

Thérapie cellulaire : traitement conservateur de l'ostéonécrose de hanche

Philippe Hernigou

Paris

Résumé – Compte tenu du fait que l'ostéonécrose de hanche, au départ, n'est pas une maladie mécanique mais une maladie biologique, avec conservation de la trame osseuse mais perte des cellules, l'injection de cellules-souches progénitrices a été proposée comme thérapeutique innovante. Dès 1985, la moelle osseuse de la crête iliaque a été aspirée, dans un premier temps sans concentration, pour être introduite dans la tête fémorale. Ce simple geste (l'injection de moelle osseuse) pouvait se faire par un petit trocart de diamètre de 3 à 4 mm, compte tenu du caractère liquide de la moelle osseuse aspirée sur la crête iliaque. La substance active définie comme un progéniteur mésenchymateux médullaire appelé aussi fibroblastique est quantifiable après une culture de 10 jours. Ces cellules étant peu nombreuses, il était donc important d'augmenter la concentration des cellules sans augmenter le volume injecté. D'où l'introduction dans la thérapeutique à partir de 1990 de la technique de « concentration » de la moelle osseuse qui permet d'augmenter le nombre de cellules dans la moelle osseuse injectée. Différentes études ont confirmé l'efficacité de la technique qui permet de guérir la nécrose dans les formes précoces et permet d'éviter la perte de sphéricité et la prothèse de hanche.

Mots clés: ostéonécrose de hanche, thérapie cellulaire.

Abstract – Given that osteonecrosis of the hip, initially, is not a mechanical disease but a biological disease, with preservation of the bone matrix but loss of cells, the injection of progenitor stem cells has been proposed as an innovative therapeutic. As early as 1985, the bone marrow of the iliac crest was aspirated, initially without concentration, to be introduced into the femoral head. This simple gesture (the injection of bone marrow) could be done by a small trocar with a diameter of 3 to 4 mm, given the liquid nature of the bone marrow aspirated on the iliac crest. The active substance defined as a medullary mesenchymal progenitor also called fibroblastic is quantifiable after a culture of 10 days. Since these cells are few in number, it was therefore important to increase the concentration of the cells without increasing the volume injected. Hence the introduction in the 1990 therapy of the concentration of the bone marrow which makes it possible to increase the number of cells in the injected bone marrow. Various studies have confirmed the effectiveness of the technique that heals necrosis in early forms and avoids loss of sphericity and hip prosthesis.

Keywords: osteonecrosis of the hip, cell therapy.

Introduction

L'ostéonécrose de hanche est une pathologie relativement fréquente puisque le diagnostic en est fait chez environ 5 000 nouveaux patients chaque année en France. La fréquence du caractère bilatéral est d'environ 70 %, ce qui représente environ 7 000 nouvelles ostéonécroses de hanche diagnostiquées chaque année. L'ostéonécrose de hanche est l'aboutissement de la mort cellulaire dans la tête fémorale, mort cellulaire en rapport avec différentes étiologies. Cette pathologie touche spécifiquement l'adulte jeune (de 18 à 40 ans). Il n'y a pas de régression spontanée de l'ostéonécrose et, après un délai d'environ deux ans, l'effondrement de la tête fémorale va aboutir à une perte fonctionnelle pour le patient, l'empêchant de marcher, que la nécrose soit unilatérale ou bien sûr bilatérale.

Compte tenu du fait que l'ostéonécrose de hanche, au départ, n'est pas une maladie mécanique mais une maladie biologique, avec conservation de la trame osseuse mais perte des cellules, l'injection de cellules-souches progénitrices apparaissait logique, d'autant que les études ont montré que le nombre

de cellules présentes dans l'extrémité supérieure du fémur était réduit chez les patients présentant des ostéonécroses [1, 2].

L'utilisation par l'auteur de la thérapie cellulaire dans l'ostéonécrose a été possible dans le cadre d'un programme de recherche en 1985. Le but de ce chapitre est de présenter les différents progrès techniques développés par notre équipe au cours des trente dernières années pour le traitement conservateur par thérapie cellulaire pour l'ostéonécrose de la hanche.

Rappel sur l'hématopoïèse

Le stroma médullaire, capable de soutenir l'hématopoïèse, est constitué d'une population hétérogène de cellules matures comprenant des fibroblastes, des cellules adipeuses, des macrophages, des cellules endothéliales et des ostéoblastes. Les composants fibroblastiques du stroma médullaire renferment des cellules progénitrices de l'os appelées cellules stromales mésenchymateuses (CSM). Les CSM sont des cellules immatures adultes capables de différenciation en cellules matures spécialisées. Ces cellules ont été initialement décrites par

Friedenstein *et al.* en 1976 [3, 4] comme étant présentes dans la moelle osseuse de la cavité des os courts et plats, multipotentes de type fibroblastique et capables de se différencier dans différentes voies mésenchymateuses dont l'ostéoblaste. Le critère principal de sélection de ces progéniteurs non hématopoïétiques est leur propriété d'adhérence au plastique suite à la mise en culture de moelle osseuse. Une population cellulaire à morphologie fibroblastique et à caractéristique clonale est ainsi obtenue. Chaque cellule adhérente de type fibroblastique est à l'origine d'une colonie nommée *Colony-Forming Unit - Fibroblast (CFU-F)*.

Innovation proposée par l'auteur pour le traitement de l'ostéonécrose de hanche

Dès les années 1985, plutôt que de prélever des fragments de crête iliaque, la moelle osseuse de la crête iliaque a été aspirée, dans un premier temps sans concentration, pour être introduite dans la tête fémorale. Ce simple geste a permis d'améliorer les patients, l'injection de moelle osseuse [5] se faisant par un petit trocart de diamètre de 3 à 4 mm. L'utilisation d'un diamètre faible de trocart a été rendue possible par le caractère liquide de la moelle osseuse aspirée dans la crête iliaque. Ceci a permis de diminuer le nombre de fractures trochantériennes, complications iatrogènes dues au gros diamètre des trocarts (8 à 10 mm) lorsqu'on devait introduire de l'os spongieux ou des péronés vascularisés dans le col et la tête fémorale.

Le tissu osseux permet d'absorber une certaine quantité de liquide (il se comporte un peu comme une éponge), mais ce volume ne peut pas être augmenté de manière trop importante : en cas de volume trop important, le liquide est repris par le drainage veineux. De plus, la moelle osseuse ne contient qu'un faible pourcentage de CSM [6], de 0,001 à 0,01 % de cellules mononucléées. La substance active, définie comme un progéniteur mésenchymateux médullaire appelé aussi fibroblastique, est quantifiable après une culture de 10 jours dans le test *in vitro* des CFU-F. Ces cellules étant peu nombreuses, il était donc important d'augmenter la concentration des cellules sans augmenter le volume injecté. D'où l'introduction dans la thérapeutique dès 1990 de la technique de « *concentration de la moelle osseuse* » qui permet d'augmenter le nombre de cellules dans la moelle osseuse injectée.

Celle-ci a bénéficié au fil du temps d'améliorations techniques (sur le mode de prélèvement et sur la concentration cellulaire) qui seront discutées dans ce chapitre.

Amélioration de la technique d'aspiration de la moelle osseuse

L'aspiration de la moelle osseuse s'effectue à partir de la crête iliaque antérieure ou postérieure. Le geste est réalisé sous anesthésie générale. Un trocart métallique biseauté est planté profondément dans l'os spongieux puis une aspiration est réalisée à l'aide d'une seringue préalablement rincée avec du sérum physiologique hépariné. L'aspiration de petites fractions (2 ml) de MO permet de réduire le degré de dilution par le

sang périphérique et par conséquent d'augmenter la richesse en progéniteurs mésenchymateux. A partir du même orifice cutané, plusieurs perforations osseuses peuvent être réalisées dans la crête iliaque.

La dilution par le sang augmente artificiellement le nombre de cellules mononucléées (MNC), mais ne fait pas augmenter le nombre de cellules stromales mésenchymateuses (CMS) qui sont présentes dans la moelle osseuse mais absentes du sang circulant chez l'homme.

Pour améliorer le nombre de CSM obtenues par aspiration de moelle osseuse, nous avons réalisé des études pour déterminer la meilleure technique à adopter. L'étude a montré que le nombre et la concentration de CSM sont influencés par la technique d'aspiration et en particulier le volume de la seringue [6] : un plus grand nombre de cellules est obtenu avec une seringue de 10 ml qu'avec une seringue de 20 ml ou 50 ml. Ce paradoxe peut être expliqué par certains concepts physiques : si l'on considère l'équation $pression = force/surface$, à force égale, la diminution de la surface (taille de la seringue) augmente la pression, donc inversement en aspirant, majore la dépression.

Mise au point d'une cartographie (secteurs) de l'ilium pour le prélèvement de la moelle osseuse

Pour améliorer l'aspiration qui doit se faire dans des zones riches en moelle osseuse, nous avons décrit une nouvelle approche de l'anatomie de l'ilium humain tenant compte de la répartition de la moelle osseuse en son sein [7, 8]. Une cartographie de l'ilium avec des lignes divisant l'aile iliaque en six secteurs égaux a été construite, indiquant l'épaisseur de l'os spongieux dans chaque secteur.

Le système sectoriel prédit de manière fiable et sûre l'épaisseur minimale de l'os spongieux dans une aile iliaque (épaisseur transversale entre les deux tables), facteur important pour assurer le placement sûr du trocart entre les deux tables de l'os. Il mentionne aussi les zones dangereuses pour sa mise en place et ainsi prévenir des lésions vasculaires ou neurologiques. Ces secteurs peuvent être transposés chez tous les patients.

Description d'une technique d'évaluation du nombre de cellules progénitrices

Les précurseurs de la lignée ostéogénique se situent dans le stroma médullaire. Ainsi, un tissu ostéogénique comprenant de l'os et du cartilage peut être constitué dans un modèle de chambre de diffusion quand de la moelle osseuse est cultivée *in vivo*. L'obtention *in vitro* de colonies d'aspect fibroblastique correspond à une prolifération clonale d'une cellule type souche issue du stroma médullaire ou *Colony-Forming Unit - Fibroblast (CFU-F)*. Il a par ailleurs été montré dans un modèle animal sur le lapin qu'il existait une corrélation positive entre la capacité ostéogénique de la moelle et sa concentration cellulaire en cellules nucléées. La capacité ostéogénique de la moelle osseuse concentrée peut être quantifiée par

le nombre de progéniteurs fibroblastiques (CFU-F) (appelés aussi mésenchymateux) mis en évidence *in vitro* après 10 jours de culture ; elle est supérieure à celle de la moelle osseuse totale. De ces données de laboratoire, est issu le principe retenu dans cette préparation de produit fini : la concentration de la moelle osseuse augmente le nombre de progéniteurs osseux mésenchymateux qui seront apportés au site de défaut osseux [9]. La numération des cellules nucléées (CN) peut être réalisée avant et après le processus de concentration de la moelle osseuse (MO).

Technique de concentration

Le principe de concentration (fig. 1) de la moelle osseuse est basé sur la séparation des différents constituants de la MO par centrifugation, en fonction des gradients de densité cellulaire. Les procédés consistent à éliminer une majeure partie des érythrocytes et du plasma, ne gardant que les cellules nucléées, c'est-à-dire les cellules stromales et souches, les monocytes, les lymphocytes et les polynucléaires [10, 11]. Les manipulations sont effectuées dans des conditions de stérilité garantissant l'obtention d'un produit ré-injectable.

La concentration sur le séparateur de cellules *Cobe*[®] 2991 a longtemps été utilisée. Cette technique est adaptée à des volumes supérieurs à 250 ml, et permet d'obtenir une suspension médullaire concentrée d'environ 50-60 ml. Elle est utilisable pour la concentration de MO de patients drépanocytaires. C'est le séparateur de référence que nous avons largement utilisé dans les données historiques. Il présente l'avantage de traiter de larges volumes de moelle osseuse (> 250 ml) mais présente l'inconvénient d'être une technique semi-ouverte et semi-automatique. D'autres techniques de séparation cellulaire peuvent être utilisées.

L'évaluation de l'efficacité de la concentration de la MO porte sur :

- la réduction de volume ;
- le facteur de concentration des cellules nucléées médullaires (CN) ;
- le facteur de concentration de la substance active CFU-F/ μ .

Etude de la viabilité cellulaire après concentration

Afin d'évaluer l'impact de chaque séparateur cellulaire sur la viabilité cellulaire, le taux des cellules vivantes a été déterminé systématiquement [12, 13, 14] sur les produits de départ et sur les produits finis par cytométrie de flux. Le marqueur nucléaire 7-AAD a été utilisé pour exclure les cellules mortes en se basant sur leur positivité au 7-AAD. Le pourcentage des cellules viables avant et après la concentration de la MO était respectivement de $96,1 \pm 1,5$ % et $96,3 \pm 1,9$ % sur *Cobe*[®], de $95,5 \pm 0,9$ % et $95,7 \pm 1,5$ % sur *Sepax 2*[®].

Ces résultats montrent que, quel que soit le séparateur utilisé :

- la viabilité cellulaire n'est pas modifiée par le processus de concentration de la MO ;
- le pourcentage des cellules viables après ce processus reste identique dans les deux groupes.

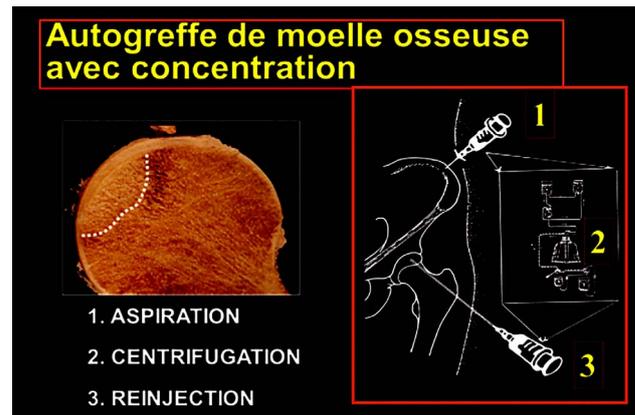


Figure 1. Les différentes étapes du traitement de la nécrose par autogreffe de moelle osseuse.

Potentiel ostéogénique des progéniteurs mésenchymateux CFU-F après concentration

Nous avons analysé la capacité des progéniteurs à former des colonies ostéoblastiques (*Colony Forming Unit-Osteoblasts CFU-OB*) après le processus de concentration de la MO. Après dix jours de culture en présence de b-glycérophosphate, dexaméthasone, acide ascorbique [12, 13, 14], les progéniteurs ostéoblastiques sont détectés par une mesure de l'activité phosphatase alcaline. Nos résultats réalisés sur des MO concentrées ont montré que 89 % des colonies avaient un potentiel de différenciation ostéoblastique. Ces résultats semblent indiquer que le processus de concentration de la MO maintient le potentiel ostéogénique des progéniteurs mésenchymateux.

Les résultats montrent que, quelle que soit la technique utilisée :

- il n'y a pas de perte de fonctionnalité après la réduction de volume des produits initiaux ;
- la concentration des progéniteurs fibroblastiques dans le produit fini est augmentée.

Fonction des CSM chez les patients avec ostéonécrose

Une question importante est la valeur fonctionnelle de ces CSM. Dans une autre étude, nous avons comparé quantitativement et qualitativement la fonction des CSM isolées d'un grand nombre de patients atteints d'ostéonécrose (ON) avec celle des donneurs normaux (DN) considérés comme des groupes témoins. Les essais d'efficacité de formation de colonies [12, 13, 14] ont été effectués afin d'évaluer l'expansion clonale des CSM et ont montré des résultats similaires pour la moelle de patients atteints d'ostéonécrose et celle des donneurs normaux (DN). Nous avons également mesuré le nombre d'unités formant des colonies-phosphatase alcaline (CFU-ALP +). Le pourcentage de colonies « d'ALP-positives » était similaire pour chaque groupe.

Justification du seuil de substance active à réinjecter

Le volume de trame osseuse d'une tête fémorale adulte est estimé à 40-50 cm³. La surface de nécrose peut atteindre jusqu'à 1/3 du volume total de la tête fémorale [11]. On estime qu'une tête fémorale contient approximativement 35 000 progéniteurs mésenchymateux dans 40-50 cm³. Ainsi, la quantité minimale de progéniteurs mésenchymateux à réinjecter pour combler le déficit *in situ* est estimée au minimum à 12 000 progéniteurs pour un volume lésionnel nécrotique de 17 cm³. Cette quantité de substance active peut parfois ne pas être atteinte à cause d'une pauvreté en progéniteurs mésenchymateux dans la matière première biologique prélevée.

Sur le plan technique

Pour éviter toute hyperpression iatrogène, il faut injecter la moelle lentement ; en principe, les 20 cm³ sont injectés en une minute, ce qui n'augmente pas la pression selon les mesures effectuées. L'injection se fait en mettant la hanche en rotation interne, ce qui place le trochanter au-dessus de la tête fémorale ; au moment de son ablation, le trocart est réintroduit dans le même point d'entrée en oblique pour casser les travées osseuses à l'entrée du canal et obtenir une obturation naturelle.

Efficacité thérapeutique dans l'ostéonécrose

Des études rétrospectives et prospectives [15, 16] ont confirmé l'efficacité de la technique. Une série rétrospective a montré l'intérêt des concentrés de moelle osseuse dans l'ostéonécrose de tête fémorale : 342 patients (534 têtes fémorales) présentant une ostéonécrose de la tête fémorale ont été traités entre 1990 et 2000 après décompression et greffe de concentré de moelle osseuse autologue prélevée sur les crêtes iliaques. Les patients ont été suivis entre 8 et 18 ans (13 années en moyenne). L'évaluation a été faite en suivant l'évolution du score de Harris qui augmente de 18 points.

Conclusion : l'injection de moelle osseuse concentrée, une pratique qui s'est répandue dans le traitement de la nécrose de hanche

Depuis les dix dernières années, de nombreux essais thérapeutiques ont été effectués dans le monde pour étudier le bénéfice de la greffe de moelle osseuse dans les ostéonécroses. L'ensemble de ces articles [17-20] a conclu à une amélioration indiscutable de l'état du patient, sur le plan de ses douleurs et sur le plan fonctionnel.

Ceci a été corroboré par la publication d'études comparatives (traitement par forage associé ou non à la MO, par exemple comparativement sur les deux hanches du même patient) dont certaines étaient randomisées [21-26]. Le forage seul, passagèrement efficace dans certains cas, s'est avéré insuffisant. Ces études ont permis de montrer une amélioration des résultats des patients inclus dans les stratégies de thérapie cellulaire

par rapport au forage seul sans cellule. Ainsi, l'étude randomisée prospective publiée par l'équipe de Bruxelles montre avec un suivi de 60 mois, une différence significative en faveur des patients traités par MO concentrée et forage par rapport aux patients traités seulement par forage simple, en ce qui concerne les critères de réduction de la douleur et de diminution de l'incidence des fractures sous-chondrales. Dans notre expérience, le risque de réintervention varie selon la taille de la nécrose, son stade, le nombre de cellules injectées, la cause de l'ostéonécrose, mais schématiquement va de 5 % dans les nécroses de petite taille au stade I, à 30 % pour les nécroses de grande taille au stade II avec un recul de 20 ans.

Références

- [1] Hernigou P, Beaujean F. La moelle osseuse, une clé dans la compréhension des nécroses de hanche idiopathiques. *Revue du Rhumatisme et des Maladies Ostéoarticulaires*, 1993; 60: 722.
- [2] Hernigou P, Beaujean F. Bone marrow activity in the upper femoral extremity in avascular osteonecrosis. *Rhum* (Eng. Ed.) 1993; (60): 610.
- [3] Friedenstein A.J., Shapiro-Piatetzky II., Petrakova K.V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*, 1966; 16: 381-90.
- [4] Friedenstein A.J., Gorskaja J.F., Kulagina, N.N., Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*, 1976; 4: 267-74.
- [5] Hernigou P, Zilber S., Filippini P., Rouard H., Mathieu G., Poignard A. Bone marrow injection in hip osteonecrosis. *Tech Orthop*, 2008; 23: 18-25.
- [6] Hernigou P, Homma Y., Flouzat Lachaniette C.H., Poignard A., Allain J., Chevallier N. *et al.* Benefits of small volume and small syringe for bone marrow aspirations of mesenchymal stem cells. *Int Orthop*, 2013; 37: 2279-87.
- [7] Hernigou J., Picard L., Alves A., Silvera J, Homma Y., Hernigou P. Understanding bone safety zones during bone marrow aspiration from the iliac crest: the sector rule. *Int Orthop*, 2014; 38: 2377-84.
- [8] Hernigou J., Alves A., Homma Y., Guissou I., Hernigou P. Anatomy of the ilium for bone marrow aspiration: map of sectors and implication for safe trocar placement. *Int Orthop*, 2014; 38 :2585-90.
- [9] Hebouvier A., Poignard A., Cavet M., Amiaud J., Leotot J., Hernigou P., Rahmouni A., Bierling P., Layrolle P., Rouard H., Chevallier N. Development of a simple procedure for the treatment of femoral head osteonecrosis with intra-osseous injection of bone marrow mesenchymal stromal cells: study of their biodistribution in the early time points after injection. *Stem Cell Res Ther*, 2015; 13(6):68.
- [10] Hernigou P, Manicom O., Poignard A., Nogier A., Filippini P., De Abreu L. Core decompression with marrow stem cells. *Oper Tech Orthop*, 2004; 14:68-74.
- [11] Hernigou P, Flouzat-Lachaniette CH., Delambre J., Poignard A., Allain J., Chevallier N., Rouard H. Osteonecrosis repair with bone marrow cell therapies: state of the clinical art. *Bone*, 2015; 70: 102-9.
- [12] Léotot J., Lebouvier A., Hernigou P., Bierling P., Rouard H., Chevallier N. Bone-Forming Capacity and Biodistribution of Bone Marrow-Derived Stromal Cells Directly Loaded Into

- Scaffolds: A Novel and Easy Approach for Clinical Application of Bone Regeneration. *Cell Transplant*, 2015; 24: 1945-55.
- [13] Lebouvier A., Poignard A., Cavet M., Amiaud J., Leotot J., Hernigou P., Rahmouni A., Bierling P., Layrolle P., Rouard H., Chevallier N. Development of a simple procedure for the treatment of femoral head osteonecrosis with intra-osseous injection of bone marrow mesenchymal stromal cells: study of their biodistribution in the early time points after injection. *Stem Cell Res Ther*, 2015; 13; 6:68.
- [14] Lebouvier A., Poignard A., Coquelin-Salsac L., Léotot J., Homma Y., Jullien N., Bierling P., Galactéros F., Hernigou P., Chevallier N., Rouard H. Autologous bone marrow stromal cells are promising candidates for cell therapy approaches to treat bone degeneration in sickle cell disease. *Stem Cell Res*, 2015; 8(15): 584-594.
- [15] Hernigou P., Beaujean F. Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. *Clin Orthop Relat Res*, 2002; 14-23.
- [16] Hernigou P., Poignard A., Zilber S., Rouard H. Cell therapy of hip osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. *Indian J Orthop*, 2009; 43: 40-5.
- [17] Gangji V., Hauzeur J.P., Matos C., De Maertelaer V., Toungouz M., Lambermont M. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone-marrow cells. A pilot study. *J Bone Joint Surg*, 2004; 86-A: 1153-60.
- [18] Gangji V., DeMaertelaer V., Hauzeur JP. Autologous bone marrow cell implantation in the treatment of non-traumatic osteonecrosis of the femoral head: five year followup of a prospective controlled study. *Bone*, 2011;49:1005-9.
- [19] Kawate K., Yajima H., Ohgushi H., Kotobuki N., Sugimoto K., Ohmura T., *et al.* Artificial tissue-engineered approach for the treatment of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head: transplantation of autologous mesenchymal stem cells cultured with beta-tricalcium phosphate ceramics and free vascularized fibula. *Organs*, 2006; 30: 960-2.
- [20] Kang J.S., Moon K.H., Park S.R., Kang S.B., Park H.B., Lee S.H. Clinical results of autoiliac cancellous bone graft combined with implantation of autologous bone marrow cells for osteonecrosis of the femoral head. *J Korean Orthop Assoc*, 2008; 43: 1-8.
- [21] Papakostidis C., Tosounidis T.H., Jones E., Giannoudis P.V. The role of "cell therapy" in osteonecrosis of the femoral head. *Acta Orthop*, 2015; 29: 1-7.
- [22] Piuze N.S., Chahla J., Schrock J., LaPrade R., Pascual-Garrido C., Mont M, *et al.* Evidence for the use of cell-based therapy for the treatment of osteonecrosis of the femoral head: A Systematic Review of the literature. *J Arthroplasty*, 2017; 32(5):1698-1708. doi: 10.1016/j.arth.2016.12.049.
- [23] Liu L., Sun Z., Chen B., Han Q., Liao L., Jia M., *et al.* Ex vivo expansion and in vivo infusion of bone marrow-derived Flk-1+CD31-CD34- mesenchymal stem cells: feasibility and safety from monkey to human. *Stem Cells Dev*, 2006; 15: 349-57.
- [24] Pepke W., Kasten P., Beckmann N.A., Janicki P., Egermann M. Core Decompression and Autologous Bone Marrow Concentrate for Treatment of Femoral Head Osteonecrosis: A Randomized Prospective Study. *Orthop Rev (Pavia)*, 2016; 8: 61-62.
- [25] Yan Z., Hang D., Guo C., Chen Z. Fate of mesenchymal stem cells transplanted to osteonecrosis of femoral head. *J Orthop Res*, 2009; 27: 442-6.
- [26] Zhao D., Cui D., Wang B., Tian F., Guo L., Yang L., *et al.* Treatment of early stage osteonecrosis of the femoral head with autologous implantation of bone marrow derived and cultured mesenchymal stem cells. *Bone*, 2012; 50: 325-30.