

Primjena bioloških principa u pospješivanju cijeljenja i regeneracije zglobne hrskavice

The biological principles in healing and regeneration of the articular cartilage

Sanja Zoričić Cvek^{1*}, Luka Đudarić¹, Olga Cvijanović¹, Veljko Šantić², Mihael Sućec³, Dalen Legović², Branko Šestan²

¹Zavod za anatomiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka

²Klinička ortopedska bolnica Lovran, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka

³Stručni studij Fizioterapija Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, Rijeka

Sažetak. Prekrivajući zglobne površine zglobna hrskavica osigurava pravilno raspoređivanje i prenošenje mehaničke sile u zglobu te omogućuje pokretanje uz niski stupanj trenja. Ima specifičnu makroskopsku, mikroskopsku i molekularnu građu, što uključuje izuzetno mali broj stanica – hondrocita (2 do 10 % ukupnog volumena tkiva) koje proizvode i održavaju integritet velike količine međustaničnog matriksa i to u relativno hipoksičnim i hiponutricijskim uvjetima zbog nedostatka krvnih žila. Uz to, mitotička aktivnost i regeneracijski potencijal hondrocita izuzetno su niski, pa nakon oštećenja zglobne hrskavice ne nastupa potpuna tkivna regeneracija, već je zamjenjuje biomehanički manje kvalitetna vezivna hrskavica. Unatoč razvoju brojnih farmakoloških i kirurških procedura liječenja oštećenja zglobne hrskavice, pokazala su se brojna ograničenja i trenutno ne postoji idealna terapijska procedura koja bi dovela do potpune morfološke i funkcionalne restauracije oštećene zglobne hrskavice. Ipak, zahvaljujući napretku stanične i molekularne biologije kostiju te tkivnog inženjerstva, učinjeni su značajni pomaci u razumijevanju mehanizama održavanja integriteta tkiva i organa koji su doveli do stvaranja novih koncepata liječenja koji se baziraju na temeljnim principima odnosa elemenata regenerativnog trijasa. U ovom članku kratko je opisana uloga svakog pojedinog elementa trijasa: stanica kao produktivnog, nosača kao konduktivnog i signalnih molekula kao induktivnog elementa regeneracije.

Glavne riječi: cijeljenje hrskavice; regenerativna medicina; tkivno inženjerstvo; zglobna hrskavica

Abstract. Covering articular surfaces, articular cartilage ensures load bearing and low frictional movement in synovial joints. Articular cartilage has a specific macroscopic, microscopic and molecular structure characterized by an extremely small number of cells – chondrocytes (2 to 10% of the total volume of tissue), which produce and maintain the integrity of the large amount of extracellular matrix in the relatively hypoxic and hyponutritional conditions, due to the lack of blood vessels. In addition, mitotic activity and regeneration potential of chondrocytes are extremely low, which is why articular cartilage does not show its complete tissue regeneration after damage, but it is replaced by the biomechanically poorer bonding cartilage. Despite the development of numerous pharmacological and surgical procedures for treatment of the damaged articular cartilage, they have shown a number of limitations, and currently there is no ideal therapeutic procedure that would lead to a complete morphological and functional restoration of damaged articular cartilage. However, thanks to advances in cellular and molecular biology and tissue engineering, significant progress in understanding mechanisms of maintaining the integrity of tissues and organs have been made, which led to the creation of new concepts of treatment, based on the fundamental principles of relations between elements of regenerative trias. This article briefly describes the role of each element of the trias: productive cells, conductive carrier and signaling molecules as an inductive element of the articular cartilage regeneration.

Key words: articular cartilage; cartilage repair; regenerative medicine; tissue engineering

***Dopisni autor:**

Prof. dr. sc. Sanja Zoričić Cvek, dr. med.
Zavod za anatomiju, Medicinski fakultet
Sveučilišta u Rijeci
B. Branchetta 20, 51 000 Rijeka, Hrvatska
e-mail: sanja.zoricic@medri.uniri.hr

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

UVOD

Traumatska, upalna i degenerativna oštećenja zglobne hrskavice dovode do funkcionalnih poremećaja zglobova, posljedičnog gubitka funkcije i invalidnosti. Ovakva stanja u ortopediji obično završavaju ugradnjom totalne proteze zgloba. Do prije 20-ak godina nije bilo mogućnosti uspješnijeg liječenja takvih stanja, mada je godinama, što zbog starenja populacije, što zbog porasta broja sportskih i akcidentalnih ozljeda, incidencija ozljeda zglobne hrskavice i oboljenja zglobova u stalnom porastu. No zahvaljujući ubrzanom razvoju eksperimentalne i kliničke medicine, uvođenju novih kirurških tehnika i materijala te naročito zahvaljujući implementaciji tkivnog inženjerstva u ortopediji, danas postoji sve više mogućnosti liječenja takvih poremećaja i oboljenja čiji je osnovni cilj stimulacija cijeljenja i regeneracije oštećenih tkivnih elemenata zglobova i ostalih dijelova lokomotornog aparata. Sve je više eksperimentalnih i kliničkih studija koje dokazuju mogućnost da regenerativna medicina iz temelja promjeni metode liječenja, naročito u području ortopedije i traumatologije^{1,2}.

Regenerativna medicina i tkivno inženjerstvo discipline su koje se jako brzo razvijaju. Osnovni cilj im je popravak, zamjena ili potpuna struktura i funkcionalna regeneracija oštećenih tkiva i organa. Radi se o multidisciplinarnom području koje primjenom različitih znanstvenih disciplina kao što su biokemija, stanična i molekularna biologija, biofizika te biomehanika, kreira i u liječenje uvodi nove materijale, nove ljekovite pripravke, mijenjajući tako standardne doktrine liječenja. U ovom članku ukratko se opisuju temeljni principi regeneracije zglobne hrskavice te nova postignuća i mogućnosti primjene tkivnog inženjerstva u liječenju oštećenja zglobne hrskavice kao alternative klasičnoj ortopedskoj rekonstruktivnoj kirurgiji.

GRAĐA, FUNKCIJA I OŠTEĆENJA ZGLOBNE HRKAVICE

Zbog specifične makroskopske, mikroskopske i molekularne građe te posebne uloge koju obavlja, zglobna hrskavica predstavlja poseban strukturalni i funkcionalni element zglobova. Zglobna hrskavica uspostavlja kongruitet zglobnih površina, amortizira, pravilno raspoređuje i prenosi mehaničke sile

na podležuću subhondralnu kost te pri pokretanju zglobova osigurava površine niskog stupnja trenja. Zglobna hrskavica je i elastična i čvrsta, što omogućuje reverzibilne deformacije pri djelovanju različitih biomehaničkih sila³⁻⁵.

Postoji određena zakonitost u makroskopskoj, mikroskopskoj i molekularnoj građi potpornih tkiva koja ih izravno povezuje s prirodom sila kojima su podvrgnuti⁶. Zglobna hrskavica najbolji je primjer takve sprege strukture i funkcije. Obično je najdeblja na površinama zglobnih tijela koje su podvr-

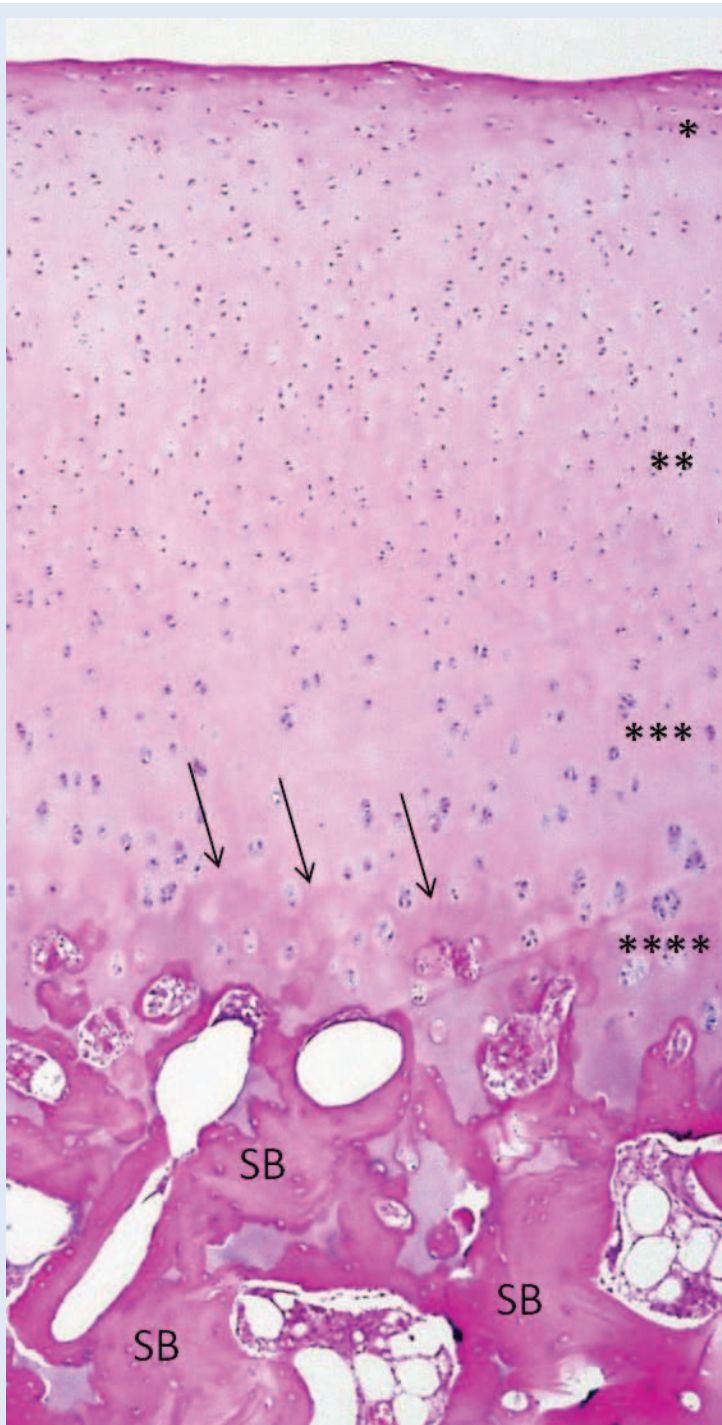
Budući da se održavanje strukturnog i funkcionalnog integriteta zglobne hrskavice odvija u relativno hipoksičnim i hiponutricijskim uvjetima, zbog niske mitotičke aktivnosti hondrocita regenerativni kapacitet zglobne hrskavice izuzetno je slab. Nakon oštećenja zglobna hrskavica najčešće se zamjenjuje biomehanički manje kvalitetnom vezivnom hrskavicom.

gnute većem mehaničkom opterećenju i manje su kongruentna sučeljenoj zglobnoj površini. Kao i ostala potporna tkiva, građena je od stanica i međustanične tvari ili matriksa koji količinom znatno premašuje stanični udio tkiva (slika 1.).

Osnovnu konstrukciju međustaničnog matriksa čini čvrsta kolagena mreža građena od izoforme kolagena tip II. Kolagena vlakanca dubljih slojeva pružaju se vertikalno, potom se lučno savijaju u površne slojeve gdje leže paralelno sa slobodnom površinom zglobne hrskavice⁷. Unutar ove trodimenzionalne kolagene mreže raspoređene su ostale strukturne komponente matriksa čiju glavninu čine makromolekularni kompleksi proteoglikana. Najvažniji među njima je agrekan, hidrofilni makromolekularni proteoglikanski kompleks koji navlači na sebe vodu i svojom osmotskom aktivnošću omogućava transport tvari iz sinovijalne tekućine u hrskavicu i kroz hrskavicu⁸. Tako 70 do 80 % težine zglobne hrskavice čini voda i glavni je medij kojim se unutar zglobne hrskavice vrši transport tvari, budući da zglobna hrskavica ne sadrži niti krvnih niti limfnih žila. Osim toga, agrekanska „spužva” međustanične tvari mijenjajući sadržaj vode čini hrskavicu fleksibilnom i elastičnom.

Tijekom opterećenja zglobne hrskavice, pa čak i u neopterećenom stanju, molekularni sastav me-

đustaničnog matriksa pridonosi fiziološkoj ravnoteži tkiva koje je otporno na sile naprezanja (kolagena mreža) i sile pritiska (proteoglikani), a ujedno omogućava stalan protok tkivne tekućine.



Slika 1. Mikrofotografija zglobne hrskavice i subhondralne kosti. Na slici su označeni: površinski sloj (*), intermedijarni sloj (**), radijarni sloj (***), Tide mark (←) i sloj kalcificirane hrskavice (****). Ispod sloja kalcificirane hrskavice nalazi se subhondralna kost (SB) s prostorima ispunjenim krvnim žilama i koštanom srži (HE, povećanje 200 ×).

Hondrociti čine svega 2 do 10 % ukupnog volumena tkiva i ukopani su u međustanični matriks pojedinačno ili u skupinama. Hondrociti su heterogena stanična populacija te se morfološki i funkcionalno razlikuju u pojedinim slojevima (slika 1A, 1B). Površinski sloj čine pojedinačni, vretenasto izduženi hondrociti paralelni s površinom i odijeljeni od zglobne šupljine i sinovijalne tekućine 200 – 500 nm debelim bestaničnim slojem koji se naziva lamina splendens. Ovaj sloj čini površinu hrskavice glatkom i skliskom, a ima i utjecaj na propusnost za difuziju hranjivih tvari iz sinovijalne tekućine u šupljini zgloba. Drugi ili intermedijarni sloj čine okruglasti hondrociti raspoređeni u manjim nakupinama. Samo u ovom sloju primijećene su mitoze hondrocita i to u mlađih individua, a isto tako je ustanovljeno da se tijekom osteoartritisa prve promjene u smislu stanične proliferacije odvijaju baš u ovom sloju. Stoga se pretpostavlja da hondrociti intermedijarnog sloja imaju najveći mitotički, pa tako i regeneracijski potencijal. Iako se dugo smatralo da su hondrociti jedina stanična populacija zglobne hrskavice, danas je poznato da zglobna hrskavica sadrži i progenitorne stanice koje imaju kapacitet proliferacije i diferencijacije u hondrocite, što znači i regeneracije lokalnih mikrolezija, mada je količina tih stanica izuzetno mala⁹. Treći radijarni sloj čine hondrociti poredani u stupovima od 4 do 8 stanica, okomitim na zglobnu površinu. Četvrti, najdublji sloj zglobne hrskavice, kalcificirani sloj, od prethodnog je odijeljen blago valovitom grančnom linijom koja se naziva Tidemark. Hondrociti kalcificiranog sloja su hipertrofični hondrociti i žive u bitno različitim uvjetima mikrookoliša, budući da je u okružujućem međustaničnom matriksu istaložena velika količina anorganskih soli. Kalcificirani sloj zglobne hrskavice izravno je spojen s podležecom subhondralnom kosti i prihvaćeno je mišljenje da ovaj sloj ima važnu ulogu temelja na kojemu leže prva tri nekalcificirana sloja zglobne hrskavice i posredstvom kojega se uspostavlja integritet i interakcija zglobne hrskavice i subhondralne lamelarne kosti^{10,11}.

Već je navedeno da je mitotička aktivnost hondrocita niska. Osim toga, u usporedbi s ostalim potpornim tkivima, zglobna hrskavica ne sadrži krvne i limfne žile i živce te hondrociti održavaju homeostazu u relativno hipoksičnim i hiponutri-

cijskim uvjetima. Glavni put dopreme nutrijenata ovisi o difuziji tvari iz sinovijalne tekućine šupljine zgloba, a ovisan je o osmotskom tlaku bubrenja međustanične tvari zglobne hrskavice. Bez obzira na relativno nepovoljne uvijete mikrookoliša, metabolička aktivnost hondrocita relativno je visoka. Relativno jednostavni makroskopski izgled skriva vrlo složenu i pravilnu unutarnju strukturu koja se održava stalnom hondrocitnom aktivnošću sve do nastupa degenerativnih promjena ili ozljeda. Zbog navedenih karakteristika nakon oštećenja zglobne hrskavice najčešće ne nastupa njena cjelovita tkivna regeneracija, već je zamjenjuje biomehanički slabije kvalitetna vezivna hrskavica. Oštećenja zglobne hrskavice najčešće nastaju kao posljedica različitih mehaničkih ozljeda (traumatske hondralne lezije), upalnih bolesti lokomotornog sustava (reumatoidni osteoartritis i hondritis), metaboličkih i genetskih bolesti (hondrokalcinoza, urična dijateza) te degenerativnih bolesti zglobova (degenerativni osteoartritis)¹²⁻¹⁴. Traumatska oštećenja zglobne hrskavice nastaju kao posljedica sportskih i drugih ozljeda. Ovisno o stupnju oštećenja i dubini ozljede, zglobna hrskavica može cijeliti spontano, ali se tkivo zamjenjuje uglavnom biomehanički manje vrijednom vezivnom hrskavicom^{15,16}. Kod dubljih traumatskih oštećenja zglobne hrskavice koje penetrira do subhondralnog koštanog tkiva, cijeljenje vrše stanice koštane srži subhondralne kosti koje proliferiraju i diferenciraju se osteoblaste i hondroblaste, koji svojim metaboličkom aktivnošću postupno izgrađuju međustaničnu tvar novonastalog tkiva. Većina ozljeda zglobne hrskavice dovodi do oslobađanja fragmenata hrskavičnog matriksa u sinovijalnu tekućinu, što posljedično izaziva daljnje upalne i degenerativne promjene zglobova i dovodi do razvoja osteoartritisa^{17,18}. Oštećenja zglobne hrskavice su karakterizirana ili primarnim promjenama molekularnog sastava međustanične tvari (proteoglikana), kao što je to slučaj u mehanički izazvanom osteoartritisu ili oštećenjem tkivne i stanične arhitekture koje dovode do njegov ubrzanog propadanja, kao što je to slučaj u degenerativnom osteoartritisu. Najčešće različiti štetni utjecaji prvo dovode do lokalnih promjena u smislu gubitka proteoglikanskog sadržaja i razaranja strukture kolagene mreže međustanične tvari, nakon kojih slijede stanične promjene i gu-

bitak hondrocita. Iako je isprva metabolička aktivnost hondrocita pojačana, postupno dolazi do metaboličkih promjena kod kojih katabolički procesi dominiraju nad anaboličkim te se proteoglikanska sinteza progresivno smanjuje i dovodi do dugotrajnije promjene molekularnog sastava međustanične tvari. Sve to vodi daljnjem oštećenju tkiva i konačnom poremećaju tkivne homeostaze s propadanjem funkcije zglobne hrskavice^{19,20}. Oštećenja zglobne hrskavice napreduju najčešće od površnih prema dubokim slojevima te u ko-

Osnovni cilj regenerativne medicine i tkivnog inženjeringa potpuna je struktura i funkcionalna regeneracija zglobne hrskavice. Primjenom različitih znanstvenih disciplina istražuju se nove metode liječenja oštećenja zglobne hrskavice koje se baziraju na interakciji triju osnovnih elemenata ključnih za održavanja homeostaze potpornih tkiva: stanica, matriksa i signalnih bioloških molekula.

načnici dovode do potpunog razaranja zglobne hrskavice i ogoljavanja subhondralne kosti, sržnih prostora i krvnih žila. Uključivanjem krvnih žila i krvnog koaguluma može dovesti do spontane regeneracije zglobne hrskavice, budući krvlju u defekt dospijevaju prije svega matične krvne stanice i veća količina različitih faktora rasta. Temeljem ovih saznanja moguće je u terapijske svrhe izvesti ogoljavanje i penetraciju subhondralne kosti s izazivanjem krvarenja, što se uspješno koristi u Pridievoj kirurškoj tehnici bušenja (engl. *Pridie drilling*)²¹ i Steadmanovoj tehnici mikrofraktura (engl. *Steadman microfracture technique*)^{22,23}, no koristi se isključivo za tretiranje manjih oštećenja zglobne hrskavice.

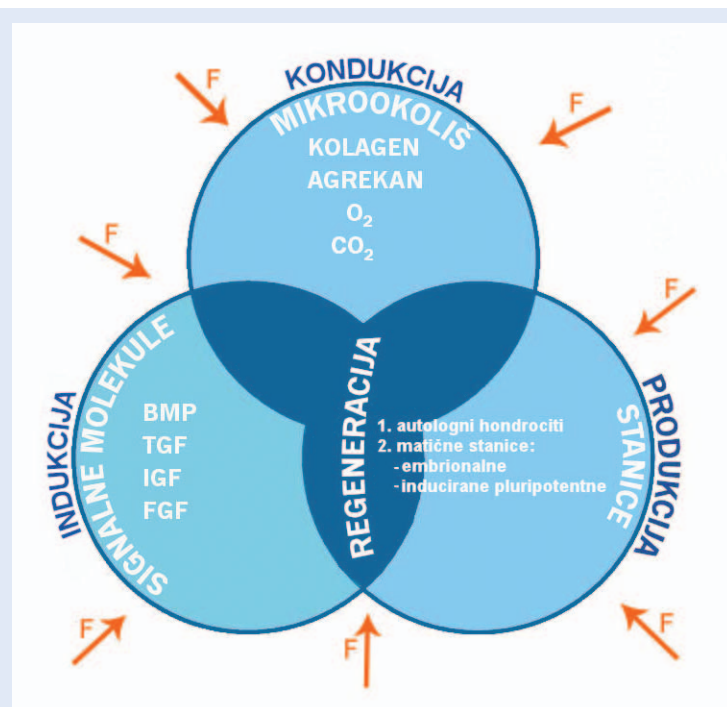
POTICANJE CIJELJENJA I REGENERACIJE ZGLOBNE HRSKAVICE

Posljednjih godina učinjeni su značajni pomaci u razumijevanju mehanizama održavanja integriteta potpornih tkiva i organa lokomotornog sustava. Također se zna da su u regeneraciju uključeni isti molekularni i stanični mehanizmi morfogeneze koji se odvijaju prilikom embriogeneze. Tri su temeljna principa morfogeneze, održavanja homeostaze i regeneracije potpornih tkiva, pa tako i

zglobne hrskavice: indukcija, kondukcija i produkcija²⁴. Regenerativni „trijasa“, kako ga nazivaju, prikazan je shematski na slici 2. Glavni induktivni element predstavljaju molekularni morfogeni signali međustaničnog okoliša koji djelujući autokrino/parakrino pokreću i potiču odvijanje određenih staničnih procesa u cilju stvaranja određene vrste tkiva. Stanice su glavni produktivni element i svojom aktivnošću proliferiraju, diferenciraju se u određeni stanični fenotip te stvaraju određene komponente međustanične tvari. Konduktivno djelovanje, odnosno prostorno vođenje određenog morfogenetskog procesa također je važno jer omogućuje i stanicama i morfogenim signalima usmjereno djelovanje u određenom pravcu. Dakle, u regeneraciji zglobne hrskavice ključnu ulogu imaju tri osnovna elementa, to su stanice, molekularni morfogeni signali međustaničnog okoliša te nosači. Budući da je glavna funkcija zglobne hrskavice biomehanička, mnogi autori se slažu i ističu također i važnost mehaničke sile kao četvrtog važnog elementa regeneracije zglobne hrskavice²⁵.

Stanice su ključni element regeneracijskog sustava tkiva te svojom aktivnošću stvaraju, održavaju i obnavljaju strukturu tkiva i aktivni su „produk-

tivni“ element regeneracije. I sama zglobna hrskavica sadrži takve diferencirane stanice koje se mogu koristiti u regenerativne svrhe, mada su njihov broj i količina limitirani. Opće je poznata činjenica da hondrociti zglobne hrskavice imaju slab potencijal proliferacije i mali kapacitet regeneracije. No uzgoj hondrocita u *in vitro* uvjetima omogućuje dobivanje dovoljnog broj funkcionalnih hrskavičnih stanica stabilnog fenotipa koje se mogu koristiti u regeneraciji ugradnjom na mjesto oštećenja zglobne hrskavice. Ova je metoda poznata kao autologna transplantacija hondrocita (engl. *autologous chondrocytes transplantation/implantation*; ATH, ACT/ACI) i prvi su je uveli Lars Peterson i Matts Brittberg²⁶ i do danas je razvijena i poboljšana četvrta generacija ove tehnike. Princip ATH metode je artroskopsko uzimanje biopsije zdrave zglobne hrskavice oboljelog pacijenta, koja se potom u laboratorijskim uvjetima procesuirala s ciljem izolacije i proliferacije hondrocita. Na taj način dobiva se suficijentan broj stanica u suspenziji koje potom na određenom nosaču (najčešće kolagenski nosač u kombinaciji s činiteljima koji potiču hondrogenezu) implantira na mjestu defekta zglobne hrskavice i pokrije prethodno izoliranim periostom. Iako je isprva izgledala obećavajuće, s obzirom na to da ne izaziva imunološku reakciju domaćina i sprječava mogućnost prenošenja infekcija, ova metoda pokazala je određena ograničenja. Naime, prilikom kultiviranja i transplantiranja hondrocita teško je zadržati stabilan diferencirani hondrocitni fenotip, te se u strategiji regeneracije zglobne hrskavice sve više istraživača usmjerava na korištenje stanica egzogenog izvora. Osim toga, iako do 2 godine po implantaciji regenerirana hrskavica pokazuje biljege hijaline hrskavice (kolagen tip II, agrekan, oligomerni proteini hrskavičnog matriksa (engl. *cartilage oligomeric matrix proteins*; COMPs) pojavljuju se i biljezi koji karakteriziraju stvaranje vezivno-hrskavičnog matriksa (kolagen tip I)⁹. S obzirom na to da zreli hondrociti imaju limitirani kapacitet proliferacije i regeneracije, istraživanja su u međuvremenu usmjerena na druge izvore stanica. Prilikom odabira vrste stanica za regeneraciju zglobne hrskavice potrebno je definirati odgovarajuće prekursorske stanice koje u odgovarajućim uvjetima mogu proliferirati i diferencirati se u hondrocite te producirati sastojke



Slika 2. Shematski prikaz interakcije elemenata regenerativnog trijasa.

međustaničnog matriksa. U tijelu postoje brojni izvori takvih stanica, kao što su stanice kambij-skog sloja perihondrija i periosta²⁷, stromalne stanice koštane srži^{28,29}, sinovijalna membrana čahure zgloba^{30,31}. Osim diferenciranih stanica, u regenerativne svrhe mogu se koristiti i mezenhimalne matične stanice (engl. *mesenchymal stem cells*; MSCs) koje su nediferencirane i pluripotentne te u određenim uvjetima i pod utjecajem različitih vanjskih uvjeta mikrookoliša mogu proliferirati i diferencirati u određenu vrstu terminalno diferenciranih stanica potpornog tkiva, pa tako i u hondrocite. Najčešće se eksperimentira s mezenhimalnim matičnim stanicama koštane srži³². Također se potencira upotreba embrionalnih matičnih stanica (engl. *embryonic stem cells*; ESCs) i induciranih pluripotentne matična stanice (engl. *induced pluripotent stem cells*; iPSCs) ali svi etički aspekti njihove primjene još uvijek su predmet rasprava i ograničenja³³.

Drugi važan element regeneracijskog sustava su signalne molekule. To su biološke molekule koje potiču proliferaciju, diferencijaciju, apoptozu te sintetske funkcije stanica. Radi se o malim molekulama staničnog mikrookoliša koje kontroliraju embrionalne i postnatalne procese morfogeneze, a isto tako prilikom oštećenja tkiva i organa aktiviraju se i kontroliraju stanične procese regeneracije. Budući da su signalne molekule bioinduktivni signali, one specifično vode tijekom regeneracije u željenom smjeru, stoga strategija tkivnog inženjstva u regeneraciji zglobne hrskavice uključuje primjenu određenih činitelja rasta, u kombinaciji s određenim tipom stanica ili nosača, koji će specifično usmjeravati tijek regeneracije u smjeru razvoja hijaline hrskavice³⁴⁻³⁶. Brojnim istraživanjima utvrđena je učinkovitost niza činitelja rasta u poticanju diferencijacije hondrocitnog fenotipa, hondogeneze i regeneracije zglobne hrskavice³⁷⁻³⁹. Poznat je čitav niz činitelja rasta koji su uključeni u proliferaciju i diferencijaciju kao i regulaciju sinteze međustaničnog matriksa u hondrocita. Najveći broj eksperimentalnih istraživanja usmjeren je na istraživanje aktivnost članova nadobitelji transformirajućeg činitelja rasta tipa β (engl. *transforming growth factor* β ; TGF β), obitelji koštanih morfogenetskih proteina (engl. *bone morphogenetic proteins*; BMP), činitelja rasta fibroblasta (engl. *basic fibroblast growth fac-*

tor; bFGF), inzulinu sličan činitelj rasta tip I (engl. *insulin like growth factor type I*; IGF-I) te trombocitni činitelj rasta (engl. *platelet derived growth factor*; PDGF) kombiniranih u različitim odnosima s članovima TGF β nadobitelji činitelja rasta. Za članove TGF β nadobitelji dobro je poznato da potiču sintezu kolagena tip II i proteoglikana, mada neki članovi ove obitelji mogu čak izazvati dediferencijaciju hondrocita u eksperimentalnim uvjetima. Isto tako pokazano je da TGF β -1 i TGF β -2 pojedinačno ne mogu inducirati sintezu za hijali-

Moderni trendovi tkivnog inženjstva usmjereni su prema stvaranju konstrukta koji će sadržavati sva tri elementa regenerativnog trijasa: nosač koji ima konduktivno djelovanje, signalnu molekulu koja ima induktivno djelovanje te stanice koje su produktivni elementi regeneracije. Cilj ovih metoda je sinergističko djelovanje svih triju elemenata regenerativnog trijasa u svrhu potpune morfološke i funkcionalne regeneracije zglobne hrskavice.

nu hrskavicu specifičnih komponenti međustaničnog matriksa te se stoga samo nekoliko kombinacija TGF β s određenim nosačima i stanicama koriste u *in vitro* uvjetima za kultiviranje hrskavice. Članovi BMP obitelji činitelja rasta, naročito BMP -4, -6 i -7 uspješnije su korišteni u eksperimentalnim istraživanjima kao bioaktivne induktivne signalne molekule u regeneraciji hrskavice. Ovi članovi BMP obitelji pokazuju hondrogeni efekt i povećavaju sintezu kolagena tip II te proteoglikana. Za BMP-2 utvrđeno je da sprječava dediferencijaciju hondrocita *in vitro*, inducira razvoj hondrocitnog fenotipa potičući sintezu kolagena tipa II B, mada dugoročno izaziva povišenje matriks metaloproteinaza (engl. *matrix metalloproteinase*; MMP), kolagena tip I i osteopontina što dovodi do hipertrofije hondrocita i indukcije morfogeneze koštanog tkiva. BMP-2 i BMP-7 proizvode se danas rekombinantnom DNK tehnologijom i dozvoljeno je njihovo korištenje u kliničke svrhe, međutim uglavnom se koriste u regeneraciji koštanog tkiva. Istraživanja na *in vitro* modelima koristila su različite kombinacije signalnih molekula i ostalih elemenata regeneracijskog trijasa zglobne hrskavice; kao što su; kolagen / stromalne sta-

nice koštane srži / TGF β 1^{40,41}, agaroz / hondrociti / FGF-2⁴², fibrin / hondrociti / IGF -1^{43,44}, polilaktat / stanice perihondrija / TGF β 1⁴⁵. Unatoč dokazanom utjecaju činitelja rasta na *in vitro* hondrogenezu, naročito TGF β i BMP, terapijska primjena ovih činitelja, *in vivo*, nije potpuno uspješna zbog kratkog poluvremena života ovih molekula, što zahtijeva daljnja istraživanja, naročito različitih materijala nosača koji će osigurati postupno otpuštanje ovih molekula u terapijskim dozama i kroz određeno vrijeme u kojemu se odvija regeneracija zglobne hrskavice. U svakom slučaju, sve bolje poznavanje signalnih molekularnih signala koji reguliraju metabolizam zglobne hrskavice u fiziološkim i patološkim stanjima doveo je do ključnih saznanja neophodnih za razvoj učinkovitije strategije u cilju bolje regeneracije zglobne hrskavice⁴⁶. Novootkrivena bioaktivna molekula nazvana kartogenin (KGN) privlači sve veću pažnju istraživača koji se bave regeneracijom zglobne hrskavice⁴⁷. Utvrđeno je da ova molekula pospješuje diferencijaciju hondrocita u primarnim kulturama humanih mezenhimalnih matičnih stanica, isto tako potiče ekspresiju za hondrogenezu tipičnih gena, potiče proliferaciju i stvaranje hrskavičnih nakupina u kulturi te potiče hondrocinu funkciju u sintezi i izlučivanju komponenti međustanične tvari. Injiciran intraartikularno na mišjem modelu osteoartritisa, potiče regeneraciju zglobne hrskavice unutar samo nekoliko tjedana.

Nosači (engl. *matrix scaffolds*) su različiti materijali koji se koriste u tkivnom inženjerstvu i tijekom regeneracije tkiva i organa djeluju konduktivno i u slučaju regeneracije zglobne hrskavice hondroinduktivno⁴⁸. Kondukcija je sposobnost određenog materijala da omogući pričvršćivanje staničnih elemenata ili bioaktivnih molekula te omogući njihovo djelovanje tijekom regeneracije. Nosač omogućuje prostorni razmještaj staničnih elemenata i njihovu aktivnost u produkciji komponenti međustanične tvari. Nosači se postupno potpuno razgrađuju i služe samo kao privremena trodimenzionalna rešetka koja se na kraju potpuno zamjenjuje novostvorenim tkivnim matriksom. Da bi određena vrsta nosača imala dobru konduktivnost, geometrijska konfiguracija materijala mora osiguravati određenu poroznost te tako osiguravati migraciju stanica, uraštanje krv-

nih i limfnih žila te difuziju tkivne tekućine. Također nosač mora imati određene biomehaničke osobine u smislu čvrstoće i elastičnosti da se tijekom primjene može oduprijeti statičkim i dinamičkim deformacijama bez oštećenja i gubitka mase. Osim toga, nosač mora biti biokompatibilan i netoksičan kako bi se minimalizirale mogućnosti izazivanja imunološkog odgovora, a isto tako kako bi omogućio dobar kontakt i integracija sa susjednim tkivom. Nosač mora biti biorazgradiv, odnosno mora se postupno i kontrolirano razgrađivati simultano s procesom staničnog i tkivnog urastanja. Mora imati dobru adhezivnost za stanice i bioaktivne molekule te ih mora postupno otpuštati u okoliš⁹. Istraživana je sposobnost poticanja cijeljenja i pospješivanja regeneracije zglobne hrskavice velikog broja različitih prirodnih biomaterijala proteinskog (kolageni, fibrinski, gelatinski), karbohidratnog sadržaja (hijaluronska kiselina, agaroz, alginat, kitozan, polilaktična i poliglukolna kiselina, celuloza, dekstrani) i biopolimera (polihidroksialkanoati – PHA, polihidroksibutirati – PHB) te sintetskih biopolimeranih nosača (dakron, teflon, karbonska vlakna, polietilenmetakrilat, hidroksiapatit) i njihovih kombinacija²⁰. Utvrđeno je da u eksperimentalnim uvjetima i sam za sebe nosač ima sposobnost pospješivanja i održavanja spontane regeneracije manjih oštećenja zglobne hrskavice. U novije vrijeme su konstruirani i bifazični nosači, naročito za potrebe regeneracije osteohondralnih defekata zglobne hrskavice. Bifazični nosači sastoje se od dvaju različitih materijala: jednog koji je dokazano konduktivan u procesu hondrogeneze i drugog koji istu sposobnost posjeduje u procesu osteogeneze, što je naročito važno za regeneraciju osteohondralnog spoja kao cjeline. Svaki od biomaterijala koji se mogu koristiti kao konduktivni nosači u regeneraciji zglobne hrskavice imaju svoje prednosti i nedostatke te ne postoji optimalan nosač koji se može preporučiti kao standard. I dalje se traže bolja rješenja te su istraživanja usmjerena na kombiniranje različitih prirodnih i sintetskih materijala te izrade multifazičnih nosača koji imaju slojevitost strukturu i omogućavaju tijekom regeneracije migraciju, adheziju, proliferaciju i diferencijaciju stanica po zonama ili slojevima što usmjerava razvoj novostvorene hrskavice u slojevima koji nalikuju normalnoj građi zglobne hrskavice.

vice. Najveći problem u razvoju novih biomaterijala i nosača i dalje ostaje problem slabe integracije sa susjednim tkivom zglobne hrskavice, unatoč sidrenju implantiranog materijala pomoću različitih fibrinskih ljepila. Unatoč bitnom napretku u razvoju biomaterijala i dalje se traga za idealnim materijalom nosača koji će svojim sastavom, fizičko-kemijskim osobitostima, trodimenzionalnom strukturom i biomehaničkim svojstvima optimalno podržavati hondrogenezu, odnosno regeneraciju zglobne hrskavice.

Moderni trendovi tkivnog inženjerstva usmjereni su prema stvaranju konstrukta koji neće sadržavati samo jedan element; konduktivni nosač, induktivnu signalnu molekulu ili produktivne stanice, već će sadržavati sva tri spomenuta regenerativna elementa koji će sinergistički voditi regeneraciju u željenom smjeru. Stoga se u istraživanjima regeneracije zglobne hrskavice koriste različite kombinacije prethodno opisanih elemenata regenerativnog trijasa²⁰.

Naime, tri su moguća temeljna pristupa u primjeni tkivnog inženjerstva u regeneraciji zglobne hrskavice. Prva je mogućnost u potpunosti proizvesti regeneracijsko tkivo *in vitro* te potom potpuno razvijen tkivni konstrukt ugraditi na mjesto defekta zglobne hrskavice. Prednost ovakvog *in vitro* pristupa je mogućnost potpune kontrole staničnog metabolizma, proliferacije i diferencijacije, ali postoje problemi vezani uz integraciju tkivnog konstrukta ili njegovu fiksaciju na potrebnom mjestu. Drugi mogući pristup, koji je prihvatljiviji među istraživačima, je konstrukcija usatka koji se sastoji od nosača, homogene populacije stanica i signalnih bioinduktivnih molekula vezanih za određeni nosač tako da se kontrolirano ispušta i dugotrajno djeluje na mjestu ugradnje te podržava staničnu aktivnost u regeneraciji. Po ugradnji na mjesto defekta zglobne hrskavice usadak je podvrgnut i mehaničkim silama koje djeluju na zglob, odnosno zglobnu hrskavicu te se regeneracija odvija u gotovo fiziološkim uvjetima, što je dodatno pospješuje. Regeneracijsko tkivo time se bolje inkorporira na mjestu ugradnje s okolnim zdravim tkivom te se postiže funkcionalna regeneracija. Treći pristup u poticanju regeneracije je direktna ugradnja faktora rasta uklopljena s nosačem u mjesto defekta što potiče direktnu staničnu regeneraciju *in situ*, odnosno potiče unutarnji

kapacitet regeneracije koju hondrociti zglobne hrskavice imaju.

S obzirom na to da mnogi čimbenici imaju važnu ulogu u rastu, razvoju, održavanju i regeneraciji zglobne hrskavice, te s obzirom na njene specifične strukturne, metaboličke i funkcionalne osobitosti, još uvijek nije dizajniran optimalan regenerativni konstrukt koji bi u potpunosti zadovoljavao kriterije potpune strukturalne i funkcionalne regeneracije zglobne hrskavice⁴⁹. Ipak, sve brži napredak stanične i molekularne biologije te tkivnog inženjerstva nezaustavljivo vodi u smjeru razvoja novog koncepta liječenja ozljeda, degeneracija i upala zglobova i oštećenja zglobne hrskavice.

Izjava o sukobu interesa: Autori izjavljuju da ne postoji sukob interesa.

LITERATURA

1. Ye K, Felimban R, Moulton SE, Wallace GG, Di Bella C, Traianedes K et al. Bioengineering of articular cartilage: past, present and future. *Regen Med* 2013;8:333-49.
2. Reddi AH. Symbiosis of biotechnology and biomaterials: applications in tissue engineering of bone and cartilage. *J Cell Biochem* 1994;56:192-5.
3. Buckwalter J, Hunziker E, Rosenberg L, Coutts R, Adams M, Eyre D. Articular cartilage: composition and structure. *In: Woo SLY, Buckwalter JA (eds). Injury and Repair of the Musculoskeletal Soft Tissues.* Park Ridge, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1988: 405-25.
4. Buckwalter J, Mankin HJ. Articular cartilage. I: Tissue design and chondrocyte-matrix interaction. *J Bone Joint Surg* 1997;79A:600-11.
5. Hunziker EB, Quinn TM, Hauselmann HJ. Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10:564-72.
6. Cormack DH. Dense connective tissue, cartilage, bone and joints. *In: Introduction to histology.* Philadelphia, Pennsylvania: JB Lippincott Co., 1984;157-97.
7. Kuettner KE, Aydelotte MB, Thonar EJ. Articular cartilage matrix and structure: a minireview. *J Rheumatol Suppl* 1991;27:46-8.
8. Heinegård D. Proteoglycans and more—from molecules to biology. *Int J Exp Pathol* 2009;90:575-86.
9. Demoor M, Ollitrault D, Gomez-Leduc T, Bouyoucef M, Hervieu M, Fabre H et al. Cartilage tissue engineering: molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction. *Biochim Biophys Acta* 2014;1840:2414-40.
10. Castañeda S, Roman-Blas JA, Largo R, Herrero-Beaumont G. Subchondralbone as a key target for osteoarthritis treatment. *Biochem Pharmacol* 2012;83:315-23.
11. Sharma AR, Jagga S, Lee SS, Nam JS. Interplay between cartilage and subchondral bone contributing to pathogenesis of osteoarthritis. *Int J Mol Sci* 2013;14:19805-30.

12. Carey-Beth J, Uhl TL. A Review of articular cartilage pathology and the use of glucosamine sulfate. *J Athlet Tra-in* 2001;36:413-9.
13. Buckwalter JA, Makin HJ. Articular cartilage. 2.: Dege-neration and osteoarthritis, repair, regeneration and transplantation. *J Bone Joint Surg* 1997;79A:612-23.
14. Pritzker KPH, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier J.-P., Revell PA et al. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage* 2006;14:13-29.
15. Newman A. Articular cartilage repair. *Am J Sport Med* 1998;26:309-24.
16. Hunziker EB, Rosenberg LC. Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Joint Surg* 1996;78A:721-33.
17. Simon L. Osteoarthritis: a review. *Clin Cornerstone* 1999;2:26-37.
18. Goldring MB. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:1916-26.
19. Buckwalter JA, Makin HJ. Articular cartilage. 2.: Dege-neration and osteoarthritis, repair, regeneration and transplantation. *J Bone Joint Surg* 1997;79A:612-23.
20. Hunziker EB. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of current status and prospect. *Osteoarthritis Cartilage* 2001;10:432-63.
21. Müller B, Kohn D. Indication for and performance of ar-ticular cartilage drilling using the Pridie method. *Ortho-pade* 1999;28:4-10.
22. Steadman JR, Briggs KK, Matheny LM, Guillet A, Hanson CM, Willimon SC. Outcomes following microfracture of full-thickness articular cartilage lesions of the knee in adolescent patients. *J Knee Surg* 2015;28:145-50.
23. Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK. Microfracture to treat full-thickness chondral defects: surgical tech-nique, rehabilitation, and outcomes. *J Knee Surg* 2002; 5:170-6.
24. Evans CH. Advances in regenerative orthopaedics. *Mayo Clin Proc* 2013;88:1323-39.
25. Salter RB. The physiologic basis of continuous passive motion for articular cartilage healing and regeneration. *Hand Clin* 1994;10:211-9.
26. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson A, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defect of the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994;331:889-95.
27. Ito Y, Fitzsimmons JS, Sanyal A, Mello MA, Mukherjee N, O'Driscoll SW. Localization of chondrocyte precursors in periosteum. *Osteoarthritis Cartilage* 2001;9:215-23.
28. Owen M. Marrow stromalstem cells. *J Cell Sci* 1988;10: 63-76.
29. Owen M, Friedenstein AJ. Stromalstem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp* 1988;136:42-60.
30. Pacifici M, Koyama E, Iwamoto M, Gentili C. Develop-ment of articular cartilage: what do we know about it and how may it occur? *Connect Tissue Res* 2000;41: 175-84.
31. Bandara G, Georgescu HI, Lin CW, Evans CH. Synovial activation of chondrocytes: evidence for complex cyto-kine interactions. *Agents Actions* 1991;34:285-8.
32. Steinert AF, Rackwitz L, Gilbert F, Nöth U, Tuan RS. Con-cise review: the clinical application of mesenchymal stem cells for musculoskeletal regeneration: current status and perspectives. *Stem Cells Transl Med* 2012;1: 237-47.
33. Lach M, Trzeciak T, Richter M, Pawlicz J, Suchorska WM. Directed differentiation of induced pluripotent stem ce-lls into chondrogenic lineages for articular cartilage tre-atment. *J Tissue Eng* 2014;30:1-9.
34. Reddi AH. Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells, and bi-omimetic biomaterials. *J Tissue Eng* 2000;6:351-9.
35. Reddi AH. Cartilage morphogenetic proteins: the role in joint development, homeostasis, and regeneration. *Ann Rheum Dis* 2003;62:73-8.
36. van der Kraan PM, Buma P, van Kuppevelt T, van den Berg WB. Interaction of chondrocytes, extracellular ma-trix and growth factors: relevance for articular cartilage tissue engineering. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10: 631-7.
37. Glowacki J. In vitro engineering of cartilage. *J Rehabil Res Dev* 2000;37:171-7.
38. Reddi AH. Cartilage-derived morphogenetic proteins and cartilage morphogenesis. *Microsc Res Tech* 1998;43: 131-6.
39. Reddi AH. Role of morphogenetic proteins in skeletal tis-sue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol* 1998; 16:247-52.
40. Andrades JA, Han B, Becerra J, Sorgente N, Hall FL, Ni-mni ME. A recombinant human TGF-beta1 fusion prote-in with collagen-binding domain promotes migration, growth, and differentiation of bone marrow mesenchy-mal cells. *Exp Cell Res* 1999;250:485-98.
41. Angele P, Kujat R, Nerlich M, Yoo J, Goldberg V, Johnsto-ne B. Engineering of osteochondral tissue with bone marrow mesenchymal progenitor cells in a derivatized hyaluronan-gelatin composite sponge. *Tissue Eng* 1999; 5:545-54.
42. Weisser J, Rahfoth B, Timmermann A, Aigner T, Bräuer R, von der Mark K. Role of growth factors in rabbit arti-cular cartilage repair by chondrocytes in agarose. *Osteo-arthritis Cartilage* 2001;9:S48-54.
43. Fortier LA, Lust G, Mohammed HO, Nixon AJ. Coordina-te upregulation of cartilage matrix synthesis in fibrin cultures supplemented with exogenous insulin-like growth factor-I. *J Orthop Res* 1999;17:467-74.
44. Nixon AJ, Fortier LA, Williams J, Mohammed H. Enhan-ced repair of extensive articular defects by insulin-like growth factor-I-laden fibrin composites. *J Orthop Res* 1999;17:475-87.
45. Fortier LA, Nixon AJ, Mohammed HO, Lust G. Altered bio-logical activity of equine chondrocytes cultured in a three-dimensional fibrin matrix and supplemented with transforming growth factor beta-1. *Am J Vet Res* 1997;58: 66-70.
46. Mariani E, Pulsatelli L, Facchini A. Signaling pathways in cartilage repair. *Int J Mol Sci* 2014;15:8667-98.
47. Johnson K, Zhu S, Tremblay MS. A stem cell-based appro-ach to cartilage repair. *Science* 2012;336:717-21.
48. Jackson DW, Simon TM. Tissue engineering principles in orthopaedic surgery. *Clin Orthop Relat Res* 1999;367: S31-45.
49. Ivkovic A, Marijanović I, Hudetz D, Porter RM, Pecina M, Evans CH. Regenerative medicine and tissue enginee-ring in orthopaedic surgery. *Front Biosc* 2011;3:923-44.