

Il principio della camera biologica nel trattamento delle pseudoartrosi complesse e delle perdite di sostanza ossee: quali materiali e perché?

G.M. Calori, M. Colombo, E. Mazza, S. Mazzola, E. Malagoli

U.O.C. di Chirurgia Ortopedica Riparativa e Risk Management, Istituto Ortopedico G. Pini, Milano, Università degli Studi di Milano

DOI 10.1007/s10261-013-0048-z



G.M. Calori

ABSTRACT The concept of biological chamber for the treatment of complex non unions and bone defects: which material and why?

Bone regeneration presents a unique challenge to both clinicians and scientists. Recently, a vast amount of knowledge has been attained with regard to the molecular mediators, cell populations and the overall cascade of events participating in the bone repair processes. For the treatment of bone non-unions or bone defects, the 'Diamond Concept' for biological enhancement supports the associated implantation of mesenchymal stem cells, a scaffold and growth factors. Prior to the implantation of any or all of these materials however, the surgeon must develop the ideal biological environment where molecular and physiological processes will evolve facilitating an early and successful osteogenesis leading to bone continuity. This privileged environment is the "Biological Chamber" that can create the best conditions promoting the regeneration and thus optimizing the results. A "bioreactor" is created in order to reproduce ideal laboratory conditions. The "Biological Chamber" must be aseptic, vascularized and protected, that means not completely isolated but surrounded selectively in order to maintain the proper contacts with the surrounding tissues. The notion of creating the optimum 'biological chamber' represents the centre of the highest biological activity and in a sense the heart of the "Diamond Concept".

Introduzione

Il tessuto osseo è uno dei pochi tessuti che mantiene la capacità di rigenerarsi nella vita adulta. L'osso possiede grandi capacità di ripristinare il tessuto danneggiato e le perdite di sostanza, comunemente denominate fratture o difetti ossei. L'assenza di tessuto connettivo cicatriziale e la capacità di deporre tessuto identico a quello precedente consentono la rigenerazione del danno. Questa caratteristica è ben evidente nella cascata di eventi che porta alla guarigione delle fratture. [1] Durante i processi di riparazione ossea viene ripercorso il normale processo di sviluppo in epoca embrionale con la partecipazione coordinata di differenti tipi cellulari. [2] Quattro elementi presenti in sede di lesione (osso corticale, periostio, midollo osseo, tessuti molli perilesionali) contribuiscono ai processi di riparazione. La misura in cui ciascuno di questi elementi è coinvolto dipende dalle condizioni del tessuto danneggiato (fattori di crescita, ormoni, nutrienti, pH, tensione di ossigeno, elettroliti, stabilità meccanica della frattura). [3] Un gran numero di fattori a livello molecolare in accordo con principi fisiologici e biomeccanici sono noti per essere implicati nei processi di guarigione. Tre elementi sono stati assunti come di fondamentale importanza: le molecole segnale, le cellule osteoprogenitrici, la matrice extracellulare (lo scaffold naturale). Le molecole che promuovono il segnale possono essere classificate in tre gruppi: (1) citochine pro-in-

fiammatorie, (2) la superfamiglia del TGF- β e altri fattori di crescita, (3) le metalloproteinasi e fattori angiogenici. [2] Una sede in cui tutti questi elementi (interleuchine - [IL1,IL6]; fattore di necrosi tumorale-alfa [TNF- α]; fattore di crescita dei fibroblasti - [FGF]; fattore di crescita insulino simile - [IGF]; fattore di crescita derivato dalle piastrine - [PDGF]; fattore di crescita endoteliale - [VEGF]; etc.) si trovano in grandi quantità è l'ematoma presente in sede di frattura. Diversi tipologie cellulari come cellule endoteliali, piastrine, macrofagi, cellule mesenchimali staminali (MSC) secernono queste molecole biologicamente attive. Le proteine morfogenetiche dell'osso (BMP - membri della superfamiglia dei TGF- β) sono molecole segnale ben note per possedere proprietà osteoinduttive esercitando i loro effetti sulle cellule osteoprogenitrici promuovendo la loro proliferazione e differenziazione nelle linee cellulari appropriate. Una popolazione cellulare attiva costituisce il secondo elemento per un processo di riparazione adeguato. Cellule mesenchimali multi potenti sono reclutate nel sito di danno attraverso il torrente ematico. La risposta del midollo osseo ad un evento fratturativo include una precoce riorganizzazione delle popolazioni cellulari in zone ad alta e bassa densità cellulare. Le aree ad alta densità cellulare sono il luogo in cui avviene la trasformazione delle MSC attraverso un fenotipo osteoblastico. [4,5] Il terzo importante fattore che influenza la guarigione della frattura è la ma-

trice extracellulare che fornisce l'impalcatura per lo svolgimento di tutti i processi ed interazioni cellulari. In ambito clinico sono state utilizzate varie tipologie di scaffold da sole o arricchite di fattori osteoinduttivi per promuovere la riparazione della frattura. Tali scaffold comprendono materiali come osso trabecolare allogenico o xeno genico, matrice ossea demineralizzata (DBM), collagene, idrossiapatite, acido polilattico o poliglicolico, vetri bioattivi e ceramiche a base di calcio. [6,7] Oltre a questa complessa triade di fattori (cellule osteogeniche, stimolo osteoinduttivo, matrice extracellulare) un altro fattore molto importante è la stabilità meccanica del focolaio di frattura. [8,9] Il grado di stabilità che può essere raggiunto a seconda del tipo di frattura è fondamentale per la scelta delle diverse tipologie di mezzi di sintesi.

La presenza di un torrente circolatorio è considerato un pre-requisito fondamentale della configurazione del diamante. Anche il profilo fisiologico del paziente e la presenza di eventuali comorbidity devono essere considerate. Il concetto di diamante è la rappresentazione di quali parametri e cofattori un clinico dovrebbe valutare al fine di ottimizzare i processi di riparazione ossea. Ma cosa effettivamente è al

centro della teoria del concetto di diamante? Che cosa ne rappresenta il cuore? La sede della frattura e il difetto osseo rappresentano il cuore del concetto di diamante. A nostro parere questa area costituisce la sede in cui tutta la cascata di eventi deve progredire allo stesso tempo così da realizzare la riparazione ossea. Si può dire che questa area rappresenta la sede con più alto significato in termini di attività biologica. Può essere considerata come un unico compartimento ovvero una camera biologica. [10]

Che cos'è la camera biologica?

La Camera Biologica è un concetto che rappresenta la sede ideale nel quale far avvenire i processi di rigenerazione ossea. È un bio-reattore naturale all'interno del quale sono presenti tutti gli elementi alla base del concetto di Diamante. La camera deve essere asettica, vitale, meccanicamente stabile e sigillata in maniera selettivamente permeabile. [10]

Come creare la camera biologica?

Per poter realizzare la camera è necessario rimuovere completamente il tessuto patologico di pseudoartrosi, rimuovendo eventuali corpi estranei e mezzi di

sintesi. È importante asportare in modo completo tutto il tessuto necrotico fino a raggiungere una sezione ossea sanguinante che significa vitalità. Il tessuto pseudoartrosico può essere assimilato a un "tumore meta-traumatico" e come tale deve essere rimosso interamente. In caso di pseudoartrosi o perdite di sostanza settiche è importante eseguire dei tamponi colturali al fine di identificare il patogeno responsabile della sepsi ed eseguire indi una terapia antibiotica mirata. Oltre all'asportazione del tessuto osseo infetto è importante eseguire un debridement ed una accurata toilette dei tessuti molli (Fig. 1,2).

Cosa inserire all'interno della camera biologica?

Nei casi settici è sempre preferibile eseguire il trattamento in due tempi, quindi una volta eseguita l'asportazione del tessuto patologico viene impiantato uno spaziatore di cemento (solitamente bi-antibiotato con Gentamicina e Clindamicina) in grado di sterilizzare la zona e creare una membrana psudosinoviale reattiva (descritta da Masquelet) estremamente utile nel secondo

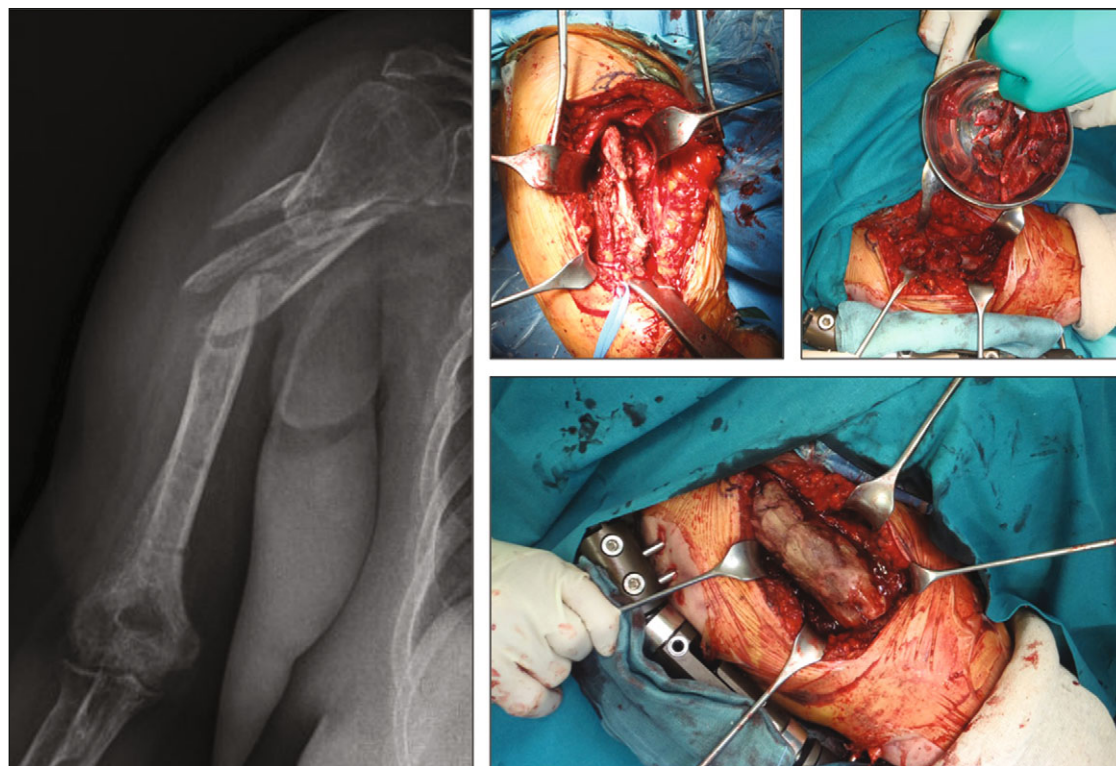


Fig. 1. Paziente femmina di affetta da grave pseudoartrosi settica con perdita di sostanza critica dell'omero, sulla sinistra è possibile vedere le Rx pre-operatorie, sulla destra immagini intraoperatorie del primo tempo chirurgico secondo la tecnica di Masquelet durante il quale viene asportato "en bloc" il tessuto patologico ed infetto e viene posizionato spaziatore di cemento bi-antibiotato, la stabilità viene ottenuta tramite l'applicazione di un fissatore esterno assiale.

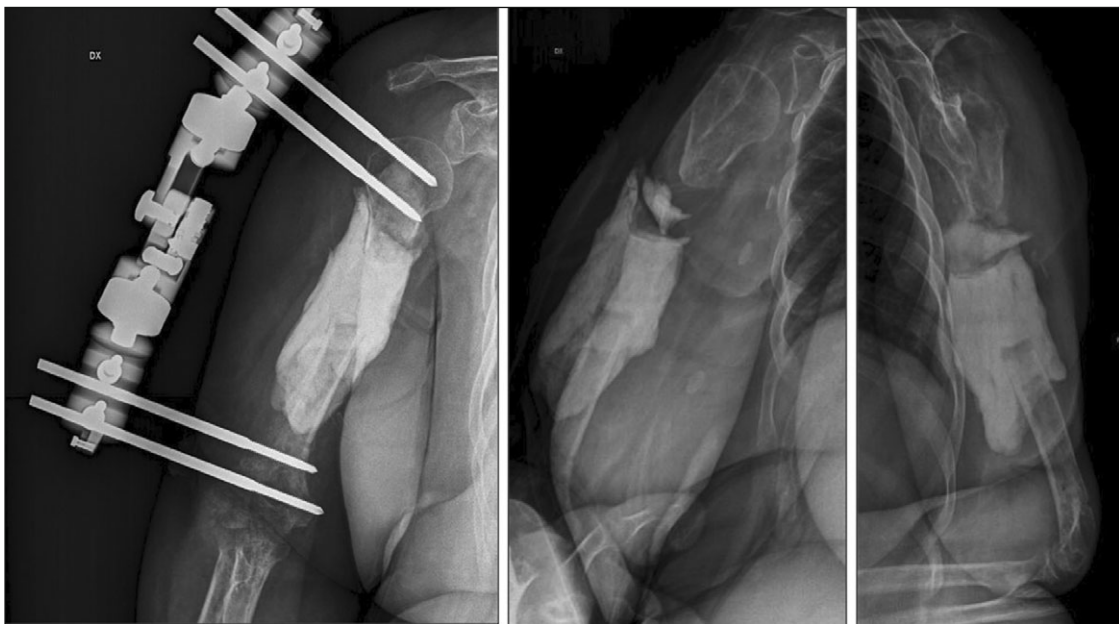


Fig. 2. Controllo Rx post operatorio (a sinistra) e dopo rimozione del fissatore esterno (a destra) 2 mesi post-operatori in preparazione al secondo tempo ricostruttivo.

tempo ricostruttivo. [11]
Nei casi non settici è possibile eseguire in un tempo unico la ricostruzione. Una volta creata la camera biologica è quindi possibile inserire all'interno di essa la politerapia ovvero l'applicazione simultanea dei tre elementi alla base del concetto di diamante (fattori di crescita, cellule mesenchimali stromali e scaffold). Il quarto elemento ovvero la stabilità meccanica verrà fornita mediante sistemi di osteosintesi (placche a stabilità angolare, chiodi endomidollari o fissatori esterni a seconda del distretto anatomico colpito e del tipo di lesione).
Analizziamo in breve gli elementi a nostra disposizione per applicare la politerapia. [12,13]

Fattori di crescita

È stato dimostrato ormai, già dalla meta 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 [14]. 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 osteogenin protein-1 (OP-1), e la rhBMP-2 [15] appartenenti alla famiglia dei fattori di crescita trasformanti TGF- β i cui recettori sono espressi su condrociti e osteoblasti [16]. Il fenomeno dell'osteoiduzione è caratterizzato dalla trasformazione delle cellule mesenchimali perivascolari in cellule osteoprogenitrici in grado di rigenerare tessuto osseo [17]. A oggi solo rhBMP-7 può essere considerata un agente osteoinduttivo.

L'unica BMP approvata in Europa per il trattamento delle pseudoartrosi della tibia 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 fissazione. 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 arretrate dall'uso nel passato consolidato di osso autologo.
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 [1,18,19,20,21].

Cellule mesenchimali

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 mL secondo i criteri EBM, essendo un concentrato di cellule con capacità osteogeniche e osteopromotrici [22,23].
L'uso clinico in pseudoartrosi si è dimostrato efficace nel determinare guarigione delle pseudoartrosi soprattutto se associate a BMP [24].

Scaffold

Gli scaffold in chirurgia ortopedica devono fornire una struttura tridimensionale che faciliti lo sviluppo delle linee cellulari ossee e la deposizione di matrice

extracellulare. Essi quindi svolgono un importante ruolo di comunicazione con i tessuti circostanti e di controllo della struttura e della funzione del tessuto osseo.

Il sostituto osseo ideale dovrebbe essere biocompatibile, facilmente disponibile, senza rischio di infezione, meccanicamente valido, riassorbibile, osteoconduttivo ed ipoteticamente anche osteoinduttivo ed osteogenetico. Dovrebbe perciò promuovere l'adesione, la migrazione, la proliferazione e la differenziazione cellulare, aiutando la sintesi della matrice extracellulare e l'invaginazione vascolare.

L'evoluzione tecnologica e la migliore comprensione dei principi biologici coinvolti nella guarigione ossea hanno portato allo sviluppo di differenti tipi di sostituti ossei. Numerosi prodotti biologici e sintetici contenenti idrossiapatite, fosfato tricalcico, fosfato dicalcico, solfato di calcio sono attualmente disponibili [7].

Trapianto autologo

Losso autologo rappresenta ancora il trattamento Gold Standard nella gestione delle perdite di sostanza ossea e le pseudoartrosi. Esso presenta tutte le caratteristiche ideali che un sostituto osseo dovrebbe avere ovvero osteoconduttività, osteoinduttività ed osteogenicità. È riconosciuto come tessuto self non creando reazioni autoimmuni. L'osteogenicità dell'osso autologo è legata alla presenza di osteociti vivi in una percentuale del 10/30%, tale vitalità è dipendente dalla diffusione dei nutrienti e dell'ossigeno dai tessuti circostanti. Nell'osso autologo sono inoltre presenti: collagene, osteonectina e fattori di crescita. L'osso spongioso è più osteogenico rispetto a quello corticale, andrebbe impiantato in meno di 2 ore dal prelievo e conservato in soluzione fisiologica tiepida senza associare disinfettati o antibiotici.

Tecniche consolidate quali il prelievo osseo vascolarizzato eseguito dal perone ed il prelievo osseo da cresta iliaca non sono comunque scevri da rischi (infettivi, frattura iatrogena) e complicanze (dolore cronico nel sito di prelievo nel 20% dei casi). Una nuova tecnica di prelievo osseo autologo chiamata RIA è ad oggi disponibile. La metodica RIA (Reamer Irrigator Aspirator) consta in un prelievo di osso autologo spongioso da ossa lunghe (femore o tibia) mediante un apposito strumentario costituito da frese aspiranti in grado di prelevare tessuto osseo midollare con una metodica rapida ed efficace. Il materiale ottenuto, anche in grande quantità è malleabile e pertanto assai utile a riempire la camera biologica [25].

Sostituti biologici

In questa categoria possiamo trovare la matrice ossea demineralizzata e i sostituti ossei allogenicici e xenogenicici.

La matrice ossea demineralizzata (DBM) è un prodotto ottenuto attraverso un procedimento di estrazione acida da allograft contenente collagene di tipo-1, proteine non collageniche e fattori di crescita osteoinduttori come le BMP, il TGF- β 1-2-3 e il fattore di crescita insulino simile (IGF). [26] Tutti questi fattori sono in grado di cooperare nel sito di impianto per creare una risposta potenzialmente osteogenica.

Allo e xeno trapianto sono considerati buone alternative all'autotrapianto osseo, in quanto permettono di evitare la morbidità e il dolore legato al prelievo e sono inoltre relativamente facili da ottenere e gestire.

Il rischio maggiore e gli svantaggi nell'utilizzo di sostituti alloplastici sono rappresentati dalla trasmissione di malattie virali e infezioni batteriche. In quanto riconosciuto come "non self", il trapianto può essere attaccato dal sistema immunitario.

Lo xenotrapianto è un tessuto osseo di derivazione bovina, equina o suina, ed è reso immunologicamente inerte tramite un processo fisico-chimico o un trattamento enzimatico che ne rimuove tutti i componenti immunogeni senza modificarne la fase minerale e il collagene tipo 1, mantenendo così le proprietà biologiche e biomeccaniche degli innesti. Sono disponibili sul mercato prodotti diversi con caratteristiche biomeccaniche legate alla forma e al grado di demineralizzazione raggiunti.

Sostituti sintetici

I sostituti sintetici sono strutture minerali simili a quella dell'osso umano. Essi hanno solo proprietà osteoconduttiva. Includono il fosfato di calcio o l'idrossiapatite (HA), l'idrossiapatite corallina (riassorbibile), il fosfato tricalcico (TCP, riassorbibi-

le) e il fosfato di calcio bifasico (BCP = HA + TCP).

Fosfato di calcio

Al giorno d'oggi, diversi prodotti a base di fosfato di calcio sono disponibili sul mercato. Essi possono essere suddivisi in HA, TCP e innesti compositi (bifasici), sulla base della loro composizione chimica. Essi hanno dimostrato di indurre una risposta biologica simile a quella dell'osso [27]. I fosfati di calcio in genere forniscono supporto biomeccanico limitato a causa della loro bassa resistenza alla tensione [28]. Il TCP è meno fragile dell'HA, tuttavia, durante il processo di degradazione si incorre in una perdita di resistenza meccanica.

Le indicazioni cliniche sono legate alle specifiche proprietà strutturali, biologiche e biomeccaniche dell'innesto. La ceramica HA è utile per riempire i piccoli difetti ossei dovuti a resezione tumorale o legati alla perdita di sostanza ossea in una frattura recente ma non è indicata in caso di difetti ossei di grandi dimensioni.

Ceramiche bioattive

Possono essere definite come materiali duri e solidi costituiti da ossido di sodio, ossido di calcio, biossido di silicio e fosforo in proporzioni diverse, disponibili come innesti solubili e non riassorbibili. Esse mostrano proprietà principalmente osteoconduttive e poca osteoinduttività [29] (Fig. 3).

Come chiudere la camera biologica?

La camera biologica come dovrebbe configurarsi rispetto ai tessuti circostanti, chiusa, parzialmente aperta o completamente aperta? Convertendo la camera biologica ad un compartimento completamente chiuso migliorerebbe il contenimento delle cellule impiantate, dei fattori di crescita e di qualsiasi altro materiale che il chirurgo desidera inserire in essa. Tuttavia, la chiusura della camera biologica lascerebbe come unica fonte di cellule osteoprogenitrici e mediatori molecolari il canale endomidollare. Ma se si decidesse di creare un compartimento chiuso creando un bioreattore locale quale dovrebbe essere il materiale utilizzato? La sola trasposizione dei tessuti molli circostanti, muscolo e fascia? Un innesto di osso tricorticale prelevato dalla cresta iliaca creando una parete mediale e una laterale con o senza l'impiego di altro materiale? La tecnica che induce la produzione di una membrana (Masquelet) rappresenta la scelta migliore in quanto il materiale così generato sarebbe l'ideale per chiudere la camera biologica poiché la sua produzione è naturale e possiederebbe la capaci-

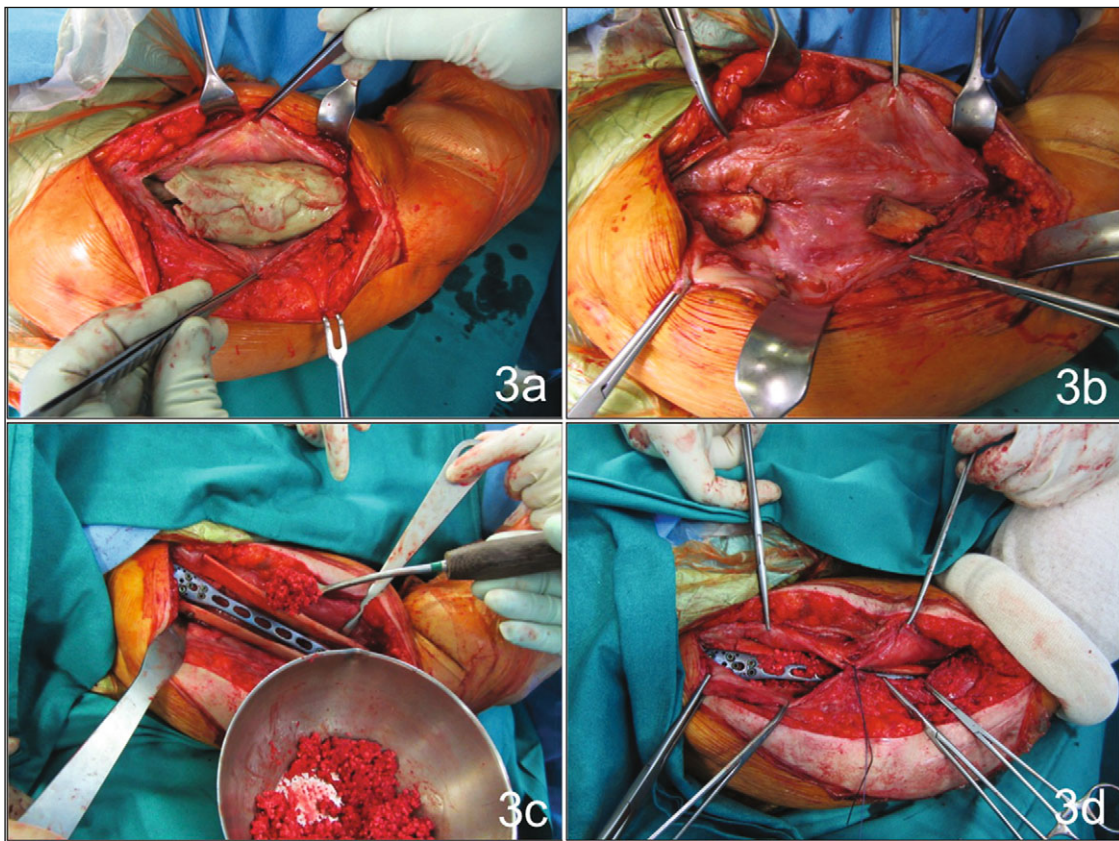


Fig. 3. Secondo tempo chirurgico di ricostruzione. 3a) Rimozione dello spaziatore di cemento; 3b) Membrana pseudosinoviale formata come reazione al cemento; 3c) Applicazione della politerapia RIA, cellule mesenchimali stromali e gli scaffolds (sostituti ossei ad incrementare l'osso autologo e stecche ossee di banca a fungere da materiale osteoconduttore ed incrementare la stabilità meccanica dell'impianto). 3d) Chiusura della Camera Biologica.

tà di produrre fattori di crescita. Nei casi settici è mandatorio utilizzare tale tecnica in due tempi. Una membrana di collagene impiantata durante l'intervento? Una membrana biorassorbibile?

caratteristiche necessarie a chiudere la camera biologica in modo selettivo, non rendendola impermeabile ma selettivamente permeabile alle sostanze utili al bioreattore [30] (Fig. 4).

tima compliance del paziente e soprattutto gli strabilianti fenomeni rigenerativi che tale metodica sta dimostrando sono molto interessanti e saranno fonte di nuovi studi.



Fig. 4. Controllo Rx post operatorio (a sinistra), dopo 5 mesi (al centro) e controllo TC ad 1 anno dalla procedura (a destra).

La superficie della membrana dovrebbe avere una porosità per diffusione di molecole e comunicazione selettiva con l'ambiente esterno? Se sì, quale dovrebbe essere lo spessore e porosità della membrana? Dovrebbe avere tutte le proprietà biomeccaniche? Essere un materiale composito? Monostrato? Doppio strato o anche triplo strato? La superficie dovrebbe presentare molecole segnale?

Nuovi studi si stanno conducendo per capire e realizzare una membrana ideale, già pronta, acquistabile sul mercato, comoda da utilizzare, sicura e con tutte le

Conclusioni

Il trattamento delle pseudoartrosi delle ossa lunghe e dei difetti ossei critici continua ad essere una sfida per il traumatologo con frequenti risultati insoddisfacenti e lunga morbilità. Tecniche classiche mediante trapianto autologo, allungamenti con fissatori esterni, artrodesi, protesizzazione ed amputazione sono ancora validi ausili nel trattamento delle gravi perdite di sostanza ossea, la "camera biologica" può essere proposta come alternativa assai incoraggiante. I buoni risultati clinici e radiografici, l'ot-

Il concetto di camera biologica posizionato al centro del concetto di diamante consente al medico di valutare in modo più completo l'ambiente molecolare circostante. Esso fornisce lo stimolo per visualizzare e analizzare in modo più completo quali dovrebbero essere le caratteristiche di questo bioreattore in situ. La nostra attività di ricerca si focalizzerà su questa importante sede consentendoci di comprendere al meglio le reazioni e interazioni che devono svilupparsi per raggiungere il risultato di rigenerazione ossea in modo efficace e rapido.

Bibliografia

- Kanakaris NK, Lasanianos N, Calori GM, et al. (2009) Application of bone morphogenetic proteins to femoral non-unions: a 4-year multicentre experience. *Injury* S3:S54-60
- Tsiridis E, Upadhyay N, Giannoudis P. (2007) Molecular aspects of fracture healing which are the important molecules? *Injury* 38:S11-25
- Giannoudis PV, Einhorn TA. (2009) Bone morphogenetic proteins in musculoskeletal medicine. *Injury* 40:S1-3
- Papathanasopoulos A, Giannoudis PV. (2008) Biological considerations of mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells. *Injury* 39: S21-32
- Pountos I, Corscadden D, Emery P, Giannoudis PV. (2007) Mesenchymal stem cell tissue engineering: techniques for isolation, expansion and application. *Injury* 38:S23-33
- De Long WG, Einhorn TA, Koval K, et al. (2007) Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis. *J Bone Joint Surg Am* 89:649-58
- Calori GM, Mazza E, Colombo M, Ripamonti C. (2011) The use of bone-graft substitutes in large bone defects: any specific needs? *Injury*. 42:S56-63
- Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. (2007) Fracture healing: the diamond concept. *Injury* 38:S3-6
- Giannoudis PV, Einhorn TA, Schmidmaier G, Marsh D. (2008) The diamond concept: open questions. *Injury* 39:S5-8
- Calori GM, Giannoudis PV. (2011) Enhancement of fracture healing with the diamond concept: the role of the biological chamber. *Injury*. 42:1191-3
- Masquelet AC, Fitoussi F, Bégue T, Muller GP. (2000) Reconstruction of long bones induced membrane and spongy autograft. *Ann Chir Plast Esthet* 45:346-53
- Calori GM, Colombo M, Ripamonti C et al (2011) Polytherapy in bone regeneration: clinical applications and preliminary considerations *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 24:85-89
- Calori GM, Mazza E, Colombo M, et al (2011) Treatment of long bone non-unions with polytherapy: indications and clinical results. *Injury* 42:587-90
- Slater M, Patava J, Kingham K et al. (1995) Involvement of platelets in stimulating osteogenic activity. *J Orthop Res* 3: 655-9
- Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. (2002) The role of growth factors in the repair of bone. *J Bone Joint Surg J Bone Joint Surg Am* 84-A:1032-44
- Celeste AJ, Iannazzi JA, Taylor RC et al (1990) Identification of transforming growth factor family members present in bone inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 9843-7
- Wozney JM. (1992) The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Devel* 32:160-7
- Calori GM, Tagliabue L, Gala L et al (2008) 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* 39:1391-402
- Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD et al (2001) Osteogenic protein-1 (BMP-7) in the treatment of tibial nonunions. *J Bone Joint Surg Am* 83: S151-158
- Kanakaris NK, Calori GM, Verdonk R, et al. (2008) Application of BMP-7 to tibial nonunions: a 3-year multicenter experience. *Injury* 39:S83-90
- Zimmermann G, Moghaddam A, Wagner C, Vock B, Wentzensen A (2006) Klinische Erfahrungen mit Bone Morphogenetic Protein 7 (BMP 7) bei Pseudarthrosen langer Röhrenknochen. *Unfallchirurg* 109:528-537
- Hernigou P, Mathieu G, Poignard A et al (2006) Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. *Surgical technique. J Bone Joint Surg Am* 88: 322-7
- Hernigou P, Poignard A, Beaujean F et al (2005) Percutaneous autologous bone marrow grafting for non-unions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am* 87:1430-7
- Saito A, Suzuki Y, Ogata SI et al (2005) Accelerated bone repair with the use of a synthetic BMP-2-derived peptide and bone-marrow stromal cells. *J Biomed Mater Res* 72: 77-82
- Cox G, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. (2011) Reamer-irrigator-aspirator indications and clinical results: a systematic review. *International Orthopaedics* 35:951-956
- Einhorn TA, Lane JM, Burstein AH, (1984) The healing of segmental bone defects induced by demineralized bone matrix. A radiographic and biomechanical study. *J Bone Joint Surg. Am.* 66:274-279
- Bohner M. (2001) Physical and chemical aspects of calcium phosphates used in spinal surgery. *Eur Spine J* 10:S114-21
- Martin RB, Chapman MW, Sharkey NA et al (1993) Bone ingrowth and mechanical properties of coralline hydroxyapatite 1 yr after implantation. *Biomaterials*14:341-8
- Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E (2005) Bone substitutes: an update. *Injury* 36:S20-S27
- Dimitriou RZ, Mataliotakis GI, Calori GM (2012) The role of barrier membranes for guided bone regeneration and restoration of large bone defects: current experimental and clinical evidence. *BMC Medicine* 10:81