

Pseudoartrosi e perdite di sostanza

Long bone nonunions and bone defects

G.M. Calori
L. Tagliabue
M. Colombo
E. Mazza
W. Albisetti

RIASSUNTO

Le pseudoartrosi delle ossa lunghe e i difetti ossei critici sono tra le complicanze più difficili da trattare. Nel corso degli anni molte classificazioni, tutte basate su una valutazione radiologica, sono state proposte nel tentativo di ottenere un corretto inquadramento di questa patologia. Recentemente è stata proposta una nuova classificazione: il *Non Union Scoring System* (Nuss) che pone l'attenzione non solo sulla qualità dell'osso e sui problemi di osteosintesi, ma sulle condizioni del paziente in toto (malattie, stile di vita e utilizzo di farmaci) e quelle dei tessuti molli.

Abbiamo esaminato tutti gli agenti coadiuvanti che possono essere utilizzati in supporto alla sintesi ossea: i fattori di crescita ossea di sintesi, gli *scaffold*, il PRP autologo, il trapianto autologo di cellule mesenchimali totipotenti e la matrice ossea demineralizzata. L'uso di promotori della riparazione ossea sembra dare i migliori risultati di guarigione, ma, nel tentativo di evitare gli sprechi economici, abbiamo proposto un algoritmo di trattamento basato sulla tipologia di pseudoartrosi o perdita di sostanza in rapporto alla sede anatomica colpita.

Parole chiave: pseudoartrosi, perdite di sostanza, fattori di crescita, cellule mesenchimali, scaffolds

SUMMARY

The long bone nonunions and critical bone defects are two of the more difficult complications to treat. Over the years many classifications, all based on a radiological assessment, have been proposed in attempt to obtain a correct classification of this disease. It was recently proposed a new classification: the Non-Union Scoring System (Nuss), which focuses not only on bone quality and osteosynthesis problems, but on the conditions of the patient as a whole (diseases, lifestyle and use of drugs) and those of soft tissue. We examined all adjuvant agents which may be used in support of bone synthesis: synthetic bone growth factors, scaffolds, autologous PRP, transplantation of autologous totipotent mesenchymal cells and demineralized bone matrix. The use of promoters of bone repair appears to give the best results in healing, but in an attempt to avoid economic waste, we have proposed a treatment algorithm based on the type of nonunion or bone defect in relation to the anatomical site affected.

Key words: nonunions, bone defects, growth factors, mesenchymal cells, scaffolds

Istituto "G. Pini", Università di
Milano

Indirizzo per la corrispondenza:
Prof. G.M. Calori, Azienda
Ospedaliera Istituto "Gaetano
Pini", Piazza A. Ferrari 1,
20122 Milano

INTRODUZIONE

Il trattamento delle pseudoartrosi (PSA) delle ossa lunghe continua ad essere una sfida per il traumatologo con frequenti risultati insoddisfacenti e lunga morbilità. È di primaria importanza individuare i fattori di rischio locali e generali che hanno determinato il fallimento della riparazione ossea¹; solamente la loro intima comprensione permetterà di apportare i giusti correttivi e riavviare i fisiologici meccanismi di guarigione.

Recentemente, è stato codificato il “*Diamond Concept*” che, ha puntualizzato le differenti pertinenze meccaniche e biologiche, queste ultime distinte per cellule, *scaffold* e fattori di crescita².

Sotto il profilo meccanico, deve essere ripristinato lo spettro di stabilità che considera l’insieme dell’osso e dell’impianto di osteosintesi.

Lo spettro di stabilità interpreta la legge di Wolff fornendo indicazioni circa la necessità di modulare la rigidità della sintesi in ragione del grado di instabilità intrinseca della pseudoartrosi³.

Per potere codificare linee guida di trattamento è necessario innanzitutto procedere ad un corretto inquadramento nosologico del problema.

Nel corso degli anni sono stati via via proposti differenti tipi di classificazione delle pseudoartrosi.

Tra queste la più seguita sin’ora è quella proposta da Weber-Cech nel 1976 che distingue forme vitali, ipertrofiche ed oligotrofiche, cioè con possibilità di risposta biologica, da forme non vitali ovvero non reattive di tipo atrofico, frequentemente accompagnate da osteonecrosi ed anche da perdita di sostanza⁴.

Negli anni ’90 sono stati condotti numerosi studi finalizzati a definire la validità dei criteri biomeccanici: la scuola di Verona ha messo a punto una metodica estensimetrica (*strain-gauge bar*) che applicata ad un fissatore esterno monoassiale permetteva di misurarne il grado di stabilità sui differenti piani di riferimento⁵; nel 1991 Kenwright, utilizzando un radiogonometro, calcolava il valore di rigidità (*stiffness*) che caratterizza la guarigione della tibia (15 Nm/degree) e del femore (20 Nm/degree)⁶; nel 1998 Marsh stabiliva che il fallimento di guarigione di una frattura equivale al mancato raggiungimento del valore soglia di 7 Nm/degree a 20 settimane; ovvero definiva pseudoartrosi la cessata formazione di callo endostale o periostale prima del raggiungimento di tale valore⁷.

Appartiene dunque, alla fine degli anni novanta il concetto, già intuito da autori precedenti, che l’atrofia o

l’ipertrofia radiologica non sono espressione di maggior o minore vigore biologico.

Basandosi su questi innovativi criteri, Biasibetti nel 2000 proponeva, pertanto, una classificazione biomeccanica che, mutuando i principi sopra esposti, oltre a considerazioni biologiche sulla vitalità o meno del focolaio focalizzava il problema circa la possibilità di esercitare una compressione assiale o meno sul focolaio di pseudoartrosi; a parte erano, poi, inquadrati le forme settiche che, una volta risolte sotto il profilo dell’infezione, ricadevano nelle altre categorie di classificazione.

Nel 2008, era proposto il NUSS (*Non Union Scoring System*) che rappresenta un innovativo approccio al problema, poiché di fatto, interpreta le ragioni multifattoriali del fallimento, spiega perché in un 20% dei casi non viene raggiunta la guarigione a fronte di un corretto trattamento e soprattutto rende possibile la stesura di un algoritmo di scelta terapeutica⁸.

DISCUSSIONE

In ortopedia, di fatto, una delle patologie più complesse e discusse da trattare è rappresentata dalle pseudoartrosi-postraumatiche, le quali sovente richiedono più trattamenti correttivi e i casi che non guariscono dopo il terzo intervento diventano estremamente refrattari ai trattamenti successivi.

Molteplici studi sono stati condotti in merito al tema delle pseudoartrosi fin dagli anni ’20 quando Albee e Lexer definirono quale pseudoartrosi 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 non-union.

I processi che portano all’instaurarsi di una pseudoartrosi 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 (diabete⁹, osteoporosi¹⁰, massa muscolare¹¹), le abitudini di vita (dieta¹², fumo^{13 14}, alcol¹⁵) e le terapie farmacologiche associate sono tutti fattori di rischio generale, che hanno un sicuro ruolo nel determinare difetti di consolidazione della frattura.

Sono tutti elementi, dunque, che possono condizionare difetti di consolidazione di una frattura –ritardi e PSA –,

come anche determinare differenti tipologie di pseudoartrosi: 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 frattura¹.

Nello specifico i fattori di rischio locali che possono favorire l'evoluzione di una frattura verso una pseudoartrosi sono legati al meccanismo traumatico di produzione del trauma, alle tipologie di fratture ed alle lesioni ad essa associate. Solo con una buona conoscenza del tipo di frattura (semplice-stabili, complesse-instabili¹⁶, comminute-altamente instabili^{17 18}, segmentarie-potenzialmente instabili), del meccanismo con la quale si è verificata (traumi a bassa energia, traumi ad alta energia¹⁹) e delle eventuali situazioni concomitanti determinate dal trauma stesso (danni vascolari²⁰, regione interessata^{21 22}, gap interframmentario²³) è possibile pianificare un trattamento adeguato che riduca, per quanto possibile, le probabilità che la frattura evolva verso un fallimento terapeutico con l'insorgenza di una pseudoartrosi. Le fratture diafisarie di tipo C (Classificazione AO di Muller del 1984) sono quelle che hanno una maggiore tendenza ad evolvere in pseudoartrosi (40% tipo C, 15% tipo B, 6% tipo A di fratture diafisarie di femore²⁴).

Considerata la rilevanza del problema sono state nel tempo proposte numerose strategie di trattamento e l'adozione contemporanea di più tecniche sembrerebbe dare i risultati migliori.

Nella nuova classificazione NUSS del 2008, in pratica, sono considerate tutte le variabili in gioco ed i fattori di rischio, attribuendo a ciascuno un punteggio basato sulla esperienza clinica e sulle evidenze scientifiche e definendo altresì una linea di trattamento a seconda del punteggio finale⁸.

Lo score finale, ricavato dalla somma dei singoli punteggi, di fatto, permette di comparare pazienti diversi con pseudoartrosi diverse, rendendoli oggettivamente confrontabili secondo un principio di complessità.

Forme atrofiche di pseudoartrosi possono infatti avere migliore prognosi e maggiori possibilità di cura da forme oligotrofiche reattive, in pazienti affetti da compromissione dello stato generale di salute, come per esempio per un diabete scompensato.

Le variabili considerate sono:

- l'osso (qualità, tipo di frattura primaria, numero di interventi precedenti e loro invasività, classificazione della pseudoartrosi secondo Weber e Cech, adeguatez-

za del primo intervento in ordine alla stabilità meccanica, allineamento, gap osseo)^{10 18 25};

- i tessuti molli (stato dei tessuti, vascolarizzazione ed eventuali interventi su parti molli/cutanee di copertura)^{19 20 26-31};
- il paziente (grado ASA [*American Society of Anesthesiologists*], diabete, esami di laboratorio, stato infettivo, farmaci assunti e fumo)^{9 13 14 32 33}.

Il valore numerico della pseudoartrosi, misurato in base 100, definisce, così, quattro gruppi di severità con loro indicazione chirurgica:

- 1° gruppo con punteggio 0/25, costituisce un problema di tipo prevalentemente meccanico; il trattamento indicato è necessariamente la stabilizzazione del focolaio, ottimizzando ovvero modificando il sistema di osteosintesi.
- 2° gruppo con punteggio 26/50, costituisce un problema di tipo sia biologico che meccanico; il trattamento richiede correzione della sintesi e stimolazione biologica del focolaio, ottenuta con l'ausilio di mezzi fisici (campi elettromagnetici pulsati [CEMP], onde d'urto extracorporee [ESWT])³⁴⁻³⁷.
- 3° gruppo con punteggio 51/75. È un problema complesso caratterizzato da estrema gravità sia delle condizioni biologiche che meccaniche. È quasi sempre richiesta la resezione del focolaio e quindi presente una perdita di sostanza ossea che deve essere ripristinata. È questo l'ambito che trova maggiore indicazione per le biotecnologie (applicazione di cellule, *scaffold* e fattori di crescita).
- 4° gruppo con punteggio 76/100. Sono pseudoartrosi di tale gravità da essere assimilate ad un problema pressoché irrisolvibile e che pertanto possono richiedere una amputazione attuale primaria.

È indubbio che le pseudoartrosi del gruppo 3 (51-75 punti) siano le più difficili da trattare e spesso corrispondono alle forme recalcitranti che giungono all'osservazione di esperti della materia dopo 2-4 operazioni pregresse di media.

In tale gruppo riteniamo opportuno l'applicazione delle biotecnologie onde evitare inutili utilizzo di risorse economiche³⁸.

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 lesione³⁹.

Di fatti, grazie all'evoluzione dell'ingegneria tissutale è stato possibile produrre i singoli fattori di crescita con la tecnica del DNA-ricombinante, in particolare le proteine morfogenetiche dell'osso (BMP). Sebbene siano state individuate almeno 40 diverse rh-BMPs/OPs, una chiara dimostrazione clinica del potenziale osteoinduttivo è disponibile ad oggi solo per la rh-BMP-7 detta anche OP-1 (*Osteogenic Protein-1*) e la rh-BMP-2⁴⁰.

L'unica BMP approvata in Europa per il trattamento delle pseudoartrosi delle ossa lunghe è la rh-BMP-7 (3,5 mg eptotermina alfa) mescolata a un *carrier* bio-riassorbibile (1 g di collagene). 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 fissazione⁴¹.

L'applicazione prima pre-clinica e poi su umano è ormai consolidata ed 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 anestesiológicos, 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 infezione⁴²⁻⁴⁷.

Dunque studi originali e trial internazionali (di livello 1) hanno dimostrato l'efficacia delle BMP-7 nella guarigione delle pseudoartrosi e la loro capacità osteoinduttiva pari e a volte superiore all'innesto di osso autoplastico. Sempre in tema di rigenerazione tessutali in caso di pseudoartrosi importanti studi hanno validato l'inferiorità di efficacia del PRP (*Platelet Rich Plasma*) sia nei confronti delle BMP-7 sia in paragone all'autograft⁴⁸⁻⁵⁰.

La applicazione di cellule mesenchimali totipotenti autologhe 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 µL secondo i criteri EBM, essendo un concentrato di cellule con capacità osteogeniche e osteopromotrici.

L'uso clinico in pseudoartrosi si è dimostrato efficace nel determinare guarigione delle pseudoartrosi soprattutto se associate a BMP^{51 52}.

Le pseudoartrosi, infine le dobbiamo suddividere in relazione a: assenza, piccolo e critico *bone defect*. Quest'ultima categoria viene diversamente classificata a seconda del distretto anatomico interessato ovvero: > di 3 cm per l'avambraccio; > di 4 cm per la tibia; > di 6 cm per l'omero ed il femore⁵³⁻⁵⁵.

Le pseudoartrosi così inquadrare inoltre, avranno differenti indicazioni di trattamento a seconda che siano localizzate a livello diafisario, metaepifisario o epifisario.

Così definite si può ipotizzare un algoritmo di trattamento (Fig. 1) che prenda in considerazione tutti i punti sovraesposti ovvero:

1. Pseudoartrosi assenza *bone defect*:
 - diafisaria, inchiodamento endomidollare (IEB) con o meno applicazione di fattori di crescita ossea (BMP-7);
 - metaepifisaria IEB o fissazione interna a stabilità angolare (ASIF) con o meno applicazione di BMP-7;

Fig. 1. Algoritmo di trattamento delle pseudoartrosi.

	A No BD	B Small BD	C Critical BD
α Dia	IMN and/or BMP-7	IMN + BMP-7 + Scaffolds +/- Cells	1. EF (transport) + BMP-7 at docking point 2. ASIF + allograft (massive) + BMP-7 + cells 3. ASIF + Scaffolds (xeno + allo) + BMP-7 + Cells
β Meta	IMN >> ASIF +/- BMP-7	ASIF >> EF (no ligamentotaxis) BMP-7 + Scaffolds +/- Cells	ASIF + allograft (massive) + BMP-7 + Cells
γ Epi	ASIF +/- BMP-7	ASIF > EF (ligamentotaxis) + BMP-7 + Scaffolds +/- Cells	Arthrodesis

A: nessuna perdita ossea (BD); B: piccola perdita ossea; C: perdita ossea critica; α: diafisaria; β: metaepifisaria; γ: epifisaria; IMN: *Intramedullary Locking Nailing*; ASIF: *Internal Fixation With Angular Stability*; EF: *External Fixator*.

- epifisaria, ASIF con o meno applicazione di BMP-7
2. Pseudoartrosi con piccolo *bone defect*:
- diafisaria, IEB in associazione a BMP-7, *scaffold* con o meno applicazione di cellule mesenchimali autologhe concentrate (MSC);
 - metaepifisaria, ASIF preferibile alla fissazione esterna (EF) non in ligamentotassi in associazione a BMP-7, *scaffold* con o meno applicazione di MSC;
 - epifisaria, ASIF preferibile EF in ligamentotassi in associazione a BMP-7, *scaffold* con o meno applicazione di MSC.
3. Pseudoartrosi con *critical bone defect*:
- diafisaria, trasporto con EF in associazione a BMP-7 al *docking point*, o ASIF in associazione ad allinnesto massivo imbibito con MSC adiuvato da BMP-7, ASIF in associazione a *scaffold* (xeno + allo) imbibito con MSC adiuvato da BMP-7;
 - metaepifisaria ASIF con allo innesto massivo imbibito con MSC adiuvato da BMP-7;
 - epifisaria, artrodesi ^{11 42 48-50 52 56-60}.

In caso di pseudoartrosi settiche diventa mandataria la rimozione dei mezzi di sintesi, un'ideale toilette chirurgica tissutale, l'asportazione completa del tessuto malacico pseudoartrosico infetto (*en-block*), la costituzione di una nuova camera biologica ottenibile attraverso diverse metodiche: trasporto con EF in associazione a BMP-7 al *docking point*, innesto di matrice ossea demineralizzata antibiotata in associazione a *scaffold* + *cast*; cemento antibiotato fino alla normalizzazione degli indici di flogosi e delle indagini radiologiche con EF, seguita dall'asportazione del cemento antibiotato, applicazione di autograft ottenuto con tecnica RIA adiuvato da BMP-7 e osteosintesi con ASIF ⁶¹⁻⁶³.

CONCLUSIONI

Il presente lavoro non vuole fornire un rigido protocollo terapeutico delle pseudoartrosi ma desidera offrire delle linee guida in grado di indirizzarne il trattamento. Oggigiorno 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 nostre raccomandazioni nascono da una lunga esperienza clinica e chirurgica e sono basate sull'EBM.

Andando ad analizzare ciò che nel corso degli anni è stato pubblicato in merito alle biotecnologie possiamo concludere, con un livello di evidenza 1, che le BMP sono superiori (4/6), uguali (1/6) ed inferiori (1/6) all'autograft nei 6 studi internazionali di maggiore rilevanza ^{42 43 48 49 50 64}.

Attualmente la ricerca si sta concentrando sulla scoperta di nuovi *carrier* in grado di aumentare la biodisponibilità e l'efficacia delle BMP, fino ad arrivare alla terapia genica ⁶⁵.

L'allograft sembra essere inferiore all'autograft ma non abbiamo studi di classe 1 in merito. Le ceramiche (idrossiapatite e calcio fosfato) sono risultate utili e sicure ma necessitano di un ambiente vitale per potersi integrare ⁶⁶.

Le matrici ossee demineralizzate (DBM) sono inferiori all'autograft presentando un alto tasso di fallimento ⁶⁷.

Le PRP infine 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 1 su di esse ⁴⁸.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Calori GM, Albisetti W, Agus A, et al. *Risk factors contributing to fracture non-unions*. Injury 2007;38(Suppl.2):S11-8.
- ² Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. *Fracture healing: the Diamond Concept*. Injury 2007;38(Suppl.4):S3-6.
- ³ Wolff J. *Das Gesetz der Transformation der Knochen*. Berlin: A. Hirschwald 1982. Transl. *The Law of Bone Remodelling*. Berlin: Springer 1986.
- ⁴ Weber BG, Cech O. *Pseudarthrosis*. New York, Grune and Stratton 1976.
- ⁵ Caiaffa V, Corina G, Solarino G, et al. *La dinamizzazione nel trattamento delle fratture di gamba con fissatore esterno*. GIOT 2000;26:S38-42.
- ⁶ Kenwright J, Richardson JB, Cunningham JL, et al. *Axial movement and tibial fractures-A controlled randomised trial of treatment*. J Bone Joint Surg 1991;73B:654-9.
- ⁷ Marsh D. *Concepts of fracture union, delayed union, nonunion*. Clin Orthop 1998;355(Suppl.):S22-30.
- ⁸ 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.
- ⁹ 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 1977;15:491-8.
- ¹⁰ Lill CA, Hesseln J, Schelegen 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.

- 11 Healy WL, White GM, Mick CA, et al. *Nonunion of humeral shaft*. Clin Orthop Relat Res 1987;219:206-13.
- 12 Einhorn TA, Bonnorens F, Burstein AH. *The contributions of dietary protein and mineral in the healing of experimental fracture*. J Bone Joint Surg 1986;68A:1389-95.
- 13 Adam CI, Kenting JF, Court-Brown CM. *Cigarette smoking and open tibial fractures*. Injury 2001;32:61-5.
- 14 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.
- 15 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.
- 16 Ring D, Barrick WF, Jupiter J. *Recalcitrant non-union*. Clin Orthop 1997;340:181-9.
- 17 Nicoll A. *Fractures of the tibial shaft*. J Bone Joint Surg 1994;46B3:373-87.
- 18 Rodrigues-Marchand EC, Forriol F. *Nonunion: general principles and experimental data*. Clin Orthop 2004;419:4-12.
- 19 Triffin P, Greg J. *Depression of bone blood flow after blunt trauma*. Acta Orthop Scand 1994;65:195-8.
- 20 Dickson K, Katzman S, Delgado E, et al. *Delayed union and non-unions of open tibial fractures: correlation with arteriography results*. Clin Orthop 1994;302:189-93.
- 21 Uhtoff HK, Rahn BA. *Healing patterns of metaphyseal fractures*. Clin Orthop 1981;160:295-303.
- 22 Hayda RA, Brighton CT, Esterhai JL. *Pathophysiology of delayed healing*. Clin Orthop 1998;355(Suppl.):31-40.
- 23 Claes L, Augat P. *Influence of size and stability of the osteotomy gap on success of fracture healing*. J Orthop Res 1997;15:577-84.
- 24 Noumi T, Yokoyam K. *Intramedullary nailing for open fracture of the femoral shaft: evaluation of contributing factors on deep infection and non-union using multivariate analysis*. Injury 2005;35:1085-93.
- 25 Zinghi GF, Rollo G, Trono M. *La pseudoartrosi delle ossa lunghe*. Bologna: Timeo Editore 2004:20-23.
- 26 Crowley DJ, Kanakaris NK, Giannoudis PV. *Debridement and wound closure of open fractures: the impact of the time factor on infection rates*. Injury 2007;38:879-89.
- 27 Amanda D, Marshall W, Bosse MJ. *Timing of closure of open fractures*. J Am Acad Orthop Surg 2002;10:379-84.
- 28 Caudle RJ, Stern PJ. *Severe open fractures of the tibia*. J Bone Joint Surg 1987;69A:801-7.
- 29 Fischer MD, Gustilo RB, Varecka TF. *The timing of flap coverage, bone-grafting, and intramedullary nailing in patients who have a fracture of the tibial shaft with extensive soft-tissue injury*. J Bone Joint Surg 1991;73A:1316-22.
- 30 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.
- 31 Naique SB, Pearse M, Nanchahal J. *Management of severe open tibial fractures, the need for combined orthopaedic and plastic surgical treatment in specialist centres*. J Bone Joint Surg 2006;88(B):351-7.
- 32 Macey LR, Kana SM, Jingushi S, et al. *Defect of early fracture-healing in experimental diabetes*. J Bone Joint Surg 1989;71A:722-33.
- 33 Concia E, De Lalla F, Di Pervi G, et al. *Orientamenti diagnostico-terapeutici nella gestione delle infezioni osteoarticolari*. Varese: Pharma Project Group 2003.
- 34 Ciombor DM, Aaron RK. *The role of electrical stimulation in bone repair*. Foot Ankle 2005;10:579-93.
- 35 Karamitros AE, Kalentzos VN, Soucacos PN. *Electric stimulation and hyperbaric oxygen therapy in the treatment of non-unions*. Injury 2006;37(Suppl.1):S63-73.
- 36 Jingushi S, Mizuno K, Matsushita T, et al. *Low-intensity pulsed ultrasound treatment for postoperative delayed union or non-union of long bone fractures*. J Orthop Sci 2007;12:35-41.
- 37 Bara T, Synder M. *Nine-years experience with the use of shock waves for treatment of bone union disturbances*. Ortop Traumatol Rehabil 2007;9:254-8.
- 38 Dahabreh Z, Calori GM, Kanakaris NK, et al. *A cost analysis of treatment of tibial fracture non-union by bone grafting or bone morphogenetic protein-7*. Int Orthop 2009;33:1407-14.
- 39 Slater M, Patava J, Kingham K, et al. *Involvement of platelets in stimulating osteogenic activity*. J Orthop Res 1995;3:655-9.
- 40 Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. *The role of growth factors in the repair of bone*. J Bone Joint Surg 2002;84A:1032-44.
- 41 EMEA. *European Public Assessment Report*. Procedure n. EMEA/H/C/293, 2000.
- 42 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;83A(Suppl.1-Part2):S151-8.
- 43 Kanakaris NK, Calori GM, Verdonk R, et al. *Application of BMP-7 to tibial non-unions: a 3-year multicenter experience*. Injury 2008;39(Suppl.2):S83-90.
- 44 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.
- 45 Goulet JA, Senunas LE, DeSilva GL, et al. *Autogenous iliac crest bone graft - complications and functional assessment*. Clin Orth Rel Res 1997;339:75-81.
- 46 Younger EM, Chapman MW. *Morbidity at bone graft donor sites*. J Orthop Trauma 1989;33:192-5.
- 47 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.
- 48 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.
- 49 Zimmermann G, Wagner C, Schmeckenbecher K, et al. *Treatment of tibial shaft non-unions: bone morphogenetic proteins versus autologous bone graft*. Injury 2009;40(Suppl.3):S50-3.

- ⁵⁰ Kanakaris NK, Lasanianos N, Calori GM, et al. *Application of bone morphogenetic proteins to femoral non-unions: A 4-year multicentre experience*. *Injury* 2009;40(Suppl.3):S54-60.
- 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;72A:77-82.
- ⁵² 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* 2005;87A:1430-7.
- ⁵³ Hollinger JO, Kleinschmidt JC. *The critical size defect as an experimental mode to test bone repair methods*. *J Craniofac Surg* 1990;1:60-8.
- ⁵⁴ Mooney MP, Siegel MI. *Animal models for bone tissue engineering of critical-sized defects (CSDs), bone pathologies and orthopaedic disease states*. In: Hollinger JO, Einhorn TA, Doll BA, Sfeir C, editors. *Bone tissue engineering*. Boca Raton - London - New York - Washington: CRC Press 2005:217-44.
- ⁵⁵ Hollinger JO, Einhorn TA, Doll BA, Sfeir C, editors. *Bone tissue engineering*. Boca Raton - London - New York - Washington: CRC Press 2005.
- ⁵⁶ Schmidmaier G, Capanna R, Wildemann B, et al. *Bone morphogenetic proteins in critical-size bone defects: what are the options?* *Injury* 2009;40(Suppl.3):S39-43.
- ⁵⁷ Ring D, Kloen P, Kadzielski J, et al. *Locking compression plates for osteoporotic non-unions of diaphyseal humerus*. *Clin Orthop Relat Res* 2004;425:50-4.
- ⁵⁸ Catagni MA. *Treatment of tibial nonunions*. In: Bianchi Maiocchi A, editor. *Treatment of fractures, nonunions and bone loss of the tibia with the Ilizarov method*. Milano: Il Quadratino 1998:97-158.
- ⁵⁹ Cheng X, Lei D, Mao T, et al. *Repair of critical bone defects with injectable platelet rich plasma/bone marrow-derived stromal cells composite: experimental study in rabbits*. *Ulus Trauma Acil Cerrahi Derg* 2008;14:87-95.
- ⁶⁰ Kanakaris NK, Mallina R, Calori GM, et al. *Use of bone morphogenetic proteins in arthrodesis: clinical results*. *Injury* 2009;40(Suppl.3):S61-5.
- ⁶¹ Klauke K, Knothe U, Anton C, et al. *Bone regeneration in long-bone defects: tissue compartmentalisation? In vivo study on bone defects in sheep*. *Injury* 2009;40(Suppl.4):S95-102.
- ⁶² Huffman LK, Harris JG, Suk M. *Using the bi-masquelet technique and reamer-irrigator-aspirator for post-traumatic foot reconstruction*. *Foot Ankle Int* 2009;30:895-9.
- ⁶³ Giannoudis PV, Tzioupis C, Green J. *Surgical techniques: how I do it? The Reamer/Irrigator/Aspirator (RIA) System*. *Injury* 2009;40:1231-6.
- ⁶⁴ 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*. Basel: Birkhauser Verlag 2002:193-205.
- ⁶⁵ Calori GM, Donati D, Di Bella C, et al. *Bone morphogenetic proteins and tissue engineering: future directions*. *Injury* 2009;40(Suppl.3):S67-76.
- ⁶⁶ 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* 2007;89A:649-58.
- ⁶⁷ 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.