bluastro, liscia, lucida e resistente; questo tipo di disturbo la rende opaca, in certi casi giallastra, e causa un rammollimento della stessa, ma porta anche gonfiore e edema ai primi stadi. La lesione si forma poi solitamente nel mezzo della superficie rotulea mediale, ed è di circa 1 centimetro di diametro, seguita quindi da una separazione in fibre, dalla formazione di fessure e dalla frammentazione ed eventualmente erosione della cartilagine negli stadi più avanzati.

Il progredire patologico della condromalacia rotulea può essere classificato in 4 diversi stadi: nel primo stadio la cartilagine appare gonfia e indebolita, al secondo stadio si notano frammentazioni e fissurazione in una zona di diametro 1 centimetro al massimo, al terzo stadio si hanno le stesse tipologie di lesioni di quello precedente ma si estendono in un'area maggiore, al quarto stadio la cartilagine subisce disgregazione ed erosione fino ad esporre l'osso subcondrale. Come si può intuire, si considerano il primo e il secondo come gli stadi iniziali, mentre terzo e quarto si definiscono stadi avanzati; è molto più probabile che si ottengano buoni risultati dagli interventi eseguiti ai primi stadi che da quelli operati agli stadi più gravi.

Anche in questo caso non c'è una causa specifica che porta allo sviluppo della patologia, ma si considerano una serie di fattori. I principali da considerare sono: traumi precedenti dell'articolazione, più nello specifico legati alla rotula; fragilità della cartilagine, che può essere congenita o dovuta ad esempio ad operazioni subite precedentemente; instabilità della rotula, a causa principalmente di lussazioni e dislocazioni; variazioni anatomiche delle ossa; anomalie della cinematica rotulea e rischi dovuti ad hobby o professioni che implicano particolari movimenti a carico del ginocchio quali squat e inginocchiamento. La causa più comune e frequente di condromalacia rotulea è però la sublussazione, nonostante sia anche la più trascurata, perché comporta una lussazione netta della rotula. Vi sono poi alcuni fattori quali l'angolo di inclinazione rotuleo laterale e la profondità trocleare, ma anche l'inclinazione tibiale e l'altezza rotulea che, attraverso alcuni studi, si è intuito possano determinare la probabilità o meno di incorrere in questo tipo di patologia (Figura 2.4).

Infine, un altro elemento importante da considerare è lo spessore del grasso subcutaneo del ginocchio (Figura 2.4): si è scoperto infatti, mediante uno studio condotto da Hong Kuan K et al. sulla correlazione tra obesità e condromalacia rotulea, che il livello di grasso subcutaneo nei pazienti affetti dalla patologia era significativamente maggiore rispetto ai soggetti sani. Inoltre, si è trovata una correlazione tra spessore e stato di avanzamento della malattia: infatti, le pazienti di sesso femminile, che presentavano uno spessore del grasso maggiore di quello dei pazienti di sesso maschile, mostravano un livello più grave di condromalacia rotulea [11].

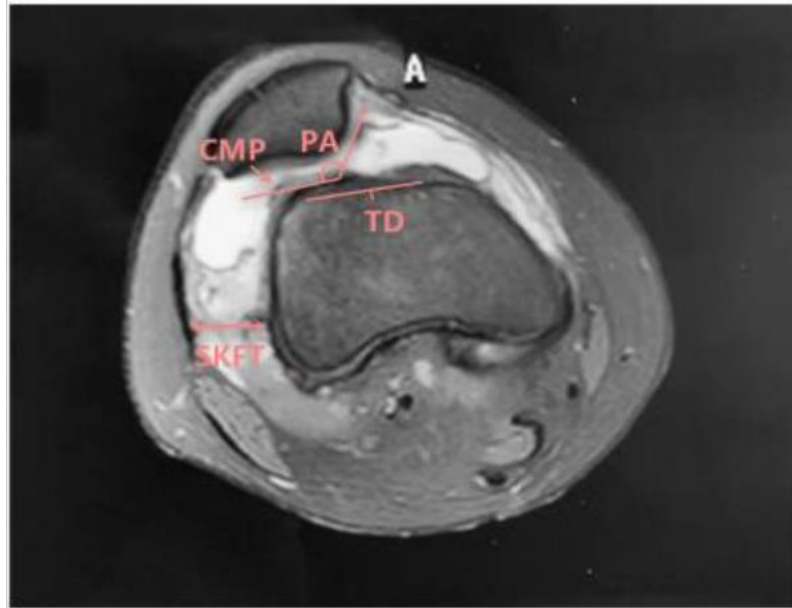


Figura 2.4: le sigle CMP, PA, TD, SKFT presenti nell'immagine indicano rispettivamente: chondromalacia patellae (condromalacia rotulea), patella angle (angolo di inclinazione rotuleo), trochlear depth (profondità trocleare) e subcutaneous knee fat thickness (spessore del grasso subcutaneo del ginocchio) [11].

## 2.2 Traumi

Quella del ginocchio è una delle articolazioni che subiscono più comunemente traumi durante l'attività sportiva; infatti, nella maggior parte degli sport, viene sottoposta ad azioni di taglio, rotazione e salto che predispongono altamente l'intera articolazione al rischio di subire traumi. Le attività con la più elevata probabilità di infortunio al ginocchio sono il calcio, la pallavolo, il basket, la pallamano e lo sci d'alpinismo, dal momento che prevedono situazioni in cui la giuntura viene sottoposta a carichi vari e sostanziali in grado di provocare diversi tipi di lesioni alle componenti coinvolte.

Le sollecitazioni a cui viene sottoposta l'articolazione possono produrre adattamenti positivi, quindi causare ad esempio l'aumento della resistenza nei tessuti e della tolleranza del carico, oppure negativi, portando di conseguenza i vari tessuti a subire stress acuto o lesioni meccaniche dovute ad uno sforzo eccessivo o ad un sovraccarico cronico. Ovviamente per adattamenti positivi si intendono quelli che avvengono a seguito di interventi specifici, come l'allenamento, volti a migliorare la capacità dei tessuti e di conseguenza mitigare il rischio di lesioni; quelli negativi invece riguardano il danno vero e proprio dei tessuti e possono coinvolgere diverse componenti dell'articolazione. Nello specifico, per quanto riguarda le lesioni alla cartilagine articolare, per il 32-58% avvengono a causa di meccanismi di lesione traumatica dovuti a infortuni non di contatto. I principali sono: il trauma contusivo diretto, il carico da impatto indiretto e il carico torsionale. Questi meccanismi producono tassi di carico elevati, quindi una bassa deformazione a compressione abbinata ad una velocità di carico elevata che può compromettere la vitalità dei condrociti; mentre una deformazione compressiva

più alta che avviene a velocità di carico elevata porta a lesioni vere e proprie del tessuto gravi e progressive. Inoltre, come si è visto nei paragrafi precedenti, traumi alla cartilagine, anche se di lieve entità, possono essere causa di patologie più gravi e degenerative del tessuto [12].



### 3. IL TRAPIANTO DI CONDROCITI AUTOLOGHI

#### 3.1 Soluzioni tradizionali alle lesioni cartilaginee

Le lesioni al tessuto cartilagineo, come esposto in precedenza, rappresentano un problema a livello clinico per due ragioni principali: l'impossibilità di contare sulla riparazione del danno da parte dell'organismo stesso, ma soprattutto la complessità e l'importanza delle caratteristiche che il tessuto in questione deve necessariamente presentare per poter svolgere in maniera efficace la funzione richiesta. Proprio per questo motivo, a differenza di altri tessuti, che possono più semplicemente essere sostituiti da biomateriali con caratteristiche analoghe, nel caso della cartilagine è stato necessario sviluppare tecniche specifiche per ovviare al problema. In particolare, le pratiche applicate sono diverse in base alla gravità della condizione del soggetto. Nei casi di lesioni gravi o patologie degenerative della cartilagine a stadi avanzati, si procede di prassi con la sostituzione protesica totale o parziale dell'articolazione (Figura 3.1).



Figura 3.1: ginocchio prima e dopo l'applicazione di una protesi sostitutiva totale [26].

Nel caso invece di interventi precoci, che quindi trattano condizioni di danno lieve al tessuto, si applicano tecniche meno invasive che puntano a ripristinare la congruità articolare e a ridurre al minimo, o almeno rallentare, l'ulteriore deterioramento dei vari componenti della giuntura [14]. Queste procedure consistono principalmente in: tecniche di stimolazione del midollo e tecniche di trapianto osteocondrale.

La principale tecnica di stimolazione del midollo è la microfrattura. Introdotta da Steadman all'inizio degli anni '90, questa tecnica consiste nell'attuare una micro-penetrazione nell'osso subcondrale, più precisamente nella lamina subcondrale, per mezzo di un punteruolo artroscopico, in modo da permettere il riempimento del difetto cartilagineo da parte di un

coagulo di sangue contenente cellule staminali mesenchimali pluripotenti. Tra i vantaggi di questa tecnica si possono considerare: la riduzione del rischio di necrosi, che si presentava in tecniche simili utilizzate precedentemente in cui i fori erano prodotti con l'utilizzo del trapano, e il mantenimento di una porzione di osso subcondrale sufficiente a non lasciar incorrere il rischio di collasso. Inoltre, l'utilizzo di un punteruolo angolato, permette il raggiungimento di alcune zone in cui non era possibile arrivare utilizzando altri strumenti come il trapano o la fresa (Figura 3.2) [16].

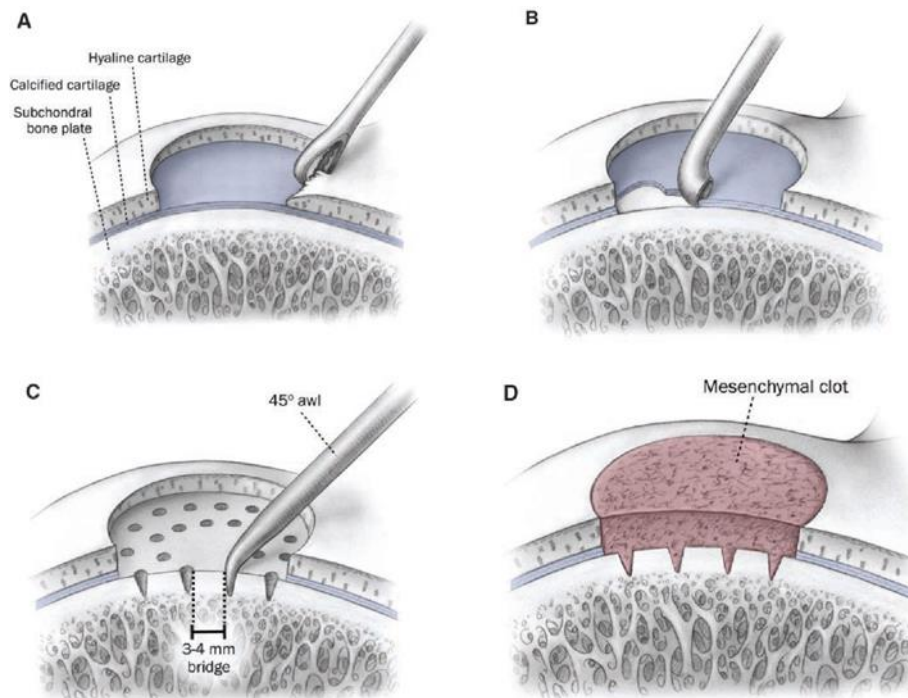


Figura 3.2: illustrazione dei principali step della tecnica di microfrattura: (A) debridement del contorno del difetto fino ad ottenere un bordo sano e stabile, (B) rimozione dello strato di cartilagine calcificata, (C) perforazione dell'osso mediante il punteruolo angolato nella zona del difetto, (D) difetto riempito dal coagulo che porterà alla formazione di nuovo tessuto [19].

Il nuovo tessuto che viene a formarsi a seguito di questo tipo di operazione però, è principalmente fibrocartilagine contenente quantità variabili di collagene di tipo II; va quindi a riparare il difetto colmando la lesione, ma presenta caratteristiche biochimiche e biomeccaniche inferiori a quelle della normale cartilagine articolare. Non trattandosi di cartilagine ialina, il tessuto cartilagineo neoformato risulta troppo debole e non perfettamente adatto a sopportare i carichi meccanici cui è sottoposta l'articolazione; infatti, questa tecnica nella maggior parte dei casi non rappresenta una soluzione definitiva al problema, perché la fibrocartilagine tende a deteriorarsi nuovamente negli anni successivi all'intervento. Tuttavia, la procedura della microfrattura può essere utile in quanto è un'operazione economica, scarsamente invasiva e a basso rischio di complicazioni. Oltre a ciò, i tempi di recupero sono relativamente brevi e può rivelarsi efficace nel rallentare il progressivo peggioramento delle condizioni del tessuto

danneggiato [14,15]. Esiste anche la possibilità di aggiungere nel sito di intervento fattori di crescita, come transforming growth factor- $\beta$ 3 (TGF- $\beta$ 3) e bone morphogenetic protein 7 (BMP-7), che inducono l'espressione genica del marcatore condrogenico per aggregano, collagene di tipo II e di tipo IX; ciò comporta un miglioramento sia in qualità sia in quantità della cartilagine prodotta dopo l'intervento.

Un'altra variante di questa tecnica prevede l'impiego di scaffold inseriti nel sito da trattare, in modo da guidare e stabilizzare il coagulo di sangue, migliorando quindi l'adesione al tessuto sano e il volume della cartilagine di nuova formazione. Gli scaffold possono essere polimerici oppure costituiti da un idrogel iniettabile e biodegradabile. In questi ultimi due casi si parla di *enhanced microfracture* [15].

Per quanto riguarda invece le tecniche di trapianto osteocondrale si riconoscono: autotrapianto osteocondrale e allotrapianto osteocondrale; in entrambi i casi si tratta di riempire il difetto utilizzando una porzione di tessuto osteocartilagineo. Si cerca così di ovviare al problema della fibrocartilagine come tessuto di riparazione, e ottenere cartilagine ialina in grado di sopportare lo stress a cui viene sottoposta senza andare incontro nuovamente a degradazione. La tecnica di autotrapianto osteocondrale è stata sviluppata all'inizio degli anni '90 da Hangody, prevede l'asportazione di una porzione cilindrica da una zona della superficie condrale a basso carico e successivamente il trasferimento dell'innesto ricavato al difetto da correggere per mezzo di una tecnica di fissaggio a pressione. Nel caso di una lesione di piccole dimensioni, può essere sufficiente un singolo tassello cartilagineo; quando invece si trattano lesioni più estese, solitamente è necessario combinare diverse porzioni di tessuto per riuscire a ricoprire l'intera area (mosaicoplastica) [16]. I risultati riportati dall'impiego di questo metodo sono promettenti soprattutto per il riscontro di cartilagine ialina nella zona riparata, ma i rischi e le limitazioni sono parecchi. Vi è, ad esempio, la possibilità che si verifichino: incongruità tra le superfici articolari dovuta all'eventuale mancata ripresa della corretta concavità da parte dell'area riparata; aumento della morbilità del sito da cui viene prelevato l'innesto cartilagineo; scarsa integrazione a livello periferico della porzione trapiantata e conseguente morte dei condrociti limitrofi.

L'allotrapianto osteocondrale prevede invece il riempimento della lesione da parte di una porzione osteocondrale fornita da una banca dei tessuti, utilizzando la stessa tecnica dell'autotrapianto appena descritto (fissaggio a pressione) (Figura 3.3). In questo modo si evita di dover prelevare tessuto da una zona sana, introducendo il rischio di danneggiamento e deterioramento anche in quest'area. Gli altri svantaggi elencati per la tecnica di autotrapianto osteocondrale permangono anche nella procedura di allotrapianto, inoltre in questo caso si aggiungono i rischi associati all'introduzione di un tessuto estraneo, che può portare a reazioni

di rigetto da parte del ricevente, e la necessità di fare in modo che l'innesto venga impiantato nella lesione entro 28 giorni dal prelievo per evitare di incorrere nella degradazione del tessuto [15].

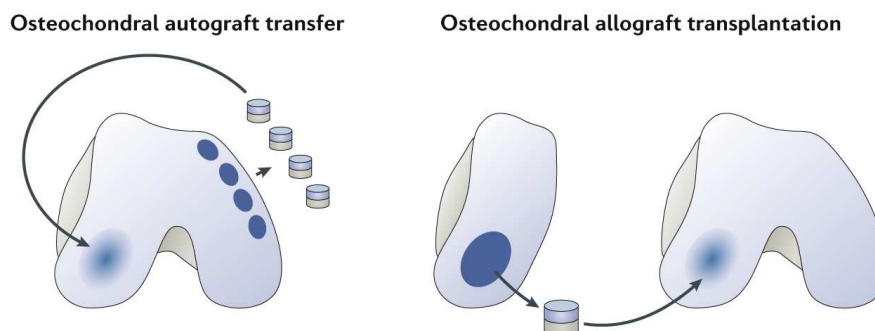


Figura 3.3: illustrazione semplificata del principio alla base del trapianto osteocondrale, sia nel caso di autotrapianto (sinistra) sia nel caso di allotrapianto (destra) [27].

Come si può notare, nessuna delle tecniche menzionate ha un livello di rischio sufficientemente basso da poterla considerare una tecnica ottimale, soprattutto nel caso di difetti a tutto spessore, nei quali risulta ancora più difficile gestire l'instabilità e precarietà di queste soluzioni. Per questo motivo si è cercato di procedere nello sviluppo di altre tecniche più efficaci, sfruttando i benefici dell'utilizzo di cellule autologhe. Questo modo di operare permette di ovviare alle problematiche legate al rigetto di materiali estranei, alla difficoltà di integrazione con il tessuto sano circostante alla lesione, e soprattutto alla inadeguatezza delle proprietà biomeccaniche che caratterizzano l'area riparata procedendo con altre tecniche meno performanti.

### 3.2 Le tecniche per il trapianto di condrociti autologhi

Il trapianto di condrociti autologhi (*Autologous Chondrocyte Implantation*, ACI), come alternativa innovativa alle sopracitate tecniche tradizionali di riparazione della cartilagine, è stato applicato ad un soggetto umano per la prima volta nel 1987 in Svezia e rappresenta il primo caso di impiego dell'ingegneria tissutale nell'ambito della riparazione della cartilagine [13]. Da quel momento si è dimostrato, a livello clinico, essere una procedura efficace e duratura per il trattamento di difetti focali della cartilagine del ginocchio di grandi dimensioni ( $> 4 \text{ cm}^2$ ). I vantaggi di questa tecnica sono sicuramente comprovati dall'abbondante numero di testimonianze cliniche, che attribuiscono al trapianto di condrociti autologhi il notevole miglioramento della funzionalità dell'articolazione, accompagnato da una consistente riduzione del dolore, dimostrando esiti superiori a quelli ottenuti mediante altre tecniche come la mosaicoplastica o la microfrattura, ma anche rispetto al trapianto osteocondrale. In questo modo, infatti, a differenza delle tecniche di trapianto osteocondrale, si possono trattare difetti di dimensioni maggiori senza gravare sull'indebolimento del sito da cui si preleva la sezione di

tessuto sostitutivo. L'aspetto più importante, però, consiste sicuramente nel fatto che in molti casi si è registrata la formazione di cartilagine ialina nella zona trattata; questo, in aggiunta agli altri due effetti appena citati, conduce alla possibilità di considerare l'ACI una tecnica rigenerativa oltre che riparativa, motivo per cui si parla di "rigenerazione del tessuto cartilagineo" e non semplicemente di "riparazione del difetto" [13,14].

La tecnica del trapianto di condrociti autologhi è una procedura in due fasi: prevede, come prima cosa, che venga raccolto un campione a tutto spessore mediante una biopsia, eseguita per via artroscopica, da una regione della cartilagine sana a basso carico. Questo campione permette di ottenere una popolazione di cellule cartilaginee (condrociti) in modo da poterle espandere in vitro per alcune settimane fino ad ottenere da 12 a 48 milioni di cellule circa. Il procedimento include poi una seconda operazione artroscopica, durante la quale i condrociti vengono impiantati nel difetto da correggere e ricoperti da una membrana, formata da un lembo di periostio, con la funzione di circoscriverli dove necessario e innescare la rigenerazione del tessuto; con lo sviluppo di tecniche di trapianto di condrociti autologhi di seconda generazione la membrana di periostio è stata sostituita da un rivestimento in collagene. Per evitare il più possibile la diffusione delle cellule al di fuori della lesione, il periostio è fissato alla cartilagine circostante per mezzo di una sutura ermetica (Figura 3.4). Il vantaggio principale che si riscontra nel trattare questo tipo di difetti mediante ACI è proprio l'utilizzo delle cellule autologhe: questo evita eventuali reazioni di rigetto o infezioni virali che invece potrebbero verificarsi nel caso di trapianto di cellule allogeniche o materiali estranei [14,16].

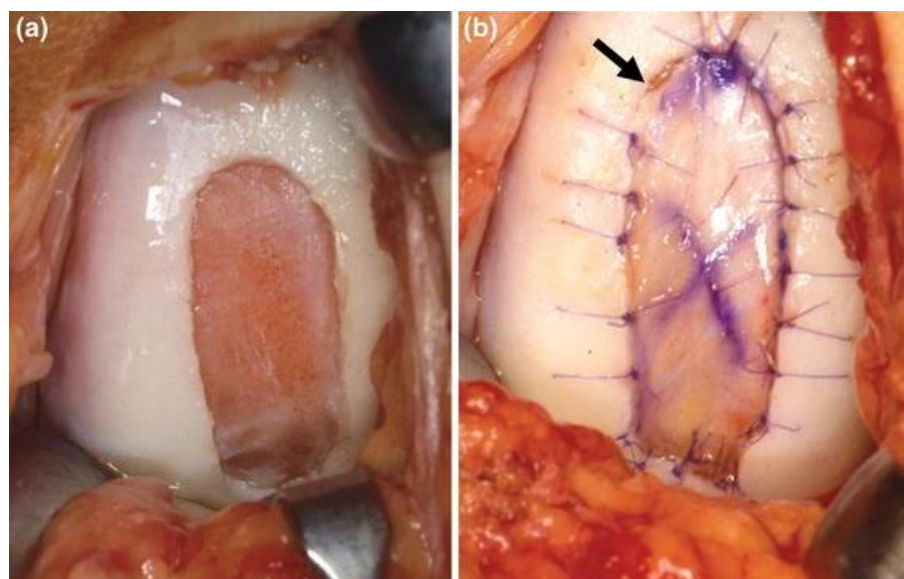


Figura 3.4: (a) la zona della cartilagine viene preparata in modo da avere cartilagine sana e stabile come bordo a cui fissare la membrana; (b) il lembo di periostio viene suturato a chiudere il difetto: la freccia indica il punto in cui è stata saltata la sutura, che verrà applicata in seguito, per permettere l'iniezione dei condrociti [17].

Nonostante i risultati positivi e i vantaggi rilevati dall'utilizzo di questa tecnica, essa è inevitabilmente correlata ad alcune limitazioni: prima tra tutte la complessità e il rischio di complicanze causate dalla necessità di praticare due operazioni chirurgiche relativamente ravvicinate, ma è anche molto frequente l'insorgenza di ipertrofia periostale. Inoltre, non è scontato che sia possibile applicare questa tecnica su qualsiasi difetto, poiché non tutta la superficie della cartilagine è adatta a fissare il lembo di copertura mediante sutura. Si può verificare, infatti, che la lesione si trovi in un'area la cui geometria non permette di ottenere un ancoraggio solido ed ermetico come è invece richiesto; procedendo in questo modo quindi si rischierebbe di incorrere in un allentamento della sutura e conseguente dispersione delle cellule all'interno della cavità articolare.

Per ovviare a questo tipo di problematiche, l'ingegneria tissutale si è aperta ad un intero campo di ricerca innovativo, che ha condotto allo sviluppo di tecniche di ACI di terza generazione, basate sulla creazione di strutture tridimensionali utilizzate per colmare il difetto del tessuto e permetterne la rigenerazione in vivo. Queste strutture sono costituite da scaffold temporanei sui quali si fanno espandere in vitro le cellule, che si organizzano tridimensionalmente; quindi, oltre a migliorare l'adesione del nuovo tessuto a quello circostante e agire sul differenziamento cellulare, il fatto che le cellule siano già ancorate ad una struttura stabile facilita la manipolazione in sede chirurgica.

Agli scaffold progettati per questo scopo si richiedono caratteristiche specifiche: devono possedere comprovata biocompatibilità, per non evocare reazioni avverse una volta impiantati; devono però anche essere biodegradabili, in modo da lasciare spazio alla matrice a mano a mano che viene secreta dalle cellule; devono essere in grado di promuovere la proliferazione dei condrociti in vitro e anche di favorire l'espressione e il mantenimento di un fenotipo cellulare differenziato. Questo diverso approccio adottato per il trapianto di condrociti autologhi presenta vantaggi importanti rispetto alla procedura tradizionale; infatti, oltre ad accorciare i tempi di recupero postoperatorio grazie alla stabilità conferita dallo scaffold, consente un maggior controllo e indirizzamento nella distribuzione dei condrociti fatti crescere in vitro e conseguentemente permette un miglior riempimento della lesione. Per di più, grazie alla struttura 3D in cui vengono seminati i condrociti, è favorita la differenziazione degli stessi, che porta quindi alla produzione di una cartilagine più ialina. La qualità del risultato finale ottenuto a seguito dell'operazione è maggiore e il tessuto risulta funzionale.

Esistono diversi materiali che permettono la produzione di strutture efficaci nel soddisfare i requisiti richiesti: le tre diverse tecniche che vengono analizzate di seguito, infatti, differiscono in base al tipo di materiale utilizzato [13,14].

### 3.2.1 MACI

Il più diffuso tra i metodi di riparazione della cartilagine tramite cellule autologhe con l'ausilio di matrice è il MACI (*Matrix-induced Autologous Chondrocyte Implantation*). Anche in questo caso è necessaria una prima operazione in cui viene prelevata una porzione di tessuto autologo: solitamente si ricava un campione a tutto spessore da una regione dell'articolazione a basso carico come può essere la fossa intercondiloidea o il bordo laterale della troclea. Dal campione vengono separate le cellule del paziente, eliminando la matrice grazie a particolari enzimi digestivi, per poi espanderle in vitro. L'espansione in vitro avviene solitamente come coltura monostrato dei condrociti fino ad ottenerne tra i 15 e i 20 milioni in un periodo di circa quattro settimane. La propagazione delle cellule in coltura monostrato non favorisce la differenziazione cellulare, ma a questo punto i condrociti vengono seminati per 3 giorni su una membrana riassorbibile di collagene misto di tipo I e di tipo III di derivazione porcina che, oltre a dare struttura all'innesto che verrà successivamente impiantato, grazie alla tridimensionalità dello scaffold permette almeno una parziale ridifferenziazione. Queste membrane sono inoltre progettate in modo da favorire l'infiltrazione e propagazione dei condrociti da un lato, mentre dall'altro sono in grado di ridurre l'attrito e promuovere la lubrificazione. Tramite una mini-artrotomia la lesione viene quindi esposta e preparata eseguendo un'azione di *debridement*, arrivando fino allo strato di cartilagine calcificata ma senza perforare la lamina subcondrale; successivamente l'innesto di matrice e cellule viene tagliato su misura, in modo che aderisca perfettamente al difetto, e impiantato, posizionandolo con il lato ricco di cellule dalla parte dell'osso subcondrale e il lato con azione lubrificante rivolto alla cavità articolare. Per fissare l'inserto, viene applicata una piccola quantità di colla di fibrina e viene esercitata una leggera pressione per qualche minuto in modo da assicurarlo il più possibile al tessuto circostante. Nel caso di difetti di estensione elevata, la colla può non essere sufficiente quindi si può ricorrere anche alla sutura o all'utilizzo di ancoraggi per fissare l'innesto ed evitarne la delaminazione (Figura 3.5).

La tecnica MACI è la tecnica maggiormente utilizzata per il trapianto di condrociti autologhi mediato da scaffold, di conseguenza vanta il più alto livello di esperienza clinica e il maggior numero di report pubblicati a riguardo. A rendere allettante questo tipo di procedura sono sicuramente il basso livello di rischio e di complessità dell'operazione, che si può definire un intervento poco invasivo [14,16].

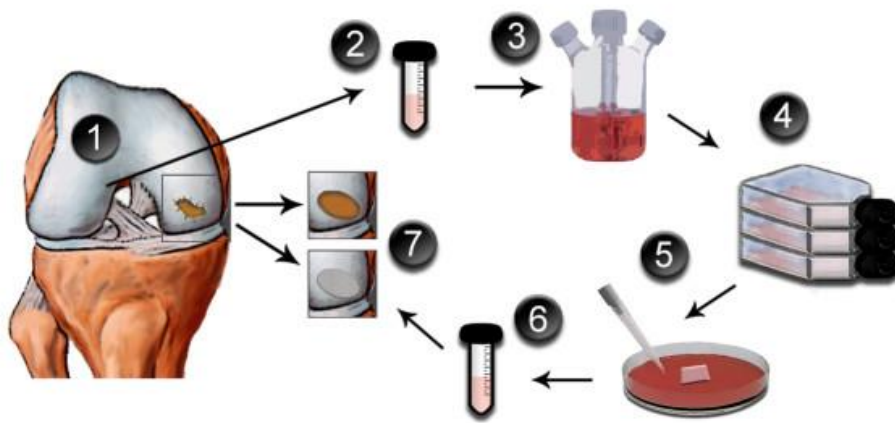


Figura 3.5: (1) descrizione della procedura MACI: a partire dalla prima artrosopia in cui viene classificata la lesione e viene prelevato il campione da cui isolare i condrociti, (2) il campione biotico viene trasferito al laboratorio, (3) dove si attua la digestione enzimatica per estrarre i condrociti; (4) si procede poi con l'espansione in vitro con coltura monostrato dei condrociti, (5) le cellule vengono poi seminate sulla matrice, (6) l'innesto viene rimandato dal laboratorio al centro dove avverrà l'intervento; (7) l'impianto viene infine posizionato nell'articolazione del paziente a colmare la lesione correggendo il difetto [16].

### 3.2.2 Hyalograft®-C

Un materiale che ha dimostrato buone potenzialità nella costruzione di scaffold 3D per l'impianto di condrociti è l'acido ialuronico (o ialuronato), ovvero un glicosamminoglicano presente in natura e abbondantemente diffuso nel corpo umano che ha dimostrato la sua azione nel mantenimento dell'omeostasi della cartilagine. Le strutture a base di acido ialuronico hanno un comportamento simile a quello delle matrici in collagene, di cui si è parlato sopra; in particolare, sono efficaci nel promuovere e mantenere il fenotipo condrocitico, ma anche nel favorire la sintesi di collagene di tipo II sia durante la coltura in vitro sia dopo l'operazione di impianto nell'articolazione. Inoltre, studi *ex vivo* rivelano che il tasso di degradazione di questo tipo di scaffold è paragonabile a quello di sintesi della matrice extracellulare da parte dei condrociti, questo favorisce l'integrazione del tessuto di nuova formazione nel sito da correggere.

Il trapianto di condrociti autologhi mediato da strutture a base di acido ialuronico riporta risultati ottimi a partire dallo sviluppo di cartilagine ialina a circa 1 anno dall'operazione di posizionamento dell'innesto, dimostrando inoltre miglioramenti nella funzionalità del tessuto e, di conseguenza, nella qualità di vita dei soggetti trattati [13,14].

Più nello specifico verrà considerato uno studio condotto sull'efficacia dell'innesto a base di acido ialuronico Hyalograft®-C. Questa tecnica prevede l'impiego di un derivato esterificato dell'acido ialuronico chiamato HYAFF®11 (Fidia Advanced Biopolymers, Abano Terme, Italy) che permette la costruzione di un ampio assortimento di strutture tridimensionali biodegradabili, variabili nella forma e nei tempi di degradazione, grazie alla possibilità di essere convertito in configurazioni stabili. I vantaggi nell'utilizzo di questo materiale si palesano



soprattutto nella promozione della crescita in vitro di condrociti altamente vitali e della loro espressione originale del fenotipo condrogenico. La matrice che viene a formarsi, inoltre, presenta caratteristiche tipiche di quella della cartilagine ialina in quanto ricca di proteoglicani, di collagene di tipo II e di aggregano. La sua elevata biocompatibilità e capacità di riassorbimento evitano di incorrere in una risposta infiammatoria e rendono questo derivato perfettamente in linea con le necessità esposte dalla procedura di ACI che si sta analizzando. Hyalograft®-C è appunto l'innesto che si crea dall'accrescimento di condrociti autologhi su uno scaffold tridimensionale di HYAFF®11. Questa tipologia di innesto è entrata in uso in Europa nel 1999 per il trattamento di difetti cartilaginei a tutto spessore portando risultati soddisfacenti, in termini di sicurezza ed efficacia, ampiamente supportati da dati clinici [13].

### 3.2.3 *BioSeed®-C*

Quest'altra tecnica di ingegneria tissutale di riparazione della cartilagine combina i vantaggi dell'utilizzo di cellule autologhe con le proprietà di promozione dell'accrescimento cellulare tipiche di una matrice gelificata. Questo avviene per mezzo di uno scaffold polimerico bioriassorbibile che conferisce stabilità all'articolazione fin da subito. È stato dimostrato in vitro che gli innesti di tessuto ingegnerizzato a base di polimeri incoraggiano lo sviluppo di cartilagine ialina come tessuto di nuova formazione. Valutazioni precliniche di questa tecnica hanno infatti dimostrato la formazione di una matrice simile a quella della cartilagine ialina e un'ottima integrazione della cartilagine rigenerata con il tessuto sano circostante e con il tessuto osseo subcondrale.

Lo scaffold in questo caso è costituito da fibrina e materiale polimerico, quale acido poliglicolico e polilattico, e polidiossano. Anche per questa procedura i condrociti sono prelevati da un campione autologo e isolati con la stessa tecnica delle metodologie descritte in precedenza (tramite enzimi digestivi). Dopo un periodo di coltura in vitro vengono quindi seminati su uno scaffold polimerico formando BioSeed®-C, ossia un materiale composito ottenuto da un vello collagenico in polyglaction 910 e poli-p-diossano arricchito di condrociti autologhi in una matrice tridimensionale: questo permette di avviare il redifferenziamento dei condrociti precedentemente espansi; la formazione della matrice e lo sviluppo del tessuto vero e proprio procedono in vivo dopo l'operazione di impianto. L'innesto che viene a formarsi contiene circa  $20 \times 10^6$  cellule/cm<sup>3</sup> fissate con circa 5-7 mg di colla di fibrina e ha un tempo di riassorbimento di circa 2-3 mesi. L'applicazione della nuova porzione di materiale nel sito da riparare avviene mediante una tecnica che prevede solitamente, come prima cosa, di eseguire il *debridement* fino all'osso subcondrale, mediante un cucchiaio chirurgico, per rendere il difetto di forma rettangolare. Dopo questa azione di preparazione, si ricava una sagoma del difetto e si

taglia il vello ottenuto in modo che si adatti perfettamente all'area da coprire. La porzione che deve essere impiantata viene allora legata a fili riassorbibili, uno per ogni angolo, con un'ansa a doppio nodo. A questo punto si praticano con un trapano 4 fori agli angoli del difetto per poter fissare la copertura per via transossea. I fili vengono usati come pulegge e guidati attraverso i fori per poi essere tagliati vicino all'uscita: in questo modo la copertura è applicata al difetto e fissata in maniera stabile senza necessità di ulteriori materiali di copertura o di un bordo di cartilagine perfettamente sana attorno al difetto (Figura 3.7) [17,21].

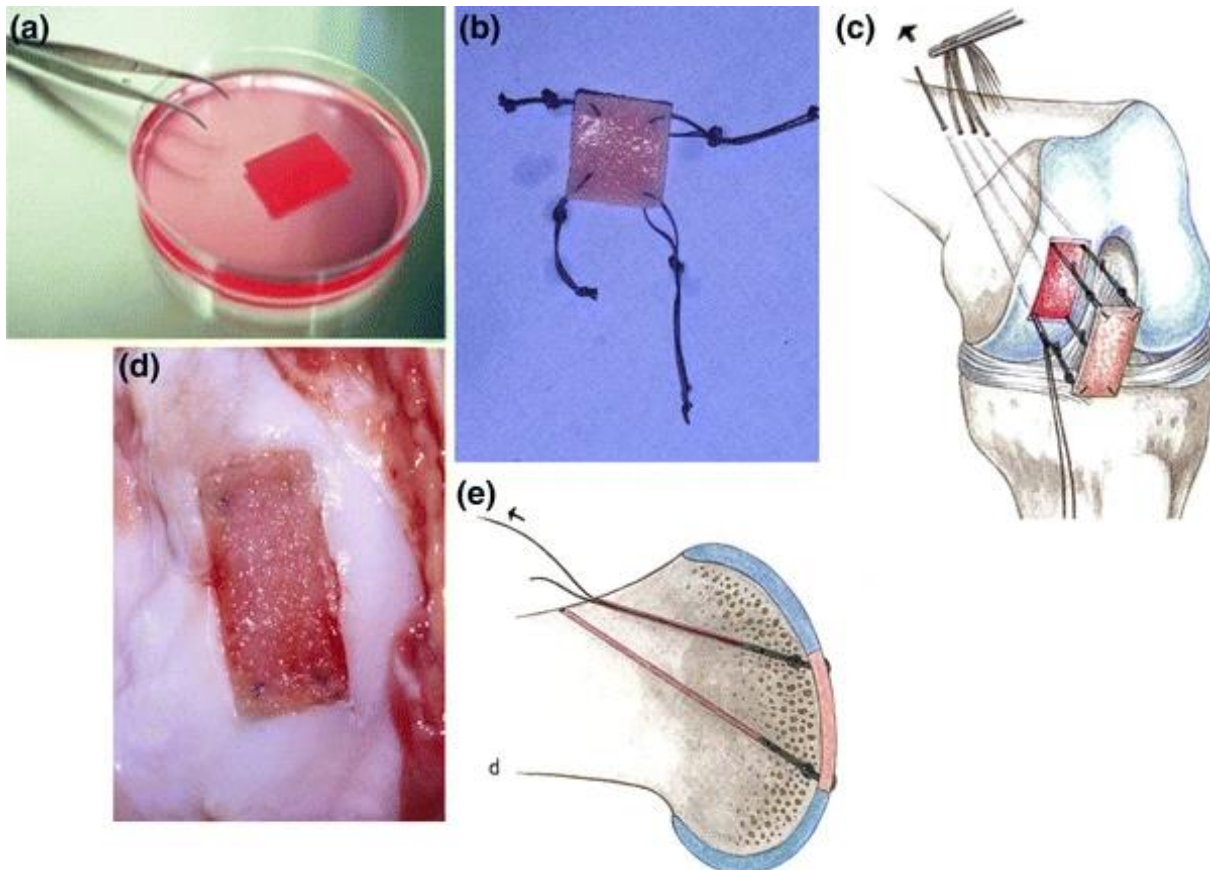


Figura 3.7: (a) innesto di Bioseed®-C; (b) innesto armato di fili riassorbibili per l'applicazione al difetto; (d) innesto applicato al difetto; (c)(e) illustrazione della tecnica di impianto per via transossea [17].

#### 4. CASI DI STUDIO

Le nuove tecniche di ingegneria tissutale sviluppate per il trapianto di condrociti autologhi sono in continuo sviluppo con l'obiettivo di perfezionare le metodologie e massimizzare i risultati ottenuti. Un dettaglio importante che caratterizza queste tecniche, la cui variazione può determinare miglioramenti o peggioramenti sostanziali degli esiti delle operazioni, è il materiale impiegato nella costruzione dello scaffold utilizzato. Come è stato descritto nel capitolo precedente, infatti, i composti che rispettano i requisiti richiesti da queste particolari metodologie, possono essere di origine diversa e, di conseguenza, presentare proprietà leggermente differenti. La valutazione di uno specifico materiale in questo contesto viene fatta a vari livelli. Innanzitutto, quando un nuovo materiale, o in generale una nuova procedura, viene proposta, qualsiasi sia l'applicazione clinica alla quale si riferisce, questa deve essere sottoposta a test *in vitro* che ne permettono una valutazione preliminare del comportamento, in condizioni che simulino quelle in cui verrà poi applicato, alla base dello scopo per cui viene presentata. Se i test *in vitro* soddisfano le aspettative e i criteri imposti per quella specifica finalità d'impiego, si procede sottoponendo la pratica analizzata a test *in vivo* che permettono di verificare che la funzionalità attesa venga realmente mantenuta anche in un ambiente biologico simile a quello in cui si prevede di sfruttarla. Nel momento in cui anche i test *in vivo* producono risultati soddisfacenti, è possibile che la tecnica venga approvata per l'utilizzo clinico. Una volta ottenuta l'approvazione per la sperimentazione sull'uomo, è possibile valutarne l'efficacia mediante studi condotti su una certa popolazione di soggetti. Gli studi prevedono il monitoraggio degli esiti della tecnica che vanno valutati osservando, secondo criteri prestabiliti, i risultati a breve e/o lungo termine. Questo tipo di studi, inoltre, se condotti analizzando i risultati secondo gli stessi criteri di valutazione, permettono di confrontare diverse tecniche che abbiano obiettivo comune: questo è possibile considerando i dati di follow up dei diversi casi. Segue un'analisi delle metodologie esposte nel capitolo precedente prendendo in considerazione tre casi di studio condotti su gruppi di pazienti, selezionati secondo specifici requisiti riguardanti sia la problematica da correggere sia le caratteristiche dei soggetti stessi, che sono stati sottoposti ad interventi di riparazione del tessuto cartilagineo mediante tecnica MACI, Hyalograft®-C o BioSeed®-C. Il monitoraggio dei risultati procede dai 2 ai 7 anni post-intervento ed è esaminato secondo i seguenti punteggi standard di valutazione dello stato della cartilagine:

- Lysholm score, valuta in base al livello di attività;
- International Knee Documentation Committee (IKDC), valuta, in base ai sintomi soggettivi, la funzionalità dell'articolazione e l'attività sportiva;

→ Modified Cincinnati score, i parametri di valutazione sono gli stessi del punteggio IKDC [19].

## 4.1 MACI case study

### 4.1.1 Descrizione delle procedure

Per la tecnica MACI si considera uno studio condotto alla Medical University of Vienna (Vienna, Austria) [19] su una popolazione di pazienti tra i 19 e i 50 anni reclutati tra ottobre 2000 e ottobre 2004 per il trattamento di difetti sintomatici alla cartilagine articolare del ginocchio. Sono stati selezionati soggetti che presentassero difetti di dimensioni superiori a 2 cm<sup>2</sup> (ma sul limite massimo di dimensione del difetto o sul numero di difetti non è stata imposta nessuna restrizione), e che non mostrassero instabilità articolare o disallineamento con asse di deviazione maggiore di 5°. L'età media dei pazienti al momento dell'operazione era di 35,2 anni (il range era tra i 20 e i 48 anni). Le dimensioni medie del difetto erano di 5.1 cm<sup>2</sup> (dai 2.4 ai 9.9 cm<sup>2</sup>) e i difetti erano collocati sul condilo femorale mediale (in 13 casi), sul condilo femorale laterale (in 4 casi), sulla patella (in 9 casi) e un paziente presentava difetto osteocondrale: in aggiunta al trattamento MACI ha subito un trapianto osseo. Prima di essere sottoposti all'operazione di trapianto di condrociti autologhi con tecnica MACI, 16 dei soggetti studiati hanno subito altre operazioni quali: osteotomia, *debridement*, tecniche di stimolazione del midollo, operazioni a menischi e/o legamenti e interventi alla rotula.

Sono stati creati 24 innesti MACI impiegati poi nel trattamento di 21 pazienti; un paziente ha necessitato di 2 impianti e uno di 3.

L'innesto in ognuno dei casi è stato preparato secondo la procedura MACI; quindi, per prima cosa, è stato classificato il difetto e sono stati prelevati 200-300 mg di cartilagine ialina da una zona a basso carico della fossa intercondiloidea mediante artroscopia. Sono poi stati isolati i condrociti rimuovendo la matrice tramite digestione enzimatica e successivamente sono stati espansi in coltura monostrato con l'ausilio di siero prelevato dal paziente durante la prima operazione. Dopo 3 o 4 settimane, le cellule avevano raggiunto un numero di circa 15-20 milioni: a questo punto sono state seminate sulla membrana a doppio strato di collagene misto di tipo I e III.

È stata quindi effettuata una mini-artrotomia: per prima cosa si è preparata la cartilagine praticando raschiamento per eliminare la parte più danneggiata immediatamente circostante al difetto, mentre la placca ossea subcondrale ha subito *debridement*. Poi l'innesto, tagliato perfettamente a misura della lesione, è stato posizionato con il lato ricco di cellule rivolto verso l'osso subcondrale ed è stato fissato usando colla di fibrina. In generale non sono state usate suture o coperture in periostio, ma in alcuni soggetti è stato necessario stratificare 2 o 3 porzioni

di membrana per colmare completamente la lesione. La manipolazione del ginocchio da parte del chirurgo ha fatto aderire l'impianto una volta completato l'innesto e l'ha reso stabile; infine la giuntura è stata avvolta con un bendaggio elastico.

Il programma riabilitativo prevedeva l'immobilizzazione per le prime 12-24 ore a seguito dell'operazione, mentre dopo due giorni è iniziata la riabilitazione vera e propria, ovvero 6-8 ore al giorno di movimento passivo continuo del ginocchio. L'esercizio passivo è stato portato avanti per sei settimane ed è servito ad accelerare la guarigione, promuovendo l'attività di sintesi dei condrociti; nel frattempo è stato anche indicato ai pazienti di effettuare contrazioni isometriche della muscolatura ed esercizi per favorire la circolazione. Inizialmente è stato impedito ai soggetti di caricare l'articolazione usando stampelle ortopediche, poi, in base al fatto che la lesione trattata si trovasse sulla zona tibiofemorale o patellofemorale, la ripresa graduale del ROM (*range of motion*) e del peso caricato sono state regolate in maniera diversa. Successivamente all'applicazione della procedura, 18 dei 21 pazienti operati hanno completato sia l'analisi clinica sia di imaging fino ai 5 anni di follow-up; uno ha partecipato solo alla valutazione clinica, mentre i restanti 2 pazienti non le completarono a causa del fallimento della procedura [19].

#### 4.1.2 Risultati e considerazioni

Tutti i pazienti hanno riscontrato miglioramenti significativi a seguito dell'operazione. In particolare, dopo un periodo di osservazione di 5 anni, il punteggio IKDC ha raggiunto, in maniera relativamente graduale, una media di  $74.3 \pm 20.4$ ; mentre rispetto alle scale di valutazione Cincinnati e Lysholm si è osservato un netto miglioramento nel primo anno post-operatorio che si è poi mantenuto nei successivi 5 anni (Figura 4.1).

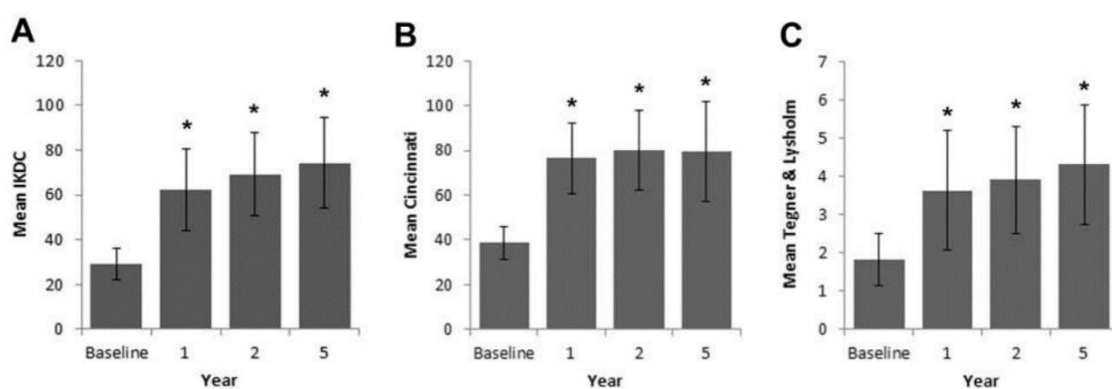


Figura 4.1: punteggi medi delle 3 scale di valutazione considerate a seguito dell'operazione con tecnica MACI a 1, 2 e 5 anni dall'intervento a confronto con la condizione preoperatoria [19].

Dall'osservazione del MRI (*Magnetic Resonance Imaging*), si nota che al completamento dei 5 anni nell'83.3% dei casi il riempimento del difetto da parte del tessuto di nuova formazione è totale; inoltre, si vede che l'edema dell'osso subcondrale raggiunge il picco a 3 mesi dall'intervento per poi decrescere finché, dopo 5 anni, solo 9 dei 19 (47.4%) pazienti sotto osservazione ancora mostravano segni di edema in questa zona.

Il volume di riempimento del difetto si è dimostrato buono già a 2 anni dall'operazione: infatti, nell'83% degli interventi praticati nell'area femorale la lesione era già stata colmata di un volume >51%, mentre in generale per il 65% delle articolazioni operate si è arrivati a >76% con una tendenza di crescita graduale durante tutto il periodo di follow-up (Figura 4.2). La completa integrazione è stata raggiunta rapidamente entro i 3 mesi nell'82% dei pazienti, per poi svilupparsi successivamente durante i 5 anni di follow-up in diversi modi: 3 casi sono ulteriormente migliorati, 12 hanno mantenuto stabile la situazione raggiunta, 2 hanno subito un deterioramento da completa a parziale integrazione del nuovo tessuto. L'assimilazione con l'osso, invece, si può notare completata in tutti i pazienti, ad eccezione di 1, già dopo 2 anni dall'impianto.

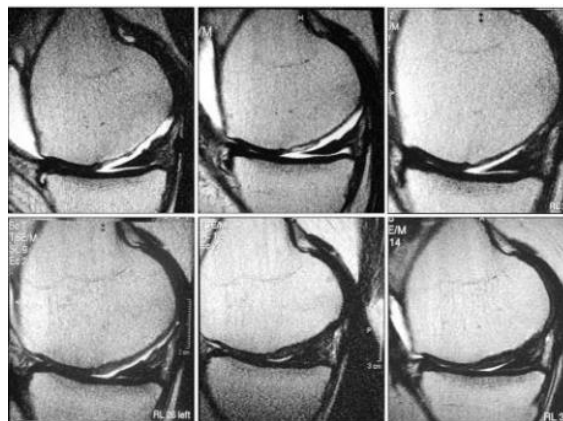


Figura 4.2: evoluzione della lesione osservata tramite risonanza magnetica (MRI), da sinistra a destra si ha: condizione preoperatoria, condizione a 3 mesi post-intervento, a 6 mesi, a 12 mesi e a 2 e 5 anni. Già a 2 anni dall'intervento il difetto era completamente colmato e integrato nella cartilagine sana [19].

È stata riscontrata adesione in 2 dei 7 casi di innesto rotuleo (29%) ma uno dei due ha mostrato segni di grave osteoartrite nella risonanza magnetica effettuata al terzo mese di osservazione. Si sono inoltre verificati 2 casi di fallimento della procedura: in uno si è deciso di procedere mediante artroscopia con un'operazione di *debridement*, mentre nell'altro si è dovuto ricorrere a sostituzione protesica dell'articolazione (Figura 4.3) [19].

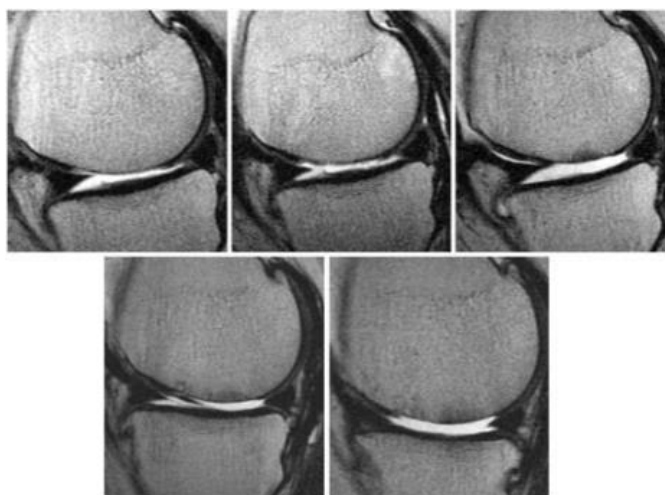


Figura 4.3: immagini di risonanza magnetica di un difetto posto sul condilo femorale mediale in cui il trattamento non ha avuto successo, da sinistra a destra: prima dell'operazione, a 3 mesi dall'operazione, a 6 mesi, a 12 mesi e a 2 anni [19].

## 4.2 Hyalograft®-C case study

### 4.2.1 Descrizione delle procedure

Lo studio [20] riguarda una popolazione di 53 pazienti, con lesione alla cartilagine articolare del ginocchio, operati al dipartimento di chirurgia ortopedica alla Medical University of Vienna: un primo gruppo di 36 soggetti è stato operato tra dicembre 2001 e settembre 2004 analizzando risultati di 3 anni di follow-up; successivamente sono stati sottoposti all'operazione anche i restanti 17. La popolazione dello studio è formata da 31 soggetti maschi e 22 femmine con età media al momento dell'intervento di  $32 \pm 12$  anni e indice di massa corporea (BMI, *Body Mass Index*) di  $24.5 \pm 3.8$  kg/m<sup>2</sup>. Solo 3 pazienti presentavano difetti cartilaginei multipli, mentre gli altri 50 mostravano lesioni singole e le dimensioni medie erano  $4.4 \pm 1.9$  cm<sup>2</sup>. I difetti erano localizzati in diverse aree dell'articolazione: sul condilo femorale mediale in 41 casi, 6 persone presentavano imperfezioni al condilo femorale laterale, e altri 2 nella zona patellare; c'è stato un solo caso di anomalia nella zona tibiale e uno di difetti multipli al condilo femorale mediale; gli ultimi due invece presentavano difetti doppi: in un caso erano coinvolti condilo femorale mediale e condilo femorale laterale e nell'altro caso condilo femorale mediale e area tibiale.

Su 40 dei pazienti trattati l'operazione di trapianto di condrociti autologhi è stata successiva o contemporanea ad altre operazioni, in particolare: 6 hanno subito microfrattura, 3 perforazione subcondrale e altri 3 retrograda, 3 soggetti sono stati sottoposti a trapianto osteocondrale, 12 a meniscectomia parziale, mentre su uno solo era stata praticata la procedura di Elmslie-Trillat prima di procedere con Hyalograft®-C; 6 pazienti sono stati sottoposti a ricostruzione del legamento crociato anteriore prima dell'operazione oggetto di questo caso di studio e 2 hanno

invece subito le due operazioni contemporaneamente, 3 sono stati sottoposti a osteotomia correttiva precedentemente al trattamento con Hyalograft®-C e altri 6 li hanno subiti in concomitanza; 4 pazienti invece si erano sottoposti a operazioni di microfrattura come prima opzione, insieme all'operazione di prelievo del campione, e hanno lasciato la possibilità di trapianto di condrociti autologhi come eventuale seconda opzione, conservando il campione prelevato.

I pazienti sono anche stati classificati in base al tipo di lesione in: casi semplici, complessi e di recupero. I casi semplici erano 23 e comprendevano i soggetti affetti da singoli difetti di dimensioni minori di 4 cm<sup>2</sup> sul condilo femorale; di quelli complessi se ne contavano invece 22 ed erano caratterizzati da difetti di dimensioni maggiori dei 4 cm<sup>2</sup> localizzati sul condilo femorale, sulla troclea, sulla tibia e sulla rotula o eventuali difetti multipli; i casi di recupero sono stati solo 8 e riguardavano lesioni a specchio o primi sintomi di osteoartrite.

La procedura con Hyalograft®-C è stata utilizzata solo per correggere i danni legati a traumi o osteocondrite dissecante, mentre instabilità e disallineamento sono state trattate prima o al momento dell'impianto, inoltre la placca subcondrale è stata conservata.

I soggetti trattati sono stati suddivisi ulteriormente secondo una classificazione tra indicazioni primarie e secondarie come è descritto nella Tabella4.1 per essere valutati separatamente.

	N	Defect Size, cm <sup>2</sup>	Age, y	BMI, kg/m <sup>2</sup>
Primary	42	4.0 ± 1.8	30.6 ± 10.5	23.8 ± 3.2
Secondary	11	5.9 ± 1.4	41.7 ± 13.6	26.9 ± 4.8
<i>P</i> <sup>b</sup>		.007	.027	.085
Cumulative	53	4.4 ± 1.9	32.9 ± 12.1	24.5 ± 3.7

<sup>a</sup>BMI, body mass index.

<sup>b</sup>*P* for double-tailed independent-sample *t* tests.

Tabella4.1: parametri clinici di classificazione dei soggetti dello studio in base ad indicazioni primarie e secondarie (media ± deviazione standard) [20].

La porzione di pazienti di indicazione primaria includeva 42 individui di età inferiore ai 55 anni nei quali si verificava stabilità dei legamenti, allineamento regolare e difetti singoli circondati da cartilagine sana; comprendeva 22 casi semplici, 19 complessi e 1 di recupero. L'indicazione secondaria invece riguardava gli 11 pazienti che non rientravano nelle caratteristiche dell'indicazione primaria e si trattava di 1 caso semplice, 3 complessi e 7 di recupero.

Come previsto dalla procedura, tramite la prima artroscopia sono stati identificati e valutati i difetti cartilaginei da correggere ed è stato prelevato il campione di cartilagine dall'area non portante dell'articolazione. È avvenuta poi l'espansione *in vitro* delle cellule che è stata gestita da Fidia Advanced Biopolymers: dopo l'isolamento dei condrociti per digestione enzimatica



della matrice, le cellule sono state espanse in coltura monostrato per 2 settimane e successivamente seminate sulla struttura di HYAFF-11S. La struttura in questo caso è rappresentata da una rete tridimensionale di fibre spesse 20 µm, è biocompatibile, idrosolubile ed è eccellente nel favorire l'adesione cellulare; inoltre va incontro ad una reazione spontanea di idrolisi che libera alcol benzilico e acido ialuronico e la dissoluzione completa si ha in un periodo di circa 4 mesi. È possibile procedere all'impianto dopo 2 settimane dalla semina dei condrociti sulla matrice; il trasporto avviene tramite un confezionamento in cui Hyalograft®-C si preserva fino a 72 ore; nel caso in cui si voglia valutare prima l'effetto di un'altra procedura come la microfrattura e poi eventualmente procedere con l'applicazione di Hyalograft®-C, è possibile congelare l'innesto ottenuto in modo che si conservi per un periodo che può arrivare fino ad un anno.

Per quanto riguarda le operazioni chirurgiche, le procedure sono state: artroscopia, per l'asportazione della porzione biotica da cui ottenere i condrociti; e mini-artrotomia, nella maggior parte dei casi senza laccio emostatico, per il posizionamento dell'innesto. La seconda operazione è consistita in un'azione di *debridement* per ottenere un contorno stabile del difetto, ma la placca subcondrale è stata mantenuta; l'impianto è stato poi sagomato seguendo un template del difetto stesso in modo da farlo aderire al meglio, e infine è stato applicato assicurandolo con colla di fibrina al sito della lesione da colmare; in nessuno dei casi sono state necessarie ulteriori suture.

Subito dopo l'intervento si è praticata l'immobilizzazione dell'articolazione per mezzo di un tutore, a due giorni dall'operazione, invece, è iniziata la riabilitazione mediante movimento passivo da 0° a 30° che è progredita fino al raggiungimento della flessione completa dopo 4 settimane. Per le prime 6 settimane, inoltre, è stato previsto l'utilizzo di stampelle ortopediche evitando totalmente di sottoporre l'articolazione al carico, mentre dalle 7 alle 12 settimane si è passati gradualmente al pieno carico [20].

#### 4.2.2 Risultati e considerazioni

Anche per quanto riguarda l'esposizione dei risultati è opportuno distinguere tra i casi di indicazione primaria e secondaria. I casi di indicazione primaria hanno visto un miglioramento significativo evidenziato dall'incremento di tutti i punteggi durante tutto il periodo post-operatorio; inoltre, l'articolazione ha dimostrato un'ottimizzazione della funzionalità che si è rivelata decisamente migliore rispetto alla condizione preoperatoria ed è rimasta stabile durante tutto il periodo di follow-up. Per quanto riguarda invece l'indicazione secondaria, che includeva casi complessi o di recupero, i miglioramenti non sono stati così rilevanti: i punteggi non sono

cresciuti in maniera evidente come per l'altra categoria di pazienti, in particolare la differenza è notevole nel caso del punteggio Lysholm (Figura 4.4).

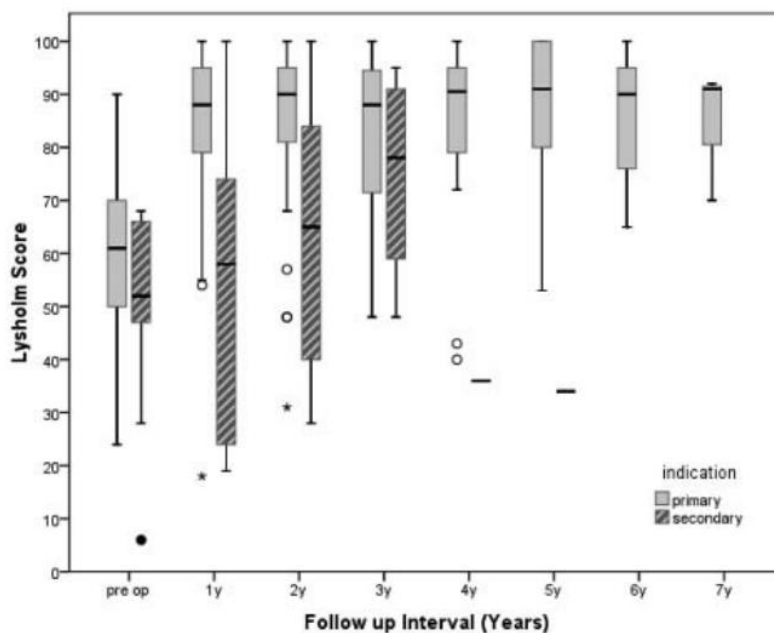


Figura 4.4: confronto tra pazienti di indicazione primaria e secondaria dell'andamento nel periodo post-operatorio dei valori medi dei punteggi Lysholm [20].

Considerando invece il confronto tra risultati ottenuti dalle due diverse tipologie di interventi risulta che i pazienti operati tramite artroscopia hanno necessitato di un periodo più breve di ospedalizzazione, hanno riscontrato risultati molto buoni già a 2 anni dall'operazione raggiungendo i punteggi medi  $84,0 \pm 8,2$  per la scala Lysholm e  $83,6 \pm 6,1$  per la scala IKDC; anche nei casi di mini-artrotomia i miglioramenti sono stati più o meno dello stesso livello. L'unica complicanza che si è presentata è stato un moderato versamento che si è verificato in 2 dei soggetti operati.

I casi in cui invece la procedura non è andata a buon fine sono stati 12 e sono andati incontro al fallimento nel periodo tra i 6 mesi e i 5 anni dopo l'operazione. In particolare, si trattava di 9 degli 11 pazienti della categoria di indicazione secondaria (81,2%) e solo 11 di quelli di indicazione primaria (7,1%); in questi casi è stato necessario ricorrere ad un'ulteriore operazione chirurgica nella quale, per i pazienti di indicazione secondaria, si è effettuata la sostituzione protesica totale dell'articolazione.

Tra i soggetti che erano stati sottoposti a tecniche di stimolazione del midollo prima dell'intervento con Hyalograft®-C, ovvero 13 di cui 10 con difetti singoli sul condilo femorale, uno nella zona patellare e 2 con difetti multipli, 3 sono andati incontro a fallimento della procedura. Va fatto notare però che tutti e tre erano casi di indicazione secondaria e presentavano segni di osteoartrite.

Osservando i riscontri ottenuti entro i 3 anni post-operatori, questo studio evidenzia che l'impiego di un innesto in Hyalograft®-C porta risultati notevolmente migliori in soggetti di età inferiore ai 30 anni, e che sicuramente anche il fatto che il paziente presenti un unico difetto o lesioni più complesse ha influenza sull'efficacia della tecnica. Infatti, nei soggetti giovani e con difetti singoli, osservando i risultati a medio-lungo termine, si può considerare una procedura sicura che ha portato ad incrementi significativi di tutti i punteggi di valutazione. La maggior parte dei pazienti ha dimostrato la capacità di praticare attività sportiva moderata e intensa, criterio di valutazione dei punteggi IKDC e Cincinnati che ne ha determinato l'incremento. Nei pazienti di indicazione secondaria invece si è presentato dolore persistente, gonfiore e riduzione della mobilità; quindi, nonostante l'operazione abbia permesso di ritardare l'intervento di sostituzione protesica, non ha prodotto risultati tali da giustificare la complessità e i costi dell'intervento.

Sicuramente il maggior vantaggio di questa tecnica rispetto al trapianto di condrociti autologhi tradizionale è l'esclusione di rischi dovuti all'impiego di una membrana periostale, come l'ipertrofia e la morbilità del sito di prelievo, ma anche un'operazione chirurgica più semplice e meno rischiosa.

Si può quindi giungere alla conclusione che l'impiego di Hyalograft®-C porta a risultati ottimali per la riparazione di difetti cartilaginei singoli ma profondi su pazienti giovani, attivi, con allineamento regolare dell'articolazione e stabilità [20].

### **4.3 BioSeed®-C case study**

#### *4.3.1 Descrizione delle procedure*

In questo studio [21] i pazienti trattati presentavano difetti post-traumatici, lievemente degenerativi o osteoartritici, significativi alla cartilagine articolare del ginocchio. Sono stati operati 22 soggetti maschi e 18 femmine di età media 36 anni, in particolare il range andava dai 17 ai 64 anni, con indice di massa corporea medio pari a 25 in un range tra 19 e 34, peso di 76.5 kg con un intervallo tra i 54 e i 102 kg e altezza tra i 160 e i 189 cm con una media di 175 cm. La dimensione media dei difetti trattati era di 4.6 cm<sup>2</sup>, da 2 a 15 cm<sup>2</sup>, ed erano localizzati in 27 casi sul condilo femorale mediale, 3 soggetti li presentavano sul condilo femorale laterale, 6 sulla patella, e sulla troclea e in unico caso nell'area tibiale. Dalla valutazione delle lesioni è inoltre emerso che 27 pazienti presentavano difetti degenerativi post-traumatici e/o difetti lievi senza presentare segni di osteoartrite, mentre gli altri 13 mostravano lesioni osteoartritiche.

Prima di procedere con BioSeed®-C erano state praticate altre procedure alle articolazioni operate, in particolare: in 20 casi si trattava di meniscectomie, 13 erano ricostruzioni del legamento crociato anteriore, 2 rilasci laterali, in 7 soggetti era stata praticata artroplastica per

abrasione, in 13 perforazione o microfrattura, 23 pazienti erano stati sottoposti ad abrasione, 8 ad osteotomia tibiale e 3 al tradizionale trapianto di condrociti autologhi; inoltre, in 24 pazienti sono state effettuate operazioni simultanee all'impianto dell'innesto BioSeed®-C.

L'operazione vera e propria è avvenuta isolando condrociti autologhi da una porzione biotica di cartilagine sana di circa 250 mg, e per la successiva espansione *in vitro* sono stati prelevati 100 ml di sangue del paziente. I condrociti isolati sono appunto stati espansi *in vitro*, e successivamente circa 20 milioni di cellule sono state seminate sull'impalcatura polimerica. Dopo l'azione di *debridment*, fino all'osso subcondrale, è stato preparato l'innesto, tagliandolo in dimensioni tali da rendere ottimale il riempimento del difetto, che è poi stato posizionato artrotomicamente o artroscopicamente in base alla localizzazione o all'estensione del difetto. In particolare, l'artrotomia è stata praticata in quei casi in cui la lesione si trovava sul condilo mediale o laterale e quando solo l'innesto era sufficiente a coprire tutto il difetto. L'innesto è avvenuto mediante la tecnica inside-out, descritta nel capitolo precedente, che prevede il posizionamento per mezzo di fili riassorbibili.

La riabilitazione è iniziata il giorno dopo l'operazione effettuando movimenti passivi dell'articolazione, per poi passare ad un periodo di 6 settimane di riabilitazione attiva e carico parziale, con circa il 15% del peso corporeo, in aggiunta ad esercizi di contrazione isometrica della muscolatura. È poi seguito, fino alla settimana 12 post-operatoria, l'aumento graduale del carico insieme a fisioterapia attiva ed esercizi specifici per l'incremento della forza, ma in alcuni casi in cui si ritenesse appropriato è anche stato praticato un leggero allenamento ergometrico. Dopo questo periodo il peso applicato all'articolazione è stato aumentato ulteriormente, affiancando esercizi muscolari di coordinazione; ulteriori sforzi leggeri come la corsa o la bicicletta sono stati consentiti dopo 6 mesi dall'intervento, mentre gli altri sport dopo 12 mesi [21].

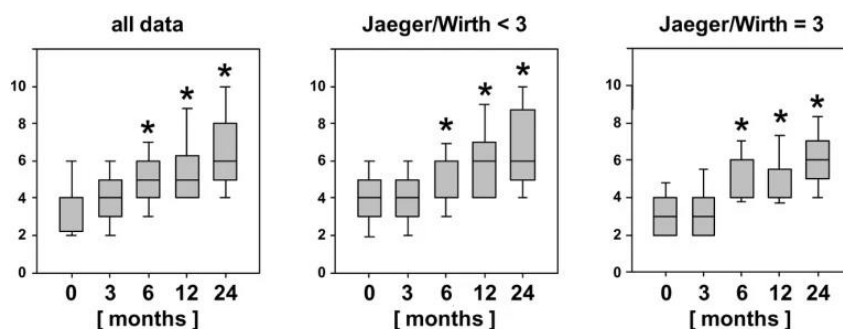
#### 4.3.2 Risultati e considerazioni

Per analizzare il livello di riempimento ottenuto sono state effettuate due risonanze magnetiche, una a 6 e una a 12 mesi dall'intervento, nelle quali si è notato che il difetto era stato colmato efficacemente da parte dell'innesto che si presentava ben integrato con la cartilagine articolare circostante e con l'osso subcondrale sottostante (Figura 4.4).

È stato necessario in 5 pazienti ricorrere ad un secondo intervento chirurgico, in particolare sono stati effettuati: un *debridment*, una sostituzione totale protesica del ginocchio, una rimozione dell'innesto e 2 sinoviectomie. In generale però le analisi istologiche delle biopsie raccolte a 9 e 12 mesi dall'operazione con lo scopo di analizzare il tessuto di riparazione, hanno mostrato in un caso la presenza di cartilagine con caratteristiche miste tra ialina e fibrosa; in



#### Modified Cincinnati Knee Score (patient)



#### Modified Cincinnati Knee Score (physician)

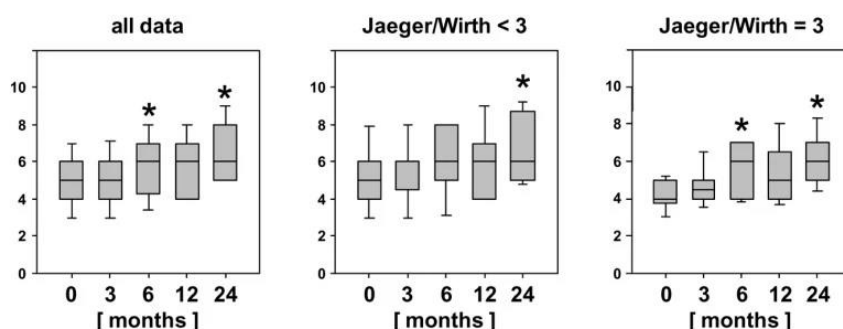


Figura 4.5: evoluzione dei punteggi della scala Cincinnati fino ai 2 anni successivi all'operazione valutando sia in generale tutti i pazienti trattati, sia dividendoli nei due gruppi: difetti post traumatici e degenerativi lievi (Jaeger-Wirth < 3) e osteoartritici (Jaeger-Wirth = 3) [21].

Anche il punteggio Lysholm è stato incrementato in entrambe le tipologie di lesioni: dai 3 mesi ai 2 anni post-intervento il punteggio medio è passato da 47.0 a 78.5 per il primo gruppo, mentre da 46.0 a 81.0 per il secondo gruppo. Valutando la popolazione intera dello studio, invece, il punteggio medio si è portato da 53.0 prima dell'operazione a 79.5 dopo 2 anni.

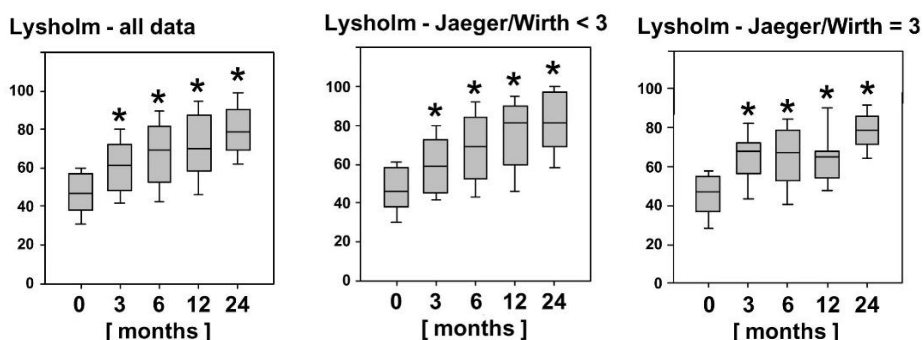


Figura 4.6: evoluzione dei punteggi della scala Lysholm fino ai 2 anni successivi all'operazione valutando sia in generale tutti i pazienti trattati, sia dividendoli nei due gruppi: difetti post traumatici e degenerativi lievi (Jaeger-Wirth < 3) e osteoartritici (Jaeger-Wirth = 3) [21].

Per quanto riguarda invece il punteggio International Knee Documentation Committee, gli incrementi si sono verificati tra i 6 mesi e i 2 anni di osservazione in tutti i pazienti, indipendentemente dal gruppo cui erano stati assegnati, e i risultati sono stati riportati

separatamente secondo le diverse sottoclassi di valutazione, sia per l'andamento generale sia per i singoli gruppi di classificazione. Le sottoclassi considerate per l'osservazione del miglioramento generale con riportati i relativi punteggi pre e post impianto sono: funzionalità fisica da 42.8 a 64.6, limitazioni dovute alla salute fisica da 25.7 a 53.6, dolore fisico da 38.9 a 61.6, problematiche di salute generali da 62.0 a 70.6, e *social functioning* da 59.5 a 77.5.

Con questo studio si è dimostrata l'efficacia dell'utilizzo della tecnica di trapianto di condrociti autologhi con scaffold polimerico BioSeed®-C per il trattamento dei difetti cartilaginei a tutto spessore nel ginocchio, sia in pazienti che presentassero lesioni degenerative post-traumatiche e lievi, sia in quelli affetti da osteoartrite [21].

#### 4.4 Confronto dei risultati

I risultati ottenuti in tutti e tre gli studi considerati si possono ritenere soddisfacenti, a dimostrazione del concetto che le tecniche di trapianto di condrociti autologhi di III generazione nella risoluzione delle lesioni cartilaginee possono essere considerate al pari o migliori delle altre tecniche descritte precedentemente, compreso il trapianto di condrociti autologhi di I e II generazione (ACI). È opportuno però, come esplicitato in tutti i casi di studio, quando si osservano i risultati ottenuti, prendere in considerazione le diverse categorie di pazienti definite. In particolare, si può osservare nella Tabella 4.2 come vengono riassunte le suddivisioni considerate nei tre studi riportati.

<b>Tecnica</b>	<b>Dimensione dei difetti (media)</b>	<b>Età (media)</b>	<b>Ulteriore classificazione</b>
MACI	5.1 cm <sup>2</sup>	35.2 anni	-
Hyalograft®-C	4.4 cm <sup>2</sup>	32 anni	→ Primarie 4.0 cm <sup>2</sup> , 30.6 anni → Secondarie 5.9 cm <sup>2</sup> , 41.7 anni
BioSeed®-C	4.6 cm <sup>2</sup>	36 anni	→ Degradazione da osteoartrite, → lesioni lievi e/o post traumatiche

Tabella 4.2: caratteristiche dei pazienti analizzati nei diversi studi presi in considerazione e delle ulteriori classificazioni definite.

Analizzando gli esiti e tenendo in considerazione un periodo di osservazione di circa 2 anni, si nota che, nonostante nei primi due studi si siano raccolti dati fino ai 5/7 anni successivi all'operazione, la maggior parte della ripresa e del miglioramento si ottiene in un tempo ravvicinato all'intervento e le valutazioni successive dimostrano solo un mantenimento dei risultati ottenuti.

Con una lettura più approfondita dei dati si può inoltre notare che nell'impiego di Hyalograft®-C si ottengono incrementi migliori nel trattare soggetti giovani, con difetti singoli di piccole dimensioni; tuttavia, si dimostra una tecnica efficace anche su pazienti che non rientrano in queste caratteristiche.

L'utilizzo di Bioseed®-C invece mostra risultati ottimali nel trattamento di lesioni lievi e post traumatiche, mentre evidenzia minori potenzialità quando applicato a cartilagine degradata a causa di osteoartrite; nonostante ciò, non è da escluderne l'impiego in quanto permette, se non la completa risoluzione del problema, quanto meno un rallentamento della degradazione e una posticipazione di interventi più invasivi e drastici come la sostituzione protesica totale del ginocchio.



## CONCLUSIONE

Nella presente tesina sono stati descritti tre casi di studio: ognuno di questi è basato su una diversa tecnica di ingegneria tissutale per la riparazione del tessuto cartilagineo mediante l'impiego di condrociti autologhi mediato da scaffold. Per ogni studio è stato definito un gruppo di pazienti di cui sono state evidenziate caratteristiche lievemente differenti. Tutti e tre, però, dimostrano l'efficacia e il successo delle tecniche sviluppate: esse, infatti, permettono di andare oltre al semplice riempimento del danno cartilagineo, puntando all'effettiva rigenerazione del tessuto, traguardo che nessuna delle precedenti soluzioni proposte era stata in grado di raggiungere.

Tuttavia, gli studi presi in considerazione, e la maggior parte degli altri condotti in questo ambito, riguardano l'osservazione degli esiti prodotti dall'applicazione di queste tecniche innovative per tempi relativamente brevi, con un periodo di follow up che al massimo raggiunge i 7 anni. Questo implica che, nonostante si noti che il principale miglioramento si ottiene entro tempi abbastanza ristretti dopo l'intervento, non si ha una valutazione dell'effetto a lungo termine delle tecniche applicate. È quindi impossibile, per ora, definire il trapianto di condrociti autologhi mediato da scaffold una soluzione duratura e definitiva, nonostante i risultati prodotti in termini di qualità della riparazione del tessuto siano soddisfacenti. Sono necessari ulteriori studi che dimostrino, oltre alla buona riuscita degli interventi e la rigenerazione e integrazione del tessuto di nuova formazione, anche l'effettiva durata a lungo termine della riparazione ottenuta, assicurandosi che non intercorrano eventuali condizioni avverse in un secondo momento. In questo modo sarebbe possibile verificare la capacità del tessuto di nuova formazione di mantenere solidità e funzionalità, dimostrate inizialmente, anche dopo un lungo periodo di applicazione dello stress, caratteristico della cartilagine articolare del ginocchio, a cui è costantemente sottoposto.



## BIBLIOGRAFIA

- [1] Kennet S. Saladin - Anatomia Umana – Piccin editore, III edizione italiana sulla VI in lingua inglese a cura di Raffaele De Caro (2020).
- [2] Giorgio Barbatelli, Franco Fais, Elena Masselli, Laura Bertoni, Antonio Franchitto, Vittorio L. Mazzarello, Francesca Boccafoschi, Ileana Giambanco, Giuseppe Musumeci, Michela Bosetti, Rosemarie Heyn, Gianfranco Natale, Francesco Carini, Paola Lanuti, Ferdinando Paternostro, Terenzio Congiu, Sabrina Lisi, Maurizio Sabatini, Katia Cortese, Francesca Luchetti, Amelia Toesca, Agata G. D’Amico, Paola L. Marmioli, Fabio Trimarchi, Claudia Dolci, Alberto M. Martelli, Antonella Vetuschi – Anatomia umana Fondamenti. Con istruzioni di istologia – Edi-Ermes (2018).
- [3] Frederic H. Martini, Robert B. Tallitsch, Judi L. Nath – Anatomia Umana – EdiSES università, VII edizione (2019).
- [4] Paolo Cabitza – Ortopedia – società editrice Esculapio (2013)
- [5] Carlo Di Bello, Andrea Bagno – “Biomateriali dalla scienza dei materiali alle applicazioni cliniche” - Pàtron Editore, II edizione (2016).
- [6] Sunhee Jang, Kijun Lee, Ji Hyeon Ju – “Recent Updates of Diagnosis, Pathophysiology, and Treatment on Osteoarthritis of the Knee” – International Journal of Molecular Sciences 22(5) (2021): 2619.
- [7] David T. Felson – “Osteoarthritis of the Knee” – The New England Journal of Medicine 354 (2006): 841-848.
- [8] Juergen Bruns, Mathias Werner, Christian Habermann – “Osteochondritis Dissecans: Etiology, Pathology, and Imaging with a Special Focus on the Knee Joint” - Cartilage 9(4) (2018): 346–362.
- [9] Franck Accadbled, Julie Vial, Jerome Sales de Gauzy – “Osteochondritis dissecans of the knee” - Volume 104, Issue 1, Supplement (2018): S97-S105
- [10] Helen M. Gordon – “Chondromalacia Patellae<sup>1</sup>” - Australian Journal of Physiotherapy, Volume 23, Issue 3 (1977): 103-106.
- [11] Weitao Zheng, Hanluo Li, Kanghong Hu, Liming Li and Mingjian Bei – “Chondromalacia patellae: current options and emerging cell therapies” - Stem Cell Research & Therapy (2021): 12-412.
- [12] David S. Logerstedt, Jay R. Ebert, Toran D. MacLeod, Bryan C. Heiderscheit, Tim J. Gabbett, Brian J. Eckenrode – “Effects of and Response to Mechanical Loading on the Knee”- Sports Medicine 52 (2022): 201–235.
- [13] Maurilio Marcacci, Massimo Berruto, Domenico Brocchetta, Antonio Delcogliano, Diego Ghinelli, Alberto Gobbi, Elisaveta Kon, Luigi Pederzini, Donato Rosa, Gian Luigi Sacchetti,

- Giacomo Stefani, Stefano Zanasi – “Articular Cartilage Engineering with Hyalograft® C. 3-Year Clinical Results” - *Clinical Orthopaedics and Related Research* 435 (2005): 96-105.
- [14] Eleftherios A. Makris, Andreas H. Gomoll, Konstantinos N. Malizos, Jerry C. Hu, Kyriacos A. Athanasiou - “Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage”- *Nat Rev Rheumatol* 11 (2015): 21–34.
- [15] Benjamin L. Clair, Adam R. Johnson, Timothy Howard - "Cartilage repair: current and emerging options in treatment." - *Foot & ankle specialist* 2.4 (2009): 179-188.
- [16] Matthias Jacobi, Vincent Villa, Robert A Magnussen, Philippe Neyret - “MACI - a new era?” - *Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol* (2011): 3-10.
- [17] Christoph Erggelet, Peter C. Kreuz, Eike H. Mrosek, Jan C. Schagemann, Andreas Lahm, Pascal P. Ducommun, Christian Ossendorf – “Autologous chondrocyte implantation versus ACI using 3D-bioresorbable graft for the treatment of large full-thickness cartilage lesions of the knee.” - *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery* 130 (2010): 957–964.
- [18] Kai Mithoefer, Timothy Mcadams, Riley J. Williams, Peter Cornelius Kreuz, Bert R. Mandelbaum – “Clinical Efficacy of the Microfracture Technique for Articular Cartilage Repair in the Knee” - *The American Journal of Sports Medicine* vol.37 (2009): 2053-2063.
- [19] Stefan Marlovits, Silke Aldrian, Barbara Wondrasch, Lukas Zak, Christian Albrecht, Goetz Welsch, Siegfried Trattinig – “Clinical and Radiological Outcomes 5 Years After Matrix-Induced Autologous Chondrocyte Implantation in Patients With Symptomatic, Traumatic Chondral Defects.” - *The American Journal of Sports Medicine* 40(10) (2012): 2273-2280.
- [20] Stefan Nehrer, Ronald Drotka, Stephan Domayer, David Stelzener, Rainer Kotz – “Treatment of Full-Thickness Chondral Defects With Hyalograft C in the Knee. A Prospective Clinical Case Series With 2 to 7 Years’ Follow-up” - *The American Journal of Sports Medicine*. 37(1\_suppl) (2009): 81-87.
- [21] Christian Ossendorf, Christian Kaps, Peter C. Kreuz, Gerd R. Burmester, Michael Sittinger, Christoph Erggelet - “Treatment of posttraumatic and focal osteoarthritic cartilage defects of the knee with autologous polymer-based three-dimensional chondrocyte grafts: 2-year clinical results” - *Arthritis Research & Therapy* volume 9 (2007): R41.

### **Siti web**

- [22] <https://www.nature-microscope-photo-video.com/it/foto/istologia-animale/anatomia-comparata-dei-vertebrati/altri-apparati-e-sistemi/apparato-scheletrico/mammiferi/tessuto-cartilagineo/cartilagine-ialina/010505c020905020101u-mammifero-cartilagine-ialina-sezione-trasversale-250x.html>

[23] [https://www.ligatender.it/?page\\_id=425](https://www.ligatender.it/?page_id=425)

[24] <https://www.riabilitypoint.it/anatomia-arto-inferiore/>

[25] <https://www.knee-pain-explained.com/images/knee-replacement1v2.jpg>

[26] [https://media.springernature.com/full/springer-static/image/art%3A10.1038%2Fs41584-019-0255-1/MediaObjects/41584\\_2019\\_255\\_Fig1\\_HTML.png](https://media.springernature.com/full/springer-static/image/art%3A10.1038%2Fs41584-019-0255-1/MediaObjects/41584_2019_255_Fig1_HTML.png)