

## FATTORI DI CRESCITA CELLULARI

### Cell growth factors

#### Riassunto

L'incremento della vita media, del livello di attività della popolazione generale e della sopravvivenza agli incidenti della strada hanno creato e creeranno una popolazione sempre maggiore di pazienti affetti da patologia traumatica. Da ciò deriva il conseguente incremento della patologia pseudo-artrosica.

Un corretto trattamento chirurgico, basato sulla piena comprensione delle leggi biomeccaniche che ne determinino la necessaria stabilità iniziale, è alla base del processo di guarigione; ciononostante appare sempre più evidente che esistono dei fattori di rischio <sup>1</sup> correlati al paziente che possono rendere tale processo difficoltoso o anche impedirne il conseguimento. Dalla razionalizzazione di questi principi è stato possibile codificare il "Non Union Severity Score (NUSS)" <sup>2</sup>.

Il concetto del "Diamante" <sup>3</sup>, poi evolutosi in quello del "Pentagono", chiarisce l'importanza di tutti quei fattori che possono portare a guarigione la pseudoartrosi. Successivamente l'attività di ricerca scientifica si è concentrata per individuare un luogo circoscritto e selettivo <sup>4</sup> ove fosse possibile il verificarsi del processo biologico di guarigione; ovvero "la camera biologica" <sup>5</sup>. Il settore delle biotecnologie appare quindi l'ambito scientifico più attivo in grado di affrontare tali problematiche e la ricerca nel campo dei fattori di crescita ne costituisce un elemento imprescindibile quale "primum movens". Le cellule non sono solo il target di tali fattori di crescita ma costituiscono successivamente gli attori principali del complesso processo di guarigione ossea.

**Parole chiave:** fattori di crescita, pseudoartrosi, cellule staminali mesenchimali, concetto del diamante

#### Summary

The increase in life expectancy, the level of activity in the general population and survival to road accidents have created and will create a growing population of patients with traumatic pathology. From this arises the consequent increase in nonunions.

Proper surgical treatment, based on the full understanding of biomechanical initial stability, is the foundation of the healing process; but nevertheless, is becoming increasingly evident that there are risk factors <sup>1</sup> related to the patient that can make this process difficult or impossible.

Due to rationalization of these principles, it was possible to codify the "Non Union Severity Score (NUSS)" <sup>2</sup>.

**E.L. MAZZA, G.M. CALORI, M. COLOMBO,  
C. RIPAMONTI, E. MALAGOLI, S. MAZZOLA**  
Istituto Ortopedico Gaetano Pini - U.O.C. COR (Chirurgia  
Ortopedica Riparativa e Risk Management), Milano

#### Indirizzo per la corrispondenza:

Emilio Luigi Mazza  
corso Sempione 63, 20149 Milano  
E-mail: dottmazza@yahoo.com

The "Diamond concept" <sup>3</sup>, later evolved into the "Pentagon" one, clarifies the importance of all the factors that can lead to healing nonunion.

Then the activity of scientific research has focused to identify a selective <sup>4</sup> and circumscribed area where it was possible the occurrence of the biological process of healing; this is the "biological chamber" <sup>5</sup>.

The biotech industry is therefore the more active scientific domain able to face those issue and the research in the field of growth factors constitutes an essential element such as "primum movens".

Cells are not only the target of these growth factors but are also the main players in the complex process of bone healing.

**Key words:** growth factors, nonunion, mesenchymal stem cells, diamond concept

#### INTRODUZIONE

L'osso è costituito prevalentemente da una componente inorganica, la restante parte è formata da componente organica e da cellule.

La componente organica è a sua volta costituita da collagene e, per un 10%, da elementi non fibrillari.

Tra questi elementi non fibrillari oltre a proteoglicani, osteocalcina e osteonectina vi sono tutta una serie di altre glicoproteine tra le quali i fattori di crescita cellulari.

In generale i fattori di crescita cellulari influenzano l'equilibrio tra inibizione e induzione che è alla base della differenziazione di specifiche cellule <sup>6</sup>.

L'impiego dei fattori di crescita in chirurgia ortopedica e traumatologica sta recentemente crescendo grazie a nuove evidenze scientifiche che ne stanno promuovendo l'efficacia e la sicurezza. Sono numerose le differenti applicazioni cliniche di tali fattori sia nel campo delle problematiche del tessuto osseo che cartilagineo con differenti livelli di evidenza scientifica. Negli ultimi anni la comunità scientifica ha rivolto l'attività di ricerca anche verso l'uso di fattori di crescita nella riparazione del tessuto nervoso, muscolo-tendineo e cutaneo.

La capacità rigenerativa del tessuto osseo è una caratteristica individuale presente durante tutto l'arco della vita. Esistono però particolari condizioni cliniche ove il trattamento diviene una vera sfida per il chirurgo, tra queste ricordiamo:

- ritardo consolidativo;
- pseudoartrosi;
- necrosi avascolare;
- pseudoartrosi con perdita di sostanza critica.

Il tessuto cartilagineo possiede scarse capacità rigenerative intrinseche, tale fatto è legato soprattutto alla scarsa vascolarizzazione della cartilagine e alla complessa struttura tridimensionale di tale tessuto; qualora usurata, la cartilagine difficilmente sarà in grado di rigenerarsi

FIG. 1. Fattori di crescita sistemici.



andando incontro a una lenta ma inesorabile degenerazione della superficie articolare caratteristica del quadro artrosico.

Tra i fattori di crescita cellulari ricordiamo: fattori sistemici (Fig. 1) e locali (Fig. 2). Tra i fattori sistemici rientrano diversi ormoni come gli estrogeni, il paratormone, la vitamina D e la calcitonina.

I fattori sistemici sono oggi di estremo interesse nella ricerca di base, sia in ambito endocrinologico che reumatologico. Sempre più interessanti appaiono infatti gli studi inerenti alle due seguenti citochine: l'osteoprotegerina (OPG) e il ligando al recettore-attivatore del fattore nucleare- $\kappa$ B (RANKL). Studi originariamente condotti allo scopo di indagare la patologia osteoporotica e il correlato rischio di frattura<sup>7</sup>, si stanno sempre più spingendo ad analizzarne le correlazioni con i processi di guarigione ossea<sup>8</sup> e potrebbero costituire degli utili indici di guarigione. Ricordiamo infatti come gli osteoblasti e le cellule stromali del midollo osseo producano RANKL. Questo attiva gli osteoclasti legandosi all'omonimo recettore. Tale legame può essere impedito dalla OPG che compete con RANKL determinando un'inibizione alla differenziazione, attivazione e sopravvivenza degli osteoclasti<sup>9</sup>.

Tra i fattori locali troviamo la superfamiglia delle TGF-beta tra cui:

- BMP (*Bone Morphogenic Proteins*);
- FGF (*Fibroblast Growth Factor*);
- IGF (*Insulin Growth Factor*);
- PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*);
- VEGF (*Vascular Endotelial Growth Factor*).

FIG. 2. Fattori di crescita locali.



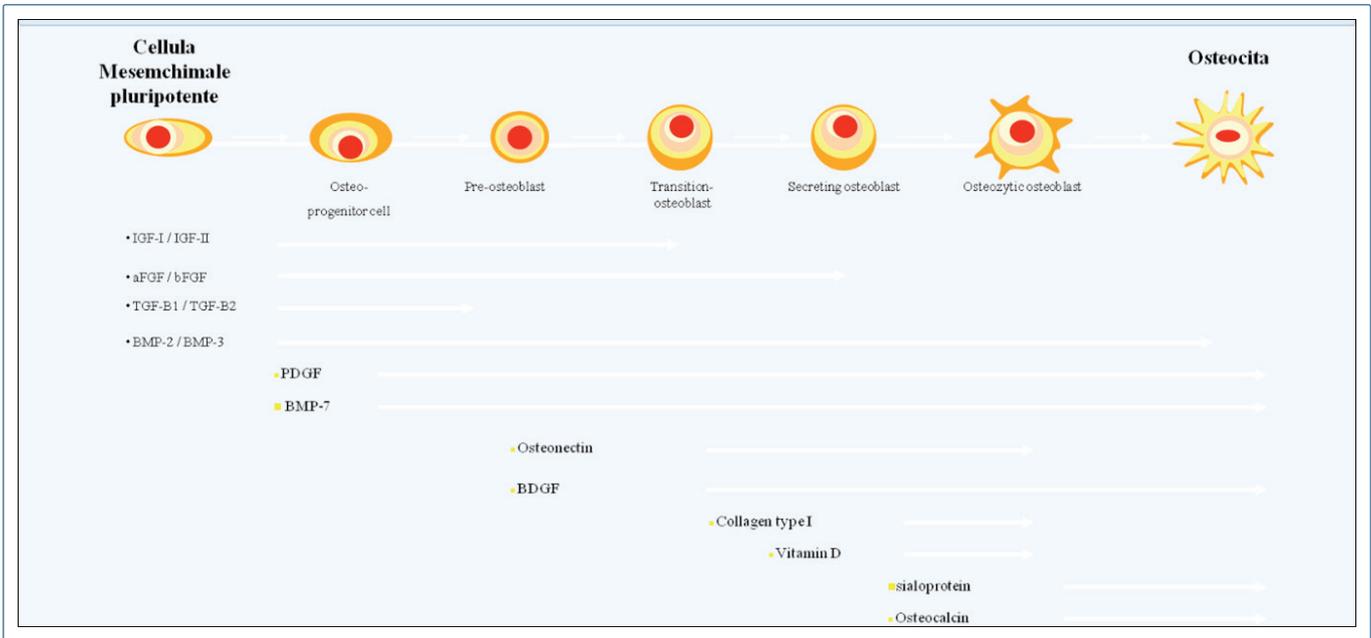
Le TGF-beta risultano estremamente più concentrate sia nell'osso che nelle piastrine<sup>10-11</sup> rispetto agli altri tessuti dell'organismo e questo ne determina, da un lato, l'importanza e, dall'altro, il tentativo di una facile estrazione autologa.

#### FATTORI DI CRESCITA SINTETICI (GFS), PROTEINE MORFOGENETICHE OSSEE (RH-BMPS) E PDGF (PLATELET DERIVED GROWTH FACTOR)

A partire dalla seconda metà degli anni Novanta la letteratura scientifica dimostra come alcuni fattori di crescita agiscano da potenti stimolatori della proliferazione osteoblastica in vitro e della guarigione ossea in vivo, tali da rivelarsi utili nel favorire i processi di consolidamento o rigenerazione ossea qualora correttamente applicati nella sede di lesione.

Grazie alle recenti evoluzioni dell'ingegneria genetica è stato possibile produrre i singoli fattori di crescita con la tecnica del DNA-ricombinante, in particolare le BMPs. Sebbene ne siano state individuate almeno 40 diverse isoforme, ad oggi una chiara dimostrazione clinica del potenziale osteoinduttivo è disponibile solo per la rh-BMP-7, nota anche con l'acronimo OP-1 (*Osteogenic Protein-1*), e la rh-BMP-2<sup>12</sup>. Esse appartengono alla super-famiglia dei fattori di crescita trasformanti TGF- $\beta$  i cui recettori sono espressi sia sui condrociti che sugli osteoblasti. Il fenomeno dell'osteoiduzione è caratterizzato dalla trasformazione delle cellule mesenchimali perivascolari in cellule osteoprogenitrici in grado di rigenerare tessuto osseo<sup>13</sup>. L'rh-BMP-7 (eptotermina alfa) è veicolata dal collagene di tipo 1 ed è la prima e unica approvata nel mondo per il

FIG. 3. Fattori di crescita ed interazione con le cellule mesenchimali pluripotenti.



trattamento delle pseudoartrosi delle ossa lunghe e negli Stati Uniti come HDE (*Humanitarian Device Exemption*) nel trattamento delle pseudoartrosi spinali. La matrice collagenica rappresenta il principale veicolo della rh-BMP-7; tale matrice è insolubile e fornisce un'adeguata impalcatura biorassorbibile per i processi proliferativi e differenziativi delle cellule. In Europa è registrata come farmaco con indicazione al trattamento delle pseudoartrosi di tibia refrattarie all'autotrapianto o nei casi in cui l'autotrapianto non risulti effettuabile<sup>14</sup>.

I fattori di crescita hanno funzioni specifiche in momenti specifici della differenziazione di ogni cellula mesenchimale. Dalla figura 3 può essere facilmente compreso quanto questo possa oggettivamente complicare il quadro clinico del loro utilizzo.

Da un punto di vista clinico i fattori di crescita autologhi (AGFs) contenuti nel plasma arricchito di piastrine (PRP) hanno fornito motivo di vivo interesse.

Il *Platelet Rich Plasma* (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 (PDGF, TGF-β1/β2, IGF-1/2, 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.

Può essere ottenuto da sangue autologo o eterologo. Nel primo caso viene utilizzato sangue del paziente diminuen-

do 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, 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 AGFs, sembra essere l'elemento cruciale per influenzare il risultato clinico e anche quello meno dominabile essendo diverse le variabili in gioco. Nella maggior parte dei casi si tratta di concentrati piastrinici o lisati piastrinici.

Da un punto di vista farmacologico un suo utilizzo correlato ai principi di dose risposta non può essere perseguito; questa problematica rimane attualmente irrisolta rendendo quindi l'uso di questi prodotti autologhi poco riproducibile e confrontabile con altri studi clinici. Il panorama generale è quello di risultati provenienti da esperienze personali differenti ma non sono ancora disponibili convincenti studi condotti con un rigore scientifico tale da considerarne le evidenze come di classe A.

Vi è sicuramente un effetto delle PDGF sulle cellule mesenchimali ma appare difficile valutarlo in funzione di una dose-efficacia. Non vi è inoltre certezza che vi sia una reale capacità di indurre una differenziazione osteogenetica<sup>15</sup>. La letteratura prevalente che ne proporrebbe l'uso in campo ortopedico è spesso di pertinenza maxillo-facciale<sup>16 17</sup>. Maggiori evidenze si hanno per quanto riguarda la guarigione di lesioni muscolari ove spesso i concentrati piastrinici e i lisati vengono utilizzati in fasi differenti del trattamento infiltrativo.

Diversamente dai prodotti autologhi da PRP, le BMPs di sintesi prevedono un dosaggio e come tale permettono un utilizzo più corretto da un punto di vista medico ma anche una maggiore riproducibilità e confrontabilità dei risultati. Le rh-BMPs<sup>13</sup> hanno dimostrato in diversi studi condotti sia su animali che sull'uomo<sup>18 19</sup>, non solo un'efficacia di laboratorio nello stimolare le cellule mesenchimali residenti, ma anche un'utilità clinica sul versante dell'osteoinduzione. La rh-BMP2<sup>20</sup>, particolarmente studiata nella chirurgia vertebrale<sup>21</sup> e la rh-BMP7 nelle pseudoartrosi delle ossa lunghe<sup>22-25</sup>, sono sicuramente le rh-BMP più promettenti e utilizzate a livello clinico<sup>26</sup>.

Tali studi sono stati condotti sia su fratture che in casi di pseudoartrosi. Per quanto riguarda le fratture in acuto, la maggiore efficacia sembra economicamente sostenibile solo nei casi più complessi<sup>27</sup>.

Un recente studio evidenzierrebbe come IGF-1 possa essere in grado di potenziare l'effetto osteoinduttivo sulle cellule mesenchimali nell'uso di BMP-9<sup>28</sup>.

### FGF E VEGF

Sono fattori di crescita cellulari che sembrano poter essere efficaci nel rivascularizzare i trapianti ossei allogeneici<sup>29</sup> ma il loro ruolo deve essere ancora ampiamente chiarito. L'azione prevalente sembra essere nella regolazione del *feedback* osteoblastico.

### IGF (INSULIN GROWTH FACTOR)

È un noto fattore di crescita cellulare del tessuto osseo la cui specifica funzione non è ancora completamente chiarita e la sua funzione è regolata da 6 *binding proteins*. Il rapporto tra IGF e le sue *binding proteins*<sup>30</sup> sembra avere un ruolo sia nella guarigione delle fratture fresche ma anche delle pseudoartrosi.

### UTILIZZO DEI FATTORI DI CRESCITA CELLULARI

Parlare di fattori di crescita cellulari vuol dire individuare quale sia l'oggetto della nostra crescita o differenziazione.

Parlando di pseudoartrosi vi è una sostanziale e univoca indicazione che l'elemento cellulare di maggior interesse (nella scienza di base e anche nella pratica clinica) sia, allo stato dell'arte, la cellula mesenchimale pluripotente.

Da tale cellula prendono origine i precursori di molte cellule del tessuto connettivo. Embriologicamente dal mesenchima derivano infatti il tessuto connettivo propriamente detto, il tessuto osseo, il tessuto cartilagineo e il sangue. Nell'adulto permangono indifferenziate alcune cellule mesenchimali pluripotenti.

La sede prevalente di tali cellule pluripotenti nell'adulto è il midollo osseo.

Tali cellule hanno quindi la possibilità di differenziarsi durante la vita del soggetto e appaiono quindi al centro della cascata di eventi in grado di portare a guarigione il focolaio di frattura. La progressione da cellula mesenchimale a osteocita vede però diverse fasi, come sopra menzionato, e in ognuna di queste gli stimoli offerti dai fattori di crescita appaiono spesso sinergici e prevedono una precisa consequenzialità (Fig. 3).

Il midollo osseo, sede fruibile delle cellule mesenchimali, costituisce oggi la fonte principale di tali cellule.

Ad oggi vi è estremo interesse nel tentare di individuare quali siano i pazienti a rischio di pseudoartrosi. È osservazione non infrequente che alcuni soggetti, purtroppo "rari", benché trattati non correttamente presentino guarigioni "miracolose". È tuttavia maggiore il numero di pazienti che, nonostante un corretto trattamento chirurgico, vanno incontro a numerosi interventi chirurgici inefficaci. L'individuazione di questi pazienti a maggior "rischio biologico" costituisce oggi la frontiera clinica di interesse e il NUSS è il primo e più rilevante passo in tale direzione. Individuati i casi e le possibili cause<sup>31</sup>, l'uso corretto dei fattori di crescita costituisce oggi la più opportuna risposta alla domanda di guarigione di questi pazienti.

Come precedentemente menzionato, un ulteriore motivo di interesse, può risiedere nel rivascularizzare e abitare i trapianti ossei massivi allogeneici.

L'aver individuato le cellule da stimolare in quanto costituzionalmente deficitarie<sup>32 33</sup>, permetterà in futuro un'eventuale terapia genica<sup>34 35</sup> atta a correggere un'apparente predisposizione alla mancata guarigione<sup>36 37</sup>. Appare quindi evidente alla comunità scientifica che qualunque sforzo atto a razionalizzare i trattamenti biotecnologici disponibili risulti necessario anche in relazione all'elevato costo.

Le rh-BMPs, e in particolare la BMP7 dati gli studi in letteratura, sono oggi di frequente utilizzo *off-label*:

- pressoché in ogni distretto topografico oltre a quello diafisario tibiale;
- per il trattamento delle necrosi avascolari epifisarie;
- in quei casi in cui si debbano utilizzare innesti massivi di osso omologo allo scopo di facilitarne e velocizzarne l'osteointegrazione.

Riteniamo comunque che un tale utilizzo più esteso debba avvenire nelle mani di centri specializzati che abbiano le

competenze e la possibilità di selezionarne l'uso in casi particolari, razionalizzandone il costo. Inoltre concentrare in pochi centri tali casi permetterà di raccogliere dati scientifici utili al progredire della conoscenza.

## CONCLUSIONI

I fattori di crescita oggi disponibili in commercio, siano essi di sintesi o di derivazione umana, possono essere utili in alcune e specifiche applicazioni cliniche in chirurgia ortopedica e traumatologica. Sono delle risorse importanti ma spesso molto costose che quindi richiedono un'applicazione rigorosa con indicazioni ristrette. Possiamo quindi concludere che, per quanto concerne il trattamento delle pseudoartrosi delle ossa lunghe, le rh-BMP-7 sono:

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

Le rh-BMP-2 sono anch'esse riconosciute come agenti osteoinduttivi ma la loro applicazione, secondo la letteratura ad oggi disponibile, trova sicuramente più spazio in chirurgia spinale e nel trattamento delle fratture acute.

Gli AGFs contenuti nel PRP sono invece:

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

Non sembrano essere molto utili quando usate da sole o in associazione con *scaffolds* nel trattamento delle pseudoartrosi delle ossa lunghe, possono invece avere un ruolo nel trattamento sintomatico delle lesioni cartilaginee soprattutto in uno stadio iniziale di artrosi del ginocchio o nei casi di lesioni muscolari.

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 1 su di esse. Andando ad analizzare ciò che nel corso degli anni è stato pubblicato in merito alle biotecnologie, possiamo concludere che le BMP sono superiori (4/6), uguali (1/6) e inferiori (1/6) all'*autograft* in sei studi internazionali di maggiore rilevanza<sup>38,43</sup>, con un livello di evidenza 1.

Attualmente la ricerca si sta concentrando sulla scoperta di nuovi *carrier* in grado di aumentare la biodisponibilità e l'efficacia delle BMP.

L'applicazione umana di MSCs si è dimostrata efficace nel trattamento delle pseudoartrosi, il numero e la concentrazione delle cellule progenitrici sono i fattori chiave per determinare la guarigione<sup>44</sup>.

## Bibliografia

- 1 Calori GM, Albisetti W, Agus A, et al. *Risk factors contributing to fracture non-unions*. Injury 2007;(Suppl 2):S11-8.
- 2 Calori GM, Phillips M, Jeetle S, et al. *Classification of non-union: need for a new scoring system?* Injury 2008;(Suppl 2):S59-63.
- 3 Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. *Fracture healing: the diamond concept*. Injury 2007;(Suppl 4):S3-6.
- 4 Dimitriou R, Mataliotakis GI, Calori GM, et al. *The role of barrier membranes for guided bone regeneration and restoration of large bone defects: current experimental and clinical evidence*. BMC Med 2012;10:81.
- 5 Calori GM, Giannoudis P. *Enhancement of fracture healing with the diamond concept: the role of the biological chamber*. Injury Int J Care Injured 2011;42:1191-3.
- 6 Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, et al. *Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells*. Proc Natl Acad Sci USA 2000;97:11307-12.
- 7 Jørgensen L, Hansen JB, Ahmed L, et al. *Osteoprotegerin is associated with hip fracture incidence: the Tromsø Study*. Int J Epidemiol 2012;41:1033-9.
- 8 Wang XF, Zhang YK, Yu ZS, et al. *The role of the serum RANKL/OPG ratio in the healing of intertrochanteric fractures in elderly patients*. Mol Med Rep 2013;7:1169-72.
- 9 Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al. *Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL*. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:3597-602.
- 10 Joyce ME, Roberts AB, Sporn MB, et al. *Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur*. J Cell Biol 1990;110:2195-207.
- 11 Noda M, Camilliere JJ. *In vivo stimulation of bone formation by transforming growth factor-beta*. Endocrinology 1989;124:2991-4.
- 12 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.
- 13 Wozney JM. *The bone morphogenetic protein family and osteogenesis*. Mol Reprod Devel 1992;32:160-7.
- 14 EMEA 2000;European Public Assessment Report. Procedure: n° EMEA/H/C/293.
- 15 Kumar A, Salimath BP, Stark GB, et al. *Platelet-derived growth factor receptor signaling is not involved in osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells*. Front Biosci 2013;18:106-19.
- 16 Shah P, Keppler L, Rutkowski J. *A review of platelet derived growth factor playing pivotal role in bone regeneration*. J Oral Implantol 2012;[Epub ahead of print].
- 17 Baeyens W, Glineur R, Evrard L. *The use of platelet concentrates: platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in bone reconstruction prior to dental implant surgery*. Rev Med Brux 2010;31:521-7.
- 18 Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, et al. *Osteogenic Protein-1 (BMP-7) in the treatment of tibial nonunions*. J Bone Joint Surg 2001;(Suppl 1):S1151-8.
- 19 Giannoudis PV, Kanakaris NK, Dimitriou R, et al. *The synergistic effect of autograft and BMP-7 in the treatment of atrophic nonunions*. Clin Orthop Relat Res 2009;467:3239-48.
- 20 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.

- <sup>21</sup> 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.
- <sup>22</sup> 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.
- <sup>23</sup> Hernigou P, Mathieu G, Poignard A, et al. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. *Surgical technique*. *J Bone Joint Surg Am* 2006;(Suppl 1):322-7.
- <sup>24</sup> Kanakaris NK, Calori GM, Verdonk R, et al. Application of BMP-7 to tibial nonunions: A 3-year multicenter experience. *Injury* 2008;(Suppl 2):S83-90.
- <sup>25</sup> 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;(Suppl 1/2):S151-8.
- <sup>26</sup> Ashman O, Phillips AM. Treatment of non-unions with bone defects: which option and why? *Injury Int J Care Injured* 2013;S1:S43-5.
- <sup>27</sup> Garrison KR, Shemilt I, Donell S, et al. Bone morphogenetic protein (BMP) for fracture healing in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2010;(6):CD006950.
- <sup>28</sup> Chen L, Jiang W, Huang J, et al. Insulin-like Growth Factor 2 (IGF-2) Potentiates BMP-9-Induced Osteogenic Differentiation and Bone Formation. *J Bone Miner Res* 2010;25:2447-9.
- <sup>29</sup> Willems WF, Larsen M, Friedrich PF, et al. Induction of angiogenesis and osteogenesis in surgically revascularized frozen bone allografts by sustained delivery of FGF-2 and VEGF. *J Orthop Res* 2012;30:1556-62.
- <sup>30</sup> Koh A, Niikura T, Lee SY, et al. Differential gene expression and immunolocalization of insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins between experimental nonunions and standard healing fractures. *J Orthop Res* 2011;29:1820-6.
- <sup>30</sup> Mathieu M, Rigutto S, Ingels A, et al. Decreased pool of mesenchymal stem cells is associated with altered chemokines serum levels in atrophic nonunion fractures. *Bone* 2013;53:391-8.
- <sup>31</sup> Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, et al. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001;19:180-92.
- <sup>32</sup> Zimmermann G, Schmeckenbecher KHK, Boeuf S, et al. Differential gene expression analysis in fracture callus of patients with regular and failed bone healing. *Injury Int J Care Injured* 2012;43:347-56.
- <sup>33</sup> Kimelman-Bleich N, Pelled G, Zilberman Y, et al. Targeted gene-and-host progenitor cell therapy for nonunion bone fracture repair. *Mol Ther* 2011;19:53-9.
- <sup>34</sup> Evans CH. Gene delivery to bone. *Adv Drug Deliv Rev* 2012;64:1331-40.
- <sup>35</sup> Kimelman-Bleich N, Pelled G, Zilberman Y, et al. Targeted gene-and-host progenitor cell therapy for nonunion bone fracture repair. *Mol Ther* 2011;19:53-9.
- <sup>36</sup> Dimitriou R, Kanakaris N, Soucacos PN, et al. Genetic predisposition to non-union: Evidence today. *Injury Int J Care Injured* 2013;44:S1,S50-3.
- <sup>37</sup> 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, eds. *Bone morphogenetic proteins. From laboratory to clinical practice*. Progress in Inflammation Research Series. Birkhauser Verlag, 2002, pp. 193-205.
- <sup>38</sup> Kanakaris NK, Lasanianos N, Calori GM. Application of bone morphogenetic proteins to femoral non-unions: A 4-year multicentre experience. *Injury* 2009;(Suppl 3):S54-60.
- <sup>39</sup> Zimmermann G, Wagner C, Schmeckenbecher K. Treatment of tibial shaft non-unions: bone morphogenetic proteins versus autologous bone graft. *Injury* 2009;(Suppl 3):S50-3.
- <sup>40</sup> 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.
- <sup>41</sup> Kanakaris NK, Calori GM, Verdonk R, et al. Application of BMP-7 to tibial nonunions: A 3-year multicenter experience. *Injury* 2008;(Suppl 2):S83-90.
- <sup>42</sup> 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;(Suppl 1/2):S151-8.
- <sup>43</sup> 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.