
BST-CarGel poprawia wyniki leczenia za pomocą stymulacji szpiku kostnego

9

Alberto Restrepo, Stephane Methot,
William D. Stanish, and Matthew S. Shive

Spis treści

9.1	Wprowadzenie	1
9.2	BST-CarGel® Informacje ogólne	2
9.2.1	Produkt	2
9.2.2	Podstawowy mechanizm działania.....	2
9.3	Zastosowanie BST-CarGel®	5
9.3.1	Wskazania/przeciwdziałania	5
9.3.2	Leczenie wspomagające	6
9.3.3	Technika chirurgiczna	6
9.3.4	Potencjalne komplikacje i rowiązywanie problemów	9
9.4	Rehabilitacja BST-CarGel®.....	10
9.5	Doświadczenie kliniczne w stosowaniu preparatu BST-CarGel®	11
9.5.1	Badania pilotażowe	11
9.5.2	Randomizowane badanie kliniczne BST-CarGel®.....	11
Bibliografia.....		Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.

9.1 Wprowadzenie

Techniki stymulacji szpiku kostnego, takie jak artroplastyka abrazyjna [1], nawiercanie Pridie'go [2] i metoda mikroślamań [3] opierają się na naturalnej reakcji naprawczej w miejscu zranienia, wywołanej przez wytworzoną przez szpik kostny skrzeplinę. Kanały wywiercone operacyjnie w kości podchrzęstnej poniżej uszkodzenia chrząstki otwierają dostęp do szpiku i elementów krwi, w tym komórek macierzystych, tworząc środowisko odpowiednie do gojenia się rany, co ostatecznie prowadzi do regeneracji chrząstki. Metoda mikroślamań, która jest często stosowana jako leczenie pierwszego wyboru w przypadku niewielkich zmian patologicznych chrząstki, ma tę zaletę, że jest prosta, bezpieczna i ekonomiczna, a ponadto w mniej skomplikowanych przypadkach jej inwazyjność jest minimalna [4, 5]. Z drugiej strony procedura ta prowadzi do powstania niejednorodnej tkanki regeneracyjnej, przede wszystkim o strukturze włóknistej lub chrząstkowo-włóknistej [6-10], o niskim poziomie kolagenu typu II i glikozaminoglikanu (GAG) oraz o słabych właściwościach mechanicznych w porównaniu do macierzystej chrząstki hialinowej. W istocie trwałość tej tkanki naprawczej zakwestionowało wielu autorów, opisujących uszkodzenie tkanki regeneracyjnej i powrót związanych z tym objawów klinicznych, które rozpoczynały się już w ciągu 24 miesięcy po zakończeniu leczenia [8, 11, 12].

W celu ukierunkowania oraz wzmocnienia procesów regeneracji chrząstki, zachodzących pod wpływem stymulacji szpiku kostnego tak, aby uzyskać tkankę zbliżoną do hialiny, zabiegi chirurgiczne łączy się z aplikacją materiałów o strukturze rusztowania i/lub czynników wzrostu lub innych materiałów biologicznych [13]. Tak zwane ulepszone techniki stymulacji szpiku kostnego mogą potencjalnie zniwelować główne wady tej metody, czyli złą jakość i nietrwałość nowej tkanki, a jednocześnie są bezpieczne i opłacalne, gdyż opierają się na jednorazowym zabiegu chirurgicznym o minimalnym stopniu inwazyjności.

[AU1] A. Restrepo, MD (✉) • S. Methot, PhD

[AU2] W.D. Stanish, MD • M.S. Shive, PhD

9.2 BST-CarGel® Informacje ogólne

9.2.1 Produkt

BST-CarGel® (Piramal Healthcare (Kanada) Ltd.) jest nowym, płynnym materiałem o strukturze rusztowania, który został opracowany w celu fizycznego ustabilizowania skrzepu krwi w obrębie uszkodzenia chrząstki po jednorazowej procedurze stymulacji szpiku kostnego, inicjującej proces tworzenia chrząstki hialinowej. Struktura produktu BST-CarGel® oparta jest na opatentowanej technologii platformy termożelowej [14]. BST-CarGel® jest roztworem fizjologicznym (pod względem pH i osmolarności) zawierającym chitozan, bufor zwany p-glicerofosforanem (P-GP) oraz kwas chlorowodorowy (HCl). Naturalny biopolimeryczny chitozan jest liniowym, kationowym polisacharydem składającym się z D-glukozaminy i N-acetylo-D-glukozaminy i był intensywnie badany pod kątem możliwości wykorzystania go w medycynie regeneracyjnej i innych zastosowaniach biotechnologicznych [15-18] ze względu na pożądane cechy, takie jak biodegradowalność, biokompatybilność i mukoadhezyjność.

Ryc. 9.1 Opakowanie produktu BST-CarGel®. BST-CarGel® jest dwuczęściowym zestawem składającym się z fiolki do mieszania *Mixing Vial* (MIX, czerwona nakrętka) i fiolki z substancją dodatkową (ADD, niebieska nakrętka) *Additive Vial*. Fiolka do mieszania zawiera roztwór chitozanu i kulki ze stali nierdzewnej, ułatwiające mieszanie z pełną krwią, podczas gdy fiolka z substancją dodatkową zawiera roztwór buforowy P-glicerofosforanu.



BST-CarGel® jest wszczepialnym materiałem medycznym o ciekłym stanie skupienia w temperaturze pokojowej, który zmieszany ze świeżą autologiczną krwią pełną (w proporcji BST-CarGel® /mieszanka krwi 1 : 3) dostarczany jest chirurgicznie do uszkodzonej chrząstki, przygotowanej wcześniej przez odsłonięcie i stymulację szpiku kostnego. Produkt BST-CarGel® jest pakowany jako dwuczęściowy zestaw, składający się z fiolki do mieszania (*Mixing Vial*) (czerwona nakrętka) i fiolki z substancją dodatkową [AU3] (*Additive Vial*) (niebieska nakrętka) (Ryc. 9.1). Fiolka do mieszania zawiera roztwór chitozanu i ziarna ze stali nierdzewnej, ułatwiające mieszanie z krwią pełną, podczas gdy fiolka z substancją dodatkową zawiera roztwór p-GP. Końcowy produkt BST-CarGel® uzyskuje się przez połączenie obu roztworów tuż przed dodaniem świeżej autologicznej pełnej krwi. Po dodaniu pełnej krwi, BST-CarGel® jest gotowy do aplikacji do uszkodzonej chrząstki, gdzie BST-CarGel® pozwala na naturalne krzepnięcie krwi i tworzenie skrzepu hybrydowego *in situ* pod postacią trójwymiarowego rusztowania, wspierającego elementy krwi w otworach szpiku podczas procesu naprawczego.

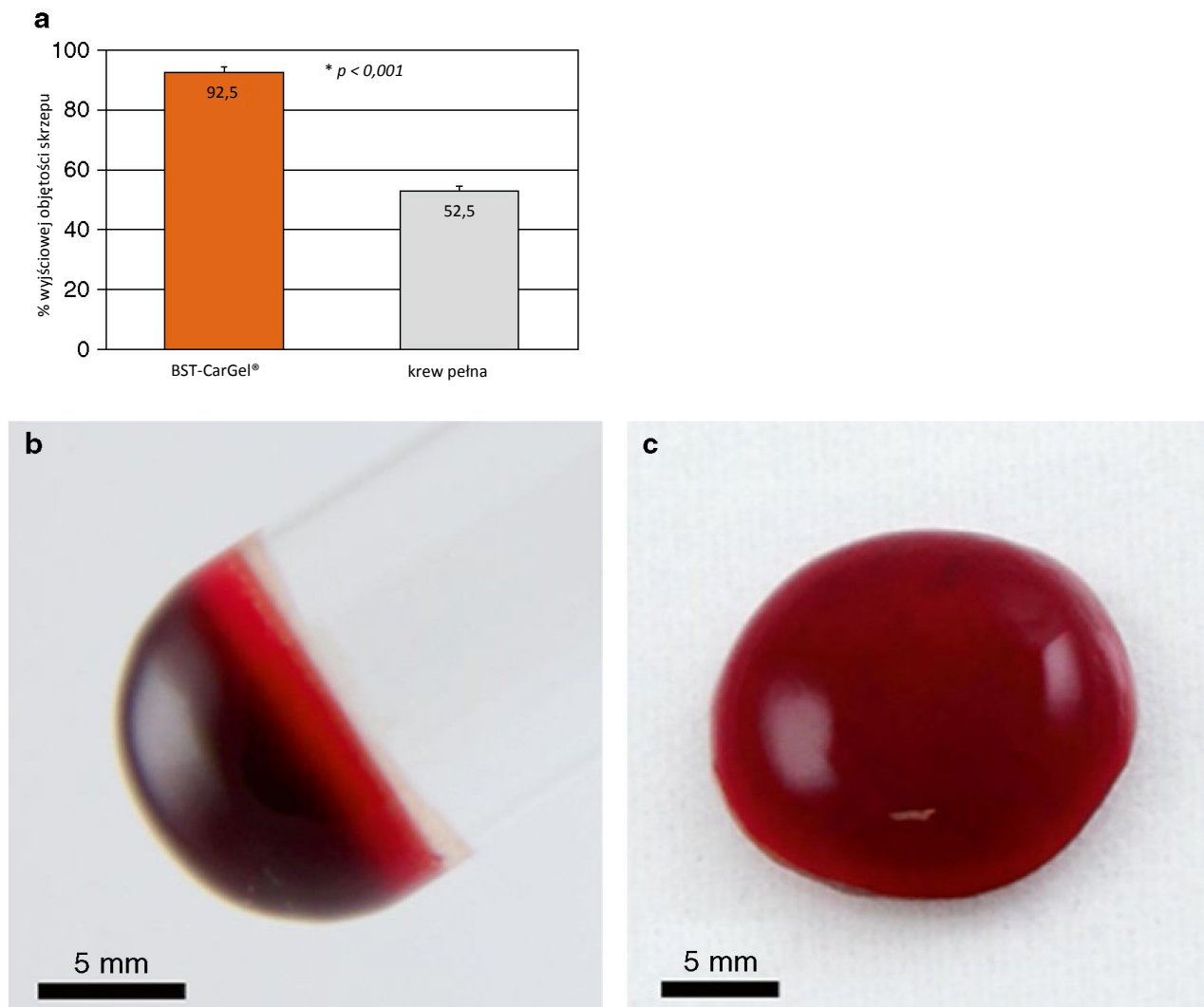
9.2.2 Podstawowy mechanizm działania

Czynniki wewnętrzne (rodzaj, lokalizacja, wielkość i głębokość uszkodzenia) oraz zewnętrzne (technika chirurgiczna, rehabilitacja pooperacyjna) mają istotne znaczenie dla procedury stymulacji szpiku kostnego w procesie leczenia uszkodzeń chrząstki.

Optymalizacja własności skrzepu krwi wytworzonego przez szpik kostny (objętość, adhezyjność i stabilność) oraz jego właściwe usytuowanie w obrębie uszkodzenia chrząstki są kluczowe dla utrzymania najważniejszych składników krwi w kanale szpiku kostnego i uruchomienia procesu naprawczego. Utrata objętości skrzepu, powstałego w wyniku zabiegu stymulacji szpiku kostnego, spowodowana obkurczeniem, może wynosić nawet 50% [19], co skutkuje gorszą odpowiedzią na leczenie, w tym niekompletnym wypełnieniem uszkodzenia,

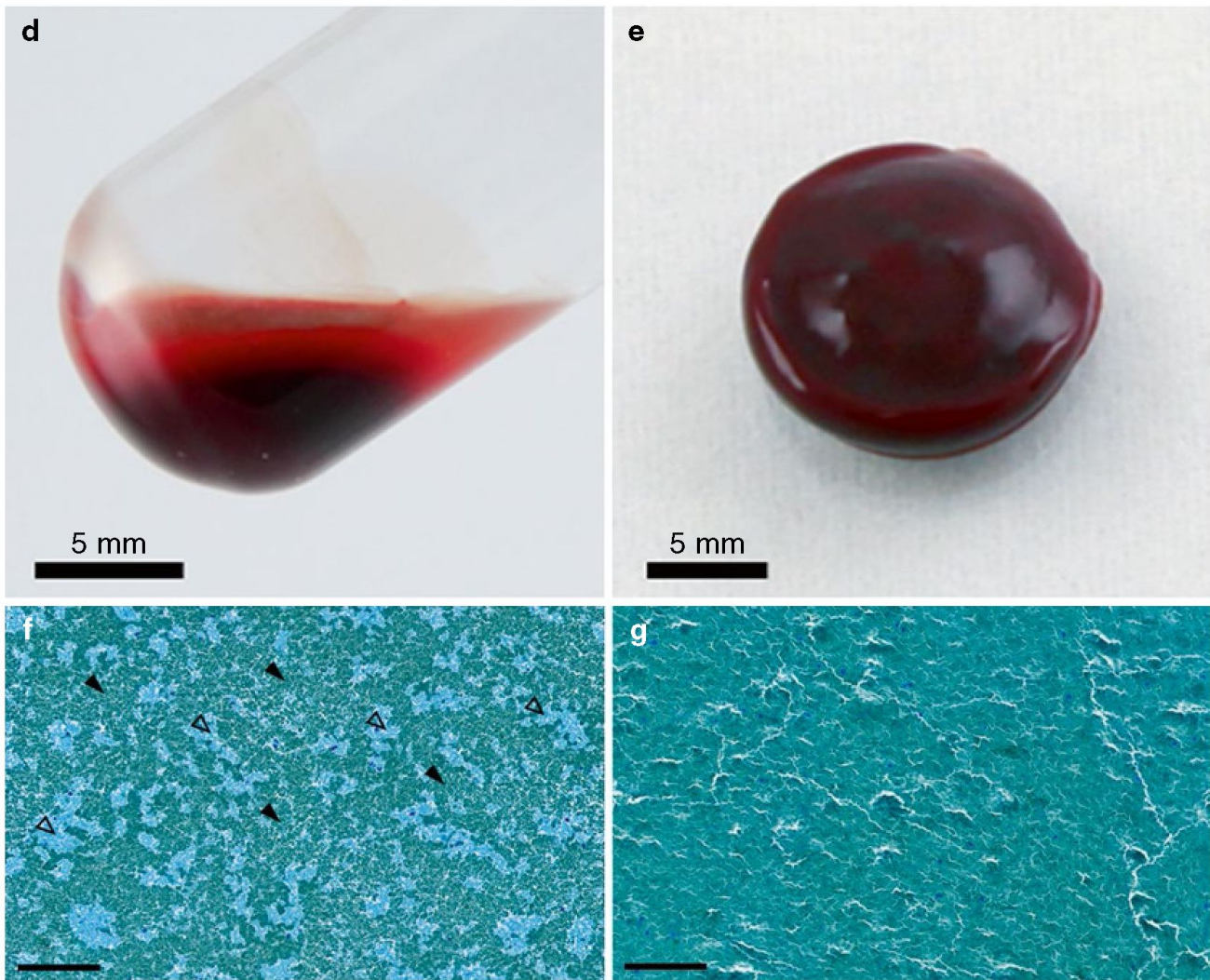
gorszą jakością tkanki oraz brakiem integracji zregenerowanej tkanki z naturalną chrząstką.

Z drugiej strony mieszanina BST-CarGel® ze świeżą, autologiczną krwią pełną umożliwia powstawanie skrzepów w naturalny sposób [20], ale hamuje obkurczanie rusztowania fibrynowego [19], zapewniając w ten sposób więcej przestrzeni do wypełnienia przez tymczasową macierz (rys. 9.2).



Ryc. 9.2 Obkurczenie się skrzepu krwi i histologia. (a) Obkurczanie skrzepu po 60 minutach w temperaturze 37°C obliczano na podstawie ciężaru skrzepu uzyskanego przed i po usunięciu wydzielonego osocza (n = 25). BST-CarGel® znacząco hamuje obkurczanie się skrzepu (92,5% objętości wyjściowej) w porównaniu do pełnej krwi (52,5%). (b) BST-CarGel®/skrzep krwi w szklanej próbówce i (c) w szalce Petriego, demonstrujący jasno czerwony kolor, stosunkowo niewielki wysięk osocza i minimalne obkurczenie. d) Skrzep pełnej krwi w szklanej próbówce i (e) szalce Petriego o ciemniejszej czerwieni (ze względu na gęsto upakowane erytrocyty), wysięk w osoczu i znaczne obkurczenie. f) Histologia BST-CarGel® /skrzep krwi

(wybarwienie błękitem toluidyny). Chitozan (*jasnoniebieski, puste strzałki*) jest jednorodnie rozproszony w erytrocytach (*zielony; czarne strzałki*), a białe krwinki (*granat*) są skokolizowane z chitozaniem. BST-CarGel®/skrzep krwi mają mniejszą gęstość (mniejsze obkurczenie) w porównaniu do skrzepu pełnej krwi i nie są zanieczyszczone artefaktami pod postacią pęknięć, wynikających z obróbki histologicznej (bardziej stabilny skrzep). (g) histologia całego skrzepu krwi (barwienie niebieskie, toluidyna) pokazujące gęsto upakowane erytrocyty (znaczne obkurczenie) i artefakty pod postacią pęknięć (delikatny skrzep).



Ryc. 9.2 (kontynuacja)

Chrzątka hialinowa składa się z ujemnie naładowanych makrocząsteczek *glikozaminoglikanu (GAG)*, zatem chitozan, główny składnik tego rusztowania, ze względu na dodatni ładunek zapewnia lepszą adhezję do powierzchni uszkodzenia [21-24]. Poprawa stabilizacji i adhezji skrzepu spowodowana przez dodanie preparatu BST-CarGel® w porównaniu do pełnej krwi jest zauważalna, jak pokazano na Ryc. 9.3. Mieszanka BST-CarGel® /krew zapewnia stabilne rusztowanie, które umiejscowione jest w obrębie chrząstki korzystniej dla procesu regeneracji chrząstki, odbywającego się dzięki pluripotencjalnym komórkom macierzystym pochodzącym ze szpiku kostnego [19-21, 23, 25]. Ponadto chitozan ulega biodegradacji za pomocą endogennych enzymów i komórek rozkładających chitozę, co powoduje całkowitą resorpcję z miejsca implantacji [14, 21, 23, 26-28]. Tabela 9.1 podsumowuje mechaniczne właściwości BST-CarGel®, które przyczyniają się do maksymalizacji objętości i obecności skrzepu w obrębie uszkodzenia chrząstki.

Te unikalne właściwości BST-CarGel® powodują większą objętość i dłuższą obecność implantu BST-CarGel®/krewinki w porównaniu do samej krwi szpiku, jak wykazano w badaniach na zwierzętach [21, 23]. Eksperymenty na zwierzętach, oceniające skuteczność procedury, wykazały, że leczenie BST-CarGel® prowadzi do: (1) wypełnienia większego obszaru uszkodzenia i lepszej integracji tkanki naprawczej, (2) wytworzenia tkanki naprawczej o lepszej komórkowej strukturze, z komórkami posiadającymi w większym stopniu fenotyp chondrogeny, (3) wzrostu zawartości glikozaminoglikanu w tkance naprawczej (oznaczonego na pomocą barwienia Safraniną-O), (4) wyższego stężenia kolagenu typu II w tkance naprawczej (oznaczonego metodami immunohistochemicznymi), oraz (5) wyższej porowatości i unaczynienia subchondralnej płyty kostnej [19, 21, 23].

Ryc. 9.3 Stabilizacja skrzepów krwi i zwiększona przyczepność BST-CarGel®. BST-CarGel® /mieszanka krwi i pełna krew były aplikowane do uszkodzeń poddanych procedurze mikrozlamań powstających na rozgrzanej kości udowej świni i pozostawiono je przez 15 min do wytworzenia skrzepu w temperaturze 37° C. Gdy kość udową obrócono o 90°, zaobserwowano lepszą adhezję skrzepu BST-CarGel® /skrzep krwi, wynikającą z unikalnej mukoadhezyjności kationowego chitosolu.

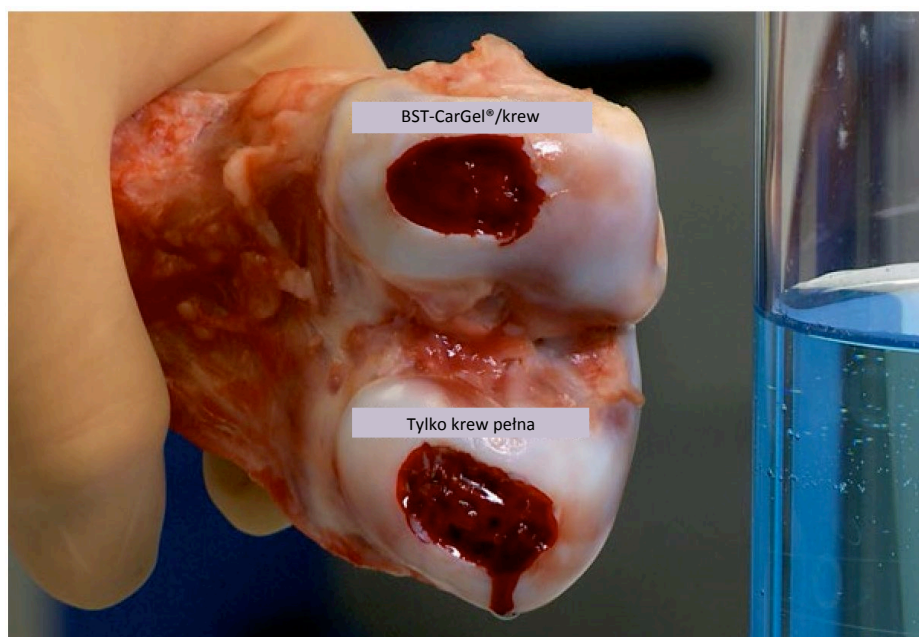


Tabela 9.1 BST-CarGel®: podstawowy mechanizm działania.

Działa jak rusztowanie fizycznie stabilizujące skrzep krwi w obszarze uszkodzenia chrząstki

Zapobiega obkurczeniu się skrzepu krwi, pozwalając na wytworzenie się prawidłowego skrzepu, dostarczając w ten sposób materiału tymczasowo wypełniającego ubytek

Przylega do powierzchni uszkodzenia chrząstki

Wykazano, że procesy naprawcze, które poprawiają ilość i jakość tkanki przebiegają korzystniej w obecności BST-CarGel® i różnią się znacząco od technik opartych wyłącznie na stymulacji szpiku kostnego pod względem trzech zjawisk na wczesnym etapie: (1) zwiększona obecność komórek zapalnych i komórek pochodzących ze szpiku w stromie; (2) zwiększone unaczynienie tymczasowej tkanki naprawczej; oraz (3) nasilenie wewnątrztrzonowego powstawania kości i przebudowy kości podchrzęstnej. Te unikalne cechy wspomagają dynamiczne warunki naprawy chrząstki, w których proces gojenia się ran indukowany przez chitozan prowadzi do lepszego tworzenia się chrząstki hialinowej [21]. Rozwój tkanki hialinowej wydaje się być modulowany przez BST-CarGel® pod względem czasu, dojrzewania i położenia względem powierzchni stawowej ognisk chondrogennych, znajdujących się w otworach subchondralnych, które przypominają naturalne procesy wzrostu chrząstki [29].

Zdolność BST-CarGel® do poprawiania morfologii i biologii kości podchrzęstnej oraz całej jednostki kostno-chrzęstnej, a nie tylko powierzchni stawowej [21, 30-32] jest bardzo ważna, ponieważ ostatnie badania podkreślają istotną rolę całej jednostki kostno-chrzęstnej [33, 34]. Ponadto istnieją kontrowersje dotyczące potencjalnego wpływu zmian w obrębie kości podchrzęstnych pod wpływem stymulacji szpiku kostnego, ponieważ niektóre doniesienia wykazują wyższe wskaźniki niewydolności w związku z kolejnymi operacjami [35, 36], a w innych pracach tego efektu nie stwierdzono [37, 38]. Korzystne działanie preparatu BST-CarGel® na kości subchręstne może potencjalnie złagodzić ten problem.

9.3 Zastosowanie BST-CarGel®

9.3.1 Wskazania/przeciwdziałania

Istotnym aspektem każdej z technik leczenia chrząstki jest właściwe dopasowanie do charakterystyki pacjenta. Sukces lub niepowodzenie danej procedury zależy od wielu zmiennych, nie tylko od pojedynczych cech demograficznych lub innych czynników związanych z procedurą chirurgiczną. Najlepsza technika chirurgiczna nie przyniesie oczekiwanych rezultatów, jeśli nie zostaną odpowiednio ocenione krytyczne zmienne, takie jak niedowład kończyny, niestabilność stawów i otyłość. Tego rodzaju przeciwwskazania powinny być korygowane przed zabiegiem lub w trakcie zabiegu. Ponadto należy wziąć pod uwagę przewlekłość stanu uszkodzenia chrząstki, ponieważ wyniki kliniczne, niezależnie od sposobu leczenia, wskazują, że istnieje odwrotna korelacja efektów terapii z przewlekłością stanu chorobowego [12].

Tabela 9.2 BST-CarGel®: wskazania / przeciwwskazania.

Wskazania	Przeciwwskazania
Ogniskowe zmiany tkanki chrzęstnej lub kostno-chrzęstnej stopnia 3 lub 4	Uszkodzenia chrząstki stawowej na obu sąsiadujących powierzchniach stawowych, tzw. „kissing lesions”
Kłykcie udowe	Niedowład kolana ponad 5°
Powierzchnia uszkodzenia do 7 cm ²	Niewydolność łąkotki
Podłoże urazowe lub degeneracyjne	Niestabilność więzadła Alergia na skorupiaki

Należy również brać pod uwagę oczekiwania pacjenta. Chociaż czynniki takie jak wiek, poziom aktywności, współwystępowanie innych chorób i poprzednie operacje chrząstki mogą mieć wpływ na wynik procedury (niezależnie od wymienionych powyżej), względny sukces lub niepowodzenie będą ostatecznie oceniane z perspektywy pacjenta. Najważniejsze jest zatem ustalenie przez klinicystę, czego pacjent może realnie oczekiwać po wykonaniu zabiegu, i w tej analizie należy wziąć pod uwagę wszystkie czynniki. W przypadku terapii z zastosowaniem BST-CarGel® należy stosować tę samą zasadę.

Z aktualnych doniesień na temat praktycznego zastosowania produktu BST-CarGel®, opartych na doświadczeniach na zwierzętach i badaniach klinicznych, wynika, że potencjalnym wskazaniem do stosowania BST-CarGel® są zlokalizowane lub ogniskowe uszkodzenia chrząstki. Przy określaniu przydatności metody BST-CarGel® w konkretnych przypadkach powinno się uwzględniać rodzaj uszkodzenia (głębokość), położenie i wielkość, jak również stan przeciwstawnej powierzchni chrząstki. Zarówno uszkodzenie chrząstki związane z urazem, jak i ogniskowe uszkodzenia wynikające z procesów zwyrodnieniowych są uważane za wskazania do użycia BST-CarGel®. Objawy te dotyczą dużej grupy pacjentów, którzy ze względu na zbyt młody wiek nie kwalifikują się do operacji całkowitej wymiany stawu kolanowego. Ponadto, jak już opisano, mechanistyczne dowody na podstawie badań na zwierzętach wykazały, że BST-CarGel® wywiera powtarzalny i pozytywny wpływ na przebudowę kości podchrzęstnej [21, 31, 32], co sugeruje, że ubytek chrząstki, którego przyczyną jest patologia w obrębie kości podchrzęstkowych, takich jak oddzielająca martwica kostno-chrzęstna lub cysty, można rozwiązać poprzez leczenie BST-CarGel®.

Podsumowanie wskazań, przedstawione w Tabeli 9.2, jest poparte randomizowanym badaniem klinicznym opisanym w Sekcji 9.5.2. Obecność współistniejących patologii, takich jak niestabilność więzadła, *tibiofemoralne* zapalenie kości i stawów, niedobór kości, bóle rzepki i patologie łąkotki, które mogą niekorzystnie wpływać na procesy naprawcze za pośrednictwem BST-CarGel®, należy rozwiązać przed lub równocześnie z zastosowaniem produktu BST-CarGel. W przyszłości, zastosowanie medycyny regeneracyjnej (SGRM), przy użyciu BST-CarGel® z wykorzystaniem materiałów o strukturze rusztowania w celu indukcji syntezy chrząstki (ICI) może być rozszerzone na inne stawy, gdzie występują zmiany chrzęstne i osteochondryczne. Urazy w stawach skokowych i stawach biodrowych mogą również być leczone BST-CarGel® ze względu na podobieństwa patologii i dostępność artroskopową.

Zgodnie z aktualną ulotką, preparat BST-CarGel® jest przeznaczony do leczenia pojedynczych uszkodzeń chrząstki w stopniu 3 i 4, zlokalizowanych na kłykciach udowych kolana, o powierzchni do 7 cm² u pacjentów w wieku od 18 i 55 lat.

9.3.2 Leczenie wspomagające

Zasada leczenia preparatem BST-CarGel® opiera się na wewnętrznych właściwościach ludzkiego skrzepu krwi pochodzącego ze szpiku kostnego, który po zakrzepnięciu naturalnie inicjuje kaskadę zdarzeń biologicznych, prowadzących do gojenia się ran przez szlaki zapalne. Z tego powodu, leki przeciwzakrzepowe i aspiryna lub heparyna, jak również dobrze tolerowane leki przeciwzapalne, powinny być odstawione co najmniej 7 dni przed rozpoczęciem leczenia produktem BST-CarGel® i nie powinny być wznawiane przez 24 godziny po podaniu produktu, chyba że przepisano inaczej. Pacjenci przyjmujący rutynowe leczenie przeciwzakrzepowe lub, jeśli to wskazano, mogą wznowić terapię po upływie 6 godzin po zakończeniu zabiegu chirurgicznego.

9.3.3 Technika chirurgiczna

Leczenie z zastosowaniem BST-CarGel®, poza standardowym pomieszczeniem operacyjnym wyposażonym w chirurgię artroskopową, nie wymaga żadnych specjalnych narzędzi lub urządzeń. Jeżeli stosowana jest metoda miniartrotomii, przydatny jest standardowy zestaw narzędzi chirurgicznych oraz hak chirurgiczny do operacji otwartego kolana.

BST-CarGel® jest nakładany do świeżo odsłoniętego uszkodzenia w formie lepkiej mieszaniny produktu połączonego na miejscu ze świeżą pełną krwią obwodową, które leczone jest stymulacją szpiku kostnego (np. mikrozlamania). Technika chirurgiczna BST CarGel® składa się z trzech etapów:

1. Przygotowanie uszkodzenia poprzez dokładne oczyszczenie i stymulację szpiku kostnego
2. Przygotowanie mieszaniny BST-CarGel®/krew
3. Dostarczenie mieszanki BST-CarGel®/krew do uszkodzenia

Przygotowanie uszkodzenia

Sonda artroskopowa służy do oceny ukierunkowanej zmiany, jej granic, stabilności jej brzegów oraz pozostałych elementów stawu. Chropowatości chrząstki, zagięcia i luźne odłamki są starannie usuwane przy pomocy golarki i skrobaczki w celu całkowitego usunięcia zwapnionej warstwy chrząstki, bez oddziaływania na kość podchrzęstną. W ten sposób powstaje zamknięty obszar uszkodzenia o stabilnych pionowych brzegach, co jest konieczne do właściwej aplikacji mieszaniny BST CarGel®. Następnie przeprowadza się stymulację szpiku kostnego (np. metodą mikrozlamań), co opisano we wcześniejszych pracach [3, 4, 39]. Ścisłe przestrzeżenie procedury stymulacji szpiku ma zasadnicze znaczenie, zwłaszcza w przypadku odsłaniania i usuwania zwapnionej chrząstki, zważywszy że zarówno chrząstka zwapniona, jak i niezwapniona, stanowi barierę dla procesów naprawczych indukowanych przez szpik [40].

Przygotowanie BST-CarGel®

Preparat BST-CarGel® powinien być przygotowany przez wyszkolonego, niesterylnego asystenta, zwykle podczas chirurgicznego przygotowania chorego. Po pierwsze, dokładnie 0,3 ml roztworu p-GP usuwa się z fiolki za pomocą strzykawki o pojemności 1 cm³ i dodaje powoli (co najmniej 5 s) do roztworu chitozanu w fiolce do mieszania. Następnie mieszaninę pozostawia się bez zakłóceń przez co najmniej 10 minut.

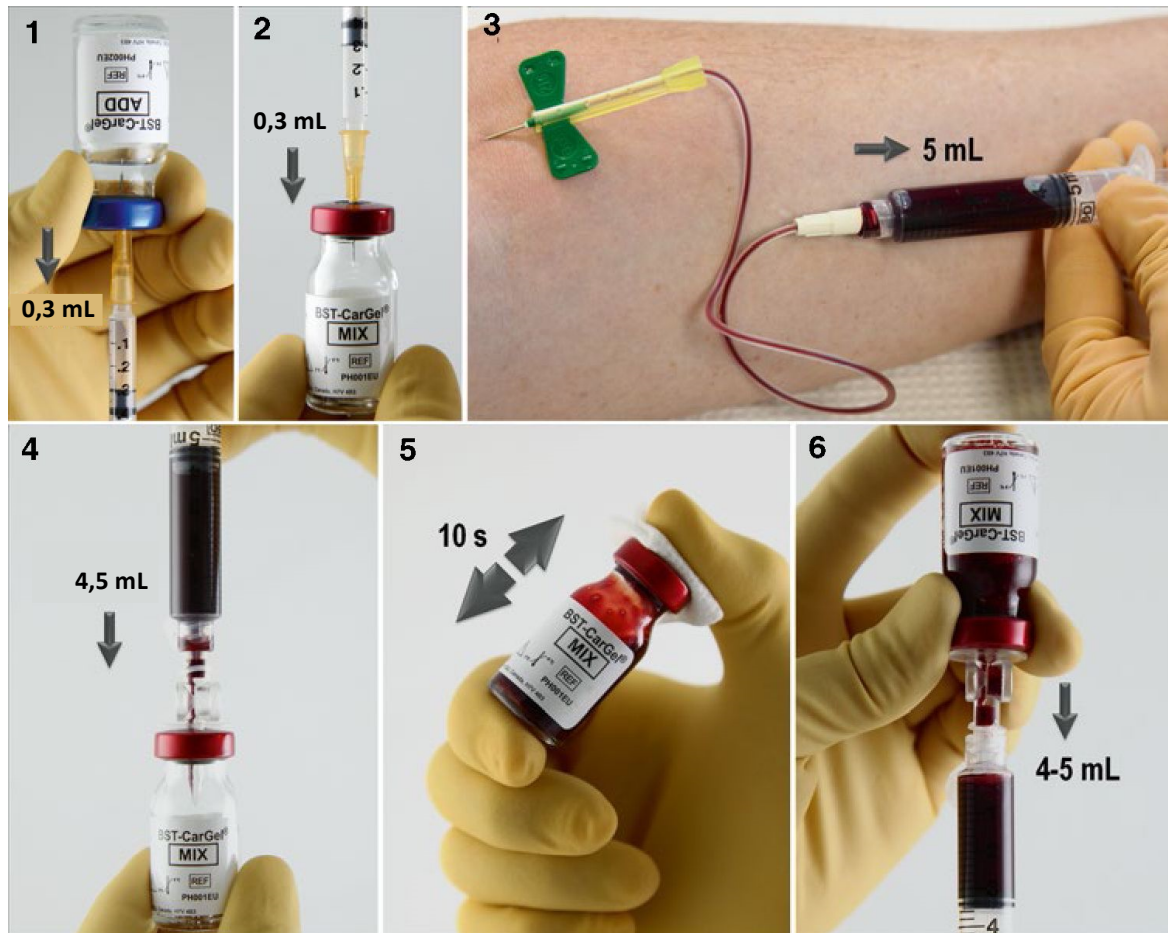
Przygotowanie preparatu i ułożenie nóg należy wykonać przed dodaniem świeżej autologicznej pełnej krwi do przygotowanego preparatu BST-CarGel®. Najpierw, 5 ml pełnej krwi obwodowej pobiera się od pacjenta do plastikowej strzykawki o pojemności 5 ml. Większe strzykawki nie są zalecane, gdyż nie posiadają wymaganej objętości gradacji.

Następnie do fiolki do mieszania należy niezwłocznie dodać dokładnie 4,5 ml krwi żyłnej, używając jednorazowego sterylnego hematologicznego sztyftu dozującego i energicznie wymieszać ręcznie przez 10 sekund. Czynność ta jest wykonywana przez niesterylnego asystenta. Drugi sztyft jest używany przez sterylnego asystenta, który powoli nabiera 4-5 ml mieszaniny BST-CarGel® / krew do jałowej strzykawki o pojemności 5 ml, przed podaniem jej chirurgowi, dostarczającemu mieszaninę do już przygotowanej zmiany (Ryc. 9.4).

Przygotowanie uszkodzenia i nałożenie preparatu BST-CarGel®

Po przeprowadzeniu stymulacji szpiku kostnego dostęp do uszkodzenia można uzyskać za pomocą wspomaganą artroskopową miniartrotomii. Długość nacięcia może być różna, zależnie od rozmiaru uszkodzenia, ale 3-4 cm zazwyczaj umożliwia wystarczającą wizualizację lezji, umożliwiającą dokładne wprowadzenie mieszaniny BST CarGel®/krew do przygotowanej zmiany. Alternatywnie, jeżeli wielkość i lokalizacja uszkodzenia pozwalają na pełną wizualizację i dokładne dostarczanie mieszaniny BST CarGel®/krew możliwe jest użycie artroskopu. Niezależnie od wybranej metody, należy całkowicie odsączyć płyn perfuzyjny i krew z operowanego stawu, a następnie nałożyć na uszkodzone miejsce gazę w celu utworzenia "suchego pola" przed nałożeniem mieszaniny BST-CarGel®/krew. Implantowany preparat BST-CarGel® jest lepka mieszaniną, zatem podczas zabiegu kolano musi być ułożone w taki sposób, aby opracowywane miejsce uszkodzenia znajdowało się w pozycji poziomej. Pozycję tę osiąga się przez zgięcie biodra i kolana o około 90 ° (Ryc. 9.5) i można ją utrzymywać za pomocą stolika Mayo lub uchwytu na nogę.

Mieszaninę następnie nanosi się na przygotowaną zmianę przez zakrapianie, stosując igłę 18G. Ilość nakładanego preparatu może być różna, w zależności od wielkości uszkodzenia. Zmianę należy wypełnić, aż będzie ona prawie pełna (Ryc. 9.6), unikając jednak przepelnienia. Skrzep hybrydowy pozostawia się do zestalenia w miejscu nałożenia przez 15 minut przed zamknięciem nacięcia. Po 15-minutowym okresie krzepnięcia, konieczne jest minimalne manipulowanie kolanem i nogą podczas zamykania, czyszczenia i zawijania. Noga powinna zostać wyprostowana jednym ruchem, zapewniając optymalne warunki implementacji BST-CarGel®/krew. Zakłada się standardowe opatrunki kolanowe, a następnie miękką opaskę, która nie powinna być usuwana przez 24 godziny po zabiegu.

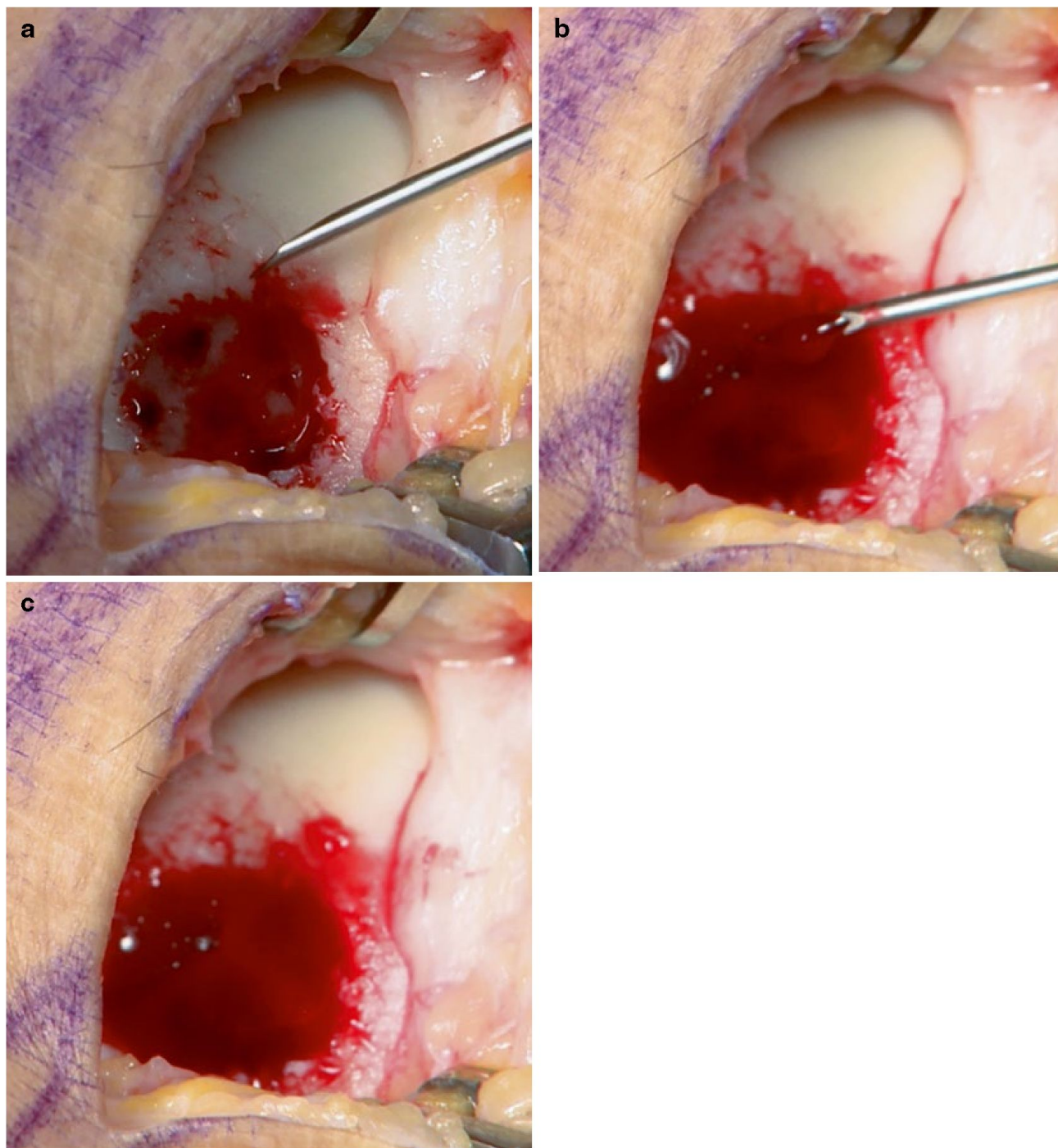


Ryc. 9.4 Przygotowanie produktu BST-CarGel®. (1) Fiolkę z substancją dodatkową (ADD) należy odwrócić i pobrać dokładnie 0,3 ml roztworu (bez bąbek powietrza) za pomocą sterylnej strzykawki o objętości 1 ml wyposażonej w sterylną igłę. (2) Po odczekaniu co najmniej 5 s, roztwór pobrany z fiolki ADD wstrzykujemy po kropli do fiolki MIX. Nie wstrząsamy fiolki MIX, pozostawiając ją w pozycji pionowej bez ruchu przez co najmniej 10 min. (3) Jeżeli uszkodzenie było opracowane metodą stymulacji szpiku, pobieramy 5 ml świeżej, obwodowej krwi pełnej z żyły obwodowej pacjenta za pomocą strzykawki o objętości 5 ml. (4) Przegrodę fiolki MIX przepłukujemy alkoholem przed wprowadzeniem skręcającym ruchem dozownika do przegrody fiolki. Strzykawkę wypełnioną krwią

mocujemy do dozownika i powoli wstrzykujemy do fiolki MIX dokładnie 4,5 ml krwi. Dozownik usuwamy i wyrzucamy. (5) Fiolkę MIX natychmiast energicznie wstrząsamy przez 10 s. (6) Drugi dozownik wprowadzamy do fiolki z wymieszanymi składnikami BST-CarGel®/fiolka wypełniona krwią przymocowujemy do sterylnej strzykawki o objętości 5 ml. Fiolkę odwracamy i przez 3 s pozwalamy pęcherzykom powietrza obecnym w mieszaninie przemieścić się na górę. Pobieramy 4-5 ml mieszaniny BST-CarGel®/krew, uważając, by do strzykawki nie dostały się pęcherzyki powietrza. Mieszanina BST-CarGel®/krew jest gotowa do nałożenia na przygotowane uszkodzenie chrząstki.

Ryc. 9.5 Przygotowanie kolana pacjenta do aplikacji BST-CarGel®. BST-CarGel® jest aplikowany jako lepki roztwór i dlatego kolano musi być ustawione w takiej pozycji, by uszkodzenie znajdowało się w pozycji horyzontalnej. Tę pozycję osiągamy wyginając biodro i kolano o ok. 90° i może ona być ustabilizowana przez użycie stolika Mayo lub uchwytu na nogę.





Ryc. 9.6 Nakładanie BST-CarGel® na opracowany operacyjnie ubytek chrząstki. (a) Mieszaninę BST-CarGel®/krew nakładamy na opracowany ubytek (b) po kropli, z użyciem sterylnych igieł 18G. (c) Ilość nakładanej mieszaniny zmienia się w zależności od rozmiaru ubytku, ale musi on być prawie całkowicie wypełniony. Należy unikać nadmiernego wypełnienia ubytku.

Mieszaninę BST-CarGel®/krew pozostawia się do utworzenia się skrzepu na 15 minut przed zamknięciem nacięcia. Po tym czasie minimalna manipulacja w obrębie kolana i nogi jest konieczna podczas zamykania, oczyszczania i opatrywania rany. Noga powinna zostać wyprostowana pojedynczym ruchem, zapewniając optymalne warunki dla zagnieżdżenia się kompleksu BST-CarGel®/skrzepina.

9.3.4 Potencjalne komplikacje i rozwiązywanie problemów

Dodatkowe punkty do rozważenia podczas stosowania preparatu BST-CarGel®:

- Ze względu na lepkość ciekłej mieszaniny BST-CarGel® / krew, należy unikać leczenia otwartych zmian chorobowych.
- Należy unikać uszkodzeń w pobliżu wcięcia lub początku

tylnego więzadła krzyżowego (PCL) bez wystarczającego osłonięcia, ponieważ trudne warunki mechaniczne mogą uniemożliwić implementację preparatu.

- Podczas zabiegu powinien być dostępny drugi zestaw BST-CarGel®, jako zapas na wypadek wypłynięcia mieszaniny z miejsca uszkodzenia przed utworzeniem skrzepu, wypadnięcia implantu przed wyprostowaniem nogi, lub innego nieprzewidzianego zdarzenia lub opóźnienia.

9.4 Rehabilitacja BST-CarGel®

Program rehabilitacji pooperacyjnej dla pacjentów leczonych BST-CarGel® ma na celu przywrócenie sprawności funkcjonalnej, przy równoczesnej ochronie rozwijającej się tkanki chrzęstnej przed szkodliwym mechanicznym przeciążeniem. Program rehabilitacji powinien być ze względów strategicznych rozłożony w czasie, ponieważ proces dojrzewania tkanki naprawczej może potrwać 18-24 miesięcy lub dłużej [41, 42].

Istnieją tylko ogólne wytyczne dotyczące rehabilitacji, ponieważ istotne znaczenie mają tutaj czynniki demograficzne i fizyczne, które należy rozważyć podczas ustalania programu ćwiczeń. Do tych czynników należą wiek pacjenta, masa ciała, poprzedni poziom aktywności fizycznej oraz oczekiwania, jak również czynniki chirurgiczne, takie jak wielkość i lokalizacja uszkodzenia. Podstawowy program powinien być dostosowany do każdego pacjenta przez fizjoterapeutę.

Program rehabilitacji po zabiegu BST-CarGel® dzieli się na dwie fazy: Faza 1, która zazwyczaj obejmuje tygodnie 1-8 po operacji, oraz faza 2, która jest zaplanowaną, długoterminową obserwacją, trwającą przez 9- 26 tygodni po operacji. Tabela 9.3 zawiera uzasadnienie i sugestie dotyczące sposobów, które mają być zastosowane.

W fazie 1, przez pierwsze 24 godziny po zabiegu, staw jest całkowicie unieruchomiony miękką opaską, której pacjent używa następnie przez 14 dni podczas ruchu oraz w nocy. Zalecane są w fazie 1 częste sesje z doświadczonym terapeutą, w pierwszym tygodniu maksymalnie pięć razy i trzy razy w kolejnych tygodniach. Bierne ćwiczenia ze wspomaganiem pozwalają utrzymać mobilność, zwiększyć zakresu ruchu i zapewniają dobry ogólny stan kolan dzięki mechanicznej stymulacji, która moduluje rozwój tkanki. Po uzyskaniu 110° zgięcia, dozwolone jest ćwiczenie na rowerze stacjonarnym. W pierwszych 6 tygodniach nie jest dozwolone obciążenie, a od 6-8 tygodnia celem jest osiągnięcie pełnego obciążenia, do granicy bólu. Inne standardowe metody mogą być realizowane według preferencji terapeuty, jak pokazano w tabeli 9.3. Po osiągnięciu celów fazy 1, pacjent może przejść do fazy 2.

Faza 2 sugeruje normalne używanie leczonego stawu kolanowego w codziennym życiu, z wyłączeniem zajęć sportowych. Aby osiągnąć efekty zilustrowane w tabeli 9.3, można wprowadzać wzmocnienie za pomocą ćwiczeń w zamkniętym łańcuchu kinematycznym. Pod koniec tej fazy zachęca się pacjentów do rozpoczęcia lekkiej aktywności sportowej, takiej jak jazda na rowerze czy pływanie. Nie są natomiast dozwolone dyscypliny wymagające większego wysiłku lub sporty kontaktowe, które wymagają wykonywania ruchów obrotowych, ponieważ dojrzewająca tkanka nadal jest podatna na obciążenia mechaniczne.

Tabela 9.3 Program rehabilitacji po zabiegu BST-CarGel®

Uzasadnienie		Ćwiczenia
Faza 1: 1-8 tygodni	Zabezpieczenie i utrzymanie implantu Kontrolowanie bólu i opuchlizny kolana Odzyskanie prawidłowego zakresu ruchów Stymulacja nowej tkanki chrzęstnej	6 tygodni ćwiczenia postawy bez obciążeń Dni 2-7: bierny ROM, wyginanie <35° Dni 8-28: bierny ROM, jeżeli jest tolerowany Stymulacja nerwowo-mięśniowa Opaska/izometryczne kurczenie Wzmocnienie biodra TheraBand®
Faza 2: 9-26 tygodni	Osiągnięcie pełnego zakresu ruchów Stymulacja dojrzewania nowej tkanki chrzęstnej Odzyskanie zdolności do prawidłowego chodu Wzmocnienie mięśni i normalizacja propriocepcji Rozpoczęcie lekkich zajęć sportowych	Ćwiczenia propriocepcyjne z bezbolesnym pełnym obciążeniem Progresywne ćwiczenia w zamkniętych łańcuchach kinematycznych Równoważnia Wspięcia na palcach, z progresją do wspięć na jednej nodze Ćwiczenia układu krążenia (jazda na rowerze, chodzenie, pływanie, StairMaster) co najmniej 20 minut na dobę

9.5 Doświadczenie kliniczne w stosowaniu preparatu BST-CarGel®

9.5.1 Badania pilotażowe

Pierwszą próbę klinicznego zastosowania preparatu BST-CarGel® przeprowadzono w okresie od sierpnia 2003 r. do grudnia 2004 r. w ramach programu Health Canada's Special Access Program, dla wyrobów medycznych przeznaczonych do indywidualnego stosowania. Badanie, w którym uczestniczyło trzydziestu trzech pacjentów leczonych za pomocą produktu BST-CarGel®, obejmowało spektrum wskazań, zarówno zmian urazowych, jak i zwyrodnieniowych, których rozmiary, zarówno u mężczyzn jak i kobiet mieściły się w zakresie od 0,5 do 12 cm² (średnia powierzchnia 4,3 cm²). W badaniu tym leczeniu poddano również przypadek oddzielającej martwicy kostno-chrzęstnej oraz torbieli subchondralnej. U dwóch pacjentów przed terapią preparatem BST-CarGel® wykonano rekonstrukcję więzadła krzyżowego przedniego. U 22 pacjentów BST-CarGel® został dostarczony podczas artroskopii, a u 11 pacjentów przez miniartrotomię. Opisywane badanie kliniczne uznawane jest za badanie obserwacyjne bez grupy kontrolnej, ale stanowiło ono pierwszą ocenę bezpieczeństwa, ponieważ podczas badań fizykalnych lub analiz krwi nie stwierdzono żadnych nieprawidłowości. Dwanaście miesięcy po zabiegu przeprowadzono ankietę Western Ontario McMaster (WOMAC) Osteoarthritis Index oceniającą poziom bólu, sztywności oraz funkcję w porównaniu do stanu przedoperacyjnego, a jednorodność danych WOMAC potwierdziła wyraźne korzyści kliniczne, wynikające z leczenia preparatem BST-CarGel®. Ponadto doświadczenie chirurgiczne zdobyte podczas procedury z użyciem BST-CarGel® wykorzystano do opracowania protokołu klinicznego w międzynarodowym, wieloośrodkowym, randomizowanym badaniu klinicznym opisanym w dalszej części pracy.

9.5.2 Randomizowane badanie kliniczne BST-CarGel®

Międzynarodowe, wieloośrodkowe badanie przeprowadzono zgodnie z zasadami opracowanymi przez Międzynarodową Konferencję Harmonizacji Dobrej Praktyki Klinicznej (GCP) w celu oceny skuteczności BST-CarGel® w leczeniu uszkodzeń chrząstki i uzyskaniu poprawy klinicznej u pacjentów po 12 miesiącach terapii w porównaniu do metody mikrozlamań, jako aktualnej standardowej formy leczenia.

Badanie przeprowadzono w 26 ośrodkach klinicznych w Kanadzie, Hiszpanii i Korei Południowej. Do badania zakwalifikowani zostali mężczyźni i kobiety w wieku 18-55 lat z izolowaną zmianą chrząstki stopnia 3 lub 4 w obrębie środkowego lub bocznego kłykcia kości udowej oraz umiarkowanym bólem kolana (> 4 VAS). Pacjenci mieli stabilne kolano z nieuszkodzoną łąkotką, BMI <30 kg / m² i nie poddawani byli wcześniej zabiegom chirurgicznym chrząstki lub więzadła w badanym kolanie, odpowiednio w ciągu 1 lub 2 lat przed rozpoczęciem badania. W badaniu wzięło udział 80 pacjentów, randomizowanych (1:1) w momencie zabiegu do grup otrzymujących preparat BST-CarGel® lub leczonych wyłącznie metodą mikrozlamań, a następnie poddani zostali 12-tygodniowej standardowej rehabilitacji. Niniejsze badanie jest pierwszą tego typu próbą w terapii chrząstki, w której zastosowano nowe, trójwymiarowe ilościowe badanie MRI, w celu porównania struktury chrząstki naprawczej, na podstawie danych gromadzonych w sposób wystandaryzowany i analiz dwóch głównych punktów końcowych, tj. ilości i jakości nowej tkanki chrzęstnej, przeprowadzonych metodą ślepej próby.

Stopień wypełnienia uszkodzenia chrząstki (% wypełnienia) obliczono objętościowo po 12 miesiącach, jako procent wyjściowej objętości 1 miesiąc po zabiegu operacyjnym a parametr charakteryzujący jakość kolagenu był mierzony po 12 miesiącach, z zastosowaniem czasu relaksacji poprzecznej (lub T2) całkowitej objętości nowej tkanki. Drugorzędowe punkty końcowe badane po 12 miesiącach, obejmowały korzyści kliniczne, określone w kwestionariuszach WOMAC oraz bezpieczeństwo. Dane pomocnicze z 38 wybranych biopsji pobrane po 13 miesiącach obejmowały ocenę makroskopową (podczas pobierania), opracowaną przez Międzynarodowe Towarzystwo Leczenia Chrząstki Stawowej (ICRS – International Cartilage Repair Society), ślepą ewaluację histologiczną ICRS I i II oraz ocenę struktury kolagenu za pomocą mikroskopu polimeryzacyjnego (PLM).

Leczenie z użyciem BST-CarGel® spełniło założenia obydwu głównych punktów końcowych, osiągając istotną statystycznie przewagę w porównaniu do metody mikroślamań zarówno pod względem stopnia wypełnienia leczonych uszkodzeń, jak i jakości nowej tkanki. Dane wskazują, że w porównaniu z grupą poddawaną procedurze mikroślamań, uszkodzenia leczone za pomocą preparatu BST-CarGel® charakteryzowały się znacznie większą objętością chrząstki naprawczej o bardziej uporządkowanej strukturze kolagenowej mierzonej T2 niż w przypadku mikroślamań, o cechach zbliżonych do naturalnej chrząstki hialinowej. Ocena bólu, sztywności i funkcji za pomocą skali WOMAC dały równoważną, statystycznie istotną w porównaniu do wartości wyjściowych poprawę dla obu grup. Poziom bezpieczeństwa był porównywalny w obu grupach. W porównaniu z terapią za pomocą mikroślamań, BST-CarGel® spowodował poprawę klasyfikacji makroskopowej ICRS, lepszą organizację kolagenu mierzoną PLM oraz poprawę większości parametrów histologicznych ICRS I i II.

Podsumowując, leczenie z użyciem preparatu BST-CarGel® zapewnia doskonałą jakość tkanki naprawczej i lepsze wypełnienie uszkodzenia po 12 miesiącach, jak wykazano na podstawie wielu niezależnych wskaźników. Można więc przypuszczać, z dużym prawdopodobieństwem, że tak znacząca poprawa korzystnie wpłynie na trwałość efektów procesu naprawczego i korzyści klinicznych, w porównaniu do metody mikroślamań.

BST-CarGel® jest obecnie dopuszczony do sprzedaży wyłącznie w Europie.

Podziękowania. BST-CarGel® został opracowany przez firmę Piramal Healthcare Bio Orthopedics (dawniej BioSyntech Canada Inc.). Jesteśmy wdzięczni profesorom Michaelowi Buschmannowi i Caroline Hoemann, wynalazcom BST-CarGel® oraz pracownikom Biomaterials and Cartilage Laboratory w Ecole Polytechnique w Montrealu, którzy opracowali podstawy naukowe dla preparatu BST-CarGel®. Dziękujemy również dr Jun Sun i dr. Mark Hurtigowi za ich doświadczenie w dziedzinie chirurgii zwierząt. Dziękujemy Dr Nicolasowi Duval i Dr Pierre Ranger za udział w pilotażowym klinicznym badaniu BST-CarGel®. Składamy podziękowania firmie BST CarGel® Clinical Study Group, w tym badaczom, koordynatorom badań i fizjoterapeutom, którzy swoim niezwykłym zaangażowaniem przyczynili się do sukcesu niniejszego badania klinicznego. Godne docenienia są także inne działania kliniczne prowadzone przez Cato Canada (Montreal), MRI wykonane przez VirtualScopics (Rochester, NY) i Qmetrics (Rochester, NY) oraz ekspertyzy statystyczne dr Alexa Yaroshinsky'ego (San Andreas CA).

- 2):294-304
5. Steadman JR, Briggs KK, Rodrigo JJ, Kocher MS, Gill TJ, Rodkey WG (2003) Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up. *Arthroscopy* 19(5): 477-484
6. Frisbie DD, Trotter GW, Powers BE, Rodkey WG, Steadman JR, Howard RD, Park RD, McIlwraith CW (1999) Arthroscopic subchondral bone plate microfracture technique augments healing of large chondral defects in the radial carpal bone and medial femoral condyle of horses. *Vet Surg* 28(4):242-255
7. Knutsen G, Drogset JO, Engebretsen L, Gronqvist T, Isaksen V, Ludvigsen TC, Roberts S, Solheim E, Strand T, Johansen O (2007) A randomized trial comparing autologous chondrocyte implantation with microfracture. Findings at five years. *J Bone Joint Surg Am* 89(10):2105-2112
8. Mithoefer K, Williams R Jr, Warren RF, Potter HG, Spock CR, Jones EC, Wickiewicz TL, Marx RG (2005) The microfracture technique for the treatment of articular cartilage lesions in the knee. A prospective cohort study. *J Bone Joint Surg Am* 87(9): 1911-1920
9. Saris DB, Vanlauwe J, Victor J, Haspl M, Bohnsack M, Fortems Y, Vandekerckhove B, Almqvist KF, Claes T, Handelberg F, Lagae K, van der Bauwhede J, Vandenuecker H, Yang KG, Jelic M, Verdonk R, Veulemans N, Bellemans J, Luyten FP (2008) Characterized chondrocyte implantation results in better structural repair when treating symptomatic cartilage defects of the knee in a randomized controlled trial versus microfracture. *Am J Sports Med* 36(2):235-246
10. Steadman JR, Rodkey WG, Rodrigo JJ (2001) Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. *Clin Orthop* 391(Suppl): S362-S369
11. Kreuz PC, Steinwachs MR, Erggelet C, Krause SJ, Konrad G, Uhl M, Sudkamp N (2006) Results after microfracture of full-thickness chondral defects in different compartments in the knee. *Osteoarthritis Cartilage* 14(11):1119-1125
12. Vanlauwe J, Saris DB, Victor J, Almqvist KF, Bellemans J, Luyten FP (2011) Five-year outcome of characterized chondrocyte implantation versus microfracture for symptomatic cartilage defects of the knee: early treatment matters. *Am J Sports Med* 39(12):2566-2574
13. Gomoll AH (2012) Microfracture and augments. *J Knee Surg* 25(1):9-15
14. Chenite A, Chaput C, Wang D, Combes C, Buschmann MD, Hoemann CD, Leroux JC, Binette F, Selmani A (2000) Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels *in-situ*. *Biomaterials* 21:2155-2161
15. Di Martino A, Sittinger M, Risbud MV (2005) Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials* 26(30):5983-5990

Bibliografia

1. Johnson LL (1986) Arthroscopic abrasion arthroplasty historical and pathologic perspective: present status. *Arthroscopy* 2(1):54-69
2. Insall JN (1967) Intra-articular surgery for degenerative arthritis of the knee. A report of the work of the late K. H. Pridie. *J Bone Joint Surg Br* 49(2): 211-228
3. Steadman JR, Rodkey WG, Singleton SB, Briggs KK (1997) Microfracture technique for full-thickness chondral defects: technique and clinical results. *Oper Tech Orthop* 7(4):300-304
4. Mithoefer K, Williams RJ 3rd, Warren RF, Potter HG, Spock CR, Jones EC, Wickiewicz TL, Marx RG (2006) Chondral resurfacing of articular cartilage defects in the knee with the microfracture technique. Surgical technique. *J Bone Joint Surg Am* 88(Suppl 1 Pt

16. Kumar MN, Muzzarelli RA, Muzzarelli C, Sashiwa H, Domb AJ (2004) Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chem Rev* 104(12):6017-6084
17. Kurita K (2006) Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Mar Biotechnol (NY)* 8(3):203-226
18. Shi C, Zhu Y, Ran X, Wang M, Su Y, Cheng T (2006) Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine. *J Surg Res* 133(2):185–192
19. Hoemann CD, Sun J, McKee MD, Chevrier A, Rossomacha E, Rivard GE, Hurtig M, Buschmann MD (2007) Chitosan-glycerol phosphate/blood implants elicit hyaline cartilage repair integrated with porous subchondral bone in microdrilled rabbit defects. *Osteoarthritis Cartilage* 15(1):78-89
20. Marchand C, Rivard GE, Sun J, Hoemann CD (2009) Solidification mechanisms of chitosan-glycerol phosphate/blood implant for articular cartilage repair. *Osteoarthritis Cartilage* 17(7):953-960
21. Chevrier A, Hoemann CD, Sun J, Buschmann MD (2006) Chitosan-glycerol phosphate/blood implants increase cell recruitment, transient vascularization and subchondral bone remodeling in drilled cartilage defects. *Osteoarthritis Cartilage* 15(3):316-327
22. Henriksen I, Green KL, Smart JD, Smistad G, Karlsen J (1996) Bioadhesion of hydrated chitosans: an in vitro and in vivo study. *Int J Pharm* 145:231-240
23. Hoemann CD, Hurtig M, Rossomacha E, Sun J, Chevrier A, Shive MS, Buschmann MD (2005) Chitosan-glycerol phosphate/blood implants improve hyaline cartilage repair in ovine microfracture defects. *J Bone Joint Surg Am* 87(12):2671-2686
24. van den Berg WB, van Lent PL, van de Putte LB, Zwartz WA (1986) Electrical charge of hyaline articular cartilage: its role in the retention of anionic and cationic proteins. *Clin Immunol Immunopathol* 39(2):187-197
25. Iliescu M, Hoemann CD, Shive MS, Chenite A, Buschmann MD (2008) Ultrastructure of hybrid chitosan-glycerol phosphate blood clots by environmental scanning electron microscopy. *Microsc Res Tech* 71(3):236-247
26. Chen H, Chevrier A, Hoemann CD, Sun J, Ouyang W, Buschmann MD (2011) Characterization of subchondral bone repair for marrow-stimulated chondral defects and its relationship to articular cartilage resurfacing. *Am J Sports Med* 39(8):1731-1740
27. Muzzarelli RA (1997) Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. *Cell Mol Life Sci* 53(2):131-140
28. Varum KM, Myhr MM, Hjerde RJ, Smidsrod O (1997) In vitro degradation rates of partially N-acetylated chitosans in human serum. *Carbohydr Res* 299(1-2):99-101
29. Chevrier A, Hoemann CD, Sun J, Buschmann MD (2011) Temporal and spatial modulation of chondrogenic foci in subchondral microdrill holes by chitosan-glycerol phosphate/blood implants. *Osteoarthritis Cartilage* 19(1):136-144
30. Chen G, Sun J, Lascau-Coman V, Chevrier A, Marchand C, Hoemann CD (2011) Acute osteoclast activity following subchondral drilling is promoted by chitosan and associated with improved cartilage repair tissue integration. *Cartilage* 2(2):173-185
31. Hoemann CD, Chen G, Marchand C, Tran-Khanh N, Thibault M, Chevrier A, Sun J, Shive MS, Fernandes MJ, Poubelle PE, Centola M, El-Gabalawy H (2010) Scaffold-guided subchondral bone repair: implication of neutrophils and alternatively activated arginase-1+ macrophages. *Am J Sports Med* 38(9):1845-1856
32. Marchand C, Chen G, Tran-Khanh N, Sun J, Chen H, Buschmann MD, Hoemann CD (2012) Microdrilled cartilage defects treated with thrombin-solidified chitosan/blood implant regenerate a more hyaline, stable, and structurally integrated osteochondral unit compared to drilled controls. *Tissue Eng Part A* 18(5-6): 508-519
33. Goldring MB, Goldring SR (2010) Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. *Ann N Y Acad Sci* 1192:230-237
34. Gomoll AH, Madry H, Knutsen G, van Dijk N, Seil R, Brittberg M, Kon E (2010) The subchondral bone in articular cartilage repair: current problems in the surgical management. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 18(4):434-447
35. Minas T, Gomoll AH, Rosenberger R, Royce RO, Bryant T (2009) Increased failure rate of autologous chondrocyte implantation after previous treatment with marrow stimulation techniques. *Am J Sports Med* 37(5):902-908
36. Pestka JM, Bode G, Salzmann G, Sudkamp NP, Niemeyer P (2012) Clinical outcome of autologous chondrocyte implantation for failed microfracture treatment of full-thickness cartilage defects of the knee joint. *Am J Sports Med* 40(2):325-331
37. McNickle AG, L'Heureux DR, Yanke AB, Cole BJ (2009) Outcomes of autologous chondrocyte implantation in a diverse patient population. *Am J Sports Med* 37(7):1344-1350
38. Zaslav K, Cole B, Brewster R, DeBerardino T, Farr J, Fowler P, Nissen C (2009) A prospective study of autologous chondrocyte implantation in patients with failed prior treatment for articular cartilage defect of the knee: results of the Study of the Treatment of Articular Repair (STAR) clinical trial. *Am J Sports Med* 37(1):42-55
39. Chen H, Hoemann CD, Sun J, Chevrier A, McKee MD, Shive MS, Hurtig M, Buschmann MD (2011) Depth of subchondral perforation influences the outcome of bone marrow stimulation cartilage repair. *J Orthop Res* 29(8):1178-1184
40. Frisbie DD, Morisset S, Ho CP, Rodkey WG, Steadman JR, McIlwraith CW (2006) Effects of calcified cartilage on healing of chondral defects treated with microfracture in horses. *Am J Sports Med* 34(11):1824-1831
41. Brun P, Dickinson SC, Zavan B, Cortivo R, Hollander AP, Abatangelo G (2008) Characteristics of repair

tissue in second-look and third-look biopsies from patients treated with engineered cartilage: relationship to symptomatology and time after implantation. *Arthritis Res Ther* 10(6):R132

42. Welsch GH, Mamisch TC, Zak L, Blanke M, Olk A, Marlovits S, Trattng S (2010) Evaluation of cartilage repair tissue after matrix-associated autologous chondrocyte transplantation using a hyaluronic-based or a collagen-based scaffold with morphological MOCART scoring and biochemical T2 mapping: preliminary results. *Am J Sports Med* 38(5): 934-942