

**DOTTORATO IN BIOTECNOLOGIE MEDICHE**

**Tecnologie Biomediche**

Med/33- Malattie dell'apparato locomotore

**Ciclo XX**

**COSTRUZIONE DI UNO SCAFFOLD VASCOLARIZZATO  
PER LA CHIRURGIA ORTOPEDICA**

Tesi di Dottorato

**Presentata da:**

**Dr. Andrea Pellacani**

**Coordinatore**

Chiar.ma Prof.ssa Marialuisa Zerbini

**Relatore**

Chiar.mo Prof. Armando Giunti

**Correlatore**

Dr. Nicola Baldini

## INDICE

<b>1</b>	<b>Finalità del progetto e delle ricerche correlate</b>	<b>1</b>
1.1	Aspetti generali	1
1.2	Fasi dello studio	2
<b>2</b>	<b>Studio in vitro</b>	<b>3</b>
2.1	Presupposti all'ingegneria tissutale dell'osso	3
2.2	Le cellule staminali	6
2.3	Colture primarie di cellule mesenchimali stromali umane	9
2.4	PCL/HA e MSC	11
2.4.1	Materiali e metodi	12
2.4.2	Risultati	12
2.4.3	Cellule	14
<b>3</b>	<b>Studio Sperimentale Animale</b>	<b>18</b>
3.1	Obiettivi	18
3.2	Training microchirurgico	18
3.3	Lo strumentario Microchirurgico	19
3.4	Le tecniche microchirurgiche	21
<b>4</b>	<b>Studio Clinico Umano</b>	<b>26</b>
4.1	Obiettivi	26
4.2	Valutazioni anatomiche e biomeccaniche	26
4.3	La stabilizzazione delle fratture Metacarpali: valutazioni biomeccaniche	30
4.4	Background all'uso della microchirurgia per i biomateriali	31
4.5	Il substrato anatomico	32
4.6	L'ampliamento delle indicazioni	32
4.7	Le condizioni di allestimento	32
4.8	Flow-Chart Diagnostica-Terapeutica	33
4.9	Criteri di inclusione ed esclusione dei pazienti	36
4.9.1	Inclusione	36
4.9.2	Esclusione	36
4.10	Tecnica Chirurgica	36
4.11	Descrizione dei materiali utilizzati	38
4.11.1	Hidrossiapatite di seconda generazione: Calcio-fosfato poroso (ENGIpore)	38
4.11.2	L'Osso Autologo	40
4.11.3	L'Osso di Banca	40
4.12	Casi Clinici	40
4.12.1	Paziente n 1	41
4.12.2	Caso Clinico 2	46
4.12.3	Caso Clinico 3	50
<b>5</b>	<b>Conclusioni</b>	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>Bibliografia</b>	<b>57</b>

## **1 FINALITÀ DEL PROGETTO E DELLE RICERCHE CORRELATE**

Il progetto si propone di attivare un percorso terapeutico specifico volto al trattamento delle perdite di sostanza ossea attraverso la creazione di un sostituto osseo vascolarizzato. L'utilizzo delle suddette metodiche si propone di ridurre la morbilità del sito donatore d'osso con un'accettabile (e massimizzata) velocità di guarigione del sito recipiente.

Quale corollario diretto si vuole inoltre indagare l'utilizzo delle apprese tecniche per la cura di patologie complesse quali l'osteomielite, le perdite di sostanza ossea non metacarpali, il trattamento delle pseudoartrosi e delle necrosi ossee asettiche, ovvero di patologie scheletriche ove l'assenza di un adeguato apporto vascolare costituisce uno dei fattori etiopatologici principali della malattia. In tale percorso si inserisce anche l'impiego e valutazione di mezzi di sintesi innovativi quali le placche a stabilità angolare per l'ottenimento di sintesi ad elevata stabilità meccanica del sistema osso/biosostituto. Lo studio è stato condotto mediante una collaborazione clinica-laboratoristica tra la S.C. di Chirurgia della Mano e Microchirurgia (Policlinico di Modena), il Laboratorio di Fisiopatologia degli Impianti Ortopedici (Istituti Ortopedici Rizzoli, Bologna) ed il Bernard O'Brien Institute (Melbourne).

### **1.1 Aspetti generali**

L'affacciarsi in campo clinico dei biomateriali sta rapidamente mutando le indicazioni e le tecniche chirurgiche ricostruttive. In letteratura sempre più frequentemente vengono pubblicati studi volti a riprodurre la complessità dei tessuti o addirittura degli organi. La chirurgia della mano, per la piccola dimensione dei segmenti scheletrici coinvolti, la superficialità delle strutture, il rapporto vascolarizzazione-dimensione e l'elevata motivazione dei pazienti al ripristino dell'autonomia funzionale, costituisce probabilmente un campo di applicazione ideale per un carrier vascolarizzato ed un ottimo indicatore per l'esportabilità del progetto verso l'ortopedia (ovvero difetti scheletrici maggiori). Se da un lato l'applicazione dei biomateriali può rappresentare la soluzione emergente alla domande dei pazienti e dei chirurghi, la complessità e la diversificazione dei biomateriali richiede la presenza nell'equipe di personale altamente specializzato e dedicato.

Le patologie dell'arto superiore necessitano in generale di un approccio terapeutico multidisciplinare, dove le diverse figure specialistiche rivestono un ruolo rilevante nella fase di diagnosi, di definizione della strategia terapeutica ed in particolare nella valutazione del programma pre e post-chirurgico. Anche la fase di semplice follow-up dei pazienti operati viene ritenuta di competenza interdisciplinare. L'equipe viene pertanto a formalizzare e razionalizzare in idonei

“percorsi” assistenziali la collaborazione tra diversi reparti-conoscenze con il fine principale di offrire ai pazienti prestazioni altamente qualificate con modalità di accesso semplificate.

## **1.2 Fasi dello studio**

Il progetto è stato strutturato su tre livelli complementari:

### **1) Laboratoristico**

In tale ambito sono stati valutati in fase bibliografica diversi biosostituti idonei per caratteristiche meccaniche e per biocompatibilità ad essere utilizzati come scaffod scheletrici, quindi in fase laboratoristica sperimentale è stata indagata l'interazione tra lo scaffod prescelto e le cellule mesenchimali staminali. Tale fase è stata considerata preliminare alle applicazioni in modello animale delle conoscenze acquisite. Lo studio è stato condotto presso il Laboratorio di Fisiopatologia degli Impianti ortopedici, Istituto Ortopedico Rizzoli (Bologna).

### **2) Sperimentale animale**

In tale ambito sono state apprese le tecniche microchirurgiche necessarie per poter sviluppare la tecnica di rivascolarizzazione microchirurgica del biomateriale. Sono stati inoltre valutati-appresi diversi modelli microchirurgici per la ricostruzione in animale di tessuti complessi. Tale fase si è rivelata necessaria per esportare in sicurezza, il modello all'uomo. Lo studio è stato condotto presso il Bernard O'Brien Institute, Melbourne, Australia.

### **3) Sperimentale Umano**

Previa richiesta ed approvazione del Comitato Etico, è stato avviato il reclutamento-trattamento dei pazienti per la ricostruzione delle perdite di sostanza ossea mediante l'utilizzo del biomateriale prescelto in fase 1 con le tecniche microchirurgiche vascolari apprese in fase 2. La fase sperimentale umana è tuttora in corso e si svolge presso la S.C. di Chirurgia della Mano e Microchirurgia, Policlinico di Modena.

## 2 STUDIO IN VITRO

### 2.1 Presupposti all'ingegneria tissutale dell'osso

E' del 1995 la definizione del termine ingegneria tissutale come un'area multidisciplinare di ricerca che mira alla rigenerazione dei tessuti e al ripristino della funzione di organi mediante l'impianto di cellule o tessuti cresciuti al di fuori dell'organismo, oppure alla stimolazione di cellule a proliferare entro una matrice impiantata<sup>1</sup>.

Il campo di ricerca è sempre stato multidisciplinare, perché dall'inizio chimici, fisici, ingegneri collaborano con biologi, chirurghi e ortopedici per disegnare e realizzare materiali/dispositivi ben tollerati dall'organismo.

Il progresso verso l'ingegneria dei tessuti è stata sostanzialmente ottenuta tramite il miglioramento del design dei materiali, con la realizzazione di scaffolds tridimensionali e l'approccio biomimetico, grazie alle potenzialità crescenti per le colture cellulari in laboratorio e grazie alle tecniche di biologia molecolare ovvero con l'uso di geni e fattori di crescita.

Si possono distinguere due percorsi alternativi per la riparazione tissutale:

1) Tissue engineering: in cui cellule progenitrici sono seminate su materiali tridimensionali (scaffolds) modificati e riassorbibili. Le cellule vengono coltivate al di fuori dell'organismo, si differenziano e mimano i tessuti naturali. Questi costrutti ingegnerizzati vengono poi re-impiantati nel paziente: nel tempo vengono riassorbiti e rimpiazzati da tessuti vitali con supporto vascolare e nervoso. Le applicazioni cliniche già in atto comprendono cartilagine, cute e sistema vascolare.

2) In situ tissue regeneration: questo approccio implica l'uso di materiali caricati con peptidi o fattori di crescita (BMPs), mirati a stimolare la riparazione locale attraverso rispettivamente l'adesione cellulare o la loro attivazione. I materiali bioattivi rilasciano tali molecole a velocità controllata per diffusione o frammentazione del supporto, e questi attivano le cellule e regolano le loro interazioni. Le cellule producono a loro volta fattori di crescita che stimolano generazione di altre cellule e assemblaggio dei tessuti in situ.

L'ingegneria tissutale dell'osso trova il suo fondamento nelle conoscenze avanzate dei meccanismi biologici e molecolari che intervengono nella deposizione/rimodellamento del tessuto osseo<sup>2</sup>.

La normale riparazione dell'osso avviene attraverso una sequenza ordinata e regolata di eventi, quali l'infiltrazione di tessuto di granulazione, il richiamo, proliferazione e differenziazione di cellule osteogeniche-osteoclastiche, la formazione di matrice e sua mineralizzazione ed infine il rimodellamento. Il tessuto osseo, così apparentemente 'solido' e 'immutabile', è altamente dinamico e viene continuamente sostituito in base a diversi stimoli meccanici.

I segnali per questo processo sono di tipo biologico, chimico e meccanico: biologicamente, la regolazione avviene attraverso fattori di crescita, citochine e ormoni che modulano migrazione, proliferazione, differenziazione e funzioni cellulari. Le forze meccaniche applicate all'osso e trasmesse attraverso la matrice extracellulare influenzano questa complessa attività.

La strategia di base dell'ingegneria dell'osso è assemblare componenti diverse per riprodurre gli elementi del tessuto osseo in formazione: un supporto tridimensionale o 'scaffold' che consenta l'adesione e funzione delle cellule in risposta a stimoli biochimici. Il sistema funzionerà in presenza di un adeguato apporto vascolare<sup>3</sup>.

Sempre riferendosi al tessuto scheletrico, dovendo i sostituti mimare il supporto stromale ad una rigenerazione ossea, pori e interconnessioni debbono necessariamente essere compresi nel range 100-300 micron per consentire vitalità e funzioni di cellule ossee, cellule vascolari e tessuto osteoide. I supporti debbono essere biodegradabili nei tempi appropriati, cioè parallelamente alla rigenerazione ossea in situ, e senza generare prodotti tossici, indurre pH basso, etc. Devono altresì garantire una stabilità meccanica primaria senza la quale il ripristino della funzione avverrebbe incongruamente.

I materiali naturali, quali collagene, fibrina, membrane biologiche, possono apparire la soluzione giusta; in realtà la difficoltà di preparazione e di modellazione nei formati necessari, la difficile ripetibilità del processo di preparazione, nonché il rischio di trasmissione di vettori di malattie, limitano il loro utilizzo. Anche le proprietà meccaniche non sono sempre adeguate.

Ecco perché si ricorre maggiormente ai materiali sintetici per costruire scaffolds, principalmente le ceramiche, quali l'idrossiapatite (HA) o tricalciofosfato (TCP), che possiedono la stessa struttura della componente minerale dell'osso e hanno porosità parzialmente modulabile. Gli svantaggi sono fondamentalmente il tempo di degradazione, che può essere di anni, e le caratteristiche meccaniche inadeguate a sostenere carichi o impatti, per cui il difetto maggiore delle ceramiche è la fragilità (brittleness).

I polimeri sono altamente modulabili da un punto di vista chimico e modellabili nella forma; inoltre la loro degradazione nel tempo può essere calcolata<sup>4</sup>.

Una promettente alternativa sono i compositi, cioè polimeri addizionati di particelle, fibre, tubi di ceramica/carbone, anche con nano-dimensioni (< 100 micron), ottenendo così un ibrido con ottime caratteristiche fisiche e meccaniche.

Ulteriormente viene 'migliorata' la superficie/architettura tridimensionale dei materiali, in modo da promuovere l'interazione con integrine cellulari specifiche e quindi l'attecchimento di cellule dell'ospite e la loro funzionalità. Con il termine biomimetica si intende la riproduzione sulle superfici dello scaffold della matrice extracellulare (ECM), mediante sequenze peptidiche di legame per cellule in genere, quale la sequenza Arg-Gly-Asp (RGD), o specifiche (-FHRRIKA, frammenti di osteopontina o di bone sialoprotein). Più recente è la sintesi di peptidi

auto-assemblanti (SAMs, Self Assembled Monolayers), cioè strutture proteiche altamente organizzate con architettura identica alle strutture biologiche fortemente organizzate (es. membrane).

Le componenti sopra descritte, scaffold/cellule/fattori, non sono necessariamente tutte presenti al di fuori dell'organismo: secondo alcuni autori si distinguono 'sistemi acellulari', 'sistemi cellulari' e 'terapie con fattori o geni'<sup>5</sup>.

Nei sistemi acellulari (matrix based approaches) la chimica e la struttura dello 'scaffold' tridimensionale gioca un ruolo predominante per la corretta riparazione. Il supporto 3D deve essere in grado di riempire adeguatamente il difetto osseo, sostenere i carichi applicati a quel sito per il tempo necessario alla rigenerazione del tessuto osso e in situ e consentire la corretta sequenza dei processi di rigenerazione.

Queste caratteristiche valgono anche per gli scaffolds utilizzati per i 'sistemi cellulari' dove vengono isolate ed utilizzate cellule specifiche.

I passaggi necessari per l'ingegnerizzazione di tessuti o organi sono la raccolta di cellule dal sito donatore, la semina di queste sul supporto 3D, l'induzione della proliferazione cellulare, il mantenimento della specializzazione o differenziazione cellulare, e infine il trapianto del costruito (cellule seminate sul materiale) nell'organismo.

Ma per ottenere una efficace, durevole e stabile riparazione del tessuto danneggiato da trauma o malattia con questo sistema occorre generare un numero adeguato di cellule/tessuto per riempire il difetto o completare la riparazione, nonché indurre la differenziazione delle cellule verso il corretto fenotipo e il mantenimento di questo o viceversa, evitare il de-differenziamento delle cellule verso fenotipi non più specifici, come può succedere ai condrociti. Le cellule dovrebbero organizzarsi in tridimensionale e produrre matrice extracellulare: in tempi adeguati alle necessità del paziente si deve ottenere una piena integrazione locale con il tessuto ospite con vascolarizzazione del tessuto neoformato<sup>6</sup>.

Teoricamente varie sono le fonti di cellule da utilizzare per la riparazione/rigenerazione dei tessuti. Queste comprendono cellule mature del paziente, cellule staminali 'adulte', come 'bone marrow stromal or mesenchymal cells', e cellule embrionali (ES) o cellule germinali (EG).

Le cellule mature isolate da biopsie tissutali possono essere re-impiantate nello stesso donatore, evitando così la necessità di immunosoppressione, ma non sono le cellule migliori per la riparazione. Grandi speranze sono riposte nelle cellule staminali da midollo osseo (MSC), cioè da quei progenitori di cellule adulte, con discreto potenziale proliferativo, che ancora sono presenti nei tessuti midollari dell'adulto. Nel migliore dei casi gli osteoprogenitori rappresentano però lo 0.001% delle cellule nucleate nel midollo osseo di adulto sano.

Si pone anche il problema della loro accessibilità, come nel caso della procedura invasiva dell'aspirato midollare, che può portare a complicazioni e comunque disagio per il paziente.

Sono in atto sperimentazioni in vivo di riparazione di difetti ossei con scaffolds caricati con MSCs: l'osso rigenerato occupa circa il 40-47% dello spazio da riempire, ed è probabile che non venga superata questa percentuale perchè deve essere presente vascolarizzazione e tessuto molle associato; le ossa lunghe 'riparate' con scaffold caricati con cellule hanno proprietà biomeccaniche (rigidità, resistenza alla torsione, etc) migliori degli scaffold cell-free<sup>7</sup>.

Riassumendo, se vengono seminate sullo scaffold cellule dell'ospite si evitano reazioni di rigetto e/o trasmissione di malattie, e, apparentemente, più rapida guarigione, ma si rende necessario un prelievo dal paziente con conseguente disagio, e il risultato a volte è insoddisfacente per scarsità e stato differenziativo delle cellule prelevate da adulto. L'impianto di cellule esogene, prive di potenziale antigenico, è oggetto di studio.

L'ultima e più innovativa risorsa sono le 'factor-based or gene therapies', consistenti nell'introdurre nel sistema scaffold-cellule uno stimolo osteoinduttivo.

Il primo è stata la Bone Demineralized Matrix (DBM), poi le Bone Morphogenetic Protein purificate (BMP 2, 4 e 7, appartenenti alla famiglia del TGF $\beta$ ).

Questi fattori di crescita, tuttora oggetto di studio, ma già anche applicati in clinica, sembrano indurre una veloce rigenerazione, perlomeno in vitro. Gli aspetti negativi comprendono la difficoltà di legarli a molecole di trasporto in modo funzionale, la difficoltà di modulare l'emivita e il rilascio, e il rischio di trasmettere vettori patogeni.

Una tecnica per modificare le cellule prevede infatti l'uso di vettori virali, tipo gli adenovirus, contenenti cDNA per BMP-2 ricombinante: le cellule diventano quindi semplici vettori dei geni appropriati e producono il fattore osteoinduttivo.

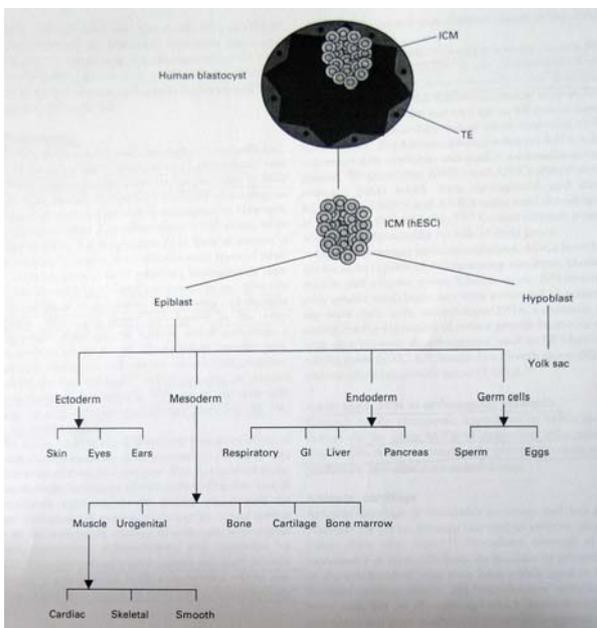
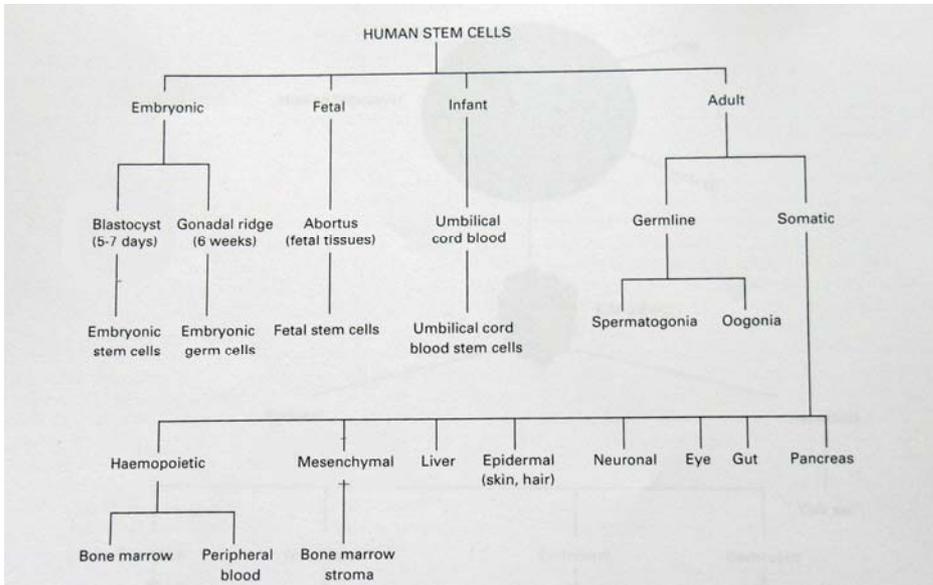
Più 'sicuro' diventa allora l'uso dei concentrati piastrinici autologhi, che apportano in buona quantità i fattori di crescita (e non solo) del paziente stesso. La difficoltà di questi sistemi è valutare l'efficacia in vivo sul processo di riparazione, in quanto non si conosce l'emivita dei fattori così introdotti.

## 2.2 Le cellule staminali

Le cellule staminali sono cellule pluripotenti in grado di differenziare sotto opportuni stimoli verso tessuti mesodermici (Es: tessuto adiposo, osseo, cartilagineo, muscolare e tendineo), ectodermici (Es: tessuto nervoso) ma anche endodermici (Es: epatociti). E' attualmente possibile attraverso le cellule mesenchimali staminali (MSC) eseguire coculture di cellule staminali orientate in senso osteoblastico e condroblastico su un medesimo biomateriale<sup>8,9</sup>. Per una corretta differenziazione delle MSC sono ovviamente importanti le condizioni di coltura, in termini di fattori di crescita utilizzati (Es: FGF 2, TGF  $\beta$ , IGF 1), di stimoli

meccanici a cui i biomateriali vengono sottoposti, del bioreattore utilizzato per eseguire le colture cellulari.

Le cellule staminali utilizzabili sono prelevabili da individuo adulto oppure da embrione<sup>10</sup>, le prime pluripotenti, le seconde totipotenti (Fig 1-2).



**Fig 1 e 2.** Schema grafico riassuntivo delle fonti di cellule staminali e delle possibilità del loro orientamento tissutale.

La fonte delle cellule staminali può attualmente ritenersi ubiquitaria (periostio, midollo, tessuto adiposo, sinovia, parete dei vasi, cartilagine...etc...). Per ognuna di queste fonte esistono problemi tecnici legati alla quantità possibile di prelievo ed alla facilità di induzione delle cellule staminali verso un determinato citotipo. In studi sperimentali le cellule mesenchimali sono state utilizzate per ingegnerizzare osso, cartilagine, legamenti, menischi, dischi intervertebrali, SNC...etc etc (Fig 3). Le cellule staminali sono capaci di transdifferenziare ovvero di passare da una linea cellulare orientata ad un'altra altrettanto orientata <sup>11</sup>.

**Table 1. Evidence to support the therapeutic use of mesenchymal stem cells (MSCs)**

Type of defect	Source of MSCs	Model	Result	Reference(s)
Tibial nonunion	Bone marrow	Human	Union in most patients	68
Nonunion, delayed union, poor regeneration after bone transport	Bone marrow	Human	Union in 68 of 72 patients	69
Nonunion	Bone marrow	Human	Bone union obtained in 53 of 60 patients with the number of injected MSCs possibly affecting outcome	70
Large femoral defect	Adipose tissue (human)	Rat	Healing of defect in eight weeks	57
Cranial bone defect	Bone marrow (human)	Rat	Acceleration of healing	75
Segmental bone defect	Bone marrow	Rabbit	BMP <sup>†</sup> -7 and bone-marrow loaded into a porous matrix had the most favourable outcome	79
Segmental bone defect	Bone marrow	Human	Complete consolidation between the implant and bone at six months	80
Large bone defect	Bone marrow	Rabbit	Increased osteogenesis, bone union and resorption of the coral scaffold	90
Osteochondral defect	Bone marrow	Rat	The defect was repaired by hyaline cartilage and subchondral bone although the number of injected MSCs decreased with time	83
Articular cartilage defect	Autologous chondrocytes	Pig	Generation of hyaline cartilage	84
Full thickness osteochondral defect	Bone marrow	Rabbit	Complete healing of the defect	91
Physseal defect	Bone marrow	Rabbit	Enhancement of physseal defect	82
Partial growth arrest	Bone marrow, periosteum, fat	Rabbit	Bone marrow and periosteum have more homogeneous MSCs and provides better correction of a physseal defect than fat	92
Full-thickness articular defect	Bone marrow	Rabbit	Joint destruction, collagen gel and MSC transplantation enhanced the repair	93
Articular defect	Periosteal graft	Goat	Early treatment of articular defects had more favourable results	94
OA* and meniscal injury	Bone marrow	Goat	Retardation of destruction of the joint and regeneration of meniscal tissue	12
Large scale osteoarticular construct	Bone marrow	Rat	Construction of articular condyle	81
Prevention of loosening of total ankle arthroplasty	Bone marrow	Human	Preliminary study: bone-prosthesis interface was established, no inflammatory reaction	76
Spinal fusion	Bone marrow	Dog	Improved bone grafting	77
Spinal fusion	Bone marrow	Rabbit	MSCs loaded into a porous ceramic seemed to enhance outcome	95
Femoral head osteonecrosis	Bone marrow	Human	Low rates of deterioration	85-87
Unicameral bone cysts	Bone marrow	Human	Bone marrow can be used in the treatment of unicameral bone cysts but has a high failure rate; no difference compared with steroid injection	96

\* OA, osteoarthritis  
† BMP, bone morphogenetic protein

**Fig 3:** Vengono mostrati alcuni degli usi clinici delle MSC sull'uomo e sull'animale.

Krampera et Al <sup>12</sup> hanno mostrato in maniera esaustiva le fonti di MSC (tra cui il circolo sanguigno periferico), le vie di differenziazione così come la capacità delle MSC di immunomodulare la risposta locale nei tessuti ospiti in cui vengono iniettate.

Murphy et Al. <sup>13</sup> hanno mostrato come l'artrosi di ginocchio in modello sperimentale animale possa risentire positivamente del trattamento mediante iniezione intra-articolare di MSC. Dallo studio si evince che nonostante gli score clinici non siano risultati ottimali, gli score istologici siano risultati buoni, soprattutto in considerazione di una così semplice tecnica di trattamento.

Adachi et Al. <sup>14</sup> hanno mostrato un uso clinico di uno scaffold di idrossiapatite caricato con cellule staminali orientate in senso condroblastico per ripristinare la congruità articolare in esiti di artrite settica di ginocchio. Da ricordare poi l'articolo di Quarto et Al. <sup>7</sup> per l'uso clinico dello scaffold di Idrossiapatite e cellule staminali per ripristinare gap scheletrici elevati nell'arto superiore.

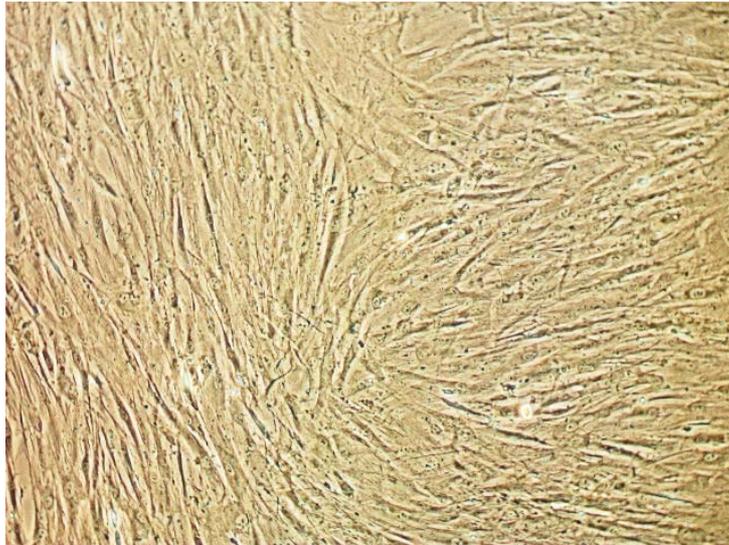
Molti autori <sup>15,16,17,18,19</sup> si sono applicati nel saggiare le potenzialità, la qualità, la resa di diverse fonti di cellule staminali: Riferendosi all'osteogenesi attualmente il midollo osseo risulta una fonte migliore per quantità e qualità delle MSC prelevate rispetto al tessuto adiposo e sinoviale, ed altri tessuti; riferendosi invece alla condrogenesi il tessuto sinoviale risulta una fonte comparabile al tessuto adiposo. Consigliamo infine l'articolo di Mikos et Al <sup>20</sup> che rappresenta la summa attuale dell'ingegneria bi o pluritissutale, con ottimi spunti per sviluppi futuri.

### **2.3 Colture primarie di cellule mesenchimali stromali umane**

Nella presente trattazione la fonte di cellule mesenchimali stromali (MSC) umane per allestire colture primarie è stato il midollo osseo ottenuto dalla fresatura del canale femorale, necessaria per l'impianto di protesi d'anca <sup>21</sup>. Il midollo, una volta giunto in laboratorio, è stato stratificato su Ficoll Istopaque 1077 (Sigma), al fine di isolare la porzione di cellule midollari mononucleate. Dopo i lavaggi, questa frazione cellulare viene diluita in terreno di coltura e le cellule seminate ad una densità di  $25 \times 10^4 / \text{cm}^2$  in terreno differenziante. Questo è costituito da Minimum Essential Medium modificato ( $\alpha$ -MEM) addizionato di 10% di siero fetale di bovino (FBS), 1% di penicillina- streptomina,  $50 \mu\text{g/ml}$  di acido ascorbico, e  $10^{-8}\text{M}$  desametasone. Le colture vengono mantenute a  $37^\circ\text{C}$  in atmosfera al 5% di  $\text{CO}_2$  e umidità al 95%. Con i successivi cambi di terreno, eseguiti ogni 2-3 giorni, le cellule non aderenti vengono allontanate dalla coltura. Le cellule aderenti, di aspetto fibroblastico, costituiscono la popolazione di MSC, e nel giro di 2-3 settimane arrivano a confluenza, fino a formare un monostrato (fig. 4). A questo punto vengono sub-coltivate, cioè vengono staccate dalla piastra di coltura con l'enzima tripsina e ri-seminate come cellule al passaggio 1 (1 pass) in nuove piastre di coltura.

Le MSC così selezionate per aderenza al substrato sono seminate in parte per i tests di caratterizzazione fenotipica in senso osteoblastico, in parte per l'espansione ed il mantenimento della coltura in vitro.

La verifica del fenotipico osteoblastico, indotto in vitro dall'aggiunta di ascorbato e desametasone, viene eseguita attraverso il test di formazione delle colonie (Colony Forming Units, CFU), l'attività della fosfatasi alcalina (ALP) e la capacità delle MSC di depositare noduli di calcio-fosfato, cioè minerale.



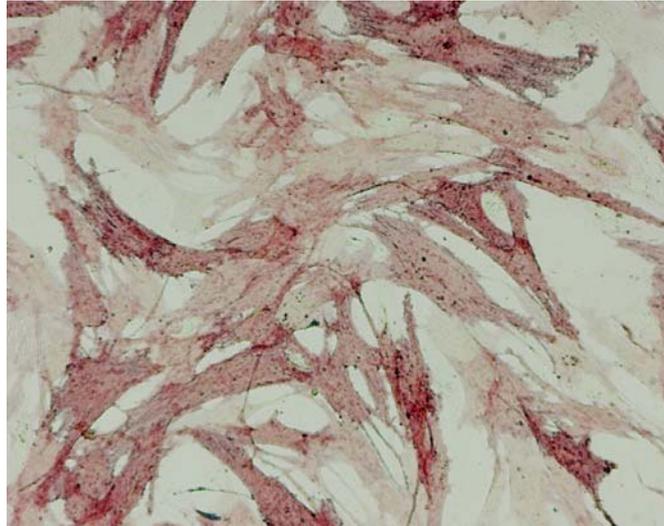
**Fig. 4.** Monostrato di MSC a 4 settimane dalla semina (a fresco, 4x)

Il test delle CFU si basa sul principio che le MSC dotate di elevata capacità proliferativa e quindi probabili precursori degli osteoblasti, sono in grado di generare in vitro una colonia di cellule a partire da una singola cellula<sup>22</sup>.

A questo scopo viene effettuata una semina molto diluita (100 cellule per cm<sup>2</sup>) e la coltura mantenuta per due settimane: viene considerata colonia un aggregato con un numero di cellule superiore a 16. Le CFU, fissate in paraformaldeide 3,7% e colorate con cristal violetto, vengono contate al microscopio.

Per saggiare la capacità delle MSC di mineralizzare in vitro viene aggiunto al mezzo di coltura alfa-glicerofosfato (alfa-GP, che costituisce la fonte di fosfato per la formazione di noduli minerali inorganici, per circa due settimane dopo la fase di proliferazione cellulare<sup>23</sup>. Quando la presenza di noduli nella coltura con terreno mineralizzante viene rilevata mediante osservazione al microscopio, la coltura viene fissata in paraformaldeide 3,7% e i noduli di calcio-fosfato vengono colorati o con rosso di alizarina, che si lega al calcio, o con il metodo di Von Kossa, che si lega al fosforo.

Il fenotipo osteoblastico viene saggiato anche con la ricerca dell'enzima fosfatasi alcalina, considerato un marker degli osteoblasti. Per quantificare l'attività dell'enzima, le cellule vengono lisate in sodio-dodecilsolfato (SDS) 0,001% ed incubate 1:1 con p-nitrofenilfosfato come substrato; la quantità del prodotto della reazione, cioè il p-nitrofenolo, viene rilevata in spettrofotometria a 405nm, ed il valore, interpolato in una curva standard, fornisce una stima dell'attività dell'enzima. La presenza di ALP nella cellula può essere evidenziato con metodo citochimico, su cellule in monostrato fissate, usando gli stessi reagenti: l'intensità della colorazione rossa che rivela la presenza dell'enzima è direttamente proporzionale alla sua presenza nella cellula (Fig. 5).



**Fig. 5.** Cellule stromali di midollo colorate per la fosfatasi alcalina (ALP, 10x)

A tempi di coltura sia brevi che prolungati viene valutata l'espressione dei geni del differenziamento osteoblastico quali Runx2, osterix e ALP, considerati marcatori precoci del fenotipo osteoblastico, ed in seguito osteocalcina e collagene di tipo I, come markers più tardivi.

La vitalità cellulare viene misurata sulle colture ogni sette giorni mediante il test dell'Alamar Blue. Il colorante blu, aggiunto nella proporzione 1:10 al mezzo di coltura per 3-4 ore, viene modificato dagli enzimi della catena redox mitocondriale, attivi solo nelle cellule vitali, assumendo una forma ridotta di colore rosa. Il viraggio della molecola viene rilevato tramite lettura con Cytofluor 2350 (Millipore) alla lunghezza d'onda di 530nm ed il valore di lettura, espresso in unità relative di fluorescenza, (Relative Fluorescence Unit, RFU), fornisce una stima del metabolismo cellulare.

#### **2.4 PCL/HA e MSC**

Tra i polimeri di utilizzo in ingegneria tissutale il poli- $\epsilon$ -caprolattone (PCL) è un materiale approvato dalla Food and Drug Administration per vari dispositivi medici, quali fili di sutura monofilamento e rilascio di farmaci (es. dispositivo intrauterino per contraccezione). Il PCL è un poliesteri alifatico semicristallino lineare, riassorbibile perché il suo legame alifatico è soggetto a idrolisi: i suoi prodotti di degradazione sono metabolizzati o attraverso la via degli acidi tricarbossilici o eliminati per escrezione renale diretta. Questo materiale è stato inoltre proposto come sostituto dei dischi intervertebrali e come spaziatore con rilascio controllato di antibiotici <sup>24</sup>.

Le matrici di poli- $\epsilon$ -caprolattone sono state preparate all'Università Federico II di Napoli in forma di supporto tridimensionale a porosità controllata e con addizione di particelle di idrossiapatite (HA). La micro- e macro-porosità ( $< 10\mu\text{m}$  e  $> 100\mu\text{m}$ , rispettivamente) è stata creata con la tecnica del 'salt leaching', cioè con l'addizione di cristalli di sodio e cloruro alla matrice polimerica, e loro successivo scioglimento in acqua. Particelle di HA (212-300  $\mu\text{m}$ ) sono state mescolate al polimero per conferire invece la resistenza necessaria a sopportare i carichi meccanici e per funzionare da siti di nucleazione del nuovo minerale che verrà depositato dagli osteoblasti. Dato che tale aggiunta modifica in modo sostanziale le caratteristiche meccaniche del polimero, e verosimilmente anche la risposta biologica, va verificata accuratamente la quantità di particelle da aggiungere: a questo scopo le particelle sono state aggiunte in proporzioni diverse per identificare quella ottimale.

#### **2.4.1 Materiali e metodi**

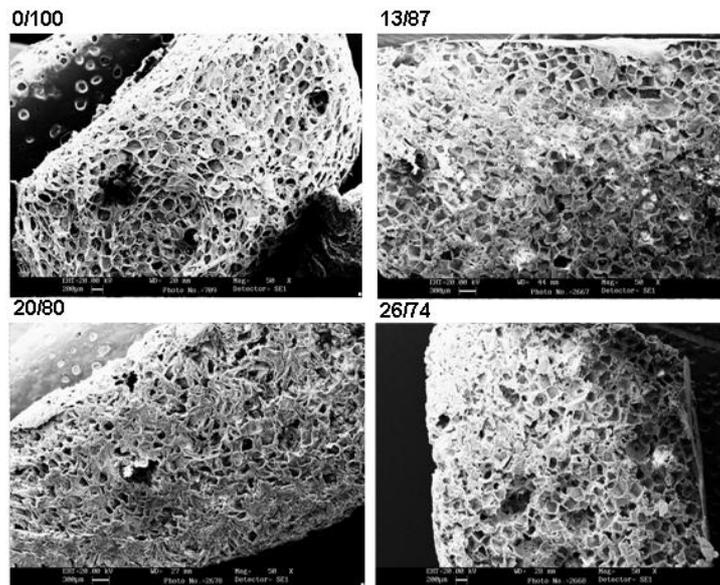
Particelle di policaprolattone (Sigma Aldrich, MW 65 kDa) sono state disciolte in una soluzione al 20 % in peso di N-N-dimethylacetamide (J.T. Baker) (5g di polimero in 20 ml di solvente) in agitazione per 3 ore a 58°C. Cristalli di cloruro di sodio di dimensioni 212-300  $\mu\text{m}$  sono state aggiunte al polimero nella proporzione 9:1 e mescolate fino a raggiungere una distribuzione omogenea. La mistura è stata compressa, immersa in etanolo e infine in acqua per 7 gg, con 3 cambi al giorno. Per gli scaffolds addizionati di idrossiapatite, le particelle di HA (area superficiale specifica 13.29  $\text{m}^2/\text{g}$ ) sono state aggiunte alla soluzione di PCL nelle proporzioni di 40, 70 e 132% in peso. I rapporti in peso HA/PCL sono stati convertiti in volumi percentuali, ottenendo così PCL con 13% HA, con 20% HA e con 26% HA in volume.

Gli scaffolds sono stati osservati con SEM e analizzati quanto a proprietà meccaniche, quali resistenza a compressione e resistenza a tensione, e porosità. Per i test biologici sono state utilizzate MSC umane al 2-5 passaggio: dopo semina sugli scaffold sono state coltivate in vitro fino a 5 settimane e analizzate per vitalità e produzione di fosfatasi alcalina (ALP) a tempi prefissati.

#### **2.4.2 Risultati**

Sono mostrati in Tabella 1,2,3 e Fig. 6 i risultati della combinazione PCL/HA. In particolare si evidenzia come all'aumentare della percentuale di HA diminuisca la porosità e del raggio medio dei pori. Il range medio dei pori si colloca tra i 10 e i

100  $\mu\text{m}$ . La resistenza a stress è influenzata dalla presenza di HA: lo stress massimo risulta intorno ai 70kPa con lo strain che risulta, allo stesso punto circa 0.16 mm/mm. Approssimativamente lo stesso comportamento si verifica per il modulo elastico, con valore tipico di circa 1 Mpa; solo nel caso di PCL con 13% vol HA si raggiunge un valore di 1.3 Mpa.



**Fig. 6.** Morfologia degli scaffold di PCL con 0, 13, 20 e 26% in volume di particelle di HA. L'indagine morfologica con SEM permette di distinguere sia la microporosità (1-10 micron) che la macroporosità (10-300 micron).

HA/PCL volume ratio	Total Porosity (%)	Average pore Radius ( $\mu\text{m}$ )	Bulk Density ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )	Total Specific Surface Area ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	Surface/Volume ratio ( $1/\text{m}$ ) * $10^6$
0/100	95.43	65.85	0.090	0.649	0.0584
13/87	92.12	64.65	0.134	0.464	0.0622
20/80	90.83	49.43	0.157	0.530	0.0831
26/74	90.19	48.63	0.185	0.501	0.0927

**Tab 1:** I risultati mostrano una porosità totale variabile tra 95.43 e 90.19 in funzione dell'aumentare del contenuto di HA mentre il raggio dei pori ha un valore tra 65 e 49 $\mu\text{m}$  andando da 100/0 HA/PCL al 26/74 HA/PCL (volume ratio).

Pore Radius Range ( $\mu\text{m}$ )	% relative volume			
	HA/PCL volume ratio			
	0/100	13/87	20/80	26/74
100-1000	12.9	13.8	14.1	10.3
10-100	71.4	71.8	72.5	78.0
1-10	15.7	14.4	13.4	11.7

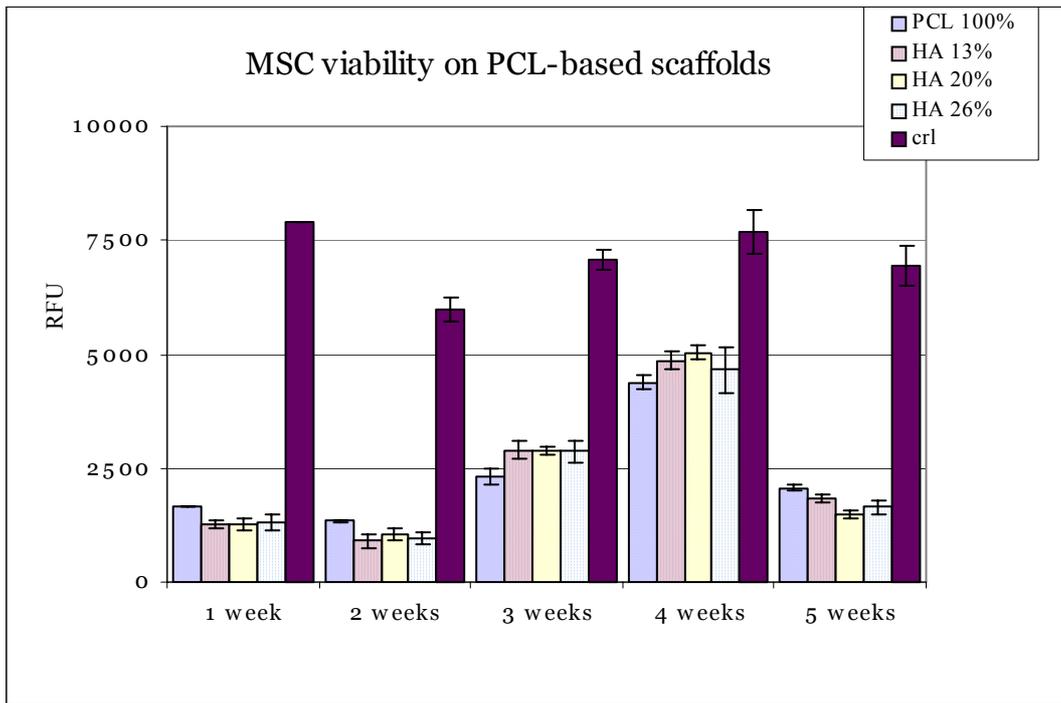
**Tab 2.** La percentuale di volume relativo dei pori in funzione del range prefissato di dimensione dei pori (1-10, 10-100, 100-1000  $\mu\text{m}$ ). Risulta evidente che la maggior frazione di pori cade nel range 10-100 $\mu\text{m}$ .

HA/PCL volume ratio	Tensile Modulus (MPa)	Strain at Max Stress (mm/mm)	Max Stress (MPa)
0/100	1.10 $\pm$ 0.31	0.160 $\pm$ 0.080	0.060 $\pm$ 0.028
13/87	1.31 $\pm$ 0.18	0.164 $\pm$ 0.060	0.076 $\pm$ 0.015
20/80	1.13 $\pm$ 0.19	0.111 $\pm$ 0.012	0.071 $\pm$ 0.0097
26/74	1.01 $\pm$ 0.17	0.172 $\pm$ 0.029	0.067 $\pm$ 0.0048

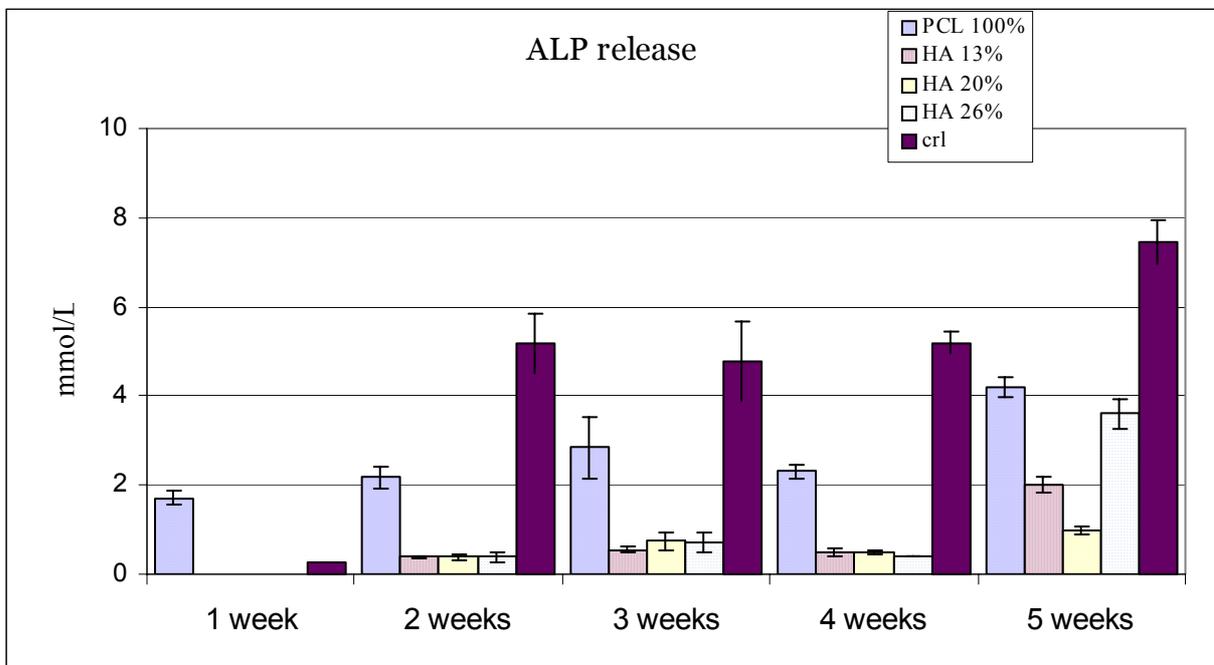
**Tab. 3.** Proprietà meccaniche del costrutto HA/PCL. Si evidenzia come la resistenza allo stress sia influenzata dalla presenza di HA.

### 2.4.3 Cellule

Le MSC seminate sugli scaffolds a base di PCL mostrano un picco di proliferazione a 4 settimane, senza rilevanti differenze tra i diversi compositi. I valori di ALP sono piuttosto bassi per tutti i compositi durante la proliferazione, tranne che per il PCL puro. (fig. 7-8) A 5 settimane, l'ALP aumenta, in accordo con la fine della fase proliferativa e l'inizio del differenziamento.

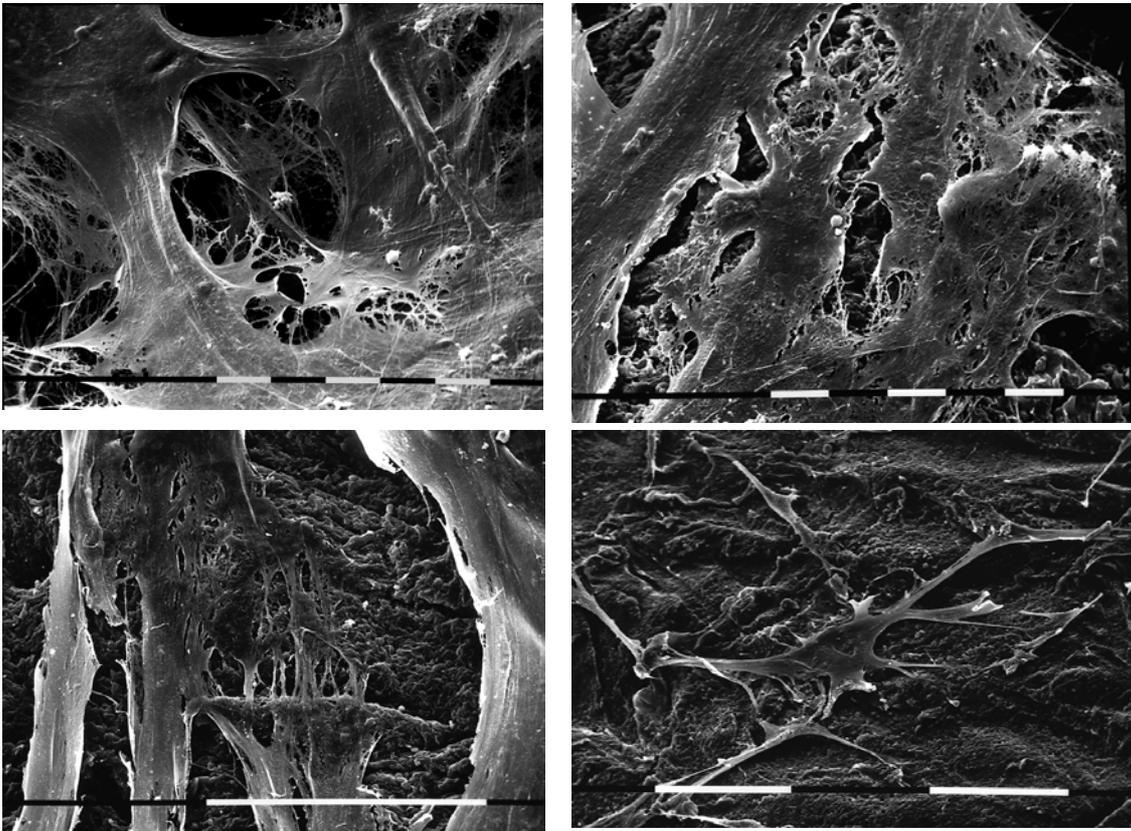


**Fig. 7** Proliferazione delle MSC seminate sugli scaffold di PCL fino a 5 settimane (n= 6; RFU= Relative Fluorescence Units).



**Fig. 8** Attività della fosfatasi alcalina nelle MSC sugli scaffold di PCL fino a 5 settimane (n= 6)

La microscopia a scansione mostra (Fig. 9) che la presenza di MSC distese sulle superfici di PCL, ma la confluenza delle cellule non è raggiunta su tutti i substrati.



**Fig. 9** SEM di MSC a 4 settimane rispettivamente su PCL (bar=10um, in alto a sn), PCL 13vol%HA (bar 10um, in alto a dx), PCL20vol%HA (bar=100um, in basso a sn), PCL26vol%HA (bar=100um, in basso a dx)

In conclusione, gli scaffolds testati hanno un range di porosità ottimale sia per la circolazione di ossigeno e nutrienti che per l'entrata di cellule ossee e successiva formazione di tessuto osseo, mostrando circa il 70% dei pori compresi tra 10 e 100 micron. Il modulo elastico risulta però ancora basso (intorno a 1Mpa) rispetto alle richieste dell'osso. La presenza di HA in proporzione 'intermedia' migliora le caratteristiche meccaniche del composito.

Quanto a risposta biologica, il confronto tra PCL100 cioè privo di HA, e i compositi PCL+13%volHA, PCL+20% volHA e PCL+26% volHA (w/w) ha indicato i PCL senza HA e con 13% di HA come i compositi migliori per capacità osteoconduttive. Risulta evidente che le buone caratteristiche di lavorazione modulare dei polimeri, quali il policaprolattone, vanno migliorate attraverso l'aggiunta di materiali con caratteristiche meccaniche più vicine all'osso, quali appunto le ceramiche (HA,

TCP, etc) che forniscono anche al sistema ioni calcio e fosfato necessari per il differenziamento delle MSC in senso osteogenico<sup>25</sup>.

### **3 STUDIO SPERIMENTALE ANIMALE**

#### **3.1 Obiettivi**

La fase sperimentale su animale è stata svolta presso il Bernard O'Brien Institute di Melbourne (dir. prof. W. Morrison) ove sono state apprese le tecniche di neovascolarizzazione microchirurgica sia in campo umano che sperimentale. In particolare oltre al training microchirurgico e' stato condotta una ricerca sulla rigenerazione guidata dei mioblasti su differenti biomateriali (Matrigel, Miogel, Curaspon) e costrutti (camera di coltura microchirurgica). L'obiettivo principale della fellowship è stato quello di apprendere ed utilizzare le tecniche microchirurgiche con un orientamento specifico verso i biomateriali ed alla ricostruzione ingegnerizzata dei tessuti. Sono state eseguite durante l'anno 2006-2007 oltre 150 anastomosi microchirurgiche durante i vari studi sperimentali su animale e qualche decina su paziente.

#### **3.2 Training microchirurgico**

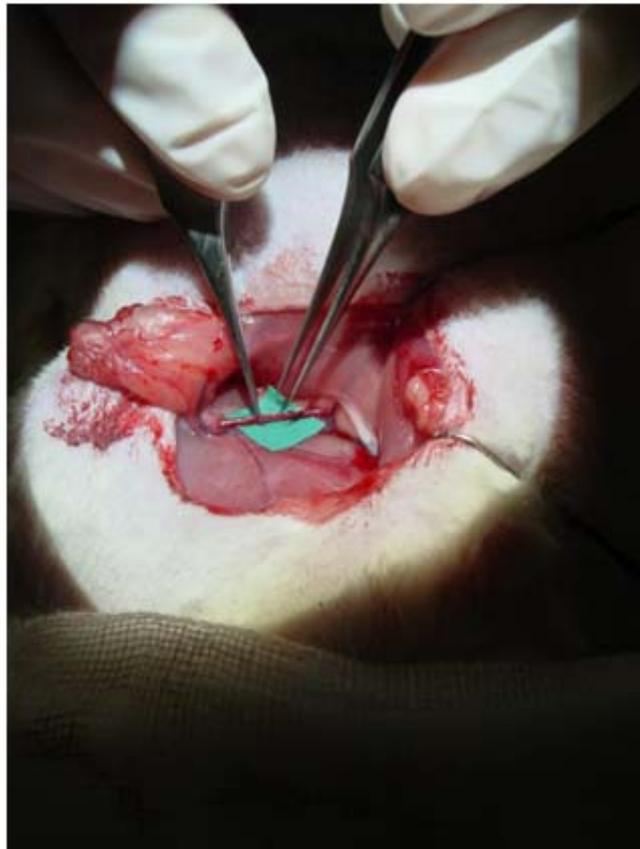
Il training microchirurgico è una settore chirurgico la cui esplicazione risulta estremamente costosa, lunga e a volte frustrante. Per ottimizzare i costi è necessario procedere per steps. Il discente deve procedere prima su modelli plastici, eseguendo suture dirette di membrane sottili con punto diretto od invertito. Procedere quindi a tubularizzare membrane sottili di guanto. Infine quando una sufficiente confidenza con la gestualità microchirurgica è stata raggiunta, il passaggio successivo consiste nell'eseguire anastomosi su cadavere di ratto, quindi su animale vivo. Il ratto rappresenta l'animale maggiormente utilizzato per il training microchirurgico. I motivi principali sono legati alla facile disponibilità di esemplari, all'elevato tasso di riproduzione degli stessi, al basso costo di stabulazione, alla relativa resistenza alle procedure chirurgiche. Inoltre le dimensioni dei vasi femorali del ratto possono essere paragonati a quelle delle arterie digitali dell'uomo. La consistenza dei vasi nel ratto è estremamente fragile se paragonata a quelle delle vene e delle arterie digitali dell'uomo. In tal senso risulta più semplice eseguire suture microchirurgiche nell'uomo dopo che si è imparato a ad eseguire suture sul ratto. Tutte le procedure sia in campo sperimentale che di training sono state condotte con l'approvazione del Comitato Etico Locale per la sperimentazione animale.

Molto si è discusso su come "certificare" l'avvenuto training microchirurgico. Secondo le ultime linee guida la pervietà dell'anastomosi vascolare microchirurgica al termine della procedura non riflette l'acquisita capacità di manualità microchirurgica. Ilie et Al <sup>26</sup>concludono nel loro studio che è necessario valutare la pervietà dell'anastomosi a 2 settimane di distanza dalla procedura.

Così come Lascar et Al.<sup>27</sup> concludono che la percentuale di pervietà non migliora dopo le prime 32 anastomosi. Hui et Al<sup>28</sup> hanno dimostrato che nonostante il tentativo di mantenere la percentuale di pervietà delle anastomosi vicino al 100% la massima percentuale di pervietà ottenibile anche in “trained surgeons” si avvicina all’88%. Rimandiamo comunque a questi ed altri Autori<sup>29</sup> l’approfondimento del training e delle problematiche legate ad un corretto training microchirurgico.

### 3.3 Lo strumentario Microchirurgico

La microchirurgia per definizione si avvale di mezzi ottici ingrandenti mediante i quali le tecniche chirurgiche vengono rese più semplici. In caso di strutture vascolari particolarmente fini, i mezzi ottici sono indispensabili per eseguire la procedura chirurgica (Fig 10).



**Fig 10:** Viene mostrato in figura l’asse vascolare femorale di un ratto. Si evidenzia come il piccolissimo diametro dei vasi renderebbe inesequibile l’anastomosi in assenza di adeguati strumentari e di mezzi ottici ingrandenti.

Il Kit Microchirurgico minimo indispensabile è costituito da 2 Pinze (N 3 e N5), da Portagli, da Forbici a punta tonda e retta, da Dilatatrice, da Approssimatore (Fig 11, 12). Sono inoltre indispensabili una pompa microchirurgica per l'irrigazione dei vasi ed un contrasto (background) per isolare dal campo operatorio l'area in cui si andrà ad eseguire l'anastomosi. Lavare costantemente i vasi non solo permette la rimozione gentile di coaguli intravasali, ma permette anche come nel caso di lumi venosi di evidenziare il lume senza traumatizzarlo.

Le suture micorchirurgiche si avvalgono di aghi dal 9-0 al 11-0 a seconda del diametro dei vasi in cui andare ad eseguire l'anastomosi.



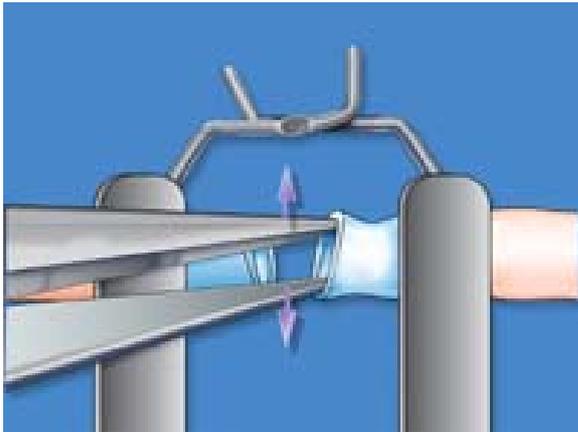
**Fig. 11** Strumentario minimo indispensabile per poter eseguire anastomosi microchirurgiche.



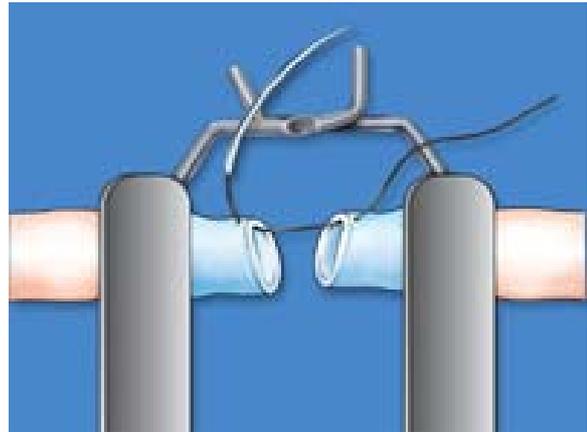
**Fig. 12** Approssimatore per vasi.

### 3.4 Le tecniche microchirurgiche.

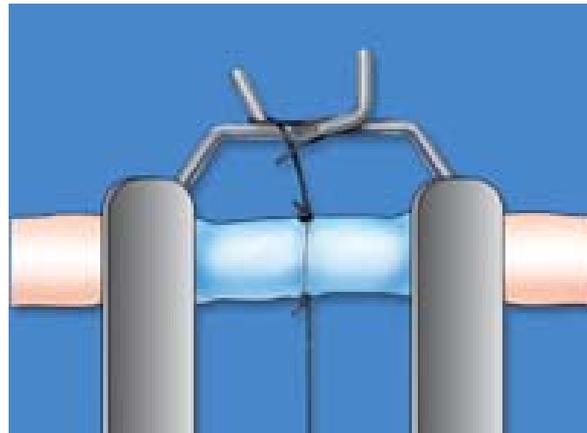
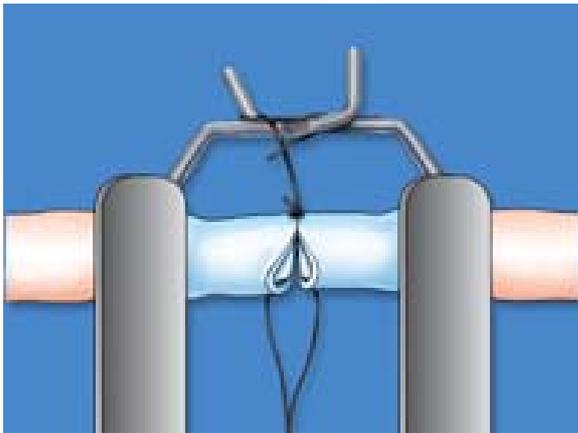
Nella figure 13 (a,b,c,d,e,f,g,h) vengono mostrati i passaggi necessari per poter eseguire un'anastomosi microchirurgica vascolare. Non sono stati mostrati i passaggi di avventiziectomia, irrigazione con soluzione eparinata del lume e l'avvicinamento in posizione ottimale dei vasi.



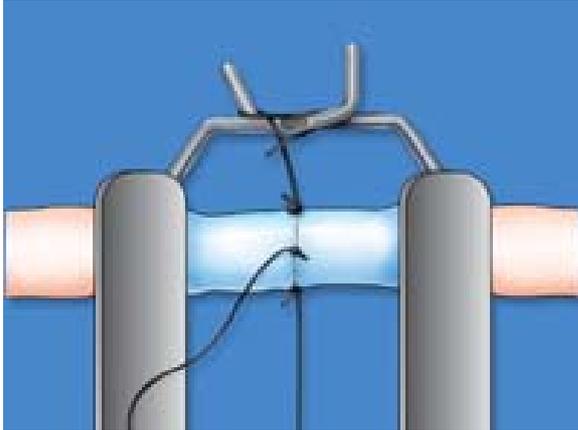
**Fig. 13a** Avvicinamento e dilatazione dei monconi.



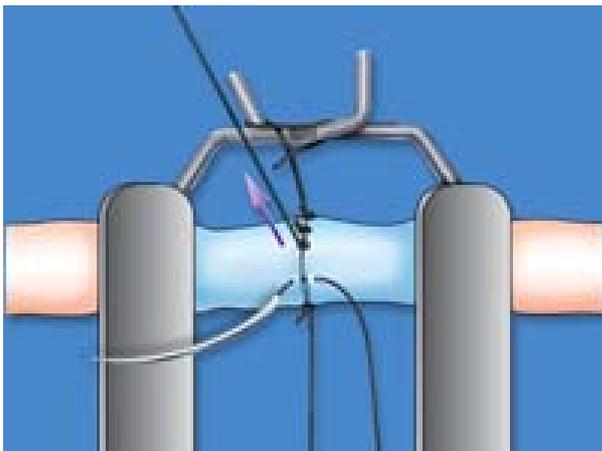
**Fig. 13b** Primo punto di sutura in posizione opposta all'operatore.



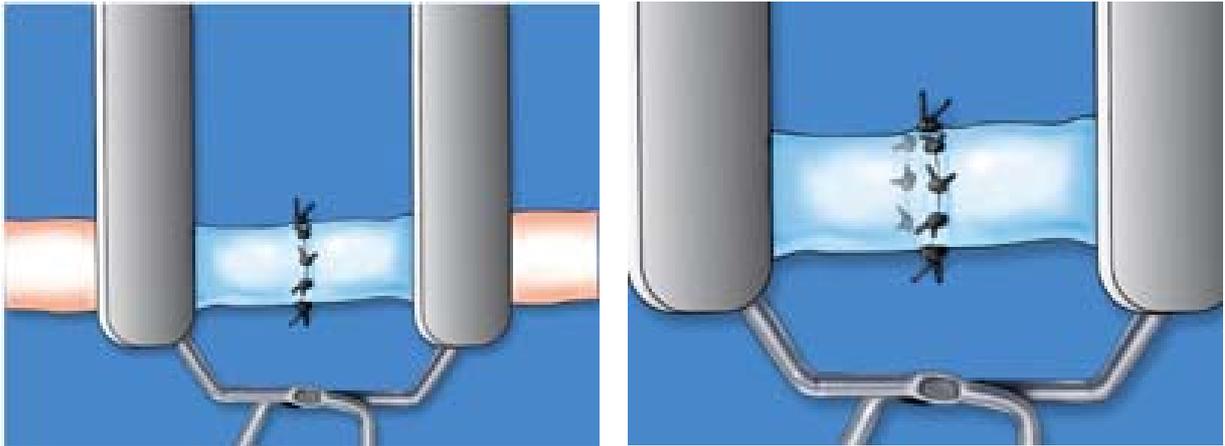
**Fig. 13c e 13d** Secondo punto di sutura in posizione prossimale rispetto all'operatore.



**Fig. 13e** Posizionamento del terzo punto di sutura centrale, allo Zenit del vaso. Dopo quest'ultimo punto la sutura procede per suddivisione degli spazi tra il 1 e 3 punto e quindi tra il 3 ed il 2. Tali operazioni vengono facilitate da un leggera trazione due fili di sutura, lasciati appositamente più lunghi.



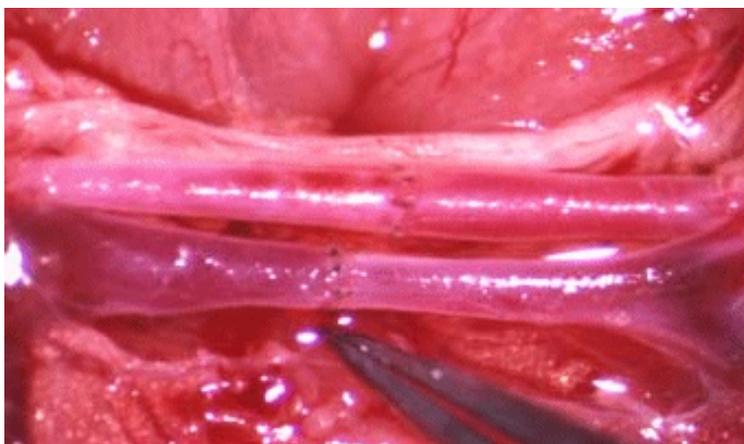
**Fig. 13f** Posizionamento del punto di sutura n 5, tra il secondo ed il terzo. L'operazione viene facilitata da una leggera trazione sui fili di sutura lasciati appositamente più lunghi.



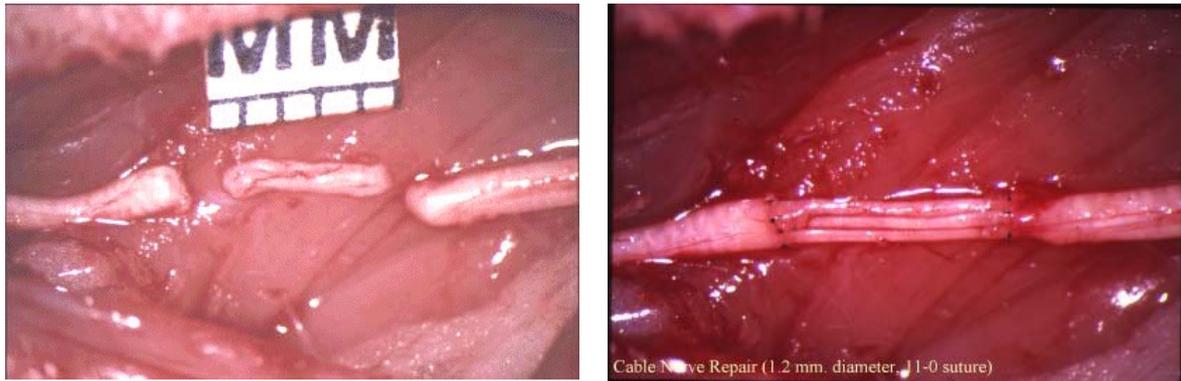
**Fig. 13g e 13h** Dopo aver completato la serie precedentemente descritta, l'approssimatore viene ribaltato di 180° per mostrare la superficie posteriore del vaso. Con tecnica speculare a quella descritta si procederà ad eseguire anastomosi della parete posteriore del vaso.

Le suture vascolari microchirurgiche si suddividono in dirette (fig 14) se i due monconi del vaso vengono direttamente affrontati e suturati, mentre si definiscono indirette se eseguite con innesto di vena interposto (fig 15 a e 15 b).

Quest'ultima opzione si rende necessaria quando esiste un gap che metterebbe in tensione, quindi a rischio di trombosi, l'anastomosi effettuata in maniera diretta.



**Fig 14.** Suture vascolari dirette eseguita direttamente tra i due monconi del vaso e con innesto interposto (fig 15 a, b) se tra i due monconi viene interposto un innesto di vena



**Fig 15.** Suture vascolari indiretta eseguite con un innesto di vena interposto

Le suture possono essere inoltre Termino-Terminali (TT) o Temino-Laterali (TL) a seconda che la posizione dei vasi da suturare sia a 180° o a 90° (fig 16).



**Fig 16.** Esempio di anastomosi TT e TL .

In modelli sperimentali peculiari possono essere eseguite anastomosi complesse (fig 17) in cui si possono alternare suture indirette TT e TL al fine di ottenere un network vascolare massivo.



**Fig 17** Tecnica di anastomosi vascolare complessa per l'ingegneria tissutale (Foto del Bernard O'Brien Institute, Melbourne, Australia).

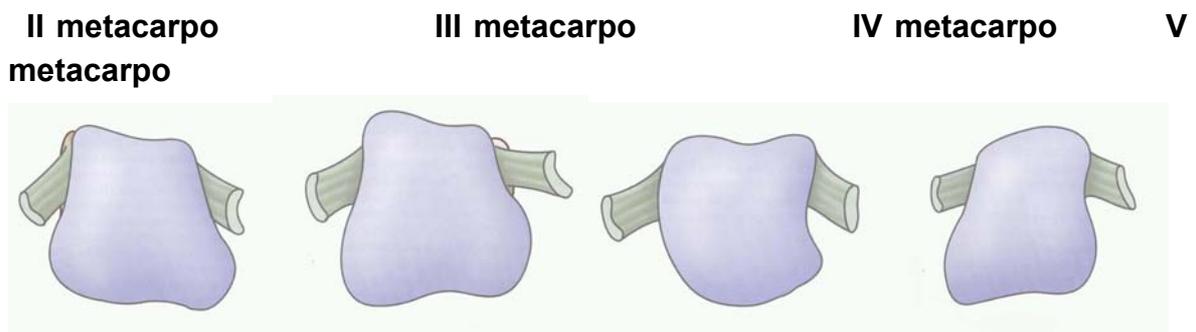
## 4 STUDIO CLINICO UMANO

### 4.1 Obiettivi

Obiettivo principale della ricerca svolta durante il dottorato di ricerca è stata la costruzione di un biosostituto scheletrico vascolarizzato, utilizzabile sia nelle perdite di sostanza scheletrica (traumatiche e non) sia in campi patologici specifici quali l'osteonecrosi, la pseudoartrosi, l'osteomielite dell'uomo.

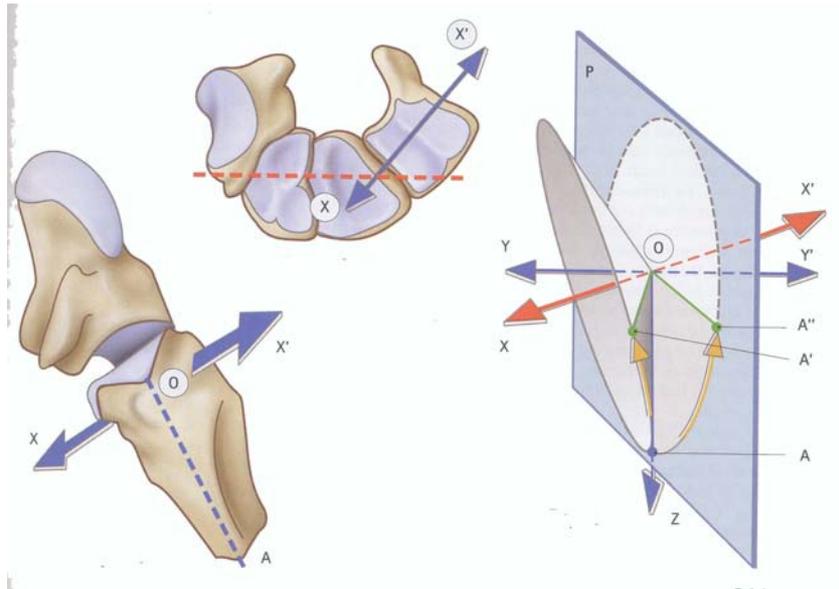
### 4.2 Valutazioni anatomiche e biomeccaniche

L'approfondimento del palmo della mano risulta essenzialmente dai movimenti degli ultimi quattro metacarpi in rapporto al carpo. Esiste un'ampia variabilità anatomica tra i vari metacarpi, necessità nata dal dover rispondere a diverse funzioni (fig 18).



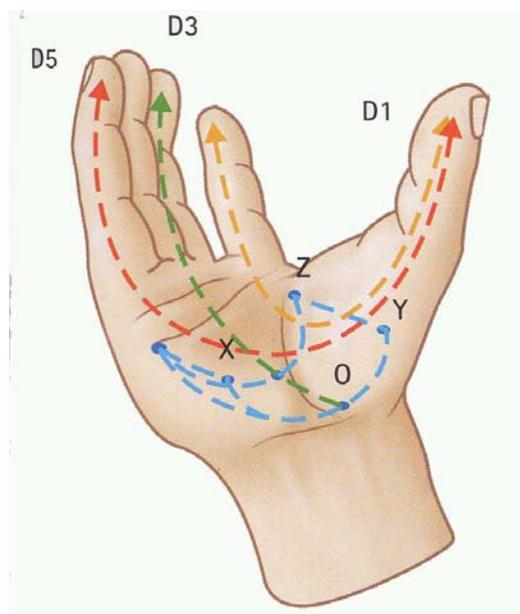
**Fig 18.** Variabilità anatomica della testa dei metacarpi

Il movimento di presa della mano avviene mediante la flessione-estensione delle Metacarpo-falangee e delle Carpo-Metacarpali. A quest'ultimo livello i gradi di movimento sono estremamente ridotti, come per tutte le artrodie (Fig. 19).

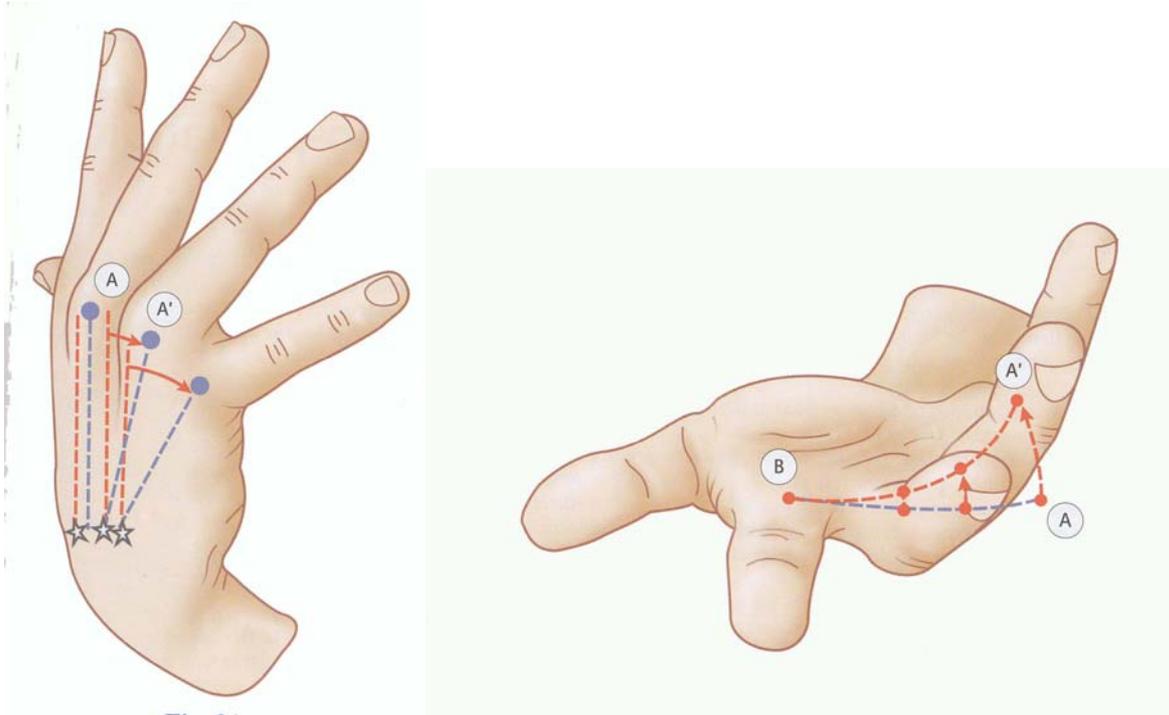


**Fig 19 .** Articolazioni Carpo-Metacarpali e relativi gradi di movimento.

L'ampiezza va tuttavia crescendo dal II metacarpo al V (fig 20, 21 a, 21b) effetto che si traduce meccanicamente in una funzione di avvolgimento da parte della mano sull'oggetto impugnato. La testa del II metacarpo praticamente non avanza in flessione rispetto agli altri metacarpi. La testa del V è quella con maggior ampiezza grazie all'artrodia tra il V metacarpo e l'uncinato.



**Fig 20** Archi di movimento delle Metacarpo-Falangee durante la flessione-estensione delle dita



**Fig 21 a e b.**

**Mano a piatto:** La testa dei quattro metacarpi è allineata su una linea retta

**Mano a pugno:** La testa dei tre ultimi metacarpi avanza in flessione e la linea che unisce le teste metacarpali è curva.

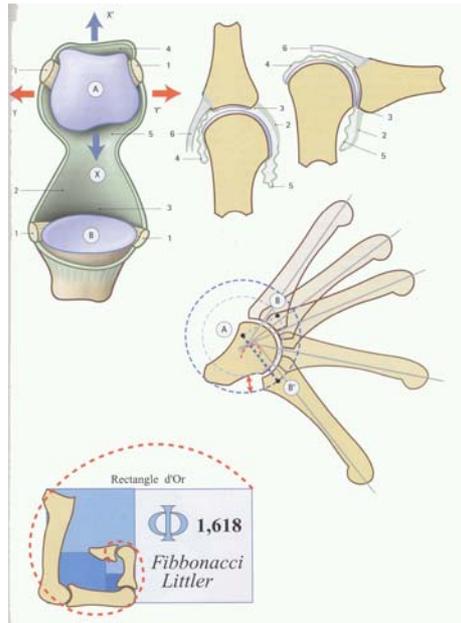
Le articolazioni metacarpo-falangee sono di tipo condiloideo e possiedono due gradi di libertà:

Flessio-estensione  $YY^l$  in un piano sagittale, ed Inclinazione laterale  $XX^l$  in un piano frontale. La testa metacarpale ha una superficie articolare convessa nei due sensi, più estesa e più larga in avanti che indietro. La base della falange è concava nei due sensi, di superficie minore che la testa metacarpale, che si prolunga in avanti nella fibrocartilagine glenoidea.

La stabilizzazione delle metacarpo-falangee avviene mediante due legamenti:

- 1) legamenti metacarpo glenoidei che controllano i movimenti della fibrocartilagine glenoidea
- 2) legamenti laterali che mantengono in contatto le superfici articolari e limitano i movimenti. Grazie alle loro inserzioni eccentriche e situate dietro al centro di curvatura della testa il legamenti risultano detesi in estensione e tesi in flessione.

Dal momento in cui si considera la flessione dei quattro segmenti (un metacarpo e tre falangi) si constata che si effettua un "avvolgimento" seguendo una spirale logaritmica, ovvero la serie di Fibonacci (fig. 22).



**Fig. 22** Flesso-estensione delle Metacarpo flangee, secondo la sequenza di Fibonacci.

La vascolarizzazione dei metacarpi avviene per ad opera dei rami anastomotici-terminali e delle collaterali dell'arteria ulnare e radiale, dell'arteria interossea anteriore e posteriore. In particolare le arterie intermetarpali dorsali e volari sono deputate alla vascolarizzazione delle ossa metarpali (fig 22). Durante le modificazioni che avvengono in una lesione traumatica complessa di una mano (es. lesione da schiacciamento) le ricche anastomosi tra le suddette arterie permettono di mantenere una ricca vascolarizzazione scheletrica.



**Fig. 22:** vascolarizzazione dei metacarpi.

### 4.3 La stabilizzazione delle fratture Metacarpali: valutazioni biomeccaniche

Pochi studi biomeccanici sono presenti in letteratura sulla stabilizzazione metacarpale e soprattutto sulle forze di rotture delle ossa metacarpali.

Black et Al.<sup>30</sup> hanno condotto esperimenti sulla stabilizzazione dei metacarpi dopo osteotomia traversa comparando placca e viti, placca e viti da richiamo, fili di K. incrociati, filo di K obliquo con cerchiaggio e cerchiaggio. Le placche con viti (da richiamo e non) sono risultate superiori a qualunque altro sistema di fissazione con una stabilità di sintesi simile all'osso nativo. I fili di K (incrociati od associati al cerchiaggio) sono risultati inferiori alla placca e viti (6 volte meno resistenti) e tra loro comparabili come sistemi di fissazione. Lo stesso autore riporta inoltre nell'articolo interessanti spunti per la modalità di fallimento al carico dei vari sistemi di sintesi.

La placca con viti (richiamo e non) falliscono per rottura dell'impianto all'interfaccia osso-vite specie al di sotto della placca, con una flessione progressiva dell'impianto. I fili di K e ed i cerchiaggi falliscono per progressiva torsione-scivolamento dei fili o per taglio dell'osso (cerchiaggio) con apertura del sito di frattura.

Firoozbakhsh et Al.<sup>31</sup> hanno successivamente comparato le forze di flessione, torsione, e la stabilità per 5 sistemi classici di stabilizzazione metacarpale (placca e viti da richiamo, viti da richiamo, fili di K incrociati, fili di K paralleli e multipli) dopo osteotomia obliqua. La placca con viti da richiamo sono risultate superiori a qualunque altro sistema di fissazione, seguita da 2 viti da richiamo dorsali e dai fili di K incrociati. Non sono risultati differenze per la stabilità ottenuta con fili di K. multipli endomidollari, disposti in maniera differente. Il carico di rottura della placca con viti è risultato 1,5 volte maggiore in flessione, 1,6 volte in torsione, e 2,5 volte con il carico assiale rispetto alle singole viti. La rigidità della placca è inoltre maggiore in risposta al carico assiale (1,5 volte) ma non in torsione e flessione rispetto alle viti.

In uno studio successivo lo stesso autore<sup>32</sup> concludeva che le fratture metacarpali oblique stabilizzate con placca e viti hanno maggior resistenza rispetto per i carichi assiali (con carichi di rottura simili all'osso nativo) ma non ai carichi in flessione se sottoposti ad impact loading (simulazione del carico fisiologico). La fissazione con placca e viti risulta in questo caso più stabile rispetto ai fili di K. La fissazione con 2 viti è risultata essere la più debole dei metodi di fissazione con il tipo di forza testata sia in flessione che in compressione. Lo stesso autore conclude che la placca e le viti sono il miglior sistema di fissazione per le fratture traverse ed oblique corte, mentre le viti sono da riservare alle fratture oblique lunghe in risposta ai possibili carichi fisiologici. Per questo tipo di frattura i fili di K. multipli sono da preferirsi alle viti.

Prevel et Al. <sup>33, 34</sup> hanno valutato la stabilità metacarpale dopo frattura spiroide obliqua stabilizzata con viti di diversa forma e dimensione, concludendo che i metacarpi stabilizzati con viti di dimensioni e disegno differente avevano gli stessi carichi di rottura. La stabilizzazione di fratture metacarpali traverse è altresì proporzionalmente legata allo spessore ed al disegno tridimensionale delle placche.

Dona et Al. <sup>35</sup> hanno concluso che per i carichi di rottura in flessione è ininfluenza la stabilizzazione condotta con placca e viti bicorticali (596 N ± 142) rispetto alle unicorticali (541 N ± 171) con una rigidità di 458 N ± 158 e 333 N ± 152 rispettivamente.

Maruyama et Al. <sup>36</sup> hanno dimostrato in laboratorio che utilizzando chiodi endomidollari riassorbibili (acido poliglicolico) risultano avere il 61% della rigidità ottenibili con i classici fili di K. Tuttavia a 4 settimane dall'impianto la stabilità dell'impianto con fili riassorbibili è tale da rendere precaria la stabilità complessiva dell'impianto e tale da richiedere una stabilizzazione con sistemi esterni.

Secondo Bozic et Al. <sup>37</sup> la stabilità dei metacarpi dopo frattura traversa e stabilizzata con placca e viti riassorbibili (ac. Poliglicolico) risulta efficace per 8 settimane, comunque ed ovviamente più debole rispetto alla placca e viti in titanio, specie alla rottura in flessione.

A nostra conoscenza non sono stati pubblicati studi biomeccanici sulle forze di rottura di sistemi complessi (osso metacarpale - biomateriale) stabilizzati. Non è pertanto possibile al momento attuale esprimere giudizi sul comportamento meccanico di questo tipo di sistemi.

#### **4.4 Background all'uso della microchirurgia per i biomateriali**

Da quando Ueba e Fujikawa <sup>38</sup> nel 1973 hanno eseguito il primo trapianto di perone vascolarizzato, i trapianti ossei microchirurgici sono incrementati sia in senso numerico che in senso di branche chirurgiche che necessitavano della microchirurgia. Dall'altro lato l'ingegneria tissutale in campo ortopedico ha compiuto parimenti passi in avanti. Come Laurencin <sup>39</sup> ha ben delineato perché l'osso nativo possa crescere ed espandersi all'interno dei biomateriali, questi devono possedere determinate caratteristiche di superficie e strutturali, migliorate dall'utilizzo dei fattori di crescita e delle cellule staminali multipotenti. Lo sviluppo dei trapianti ossei vascolarizzati ha seguito un percorso estremamente complesso che qui riassumeremo per mostrare il rapido susseguirsi di tecniche ed indicazioni. Si può brevemente riassumere la storia di questa ricerca in tre capitoli fondamentali: il substrato anatomico, le condizioni di dissezione-alloggiamento dell'innesto, l'ampliamento delle indicazioni. Tralascieremo in questa sezione tutte le discipline che vedono l'osso come substrato anatomico per concentrarci sull'uso specifico relativo alla mano.

#### **4.5 Il substrato anatomico**

Molti autori hanno indagato le basi anatomiche per l'utilizzo di innesti ossei vascolarizzati sia a livello delle ossa carpali <sup>40,41</sup> che in particolare delle ossa metacarpali <sup>42,43,44</sup>. Attualmente dagli stessi autori si può concludere che sia a livello delle ossa carpali, che del radio distale e delle ossa metacarpali sono disponibili un ampio numero di peduncoli A-V per realizzare interventi microchirurgici.

#### **4.6 L'ampliamento delle indicazioni**

L'utilizzo di innesti ossei vascolarizzati (principalmente del perone) ha visto un continuo espandersi dell'indicazione. Molti autori <sup>45,46,47</sup> hanno sistematicamente analizzato vantaggi, limiti ed controindicazioni all'utilizzo degli innesti vascolarizzati nell'arto superiore ed in particolare per le estremità. Dagli stessi autori si evince come l'utilizzo del perone vascolarizzato o di tecniche che prevedano l'utilizzo di peduncoli possa attualmente considerarsi come routinaria.

#### **4.7 Le condizioni di allestimento**

Probabilmente rappresenta il percorso più affascinante della storia degli innesti vascolarizzati. Potendosi definire trentennale la storia degli innesti vascolarizzati, un grande numero di esperimenti sulla preparazione, condizionamento, valutazione delle condizioni critiche e delle possibilità è stata eseguita nei passati anni sul modello animale. Bray et Al. <sup>48</sup> hanno valutato con esito positivo la possibilità di eseguire trapianti vascolarizzati con cartilagini in accrescimento; Hopper et Al. <sup>49</sup> hanno dimostrato l'importanza di un terreno ospite di adeguata qualità per un'ottimale integrazione degli innesti; Taguci <sup>50</sup> ha valutato la possibilità di riutilizzare innesti autologhi previa sterilizzazione in autoclave con peduncolo vascolare; Janowski e Siegert <sup>51,52</sup> hanno valutato gli effetti della trombosi venosa ed arteriosa rispettivamente sull'integrazione degli innesti. Leunig, Kamuta e Moore <sup>53,54,55</sup> hanno valutato il comportamento biologico degli innesti vascolarizzati eterologhi ed omologhi. Musharafieh et Al. <sup>56</sup> hanno dimostrato la possibilità di eseguire distrazione sugli innesti vascolarizzati per ottenere l'allungamento osseo. Il logico passaggio successivo (contemporaneo all'avanzamento della preparazione dei biomateriali), è risultato dalla combinazione prevalentemente in modello animale di tecniche microchirurgiche con l'utilizzo dei biomateriali. La letteratura in tal senso

risulta particolarmente prolifica. Gill et Al.<sup>57</sup> e successivamente Busa et Al.<sup>58</sup> hanno positivamente combinato con tecniche differenti anastomosi microchirurgiche ed osso autologo. Celik et Al.<sup>59</sup> nel 2000 hanno successivamente costruito un peduncolo del neoinnesto per un trasferimento locale in difetto osseo critico, con risultato istologico confortante. Mizumoto et al.<sup>60,61</sup> hanno valutato positivamente la combinazione di innesti vascolari all'interno di camere di Polietilene e di idrossiapatite (HA) combinata con demineralized bone matrix (DMB) e cellule midollari. Alla stessa conclusione sono più recentemente giunti Terheyden e Kawamura<sup>62,63,64</sup> che hanno valutato positivamente la combinazione del di OP1 (Osteogenic protein 1), osso eterologo ed anastomosi microchirurgiche. L'effetto degli innesti ossei vascolarizzati trasposti su modello locale di osteonecrosi ha prodotto secondo Gonzalez del Pino e Uchida<sup>65,66</sup> risultati assai promettenti. Ovviamente la letteratura<sup>67,68</sup> si è spinta alla ricerca e costruzione di tessuti più complessi e tradizionalmente di difficile crescita come il tessuto cartilagineo. Recentemente Heliotis et Al.<sup>69</sup> hanno tentato la costruzione di un impianto vascolarizzato su uomo, fallito successivamente per complicanze settiche. Il comportamento biologico degli innesti vascolarizzati e in generale degli autotrapianti ossei rivascolarizzati è stato oggetto di notevoli e numerosi studi, sia passati<sup>70,71,72,73,74</sup> che recenti<sup>75</sup> e tranne un autore<sup>76</sup>, concordano in generale nel definire l'utilizzo combinato di un innesto vascolare autologo microchirurgico su innesto osseo (autologo od omologo, o biomateriale) come metodiche di riferimento per la cura di patologie come le necrosi, le pseudoartrosi, l'osteomielite e le perdite di sostanza ossea. E' intuitivo che l'utilizzo sopra esposto di biomateriali già disponibili e validati in commercio, abbatterebbe la notevole morbilità del sito donatore<sup>77</sup> ottimizzando la cura di patologie scheletriche complesse come l'osteomielite, i difetti ossei, le pseudoartrosi e le necrosi asettiche.

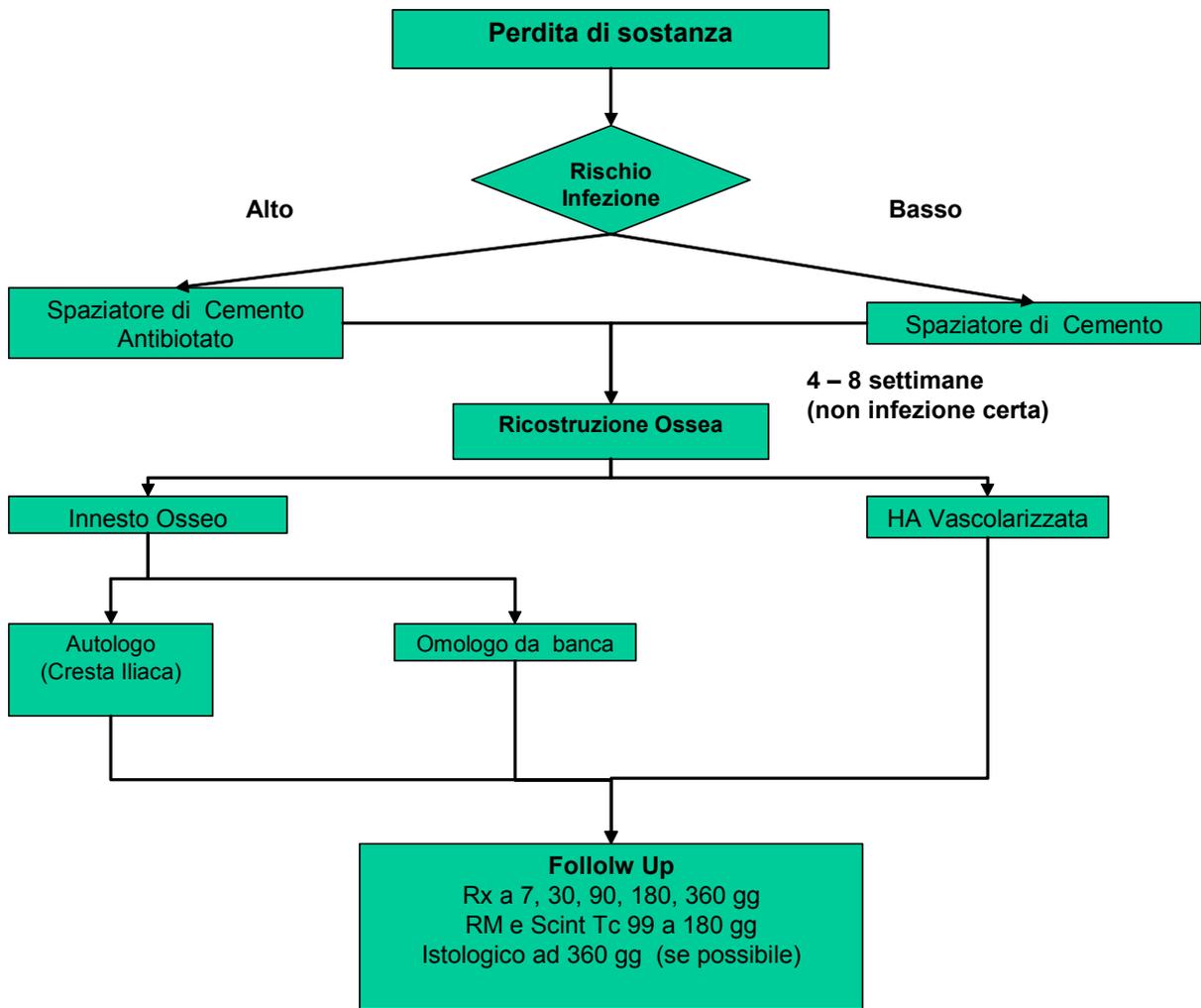
#### **4.8 Flow-Chart Diagnostica-Terapeutica**

Il protocollo diagnostico (fig 24) prevede la valutazione Radiografica Standard (proiezioni Antero-Posteriore e Latero-Laterale) del segmento scheletrico interessato e l'approccio clinico per la quantificazione del gap osseo da ricostruire ed il possibile rischio infettivo. Qualora quest'ultimo fosse significativamente alto sono previste valutazioni sierologiche (VES, PcR, emocromo con formula) e la Scintigrafia con Leucociti marcati. Ove necessario potrà essere eseguito prelievo intraoperatorio per esame colturale ed istologico al fine di accertare infezioni subacute.

Seguendo la tecnica di Pelissier et Al.<sup>78</sup> il gap osseo postraumatico verrà inizialmente colmato con spaziatore in cemento (eventualmente implementato con antibiotico, in caso di infezione certa o rischio infettivo alto). Ad una distanza di 4-8

settimane, dopo l'avvenuta formazione della membrana di contenimento dello spaziatore, ricca di citochine proangiogenetiche <sup>78</sup>, il paziente viene guidato verso la ricostruzione della perdita scheletrica. Per una migliore ricostruzione, nei casi di difficile quantizzazione del gap osseo, il paziente potrà eseguire una TC comparativa del MTC controlaterale (od altro segmento scheletrico) in base alla quale verrà richiesto alla ditta fornitrice del biomateriale di modellare il neometacarpo. Potrà rendersi necessaria l'esecuzione di ECOdoppler preoperatoria per la valutazione degli assi vascolari da utilizzare come asse vascolare per il biomateriale. Rimandiamo al paragrafo successivo l'analisi della tecnica chirurgica di allestimento ed inserimento del biomateriale. La randomizzazione dello studio verrà eseguita con l'innesto di osso autologo da cresta iliaca e con l'innesto omologo da donatore, seguendo sempre la stessa metodica chirurgica e microchirurgica.

E' prevedibile pensare che per raggiungere un numero sufficiente di pazienti per lo studio finale sia necessario introdurre in ciascun gruppo un numero minimo di 6 e massimo di 10 pazienti (vedasi algoritmo). I pazienti saranno seguiti in controlli ambulatoriali successivi dedicati con Rx (7, 30, 90 e 180 gg), RMN (180 gg) e scintigrafia con TC-99 (180 gg). La rimozione dei mezzi di sintesi verrà programmata in base all'andamento clinico-radiografico dell'impianto, al tipo di mezzo di sintesi utilizzato e alle dimensioni del gap osseo; è prevedibile che placche e viti possano essere rimosse a 12-18 mesi dall'impianto; fili di Kirshener e Fissatori esterni a 30-60 gg dall'impianto. In occasione della rimozione dei MDS saranno eseguiti sui materiali impiantati biopsia con ago fine e a valutazione istologica.



**Fig 24:** Viene mostrato l'algoritmo diagnostico e terapeutico dello studio

## 4.9 Criteri di inclusione ed esclusione dei pazienti

### 4.9.1 *Inclusione*

- 1) Lesioni scheletriche con perdita di sostanza ossea diafisaria inferiore ai 40 mm.
- 2) Lesioni scheletriche con perdita di sostanza ossea superiore al difetto critico minimo, ovvero 15 mm.
- 3) Età pazienti compresa tra i 18 e i 55 aa
- 4) Evento traumatico acuto o cronico;
- 5) Asse vascolare dorsale (o alternativo) utilizzabile per rivascolarizzazione/vascolarizzazione dell'impianto

### 4.9.2 *Esclusione*

- 1) Lesioni scheletriche con interessamento delle epifisi;
- 2) Perdita di sostanza superiore ai 40 mm;
- 3) Perdita di sostanza inferiore ai 15 mm;
- 4) Non controllo dell'infezione e/o malattia di base
- 5) Età non inclusa nel precedente gruppo;
- 6) Asse vascolare non utilizzabile per impianto
- 7) Controindicazione dopo l'esecuzione dello screening preoperatorio
- 8) Sistemi di sintesi non adeguati
- 9) Pazienti con alterato metabolismo osseo, malattie metaboliche maggiori (Diabete, dislipidemia, difetti coagulazione, Immunocompromissione, ect...)
- 10) Lesioni complesse acute della mano o lesioni associate che richiedano altre procedure in urgenza
- 11) Controindicazioni anatomiche specifiche all'impianto (locali o generali)
- 12) Rifiuto del paziente all'arruolamento nello studio per motivazioni specifiche o generali
- 13) Malattie psichiche

## 4.10 **Tecnica Chirurgica**

Il paziente arruolato nello studio, dovrà essere sottoposto ad intervento ricostruttivo. La tecnica prevede un accesso dorsale secondo tecnica esposta in Hoppenfield<sup>79</sup>. Verrà preparato il sito recipiente sede del gap osseo e quindi alloggiato uno spaziatore di cemento antibiotato o in Tricalciofosfato (TCP) a seconda del rischio infettivo. A 4-6 settimane si procederà all'espianto dello spaziatore e a ricostruzione del difetto. In tal caso si procederà mediante

medesimo accesso chirurgico all'esposizione metacarpale. A seconda dell'inclusione del paziente nei vari gruppi, si procederà o al prelievo di cresta iliaca, o alla preparazione dell'innesto da banca o ad alloggiamento del biomateriale. In ciascuno dei precedenti sistemi dovrà essere presente o preparata la sede di alloggiamento dell'asse vascolare microchirurgico. Si procederà a sintesi con placca e viti degli impianti, qualora le condizioni specifiche non richiedano l'utilizzo di Fissatori esterni o fili di Kirschner. Si procederà quindi all'esposizione e alla preparazione microchirurgica dell'asse vascolare metacarpale dorsale (con o senza innesti venosi) con successivo alloggiamento all'interno dei diversi sistemi ricostruttivi (cresta iliaca, HA, Osso di banca). Verrà utilizzato per i biomateriali e per l'osso di banca un'aggiunta di gel di piastrine/cellule staminali. Dopo chiusura del campo operatorio, si procederà a posizionamento dell'arto operato in gesso/valva gessata a seconda del sistema di sintesi utilizzato.

## 4.11 Descrizione dei materiali utilizzati

### 4.11.1 Idrossiapatite di seconda generazione: Calcio-fosfato poroso (ENGIpore)

Caratteristiche generali ENGIpore:

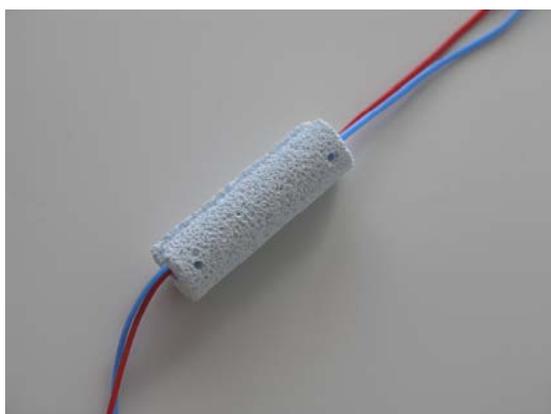
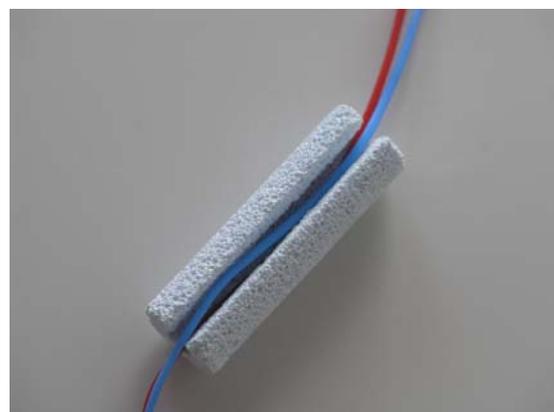
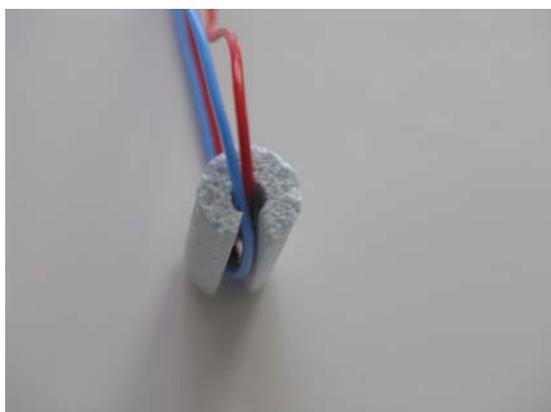
- Sostituto osseo a base di bioceramica mimetica;
- Porosità che raggiunge il 90% del suo volume con macropori in un range di 200-500 micron e pori di interconnessione nel range di 80-200 micron. Questa struttura macroporosa interconnessa e le caratteristiche morfologiche microstrutturali consentono di assorbire a tutto spessore le proteine bioattive e i fattori di crescita presenti nel coagulo e di rilasciarli progressivamente, generando una rapida vascolarizzazione e rendendo più efficace l'osteogenesi;
- Alta biocompatibilità: il prodotto è stato sottoposto ai test di genotossicità, carcinogenicità,
- Elevate proprietà osteoconduttive;
- Cinetica di osteointegrazione: 9-18 mesi;
- Stabilità e resistenza meccanica;
- Ottima adattabilità e lavorabilità del materiale;
- Alta superficie di contatto;
- Disponibile sia in blocchetti preformati rigidi, facilmente lavorabili con frese odontoiatriche, sia in scaglie da 0.5-1 mm;
- Confezione sterile, monouso. L = 5 -40 mm

Caratteristiche del Prodotto per l'uso Metacarpale (Fig 25, 26)

- Diametro Est = 13 mm
- Diametro Int = 4 mm
- Fori di stabilizzazione monocorticali
- Foro centrale eccentrico per massimizzare la resistenza meccanica
- Alloggio centrale a tutta lunghezza per l'inserimento del peduncolo vascolare



**Figg 25 a, 25 b.** Schematica visione del sistema di sostituzione scheletrica. Si notino i fori per la stabilizzazione alla placca, lo scasso a tutta lunghezza nel materiale, e la forma cilindrica del costruito



**Fig 26 a, b, c.** Rappresentazione schematica della Vascolarizzazione del materiale

#### **4.11.2 L'Osso Autologo**

Mediante incisione cutanea in corrispondenza della cresta iliaca anteriore, e con rispetto del ramo cutaneo sensitivo femorale, si accederà al piano scheletrico. Preferibilmente sono stati prelevati innesti ossei tricorticali in modo che l'innesto abbia la massima resistenza meccanica. Si rimanda alla letteratura già citata per la valutazione della morbidity del sito donatore<sup>77</sup>.

#### **4.11.3 L'Osso di Banca**

Gli innesti ossei provenienti da donatore cadavere vengono definiti omologhi. Una volta espantato, il prodotto viene lavato sterilmente in soluzione fisiologica antibiotata calda a circa 40°, quindi chiuso in una triplice confezione sotto vuoto e conservato a -80°. Se la lavorazione non è avvenuta in asepsi, la confezione viene sterilizzata con raggi gamma ad un dosaggio che non altera le caratteristiche fisiche e meccaniche dell'osso. Si rimanda all'apposita letteratura per la valutazione delle caratteristiche meccaniche degli innesti ossei da donatore<sup>80,81</sup>.

### **4.12 Casi Clinici**

Dal 2005 ad oggi sono stati trattati presso la S.C. di chirurgia della mano e Microchirurgia 2 pazienti mediante la tecnica di ricostruzione con innesto di cresta iliaca, 3 paziente con innesto di Idrossiapatite, 1 paziente mediante innesto da cadavere. Le difficoltà principali nell'individuare pazienti ed includerli nello studio sono principalmente stati legati alla ristrettezza dei criteri di inclusione ed alla recentissima approvazione da parte del comitato etico del protocollo di trattamento mediante vascolarizzazione microchirurgica. Vedasi Tab 4 per i dati clinici dei pazienti inclusi nello studio. Informazioni preziose sono state ricavate sulla forma finale dello scaffold di HA.

Paziente	Età	Sesso	Eziologia	Tipo innesto	Follow up	Guarigione
1	25	m	Trauma	HA	15 mesi	No
2	32	f	Trauma	HA	16 mesi	Si
3	36	m	Trauma	HA	12 mesi	Si
4	56	m	Trauma	Cadavere	2 mesi	Si
5	44	f	Neoformazione	Cresta Iliaca	8 mesi	Si
6	38	m	Trauma	Cresta Iliaca	6 mesi	Si

**Tab 4:** Tabella riassuntiva con i dati clinici dei pazienti trattati.

#### **4.12.1 Paziente n 1**

Paziente 25 aa, Operaio, Destrimane, in apparente buona salute (ABS).

Il 13-6-06 Incidente Stradale con frattura biossea avambraccio sx trattata in altra sede con riduzione e sintesi delle fratture con placca e viti. La frattura ulnare è successivamente evoluta in pseudoartrosi.

In data 13-7-07 la paziente eseguiva presso il reparto di Chirurgia della mano e microchirurgia trattamento di rimozione di MDS e nuova sintesi con placche e viti ed apposizione di innesto custom made di HA.

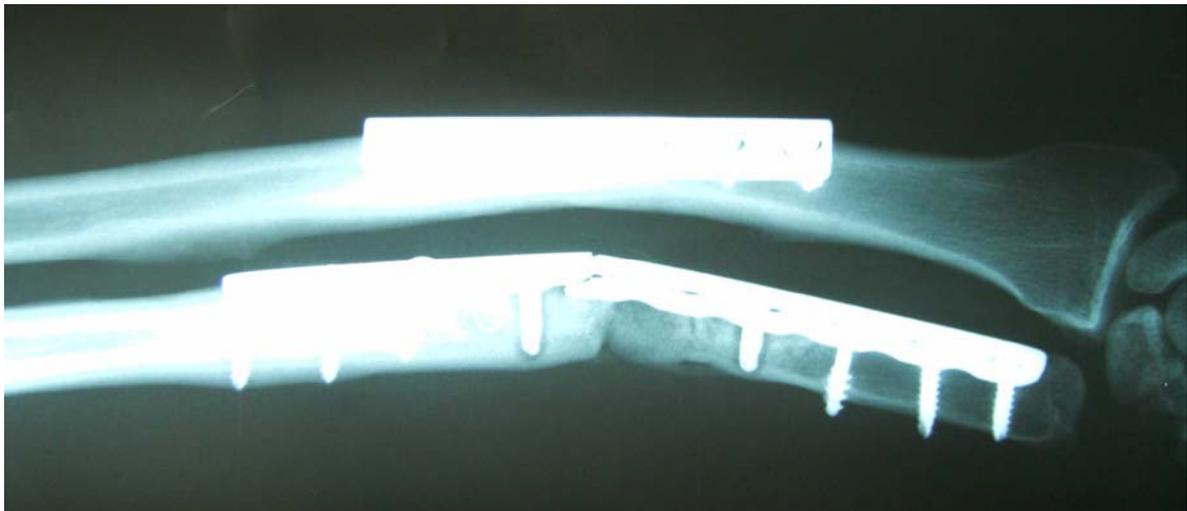
In data 1-1-08 si è reso necessario asportare i MDS, l'innesto di HA e eseguire nuova sintesi ulnare, con innesto da cadavere (stecca tibiale) stabilizzato con placca e viti ed applicazione di gel di piastrine.



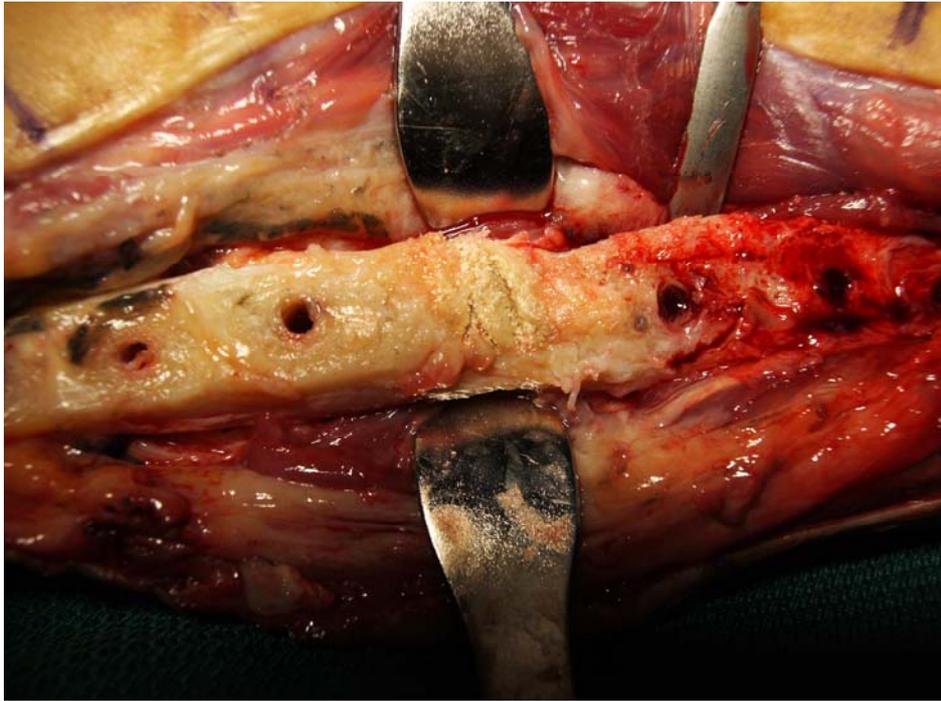
**Fig 27:** Quadro radiografico alla nostra osservazione, con pseudoartrosi dell'ulna.



**Fig 28** Quadro Rx a 3 mesi dall'intervento eseguito presso la nostra divisione, con apparente buona guarigione delle fratture e iniziale integrazione dell'innesto di HA.



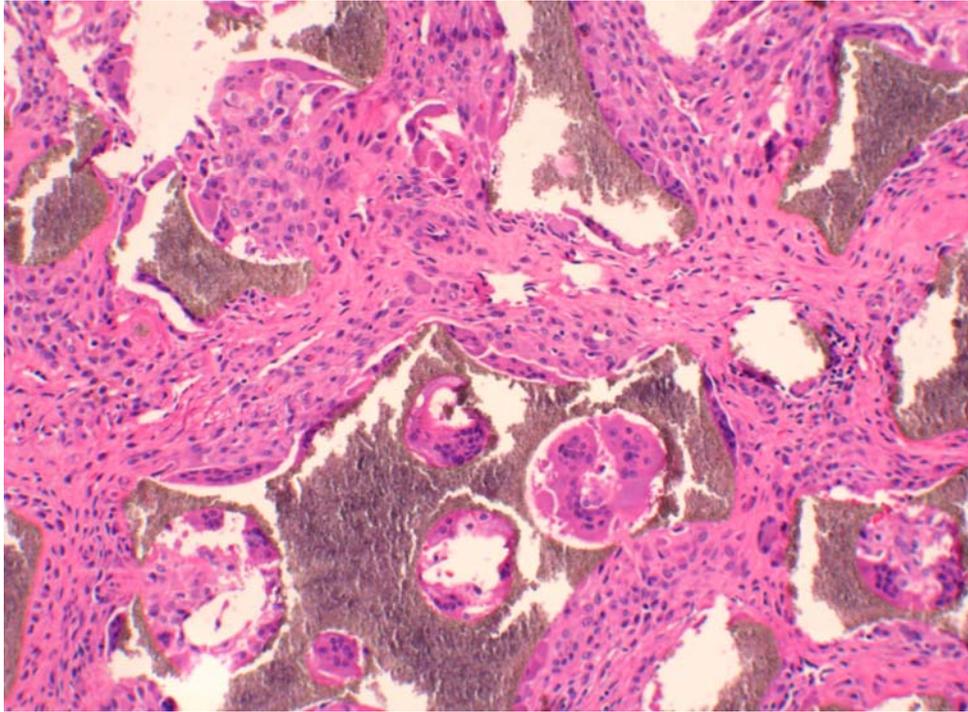
**Fig 29:** Rottura dei MDS con angolazione ulnare a 6 mesi dall'intervento.



**Fig 30:** Quadro intraoperatorio al terzo intervento, con evidenza del focolaio di pseudoartrosi, nonostante l'utilizzo di innesto HA



**Fig 31:** Sezione trasversale dell'innesto di HA. Notare il riempimento del canale midollare con l'innesto granulare di HA. Non evidenza di vascolarizzazione all'interno del canale midollare all'esame macroscopico.

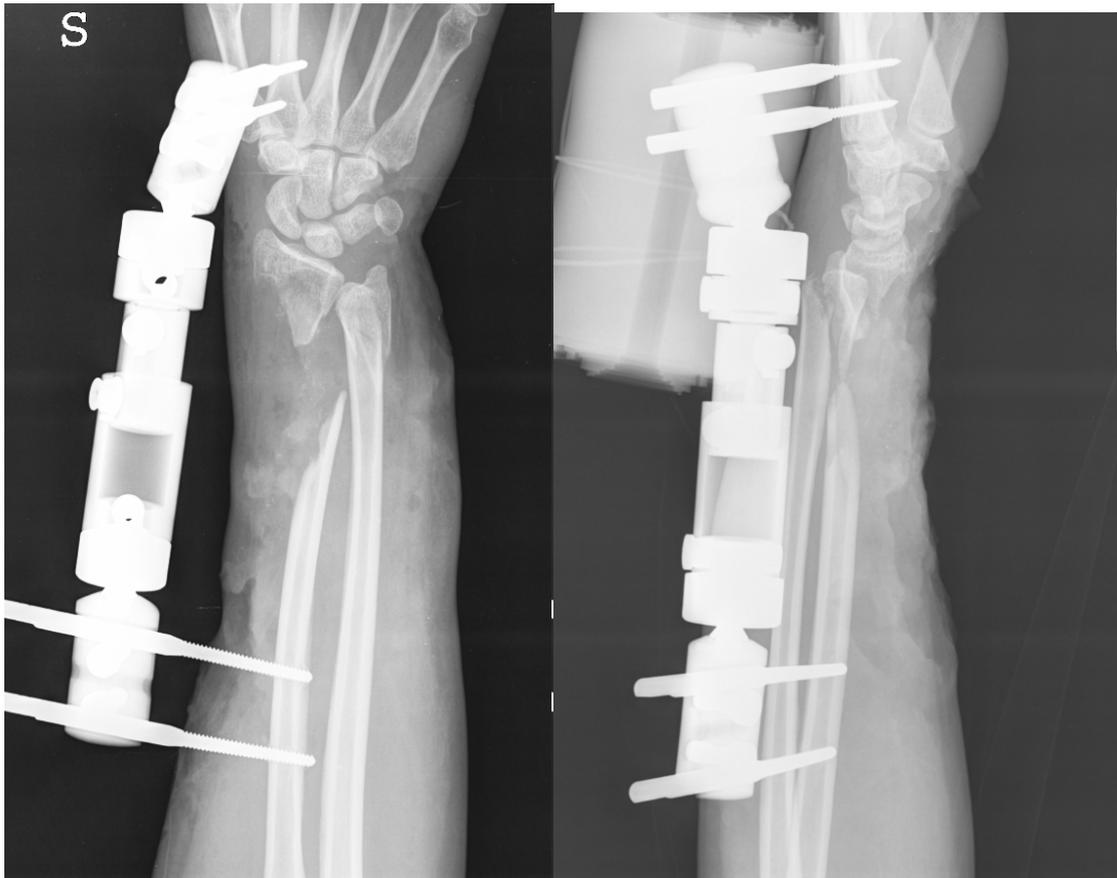


**Fig 32:** Valutazione Istologica dell'HA. Sono presenti cellule giganti reattive tipo reazione infiammatoria da corpo estraneo.

#### 4.12.2 Caso Clinico 2

Paz 32 aa Destrimane, Impiegata, In ABS.

A giugno 2006 Grave Incidente stradale con subamputazione avambraccio sx, ampia perdita di sostanza dei tessuti molli. Veniva trattata presso la S.C: di Chirurgia della mano e microchirurgia con intervento di stabilizzazione temporanea con FE, tenoraffie e debridment della ferita.



**Fig 33** Quadro Rx intraoperatorio dopo stabilizzazione con FE articolato.



**Fig 34:** Quadro Rx a 6 mesi di distanza dall'intervento di Rimozione del FE, innesto custom made di HA, e stabilizzazione con placca e viti. Si noti la buona integrazione dell'innesto di HA.



**Fig 35** : Quadro Rx a 12 mesi dall'intervento. Si notino i segni di integrazione radiografica tra l'innesto di HA ed il radio prossimale.



**Fig 36:** Scintigrafia con TC 99 n fase tardiva. Si noti l'ipercaptazione scintigrafica del radionucleotide, indice di un elevato metabolismo osseo.



**Figg 37 a, b:** Ottimo quadro clinico a 16 mesi dall'intervento. Sono tuttavia presenti con limitazione della flessione ma non della pronosupinazione (non mostrata).

### 4.12.3 Caso Clinico 3

Paz. 36 aa destrimane, disoccupato in ABS.

Il 20-2 2007 Grave Incidente stradale con coma (30 gg), lacerazione renale ed epatica e grave trauma con perdita di sostanza scheletrica al radio distale sx. Veniva trattato in urgenza con intervento di nefrectomia, sutura lesioni epatiche ed applicazione di FE articolato Hoffmann. A miglioramento delle condizioni cliniche locali, il 27-3-07 veniva trattato con intervento di di rimozione del FE, applicazione di Innesto di HA e stabilizzazione con placca e viti.



**Fig. 38:** Rx AP e LL che evidenziano il gap radiale al momento del trattamento in urgenza.



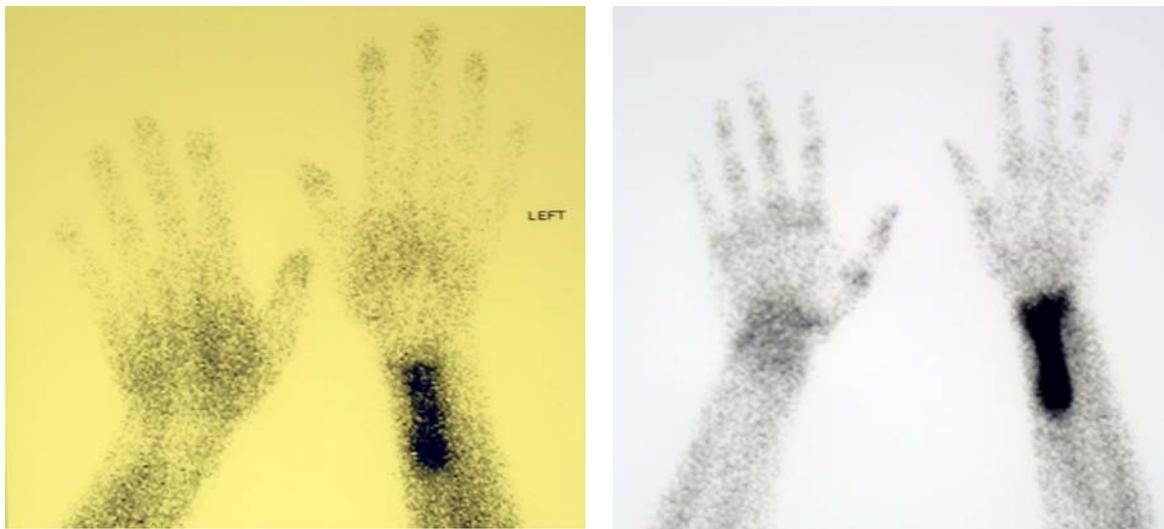
**Fig 39.** Quadro Rx a 3 mesi di distanza dall'intervento ricostruttivo. Si notino le sedi di inserimento dell'innesto di HA ancora evidenti, con iniziali segni di integrazione.



**Fig 40.** Quadro Rx a 9 mesi di distanza dall'intervento ricostruttivo. Si notino le sedi di inserimento dell'innesto di HA ormai non più evidenti.



**Fig 41.** Quadro Rx a 12 mesi di distanza dall'intervento ricostruttivo. Completa integrazione dell'innesto.



**Fig 42 a, 42 b.** Scintigrafia con TC 99. Si notino l'intensa captazione sia in fase precoce a, che in fase tardiva b, del radiocomposto.



**Fig 43.** Quadro clinico a 12 mesi dall'intervento. Deficit della supinazione e della flessione del polso. Buona la funzione di presa (Jamar e Pinch test). Dati non mostrati.

## 5 CONCLUSIONI

L'affacciarsi dei biomateriali in campo biomedico sta rapidamente mutando le indicazioni chirurgiche. La possibilità di ridurre la morbidità del sito donatore, l'ottenere adeguate quantità e qualità di sostituti biologici, sagomabili in fase preoperatoria rappresentano tutti indiscutibili vantaggi dell'utilizzo dei biomateriali. La relativa carenza di letteratura "applicativa", le rigide normative in campo di ingegneria tissutale, le problematiche etiche e medico-legali correlate all'utilizzo di queste metodiche rappresentano le principali limitazioni. Da una semplice ricerca Medline con le parole chiave "Biomaterials", appaiono 53023 voci, che si riducono a 2019 se nei limiti si introducono le parole "Clinical Trial & Humans". Tale numero si riduce a 26 se ci si limita all'ortopedia. Ovvero in letteratura si riscontra un'estrema povertà di applicazioni cliniche.

Le principali problematiche/limitazioni riscontrate in ambito ortopedico/osseo all'utilizzo dei sostituti scheletrici sono legate:

1. Alla fragilità primaria dei biomateriali o secondaria all'interazione osso/biomateriale/sistema di sintesi.
2. Alla difficile prevedibilità della cinetica di integrazione/riassorbimento del biomateriale in modello umano.
3. Alla reazione tissutale/tossicità locale indotta dall'introduzione del biomateriale.
4. Alle scarse conoscenze di ciò che è strettamente indispensabile dal punto di vista biologico per l'integrazione del biosostituto (recettori, apporto vascolare, sistema neurologico, etc).

Una delle problematiche specifiche oggetto della presente tesi è stato l'indagare le possibilità offerte dall'introduzione di un asse vascolare microchirurgico all'interno di un sostituto osseo. In molte patologie l'assenza di apporto vascolare costituisce una delle cause del mantenimento della patologia stessa (Es. Osteomielite, Pseudoartrosi) o addirittura il fattore scatenante (Necrosi asettica). E' logico supporre che l'introduzione di un biomateriale non dotato di vascolarizzazione autonoma possa in qualche modo almeno ritardare la progressione dell'integrazione. L'ottenere quindi un biomateriale dotato di un asse vascolare autonomo può almeno idealmente costituire un ausilio terapeutico per le dette patologie e costituire un sistema a massimali capacità di integrazione.

In campo di chirurgia dell'arto superiore, la povertà della bibliografia clinica applicativa dei biosostituti ossei è particolarmente imponente. E' logico pensare che il chirurgo prima di introdurre una soluzione alternativa a soluzioni classiche, come l'innesto di cresta iliaca, debba attentamente vagliare e soppesare il rapporto rischio/beneficio.

Lo studio presente è stato strutturato su tre livelli di complessità differente, proprio per ovviare a possibili errori e per dare le certezze necessarie all'uso clinico. La fase bibliografica è stata utilizzata per vagliare/scegliere la rosa di potenziali biomateriali disponibili in commercio ed adattabili per la costruzione di uno scaffold vascolarizzato.

La fase laboratoristica è stata utilizzata per valutare la citotossicità del biomateriale, i rapporti tra componente minerale ed organica (ovvero della problematica stabilità / induzione della crescita osteoblastica).

Individuate le caratteristiche idonee del biomateriale la fase clinica si è occupata di introdurre il biomateriale in un sistema interattivo e dinamico come il corpo umano.

La recente approvazione da parte del comitato etico dell'utilizzo del carrier vascolarizzato ha ridotto le possibilità di includere un numero di pazienti sufficiente a trarre delle conclusioni di rilevanza statistica. Lo studio alla fase attuale di pubblicazione si è limitato a valutare l'utilizzo dell'idrossiapatite in campo di chirurgia della mano. In tale settore non sono disponibili studi clinici in grado di validare il sistema, ovvero studi che permettano di passare direttamente all'utilizzo di carrier vascolarizzati così come progettati.

Le informazioni cliniche, seppur limitate, che abbiamo raccolto indicano che l'idrossiapatite come biomateriale per la sostituzione di gap ossei nell'arto superiore ed in particolare per le estremità, rappresenta un materiale promettente. Delle 3 fratture trattate con innesti lunghi di idrossiapatite, 2 hanno ottenuto una buona guarigione mentre una è evoluta in pseudoartrosi. Dagli esami istologici effettuati nel paziente con pseudoartrosi, l'idrossiapatite si è rivelata un materiale tutt'altro che inerte. Va rilevato dal punto di vista clinico che in nessun paziente si è riscontrato dolore locale, compreso il paziente con pseudoartrosi. In definitiva quindi nella cascata di eventi che hanno portato al riassorbimento del materiale non sono state generate citochine infiammatorie responsabili del dolore. La reazione gigantocellulare riscontrata indica sicuramente una reazione infiammatoria cronica, con lento riassorbimento del materiale.

Nel caso della pseudoartrosi, il chirurgo aveva utilizzato l'idrossiapatite anche in forma granulare, come riempitivo dei canali midollari prossimali e distali all'inserzione del biosostituto cilindrico. Questo gesto chirurgico ha probabilmente costituito un ostacolo al ripristino della vascolarizzazione endomidollare. Le scintigrafie scheletriche eseguite nei pazienti con prognosi favorevole hanno mostrato un'iper captazione intensa del TC 99 in fase tardiva e precoce. Tali dati depongono per una buona vascolarizzazione del biomateriale e per la presenza di un elevato rimaneggiamento osseo in presenza del biomateriale. In nessun caso si è avuta rottura od infezione del biomateriale utilizzato, ad indicare un'utilità del biomateriale per la chirurgia ricostruttiva delle estremità dell'arto superiore.

Dai dati disponibili (studi in corso ed attualmente non pubblicati) pertanto abbiamo ricavato i seguenti spunti, per la costruzione del carrier vascolarizzato definitivo:

- 1) Favorevole effetto sull'integrazione osso-biomateriale di cellule staminali mesenchimali – gel piastrinico all'atto dell'impianto. Da valutare la possibilità/utilità di coculture di cellule endoteliali/osteoblasti/ su un medesimo supporto, almeno in fase laboratoristica.
- 2) Introduzione di un asse vascolare microchirurgico con maggiorata diffusione di nutrienti per le cellule residenti introdotte o reclutate e per il mantenimento della vascolarizzazione endomidollare.
- 3) Costruzione di un sistema di sintesi ad hoc che garantisca la stabilità osso-biomateriale evitando fratture di un materiale comunque fragile.

E' intuitivo pensare che i prossimi mesi, in cui gli sforzi generati dalle descritte fasi preliminari si tradurranno in dispositivi concreti ed in un ampliamento numerico della casistica, si potrà raggiungere la forza statistica necessaria per ottenere certezze scientifiche. Potremo pertanto sicuramente raggiungere, se non la soluzione, almeno agli spunti necessari per far progredire una disciplina così affascinante, come la chirurgia della mano.

## 6 BIBLIOGRAFIA

1. Vacanti CA, Mikos AG eds. Tissue Engineering. Larchmont (NY), Mary Ann Liebert Inc. 1995.
2. Lumelsky NL. Commentary: Engineering of Tissue Healing and Regeneration. Tissue Engineering 2007; 13: 1393-98.
3. Freed LE, Guilak F, Guo XE, Gray ML, Tranquillo R, Holmes JW, Radisic M, Sefton MV, Kaplan D, Vunjak-Novakovic G. Advanced Tools for Tissue Engineering: Scaffolds, Bioreactors, and Signaling. Tissue Engineering 2006; 12: 3285-305.
4. Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. Biomaterials 2000; 21: 2529-2543.
5. Burg KJL, Porter S, Kellam JF. Biomaterial development for bone tissue engineering. Biomaterials 2000; 21: 2347-2359.
6. Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG. Engineering Principles of Clinical Call-Based Tissue Engineering. J Bone Joint Surg 2004; 86-A: 1541-58.
7. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R Et Al Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. N Engl J Med. 2001 Feb 1;344(5):385-6.
8. Chao PH, Grayson W, Vunjak-Novakovic G. Engineering cartilage and bone using human mesenchymal stem cells. J Orthop Sci. 2007 Jul;12(4):398-404. Epub 2007 Aug 2.
9. Mikos AG, Herring SW, Ochareon P, Elisseeff J et Al Engineering complex tissues. Tissue Eng. 2006 Dec;12(12):3307-39.
10. Lee EH, Hui JH. The potential of stem cells in orthopaedic surgery. J Bone Joint Surg Br. 2006 Jul;88(7):841-51.
11. Pountos I, Jones E, Tzioupis C, McGonagle D Et Al Growing bone and cartilage. The role of mesenchymal stem cells. J Bone Joint Surg Br. 2006 Apr;88(4):421-6.

12. Krampera M, Pizzolo G, Aprili G, Franchini M. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. *Bone*. 2006 Oct;39(4):678-83. Epub 2006 Jun 12.
13. Murphy JM, Fink DJ, Hunziker EB, Barry FP. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2003 Dec;48(12):3464-74.
14. Adachi N, Ochi M, Deie M, Ito Y. Transplant of mesenchymal stem cells and hydroxyapatite ceramics to treat severe osteochondral damage after septic arthritis of the knee. *J Rheumatol*. 2005 Aug;32(8):1615-8.
15. Im GI, Shin YW, Lee KB. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage*. 2005
16. Hannouche D, Terai H, Fuchs JR, et Al Engineering of implantable cartilaginous structures from bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng*. 2007 Jan;13(1):87-99.
17. Munirah S, Samsudin OC, Chen HC, Salmah SH et Al. Articular cartilage restoration in load-bearing osteochondral defects by implantation of autologous chondrocyte-fibrin constructs: an experimental study in sheep. *J Bone Joint Surg Br*. 2007 Aug;89(8):1099-109.
18. Afizah H, Yang Z, Hui JH, Ouyang HW, Lee EH. A comparison between the chondrogenic potential of human bone marrow stem cells (BMSCs) and adipose-derived stem cells (ADSCs) taken from the same donors. *Tissue Eng*. 2007 Apr;13(4):659-66.
19. Mochizuki T, Muneta T, Sakaguchi Y, Et Al Higher chondrogenic potential of fibrous synovium- and adipose synovium-derived cells compared with subcutaneous fat-derived cells: distinguishing properties of mesenchymal stem cells in humans. *Arthritis Rheum*. 2006 Mar;54(3):843-53.

20. Mikos AG, Herring SW, Ochareon P Et Al . Engineering complex tissues. *Tissue Eng.* 2006 Dec;12(12):3307-39.
21. Leskela HV, Risteli J, Niskanen S, Koivunen J, Ivaska KK, Lehenkari P. Osteoblast recruitment from stem cells does not decrease by age at late adulthood. *Biochem Biophys Res Comm* 2003, 311:1008-1013.
22. Kuznetsov SA, Krebsbach PH, Satomura K, Kerr J, Riminucci M, Benayahu D, Gheron Robey P. Single-Colony Derived Strains of Human Marrow Stromal Fibroblasts Form Bone After Transplantation In Vivo. *J Bone Joint Surg* 1997, 12: 1335-1347.
23. Declercq HA, Verbeeck RMH, De Ridder LIFJM, Schacht EH, Cornelissen MJ. Calcification as an indicator of osteoinductive capacity of biomaterials in osteoblastic cell cultures. *Biomaterials* 2005; 26: 4964-4974.
24. H.Y. Kweon, M.K. Yoo, I.K. Park, T.H. Kim, H.C. Lee, H.S. Lee, J.S. Oh, T. Akaike, C.S. Cho - A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering – *Biomaterials* 24 (2003) 801-808.
25. [D.W. Hutmacher - Scaffold design and fabrication technologies for tissue engineering – State of art and future perspectives – *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, Vol.12 pp. 107-124 (2001)]
26. Ilie V et Al. Assessment of the microsurgical skills: 30 minutes versus 2 weeks patency. *Microsurgery.* 2007; 27(5):451-4.
27. Chan WY et Al. Validation of microsurgical models in microsurgery training and competence: a review. *Microsurgery.* 2007; 27(5):494-9.
28. Lascar I et Al. Training program and learning curve in experimental microsurgery during the residency in plastic surgery. *Microsurgery.* 2000;20(1):22-4
29. Hui KC et Al Learning curve of microvascular venous anastomosis: a never ending struggle? *Microsurgery.* 2000.
30. Black D, Mann RJ, Constantine R et Al. Comparison of internal fixation technique in metacarpal fractures. *J Hand Surg (am)* 1985 Jul; 10(4):466-72.

31. Firoozbakhsh KK, Moneim MS, Howey T et Al comparative fatigue strength and stabilities of metacarpal internal fixation techniques. *J Hand Surgery (am)*. 1993 Nov; 18(6): 1059-68.
32. Firoozbakhsh KK, Moneim MS, Doherty W et Al. Internal fixation of oblique metacarpal fractures. A biomechanical evaluation by impact loading. *Clin Orthop* 1996 Apr; 325:296-301.
33. Prevel CD, Morgan R, Molnar J et Al. Biomechanical testing of titanium self-tapping versus pretapped lag screw fixation of spiral metacarpal fractures. *Ann Plast Surg* 1996 Jul; 37(1):34-40.
34. Prevel CD, McCarty M, KAtona T et Al. Comparative biomechanical stability of titanium bone fixation systems in metacarpal fractures. *Ann Plast Surg* 1995 Jul; 35(1):6-14.
35. Dona E, Gillies RM, Gianoutsou MP et Al. PLating metacarpal fractures: unicortical or bicortical screws? *J Hand Surg (Br)*. 2004 Jun;29(3):218-21.
36. Maruyama T, Saha S, Mangiano DO et Al. Metacarpal fracture fixation with absorbable polyglycolde rods and stainless steel K wires: a biomechanical comparison. *J biomed MAter Res* 1996 Spring; 33(1):9-12.
37. Bozic KJ, Perez LE, Wilson DR et Al. Mechanical testing of bioresorbable implants for use in metacarpal fracture fixation. *J Hand Surg (am)* 2001 Jul; 26(4):755-61.
38. The first description of the free vascularized bone transplant. Liu J, Kumar VP. *Plast Reconstr Surg* 1997 Jan; 99(1): 270-2.
39. Tissue Engineering of bone and ligament. Laurencin CT, Yusuf K, Kofron Y et Al. *Clin Orthop* 2006. 447 : 221-36.
40. Use of distal arteries for microsurgical reconstruction in forearm and hand surgery. Ge XZ, Huang GK. *Microsurgery*. 1996; 17 (4): 180-3.
41. Pedicle vascularized bone grafts for disorders of the carpus: scaphoid nonunion and Kienbock's disease. Shin AY, Bishop AT. *J Am Acad Orthop Surg* 2002 May-Jun; 10 (3):210-6.

42. The vascular blood supply of the second metacarpal bone: anatomic basis for a new vascularized bone graft in hand surgery. An anatomical study in cadavers. Pierer G, Steffen J, Hoflehner H. *Surg Radiol Anat.* 1992; 14(2):103-12.
43. The anatomic basis of the fourth dorsal metacarpal flap: a cadaveric dissection. Yoon TS, Carrera A, Benito-Ruiz et Al. *J Hand Surg (am).* 2006 May-Jun; 31(5):711-6.
44. First dorsal metacarpal artery flap in hand reconstruction. Sherif MM. *J Hand Surg(am)* 1994 Jan. 19(1):26-31.
45. Free vascularized fibular grafts for reconstruction of skeletal defects. Malizos KN, Zalavras CG, Soucacos PN et Al. *J Am Acad Orthop Surg* 2004 Sep-Oct; 12 (5):360-9.
46. Vascularized bone grafts to the upper extremity. Indications and technique. Gerwin M, Weiland AJ. *Hand Clin.* 1992 Aug; 8(3):509-23.
47. Free vascularized bone transplantation in the extremities. Eisenshenk A, Lautenback M, Rohlmann A. *Orthopade.* 1998 Jul; 27 (7):491-500.
48. Development and validation of a new model for microvascular transplantation of epiphyseal plate allografts with minimal adjoining epiphyseal and metaphyseal bone. Bray PW, Neligan PC, Bowen CV et AL. *Microsurgery.* 2003; 23 (2): 153-63.
49. Effect of isolation of periosteum and dura on the healing of rabbit calvarial inlay bone grafts. Hopper RA, Zhang JR, Fourasier VL et Al. *Plast Reconstr Surg.* 2001 Feb; 107 (2):454-62.
50. Autoclaved autograft bone combined with vascularized bone and bone marrow. Taguchi Y, Pereira BP, Kour AK et Al. *Clin Orthop Rel Res.* 1995 Nov ; (320) :220-30.
51. The effect of venous occlusion on the integration of vascularized cortical bone graft. Janowski EM, Mazer N, Barbieri CH et Al. *J reconstr Microsurg.* 1993 May;9(3):219-25.
52. Thrombosed vascularized bone graft:viabilità compared with a conventional bone graft. Siegert JJ, Wood MB. *J reconstr Microsurg.* 1987 Jan; 3(2):99-103.

53. Quantitative assessment of angiogenesis and osteogenesis after transplantation of bone: comparison of isograft and allograft bone in mice. Leunig M, Demhartner TJ, Sckell A et Al. *Acta Orthop Scand*. 1999 Aug; 70(4):384-80.
54. Revascularization of bone allografts following vascular bundle implantation : an experimental study in rats. Kamuta S, Yip K, Roy N et Al. *Arch Orthop Trauma Surg*. 1996;115(3-4):206-10.
55. Allogenic transplants of bone revascularized by microvascular anastomoses: a preliminary study. Moore JR, Philipps TW, Weiland AJ et Al. *J orthop Res*. 1984; 1(4):352-60.
56. Microvascular soft-tissue coverage and distraction osteosynthesis for lower-extremity salvage. Musharafieh RS, Saghieh SS, Nassar H et Al. *Microsurgery*. 1996; 17 (12): 666-73.
57. The prefabrication of a bone graft in a rat model. Gill DR, Ireland DC, Hurley JV et Al. *J Hand Surg (am)*. 1998 Mar; 23(2):312-21.
58. Neovascularized bone Grafts: Experimental investigation. Busa R, Adani R, Castagnetti C et Al. *Microsurgery*. 1999; 19(6): 289-95.
59. Histologic analysis of prefabricated, vascularized bone grafts: an experimental study in rabbits. Celik M, Tuncer S, Emekli U et Al. *J Oral Maxillofac. Surg*. 2000 Mar;58(3):292-5.
60. Pre-formed vascularized bone grafts using polyethylene chambers. Mizumoto S, Inada Y, Weiland AJ. *J reconstr Microsurg*. 1992 Jul; 8(4):325-33.
61. Fabrication of vascularized bone grafts using ceramic chambers. Mizumoto S, Inada Y, Weiland AJ. *J reconstr Microsurg*. 1993 Nov; 9(6):441-9.
62. Mandibular reconstruction with a prefabricated vascularized bone graft using recombinant human osteogenic protein-1:an experimental study in miniature pigs. Part I: Prefabrication. Terheyden H, Knak C, Jepsen S et Al. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2001 Oct; 30(5):373-9.
63. Mandibular reconstruction with a prefabricated vascularized bone graft using recombinant human osteogenic protein-1:an experimental

- study in miniature pigs. Part II. Terheyden H, Warnke P, Dunasche A et Al. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2001 Dec; 30(6):469-78.
64. Experimental study of vascularized tissue-engineered bone grafts. Kawamura K, Yajima H, Ohgushi H et Al. *Plast Reconstr Surg*. 2006 Apr 15; 117 (5):1471-9.
65. Role of free vascularized bone grafts in the experimentally-induced ischemic necrosis of the femoral head. Gonzalez del Pino J, Gomez Castesana F, Benito M et Al. *J reconstr Microsurg*. 1990 Apr; 6(2):151-9.
66. Effects of vascularized bone graft on surrounding necrotic bone: an experimental study. Uchida Y, Sugioka Y. *J Reconstr Microsurg*. 1990 Apr;6(2):101-7.
67. Flap prefabrication and prelamination with tissue-engineered cartilage. Staudenmaier R, Hoang TN, Kleinsasser N et Al. *J reconstr Surg*. 2004 Oct;20(7):555-64.
68. Tissue-engineered cartilage in a prefabricated microvascular flap. Staudenmaier R, Miehle N, Kleinsasser N et Al. *HNO*. 2004 Jun;52(6):510-7.
69. Transformation of a prefabricated Hydroxyapatite/Osteogenic protein 1 implant into a vascularized pedicle bone flap in the human chest. Heliotis M, Lavery KM, Ripamonti U et Al. *Int J maxillofac Surg* 2006 Mar; 35(3):265-9.
70. Bone Scintigraphy of experimental composite bone grafts revascularized by microvascular anastomoses. Bos KE. *Plast Reconstr Surg*. 1979 Sep; 64(3):353-60.
71. Vascularization, cellular behavior, and union of vascularized bone grafts: experimental study in the rabbit. Teissier J, Bonnel F, Allieu Y. *Ann Plast Surg*. 1985 Jun;14(6):494-505.
72. The growth of vascularized onlay bone transfers. La trenta GS, McCarthy JG, Cutting CB. *Ann Plast Surg*. 1987 Jun;18(6):511-6.
73. A comparison of vascularized and nonvascularized bone transfer in rabbits: a roentgenographic, scintigraphic and histologic evaluation.

- Brunelli G, Guizzi PA, Battiston B et Al. J reconstr Microsurg. 1987 Jul; 3(4):301-7.
74. Blood flow evaluation of vascularized bone transfer in a canine model. Siegert JJ, Wood MB. J Orthop Res. 1990 Mar; 8(2):291-6.
75. Long term remodeling of vascularized and nonvascularized onlay bone grafts: a macroscopic and microscopic analysis. Gosain AK, Song L, Santoro TD et AL. Plast Reconstr Surg. 1999 Apr; 103(5):1443-50.
76. Growth and survival of vascularized and nonvascularized membranous bone: an experimental study. Bartlett SP, Whitaker LA. Plast reconstr Surg. 1989 Nov; 84(5):783-8.
77. Comparison of anterior and posterior iliac crest bone grafts in terms of harvest-site morbidity and functional outcomes. Ahlmann E, Patzakis M, Roidis N et Al. J Bone Joint Surg Am. 2002 May;84-A(5):716-20.
78. Induced membranes secrete growth factors including vascular and osteoinductive factors and could stimulate bone regeneration. Pelissier P, Masquelet AC, Bareille R et Al. J Orthop Res. 2004 Jan;22(1):73-9
79. Vie d'accesso in ortopedia. Hoppenfield. Verducci Editore. Roma. 1999.
80. Massive bone allograft reconstruction in high-grade osteosarcoma. Donati D, Di Liddo M, Zavatta M et Al. Clin. Orthop Relat Res. 2000 Aug;(377):186-94.
81. A histomorphologic study of explants of massive allografts: preliminary results. Caldrea P, Donati D, Capanna R. Chir Organi Mov. 1995 Apr-Jun;80(2):191-205.