

lek. Maciej Pawlak¹,

dr Joanna Walecka¹,

dr Paweł Bąkowski²,

dr hab. Agata Tyczewska,
prof. ICHB PAN²,

dr hab. Kamilla Grzywacz,
prof. ICHB PAN²✉

¹Rehasport Clinic, Poznań

²Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

https://doi.org/10.18388/pb.2021_505

✉ autor korespondujący: kamilla.grzywacz@ibch.poznan.pl

Słowa kluczowe: komórki mezenchymalne, matryce biologiczne, osocze bogatopłytkowe, autologiczna tkanka tłuszczowa

Wykaz skrótów: AAT – autologiczna tkanka tłuszczowa (ang. *autologous adipocyte tissue*); A-MSc – mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące z autologicznej tkanki tłuszczowej (ang. *adipocyte-derived mesenchymal stem cells*); BD-MSc – mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące z kaletki (ang. *bursa-derived mesenchymal stem cells*); BMA – aspirat szpiku kostnego (ang. *bone marrow aspirate*); BMC – koncentrat szpiku kostnego (ang. *bone marrow concentrate*); BM-MSc – mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące ze szpiku kostnego (ang. *bone marrow-derived mesenchymal stem cells*); BMS – stymulacja szpiku kostnego (ang. *bone marrow stimulation*); MSc – mezenchymalne komórki macierzyste (ang. *mesenchymal stem cells*); PPP – osocze ubogopłytkowe (ang. *platelet-poor plasma*); PRP – osocze bogatopłytkowe (ang. *platelet-rich plasma*); T-MSc – mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące z tenocytów (ang. *tenocyte-derived mesenchymal stem cells*); UCB-MSc – mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące z pępowiny (ang. *umbilical cord-derived mesenchymal stem cells*); UDSC – mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące z moczu (ang. *urine-derived stem cells*)

STRESZCZENIE

Uszkodzenia narządu ruchu znacząco pogarszają mobilność i jakość życia, ograniczając aktywność życia codziennego. Aby leczenie ortopedyczne zakończyło się sukcesem, należy wziąć pod uwagę czynniki anatomiczne, fizjologiczne i biomechaniczne, ponieważ wszystkie one wpływają na procesy gojenia tkanek. Z tego punktu widzenia niezwykle istotne jest wspieranie tradycyjnych technik leczenia terapiami biologicznymi, gdyż ułatwiają one regenerację właściwej mikroarchitektury tkankowej. Preparaty takie działają na poziomie komórkowym (preparaty bogate w komórki zdolne do różnicowania – komórki mezenchymalne lub czynniki wzrostu) lub na poziomie tkankowym (matryce do naprawy np. tkanki chrzęstnej). W niniejszym artykule przeglądowym opisujemy najczęściej stosowane w leczeniu preparaty ortobiologiczne bogate w komórki mezenchymalne (szpik kostny, autologiczna tkanka tłuszczowa, tenocyty, pępowina, mocz i kaletka) oraz terapie oparte na preparatach bogatych w czynniki wzrostu prezentując molekularne podstawy ich funkcjonowania i skuteczność.

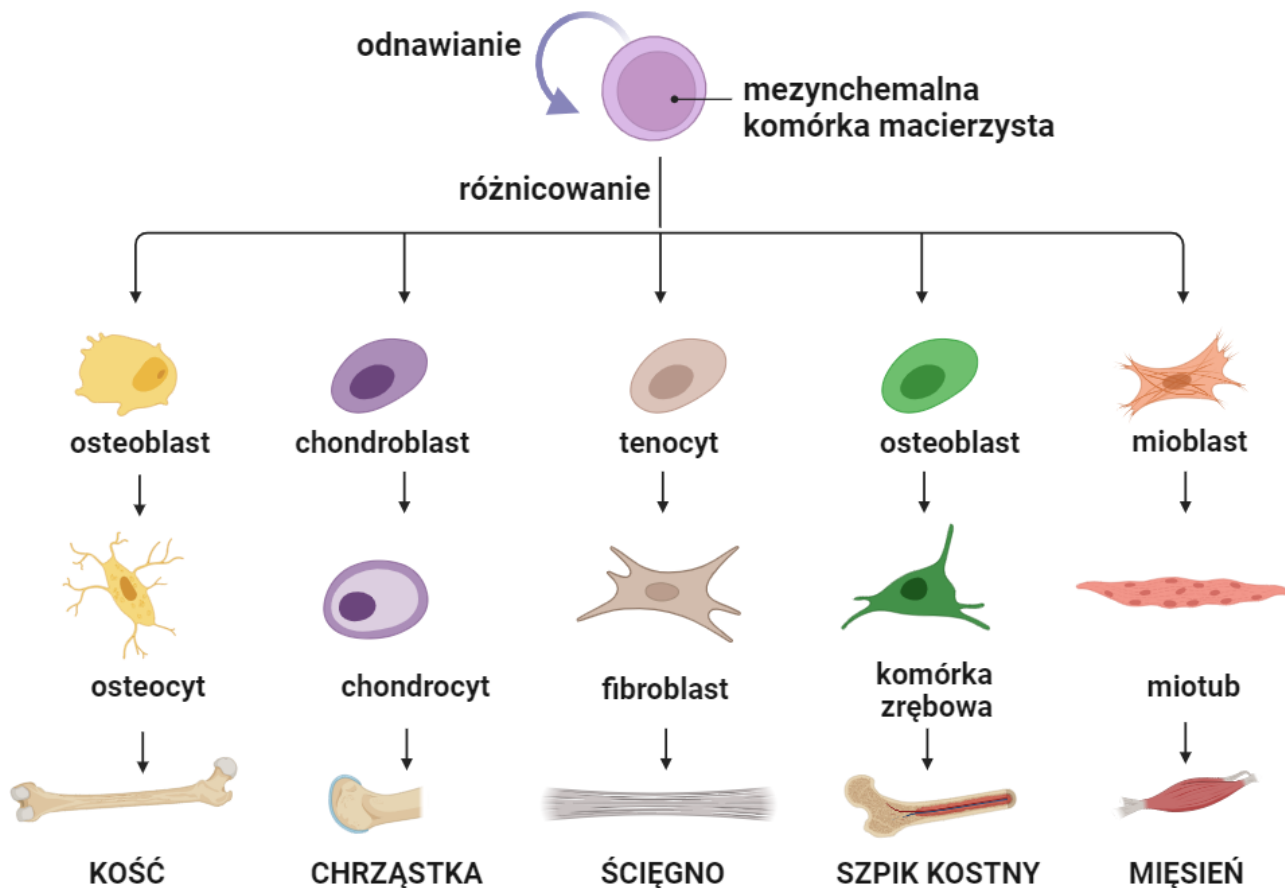
WPROWADZENIE

Ortopedia to dział medycyny, który skupia się na leczeniu wad wrodzonych, chorób i urazów układu ruchu, na który składają się kości, stawy, więzadła, ścięgna, mięśnie, nerwy i naczynia. Z ortopedią ściśle związana jest traumatologia, tj. chirurgia urazowa, której istotą jest operacyjne leczenie układu kostno-stawowego po urazach. Skuteczność leczenia ortopedycznego zależy przede wszystkim od prawidłowej diagnozy i wyboru właściwego postępowania przez lekarza, podczas którego wykorzystywane są zarówno metody leczenia zachowawczego, jak i operacyjnego. Niezależnie od sposobu, leczenie ortopedyczne musi uwzględniać czynniki anatomiczne, fizjologiczne i biomechaniczne, które wpływają na procesy gojenia tkankowego. Stąd w nowoczesnej ortopedii stosuje się holistyczne podejście do terapii, bazujące na leczeniu per se tradycyjnymi technikami oraz wspomaganie tego procesu terapiami biologicznymi, ułatwiającymi regenerację prawidłowej mikroarchitektury tkanki. Wspomaganie biologiczne może odbywać się na poziomie komórkowym (preparaty bogate w komórki zdolne do różnicowania – komórki mezenchymalne lub czynniki wzrostu) lub tkankowym (matryce do naprawy np. tkanki chrzęstnej). Istnieje wiele publikacji przeglądowych na temat metod biologicznych, które mogą poprawić gojenie operowanego kolana, łokcia czy ramienia. W publikacjach tych nie ma jednak podziału na metody stosowane w codziennej praktyce chirurga i metody, które w przyszłości będą mogły stanowić dobrą alternatywę, ale obecnie pozostają na etapie analiz molekularnych. W niniejszej pracy podjęliśmy próbę usystematyzowania istniejącej wiedzy i przybliżenia Czytelnikom najczęściej stosowane preparaty ortobiologiczne z dwóch punktów widzenia: biologa molekularnego, opisując podstawy molekularne działania terapii wspomaganie biologicznego oraz ortopedy, wskazując które z metod biologicznych są efektywne we wspomaganie leczenia ortopedycznego.

TERAPIE OPARTE NA PREPARATACH BOGATYCH W KOMÓRKI MEZENCHYMALNE

Techniki wspomaganie komórkowego dotyczą wykorzystania preparatów o dużej koncentracji pluripotencjalnych komórek macierzystych. Komórki macierzyste to niezróżnicowane komórki, które mają potencjał różnicowania się w określone typy komórek pochodzenia mezenchymalnego (tj. kości, tkanki tłuszczowej, ścięgien, mięśni, chrząstki) i namnażania się w nieskończoność [1] (Ryc. 1).

Mezenchymalne komórki macierzyste (ang. *mesenchymal stem cells*, MSC) to bardzo obiecujące narzędzia inżynierii tkankowej, ortopedii i medycynie rege-



Rycina 1. Potencjał różnicowania komórek mezenchymalnych.

neracyjnej, wykazujące wyjątkową skuteczność terapeutyczną [2,3]. Zastosowanie MSC opiera się na ich aktywacji przez cytokiny zapalne, przemieszczaniu do miejsca uszkodzenia i kontrolowaniu procesu regeneracji tkanki poprzez uwalnianie szeregu czynników ułatwiających różnicowanie i proliferację komórek progenitorowych, hamując jednocześnie reakcje zapalne. Stąd, zastosowanie MSC do wspomagania gojenia i leczenia schorzeń mięśniowo-szkieletowych barku i kolana zyskało na popularności ze względu nie tylko na ich potencjał różnicowania w kierunku różnych komórek docelowych, ale również ich właściwości przeciwzapalne i angiogenne [4]. Wydzielane przez komórki mezenchymalne cytokiny przeciwzapalne i immunomodulacyjne zebrane zostały w Tabeli 1.

Zidentyfikowano różne źródła MSC, w tym szpik kostny, tkankę tłuszczową, mięśnie, błonę maziową, okostną, ścięgno, skórę właściwą i pępowinę lub krew obwodową [5]. Główne typy MSC zebrano w Tabeli 2.

SZPIK KOSTNY JAKO ŹRÓDŁO KOMÓREK MEZENCHYMALNYCH

Szpik kostny jest pierwszym poznany i wykorzystywanym źródłem komórek mezenchymalnych w medycynie. W ortopedii BM-MSC (ang. *bone marrow-derived mesenchymal stem cells*) mogą być podawane jako aspirat lub koncentrat szpiku kostnego (ang. *bone marrow aspirate*, BMA, lub *bone marrow concentrate*, BMC). Aspirat

pozyskuje się głównie z talerza biodrowego, końca dalszego kości udowej lub końca bliższego kości ramiennej i podaje w postaci zastrzyku w operowane miejsce (Ryc. 2A). Koncentrat uzyskuje się poprzez poddanie aspiratu separacji na frakcje poprzez wirowanie, a w operowane miejsce podaje się zastrzyk frakcji aspiratu, w której komórki macierzyste są zagęszczone (Ryc. 2B). Od wielu lat najczęściej stosowaną metodą dostarczania BM-MSC jest stymulacja szpiku kostnego (ang. *bone marrow stimulation*, BMS), z wykorzystaniem mikrozłamań (ang. *microfractures*) lub mikronawiertów (ang. *channelling*). Wówczas szpik kostny z wywierconych otworów może przemieścić się w uszkodzoną okolicę (Ryc. 2C).

AUTOLOGICZNA TKANKA TŁUSZCZOWA JAKO ŹRÓDŁO KOMÓREK MEZENCHYMALNYCH

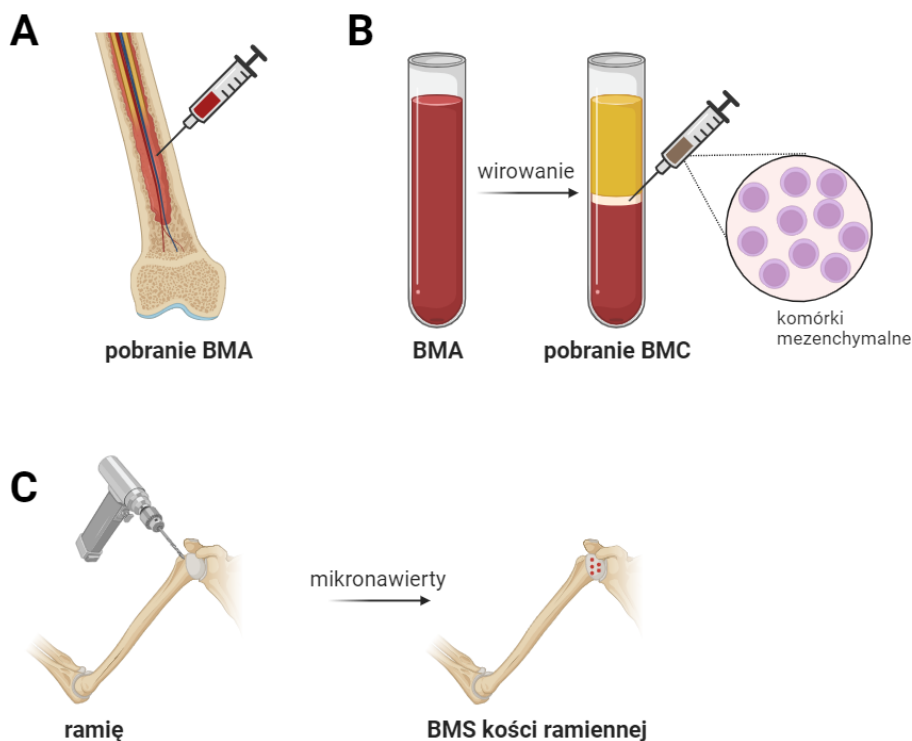
Autologiczna tkanka tłuszczowa (ang. *autologous adipocyte tissue*, AAT) jest równie częstym źródłem komórek mezenchymalnych wykorzystywanym w ortopedii co szpik kostny. A-MSC (ang. *adipocyte-derived mesenchymal stem cells*) pozyskuje się z podskórnej tkanki tłuszczowej lub aspiratów po liposukcji [6]. Procedura izolacji preparatu bogatego w A-MSC odbywa się podczas operacji ortopedycznej, najczęściej w znieczuleniu ogólnym. Najpierw pobiera się tkankę tłuszczową (około 100 ml) metodą lipoaspiracji lub liposukcji. Lipoaspirat poddawany jest następnie obróbce mechanicznej (filtrowanie, rozdrabnianie) w celu zmniejszenia wielkości skupisk tkanki tłuszczowej,

Tabela 1. Cytokiny wydzielane przez mezenchymalne komórki macierzyste i ich komórki docelowe. (na podstawie [32]).

Cytokina	Pełna nazwa	Komórki docelowe
IL-10	Interleukina 10 (ang. <i>Interleukin 10</i>)	makrofagi, neutrofile, komórki dendrytyczne, limfocyty T pomocnicze, regulatorowe limfocyty T (Treg), komórki nowotworowe
IL-6	Interleukina 6 (ang. <i>Interleukin 6</i>)	neutrofile, monocyty, komórki dendrytyczne, limfocyty B, limfocyty T pomocnicze, regulatorowe limfocyty T (Treg)
TGFβ	Czynnik transformujący wzrostu β (ang. <i>Transforming growth factor β</i>)	makrofagi, komórki NK, komórki dendrytyczne, limfocyty B, limfocyty T, regulatorowe limfocyty T (Treg)
chemokiny	ang. chemokines	neutrofile, monocyty, komórki NK, eozynofile, bazofile, limfocyty
CCL-2/ MCP-1	Ligand chemokiny 2/ chemotaktyczne białko monocytów 1 (ang. <i>chemokine ligand 2/ Monocyte chemotactic protein 1</i>)	makrofagi, komórki śródbłonka naczyń, komórki plazmatyczne, limfocyty T pomocnicze
CCL-5/ RANTES	Ligand chemokiny 5/ RANTES (ang. <i>chemokine ligand 5/ Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i>)	neutrofile, monocyty, komórki dendrytyczne, limfocyty T pomocnicze, regulatorowe limfocyty T (Treg)
IDO	Indoleamina-2,3-dioxygenaza (ang. <i>Indoleamine-2,3-dioxygenase</i>)	Mo, komórki dendrytyczne, limfocyty B, limfocyty T, regulatorowe limfocyty T (Treg)
VEGF	Czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (ang. <i>Vascular endothelial growth factor</i>)	komórki dendrytyczne, komórki śródbłonka naczyń, limfocyty T pomocnicze, regulatorowe limfocyty T (Treg)
ICAM	Międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna (ang. <i>Intercellular adhesion molecule</i>)	limfocyty B, komórki mezenchymalne
PGE2	Prostaglandyna E2 (ang. <i>Prostaglandin E2</i>)	makrofagi, monocyty, komórki NK, komórki dendrytyczne, limfocyty T, regulatorowe limfocyty T (Treg)

Tabela 2. Główne typy komórek mezenchymalnych.

Zródło komórek mezenchymalnych	Nazwa komórek w języku polskim	Nazwa komórek w języku angielskim	Skrót
Szypik kostny	MSC pochodzące ze szpiku kostnego	<i>bone marrow-derived mesenchymal stem cells</i>	BM-MSC
Tkanka tłuszczowa	MSC pochodzące z tkanki tłuszczowej	<i>adipocyte-derived mesenchymal stem cells</i>	A-MSC
Tenocyty (komórki ścięgna)	MSC pochodzące z tenocytów	<i>tenocyte-derived mesenchymal stem cells</i>	T-MSC
Pępowina	MSC pochodzące z pępowiny	<i>umbilical cord-derived mesenchymal stem cells</i>	UCB-MSC
Mocz	MSC pochodzące z moczu	<i>urine-derived stem cells</i>	UDSC
Kaletka	MSC pochodzące z kaletki	<i>bursa-derived mesenchymal stem cells</i>	BD-MSC

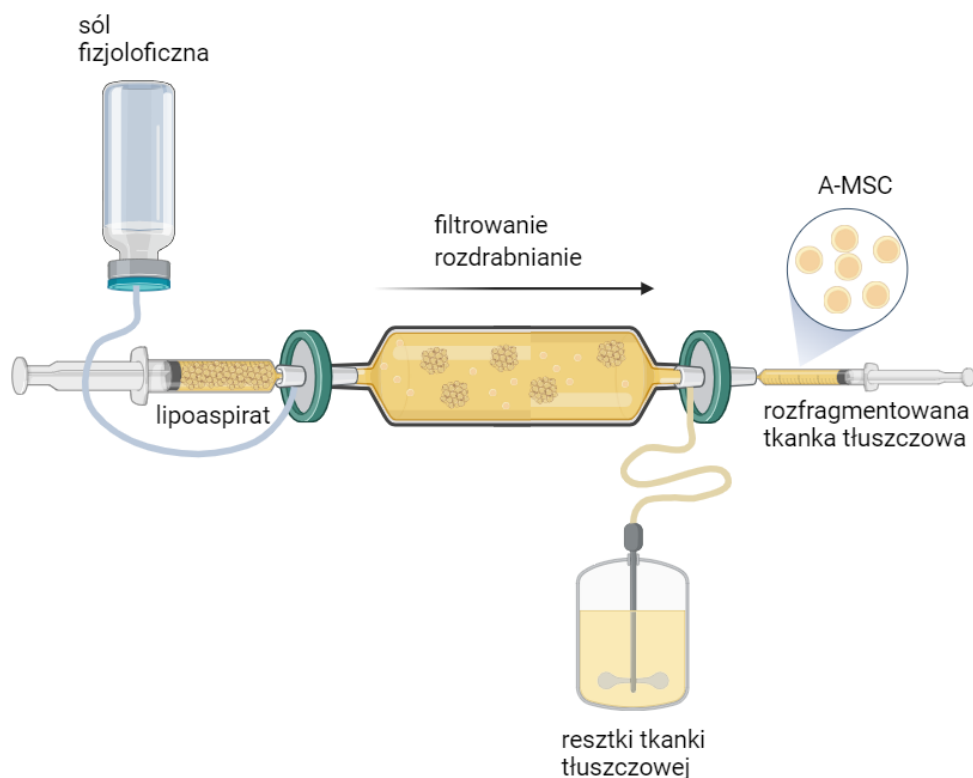


Rycina 2. Pozyskiwanie preparatów bioortopedycznych bogatych w komórki mezenchymalne szpiku kostnego. (A) Pobranie aspiratu szpiku kostnego (BMA). (B) Przygotowanie koncentratu szpiku kostnego (BMC) bogatego w komórki mezenchymalne z aspiratu. (C) Stymulacja szpiku kostnego (BMS) przy pomocy mikrouszkodzeń kości ramiennej.

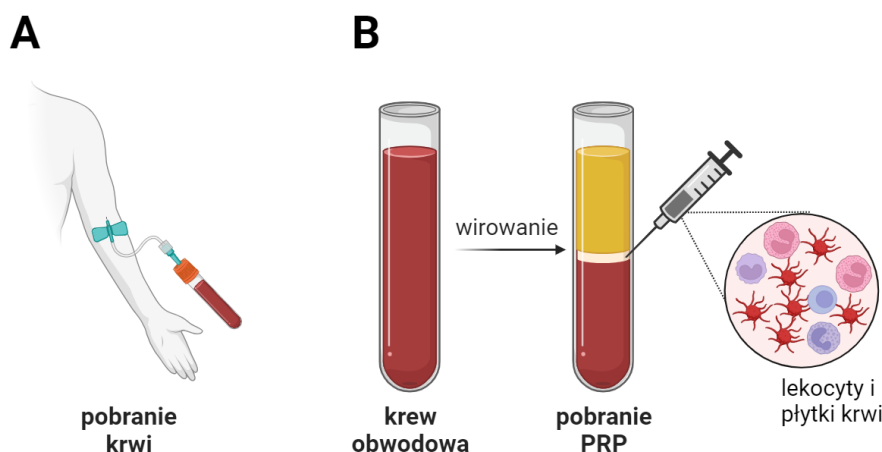
Tabela 3. Wybrane zastosowania preparatów zawierających komórki mezenchymalne w ortopedii.

Typ komórek	Miejsce podania	Leczone schorzenie/uraz	Forma podania	Wyniki zastosowania	Źródło
BM-MSC	Staw ramienny	Uszkodzenie pierścienia rotatorów	Iniekcja	Przyspieszenie gojenia, zapobieganie dalszym uszkodzeniom, po 10 latach obserwacji 87% pacjentów wykazało integralność ścięgna.	[33]
BM-MSC	Staw ramienny	Uszkodzenie pierścienia rotatorów	Augmentacja szwów BMA z talerza biodrowego	Całkowite wygojenie 12 miesiące po terapii.	[34]
BM-MSC	Staw kolanowy	Szpotawość strukturalna kości piszczelowej	BMS metodą mikrozlamań	Lepsze wyniki w KSS, ICRS-CRA, IKDC, WOMAC.	[35]
BM-MSC	Staw kolanowy	Szpotawość strukturalna kości piszczelowej	Iniekcja BMA	Lepsze wyniki w Koshino, ICRS-CRA, IKDC.	[36]
BM-MSC	Staw kolanowy	Szpotawość strukturalna kości piszczelowej	Iniekcja BMA	Lepsze wyniki w, ICRS-CRA, WOMAC	[37]
BM-MSC	Staw kolanowy	Uszkodzenie łąkotki	Augmentacja szwów BMA z talerza biodrowego	Powrót do funkcjonalności, stabilne wyniki w obserwacji dwuletniej.	[38]
A-MSC	Staw ramienny	Uszkodzenie pierścienia rotatorów	Iniekcja AAT	Zagojenie kaletki barkowej po 12 miesiącach, stabilne wyniki przez 2 lata.	[39]
A-MSC	Staw ramienny	Uszkodzenie pierścienia rotatorów	Iniekcja AAT	Lepsze wyniki w ASES w 24. i 52. tygodniu.	[40]
A-MSC	Staw kolanowy	Osteoartroza	Iniekcja AAT	Mniejszy ból odczuwalny (KOOS, VAS).	[41]
A-MSC	Staw kolanowy	Osteoartroza	Iniekcja AAT	Lepsze wyniki w KOOS, IKDC, WOMAC. Powrót do funkcjonalności (TUG, 5xSTS, 10mWT). Poprawa siły mięśniowej (MVIC).	[42]
A-MSC	Staw kolanowy	Osteoartroza	Iniekcja AAT	Lepsze wyniki w KOOS, IKDC, mniejsze dolegliwości bólowe.	[43]

5xSTS – test funkcjonalny kończyny dolnej 5 times Sit-to-Stand, 10 mWT – test funkcjonalny kończyny dolnej 10m Walk Test, ASES – formularz standaryzowanej oceny stawu barkowego American Shoulder and Elbow Surgeons, ICRS-CRA – formularz standaryzowanej oceny stawu kolanowego International Cartilage Repair Society – Cartilage Assessment, IKDC – formularz standaryzowanej oceny stawu kolanowego International Knee Documentation Committee, KOOS – Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score, KSS – formularz standaryzowanej oceny chrząstki Koshino Staging System, MVIS – izometryczny test siły mięśni zginaczy i prostowników Maximal Isometric Voluntary Contraction, TUG – test funkcjonalny kończyny dolnej The Timed Up and Go, VAS – Visual Analogue Scale, WOMAC – formularz standaryzowanej oceny stawu kolanowego Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index.



Rycina 3. Pozyskiwanie preparatów bioortopedycznych bogatych w komórki mezenchymalne z tkanki tłuszczowej (A-MSC). Opis procedury w tekście.



Rycina 4. Pozyskiwanie preparatów bioortopedycznych bogatych w płytki krwi. (A) Pobranie krwi obwodowej. (B) Przygotowanie osocza bogatopłytkowego (PRP) bogatego w leukocyty i płytki krwi.

Tabela 4. Wybrane zastosowania preparatów zawierających komórki mezenchymalne w modelach zwierzęcych schorzeń i urazów ortopedycznych stawu ramiennego.

Typ komórek	Miejsce podania	Leczone schorzenie/ uraz	Model	Forma podania	Wyniki zastosowania	Źródło
T-MSC	Staw ramienny	Uszkodzenie pierścienia rotatorów	Szczur	Iniekcja	Znaczna poprawa naprawy ścięgien, zwiększenie produkcji kolagenu, poprawa orientacji włókien kolagenowych.	[44]
T-MSC	Staw ramienny	Uszkodzenie pierścienia rotatorów	królik	Iniekcja	Zmniejszenie nacieku limfocytów we wczesnej fazie naprawy, poprawa właściwości histologicznych i biomechanicznych.	[45]
UCB-MSC	Staw ramienny	Uszkodzenie pierścienia rotatorów	królik	Iniekcja	Częściowa regeneracja ścięgien rotatorów, poprawa histologiczna.	[46]
UCB-MSC	Staw ramienny	Uszkodzenie pierścienia rotatorów	pies	Iniekcja	UDSC indukowane TGF- β 3 pozostały żywe przez 6 tygodni po operacji. Większy obszar chrząstki włóknistej, większe odkładanie proteoglikanów i wyższa dwójłomność kolagenu w porównaniu z grupą kontrolną już po 12 tygodniach od naprawy.	[47]
BD-MSC	Staw ramienny	Uszkodzenie pierścienia rotatorów	mysz	Augmentacja na rusztowanie ceramiczne	Multipotencjalne różnicowanie <i>in vitro</i> oraz rozległe tworzenie się tkanki kostnej i ścięgienistej.	[48]

Tabela 5. Czynniki wzrostu wydzielane przez płytki krwi i pełnione przez nie funkcje we wspomaganiu leczenia ortopedycznego [49-51].

Czynnik wzrostu	Pełna nazwa	Funkcja czynnika we wspomaganiu leczenia ortopedycznego
PDGF	plytkopochodny czynnik wzrostu (ang. platelet-derived growth factor)	Kluczowy czynnik regulacyjny w naprawie i regeneracji tkanek, stymuluje replikację (mitogenezę) i promuje angiogenezę. Zwiększa populację komórek gojących się, w tym mezenchymalnych komórek macierzystych i komórek osteoprogenitorowych, dlatego PDGF może wspomagać regenerację kości opartą na komórkach macierzystych.
TGF- β	Czynnik transformujący wzrostu β (ang. Transforming growth factor β)	Moduluje syntezę macierzy kostnej poprzez zwiększenie liczby komórek zdolnych do ekspresji osteoblastów i zmniejsza resorpcję kości poprzez indukcję apoptozy osteoklastów. Indukuje fibroblasty do tworzenia kolagenu, komórki śródbłonka do angiogenezy, komórki chondroprogenitorowe do chrząstki i komórki mezenchymalne w celu zwiększenia populacji komórek gojących się ran.
VEGF	Czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (ang. Vascular endothelial growth factor)	Podrodzinę VEGF stanowią białka sygnalizacyjne zaangażowane zarówno w waskulogenezę, jak i angiogenezę, co toruje drogę do gojenia.

oddzielenia frakcji oleistej oraz wyeliminowania pozostałości elementów morfotycznych krwi, które działają prozapalnie (Ryc. 3). Obecnie dostępne są gotowe zestawy komercyjne, które różnią się procesem pobierania oraz przygotowania preparatu bogatego w A-MSC. Powstała

rozfragmentowaną tkankę tłuszczową bogatą w A-MSC zbiera się i wstrzykuje w leczone miejsce.

Efekty terapeutyczne A-MSC przypisuje się pośredniczeniu w ostrym zapaleniu ze zmniejszoną obecnością obrzęków i neutrofilii [7], odwróceniu odpowiedzi blizny

włóknisto-naczyniowej w ostrym gojeniu ścięgien i kości [8], zwiększeniu gęstości mineralnej kości [9], poprawianiu funkcjonowania mięśni i zmniejszaniu nacieków tłuszczowych w mięśniach oraz zwiększeniu powierzchni chrząstki włóknistej [10].

Obecnie we wspomaganiu leczenia ortopedycznego pacjentów zastosowanie znalazły preparaty biologiczne zawierające komórki mezenchymalne pochodzące ze szpiku kostnego i tkanki tłuszczowej (Tabela 3).

TENOCYTY, PĘPOWINA, MOCZ I KALETKA JAKO ŹRÓDŁO KOMÓREK MEZENCHYMALNYCH

Komórki macierzyste pochodzące z tenocytów (znane również jako komórki macierzyste pochodzące ze ścięgien, T-MSC, ang. *tenocyte-derived mesenchymal stem cells*) charakteryzują się potencjałem wielokrotnego różnicowania w tenocyty, chondrocyty, osteocyty i adipocyty, wysoką klonogennością i zdolnością do samoodnawiania [11]. Cechy te, jak również zdolność do wytwarzania tropicznych czynników parakrynych, odgrywają kluczową rolę w poprawie regeneracji połączenia ścięgno-kość [12,13]. Zaproponowano, że wysoki poziom ekspresji genów związanych ze ścięgniem (takich jak COL1A1, tenascyna C (TNC), Scleraxis (Scx) i tenomodulina (TNMD) w TDSC może przyczyniać się do spontanicznego różnicowania tenogenego [14]. Co więcej, wydzielanie genu/białka 6 stymulowanego TNF- α (TSG-6) przez T-MSC może sprzyjać gojeniu ścięgna z kością poprzez modulowanie odpowiedzi na sygnały uszkodzenia, zmniejszanie stanu zapalnego i zapobieganie tworzeniu się tkanki włóknisto-naczyniowej [15].

Preparaty bogate w komórki T-MSC można wyizolować ze ścięgna mięśnia nadgrzebieniowego, a także z głowy długiej ścięgna mięśnia dwugłowego ramienia podczas artroskopowych zabiegów naprawczych [16,17]. Niemniej jednak kliniczne zastosowanie T-MSC jest raczej trudne, ponieważ ich stężenie jest stosunkowo niskie, a szybkość proliferacji komórek jest niewielka [18]. Dodatkowo wykazano, że w hodowlach *in vitro* T-MSC stopniowo tracily swój fenotyp, zwiększał się udział syntezy kolagenu typu III i zmniejszał się poziom ekspresji genów związanych z tenocytami (takich jak TNMD) [19].

Mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące z pępowiny (UCB-MSC, ang. *umbilical cord-derived mesenchymal stem cells*) mają wysoce samoodnawiający, wielokierunkowy potencjał różnicowania, wysoką zdolność proliferacji, niską immunogenność i można je łatwo uzyskać z pępowiny [20,21]. Istotnymi zaletami komórek macierzystych pochodzących z moczu (UDSC, ang. *urine-derived stem cells*), poza silną zdolnością do proliferacji i wielopotencjalnego różnicowania (w osteocyty, chondrocyty, adipocyty, neurocyty i miocyty), są nieinwazyjna i łatwa metoda pobierania [22]. Natomiast odkrycie potencjału komórek macierzystych pochodzących z kaletki (BD-MSC, ang. *bursa-derived mesenchymal stem cells*) przyczyniło się do wyjaśnienia funkcji kaletki podbarkowej – może ona zwiększać właściwości regeneracyjne sąsiadujących tkanek [23]. Komórki BD-MSC charakteryzują się różnicowaniem osteoblastycznym, adipogennym, chondrogennym i tenogennym *in vitro* i *in*

in vivo, wysoką zdolnością proliferacyjną i różnicowaniem w kierunku komórek linii mezenchymalnych z dużą wydajnością [24]. Co więcej, komórki poddane działaniu białka morfogenetycznego kości-12 (BMP-12) wykazały ekspresję markerów tenocytów i przyjęły w hodowli wyrównaną morfologię, a po wysianiu na rusztowania ceramiczne *in vivo* utworzyły kość, a także tkankę przypominającą ścięgno [23,25]. Kilka cech BD-MSC, takich jak ścisła sieć włóknisto-naczyniowa, wysoka zawartość czynników wzrostu i duży potencjał progenitorowy komórek pochodzących z kaletki, może przyspieszać proces gojenia w ortopedii [23,25].

Preparaty biologiczne zawierające komórki mezenchymalne pochodzące z tenocytów, pępowiny, moczu i kaletki znalazły zastosowanie w badaniach schorzeń i urazów ortopedycznych stawu barkowego w modelach zwierzęcych (Tabela 4).

TERAPIE OPARTE NA PREPARATACH BOGATYCH W CZYNNIKI WZROSTU

Osocze bogatopłytkowe (ang. *platelet-rich plasma*, PRP) to produkt biologiczny definiowany jako część osocza krwi autologicznej o dużej koncentracji płytek krwi (trombocytów). Powszechnie przyjętą definicją PRP jest produkt o stężeniu 1,5 mln płytek krwi na 1 μ l osocza [26]. Proces przygotowania PRP (Ryc. 4) polega na pobraniu krwi obwodowej (zwykle 10 ml), a następnie jej odwirowaniu w celu separacji warstw: dolna warstwa (czerwona) zawiera erytrocyty, środkowa warstwa (biała) zawiera leukocyty i płytki krwi (PRP), a górna warstwa (żółta) stanowi osocze ubogopłytkowe (ang. *platelet-poor plasma*, PPP). Następnie PRP zostaje zebrane i wstrzyknięte w żądane miejsce, zazwyczaj jednorazowo podczas operacji i dodatkowo 2-3 razy podczas wizyt kontrolnych.

Potencjał wspomagania leczenia ortopedycznego osocza bogatopłytkowego leży przede wszystkim w granulach α , które zawierają ponad 30 bioaktywnych białek, z których wiele odgrywa zasadniczą rolę w hemostazie i/lub gojeniu tkanek [27]. Białka te obejmują m.in. czynniki wzrostu, chemokiny i cytokiny [28] (Tabela 5). Po uszkodzeniu tkanki lub bodźcu chirurgicznym, płytki krwi ulegają agregacji (aktywacja), a granulki α uwalniają do otoczenia część białek (degranulacja) już w ciągu 10 minut po skrzepnięciu, przy czym ponad 95% czynników wzrostu jest wydzielanych w ciągu 1 godziny [29]. Po tym początkowym „wyrzucie” czynników wzrostu, płytki krwi syntetyzują i wydzielają dodatkowe czynniki wzrostu przez kilka pozostałych dni swojego życia.

Choć w publikacjach naukowych zazwyczaj nie są zawarte informacje na temat parametrów molekularnych PRP stosowanych u pacjentów (np. stężenia płytek krwi bądź poziomu ekspresji genów kodujących czynniki wzrostu), wiele z nich wskazuje na pozytywne efekty PRP we wspomaganiu leczenia ortopedycznego. Każdego roku przybywa znacząca liczba doniesień literaturowych dotyczących wykorzystania PRP w ortopedii. Nasze wyszukiwanie publikacji w bazie PubMed w dniu 3 listopada 2023 roku przy użyciu słów kluczowych „platelet-rich plasma” oraz „knee” wskazało na istnienie blisko 1 300 publikacji ukazujących się

systematycznie od roku 2009, w tym 126 randomizowanych badań klinicznych, 81 metaanaliz i 149 systematycznych prac przeglądowych. Podobnie, wyszukiwanie publikacji w bazie PubMed przy użyciu słów kluczowych „platelet-rich plasma” oraz „shoulder” wskazało na istnienie ponad 400 publikacji ukazujących się systematycznie od roku 2007, w tym 59 randomizowanych badań klinicznych, 45 metaanaliz i 56 systematycznych prac przeglądowych. Taka ilość prac jednoznacznie wskazuje na aktualność i ważność tematu. Choć nie sposób przedstawić Państwu wyniki wszystkich prac, dwie najbardziej obszerne analizy systematyczne (obejmujące 42 publikacje z zakresu wykorzystania PRP w chorobie zwyrodnieniowej stawu kolanowego [30] oraz 13 metaanaliz z zakresu wykorzystania PRP w uszkodzeniu pierścienia rotatorów [31]) wskazują jednoznacznie na korzyści kliniczne zastosowania osocza bogatopłytkowego w ortopedii, w tym przyspieszenie gojenia, zapobieganie dalszym uszkodzeniom i poprawę wyników funkcjonalnych pacjentów.

PODSUMOWANIE

Uszkodzenia narządu ruchu prowadzą do ograniczenia aktywności życia codziennego (ang. *activities of daily living*, ADL) i znacznie pogarszają mobilność i jakość życia. Możliwości kliniczne chirurgii i konwencjonalnych metod leczenia są w pewnym stopniu ograniczone, co może przekładać się na niepełną efektywność i mniejsze zadowolenie pacjentów. Istnieje wiele badań wskazujących na wspomaganie regeneracji prawidłowej mikroarchitektury przyczepu ścięgno-kość poprzez zastosowanie terapii ortobiologicznych z wykorzystaniem preparatów zawierających osocze bogatopłytkowe z czynnikami wzrostu czy komórki macierzyste. Wspomaganie ortobiologiczne nie jest zatem metodą leczniczą, a jedynie elementem wspomagającym właściwy proces leczenia. Obecnie jednym z szeroko badanych zagadnień jest wykorzystanie w ortopedii komórek macierzystych modyfikowanych przed implantacją poprzez ekspozycję na różne czynniki wzrostu lub modyfikację warunków hodowli, w celu uzyskania pożądanego fenotypu. Co więcej, nowo poznany przeciwzapalny i przeciwapoptotyczny wpływ komórek macierzystych na gojenie się tkanek może mieć ogromny potencjał w zakresie regeneracji i poprawy funkcjonalności stawów. Niemniej jednak, aby leczenie biologiczne było bardziej skuteczne i jeszcze bardziej usprawniało gojenie, konieczne jest lepsze zrozumienie molekularnych mechanizmów fizjologicznego gojenia ścięgien.

PIŚMIENNICTWO

- Liu J, Gao J, Liang Z, Gao C, Niu Q, Wu F, Zhang L (2022) Mesenchymal stem cells and their microenvironment. *Stem Cell Res Ther* 13(1): 429
- Costela-Ruiz VJ, Melguizo-Rodríguez L, Bellotti C, Illescas-Montes R, Stanco D, Arciola CR, Lucarelli E (2022) Different Sources of Mesenchymal Stem Cells for Tissue Regeneration: A Guide to Identifying the Most Favorable One in Orthopedics and Dentistry Applications. *Int J Mol Sci* 23(11): 6356
- Furia JP, Lundeen MA, Hurd JL, Pearce DA, Alt C, Alt EU, Schmitz C, Maffulli N (2022) Why and how to use the body's own stem cells for regeneration in musculoskeletal disorders: a primer. *J Orthop Surg Res* 17(1): 36
- Wang HN, Rong X, Yang LM, Hua WZ, Ni GX (2022) Advances in Stem Cell Therapies for Rotator Cuff Injuries. *Front Bioeng Biotechnol* 10: 866195
- Gonzalez-Vilchis RA, Piedra-Ramirez A, Patiño-Morales CC, Sanchez-Gomez C, Beltran-Vargas NE (2022) Sources, Characteristics, and Therapeutic Applications of Mesenchymal Cells in Tissue Engineering. *Tissue Eng Regen Med* 19(2): 325-361
- Bunnell BA (2021) Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cells* 10(12): 3433
- Valencia Mora M, Antuña Antuña S, García Arranz M, Carrascal MT, Barco R (2014) Application of adipose tissue-derived stem cells in a rat rotator cuff repair model. *Injury* 45 Suppl 4: S22-27
- Lipner J, Shen H, Cavinatto L, Liu W, Havlioglu N, Xia Y, Galatz LM, Thomopoulos S (2015) In Vivo Evaluation of Adipose-Derived Stromal Cells Delivered with a Nanofiber Scaffold for Tendon-to-Bone Repair. *Tissue Eng Part A* 21(21-22): 2766-2774
- Kaizawa Y, Franklin A, Leyden J, Behn AW, Tulu US, Sotelo Leon D, Wang Z, Abrams GD, Chang J, Fox PM (2019) Augmentation of chronic rotator cuff healing using adipose-derived stem cell-seeded human tendon-derived hydrogel. *J Orthop Res* 37(4): 877-886
- Shin MJ, Shim IK, Kim DM, Choi JH, Lee YN, Jeon IH, Kim H, Park D, Kholinne E, Yang HS, Koh KH (2020) Engineered Cell Sheets for the Effective Delivery of Adipose-Derived Stem Cells for Tendon-to-Bone Healing. *Am J Sports Med* 48(13): 3347-3358
- Li Y, Wu T, Liu S (2021) Identification and Distinction of Tenocytes and Tendon-Derived Stem Cells. *Front Cell Dev Biol* 9: 629515
- Wei B, Lu J (2021) Characterization of Tendon-Derived Stem Cells and Rescue Tendon Injury. *Stem Cell Rev Rep* 17(5): 1534-1551
- Shengnan Q, Bennett S, Wen W, Aiguo L, Jiakex X (2021) The role of tendon derived stem/progenitor cells and extracellular matrix components in the bone tendon junction repair. *Bone* 153: 116172
- Hou Y, Ni M, Lin S, Sun Y, Lin W, Liu Y, Wang H, He W, Li G, Xu L (2017) Tenomodulin highly expressing MSCs as a better cell source for tendon injury healing. *Oncotarget* 8(44): 77424-77435
- Cheng B, Ge H, Zhou J, Zhang Q (2014) TSG-6 mediates the effect of tendon derived stem cells for rotator cuff healing. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 18(2): 247-251
- Tsai CC, Huang TF, Ma HL, Chiang ER, Hung SC (2013) Isolation of mesenchymal stem cells from shoulder rotator cuff: a potential source for muscle and tendon repair. *Cell Transplant* 22(3): 413-422
- Randelli P, Margheritini F, Cabitza P, Dogliotti G, Corsi MM (2009) Release of growth factors after arthroscopic acromioplasty. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 17(1): 98-101
- Tan Q, Lui PP, Lee YW (2013) In vivo identity of tendon stem cells and the roles of stem cells in tendon healing. *Stem Cells Dev* 22(23): 3128-3140
- Docheva D, Hunziker EB, Fässler R, Brandau O (2005) Tenomodulin is necessary for tenocyte proliferation and tendon maturation. *Mol Cell Biol* 25(2): 699-705
- Alatyyat SM, Alasmari HM, Aleid OA, Abdel-Maksoud MS, Elsherbiny N (2020) Umbilical cord stem cells: Background, processing and applications. *Tissue Cell* 65: 101351
- Lyons FG, Mattei TA (2019) Sources, Identification, and Clinical Implications of Heterogeneity in Human Umbilical Cord Stem Cells. *Adv Exp Med Biol* 1169: 243-256
- Ji X, Wang M, Chen F, Zhou J (2017) Urine-Derived Stem Cells: The Present and the Future. *Stem Cells Int* 2017: 4378947
- Klatte-Schulz F, Thiele K, Scheibel M, Duda GN, Wildemann B (2022) Subacromial Bursa: A Neglected Tissue Is Gaining More and More Attention in Clinical and Experimental Research. *Cells* 11(4): 663
- Muench LN, Baldino JB, Berthold DP, Kia C, Lebaschi A, Cote MP, McCarthy MB, Mazzocca AD (2020) Subacromial Bursa-Derived Cells Demonstrate High Proliferation Potential Regardless of Patient Demographics and Rotator Cuff Tear Characteristics. *Arthroscopy* 36(11): 2794-2802
- Song N, Armstrong AD, Li F, Ouyang H, Niyibizi C (2014) Multipotent mesenchymal stem cells from human subacromial bursa: poten-

- tial for cell based tendon tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 20(1-2): 239-249
26. Weibrich G, Kleis WK, Hafner G, Hitzler WE (2002) Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J Craniomaxillofac Surg* 30(2): 97-102
 27. Harrison P, Cramer EM (1993) Platelet alpha-granules. *Blood Rev* 7(1): 52-62
 28. Alves R, Grimalt R (2018) A Review of Platelet-Rich Plasma: History, Biology, Mechanism of Action, and Classification. *Skin Appendage Disord* 4(1): 18-24
 29. Marx RE (2004) Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg* 62(4): 489-496
 30. Reale D, Feltri P, Franceschini M, de Girolamo L, Laver L, Magalon J, Sanchez M, Tischer T, Filardo G (2023) Biological intra-articular augmentation for osteotomy in knee osteoarthritis: strategies and results : A systematic review of the literature from the ESSKA Orthobiologics Initiative. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 31(10): 4327-4346
 31. Ahmad Z, Ang S, Rushton N, Harvey A, Akhtar K, Dawson-Bowling S, Noorani A (2022) Platelet-Rich Plasma Augmentation of Arthroscopic Rotator Cuff Repair Lowers Retear Rates and Improves Short-Term Postoperative Functional Outcome Scores: A Systematic Review of Meta-Analyses. *Arthrosc Sports Med Rehabil* 4(2): e823-e833
 32. Kyurkchiev D, Bochev I, Ivanova-Todorova E, Mourdjeva M, Oreshkova T, Belemezova K, Kyurkchiev S (2014) Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells* 6(5): 552-570
 33. Hernigou P, Flouzat Lachaniette CH, Delambre J, Zilber S, Duffiet P, Chevallier N, Rouard H (2014) Biologic augmentation of rotator cuff repair with mesenchymal stem cells during arthroscopy improves healing and prevents further tears: a case-controlled study. *Int Orthop* 38(9): 1811-1818
 34. Ellera Gomes JL, da Silva RC, Silla LM, Abreu MR, Pellanda R (2012) Conventional rotator cuff repair complemented by the aid of mononuclear autologous stem cells. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 20(2): 373-377
 35. Jin Q-H, Chung Y-W, Na S-M, Ahn H-W, Jung D-M, Seon J-K (2021) Bone marrow aspirate concentration provided better results in cartilage regeneration to microfracture in knee of osteoarthritic patients. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 29: 1090-1097
 36. Yang HY, Song EK, Kang SJ, Kwak WK, Kang JK, Seon JK (2021) Allogenic umbilical cord blood-derived mesenchymal stromal cell implantation was superior to bone marrow aspirate concentrate augmentation for cartilage regeneration despite similar clinical outcomes. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 30(1): 208-218
 37. Lee NH, Na SM, Ahn HW, Kang JK, Seon JK, Song EK (2021) Allogenic human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells is more effective than bone marrow aspiration concentrate for cartilage regeneration after high tibial osteotomy in medial unicompartmental osteoarthritis of knee. *Arthroscopy* 37(8): 2521-2530
 38. Whitehouse MR, Howells NR, Parry MC, Austin E, Kafienah W, Brady K, Goodship AE, Eldridge JD, Blom AW, Hollander AP (2017) Repair of torn avascular meniscal cartilage using undifferentiated autologous mesenchymal stem cells: from in vitro optimization to a first-in-human study. *Stem Cells Transl Med* 6(4): 1237-1248
 39. Jo CH, Chai JW, Jeong EC, Oh S, Yoon KS (2020) Intratendinous Injection of Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Rotator Cuff Disease: A 2-Year Follow-Up Study. *Arthroscopy* 36(4): 971-980
 40. Hurd JL, Facile TR, Weiss J, Hayes M, Hayes M, Furia JP, Maffulli N, Winnier GE, Alt C, Schmitz C, Alt EU, Lundeen M (2020) Safety and efficacy of treating symptomatic, partial-thickness rotator cuff tears with fresh, uncultured, unmodified, autologous adipose-derived regenerative cells (UA-ADRCs) isolated at the point of care: a prospective, randomized, controlled first-in-human pilot study. *J Orthop Surg Res* 15(1): 122
 41. Koh YG, Kwon OR, Kim YS, Choi YJ (2014) Comparative outcomes of open-wedge high tibial osteotomy with platelet-rich plasma alone or in combination with mesenchymal stem cell treatment: a prospective study. *Arthroscopy* 30:1453-1460
 42. Kaszyński J, Bąkowski P, Kiedrowski B, Stołowski Ł, Wasilewska-Burczyk A, Grzywacz K, Piontek T (2022) Intra-Articular Injections of Autologous Adipose Tissue or Platelet-Rich Plasma Comparably Improve Clinical and Functional Outcomes in Patients with Knee Osteoarthritis. *Biomedicines* 10(3): 684
 43. Bąkowski P, Kaszyński J, Baka C, Kaczmarek T, Ciemniewska-Gorzela K, Bąkowska-Żywicka K, Piontek T (2023) Patients with stage II of the knee osteoarthritis most likely benefit from the intra-articular injections of autologous adipose tissue-from 2 years of follow-up studies. *Arch Orthop Trauma Surg* 143(1): 55-62
 44. Harada Y, Mifune Y, Inui A, Sakata R, Muto T, Takase F, Ueda Y, Kataoka T, Kokubu T, Kuroda R, Kurosaka M (2017) Rotator cuff repair using cell sheets derived from human rotator cuff in a rat model. *J Orthop Res* 35(2): 289-296
 45. Shen W, Chen J, Yin Z, Chen X, Liu H, Heng BC, Chen W, Ouyang HW (2012) Allogeneous tendon stem/progenitor cells in silk scaffold for functional shoulder repair. *Cell Transplant* 21(5): 943-958
 46. Park GY, Kwon DR, Lee SC (2015) Regeneration of Full-Thickness Rotator Cuff Tendon Tear After Ultrasound-Guided Injection With Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells in a Rabbit Model. *Stem Cells Transl Med* 4(11): 1344-1351
 47. Chen Y, Xu Y, Li M, Shi Q, Chen C (2020) Application of Autogenous Urine-Derived Stem Cell Sheet Enhances Rotator Cuff Healing in a Canine Model. *Am J Sports Med* 48(14): 3454-3466
 48. Song N, Armstrong AD, Li F, Ouyang H, Niyibizi C (2014) Multipotent mesenchymal stem cells from human subacromial bursa: potential for cell based tendon tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 20(1-2): 239-249
 49. Mizuno M, Katano H, Otabe K, Komori K, Matsumoto Y, Fujii S, Ozeki N, Tsuji K, Koga H, Muneta T, Matsuyama A, Sekiya I (2015) Platelet-derived growth factor (PDGF)-AA/AB in human serum are potential indicators of the proliferative capacity of human synovial mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 6: 243
 50. Klein GL (2022) Transforming Growth Factor-Beta in Skeletal Muscle Wasting. *Int J Mol Sci* 23(3): 1167
 51. Ferrara N, Gerber HP (2001) The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Haematol* 106(4): 148-156

Biological strategies supporting the orthopaedic treatment

Maciej Pawlak¹, Joanna Wałęcka¹, Paweł Bąkowski², Agata Tyczewska², Kamilla Grzywacz^{2✉}

¹Rehasport Clinic, Poznań

²Institute of Bioorganic Chemistry Polish Academy of Sciences, Poznań

✉corresponding author: kamilla.grzywacz@ibch.poznan.pl

Keywords: mesenchymal cells, biological matrix, platelet-rich plasma, autologous adipose tissue

ABSTRACT

Damage to the musculoskeletal system significantly impairs mobility and quality of life, limiting everyday activities. For a successful orthopedic treatment, anatomical, physiological and biomechanical factors must be taken into account as they all influence tissue healing. It is therefore of crucial importance to support traditional treatment with biological therapies, as they facilitate the regeneration of the tissue microarchitecture. Such orthobiologics work at the cellular level (orthobiologics rich in mesenchymal cells or growth factors) or at the tissue level (matrices for repairing e.g. cartilage). In this review, we describe the most frequently used orthobiologics rich in mesenchymal cells (bone marrow, autologous adipose tissue, tenocytes, umbilical cord, urine and bursa) and growth factors, presenting the molecular basis of their functioning and their clinical effectiveness.

