

# Applicazioni biotecnologiche nel campo delle problematiche del tessuto osseo

**Giorgio Maria Calori,  
Emilio Mazza,  
Lorenzo Tagliabue,  
Massimiliano Colombo,  
Carlo Ripamonti**

C.O.R., Istituto Ortopedico  
Gaetano Pini, Università di Milano

**RIASSUNTO** / Il tessuto osseo è uno dei pochi capaci di rigenerarsi in età adulta eppure, se il fisiologico processo di riparazione ossea viene rallentato (ritardi consolidativi) o interrotto (pseudoartrosi) oppure si è instaurata una necrosi ossea o una perdita di sostanza critica, ottenere la rigenerazione può diventare una vera sfida per il chirurgo. Per questo gli scienziati hanno iniziato a concentrare la loro ricerca sulla valorizzazione di alcune sostanze biologiche attive sui processi di guarigione dell'osso (biotecnologie) come mezzi alternativi al trapianto osseo autologo. Quest'ultimo è stato a lungo considerato il trattamento gold standard in questi casi ma è caratterizzato da una disponibilità limitata, un prolungato tempo chirurgico di prelievo e dalla morbidità legata al sito donatore. Le biotecnologie utilizzate per ottimizzare il substrato biologico possono essere identificate in: fattori di crescita sintetici (GF) come le proteine morfogenetiche ossee (rhBMP), fattori di crescita autologhi (AGF) contenute nel plasma arricchito di piastrine (PRP), cellule staminali mesenchimali (MSC) e scaffold. Esse possono essere utilizzate da sole (monoterapia) oppure in associazione (politerapia) a seconda della gravità del caso e della tipologia di paziente. Oltre che nel trattamento delle pseudoartrosi e dei difetti ossei critici, da qualche anno stiamo utilizzando queste biotecnologie anche nelle necrosi avascolari della testa del femore associate a core decompression. Le biotecnologie sono uno strumento potente e valido in chirurgia ortopedica, sono numerosi gli studi internazionali che ne sottolineano l'efficacia e la sicurezza. Una rigorosa indicazione e il loro utilizzo corretto però sono prioritari al fine di evitarne sprechi o mal usi.

**SUMMARY** (*Biotechnology applications in bone tissue complications*) / The bone tissue is one of the few able to regenerate in adult life but, if the physiological process of bone repair is slow (delayed unions) or stopped (non union), or an osteonecrosis or a critical bone loss are present, obtaining the regeneration can be a real challenge for the surgeon. For this reason, scientists have begun to focus their research on the exploitation of certain biologically substances active on the processes of bone healing (biotechnology) as an alternative to autologous bone graft. This has been considered for a long time the gold standard treatment in these cases but it has a limited availability, prolongs the surgery time and presents high morbidity related to the donor site. The biotechnologies used to optimize the biological substrate can be identified in: synthetic growth factors (GFs) such as bone morphogenetic proteins (rhBMPs), autologous growth factors (AGFs) contained in platelet-rich plasma (PRP), mesenchymal stem cells (MSCs) and scaffolds. They may be used alone (monotherapy) or in combination (polytherapy) depending on the severity of the case and the type of patient. In addition to the treatment of nonunions and critical bone defects we are also using these biotechnologies in the treatment of avascular necrosis of the femoral head associated with a core decompression. Biotechnologies are very powerful and valuable in orthopedic surgery, there are many international studies that underline their effectiveness and safety. Strict indications and a correct application, however, are a priority in order to prevent waste or bad uses.

**Parole chiave**

Biotecnologie, fattori di crescita, cellule mesenchimali, scaffold, pseudoartrosi, osteonecrosi, difetti ossei.

**Corrispondenza**

Prof. Giorgio Maria Calori,  
Direttore del Reparto di Chirurgia  
Ortopedica Riparativa,  
Istituto Ortopedico Gaetano Pini,  
Piazza Cardinal Ferrari 1,  
20122 Milano.  
E-mail: gmc@studiocalori.it

©2010, Editrice Kurtis.

## INTRODUZIONE

La riparazione del tessuto osseo è un complesso processo cellulare e molecolare strettamente regolato che conduce alla rigenerazione ossea del segmento traumatizzato. Negli ultimi anni le nostre conoscenze degli specifici eventi molecolari sono rapidamente cresciute. Il tessuto osseo possiede l'abilità di rigenerarsi anche in età adulta, ripristinando la stessa anatomia strutturale senza produrre tessuto cicatriziale. Inizialmente vi è uno stato infiammatorio, grazie alla secrezione di specifiche proteine e all'attivazione chemiotattica e paracrina vengono reclutate cellule progenitrici angiogeniche e mesenchimali. Queste, se stimolate da apposite proteine [(fattori di crescita trasformanti (TGF) e proteine morfogenetiche ossee (BMP)], possono differenziarsi in cellule specifiche (condroblasti o osteoblasti) in grado di produrre tessuto osseo qualora le condizioni biomeccaniche (stabilità e rigidità dell'impianto) ne consentano lo sviluppo (1). Vengono così soddisfatte le 4 esigenze del "concetto di diamante" che ha puntualizzato le differenti pertinenze meccaniche e biologiche necessarie al processo di rigenerazione ossea, queste ultime distinte per cellule, fattori di crescita e scaffold (2).

Eppure esistono situazioni in cui la rigenerazione ossea diventa un processo difficile, lento e a volte non raggiungibile senza un appropriato stimolo dall'esterno. Rientrano in questi casi le pseudoartrosi (PSA), soprattutto le atrofiche (Weber e Chech) (3), i difetti ossei critici e le osteonecrosi.

### *Pseudoartrosi*

Molteplici studi sono stati condotti in merito al tema delle PSA fin dagli anni '20 quando Albee e Lexer defi-

nirono quale PSA il momento in cui la consolidazione non può essere portata a termine se non con un nuovo stimolo biologico. Da allora diversi autori hanno apportato conoscenze fondamentali sui meccanismi osteogenetici riparativi, ponendo l'accento sui fattori di rischio di una PSA.

I processi che portano all'instaurarsi di una PSA oggi sono stati codificati e possono essere dovuti a fattori legati alla condizione stessa del paziente al momento del trauma e/o durante la fase seguente di riparazione dell'osso. L'età, il sesso, le condizioni fisiche [diabete (4), osteoporosi (5), massa muscolare (6), abitudini di vita - dieta (7), fumo (8, 9), alcol (10)] e le terapie farmacologiche associate sono tutti fattori di rischio generale, che hanno un sicuro ruolo nel determinare difetti di consolidazione della frattura andando a interagire col processo di guarigione anche dal punto di vista biologico. Sono tutti elementi, dunque, che possono condizionare difetti di consolidazione di una frattura (ritardi e PSA), come anche determinare differenti tipologie di PSA: atrofiche, agendo direttamente a livello delle fasi precoci, inibendo la formazione del coagulo e la formazione dell'osso periostale; ipertrofiche agendo sulla fase del rimaneggiamento senza permettere una corretta unione dei monconi di frattura (11). Le ipertrofiche indicativamente necessitano di stabilità, le atrofiche di uno stimolo biologico. Concorrono all'instaurarsi di queste complicazioni anche tutti i fattori di rischio locali costituiti dallo stato dei tessuti molli, dell'eventuale associazione di lesioni vascolo-nervose e di sepsi.

Al fine di racchiudere tutti questi elementi e fornire un'indicazione terapeutica, nel 2008 abbiamo sviluppato un nuovo sistema classificativo:

il Non Union Score System (NUSS). Questo innovativo sistema classificativo di fatto consente di identificare forme di PSA prognosticamente omogenee, indipendentemente dal solo sospetto radiografico e quindi di strutturare una più corretta ricerca clinica per ricavarne un algoritmo di cura. Noi riserviamo le biotecnologie ai casi complessi caratterizzati da gravità sia delle condizioni biologiche che meccaniche (NUSS compreso tra 51 e 75), in cui è quasi sempre richiesta la resezione en-bloc del focolo (tumore meta-traumatico). Spesso vi è, pertanto, una grave perdita di sostanza ossea che deve essere ripristinata (12).

### *Difetti ossei*

I difetti ossei critici sono una vera sfida per il chirurgo, possono verificarsi in conseguenza di traumi sovente ad alta energia, in esiti di estese resezioni ossee per patologia neoplastica o infettiva ma anche, come già accennato, nel trattamento di complessi focolai pseudoartrosici. I difetti sono considerati critici in base al tipo di segmento osseo colpito e alla dimensione della perdita ossea: 3 cm per l'avambraccio, 5 cm per il femore e la tibia e 6 cm per l'omero. Accanto alle consolidate tecniche di trasporto con fissatore esterno, autotrapianto o artrodesi, anche in questo campo possono trovare indicazione le biotecnologie (13).

### *Osteonecrosi*

Le osteonecrosi (testa e condili femorali, astragalo) sono anch'esse caratterizzate da uno stato di morte biologica nel quale il tessuto osseo ha perso vitalità. È molto difficile trattare questi casi e spesso la sostituzione protesica sembra l'unico trattamento possibile, soprattutto in casi avanzati con deformazione associata e artrosi secondaria.

A uno stadio intermedio però (II-III

di Steinberg nelle epifisarie di femore) uno stimolo biologico, se opportunamente fornito, potrebbe riattivare i fenomeni riparativi e ricostituire del tessuto osseo sano. In questo campo stiamo da qualche anno applicando in via sperimentale varie tecniche tra cui quelle di core decompression che associano l'utilizzo di biotecnologie (14).

## BIOTECNOLOGIE

Le biotecnologie a nostra disposizione possono essere identificate in: fattori di crescita sintetici (GF) come le proteine morfogenetiche ossee ricombinanti umane (rhBMP), fattori di crescita autologhi (AGF) contenute nel plasma arricchito di piastrine (PRP), cellule staminali mesenchimali (MSC) e scaffold. Andiamo ora ad approfondire tali biotecnologie analizzandone i principali studi in merito.

### GF

È stato dimostrato ormai, già dalla metà degli anni '90, che alcuni fattori di crescita agiscono come potenti stimolatori della proliferazione osteoblastica in vitro e della guarigione ossea in vivo, tali da rivelarsi assai utili nel favorire i processi di guarigione se correttamente applicati nella sede di lesione (15). Grazie all'evoluzione dell'ingegneria tissutale, infatti, è stato possibile produrre i singoli fattori di crescita con la tecnica del DNA-ricombinante, in particolare le BMP. Sebbene siano state individuate almeno 40 diverse rhBMP, una chiara dimostrazione clinica del potenziale osteoinduttivo è disponibile a oggi solo per la rhBMP-7, detta anche osteogenic protein-1 (OP-1), e la rhBMP-2 (16) appartenenti alla famiglia dei fattori di crescita trasformanti TGF- $\beta$  i cui recettori sono espressi su condrociti e osteoblasti

(17). Il fenomeno dell'osteoinduzione è caratterizzato dalla trasformazione delle cellule mesenchimali perivascolari in cellule osteoprogenitrici in grado di rigenerare tessuto osseo (18). A oggi solo rhBMP-7 può essere considerata un agente osteoinduttivo.

La recombinant human osteogenic protein-1 (rhOP-1), nota anche come rhBMP-7 (eptotermina  $\alpha$ ), veicolata dal collagene di tipo 1, è la prima approvata nel mondo nelle pseudoartrosi delle ossa lunghe e negli Stati Uniti come "humanitarian device exemption" (HDE) nelle pseudoartrosi spinali. La matrice di collagene rappresenta il veicolo della rhBMP-7, è insolubile e fornisce un'appropriata impalcatura biorisorbibile per i processi di proliferazione e differenziazione delle cellule, indotti dal principio attivo. Consente, inoltre, la ricrescita ossea dal tessuto osseo vascolarizzato e sano circostante verso l'area interna che ne difetta. In Europa è registrata come farmaco con indicazione nelle pseudoartrosi della tibia refrattarie all'autotrapianto o nei casi in cui l'autotrapianto non sia possibile. È un farmaco contenuto in una fiala sterile che deve essere ricostituito con 2-3 ml di soluzione fisiologica; viene quindi applicata sulla lesione, dopo posizionamento del dispositivo di fissazione (19).

L'applicazione prima pre-clinica e poi su umano è ormai consolidata e ha portato, in vari studi, percentuali di successo tra l'85 e l'89% con abbattimento altresì di tutte le complicazioni arrecate dall'uso nel passato consolidato di osso autologo: difficoltà connesse al prelievo autoplastico (ala iliaca, perone o stecca tibiale), che determinano scarsa compliance per il paziente con presenza nel 20% dei casi dolore cronico residuo al sito donatore, penalizzazione dei tempi operatori chirurgici ed anestesiolgici, frequenti

complicanze nella sede del prelievo (morbilità del sito donatore), tali da incidere in maniera negativa sia sullo stesso paziente che sulla spesa economica aziendale della struttura sanitaria. Per ultimo, ma non per importanza, l'aumento dei tempi operatori è segnato da un proporzionale aumento del rischio di infezione (20-25).

Studi originali e trial internazionali (di livello 1) hanno quindi dimostrato l'efficacia delle BMP-7 nella guarigione delle PSA e la loro capacità osteoinduttiva pari e a volte superiore all'innesto di osso autoplastico. Nel 2001 Friedlaender e coll. hanno riportato lo stesso tasso di guarigione dell'rhBMP-7 rispetto al trapianto autologo in una serie di 124 PSA tibiali (20). L'applicazione di rhBMP-2 in 150 fratture esposte di tibia [studio BMP-2 Evaluation in Surgery for Tibial Trauma (BESTT) (26)] e in 134 artrodesi vertebrali ha dimostrato una superiore capacità di guarigione se paragonate all'autotrapianto (27). De Long e coll., in un'importante review del 2007 su trapianti ossei e sostituti, conclusero che l'utilizzo clinico, supportato da un livello di evidenza scientifica 1, esiste a oggi solo per le rhBMP. (28). Dinopoulos e coll. nel 2007 hanno studiato l'applicazione delle due BMP disponibili (rhBMP-2 e rhBMP-7) nel trattamento di PSA delle ossa lunghe, concludendo che solo rhBMP-7 raggiunge un livello di evidenza 1 e quindi può rappresentare una valida alternativa all'autotrapianto in queste patologie (29). Un recente studio randomizzato su 60 PSA delle ossa lunghe e uno studio multicentrico su 68 PSA di tibia, hanno dimostrato che l'impiego di rhBMP-7 ha un tasso di guarigione (da 86,6 a 89,7%) superiore all'autotrapianto (21, 30).

In conclusione, rhBMP-7 è:

- un farmaco con una dose chiara e costante (31);
- un agente in grado di indurre la formazione di nuova matrice ossea (osteoinduttività) (32);
- l'unico fattore di crescita con una riconosciuta abilità di indurre la differenziazione delle cellule osteoprogenitrici in pre-condroblasti e pre-osteoblasti (16).

### AGF (PRP)

Il PRP è il prodotto più avanzato del "Blood Management", è un concentrato biologicamente attivo di mediatori estratti dal plasma del paziente ed è una fonte di fattori di crescita autologhi aspecifici [fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), TGFβ1-β2, fattore di crescita insulino-simile di tipo 1-2 (IGF1-2), fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF)] in grado di stimolare i processi riparativi ossei, cartilaginei e dei tessuti molli nella sede di impiego. È caratterizzato da un'elevata concentrazione di trombociti in grado di degranulare diversi fattori di crescita e citochine che inducono l'osteogenesi e l'angiogenesi con meccanismo chemotattico e mitogenetico (16).

Può essere ottenuto da sangue autologo o eterologo. Nel primo caso viene utilizzato sangue del paziente diminuendo la probabilità di infezioni o di reazioni crociate. Il volume di sangue prelevato non risulta essere emodinamicamente significativo per cui il prelievo può essere effettuato in sala operatoria nel momento stesso dell'intervento, la cui durata non viene dunque prolungata. Attualmente esistono anche preparati da sangue eterologo, vengono prodotti in collaborazione con il centro trasfusionale, i costi di produzione sono sicuramente inferiori, offrendo un prodotto altrettanto sicuro se vengono rispettati

degli standard di sicurezza e certificazione.

La raccolta degli emocomponenti necessari per la produzione del gel piastrinico può essere effettuata secondo un metodo di tipo classico e uno di tipo automatizzato. A seconda della procedura utilizzata si possono ottenere concentrazioni piastriniche finali dalle 4 alle 8 volte superiori a quelle iniziali. La concentrazione delle piastrine e quindi degli AGF, sembra essere l'elemento cruciale per influenzare il risultato clinico.

Nell'ambito della chirurgia maxillo-facciale Marx (33) espose un tasso di maggior densità dell'osso trabecolare nel gruppo trattato con PRP in casi di ricostruzione mandibolare. Tuttavia, risultati più scoraggianti giunsero prima da Fennis (34) sulla mandibola di topi e poi da Lowery e coll. (35) sulla colonna di conigli, che dimostrarono una percentuale di risultati positivi con uso di PRP pari a circa il 30%. Anche studi più recenti sempre in animali (36) e in chirurgia vertebrale (37, 38) confermano questi dati. Infine, in uno studio clinico prospettico randomizzato controllato del 2007 condotto su 60 PSA omogenee delle ossa lunghe si è dimostrata una minore capacità di guarigione da parte del PRP (63,8%) sia nei confronti delle BMP-7 sia in paragone all'autograft (30).

In conclusione, gli AGF contenuti nel PRP, come chiarito dai dati pre-clinici e clinici, sono:

- promotori della divisione cellulare (mitogenesi);
- non specifici per le cellule ossee;
- incapaci di promuovere la differenziazione delle cellule mesenchimali e di indurre la formazione di nuovo tessuto osseo (16).

Non sembrano essere molto utili quando usati da soli o in associazione con scaffold nel trattamento delle PSA delle ossa lunghe (30, 37, 38).

### MSC

Studi basati su terapie cellulari si sono concentrati su una rara popolazione di cellule non-ematopoietiche, chiamate MSC, che sono presenti nel midollo osseo dei pazienti e può essere ampliata in cultura in uno stato indifferenziato (39, 40). Oltre alle loro proprietà pluripotenti, le MSC sono considerate cellule progenitrici osteogeniche con dimostrata capacità di riparazione dei difetti ossei (41, 42). Tuttavia, un aspetto non va sottovalutato: la loro non sempre elevata concentrazione nel midollo osseo (43).

L'idea di arricchire una matrice con le MSC o il loro diretto impianto non è una novità (44). Tutte le strategie messe in atto sono state caratterizzate dalla raccolta di cellule del midollo osseo da cresta iliaca e loro espansione in coltura (41, 45). Ma in vitro l'isolamento e la differenziazione delle MSC richiedono tempo, lavoro e costi notevoli.

Recentemente nuove tecniche (46) si sono rese disponibili. L'aspirato di midollo osseo del paziente permette la concentrazione di cellule staminali mesenchimali direttamente in sala operatoria: da processi di centrifugazione che separano i componenti cellulari per la loro densità oppure da processi di ritenzione (filtrazione) che sfruttano la naturale affinità selettiva delle MSC a una matrice ossea di origine animale o di sintesi, così imbevuto in pressione negativa di MSC. Questo nuovi metodi mostrano due evidenti vantaggi: meno costi rispetto all'espansione in vitro delle MSC e un abbassamento drastico della morbilità del sito donatore rispetto alla tradizionale raccolta a cielo aperto dalla cresta iliaca.

L'applicazione umana di MSC si è dimostrata efficace in 53 pazienti in una serie di 60 PSA delle ossa lunghe (47). In tutti i casi è stata applicata un'iniezione di 20 cm<sup>3</sup> di

MSC ottenute per centrifugazione nel sito di PSA parametrata al volume della lesione patologica onde mantenere una magnificazione minima di 4 volte. In questo studio l'autore sottolinea l'influenza del numero e della concentrazione delle cellule progenitrici come fattore chiave per determinare la guarigione. Nel gruppo guarito (88,3%), infatti, la concentrazione di cellule progenitrici osservata è stata  $>1.500/\text{cm}^3$ , mentre nel gruppo dei fallimenti (11,7%) la concentrazione rilevata è stata  $<1.000/\text{cm}^3$ . Infine, lo studio di Hernigou ha mostrato che il trapianto autologo percutaneo di midollo osseo è un trattamento sicuro per le PSA asettiche e atrofiche della diafisi tibiale, in assenza di complicanze locali o sistemiche.

Tuttavia, ci sono delle questioni aperte: il numero di MSC umane con potenziale osteogenico diminuisce con l'età (48, 49). Esiste una grande variabilità di concentrazione delle MSC nel midollo osseo dei pazienti, tra le 200 e le 2.000 MSC per ml (43), e, in alcune malattie o alcune co-morbidità (fumatori), le cellule del midollo possono essere danneggiate o ridotte di numero (50). Infine, il tasso di guarigione non supera l'88%.

L'applicazione di MSC adulte prelevate dal midollo osseo e concentrate per centrifugazione in sala operatoria ha dimostrato costi inferiori alle espansioni cellulari di laboratorio e discreta efficacia di osteoinduzione cellulo-mediata (livello B di raccomandazione) se in concentrazioni superiori a  $60.000 \mu\text{l}$  secondo i criteri della evidence-based medicine, essendo un concentrato di cellule con capacità osteogeniche e osteopromotrici. L'uso clinico in pseudoartrosi si è dimostrato efficace nel determinare la guarigione delle PSA, soprattutto se associate a BMP (47, 51).

### **Scaffold**

L'osteoconduzione è determinata dalle caratteristiche chimico fisiche del substrato atte a favorire l'adesione e la crescita cellulare di superficie. Le caratteristiche meccaniche degli innesti ossei e la loro resistenza in compressione e torsione sono influenzate dalla loro forma (massivo, stecca corticale, blocco spongioso, morcellizzato), dalle modalità di prelievo, processazione e conservazione e dal tipo di mezzi di sintesi utilizzati. Il loro utilizzo ne dirige la scelta a seconda che sia sufficiente produrre la sola "conduzione" ovvero sia richiesta anche una solidità strutturale propria per fornire dignità di sostegno alla correzione della deformità o del gap osseo.

### **Matrice ossea demineralizzata**

La matrice ossea demineralizzata (DBM, collagene + proteine non collageniche), che si ottiene dalla demineralizzazione della corticale di ossa lunghe, ha dimostrato potenziale osteogenico dovuto alla presenza di BMP e di altri fattori come il TGF $\beta$  e l'IGF (52). Può essere "pura" o associata a un carrier biologico (porcino) o sintetico (acido ialuronico o glicerolo); può essere preparata senza particolari difficoltà e conservata senza perdere le sue proprietà osteoinduttive e osteoconduttive.

Essendo parte della categoria di derivazione dell'osso omologo ne condivide il rischio biologico.

Tuttavia, la DBM ha dimostrato una capacità osteoinduttiva inferiore rispetto all'autotrapianto (53) e ha mostrato un'elevata variabilità di concentrazione di BMP-2 e BMP-7, in differenti prodotti (54).

### **Sostituti di sintesi**

I sostituti di sintesi sono strutture minerali simili a quelle dell'osso umano. Hanno potere solo osteoconduttivo. Essi appartengono ai

calcio fosfati o alle ceramiche di calcio fosfato come l'idrossiapatite, l'idrossiapatite corallina (riassorbibile), il tricalcio fosfato (TCP, riassorbibile) ed il calcio fosfato bifasico (BCP=HA+TCP).

L'idrossiapatite è il materiale più utilizzato ed è disponibile in forma granulata riassorbibile e non riassorbibile e in forma solida, anch'essa nelle varianti riassorbibile e non riassorbibile. Per difetti di piccole dimensioni le idrossiapatiti sono dei buoni riempitivi e favoriscono, grazie alle loro proprietà osteoconduttive, la rivascularizzazione e la riossificazione progressiva dell'area trattata. Tutti i materiali disponibili hanno dei limiti evidenti. In particolare, le ceramiche sono disponibili sotto forma di polveri, di cementi o di impianti porosi e presentano almeno tre svantaggi importanti: la difficoltà di essere mantenute in sede, il lungo tempo necessario per il riassorbimento e la completa sostituzione con osso neofornito e l'impossibilità a colmare gap ossei importanti. Pertanto, non sono molto utili quando usati da soli nel trattamento delle PSA atrofiche delle ossa lunghe. (28).

### **Sostituti biologici**

Riconosciuti come "non-self", gli allotrapianti vengono aggrediti dal sistema immunitario. Essi hanno dimostrato potere osteoconduttivo ma non osteoinduttivo. Devono, quindi, essere rivascularizzati e ripopolati dall'esterno, richiedendo un ambiente circostante favorevole. Possono essere utilizzati come riempitivi (morcellizzato) oppure come supporto meccanico (stecche).

L'osso eterologo, detto anche xenograft, è tessuto osseo di derivazione bovina, equina o suina. Esso non viene demineralizzato, ma reso immunologicamente inerte (deantigenizzato). Esistono differenti prodotti con diverse caratteristiche biomec-

caniche legate alla forma e al livello di demineralizzazione ottenuto.

### NOSTRA ESPERIENZA

La nostra esperienza nasce da un lungo percorso clinico e chirurgico. Presso l'Unità Operativa Complessa di Chirurgia Ortopedica Riparativa dell'Istituto Ortopedico Gaetano Pini di Milano ci occupiamo estesamente del trattamento di PSA, difetti ossei critici e ostenecri, con particolare attenzione e interesse all'utilizzo delle nuove biotecnologie applicabili nell'ambito della rigenerazione ossea. Il nostro percorso è iniziato dalla considerazione dei fattori di rischio che conducono a una PSA (10), passando attraverso la formulazione di un nuovo sistema classificativo (NUSS) (12), quindi arrivando alla stesura delle linee guida di trattamento delle PSA e dei difetti ossei per la Società Italiana di Ortopedia e Traumatologia (SIOT) (13). Il percorso, però, non si è concluso: il nostro sforzo è di trovare e validare nuove applicazioni delle biotecnologie e nuovi materiali, sempre mantenendo il rigore scientifico e ponendo al centro dell'attenzione il paziente. Attualmente stiamo lavorando per determinare le modalità di realizzazione della cosiddetta "camera biologica" che vuole interpretare il ruolo del laboratorio naturale (bioreattore) per lo sviluppo delle fasi osteo-riparative. A titolo esemplificativo vi esporremo due differenti applicazioni biotecnologiche in un caso di PSA di avambraccio e un caso di osteonecrosi della testa del femore.

#### PSA (avambraccio)

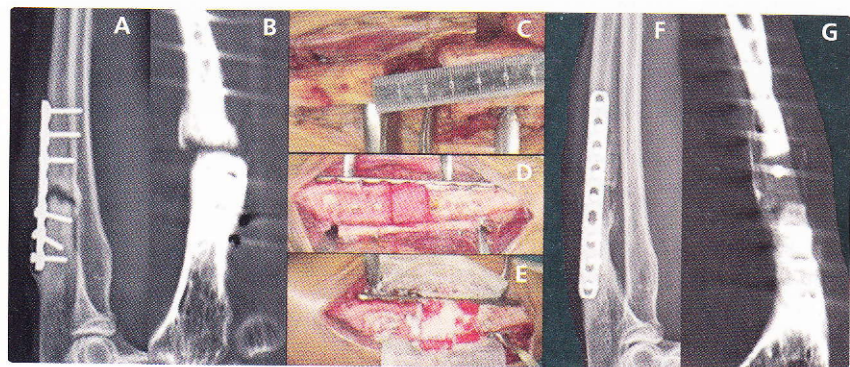
Le PSA di avambraccio sono una complicazione assai invalidante nella traumatologia dell'arto superiore; i pazienti giungono all'attenzione del-

l'esperto in materia spesso dopo 3 o più interventi chirurgici non risolutivi. Tali PSA sono caratterizzate da grave perdita di sostanza ossea che viene sostituita da tessuto patologico, non più attivo, spesso necrotico, che deve essere eliminato. La ricostruzione mediante autoinnesto di perone vascularizzato è una valida scelta terapeutica non scevra da complicazioni, prolungati tempi chirurgici e poca compliance da parte del paziente; tutt'ora tale tecnica viene da noi utilizzata in casi estremi (gap >5 cm) anche in associazione a biotecnologie per implementare ulteriormente i risultati. In alternativa, per casi meno critici (gap <5 cm), stiamo applicando il seguente protocollo chirurgico: resezione radicale del tessuto patologico (en-bloc) a margini netti fino ad arrivare a tessuto osseo sano e sanguinante, apertura mediante trivelle a mano del canale diafisario, impianto di materiale osteoconduttivo (scaffold sintetici o allogenici arricchiti di cellule mesenchimali autologhe) e osteoinduttivo

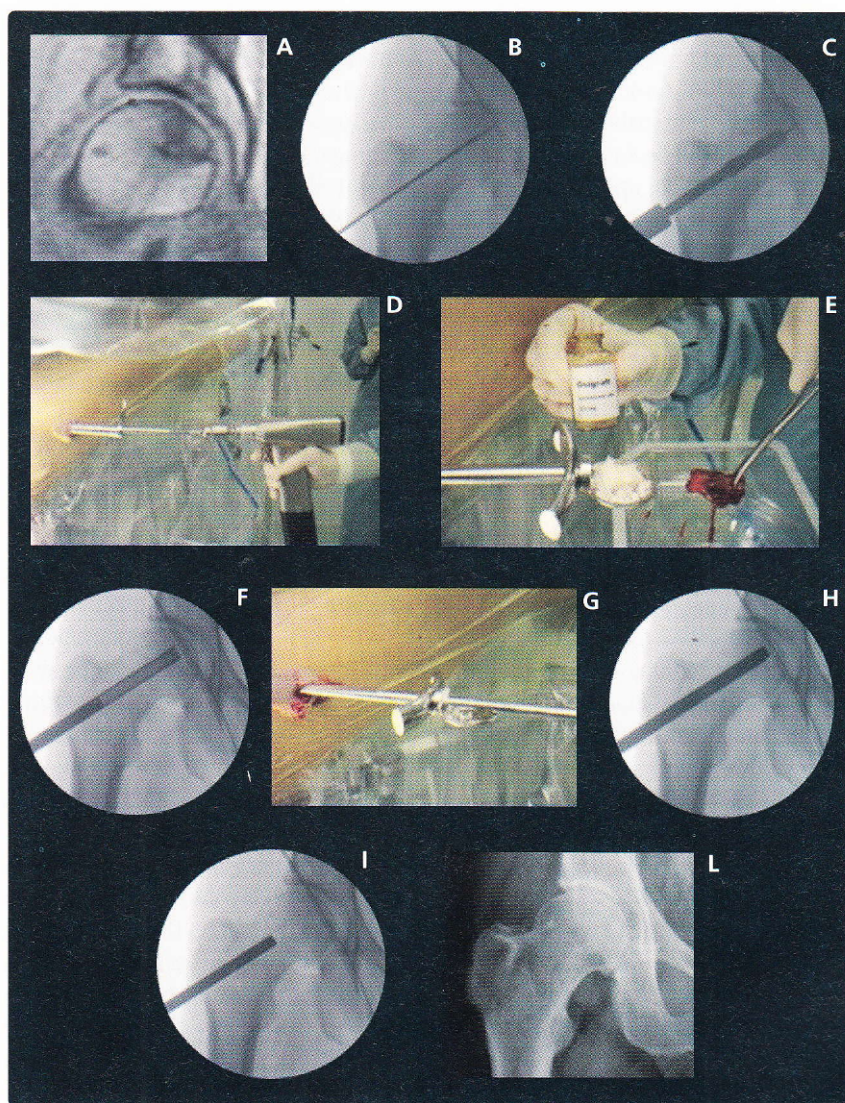
(fattori di crescita), stabilizzazione meccanica ottenuta tramite osteosintesi con placca a stabilità angolare supportata da stecca peroneale omologa contrapposta. L'intervento è ben tollerato dal paziente in quanto, grazie alla buona stabilità dell'impianto, l'arto può essere mobilizzato da subito. Già a 6 settimane è possibile valutare radiograficamente i primi fenomeni osteo-integrativi, i risultati clinici, radiografici e TC, come nel caso esposto, a 6 e 9 mesi dall'intervento sono ottimi (Figura 1).

#### Osteonecrosi (testa femorale)

L'osteonecrosi della testa del femore a uno stadio iniziale è tutt'oggi una sfida per l'ortopedico, soprattutto in considerazione del fatto che spesso colpisce pazienti giovani (tra la terza e la quinta decade di vita). La protesi totale dell'anca rimane il trattamento gold standard, pur essendo una scelta drastica che non risparmia l'articolazione colpita da tale patologia. Per questo da tempo sono state proposte in casi selezionati



**FIGURA 1** / Maschio, 34 anni, Non Union Severity Score (NUSS) 58. Trauma iniziale: incidente durante corsa motociclistica, frattura dell'ulna sinistra. Quadro attuale: pseudoartrosi atrofica con perdita di sostanza [pannello A: immagine Rx pre-op; pannello B: immagine di tomografia computerizzata (TC) pre-op]. Trattamento eseguito: resezione radicale (2,5 cm) del tessuto patologico (pannello C) a margini netti, apertura del canale diafisario, impianto di scaffold sintetico arricchito di cellule mesenchimali autologhe, osteosintesi con placca a stabilità angolare supportata da stecca peroneale omologa contrapposta (pannello D), impianto dei fattori di crescita rhBMP-7 (proteine morfogeniche ossee ricombinanti umane-7) (pannello E). A 6 mesi dall'intervento, clinica: buona funzione, assenza di dolore; Rx: buona formazione di callo osseo periostale con colata su lato volare dell'ulna (pannello F). A 9 mesi: TC: progressione del callo osseo, buona tenuta dell'osteosintesi e degli innesti (pannello G).



**FIGURA 2** / Maschio, 50 anni, necrosi avascolare della testa del femore destro a eziologia embolica (subacqueo) (pannello A: immagine di risonanza magnetica nucleare pre-op). Buone condizioni articolari. Trattamento eseguito: core decompression ottenuta grazie a infissione di un filo guida sotto controllo ampliscopico avendo cura di raggiungere l'area necrotica (pannello B) e successiva fresatura (pannelli C e D). Impianto tramite apposita cannula di fattori di crescita (proteine morfogeniche ossee ricombinanti umane-7, rhBMP-7) e uno scaffold equino flessibile arricchito con cellule staminali mesenchimali (MSC) autologhe (pannello E) innestati con spingitore dedicato (pannelli F-I). A 9 mesi, clinica: ottima funzione articolare, assenza di dolore; Rx: non progressione della necrosi, nessun collasso, sfericità della testa conservata, buona tenuta degli innesti.

varie tecniche alternative (artrodiastasi, tecnica di Mont, trapianto di perone vascolarizzato, core decompression con o senza impianto di mezzi di sintesi e fattori di crescita) in grado di salvare la testa femorale. Seguendo la strada della core de-

compression abbiamo voluto sviluppare una nuova tecnica chirurgica con realizzazione di uno strumento dedicato che associa l'asportazione del tessuto necrotico (decompressione) all'impianto di fattori di crescita (rhBMP-7) e uno scaffold

di osso equino flessibile arricchito con cellule mesenchimali autologhe. Scopo della procedura è di creare una camera biologica all'interno della testa femorale, un vero e proprio reattore biologico nel quale sono contenuti tutti gli elementi necessari al processo di rigenerazione ossea. La tecnica sembra offrire degli ottimi risultati soprattutto in considerazione dei brevi tempi chirurgici, della semplicità della tecnica operatoria e della possibilità di salvare un'articolazione ancora sana in pazienti giovani ma già sintomatici. Come nel caso esposto i risultati a 2 anni e 9 mesi sono incoraggianti, dimostrando la conservazione della sfericità della testa femorale, la congruenza articolare ed una clinica caratterizzata da assenza di dolore e una buona funzionalità dell'anca (Figura 2).

## CONCLUSIONI

Oggi giorno abbiamo a disposizione validi aiuti (biotecnologie) che possono essere utilizzati in sostituzione dell'innesto autologo. Sono strumenti efficaci, ma costosi, che pertanto necessitano di una rigorosa indicazione terapeutica al fine di evitarne sprechi o mal usi.

Le nostra esperienza nasce da un lungo percorso clinico e chirurgico basato sulla evidence-based medicine. Andando ad analizzare ciò che nel corso degli anni è stato pubblicato in merito alle biotecnologie, infatti, possiamo concludere, con un livello di evidenza 1, che le BMP sono superiori (4/6), uguali (1/6) e inferiori (1/6) all'autograft nei 6 studi internazionali di maggiore rilevanza (20, 21, 30, 55-57). Attualmente la ricerca si sta concentrando sulla scoperta di nuovi carrier in grado di aumentare la biodisponibilità e l'efficacia delle BMP. Anche il ruolo delle VEGF si sta andando a delineare, tali fatto-

ri sembrano infatti rivestire grande importanza nei difetti ossei critici (59). Le PRP possono aumentare le capacità integrative del trapianto autologo ma non riescono da sole ad aumentare il tasso di fusione e non vi sono studi di classe I su di esse (30). L'applicazione umana di MSC si è dimostrata efficace, il numero e la concentrazione delle cellule progenitrici sono dei fattori chiave per determinare la guarigione (47). L'allograpianto sembra essere inferiore all'autotrapianto ma non abbiamo studi di classe I in merito. Le ceramiche (idrossiapatite e calcio fosfato) sono risultate utili e sicure ma necessitano di un ambiente vitale per potersi integrare (28). Le DBM sono inferiori all'autotrapianto presentando un alto tasso di fallimento (53). Infine nuove prospettive si stanno aprendo grazie alla ricerca di nuovi materiali, carrier e nel campo della terapia genica (58).

## BIBLIOGRAFIA

- Marsell R, Einhorn TA. The role of endogenous bone morphogenetic proteins in normal skeletal repair. *Injury* 2009; 40 (Suppl 3): S4-7.
- Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: the Diamond Concept. *Injury* 2007; 38 (Suppl 4): S3-6.
- Weber BG, Cech O. Pseudarthrosis. Grune and Stratton, 1976.
- Martin JA, Ellerbroek SM, Buckwalter JA. Age-related decline in chondrocyte response insulin-like growth factor-I: the role of growth factor binding proteins. *J Orthop Res* 1997; 15: 491-98.
- Lill CA, Hessel J, Schelegel U et al. Biomechanical evaluation of healing in a non-critical defect in a large animal model of osteoporosis. *J Orthop Res* 2003; 21: 836-42.
- Healy WL, White GM, Mick CA et al. Nonunion of humeral shaft. *Clin Orthop Relat Res* 1987; 219: 206-13.
- Einhorn TA, Bonnorens F, Burstein AH. The contributions of dietary protein and mineral in the healing of experimental fracture. *J Bone* 1986; 23: 53-8.
- Adam CI, Kenting JF, Court-Brown CM. Cigarette smoking and open tibial fractures. *Injury* 2001; 32: 61-5.
- Ziran B, Cheung S, Smith W et al. Comparative Efficacy of 2 different demineralized bone matrix allografts in treating long-bone nonunions in heavy tobacco smokers. *Am J Orthop* 1995; 34: 329-32.
- Calori GM, Alibisetti W, Agus A et al. Risk factors contributing to fracture non-unions. *Injury* 2007; 38 (Suppl 2): S11-8.
- Chakkalakal DA, Novak JR, Fritz ED et al. Inhibition of bone repair in a rat model for chronic and excessive alcohol consumption. *Alcohol* 2005; 36: 201-14.
- Calori GM, Phillips M, Jeetle S et al. Classification of non-union: need for a new scoring system?. *Injury* 2008; 39(Suppl 2): S59-63.
- Calori GM, Tagliabue L, Colombo M et al. Pseudoartrosi e perdite di sostanza. *G.I.O.T.* 2010; 36: 183-9.
- Calori GM, Mazza E, Tagliabue L. Management delle osteonecrosi avascolari della testa femorale con fattori di crescita. *Aggiorn Club Ital Osteosint* 2008; 14: S131-5.
- Slater M, Patava J, Kingham K et al. Involvement of platelets in stimulating osteogenic activity. *J Orthop Res* 1995; 3: 655-9.
- Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. *J Bone Joint Surg J Bone Joint Surg Am* 2002; 84-A: 1032-44.
- Celeste AJ, Iannazzi JA, Taylor RC et al. Identification of transforming growth factor family members present in bone inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 9843-7.
- Wozney JM. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Devel* 1992; 32: 160-7.
- EMEA. European Public Assessment Report. Procedure: n° EMEA/H/C/293, 2000.
- Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD et al. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *J Bone Joint Surg* 2001; 83 (Suppl 1 - Part 2): S151-8.
- Kanakaris NK, Calori GM, Verdonk R et al. (2008) Application of BMP-7 to tibial non-unions: A 3-year multicenter experience. *Injury* 39 (Suppl 2): S83-90.
- Gupta AR, Shah NR, Patel TC et al. Perioperative and long-term complications of iliac crest bone graft harvesting for spinal surgery: a quantitative review of the literature. *Intern Med J* 2001; 8: 163-6.
- Goulet JA, Senunas LE, DeSilva GL et al. Autogenous iliac crest bone graft - complications and functional assessment. *Clin Orthop Relat Res* 1997; 339: 75-81.
- Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma* 1989; 3: 192-5.
- St John TA, Vaccaro AR, Sah AP et al. Physical and monetary costs associated with autologous bone graft harvesting. *Am J Orthop* 2003; 32: 18-23.
- Govender S, Csimma C, Genant HK et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am* 2002; 84A: 2123-34.
- Burkus JK, Sandhu HS, Gornet MF et al. Use of rhBMP-2 in combination with structural cortical allografts: clinical and radiographic outcomes in anterior lumbar spinal surgery. *J Bone Joint Surg Am* 2005; 87: 1205-12.
- De Long WG, Einhorn TA, Koval K et al. Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis. *J Bone Joint Surg Am* 2007; 89: 649-58.
- Dinopoulos H, Giannoudis PV. The use of bone morphogenetic proteins (BMPs) in long-bone non-unions. *Curr Orthopaed* 2007; 21: 268-79.
- Calori GM, Tagliabue L, Gala L et al. Application of rhBMP-7 and platelet-rich plasma in the treatment of long bone non-unions: a prospective randomized clinical study on 120 patients. *Injury* 2008; 39: 1391-402.
- Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 2004; 22: 233-41.
- Giannoudis PV, Tzioupis C. Clinical applications of BMP-7. The UK perspective. *Injury* 2005; 36 (Suppl): S47-50.
- Marx RE. Platelet Rich Plasma: Evidence to support its use. *J Oral Maxillofacial Surgery* 2004; 62: 489-96.
- Fennis JPM, Stoeltinga PJW, Jansen JA. Mandibular reconstruction: a clinical and radiographic animal study on the use of autogenous scaffolds and platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg* 2002; 31: 281-6.
- Lowery GL, Kulkarni S, Pennisi AE. Use of autologous growth factors in lumbar spinal fusion. *Bone* 1999; 2: 47-50L.
- Roldan JC, Jepsen S, Miller J et al. Bone formation in the presence of PRP vs BMP7. *Bone* 2004; 34: 80-90.
- Carreon LY, Glassman SD, Anekstein Y et al. Platelet gel (AGFs) fails to enhance fusion rates in instrumented posterolateral fusion. *Spine* 2005; 30: 243-6.
- Weiner BK, Walker M. Efficacy of autologous growth factors in lumbar intertransverse fusions. *Spine* 2003; 28: 1968-71.
- Pountos I, Corscadden D, Emery P et al. Mesenchymal stem cell tissue engineering: techniques for isolation, expansion and application. *Injury* 2007; 38 (Suppl 4): S23-33.
- Kadiyala S, Jaiswal N, Bruder SP. Culture-expanded, bone marrow-derived mesenchymal stem cells can regenerate a critical-sized segmental bone defect. *Tissue Engineering* 1997; 3: 173-85.
- Connolly JF. Clinical use of marrow osteoprogenitor cells to stimulate osteogenesis. *Clin Orthop Relat Res* 1998; 355 (Suppl): S257-66.
- Hamanishi C, Yoshii T, Totani Y et al. Bone mineral density of lengthened rabbit tibia is enhanced by transplantation of fresh autologous bone marrow cells. *Clin Orthop* 1994; 303: 250-5.
- Muschler GF, Boehm C, Easley K. Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume. *J Bone Joint Surg Am* 1997; 79: 1699-1709.
- Cummine J, Armstrong L, Nade S. Osteogenesis after bone and bone marrow transplantation. *Acta Orthop* 1983; 54: 235-41.
- Sharma S, Garg NK, Velliath AJ et al. Percutaneous bone-marrow grafting of osteotomies and bony defects in rabbits. *Acta Orthop Scand* 1992; 63: 166-9.
- Hernigou P, Mathieu G, Poignard A et al. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for



- nonunions. Surgical technique. *J Bone Joint Surg Am* 2006; 88 (Suppl 1): 322-7.
47. Hernigou P, Poignard A, Beaujean F et al. Percutaneous autologous bone marrow grafting for non-unions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am* 2005; 87: 1430-7.
  48. Muschler GF, Nitto H, Boehm CA et al. Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. *J Orthop Res* 2001; 19: 117-25.
  49. Nishida S, Endo N, Yamagiwa H et al. Number of osteoprogenitor cells in human bone marrow markedly decreases after skeletal maturation. *J Bone Miner Metab* 1999; 17: 171-7.
  50. Bidula J, Boehm C, Powell K et al. Osteogenic progenitors in bone marrow aspirates from smokers and nonsmokers. *Clin Orthop Relat Res* 2006; 442: 252-9.
  51. Saito A, Suzuki Y, Ogata SI et al. Accelerated bone repair with the use of a synthetic BMP-2-derived peptide and bone-marrow stromal cells. *J Biomed Mater Res* 2005; 72: 77-82.
  52. Einhorn TA, Lane JM, Burstein AH. The healing of segmental bone defects induced by demineralized bone matrix. A radiographic and biomechanical study. *J Bone Joint Surg Am* 1984; 66: 274-9.
  53. Drosos GI, Kazakos KI, Kouzoumpasis P et al. Safety and efficacy of commercially available demineralised bone matrix preparations: a critical review of clinical studies. *Injury* 2007; 38 (Suppl 4): S13-21.
  54. Bae HW, Zhao L, Kanim LE. Intersubject and intrasubject variability of bone morphogenetic proteins in commercially available demineralized bone matrix products. *Spine* 2006; 31: 1299-306.
  55. Zimmermann G, Wagner C, Schmeckenbecher K. Treatment of tibial shaft non-unions: bone morphogenetic proteins versus autologous bone graft. *Injury* 2009; 40 (Suppl 3): S50-3.
  56. Kanakaris NK, Lasanianos N, Calori GM. Application of bone morphogenetic proteins to femoral non-unions: A 4-year multicentre experience. *Injury* 2009; 40 (Suppl 3): S54-60.
  57. Giltaij LR, Shimmin AS, Friedlander G. Osteogenic protein-1 (OP-1) in the repair of bone defects and fractures of long bones: clinical experience. In: Vukicevic S, Sampath K, editors. *Bone morphogenetic proteins. From laboratory to clinical practice. Progress in Inflammation Research Series*. Birkhauser Verlag, 2002, pp 193-205.
  58. Calori GM, Donati D, Di Bella C et al. Bone morphogenetic proteins and tissue engineering: future directions. *Injury* 2009; 40 (Suppl 3): S67-76.
  59. Keramaris NC, Calori GM, Nikolaou VS et al. Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF. *Injury* 2008; 39 (Suppl 2): S45-57.