

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE BIOMEDICHE**

Ciclo XXVIII

Settore Concorsuale di afferenza: MED/33

Settore Scientifico disciplinare:06/F4

**SOPRAVVIVENZA ED INTEGRAZIONE DEL TRAPIANTO
OSTEOCONDRALE BIPOLARE FRESCO DI CAVIGLIA: TIPIZZAZIONE
GENETICA E CARATTERISTICHE FENOTIPICHE DEL TESSUTO
TRAPIANTATO**

Presentata da: Dr. Alberto Ruffilli

Coordinatore Dottorato

Prof. Lucio Cocco

Relatore

Prof. Roberto Buda

Esame finale anno 2015 / 2016

INTRODUZIONE

L'artrosi post-traumatica di tibio-tarsica rappresenta tuttora un problema terapeutico e conduce a severe limitazioni funzionali per il paziente. Gli interventi chirurgici tradizionalmente praticati per il trattamento di questa patologia sono l'artrodesi e la sostituzione protesica dell'articolazione.[1,2,3] Nei casi in cui l'articolazione medio-tarsica abbia un escursione articolare completa e non sia artrosica, l'artrodesi di caviglia garantisce la scomparsa della sintomatologia dolorosa, sebbene siano presenti a seguito di questa procedura limitazioni di ordine funzionale e psicologico.[1,4] D'altronde in pazienti giovani ed attivi, la sostituzione protesica pone il problema dell'inevitabile deterioramento delle componenti. Per queste ragioni la ricerca si è orientata verso soluzioni sostitutive di tipo biologico.[5]

L'idea del trapianto da donatore è certamente la possibilità più affascinante, in quanto sostituire un organo danneggiato con uno simile, in grado di sopravvivere al trapianto, oltre ad essere la soluzione più naturale, è anche quella che ha l'obiettivo di restituire al paziente un'articolazione completamente integrabile, valida e meno soggetta ad usura.

Inizialmente le indicazioni per l'allograft, che prevedeva l'uso di trapianti massivi congelati, si restringeva alla chirurgia di salvataggio nell'ambito dell'ortopedia oncologica. L'alto numero di complicanze e la scarsa vitalità condrocitaria dovuta al congelamento, associata ad un miglioramento delle procedure di conservazione del materiale osteocartilagineo da impiantare, hanno aperto l'orizzonte al trapianto osteocondrale fresco. Il razionale alla base del trapianto osteocondrale è quello di trapiantare un organo intatto, costituito di osso e cartilagine vitale, in grado di integrarsi con il ricevente e di sostituire un'articolazione danneggiata ottenendo un buon risultato funzionale, senza peraltro compromettere la possibilità di una sostituzione protesica futura. [6,7,8,9]

Il trapianto osteocondrale è una tecnica chirurgica usata con successo per molti anni nel trattamento

di lesioni osteocondrali ampie. Il trapianto osteocondrale fresco totale di tibio-tarsica è stato proposto in tempi recenti come valida e realizzabile alternativa all'artrodesi nel trattamento di artrosi postraumatica di tibio-tarsica nel paziente giovane e attivo. [10,11,12,13]

Nonostante l'uso sempre più estensivo di tale procedure, poco si conosce sull'effettiva sopravvivenza delle cellule dell'allograft e sulla sua integrazione in seguito all'impianto. Numerosi studi supportano il mantenimento della vitalità in vivo delle cellule cartilaginee dell'allograft anche a distanza di svariati anni dall'impianto ma senza determinazione dell'origine delle cellule stesse. [14,15,16,17] Alcuni studi hanno indagato questo aspetto, in maggioranza case reports su allograft parziali di ginocchio, sostenendo come le cellule del ricevente non colonizzino l'innesto eccezion fatta per piccoli foci di tessuto fibrocartilagineo.[18,19,20,21] In particolare uno studio su allograft parziali nel ginocchio ha dimostrato la presenza di sola cartilagine vitale derivante da donatore sui prelievi bioptici eseguiti a 3 anni di distanza dall'impianto [20], mentre un solo case report su un pregresso allograft parziale di ginocchio riporta come a 29 anni di distanza dall'impianto sia stata ritrovata una popolazione cellulare mista donatore/ricevente [21].

Differentemente da ciò che accade nei trapianti osteocondrali gli allotrapianti tendinei, legamentosi e meniscali mostrano un progressivo ricambio cellulare con una colonizzazione del tessuto trapiantato da parte di cellule del ricevente.[22] Nelle capra innesti freschi di tendine rotuleo e legamento crociato anteriore perdono in fretta la popolazione di cellule originarie del donatore che vengono rimpiazzata da cellule del ricevente in poche settimane.[22] Risultati simili si osservano dopo impianto di allograft meniscali nel paziente umano a circa 3 mesi dall'impianto.[15]

In questo studio vengono analizzati trapianti osteocondrali freschi totali di caviglia in cui la cartilagine del ricevente è stata totalmente sostituita con quella del donatore. Lo scopo principale di questo lavoro era esplorare il potenziale delle cellule del ricevente di integrarsi nella cartilagine trapiantata e, in caso affermativo, di identificare quale tra le due popolazioni cellulare fosse quella maggiormente rappresentata. Endpoint secondario di questo studio era investigare l'influenza di un

eventuale colonizzazione cartilaginea da parte di cellule del ricevente sull'outcome clinico. A questo scopo al momento dell'impianto, le cellule cartilaginee di donatore e ricevente sono state tipizzate dal punto di vista genetico. A distanza di 21 mesi dall'impianto osteocondrale, i pazienti sono stati sottoposti a rimozione dei mezzi di sintesi ed al prelievo di un frammento bioptico osteocondrale. I frammenti sono stati analizzati valutandone il pattern genotipico ed inoltre la produzione di markers specifici della serie cartilaginea, ossea e mesenchimale così da tipizzare in maniera indiretta il tipo di cellule rinvenute nell'allograft a distanza di tempo.

ALLOGRAFT FRESCHI DI CAVIGLIA: STATO DELL'ARTE

Il trapianto di un'articolazione di banca in sostituzione di una danneggiata è stata già ampiamente sperimentata in passato.

La prima serie di casi di trapianti osteocondrali fu pubblicata nel 1908 da Lexer et al: si trattava di 11 allograft monopolari di caviglia e a 23 di ginocchio destinati al trattamento di patologie oncologiche e post-infettive, in particolare sarcomi, osteomieliti e tubercolosi. [23]

Tuttavia, solo con gli studi di Bonfiglio et al e di Chalmers del 1955 e del 1959, eseguiti sul modello animale canino, si è valutato per la prima volta il ruolo della risposta immunologica al tessuto trapiantato: il processo di osteointegrazione dell'allograft può trarre giovamento dall'uso di trapianti congelati rispetto a quelli freschi, riducendo la risposta immunologica dell'ospite. [24, 25]

In seguito a queste valutazioni, l'uso di trapianti congelati infatti ha tratto significativo impulso nella chirurgia di salvataggio, oncologica e traumatologica: Numerose furono le complicanze descritte: fratture (20%), pseudoartrosi della giunzione tra osso dell'ospite e innesto (11-17%) e infezioni (10-15%). In particolare, sono emersi due punti deboli importanti nell'uso di allograft congelati: innanzitutto, la perdita di vitalità dei condrociti, legata al congelamento, condiziona fortemente la qualità del risultato; inoltre, l'uso di impianti massivi riduce la possibilità di integrazione del trapianto da parte del ricevente, risultando in un'alta percentuale di mancate consolidazioni e fratture del trapianto stesso. [26]

Pertanto, l'uso di allograft massivi congelati è stato proficuamente associato con l'uso di protesi in diverse forme e combinazione, in maniera da mantenere nel tempo una funzionalità articolare accettabile.

Lo stoccaggio dei tessuti espantati ha subito significative migliorie recentemente, soprattutto nel campo delle tecniche di conservazione e di diagnostica delle infezioni. Questo, unito ai risultati non

sempre positivi dei trapianti congelati, ha portato ad una maggiore applicabilità del trapianto osteocondrale fresco a livello di svariati distretti anatomici, in particolare anca, ginocchio e caviglia.

L'anca è stata oggetto di trapianti allograft solo marginalmente, per le osteonecrosi e l'osteochondrite dissecante, raggiungendo risultati incoraggianti [27, 28].

Il ginocchio è certamente il distretto in cui l'uso di allograft parziali ha trovato maggiore applicazione nella riparazione di difetti osteocondrali mono o bipolari di varia entità, essendo la sostituzione protesica del ginocchio di modesto successo nel paziente giovane e attivo. Nello studio di Beaver et al [29], che considerava 98 pazienti operati allograft mono o bipolare per ampie lesioni osteocondrali, il 63% dei pazienti ha raggiunto risultati soddisfacenti a 14 anni di follow-up.

La percentuale di successo fu inferiore nei trapianti bipolari (indipendentemente dall'età) e nei pazienti con età uguale o superiore ai 60 anni.

Nello studio condotto da Gross et al. [30], 126 pazienti trattati mediante allograft bipolare parziale hanno raggiunto buoni risultati nell'85% dei casi (125 pazienti a 10 anni di follow-up). Bugbee [31] ha utilizzato i trapianti osteocondrali nel ginocchio come trattamento di salvataggio a seguito di altre procedure di riparazione cartilaginea fallite. L'autore ha descritto un tasso >75% di successi nel trattamento delle lesioni focali dei condili femorali in seguito a trauma, nelle osteochondriti dissecanti, nelle necrosi avascolari e nell'artrosi posttraumatica.

I punti dove concentrare la ricerca, individuati da Bugbee, risultano gli aspetti tecnici della tecnica chirurgica e la biologia dei trapianti osteoarticolari, al fine di migliorare l'osteointegrazione e la sopravvivenza dei condrociti.

I buoni risultati di Bugbee sono stati confermati anche nel lavoro di Gross, che ha riportato la sua esperienza sul ginocchio a 10 anni di follow-up, confrontandola con la letteratura disponibile, sostanzialmente in linea con i buoni esiti descritti. [32]

La prima serie di trapianti osteocondrali massivi nella caviglia è stata riportata da Bugbee et al. [33], ma la tecnica chirurgica di trapianto di entrambe le superfici articolari della caviglia venne messa a punto da Kim et al., utilizzando le sole superfici articolari e un sottile strato osseo per favorire al massimo l'osteointegrazione del trapianto (trapianti a conchiglia). L'autore riporta una serie di 7 pazienti con follow-up medio di 148 mesi (range, 85-198). Tre sono i cattivi risultati descritti e la percentuale di complicanze vanno dalla frammentazione del trapianto alla mancata consolidazione.

Meehan et al. [34] hanno riportato risultati ottenuti in 9 pazienti trattati con allograft totale e 2 con allograft parziale. Sono stati riportati cinque fallimenti, di cui tre hanno reimpiantato un nuovo allograft, uno è andato incontro a protesizzazione e l'altro invece non ha subito un ulteriore trattamento nonostante il collasso del graft. Jeng et al. [10] hanno pubblicato una casistica di 29 allograft totali di caviglia, di cui 14 sono andati incontro a fallimento e perciò revisionati con nuovo allograft, protesi o artrodesi. I fattori prognostici negativi sono stati individuati nell'elevato body mass index, nell'età e nel malallineamento pre-operatorio. Giannini et al. [35] hanno riportato una casistica di 32 allograft totali di caviglia con un follow-up medio di 31,2 mesi. Secondo i parametri della scala AOFAS sei risultati erano eccellenti, undici buoni, nove accettabili e sei scarsi. Cinque casi hanno subito un'artrodesi a 24 mesi dell'intervento per fallimento del trapianto, mentre in un paziente è stata eseguita una toilette artroscopica. In questa casistica, interventi associati erano stati 8 allungamenti del tendine di achille, 3 ostetomia del 1 metatarsale e tenotomia estensore lungo delle dita, 1 tenodesi del peronei e 1 intervento di artrodesi correttiva con cuneo osseo della sottoastragalica. In particolare in un caso esito di piede torto inveterato con molteplici artrodesi ipsilaterali della mediotarsica, l'allograft è stato utilizzato per sostituire la caviglia e ripristinarne il movimento. In seguito nel 2014, sempre il gruppo di Giannini, ha pubblicato una casistica di 26 pazienti trattati con trapianto osteocondrale fresco impiantato attraverso una via d'accesso anteriore alla caviglia. In questa casistica sono stati riportati risultati soddisfacenti nel 76% dei casi, con 6 fallimenti ad un follow-up ragguardevole di 40.9 ± 14.1 mesi [36]. In questa casistica sono stati

eseguiti come interventi accessori 15 allungamenti del tendine di achille, 1 tenotomia del flessore lungo del 1 dito e 1 tenodesi del peronei.

I fattori fondamentali per una buona riuscita del trapianto sono il corretto posizionamento delle componenti, una stretta corrispondenza dimensionale tra le superfici del donatore e quelle del ricevente, e il carico completo concesso a 6 mesi dall'intervento.

In un lavoro di Haene et al [37], 17 caviglie operate di trapianto fresco allogenico osteocondrale per difetti grandi e profondi sono stati clinicamente e radiologicamente valutati a 4 anni di follow-up.

Quattro caviglie su 17 hanno avuto risultati eccellenti, cinque sono falliti. La valutazione radiologica a medio termine ha mostrato diversi casi di degenerazione. In un lavoro di Bugbee [38], dove 88 caviglie sono state sottoposte a trapianto osteocondrale fresco bipolare per artrosi sintomatica, la sopravvivenza dell'allotrapianto ha raggiunto il 76% a 5 anni e 44% a 10 anni

MATERIALI E METODI

CASISTICA

Ventidue pazienti, 15 maschi e 7 femmine (età media: 35 anni; range 18-45, DS 8,2), affetti da artrosi post-traumatica di III grado alla caviglia sono stati sottoposti a trapianto osteocondrale fresco di caviglia (12 caviglie destre e 10 sinistre). Il tempo medio intercorso tra la diagnosi e la chirurgia è stato di 14 ± 9 mesi. Criteri di inclusione sono stati: pazienti < 50 anni affetti da artrosi bipolare post-traumatica. Le controindicazioni invece hanno incluso severo sovvertimento articolare, instabilità, malallineamenti, osteoporosi, artrite reumatoide, infezioni, disordini vascolari e tumori maligni. I trapianti osteocondrali sono stati prelevati da donatori giovani in regime di sterilità. I donatori sono stati identificati attraverso il programma della banca dell'osso per la donazione dei tessuti. Sono stati registrati l'età, il sesso e il gruppo sanguigno del donatore (ABO).

Il prelievo della caviglia dal donatore ha richiesto l'escissione dell'intera articolazione con la capsula articolare intatta e la membrana sinoviale. La caviglia è stata in seguito posta in un contenitore sterile contenente una soluzione di L-glutamina, NaHCO_3 ed antibiotici. Il campione è stato poi conservato a 4°C fino al momento del trapianto, che è stato generalmente condotto entro 14 giorni. L'intervallo tra la raccolta ed il trapianto nei casi valutati è stato di $10,6 \pm 3,3$ (range 4-14) giorni.

Le dimensioni della tibia e dell'astragalo del donatore sono state valutate mediante esami diagnostici tomografici ed il candidato appropriato è stato selezionato non appena condotta la misura della caviglia. In questa serie di pazienti non è stato condotto nessun esame di compatibilità tra il tessuto del donatore e quello del ricevente.

Tutti i pazienti hanno espresso il loro consenso informato all'impianto e alla rivalutazione e lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Istituto Ortopedico Rizzoli. I pazienti sono stati

valutati pre-operatoriamente a 21 mesi ed al follow-up finale di 61 ± 13.6 mesi con valutazione radiografica e con l'American Orthopaedic Foot and Ankle Score (AOFAS)[39].

TECNICA CHIRURGICA

Preparazione del trapianto:

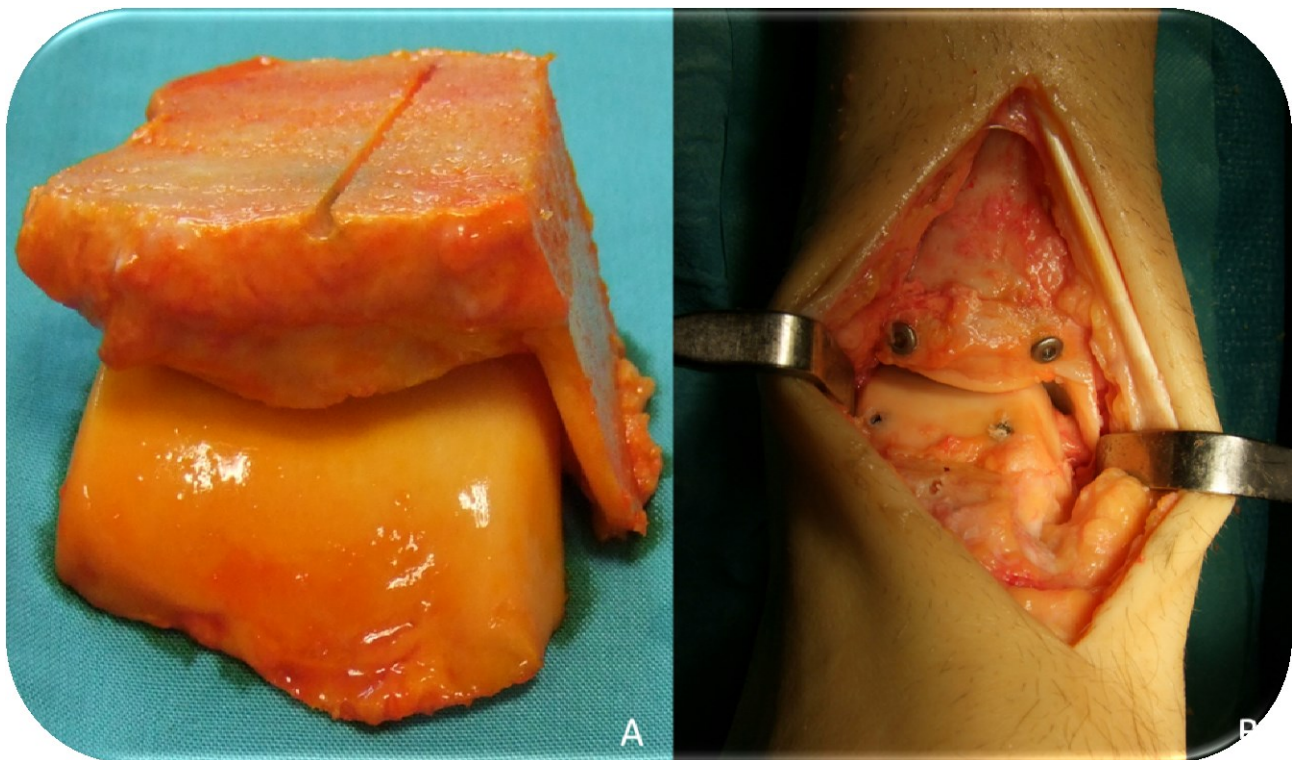
L'allograft viene prelevato in regime di sterilità e i tessuti molli sono rimossi dalla caviglia risparmiando accuratamente la superficie articolare, su un tavolino servitore a parte. Avvalendosi di uno strumentario specifico utilizzabile sia per la caviglia del donatore sia per quella del ricevente, si provvede a conformare il graft. Le superfici articolari ottenute vengono poste in soluzione salina mentre si procede alla preparazione dell'alloggiamento nella caviglia ricevente. **(Figura 1.A)**

Impianto:

Con il paziente in decubito supino e laccio alla radice dell'arto, l'articolazione della caviglia viene approcciata per via mediana anteriore, incidendo tra l'estensore lungo dell'alluce e il tendine tibiale anteriore. Il fascio neurovascolare viene retratto lateralmente. Dopo aver eseguito un'ampia sinovectomia e un debridement dell'impingement fibroso ed osseo, la superficie del malleolo mediale si prepara con la stessa maschera utilizzata per il taglio della superficie del donatore. Successivamente, due fili di K sono posizionati sotto controllo fluoroscopico sia sulla tibia sia sull'astragalo, e quindi viene eseguito il taglio tibiale e talare alla stessa altezza del taglio eseguito sulle componenti del donatore. Per evitare danni termici, vengono eseguite frequenti irrigazioni del campo operatorio durante la preparazione delle superfici. Le superfici dell'allograft vengono posizionate temporaneamente, saggiando la congruenza tramite fluoroscopia. L'eventuale perdita di osso viene borrata con l'osso spongioso prelevato dalla superfici articolari rimosse al paziente. Le

componenti tibiali sono fissate tramite due 2 viti in titanio standard, mentre sia viti twist-off (De Puy Ortopedia Inc, Warsaw, IN, USA) sia viti di Herbert possono essere impiegate per la fissazione dell'astragalo (Zimmer Inc, Varsavia, IN, USA). **(Figura 1.B)** Una volta valutata la stabilità e l'escursione articolare si eseguono la sutura finale di capsula e cute.

Figura 1.A-B



TRATTAMENTO POST-OPERATORIO

Per i primi 21 giorni dopo l'intervento si posiziona uno stivaletto gessato per permettere la guarigione delle ferite chirurgiche. Alla rimozione del gesso i pazienti sono sottoposti ad esercizi di mobilizzazione passiva della caviglia (6-8 ore al giorno), da implementare gradualmente secondo tolleranza. Il carico sull'arto operato è vietato per i primi 4 mesi.

A 4 mesi dall'intervento, è concesso un carico parziale sull'arto operato (circa 30 kg), mentre a 6 mesi è concesso il carico completo.

RACCOLTA DEI CAMPIONI

Al momento dell'intervento di trapianto sono stati prelevati sangue periferico dal paziente ricevente e un frammento osteocondrale del donatore. A 21±5 mesi di follow-up nel contesto della rimozione dei mezzi di sintesi è stato prelevato, utilizzando un mandrino da biopsia (8 gauge), un frammento cilindrico osteocondrale dalla porzione astragalica anteriore in zona di carico in 20 casi. Nei restanti due casi il frammento biotico è stato ottenuto durante l'intervento di revisione conseguente al fallimento dell'allograft stesso ad un follow-up di 24±6 mesi. I soli frammenti cartilaginei sono stati utilizzati per le analisi di typing genetico e di espressione dell'mRNA, mentre l'intero frammento osteocondrale è stato utilizzato per le analisi istologiche e di immunohistochimiche. **In considerazione della poca quantità di tessuto prelevato (volontariamente per non rovinare in modo consistente e sintomatico l'innesto) non tutte le analisi sono state effettuate su tutti i prelievi.**

ISOLAMENTO DEL DNA

Il DNA costituzionale del ricevente e del donatore sono stati ottenuti dal sangue periferico e dal tessuto osteocondrale residuo rispettivamente. Il DNA dell'allograft è stato ottenuto da biopsie cilindriche lavate in PBS dopo rimozione di tutto l'osso subcondrale per mezzo di uno scalpello. I frammenti biotici congelati sono stati polverizzati con la fresa Mikro-Dismembrator-S (Sartorius, Italy). Il DNA totale è stato estratto utilizzando il DNA mini-kit QIAamp (Qiagen, Germany).

GENOTYPING DELL'ALLOGRAFT (eseguito su 20 campioni inclusi i 2 fallimenti)

Per determinare se la cartilagine dell'allograft contenesse cellule del donatore o del ricevente, è stata eseguito un genotyping attraverso analisi dei microsatelliti sul DNA estratto dai campioni prelevati al follow-up comparandolo con il DNA di donatore e ricevente. Il pattern allelico dei casi sono stati ottenuti attraverso polymerase chain reaction (PCR) delle sequenze ripetute in tandem di CD4, fattore A di Von Willebrand (VWA), oncogene del sarcoma felino (FES), perossidasi tiroidea (TPOX) e P53 [40]. I prodotti della PCR sono quindi stati sottoposti ad elettroforesi e colorazione con SYBR green (Roche, Indianapolis, Indiana). Le immagini dopo elettroforesi sono infine state acquisite con la Kodak Image Station 4000MM (Kodak, Rochester, New York).

ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA DEGLI ALLOGRAFT (eseguito su 6 campioni)

6 campioni cartilaginei ottenuti dalle biopsie cilindriche dopo rimozione della porzione ossea sono state valutate e comparate ad una serie di controlli (C) inclusi: Cartilagine sana (C1-2), condrociti isolati da cartilagine sana e non coltivati (C3), condrociti coltivati a P1 (C4) e P10 (C5), fibroblasti sinoviali coltivati a P3 (C6), osteoblasti isolati e non coltivati (C7) e cellule mononucleate midollari mesenchimali (C8). Le colture sono state effettuate come descritto da Neri et Al. [41]

L'RNA totale è stato estratto utilizzando l'RNA Pure reagent (Euroclone, Italy) dai campioni di cartilagine e dalle cellule utilizzate come controlli (C3-C8). Dopo trascrizione inversa utilizzando il kit SuperScript-VILO cDNA Synthesis (Invitrogen, USA), l'espressione di markers specifici è stata valutata attraverso Real-Time PCR (Tabella 1).

Tabella 1 Riassunto delle sequenze primer e della dimensione dei prodotti amplificati dalla RT-PCR analisi

Template	Sequenza primer	Dimensione dei prodotti amplificati (coppie di basi)
Collagene II (Col II)	5'-GACAATCTGGCTCCCAAC-3'	257

5'-ACAGTCTTGCCCCACTTAC-3'

Collagene IX (Col IX) 5'-CAGGAAGAGGTCCCAAC-3' 175

5'-GCTGGCTCACAGAAACC-3'

Collagene X (Col X) 5'-CCAGCACGCAGAATCC-3' 139

5'-GTGTTGGGTAGTGGGC-3'

Aggrecano (Aggr) 5'-GTCTCACTGCCCAACTAC-3' 157

5'-GGAACACGATGCCTTTCAC-3'

SOX9 5'-GAGCAGACGCACATCTC-3' 118

5'-CCTGGGATTGCCCGA-3'

Catepsina B (Cath B) 5'-TGTGTATTCGGACTTCCTGCT-3' 113

5'-GTGTGCCATTCTCCACTCC-3'

MMP-13 5'-TCACGATGGCATTGCT-3' 277

5'-GCCGGTGTAGGTGTAGA-3'

Collagene I (Col I) 5'-GAGAGCATGACCGATGG-3' 251

	5'GTGACGCTGTAGGTGAA-3'	
Fosfatasi alcalina (AP)	5'-GGAAGACACTCTGACCGT-3'	152
	5'-GCCATTGCCATACAGGA-3'	
RUNX2	5'-GGAATGCCTCTGCTGTTATG-3'	105
	5'-AGACGGTTATGGTCAAGGTG-3'	
Osteocalcina (OC)	5'-GCAGCGAGGTAGTGAAGA-3'	148
	5'-TCCTGAAAGCCGATGTGG-3'	
Osteopontina (OP)	5'-ATGATGGCCGAGGTGATAG-3'	119
	5'-GCTTCCATGTGTGAGGTG-3'	
Sialoproteina ossea (BSP)	5'-CAGTAGTGACTCATCCGAAG-3'	158
	5'-CATAGCCCAGTGTGTAGCA-3'	
GAPDH	5'-TGGTATCGTGGAAGGACTCATGAC-3'	190
	5'-ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC-3'	

ISTOLOGIA ED IMMUNOISTOCHEMICA

I campioni provenienti dall'allograft al follow-up, dal donatore al momento dell'innesto e dal tessuto rimosso dal ricevente al momento dell'impianto sono stati fissati in formalina al 10%, lavati e decalcificati in acido idroclorico al 4% e acido formico al 5% a temperatura ambiente, reidratati in alcool e messi in paraffina. Sezioni seriali sono state colorate con Ematossilina/Eosina e 0,1%Safranina-O/0,02% fast green. Lo score ICRS I è stato utilizzato per valutare qualitativamente il tessuto analizzato .[42]

Per l'immunoistochimica sono stati valutati I seguenti markers: Collagene II, CD73, CD90, MMP-13, Caspasi-3 e TRAP. A tale scopo i campioni sono stati incubati con anticorpi monoclonali contro collagene II (2.5µg/ml, Chemicon,USA), CD73 (5µg/ml, Serotec,UK), CD90 (5µg/ml,Serotec), MMP-13 (5µg/ml, R&D,USA), caspasi-3 (5µg/ml, R&D) e TRAP (5µg/ml, Novocastra,UK). Le sezioni sono state quindi trattate con anticorpi secondari biotinilati e Streptavidina marcata con fosfatasi alcalina (BioGenex,USA). Le reazioni sono state innescate utilizzando Fast Red substrate (BioGenex). I tagli sono stati contro-colorati con Ematossilina (Sigma,USA). Le immagini sono infine state acquisite con microscopio Eclipse-90i (Nikon) e valutate da due osservatori indipendenti.

ANALISI STATISTICA

La quantificazione immunoistochimica, gli score AOFAS ed ICRS I sono stati espressi come media e deviazione standard. La correlazione di Spearman è stata utilizzata per esaminare la relazione tra score ICRS I, AOFAS ed età. Il test di Mann Whitney ha permesso di analizzare l'influenza del sesso di donatore e ricevente sullo score AOFAS ed ICRS I. Il test di Kruskal-Wallis ed il post-hoc sono stati utilizzati per i dati immunoistochimici. Il test non parametrico di Jonckheere-Terpstra ha valutato la relazione tra punteggi clinici ed istologici ed il genotyping.

Per tutti i tests $p < 0.05$ è stato considerato significativo.

L'analisi gerarchica per gruppi dei profili di espressione genica è stata effettuata utilizzando il coseno di similitudine.

RISULTATI

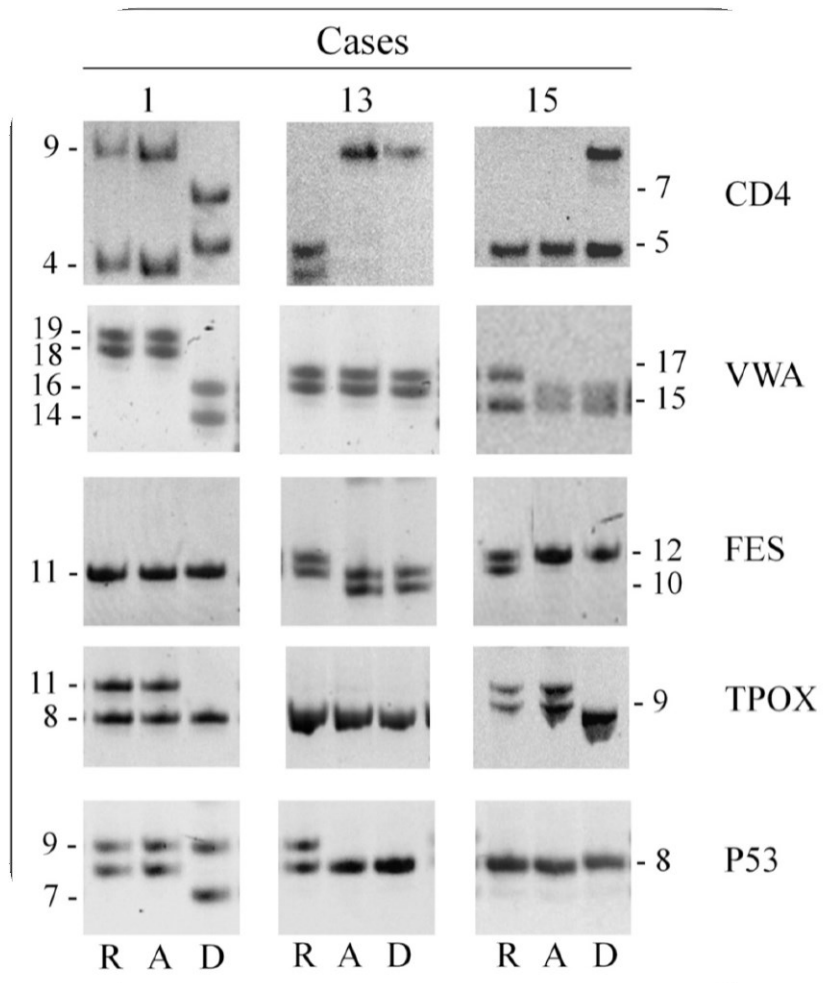
OUTCOME CLINICO:

Non si sono osservate complicanze intra-operatorie. Nel post-operatorio si è osservata una infezione per cui è stata eseguita una toilette chirurgica a 9 mesi dall'impianto che si è risolta completamente associando terapia antibiotica mirata a 12 mesi di follow-up. Abbiamo osservato 2 fallimenti rispettivamente a 20 e 28 mesi. Il primo fallimento è stato legato ad un collasso meccanico dell'impianto dovuto a carico precoce non autorizzato, mentre per il secondo caso di è osservata una progressiva condrolisi in assenza di chiare alterazioni meccaniche in grado di spiegare il fallimento. Lo score AOFAS è aumentato da $25,7 \pm 8.0$ pre-operatoriamente fino a $77,5 \pm 11,2$ a 12 mesi (22 casi; $p < 0.05$). Al follow-up finale di 61 ± 13.6 mesi (20 casi), lo score AOFAS si è mantenuto stabile con un valore di 76.2 ± 14.1 ($p < 0.05$). Non si sono osservate relazioni tra lo score AOFAS, l'età del donatore o del ricevente e il sesso del donatore e del ricevente.

TYPING GENETICO DELL'ALLOGRAFT (Eseguito in 20 casi)

Il pattern allelico relativo a 5 sequenze ripetute disposte secondo una ripetizione in tandem dei prelievi cartilaginei dell'allograft (A) è stato comparato al pattern allelico costituzionale del ricevente (R) e del donatore (D). In **figura 2** un esempio di ogni possibile matching (A=R; A=D; A=misto)

Figura 2



In 12 casi, inclusi i due fallimenti, il pattern allelico dei prelievi biotici è risultato uguale a quello del ricevente, indicante pertanto la esclusiva presenza di cellule del ricevente nella porzione cartilagine dell'allograft.

Solo in 3 casi si è osservato un pattern dei prelievi biotici sovrapponibile al donatore, indicante pertanto la esclusiva presenza di cellule del donatore nella porzione cartilagine dell'allograft.

Nei restanti 5 casi si è osservato un pattern allelico misto tra i due con cellule quindi sia appartenenti al donatore che al ricevente.

L'analisi statistica dei risultati ha evidenziato come non si potessero rinvenire correlazioni tra il pattern allelico dei campioni e l'andamento clinico o l'età del ricevente.

CARATTERIZZAZIONE DELLE CELLULE CARTILAGINEE DELL'ALLOGRAFT (Eseguito in 6 casi)

L'RNA di cellule cartilaginee dell'allograft di sei campioni e di otto controlli (C1-C8) è stato analizzato circa l'espressione di markers della linea cartilaginea ed ossea. I controlli C1,C2 e C3 sono stati scelti per comparare le cellule dell'allograft a condrociti maturi o differenziati mentre C4 e C5 sono stati scelti per comparare le cellule dell'allograft a condrociti de-differenziati.

I risultati sono espressi come numero di copie di RNA/ 100,000 copie di GAPDH. I livelli di markers specifici testati sono risultati estremamente eterogenei nei prelievi valutati, suggerendo un differente comportamento dell'allograft nei 6 casi. **(Tabella 2)**

Tabella 2: Espressione relativa di mRNA dei differenti markers sui campioni raccolti da allograft e sui controlli

	ColII	Col IX	ColX	Aggr	SOX9	CathB	MMP-13	ColI	AP	RUNX2	OC	OP	BSP
Campioni													
3	0	42	580	15177	1992	81225	13679	1492853	22531	34628	271321	1308643	419887
8	333	8	40	16724	3956	73204	404	10689125	787	4544	347	855	0
10	0	202	0	4	534	6121	0	4124	0	0	0	31864	1234
15	57038	34	10224	38157	1563	28917	326	4737	34	694	1160	75262	5712
16	290795	172	2435	20448	1399	130134	53219	1837917	9740	13584	260268	1238052	267586
17	820	0	0	21613	3983	80107	3125	5571524	4181	6983	837	2592	3540
Media	58164	76	2213	18687	2237	66618	11792	3266713	6212	10072	88989	442878	116326
Int. Conf.	167-159657	15-146	27-5731	9200-28276	1192-3330	33215-99381	299-30354	557877-6927247	410-14003	1977-21846	395-201978	14641-982592	1739-278268
Controlli													
C1	72262	592	54337	408405	64618	61132	0	0	0	1184	592	85264	663456
C2	469134	0	29730	2653823	288786	162451	0	0	0	0	0	246229	2170567
C3	194531	211	83	125701	41754	30993	14	168	0	59	226	9807	22
C4	190	4	9	1722	910	40895	1663	13870	25	17	49	4836	298
C5	0	0	0	3280	169	83509	1	46652	9	99	144	13	176

C6	1	4	0	258	76	100696	5	92659	0	0	0	0	0
C7	10	0	101	18428	11502	402782	1176	431691	165	4575	2916	1370	2665
C8	0	0	0	130134	9606	365533	52	1622335	2418	14063	505	28	4067

In particolare l'espressione di Collagene II è stata rinvenuta in 4 prelievi, due dei quali dimostravano alti livelli di mRNA compatibili con condrociti de-differenziati (controlli da C1 a C3). I frammenti di allograft dimostravano alti livelli di Collagene di tipo I suggerendo un certo livello di fibrosi dell'allograft. Allo stesso modo dimostravano, come pure i controlli, presenza di Catepsina B e MMP-3 suggestivi per un certo grado di rimodellamento tissutale.

Un'analisi gerarchica per gruppi sui 6 prelievi combinata con gli 8 controlli è stata eseguita come indicato nella sezione metodologica nel paragrafo analisi statistica. Sono stati così determinati tre maggiori gruppi (A,B,C) a seconda di quanto strettamente correlarono le caratteristiche, in termini di markers, dei prelievi dall'allograft con i controlli. Quattro prelievi sono così stati inseriti nel gruppo A insieme al gruppo controllo C8 rappresentato da cellule mononucleate midollari mesenchimali indifferenziate. I rimanenti 2 casi invece sono stati raggruppati con i controlli da C1 a C3 suggestivi per condrociti differenziati. Questa analisi sembra sposare la teoria che precursori cellulari del ricevente migrino dall'osso subcondrale attraverso il tidemark per ricolonizzare la porzione cartilaginea dell'allograft subendo nel tempo una parziale e progressiva differenziazione verso la linea condrocitaria.

ANALISI ISTOLOGIA ED IMMUNOISTOCHEMICA

I prelievi effettuati sulla cartilagine del ricevente al momento dell'impianto hanno dimostrato ovviamente alto grado di degenerazione tissutale testimoniato da un basso valore del punteggio ICRS I score che ha totalizzato una media di 5 ± 1.3 .

I prelievi bioptici eseguiti alla rimozione dei mezzi di sintesi (20 casi) apparivano invece caratterizzati da differenti gradi di riparazione tissutale. Macroscopicamente si è osservata una superficie cartilagine mediamente sfibrillata, mentre l'analisi istologica ha evidenziato un tessuto con una buona vitalità cellulare, e una buona organizzazione, un moderato contenuto in proteoglicani e varie aree di discontinuità nel tidemark attraversate da colonne di cellule mono e multinucleate a partenza dall'osso subcondrale. Il punteggio ICRS I raggiungeva nei prelievi bioptici un valore di 13 ± 3 .

I due fallimentei invece dimostravano differenti aspetti degenerativi compresi perdita della matrice cartilaginea, apoptosi cellulare, basso contenuto in proteoglicani e alterata mineralizzazione della cartilagine, registrando un punteggio ICRS I di 8.5 ± 0.5 .

L'analisi statistica ha dimostrato come il miglior punteggio ICRS I sia stato raggiunto dai pazienti in cui l'allograft presentava un profilo genotipico misto (15.5 ± 0.7) rispetto ai pazienti in cui l'allograft presentava un genotipo compatibile con il solo donatore ($12.3 \pm 3.8^\circ$) solo ricevente (10.7 ± 3.2) ($p=0.024$).

L'analisi istologica del tessuto del donatore ha ovviamente evidenziato una buona morfologia cartilaginea che ha raggiunto il massimo valore ICRS I. Una correlazione interessante emersa è che il punteggio clinico a 18 mesi era direttamente correlato al valore ICRS I della cartilagine del donatore ($Rho=0.636$, $p=0.048$) suggerendo come una miglior qualità della cartilagine trapiantata possa esitare in un miglior risultato clinico.

L'espressione di collagene di tipo II è ovviamente risultata più marcata nei prelievi bioptici ($90 \pm 4\%$) e nella cartilagine del donatore ($91 \pm 3\%$) piuttosto che in quella del ricevente ($30 \pm 5\%$; $p < 0.001$ in entrambi i casi).

Una positività per il markers CD73 è stata riscontrata in tutti I campioni ($35 \pm 2\%$) come pure per il marker CD90. Una moderata positività cellulare per MMP-13, coinvolto nella distruzione della

cartilagine, è stato rinvenuto nella cartilagine del ricevente ($60\pm 3\%$), rispetto ai prelievi bioptici sull'allograft ($25\pm 3\%$; $p < 0.01$) ed alla cartilagine del donatore impiantata ($15\pm 4\%$; $p < 0.001$).

L'espressione cellulare della Caspasi 3 coinvolta nell'apoptosi era ancora una volta differente nella cartilagine del ricevente ($63\pm 4\%$), nei prelievi bioptici ($17\pm 3\%$) e nella cartilagine del donatore ($5\pm 2\%$) ($p < 0.01$ in entrambe le comparazioni).

La colorazione TRAP nei frammenti bioptici prelevati ha dimostrato una marcata positività ($98\%\pm 2$) nelle cellule multinucleate che invadevano la matrice cartilaginea attraversando il tidemark.

DISCUSSIONE

Il trapianto osteocondrale fresco di caviglia rappresenta una interessante opzione biologica per il trattamento delle artropatie degenerative in fase avanzata, ma appare gravato in letteratura da una significativa percentuale di complicanze come pure di fallimenti. [10,11,12,13]

La biologia dell'allograft fresco come pure il suo processo integrativo appaiono, al momento attuale, le due direzioni verso cui indagare per ottimizzare il risultato clinico di tale procedure rendendola più ampiamente fruibile.

Il razionale alla base dell'allograft fresco è sempre stato considerato il mantenimento della vitalità dei condrociti del donatore nel tempo; in realtà, la sopravvivenza di tali cellule, come pure il genotipo delle cellule cartilaginee dell'allograft, sono state poco indagate.

Lo scopo del presente studio era analizzare 22 allograft freschi bipolari di caviglia a 22 mesi di follow-up, cercando di descrivere l'origine delle cellule cartilaginee del trapianto ed il loro fenotipo. Di 20 allograft analizzati, 12 presentavano solo cellule del ricevente, 3 presenza esclusiva di cellule del donatore e i rimanenti 5 un pattern misto con cellule sia del ricevente che del donatore.

Differentemente da quanto sempre creduto quindi, in 17 casi si è osservata la presenza preponderante o combinata di cellule del ricevente suggerendo come la cartilagine del donatore venga lentamente ma inesorabilmente sottoposta ad un processo di colonizzazione da parte delle cellule del ricevente.

Questo punto fondamentale della presente ricerca mette in crisi il razionale stesso della procedura ponendo domande sulla reale necessità di trapiantare un tessuto contenente condrociti vitali. In realtà i brillanti risultati ottenuti dagli allograft freschi rispetto a quelli congelati sembrano suggerire una migliore integrazione per i trapianti vitali sebbene non vi sia menzione in letteratura di innesti congelati conformati come quelli freschi presi in esame in questa dissertazione.

E' opinione degli Autori del presente studio che la vitalità cellulare del graft giochi un ruolo importante nell'integrazione dal momento che le cellule vitali sono in grado di contribuire alla permanenza della matrice extracellulare e che le cellule del ricevente che colonizzano l'allograft sono in grado di colonizzare nelle fasi precoci solo la porzione basale dello strato cartilagineo. Questa ipotesi sembra trovare una giustificazione valutando la morfologia dei prelievi bioptici al follow-up. Il tessuto con valori ICRS I più alti è quello infatti che dimostra un genotipo misto con cellule del donatore ancora presenti ed iniziale colonizzazione da parte di cellule del ricevente. Nonostante questa ipotesi appaia intrigante vi è però da considerare come non si sia osservata alcuna correlazione statistica tra il pattern genotipico dell'allograft e il risultato clinico (né al momento della biopsia né al follow-up finale).

I risultati clinici sono apparsi comunque brillanti con solo 2 fallimenti ed un risultato clinico che oscilla tra buono ed eccellente in tutti i restanti casi. In linea con i buoni risultati clinici ottenuti l'analisi istologica ed immunohistochimica ha evidenziato un tessuto cartilagineo ben organizzato, con alto contenuto di collagene di tipo II e segni di rimodellamento tissutale (espressione di MMP-13 e TRAP) compatibile con la re-invasione del tessuto cartilagineo del donatore da parte di cellule del ricevente.

La caratterizzazione delle cellule dell'allograft ha dimostrato come alcuni campioni bioptici analizzati producessero mRNA di Collagene II suggestivo per cartilagine normale. [43,44] Questo aspetto ha ricevuto da parte nostra molta attenzione in quanto questo marker è esclusivo dei condrociti differenziati. Sfortunatamente come descritto nella sezione metodologica non abbiamo potuto eseguire tutte le analisi su tutti i campioni per la poca quantità di tessuto prelevata in sede bioptica, ma va rimarcato che dei campioni che esprimevano positività per mRNA di collagene II, 2 sono stati sottoposti ad analisi genotipica. L'analisi ha dimostrato un pattern misto donatore ricevente ed un pattern esclusivo di cellule del ricevente nell'altro. In considerazione del fatto che la procedura di allograft prevede una completa rimozione di cellule cartilaginee del ricevente, se il

profilo genotipico al follow-up prevede la presenza di sole cellule del ricevente e queste esprimono mRNA di collagene di tipo II, allora è lecito pensare che tali cellule migrate nell'allograft si siano progressivamente differenziate in condrociti maturi. Va inoltre notato come tutti gli allograft che esprimevano positività per l'mRNA di Collagene di tipo II presentassero outcome clinici eccellenti.

L'analisi per gruppi che ha caratterizzato ulteriormente il fenotipo dei 6 prelievi biotici analizzati, ha dimostrato come le cellule in essi rinvenute esprimessero markers tipici delle cellule mesenchimali e dei condrociti, supportando la colonizzazione della cartilagine dell'allograft da parte di cellule del ricevente totipotenti che migrano attraverso il tidemark dallo strato subcondrale. Ulteriore prova di questa ipotesi è rappresentata dalla presenza di cellule multinucleate TRAP positive al tidemark compatibili con osteoclasti in grado di creare interruzioni nel tidemark stesso così da permettere la migrazione delle cellule totipotenti del ricevente nella cartilagine del donatore.

Le analisi istologiche ed immunohistochemiche non hanno dimostrato alcun rimodellamento alla porzione superficiale della cartilagine articolare escludendo così che le cellule che invadono la cartilagine del graft possano essere cellule mesenchimali a partenza dal liquido sinoviale.[45,46]

La eterogeneità dei genotipi riscontrati appare secondo gli Autori imputabile al poco tempo intercorso tra chirurgia e prelievo biotico ed alla variabilità, tra i casi valutati, di tale intervallo temporale. Appare chiara pertanto, la necessità di studi a lungo follow-up, per poter così monitorare nel lungo periodo il processo di ricolonizzazione della porzione cartilaginea del graft e conseguentemente la sua morfologia.

BIBLIOGRAFIA

1. Coester LM, Saltzman CL, Leupold J, Pontarelli W. Long-term results following ankle arthrodesis for post-traumatic arthritis. *J Bone Joint Surg Am.* 2001 Feb;83-A(2):219-28.
2. Kitaoka HB, Patzer GL. Clinical results of the Mayo total ankle arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am.* 1996 Nov;78(11):1658-64.
3. Kitaoka HB, Romness DW. Arthrodesis for failed ankle arthroplasty. *J Arthroplasty.* 1992 Sep;7(3):277-84.
4. Fuchs S, Sandmann C, Skwara A, Chylarecki C. Quality of life 20 years after arthrodesis of the ankle. A study of adjacent joints. *J Bone Joint Surg Br* 2003;85(7):994-998.
5. Conti SF, Wong YS. Complications of total ankle replacement. *Clin Orthop Relat Res* 2001;391:105-114.
6. Brown KLB, Cruess RL: Bone and Cartilage Transplantation in Orthopaedic Surgery. *J Bone J Surg.* 1982; 64A(2):270-279.
7. McGoveran BM, Pritzker KPH, Shasha N, Price J, Gross AE: Long term chondrocyte viability in fresh osteochondral allograft. *Am J Knee Surg.* 2002; 15: 97-100.
8. Bugbee WD, Convery R: Osteochondral Allograft Transplantation. *Clin Sports Med* 1999; 18(1): 67-75.
9. Ball ST, Amiel D, Tonz W: The Effects of Storage on Fresh Human Osteochondral Allograft. *Clin Orthop.* Jan 2004; 418:246-252.
10. Jeng CL, Kadakia A, White KL, Myerson MS. Fresh osteochondral total ankle allograft transplantation for the treatment of ankle arthritis. *Foot Ankle Int.* 2008 Jun;29(6):554-60.
11. Kim CW, Jamali A, Tontz W Jr, Convery FR, Brage ME, Bugbee W. Treatment of post-traumatic ankle arthrosis with bipolar tibiotalar osteochondral shell allografts. *Foot Ankle Int* 2002;23(12):1091-1102.
12. Meehan R, McFarlin S, Bugbee W, Brage M. Fresh ankle osteochondral allograft transplantation for tibiotalar joint arthritis. *Foot Ankle Int* 2005;26(10):793-802.

13. Tontz WL Jr, Bugbee WD, Brage ME. Use of allografts in the management of ankle arthritis. *Foot Ankle Clin* 2003;8(2):361-373.
14. Jackson DW, Simon TM. Donor cell survival and repopulation after intraarticular transplantation of tendon and ligament allografts. *Microsc Res Techniq.* 2002;58:25-33.
15. Verdonk P, Almqvist KF, Lootens T, Van Hoofstat D, Van Den Eeckhout E, Verbruggen G, Verdonk R. DNA fingerprint of fresh viable meniscal allografts transplanted in the human knee. (Abstract). *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10(Suppl. 1):S43-4.
16. Czitrom AA, Keating S, Gross AE. The viability of articular cartilage in fresh osteochondral allografts after clinical transplantation. *J Bone Joint Surg Am.* 1990;72:574-81.
17. Williams SK, Amiel D, Ball ST, Allen RT, Tontz WL Jr, Emmerson BC, Badlani NM, Emery SC, Haghghi P, Bugbee WD. Analysis of cartilage tissue on a cellular level in fresh osteochondral allograft retrievals. *Am J Sports Med.* 2007;35:2022-32.
18. Convery FR, Akeson WH, Amiel D, Meyers MH, Monosov A. Long-term survival of chondrocytes in an osteochondral shell allograft. *J Bone Joint Surg Am.* 1996;78:1082-8.
19. Maury AC, Safir O, Heras FL, Pritzker KP, Gross AE. Twenty-five year chondrocyte viability in fresh osteochondral allograft. A case report. *J Bone Joint Surg Am.* 2007;89:159-65.
20. Haudenschild DR, Hong E, Hatcher S, Jamali AA. Chondrogenic potential and homogeneity of cell populations of donor and recipient cells in a fresh osteochondral allograft: a case report. *J Bone Joint Surg Am.* 2012;94: e17.
21. Jamali AA, Hatcher SL, You Z. Donor cell survival in a fresh osteochondral allograft at twenty-nine years. A case report. *J Bone Joint Surg Am.* 2007;89:166-9.
22. Jackson DW, Simon TM. Donor cell survival and repopulation after intraarticular transplantation of tendon and ligament allografts. *Microsc Res Techniq.* 2002;58:25-33.
23. Lexer E; Die Verwendung der Freinen Knochenplastic nebst Versuchen uber Gelenkversteifung & Gelenktransplantation. *Arth. Klein. Chir.* 1908, 86: 939.

24. Bonfiglio M, Jeter WS and Smith C: The immune concept: its relation to bone transplantation. *Ann NY Acad Sci.* 1955; 59: 417.
25. Chalmers J: Transplantation immunity in bone homografting. *J Bone J Surg* 1959; 41B: 160.
26. Berrey BH Jr, Lord CF, Gebhardt MC, Mankin HJ. Fractures of allografts. Frequency, treatment, and end-results. *J Bone Joint Surg Am.* 1990 Jul;72(6):825-33.
27. Meyers MH. Resurfacing of the femoral head with fresh osteochondral allografts. Long-term results. *Clin Orthop Relat Res.* 1985 Jul-Aug;(197):111-4.
28. Evans KN, Providence BC. Case report: Fresh-stored osteochondral allograft for treatment of osteochondritis dissecans the femoral head. *Clin Orthop Relat Res.* 2010 Feb;468(2):613-8. Epub 2009 Sep 2.
29. Beaver RJ, Mahomed M, Backstein D, Davis A, Zukor DJ, Gross AE. Fresh osteochondral allografts for post-traumatic defects in the knee. A survivorship analysis. *J Bone Joint Surg Br.* 1992 Jan;74(1):105-110.
30. Gross AE. Repair of cartilage defects in the knee. *J Knee Surg.* 2002 Summer;15(3):167-9.
31. Bugbee WD. Fresh osteochondral allografts. *J Knee Surg.* 2002 Summer;15(3):191-5.
32. Gross AE, Shasha N, Aubin P. Long-term followup of the use of fresh osteochondral allografts for posttraumatic knee defects. *Clin Orthop Relat Res.* 2005 Jun;(435):79-87.
33. Kim CW, Jamali A, Tontz W Jr, Convery FR, Brage ME, Bugbee W. Treatment of post-traumatic ankle arthrosis with bipolar tibiotalar osteochondral shell allografts. *Foot Ankle Int* 2002;23(12):1091-1102.
34. Robert Meehan, Sarah McFarlin, William Bugbee, Michael Brage. Fresh Ankle Osteochondral Allograft Transplantation for Tibiotalar Joint Arthritis. *Foot Ankle Int.* 2005 Oct;26(10):793-802.
35. Giannini S, Buda R, Grigolo B, Bevoni R, Di Caprio F, Ruffilli A, Cavallo M, Desando G, Vannini F. Bipolar fresh osteochondral allograft of the ankle. *Foot Ankle Int.* 2010 Jan;31(1):38-46.

36. Giannini S, Buda R, Pagliuzzi G, Ruffilli A, Cavallo M, Baldassarri M, Vannini F. Survivorship of bipolar fresh total osteochondral ankle allograft. *Foot Ankle Int.* 2014 Mar;35(3):243-51.
37. Haene R, Qamirani E, Story RA, Pinsker E, Daniels TR. (2012) Intermediate outcomes of fresh talar osteochondral allografts for treatment of large osteochondral lesions of the talus. *J Bone Joint Surg Am.*94(12):1105-10.
38. Bugbee WD, Khanna G, Cavallo M, McCauley JC, Görtz S, Brage ME. (2013) Bipolar fresh osteochondral allografting of the tibiotalar joint. *J Bone Joint Surg Am.* 95(5): 426-32.
39. Kitaoka HB, Alexander IJ, Adellar RS, Nunley JA, Myerson MS, Sanders M. Clinical rating systems for the ankle-hindfoot; midfoot; hallux; and lesser toes. *Foot Ankle Int.* 1994;15:349-53.
40. Neri S, Cattini L, Facchini A, Pawelec G, Mariani E. Microsatellite instability in in vitro ageing of T lymphocyte clones. *Exp Gerontol.* 2004;39:499-505.
41. Neri S, Mariani E, Cattini L, Facchini A. Long-term in vitro expansion of osteoarthritic human articular chondrocytes do not alter genetic stability: a microsatellite instability analysis. *J Cell Physiol.* 2011 Oct;226(10):2579-85.
42. Mainil-Varlet P, Aigner T, Brittberg M, Bullough P, Hollander A, Hunziker E, Kandel R, Nehrer S, Pritzker K, Roberts S, Stauffer E. Histological assessment of cartilage repair: a report by the Histology Endpoint Committee of the International cartilage Repair Society (ICRS). *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85:45-57.
43. von der Mark K, Gauss V, von der Mark H, Müller P. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature.* 1977 Jun 9;267(5611):531-2.
44. Schnabel M, Marlovits S, Eckhoff G, Fichtel I, Gotzen L, Vecsei V, Schlegel J. Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002 Jan;

10(1):62-70.

45. Hunziker EB, Rosenberg LC. Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Joint Surg Am.* 1996 May;78(5):721-33.
46. Zhang W, Chen J, Tao J, Jiang Y, Hu C, Huang L, Ji J, Ouyang HW. The use of type 1 collagen scaffold containing stromal cell-derived factor-1 to create a matrix environment conducive to partial-thickness cartilage defects repair. *Biomaterials.* 2013 Jan;34(3):713-23. Epub 2012 Oct 26.