

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE FARMACOLOGICHE, TOSSICOLOGICHE, DELLO
SVILUPPO E DEL MOVIMENTO UMANO**

Ciclo 32°

Settore Concorsuale: 06/F4

Settore Scientifico Disciplinare: MED/33

**TRATTAMENTO DELLE LESIONI OSTEOCONDRALE DEL
GINOCCHIO CON UN INNOVATIVO SCAFFOLD DI ARAGONITE:
RISULTATI DI UNO STUDIO PROSPETTICO A DUE ANNI DI
FOLLOW-UP**

Presentata da: Dr.ssa Francesca de Caro

Coordinatore Dottorato

Supervisore

Prof.ssa Patrizia Hrelia

Prof. Stefano Zaffagnini

Esame finale anno 2020

INDICE GENERALE

Introduzione.....	3
Capitolo 1: recente approccio terapeutico delle lesioni della cartilagine articolare	5
Capitolo 2: scopo della ricerca	6
Capitolo 3: lesioni della cartilagine articolare e loro trattamento	7
3.1 - Sottovalutazione dei problemi cartilaginei	7
3.2 – Epidemiologia.....	7
3.3 - Evoluzione delle lesioni condrali e loro classificazione	8
3.4 – Sintomatologia	10
3.5 - Test diagnostici e diagnosi clinica	11
3.6 – Trattamento: principi generali	12
3.6.1. – Tecniche riparative	13
3.6.2 - Tecniche rigenerative	15
3.6.3 - Trattamenti rigenerativi “one-step”	21
Capitolo 4: Agili-C™, un innovativo scaffold bifasico di aragonite.....	23
4.1 Innovazioni della bioingegneria tissutale.....	23
4.2 Composizione chimico-fisica dello scaffold AGILI-C™	23
4.3 Evoluzione dello scaffold AGILI-C™	25
Capitolo 5: trattamento delle lesioni osteocondrali del ginocchio con un innovativo scaffold di aragonite: risultati a 2 anni di follow-up	27
5.1 Introduzione allo studio	27
5.2 Materiali e metodi.....	28
5.2.1 Arruolamento dei pazienti	28
5.2.2 Tecnica chirurgica	29
5.2.3 Protocollo riabilitativo	31
5.2.4 Valutazione dei pazienti	32
5.2.5 Analisi statistica.....	33
5.3 Risultati	34
5.4 Discussione	36
5.5 Conclusioni	39
Bibliografia.....	41

INTRODUZIONE

La cartilagine ialina, tipica delle superfici articolari, per le sue peculiarità anatomiche e funzionali (assenza di apporto vascolare) (1, 2) può, se lesa, affrontare i processi riparativi con qualche possibilità di successo solo, e in maniera parziale, nel caso delle lesioni osteo-condrali nelle quali può sostenere un importante ruolo la vascolarizzazione ossea. In maniera parziale, poiché il processo riparativo porta alla formazione di fibrocartilagine, cioè di un tessuto che, dal punto di vista della meccanica articolare, ha caratteristiche strutturali e meccaniche ben inferiori a quelle della normale cartilagine articolare.

Lesioni, prevalentemente di origine traumatica, sono possibili in tutte le articolazioni ed età ma sono particolarmente frequenti nei giovani e a carico di quelle del ginocchio e, con minor frequenza, dell'anca (3). Il loro processo riparativo, per le inidonee caratteristiche funzionali della fibrocartilagine, viene seguito da alterazioni patologiche dell'osso sottostante alla cartilagine, alla progressiva degenerazione articolare e, infine anche alla osteoartrosi (4).

Si è tentato di stimolare la rigenerazione della cartilagine lesa con tecniche quali "drilling", microfratture o abrasioni, tutte basate sul presupposto di favorire l'apporto alla lesione di cellule staminali provenienti dall'osso subcondrale, ma i risultati si sono dimostrati sempre modesti se non francamente negativi.

Non potendo fare affidamento sui processi riparativi sono stati presi in considerazione quelli rigenerativi o quelli ricostruttivi. Al momento, la tecnica che ha dato i migliori risultati è quella del trapianto MACI (Matrix-Assisted Autologous Chondrocyte Implantation) di seconda generazione. Ma questa tecnica, anche se dà buoni risultati a breve e medio termine, anche se ha il pregio di poter essere eseguita in artroscopia evitando la chirurgia aperta e relative possibili complicazioni, trova un limite e nella procedura chirurgica in due tempi e nel tipo di lesione da trattare (5, 6).

Una tecnica ricostruttiva che in genere gode di una elevata percentuale di successi, l'autotrapianto di tessuto, nel caso delle ampie lesioni cartilaginee è ostacolata dalla limitata quantità di tessuto che può essere prelevata, senza conseguenze, dallo stesso individuo.

Infine, altri, e fortemente limitanti problemi (disponibilità di tessuti, rischio di infezioni...), rendono poco applicabile anche l'uso di allotrapianti provenienti dalle banche dei tessuti muscolo-scheletrici.

Recentemente, la consapevolezza del coinvolgimento dell'osso subcondrale nell'eziopatogenesi delle lesioni cartilaginee ha portato ad un forte sviluppo della bioingegneria tissutale per la creazione di nuovi dispositivi capaci di riprodurre l'intera unità osteocondrale, dispositivi che non necessitano di aggiunta di cellule, disponibili in sala operatoria a basso costo per ovviare ai succitati problemi delle altre tecniche.

CAPITOLO 1: RECENTE APPROCCIO TERAPEUTICO DELLE LESIONI DELLA CARTILAGINE ARTICOLARE

Il più recente approccio terapeutico delle lesioni della cartilagine articolare, viene dall'uso di componenti di ingegneria tissutale capaci di integrarsi con i tessuti sani e di partecipare attivamente ai processi rigenerativi e ricostruttivi.

Uno dei più recenti prodotti dell'ingegneria tissutale è lo scaffold bifasico Agili-C™.

Agili-C™ è uno scaffold “cell free”, riassorbibile, costituito da aragonite (carbonato di Calcio, CaCO₃), una componente di molti organismi animali, simile all'osso umano nella sua struttura tridimensionale, nella connessione fra i pori in essa presente e nella forma dei cristalli del carbonato di calcio.

L'aragonite si ottiene dall'esoscheletro dei coralli, invertebrati marini appartenenti agli Antozoi, una classe costituita da diverse migliaia di specie.

L'aragonite nelle varie specie differisce per dimensioni e inter-connettività fra i pori. Loro caratteristiche ottimali ai fini della rigenerazione e ricostruzione della cartilagine lesa sono: per quanto riguarda la colonizzazione degli osteoidi e del connettivo, diametro dei pori di 100 µm; per quanto riguarda la creazione di sistemi Haversiani e l'entrata dei vasi, connessioni fra i pori da 100 a 200 µm.

CAPITOLO 2: SCOPO DELLA RICERCA

Il corallo viene impiegato nel trattamento delle lesioni delle cartilagini articolari, per le sue capacità osteoconduttive e osteogeniche, per riempire il vuoto osseo attraverso il progressivo riassorbimento del minerale e la sua sostituzione con tessuto osseo funzionale. Pertanto, scopo della ricerca oggetto di questa tesi, è la valutazione dei risultati clinici e di risonanza magnetica del trattamento mediante impianto di scaffold di aragonite di lesioni osteocondrali del ginocchio in 12 pazienti, con un follow-up medio di 2 anni.

CAPITOLO 3: LESIONI DELLA CARTILAGINE ARTICOLARE E LORO TRATTAMENTO

3.1 – Sottovalutazione dei problemi cartilaginei

I problemi delle cartilagini articolari sono valutati meno di quanto non meritino per diversi motivi. In primo luogo, le lesioni condrali sono spesso associate ad altre alterazioni articolari che ne condividono i segni. In secondo luogo, al momento mancano test specifici che possano consentirci di valutare lo stato delle cartilagini, così come non è ancora sufficiente la sensibilità dei metodi con imaging.

Per questi motivi, è frequente che il danno condrale venga casualmente rilevato nel corso di un intervento chirurgico in corso per altre problematiche articolari.

3.2 – Epidemiologia

Lesioni della cartilagine articolare si osservano sia negli anziani che nei giovani. Esse sono oggi più frequenti che in passato per l'allungamento dell'attesa di vita e per la maggiore diffusione di attività sportive nei giovani e sono legate principalmente a traumi, anche lavorativi.

Numerosi fattori, quali età, particolari attività lavorative, particolari attività sportive, pregresse fratture, pregressi interventi a carico delle articolazioni, ischemia, patologie endocrine, come pure farmaci (anti-infiammatori non steroidei, gluco-corticoidi), immobilizzazione protratta, e così via possono facilitare la comparsa di lesioni cartilaginee.

Le lesioni della cartilagine articolare sono frequenti, quelle osteo-articolari specialmente negli adolescenti, quelle parziali particolarmente dopo i 40 anni, mentre quelle a tutto spessore difficilmente compaiono prima dei 30 anni.

La loro alta incidenza è evidenziata da uno studio di Curl (7) che, in 31.516 artroscopie del ginocchio (età media dei soggetti: 43 anni), ha riscontrato nel 63% dei casi lesioni cartilaginee di differente gravità: 41% di III grado (profondità della lesione: >50% dello spessore della cartilagine) e 19,2% di IV grado (lesione a tutto spessore). In questo studio, risultava che le sedi più colpite erano il condilo femorale mediale e la rotula.

Per quanto riguarda l'incidenza delle lesioni cartilaginee traumatiche, sia asintomatiche che sintomatiche, da uno studio di Noyes (8) risulta che, in pazienti con emartro acuto nell'articolazione del ginocchio, essa era del 5-10%.

Da uno studio di Widuchowski (9) risulta che in 25.124 artroscopie del ginocchio si evidenziavano 15074 lesioni cartilaginee (60% dei casi), con differenti localizzazioni: rotula (36%), condilo femorale mediale (34%), condilo femorale laterale (9%), troclea (8%), piatto tibiale laterale (7%) e piatto tibiale mediale (6%).

Le lesioni della cartilagine articolare sono molto spesso associate ad altre patologie dell'articolazione. Da uno studio prospettico di 200 casi di Zamber (10) risulta che lesioni isolate sono presenti nel 6,5% dei casi mentre nel 61,5% sono accompagnate da lesioni dei menischi (lesione meniscale instabile, specie del comparto mediale) o dei legamenti (lesioni del crociato anteriore, con lesioni cartilaginee prevalentemente mediali; lesioni del crociato posteriore, con lesioni condrali localizzate nel comparto mediale e nella femoro-rotulea).

È stato visto che la frequenza delle lesioni cartilaginee associate a lesioni del crociato anteriore aumenta con l'aumentare del tempo intercorrente fra trauma e intervento di ricostruzione del legamento. Meno chiara è la correlazione fra lesione condrale e danno meniscale (11). Infatti, se è vero che una lesione meniscale non trattata può provocare una lesione condrale, è anche vero che una meniscectomia, specie ampia, può dar luogo a precoce comparsa di lesioni artrosiche e che anche un intervento artroscopico sul menisco può causare danno cartilagineo.

Infine, l'osteoartrosi consiste nella degenerazione della cartilagine articolare, con comparsa di diffuse lesioni condrali di differenti profondità e forma, generalmente dopo i 40 anni. In questo caso, l'irrigidimento dell'osso subcondrale riduce la capacità di assorbire colpi e provoca la rottura della matrice cartilaginea.

3.3 – Evoluzione delle lesioni condrali e loro classificazione

Le lesioni condrali evolvono per gradi e su questa base se ne riconosce la gravità, suddivisa in 4 stadi secondo la classificazione di Outerbridge (Fig. 1) e di Outerbridge artroscopica (Fig. 2):

- grado I: rammollimento e gonfiore della cartilagine;
- grado II: frammentazione e fissurazione del tessuto, diametro inferiore a 1,5 cm;

- grado III: frammentazione e fissurazione del tessuto, diametro superiore a 1,5 cm;
- grado IV: erosione profonda che raggiunge l'osso subcondrale esposto.



Fig. 1 Lesioni condrali secondo la classificazione di Outerbridge

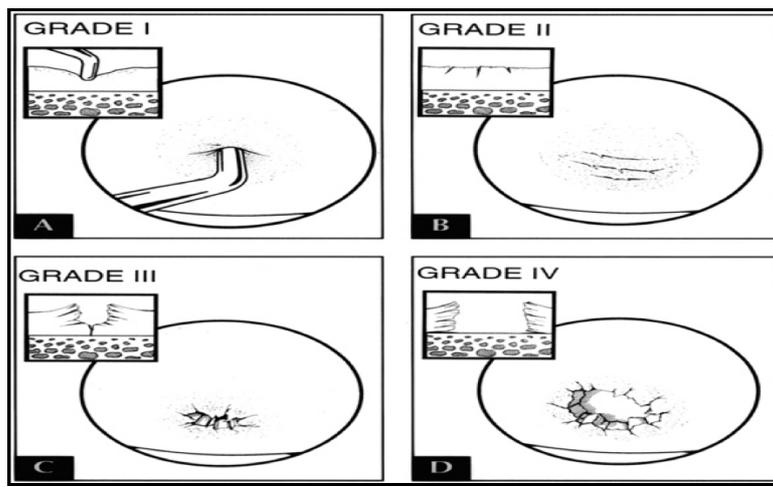


Fig. 2 Classificazione artroscopica di Outerbridge delle lesioni condrali

La ICRS (International Cartilage Research Society) suggerisce una suddivisione in gradi di profondità (Fig. 3):

- grado 1a: *quasi normale*, con leggera dentellatura e/o fissurazioni e rotture superficiali;
- grado 1b: *quasi normale* ma con lacerazioni e fratture profonde;
- grado 2: *anormale* con lesione che si estende in profondità per meno del 50% dello spessore della cartilagine;
- grado 3: *molto anormale* con lesione che si estende in profondità per più del 50% dello spessore della cartilagine. Il grado 3 è suddiviso in 3 sottogruppi:
 - 3a: la lesione non attraversa lo strato calcificato;
 - 3b: la lesione coinvolge lo strato calcificato;
 - 3c: la lesione è profonda ma non attraversa il piatto dell'osso subcondrale;
- grado 4: *estremamente anormale*, con esposizione dell'osso subcondrale.

Secondo l'ICRS solo per le lesioni di grado 3 e 4 grado, sintomatiche, è indicato un trattamento specifico, come stimolazione dell'osso subcondrale, trapianto di condrociti o scaffold osteocondrali.

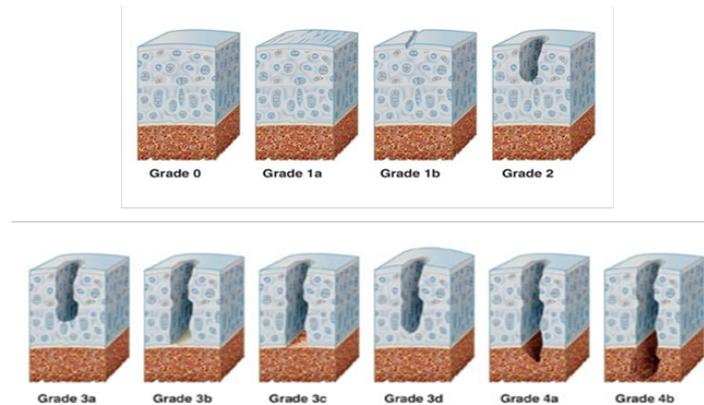


Fig. 3 Classificazione ICRS delle lesioni condrali

Una suddivisione precisa in quadranti è utile per una rappresentazione accurata della lesione (Fig. 4).

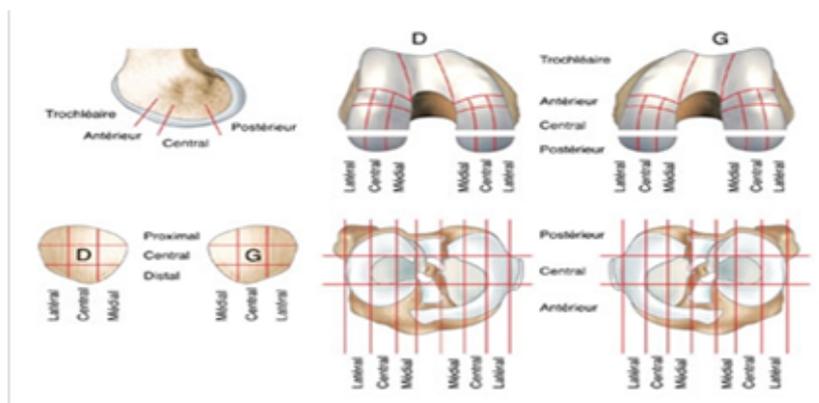


Fig. 4 Classificazione delle lesioni cartilaginee secondo localizzazione ed estensione

3.4 – Sintomatologia

La sintomatologia delle lesioni della cartilagine articolare è modesta e consiste principalmente in dolore sordo, localizzato o diffuso, percepito durante o dopo l'attività fisica, dovuto alla congestione venosa conseguente al danno condrale e alle anormali sollecitazioni pressorie alle quali è sottoposto l'osso subcondrale, con stimolazione delle terminazioni nervose a livello periarticolare. Un dolore più intenso può essere provocato dalla distensione capsulare per una sinovite causata dalla liberazione di metaboliti ed enzimi.

Esiste una correlazione fra sintomatologia e localizzazione della lesione condrale (1). Infatti, lesioni della femoro-rotulea provocano dolore anteriore ma non instabilità, che può essere invece presente in quelle della regione posteriore del condilo femorale.

Limitazione dell'attività fisica può essere provocata da lesioni particolarmente gravi o estese. Altri possibili sintomi (confondibili con lesioni meniscali) sono gonfiore articolare, scrosci, blocchi articolari, versamento intrarticolare.

3.5 – Test diagnostici e diagnosi clinica

Non sono disponibili test specifici per la diagnosi delle lesioni condrali e pertanto è necessario avvalersi delle metodiche di imaging per confermarne il sospetto diagnostico sollevato dall'anamnesi e dall'esame obiettivo.

La *radiologia convenzionale* non permette la visualizzazione della cartilagine ma può evidenziare utili segni indiretti, mentre la *Risonanza Magnetica Nucleare (RMN)*, più che la TAC, con il suo studio multiplanare, la qualità del contrasto, la non invasività, la ripetibilità, è attualmente lo strumento migliore per lo studio morfologico, in quanto capace di fornire informazioni sulle lesioni, sullo spessore, sul volume, sulla quantità di acqua, proteoglicani, collagene e sodio presenti nella cartilagine (Fig. 5).

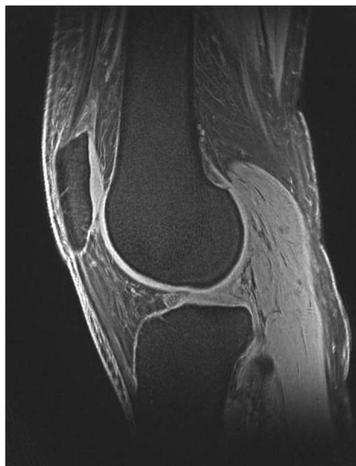


Fig. 5 RMN del ginocchio

La RMN, però, anche se superiore alla radiografia e alla TAC non è uno strumento risolutivo: attualmente è l'*artroscopia* l'unico esame veramente affidabile per diagnosticare le lesioni della cartilagine articolare.

Lo studio del paziente può essere completato da indagini biomeccaniche dell'apparato locomotore. Uno studio cinesiologico può evidenziare un'errata esecuzione delle

gestualità e consentire di intervenire a questo livello per correggere condizioni negative per la funzionalità articolare e quindi per la cartilagine.

Strumenti potenzialmente molto utili per lo studio delle lesioni condrali sono i *markers biochimici*. Attualmente più studiate sono la MMP3 (stromelisina) e la MMP1 (collagenasi), metallo-proteinasi presenti nel fluido sinoviale capaci di degradare le componenti della matrice intercellulare, ma oggetto di studio sono anche alcuni inibitori delle metallo-proteinasi. I markers biochimici potrebbero essere importanti strumenti non solo diagnostici nella fase preclinica delle lesioni condrali, ma anche prognostici nella progressione della malattia.

3.6 – Trattamento: principi generali

Un tempo si riteneva che le lesioni condrali non potessero giungere a guarigione né spontanea né indotta da farmaci o trattamenti chirurgici (12). Oggi si sa che la riparazione di tali danni è possibile, se il tipo di lesione, la sua gravità, la sua localizzazione e l'età del paziente lo consentono (13).

Non è certo possibile la riparazione delle lesioni gravi per profondità ed estensione del danno, ma quelle di piccole dimensioni possono essere colmate da un tessuto simil-cartilagineo. E' stato dimostrato che le lesioni profonde vengono riempite da un coagulo di fibrina nel quale migrano cellule mesenchimali che successivamente si differenziano in condrociti formando un tessuto molto simile alla cartilagine ialina che però con il passare del tempo (2 mesi) assume forti analogie con la cartilagine fibrosa. Andando ancora avanti nel tempo (3 mesi) la trasformazione in fibrocartilagine progredisce e a distanza di 6-12 mesi il tessuto di riparazione presenta una superficie erosa e irregolare (14) che prelude a una progressione verso la degenerazione della superficie articolare (15).

Sono state proposte diverse tecniche di trattamento chirurgico delle lesioni condrali, tendenti alcune alla riparazione della lesione altre alla ricostruzione del tessuto danneggiato.

Tecniche volte a riparare il danno sono il *debridement*, il *lavaggio articolare* e lo *shaving*, e tecniche di stimolazione midollare come le *perforazioni*, le *abrasioni*, le *microfratture*. Tecniche volte alla ricostruzione del tessuto danneggiato sono il *trapianto osteocondrale massivo*, la *mosaicoplastica*, il *trapianto di pericondrio* o

periostio, il trapianto di condrociti autologhi con cartilagine bio-ingegnerizzata. Tutte queste tecniche devono sempre essere affiancate da interventi volti a favorire la guarigione del danno, quindi interventi di correzione di un asse alterato o di ricostruzione legamentosa in un ginocchio instabile.

Ciascuna di queste tecniche ha le sue indicazioni, contro-indicazioni e probabilità di successo, in relazione all'età o alle attività del paziente, alla entità o alla profondità della lesione. Pertanto, la scelta del tipo di trattamento da impiegare richiede una accurata tipizzazione della lesione perché esso sia il più adeguato alla patologia, alle esigenze e alle aspettative del paziente.

Quando nessuna delle vie terapeutiche disponibili risulta praticabile, l'unica alternativa che rimane è l'*artroprotesi*.

3.6.1 – Tecniche riparative

Lavaggio articolare, debridement articolare, perforazioni subcondrali, microfratture e condroabrasione sono tecniche aventi lo scopo di favorire la riparazione tessutale lasciando all'organismo il compito di provvedere alla ricostruzione del tessuto lesso (16-17). Tali tecniche sono indicate nel trattamento delle lesioni di I, II e III grado di Outerbridge.

- a) Il lavaggio articolare si basa sulla rimozione di frammenti di cartilagine degenerata e con loro di mediatori dell'infiammazione e prodotti catabolici. Il lavaggio comporta un miglioramento che, persistendo la lesione, è limitato nel tempo.
- b) Il debridement articolare consiste nella pulizia della cavità articolare mediante eliminazione di lembi di cartilagine, di tessuto cartilagineo degenerato, l'escissione di lesioni degenerative meniscali, la sinoviectomia parziale e l'asportazione di osteofiti anteriori. Questa tecnica evita l'impingement meccanico e la formazione di corpi liberi nell'articolazione e l'infiammazione che essi provocano. È indicata in caso di scarse richieste funzionali, è un intervento semplice, veloce ma non ha effetto curativo e i suoi risultati positivi tendono a diminuire nel tempo. È indicato nelle lesioni di III e IV grado di Outerbridge e i suoi risultati migliorano quando si aggiunge al lavaggio articolare.

Il debridement effettuato da solo è una procedura puramente palliativa che non conduce alla riparazione della cartilagine nella lesione, ma può risolvere con successo i sintomi meccanici rumorosi.

- c) Le perforazioni subcondrali hanno lo scopo eliminare il difetto cartilagineo attraverso la stimolazione della condrogenesi, basandosi sul presupposto che, essendo la cartilagine avascolarizzata e non potendo quindi mettere in atto i normali processi riparativi degli altri tessuti, vi è la possibilità che il penetrare nello strato sottocondriale inneschi il processo che porta alla formazione della fibrocartilagine.

La tecnica include un debridement della cartilagine danneggiata e una accurata preparazione della lesione, quindi per mezzo di un drill artroscopico, si esegue perforazione dell'osso subcondrale e formazione di fori dai quali fuoriesce sangue con successiva formazione di un manto di fibrina. Questo trattamento comporta la formazione di tessuto di riparazione con predominanza di tessuto fibroso e/o fibrocartilagineo che però va incontro a progressivo deterioramento.

- d) Basate sugli stessi principi delle perforazioni subcondrali sono le microfratture che si producono con un puntale, quindi senza l'effetto necrotizzante da calore delle perforazioni mediante drill artroscopico. Le possibilità di successo con risultati duraturi sono pertanto maggiori specialmente in soggetti giovani, seppur sempre con la formazione di fibrocartilagine (Fig. 6).



Fig. 6 Microfratture, vista artroscopica

- e) La condroabrasione consiste nella rimozione per mezzo di frese in aspirazione di uno strato di tessuto lesio che raggiunga e coinvolga lo strato superficiale di osso subcondrale e, intorno alla lesione, dei margini di

cartilagine sana circostanti. La abrasione dell'osso subcondrale comporta la formazione di un essudato emorragico e di un coagulo di fibrina che aderisce alla superficie abrasa e diviene l'impalcatura per il tessuto di riparazione. Anche in questo caso non si forma un tessuto cartilagineo normale ma una fibrocartilagine ricca di fibroblasti e povera di proteoglicani, destinata a deteriorarsi in breve tempo.

3.6.2 – Tecniche rigenerative

Le tecniche volte alla ricostruzione del tessuto danneggiato sono indicate per il trattamento delle lesioni del III e IV grado di Outerbridge e per lesioni osteocondrali ampie.

- a) La mosaicoplastica, descritta da Hangody nel 1998 (18) comporta l'impiego di piccoli innesti osteocondrali prelevati da un'area di non carico della superficie antero-superiore del condilo laterale del femore (area non sottoposta a carico) e il loro inserimento nell'area lesa, previo debridement di questa e asportazione di eventuale tessuto di granulazione.

Il materiale da innestare viene ottenuto con carotatori inseriti a circa 16-18 mm nella cartilagine, perpendicolarmente ad essa allo scopo di ottenere campioni circolari, più funzionali di quelli ellittici (19). La sede della lesione viene preparata con una fresa o un cilindro cavo di profondità per ottenere siti riceventi lievemente inferiori (1-2 mm) alla lunghezza degli innesti che vengono ivi inseriti e fissati con la tecnica "press-fit".

Il posizionamento deve essere fatto con molta attenzione per non danneggiare la cartilagine articolare e per non creare pericolosi, ai fini del risultato a distanza, dislivelli fra gli innesti e la cartilagine stessa.

Vantaggi della mosaicoplastica sono la possibilità, con un adeguato numero di innesti, di riempire (fino al 70%) la lesione, ripristinando allo stesso tempo il naturale raggio di curvatura della superficie articolare. Punti delicati di questa tecnica sono la delicatezza e precisione richieste per le piccole dimensioni dei cilindri, la precisione dei carotaggi, la necessità di mobilizzazione precoce e di applicazione graduale dei carichi.

Svantaggio della mosaicoplastica è l'impossibilità di impiego nelle lesioni di grandi dimensioni che richiederebbero un prelievo troppo vasto e quindi dannoso per la zona donatrice.

Indicazioni di questa tecnica sono lesioni, generalmente conseguenti a traumi, di dimensioni inferiori a 2 cm, con margini netti, circondati da cartilagine integra, a tutto spessore, sintomatiche, in pazienti di età non superiore a 45 anni e con buon allineamento dell'arto.

Nel complesso, la mosaicoplastica è un'ottima tecnica che comporta un unico tempo chirurgico, è poco invasiva perché eseguibile in artroscopia e sembra dare ottimi risultati nelle lesioni di dimensioni inferiori a 2 cm (Fig. 7) (20, 21, 22, 23).

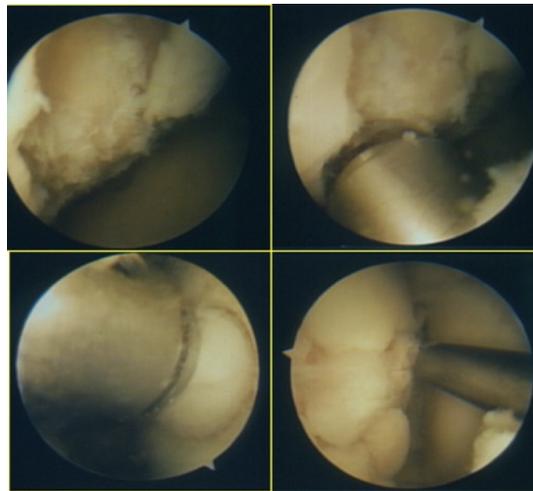


Fig. 7 Tecnica chirurgica di mosaicoplastica: visualizzazione artroscopica intraoperatoria

- b) Il trapianto osteocondrale massivo si impiega nelle gravi perdite sia di tessuto osseo che di cartilagine (24). I suoi vantaggi sono il basso livello di difficoltà, il basso costo, il richiedere un unico tempo chirurgico, la possibilità di ripristinare una buona congruenza articolare. Suoi svantaggi la necessità di operare in artrotomia e l'importante morbidità che crea nel sito donatore.

La tecnica comporta il prelievo di porzioni cilindriche osteocondrali da aree non sottoposte a carico, la superficie trocleare o la parte anterosuperiore del condilo femorale laterale e il loro trasferimento in fori creati alla base del danno cartilagineo. Il trapianto conserva la vitalità della cartilagine ialina e al punto di contatto con la cartilagine articolare presenta una organizzazione di tipo fibrocartilagineo (25). I risultati positivi sono elevati, come si rileva da uno

studio di Bobic (26) in cui su 12 pazienti con lesione del crociato anteriore e danno cartilagineo di 10-22 mm, con 3-5 impianti osteocondrali, 10 pazienti hanno riportato ottimi risultati dopo un follow-up di 12 mesi (Fig. 8).

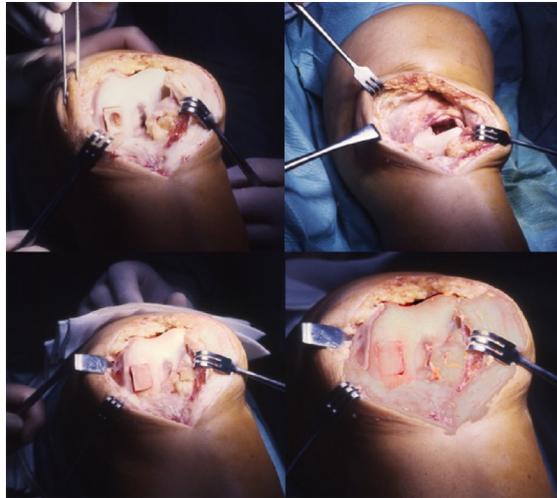


Fig. 8 Tecnica chirurgica trapianto osteocondrale massivo

- c) Il trapianto di pericondrio e periostio è una tecnica che nell'animale da esperimento ha dimostrato di avere ottime potenzialità (27), introdotta da Homminga nel 1990 (28).

Per il trattamento di lesioni di III e IV grado, questo autore ha impiegato *graft di pericondrio autologo*, ottenuto dalle cartilagini costali, che venivano fissati con colla di fibrina. Ad 1 anno dall'impianto, nelle lesioni 2-3 cm si osservavano significativi miglioramenti: nel 90% dei casi il danno risultava completamente riempito da tessuto simil-cartilagineo e si osservava un netto miglioramento clinico. A 2 anni dall'impianto, però, il risultato peggiorava con iperdensità di tipo calcifico nella maggioranza dei casi, seguita nel tempo da ossificazione encondrale e formazione di osso nel sito di riparazione con ricomparsa della sintomatologia (29).

Per quanto riguarda il trattamento mediante *trapianto del periostio* si è visto che l'uso di lembi liberi in ambiente non vascolarizzato favorisce lo sviluppo della cartilagine (30).

Per eseguire questo tipo di trapianto è necessario preparare con il debridement il sito ricevente e poi suturare il periostio alla base della lesione, con lo strato cambiale rivolto verso l'articolazione.

Il trapianto del periostio, con innesti ottenuti dalla tibia, è stato impiegato nei danni rotulei a tutto spessore ma i risultati a lungo termine ottenuti sono stati fallimentari (31).

La base razionale del trapianto di pericondrio e del trapianto di periostio è la stessa ed è affine a quella della stimolazione midollare, vale a dire tentare di portare in seno alla lesione cellule capaci di ripristinare l'integrità della cartilagine. Infatti, pericondrio e periostio contengono cellule fibrociarie progenitrici e cellule di supporto che, opportunamente stimulate, in teoria possono ricostruire il tessuto danneggiato. È evidente che quanto più grande è il numero di queste cellule tanto maggiori sono le probabilità di successo: infatti, i risultati migliori con questa tecnica sono stati ottenuti nei giovani nei quali sono più numerose le cellule indifferenziate con potenzialità condrogenica.

Queste metodiche hanno il vantaggio di poter essere realizzate in un unico tempo chirurgico, ma hanno molti svantaggi: necessità di un doppio accesso chirurgico, difficile manipolazione degli innesti, molto sottili, attecchimento laborioso, necessità di una lunga rieducazione con mobilizzazione passiva per facilitare la guarigione.

Nel complesso, l'uso di queste tecniche è stato scoraggiato da risultati non soddisfacenti se non fallimentari.

Numerosi studi, iniziati negli anni '80, hanno dimostrato che è possibile stimolare la riproduzione di condrociti in vitro (32) e che nell'animale da esperimento tali condrociti, impiantati su cartilagine lesa, possono produrre un tessuto di riparazione simil-ialino (33).

- d) Il trapianto di condrociti autologhi (ACI) di prima generazione (Fig. 9) consiste nell'impiego di condrociti coltivati in vitro da porre sulla lesione e ivi mantenerli mediante un flap periostale, sigillato con colla di fibrina.

La tecnica prevede due interventi separati.

Il primo consiste nel valutare, per via artroscopica, se esiste l'indicazione al trapianto ACI e quindi, per la stessa via, prelevare i campioni di cartilagine dai quali saranno isolati condrociti da coltivare in piastra fino a ottenerne una sufficiente quantità.

Il secondo intervento viene eseguito a cielo aperto. La lesione viene evidenziata, regolarizzata, courettandola fino al tessuto sano. I condrociti autologhi vengono versati nella lesione e ivi mantenuti con un flap periostale, sigillato con colla di fibrina.

Questa tecnica dà buoni risultati per la produzione di un tessuto simil-ialino (ma in certi casi sviluppa un tessuto diverso, con fibrociti e matrice sparsa) con sensibile riduzione del dolore, migliore funzionalità articolare, benessere (34, 35).

Dall'84 al 91% dei pazienti possono ritornare a un livello di normale attività.

L'impianto di condrociti autologhi è un trattamento sicuro, efficace e riproducibile (36), ma non scevro da svantaggi, che sono anzi numerosi: procedura indaginosa, ampia esposizione dell'articolazione con relativi rischi, quali artrofibrosi con necessità di reinterventi (37), possibili alterazioni del fenotipo tipico del condrocita e così via.

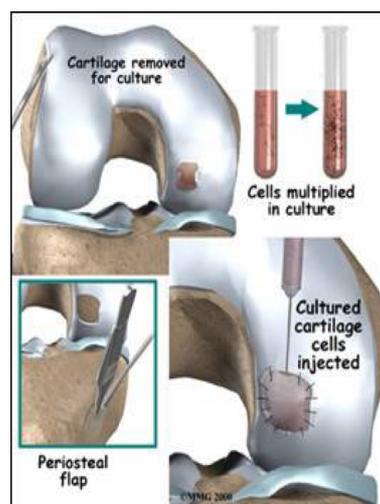


Fig. 9 Trapianto autologo di condrociti di I generazione

- e) Nell'intento di superare questi aspetti negativi, è stato sviluppato il trapianto di condrociti autologhi (ACI) di seconda generazione che usa scaffolds polimerici biodegradabili per la crescita in vitro di cellule che vengono successivamente impiantate nel sito della lesione. Si è infatti dimostrato che gli scaffolds tridimensionali consentono il mantenimento di un fenotipo differenziato di condrociti (38).

Gli scaffolds tridimensionali, tutti biocompatibili e biodegradabili in un tempo adeguato (39), sono differenti per composizione fisica e chimica. Quelli più usati

sono l'acido poliglicolico (PGA) o polilattidi come l'acido polilattico (PLA). Fra i materiali naturali utilizzati per produrli ricordiamo agarosio, alginato, acido ialuronico, gelatina, colla di fibrina, derivati del collagene e matrice di collagene acellulare.

Oltre alla biocompatibilità e alla biodegradabilità, l'uso degli scaffolds tridimensionali ha il vantaggio di ridurre l'esposizione dell'articolazione poiché evita il rivestimento periostale e la sutura e offre anche la possibilità di impianto con tecniche artroscopiche (40, 41).

Un particolare tipo di scaffold è lo Hyalograft® C (Fig. 10). È costituito dall'estere benzilico dell'acido ialuronico (HYAFF®, Fida Advanced Biopolymers Laboratories, Abano Terme, Italy). Può essere utilizzato con tecniche artroscopiche, attualmente utilizzato per quasi tutte le lesioni del condilo femorale, anche se di dimensioni importanti. Fanno eccezione le lesioni della cartilagine patellare e del piatto tibiale, che richiedono l'intervento a cielo aperto. Non sono riportate complicanze correlate al suo impianto (42). I risultati a medio-lungo termine fino ad ora raccolti indicano un ottimo recupero a 2 anni di follow-up ed il mantenimento di valori stabili per 7 anni (Fig. 10).



Fig. 10 Hyalograft C

Sono promettenti scaffolds il BioseedC®, composto da una membrana di fibrina, polidioxanone e PGA-PLA, il Novocart 3D, a struttura bifasica collagene-condroitinsolfato, il Cartipatch, composto da un idrogel di agarosio alginato che lo rende molto maneggevole, il Neocart, l'Atelocollagen, il Chondron e il CaReS.

3.6.3 – Trattamenti rigenerativi “one-step”

Per superare alcuni dei problemi legati all’uso degli ACI di seconda generazione (alti costi, due tempi chirurgici...), e grazie al maggiore interesse posto sull’eziopatogenesi delle lesioni condrali (importanza osso subcondrale) sono stati introdotti nuovi trattamenti definiti “one-step”.

Queste tecniche sono nate dalla osservazione che condrociti crescono e migrano da frammenti di cartilagine sana prelevata dallo stesso paziente, inseriti in uno scaffold polimerico riassorbibile e impiantati nella lesione dando luogo alla formazione di un tessuto simil-ialino con risultati clinici incoraggianti, anche migliori di quelli ottenuti con le microfratture.

Recenti tecniche di ricostruzione cartilaginea “one-step” comportano l’uso di midollo osseo concentrato al posto dei condrociti da aggiungere allo scaffold oppure un concentrato di cellule derivate dal midollo osseo e polvere collagenica o anche una membrana di acido ialuronico usato come scaffold per il supporto cellulare ma i progressi ottenuti nella bioingegneria hanno permesso di sviluppare nuovi metodi di produzione di tessuti autologhi ingegnerizzati (Tissue Engineering Constructs, TEC) per la riparazione dei tessuti.

Attualmente, come alternativa all’uso di innesti multipli di matrici cilindriche (innesti osteocondrali plurimi) la bioingegneria tissutale propone l’uso di composti osteocondrali “su misura”, cioè con forma anatomica che riproduce il contorno della superficie cartilaginea e quindi migliora il contatto e la distribuzione dei carichi fra le superfici articolari.

La procedura Amic® rappresenta un ulteriore passo in avanti nel campo dei trattamenti rigenerativi “one-step”. Esso è basato, come nel caso delle microfratture, sul principio di stimolare la rigenerazione senza l’apporto di cellule ma sfruttando quelle naturalmente presenti nell’organismo facilitando però l’azione di queste ultime. La procedura, pertanto, consiste nel combinare le microfratture con una matrice collagenica, di derivazione suina, di tipo III/I a due strati per stabilizzare il coagulo ematico.

La procedura Amic® consente di trattare lesioni di notevoli dimensioni, superiori a 2 cm, con risultati molto soddisfacenti e di lunga durata.

Un'altra procedura "one-step" prevede l'impiego come sostituto osteocondrale di un biopolimero cilindrico bifasico poroso a base di calcio solfato polilattico e poliglicolico, il TruFit®, sulla cui efficacia vi sono ancora dati incerti o contraddittori. In alcuni studi, i primi risultati sono apparentemente positivi, ma nel tempo (12 mesi) il tessuto di nuova formazione appare ancora eterogeneo (38) e in tempi più lunghi (63 mesi) ancora non presenta segni di maturazione (44). I risultati di altri studi (45) sono incoraggianti in quanto dimostrano che se in un tempo operatorio intermedio le immagini RMN sono poco favorevoli in tempi di follow-up più lunghi l'aspetto del tessuto tende a migliorare in modo significativo.

Interessante appare il Maioregen®, scaffold nanostrutturato biomimetico, a composizione porosa tridimensionale e trifasica.

La matrice tridimensionale del Maioregen è costituita da idrossiapatite, più concentrata (70%) nello strato più profondo, meno nello strato intermedio (40%), assente in quello superficiale, dove è sostituita da collagene di tipo I. In sostanza, questo scaffold mima la struttura osteocartilaginea dell'articolazione, con la base ossea rappresentata dall'*idrossiapatite*, noto sostituto osseo di sintesi, estesamente impiegato in chirurgia maxillofacciale, in odontoiatria, in ortopedia, e la superficie cartilaginea rappresentata dal *collagene di tipo I*, di norma presente nella cartilagine ialina.

Il Maioregen, per le sue caratteristiche (composizione chimica, elevata porosità, dimensione dei pori, biocompatibilità...) può indurre la formazione di tessuto cartilagineo e di tessuto osseo sub-condrale rispettando la struttura biochimica e morfologica del comparto anatomico osteocartilagineo, comportandosi quindi come scaffold biomimetico.

Le ricerche su animali (46) hanno confermato le potenzialità di questo scaffold e gli studi clinici (47, 48, 49, 50) hanno dimostrato che l'uso del Maioregen dà luogo a ottimi risultati con scores sia soggettivi che oggettivi migliori di quelli che si ottengono con altri tipi di scaffold (Fig. 11).

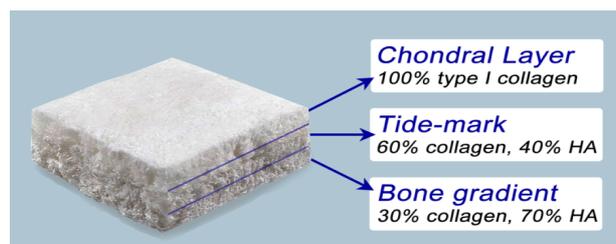


Fig. 11 Scaffold biomimetico Maioregen®

CAPITOLO 4: AGILI-C™, UN INNOVATIVO SCAFFOLD BIFASICO DI ARAGONITE

4.1 – Innovazioni della bioingegneria tissutale

Negli ultimi anni l'attenzione si è spostata sempre più sul ruolo dell'osso subcondrale nell'etiopatogenesi delle lesioni cartilaginee. Esso infatti è spesso coinvolto nel processo degenerativo della superficie articolare e può anche aumentare di dimensioni nel tempo, con concomitanti cambiamenti, sia a carattere osteofitico che di riassorbimento, dello strato osseo sottostante (51- 52). Il trattamento dovrebbe quindi essere volto a ristabilire la superficie articolare nel modo più anatomico possibile, ripristinando le proprietà fisiologiche dell'intera unità osteocondrale. Per questo motivo sono stati sviluppati degli scaffold differenti per il trattamento di difetti condrali ed osteocondrali più estesi in cui vengono coinvolti due tessuti (osso e cartilagine articolare) con potenziale rigenerativo intrinseco nettamente differente.

Uno scaffold osteocondrale deve garantire un sito di adesione per le cellule, permettendo la loro migrazione e proliferazione all'interno dello stesso, con scopo ultimo la completa integrazione del tessuto autologo ingegnerizzato con il tessuto di riparazione. Deve altresì garantire la stabilità meccanica sotto il sistema di carichi fisiologici al sito d'impianto. Inoltre, lo scaffold deve avere una porosità specifica, in grado di consentire la diffusione di ossigeno e nutrienti al suo interno e, nel contempo, l'eliminazione dei metaboliti. Infine la degradazione dello scaffold deve avvenire in maniera controllata, compatibile con i processi di formazione del neotessuto, e i prodotti di degradazione devono risultare non dannosi.

Sia dal punto di vista chirurgico che commerciale, il graft ideale per riparare difetti condrali ed osteocondrali dovrebbe essere un prodotto da scaffale, perciò alcuni biomateriali sono stati recentemente proposti per indurre la rigenerazione "in situ" della cartilagine dopo l'impianto direttamente nel sito di lesione.

4.2 – Composizione chimico-fisica dello scaffold AGILI-C™

Lo sviluppo dello scaffold Agili-C™ si è basato sull'innovativo concetto di usare due noti dispositivi approvati dall'FDA per creare uno scaffold per il trattamento delle lesioni articolari superficiali. Agili-C™ è uno scaffold poroso realizzato per il

trattamento delle lesioni della superficie articolare del ginocchio. Agili-C™ è un esoscheletro di corallo poroso, costituito da carbonato di calcio inorganico purificato (aragonite) dall'esoscheletro inorganico del corallo (Fig. 12).

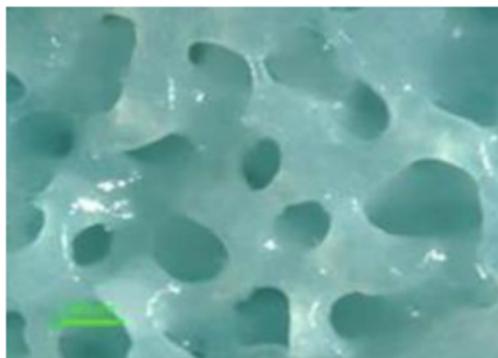


Fig. 12 Esoscheletro di corallo

L'esoscheletro del corallo (aragonite) è un materiale biologico incredibilmente simile all'osso umano per la sua struttura 3D, le interconnessioni dei pori e la forma dei cristalli di calcio carbonato (CaCO_3). Queste caratteristiche conferiscono allo scaffold la sua capacità osteo-conduttiva rendendolo così un materiale adatto alla riparazione dell'osso.

I coralli sono invertebrati marini appartenenti alla classe degli Antozoi che include circa 7.000 specie con una ampia diversità di tipologie scheletriche, differenti morfologie e strutture dei cristalli. I coralli utilizzati a scopo medicale sono limitati a un selezionato numero di specie, quali i Porites, Acropora, Lobophyllia, Goniopora, Polyphyllia e Pocillopora (53).

Questi biomateriali forniscono una struttura tridimensionale (3D) con proprietà meccaniche e microporosità (tra 100 e 200 μm) necessarie per la crescita interna del tessuto vascolare. Queste caratteristiche conferiscono all'aragonite la sua capacità osteo-conduttiva rendendola adatta alla rigenerazione dell'osso. La struttura di calcio carbonato viene gradualmente riassorbita e sostituita da tessuto osseo funzionale. I derivati corallini sono comunemente usati come sostituti e riempitivi ossei, con diversi prodotti già autorizzati FDA, come, ad esempio, Pro-Osteon 200R (Biomet, K000515) e BoneMedik (Metabiomed, K070897).

Se da una parte il corallo è un buon materiale per la riparazione ossea, dall'altra non è in grado di rigenerare la cartilagine ialina nativa. Shahgaldi et al. (54) hanno impiantato plug corallini nella troclea di conigli, e sebbene la qualità delle riparazioni superficiali,

evidenziata dalla struttura 3D del collagene e dalla colorazione (fluorescenza) con Safranin-O, fosse decisamente migliore di quella ottenuta con difetti lasciati vuoti, non rigenerava la normale cartilagine ialina articolare.

La parte inferiore dell'impianto è composta di aragonite inorganica, mentre la parte superiore è stata modificata attraverso perforazioni di 2 mm di profondità. Nella prima versione dello scaffold (Fig. 13), veniva aggiunto acido ialuronico alla parte superficiale dell'impianto, attualmente questo non viene più applicato.

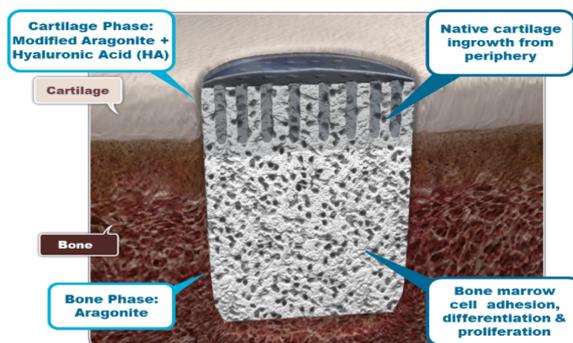


Fig. 13 Struttura di Agili C nella prima versione con aggiunta di acido ialuronico

L'esame istologico realizzato da un laboratorio indipendente in una serie di studi preclinici ha confermato la rigenerazione di cartilagine ialina, come dimostrato dalla presenza di collagene di tipo II e aggrecano, e dalla mancanza di collagene di tipo I nel tessuto riparato, così come ha confermato anche la ricostruzione dell'osso subcondrale (Fig. 14).

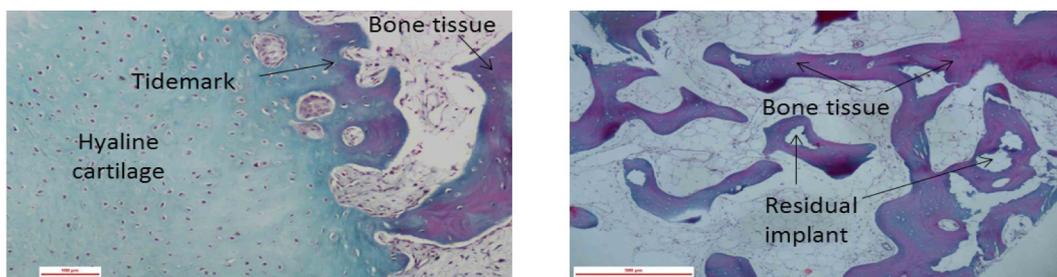


Fig. 14 A dodici mesi dall'impianto: l'esame istologico conferma la rigenerazione della cartilagine ialina e della ricostruzione dell'osso subcondrale

4.3 – Evoluzione dello scaffold AGILI-C™

Lo scaffold iniziale consisteva di aragonite corallina. A seguito del processo di lavorazione, venne realizzata una matrice a griglia di forma quadrata con canali profondi da 1 a 2 mm, nella fase condrale o nella fase ossea, usando degli strumentari appositi (Bungard CCD). Questa conformazione venne usata e realizzata a forma di

cilindri per il trattamento sia dei difetti condrali che osteocondrali nell'essere umano. I cilindri avevano un'altezza di 10 mm con un diametro variabile disponibile da 7.5 a 20 mm a seconda della dimensione della lesione.

Recentemente è stata invece sviluppata una versione conica degli impianti, con un angolo di 2 gradi dall'asse longitudinale, per migliorare l'impianto press-fit dello scaffold (Fig. 15). Dopo approfonditi processi di purificazione, necessari per trattare e rimuovere particelle, residui e detriti organici trattenuti, gli impianti venivano sterilizzati con radiazioni gamma a 25 kGy (Sor-Van Ltd., Israel). Successive modifiche hanno portato a prototipi diversi. Gli impianti usati nello studio oggetto della tesi non sono impregnati in modo omogeneo con acido ialuronico.



Fig. 15 Impianto Agili-C™

CAPITOLO 5: TRATTAMENTO DELLE LESIONI OSTEOCONDRALE DEL GINOCCHIO CON UN INNOVATIVO SCAFFOLD DI ARAGONITE: RISULTATI A 2 ANNI DI FOLLOW-UP

5.1 – Introduzione allo studio

La cartilagine articolare è un tessuto altamente specializzato che riveste le superfici dei capi articolari, permettendo il movimento delle nostre articolazioni. È priva di apporto vascolare e non rigenera spontaneamente in seguito a lesioni. Si assiste a qualche tentativo di riparazione quando la lesione cartilaginea raggiunge il sottostante osso sub-condrale (lesione osteo-condrale). Negli ultimi anni grande interesse è stato posto sull'osso subcondrale ed il suo ruolo nell'eziopatogenesi delle lesioni cartilaginee e dell'osteoartrosi iniziale. In caso di estese lesioni cartilaginee così come nei difetti focali lasciati senza trattamento, l'osso subcondrale è spesso coinvolto nel processo degenerativo della superficie articolare e può anche aumentare di dimensioni nel tempo, con concomitanti cambiamenti, sia a carattere osteofitico che di riassorbimento, dello strato osseo sottostante.

I progressi fatti nella bioingegneria tissutale hanno permesso lo sviluppo di diversi metodi di assemblaggio di innesti osteocondrali compositi bioingegnerizzati per la realizzazione di tessuti autologhi ingegnerizzati per la riparazione delle lesioni, con lo scopo di ottenere la completa integrazione di scaffold con il tessuto ospite, fino al completo rimodellamento del sito di impianto (55).

Il trattamento dovrebbe quindi essere volto a ristabilire la superficie articolare nel modo più anatomico possibile, ripristinando le proprietà fisiologiche dell'intera unità osteocondrale, allo scopo di ottenere un tessuto di riparazione che rispecchi la superficie articolare nativa e con risultati affidabili nel tempo.

Lo scopo di questo studio è di valutare i risultati clinici e strumentali a due anni di follow-up di un innovativo scaffold acellulare tridimensionale di aragonite.

5.2 – Materiali e metodi

5.2.1 – Arruolamento dei pazienti

La sperimentazione clinica è stata avviata dopo l'approvazione del Comitato Etico dell'Università di Anversa, per il dipartimento di ortopedia *AZ Monica Hospital, ORTHOCA*, di Anversa, Belgio, con il numero di protocollo B300201419853.

Tutti i pazienti hanno firmato un consenso informato prima di ogni intervento chirurgico, previa ampia spiegazione dello stesso.

Sono stati trattati consecutivamente con impianto dello scaffold AGILI-C™, Cartiheal, 12 pazienti affetti da lesioni cartilaginee di III o IV grado (International Cartilage Repair Society evaluation package) con sintomi clinici di dolore e gonfiore al ginocchio.

Criteri di inclusione:

- ✓ 18-55 anni
- ✓ Lesioni osteocondrali di grado III e IV (classificazione ICRS)
- ✓ Dimensione < 3,5 cm²
- ✓ Lesione completamente circondata da osso sano
- ✓ Capacità di firmare un consenso informato per partecipare allo studio

Criteri di esclusione:

- χ Diagnosi di:
 - Malattie infiammatorie croniche
 - Coagulopatie
 - Malattie vascolari o neurogene
 - Diabete di tipo I
- χ Instabilità del ginocchio
- χ Malallineamento > 5°
- χ Perdita di menisco > 50%
- χ Kissing lesions
- χ Osteoartrosi diffusa
- χ Pregresso intervento chirurgico al ginocchio nei sei mesi precedenti
- χ Utilizzo di corticosteroidi o chemioterapici negli ultimi 12 mesi
- χ Abuso di alcol o droghe

χ Incapacità di raccogliere un consenso informato

Nessuna procedura associata è stata eseguita durante l'intervento chirurgico.

I pazienti che hanno raggiunto un follow-up di 2 anni e che sono stati rivalutati clinicamente ed attraverso la somministrazione dei questionari IKDC (International Knee Documentation Committee), Tegner per l'analisi dell'attività sportiva, Lysholm score e KOOS (dolore, sintomi, funzioni della vita quotidiana, attività sportiva e qualità di vita) sono stati 12: 9 pazienti erano uomini e 3 donne con età media di 31.4 ± 8.0 anni.

Le lesioni erano situate sul CFM in 3 pazienti, sul CFL in 4 e sulla troclea femorale in 5 pazienti. Solamente in un paziente sono stati impiantati due plug di dimensione di 12,5 mm e 10 mm di diametro sul CFM. Negli altri pazienti è stata impiantato sempre un singolo plug. La dimensione media dei plug impiantati è di $11.7 \pm 2,1$ mm.

Per quanto riguarda l'eziologia delle lesioni, in 6 pazienti l'insorgenza è stata acuta (50% durante l'attività sportiva) e in 6 pazienti è stata graduale.

L'indice di massa corporea (BMI) aveva un valore medio di $25,2 \pm 3,5$ kg/m² (20,5 – 33,4 kg/m²).

I pazienti che, prima della lesione, praticavano sport a livello professionistico o agonistico erano 6 (Tegner 10, 9, 8) mentre gli altri 6 praticavano sport a livello amatoriale (Tegner 7, 6, 5, 4) nessuno praticava sport raramente o non ne praticava (Tegner 3, 2, 1).

Cinque pazienti (42%) erano stati sottoposti a precedenti interventi chirurgici al ginocchio in questione, in particolare in un paziente erano state eseguite microfratture, in 2 pazienti microfratture più meniscectomia mediale e in 1 paziente microfratture più meniscectomia laterale, infine un ultimo paziente era stato sottoposto a debridement e ricostruzione del legamento collaterale mediale.

Per quanto riguarda le procedure chirurgiche associate, in nessun caso queste sono state eseguite contemporaneamente all'impianto dello scaffold.

5.2.2 – Tecnica chirurgica

Il paziente viene posizionato supino sul lettino operatorio, generalmente in anestesia spinale.

Un laccio pneumatico viene applicato alla radice dell'arto per ischemizzare tutto l'arto inferiore durante l'intervento chirurgico. In base alla sede ed alla dimensione della

lesione si esegue una mini artrotomia paratrotulea mediale o laterale. È importante avere una buona visualizzazione della lesione da trattare.

Il sito di lesione viene quindi preparato utilizzando lo strumentario apposito (Cartiheal Ltd, Israele). Il primo step consiste nel misurare la dimensione della lesione con un 'aligner' dedicato, ponendo particolare attenzione ad essere sempre perpendicolari alla lesione (A). Un filo di kirschner viene quindi posizionato perpendicolare al centro della lesione (B). Questo servirà da guida agli strumenti utilizzati nei tre passaggi successivi: un trapano con manicotto che prepara la lesione fino alla profondità desiderata, un alesatore per assicurare che sia stata raggiunta la profondità adeguata (C-D) ed infine lo shaper che viene utilizzato per assicurare la corretta inclinazione delle pareti (E).

Viene quindi creata una loggia di 12 mm di profondità con pareti perpendicolari, che dovrà accogliere press-fit lo scaffold, che presenta una profondità di 10 mm.

A questo punto si rimuove il filo di Kirschner, la loggia viene abbondantemente lavata con soluzione fisiologica per rimuovere qualunque detrito (F-G).

La cartilagine periferica viene regolarizzata con un particolare 'cutter' o con un bisturi a lama piccola per creare un bordo liscio che permetta di inserire agevolmente l'impianto, evitando l'introflessione della cartilagine periferica (H). Lo scaffold Agili-C™ viene inserito manualmente, spingendo con decisione con il pollice e successivamente viene gentilmente impattato 2 mm sotto la superficie articolare, attraverso l'utilizzo di un apposito battitore rivestito da silicone (Figg. 16-17). Quando vengono impiantati più plugs contemporaneamente, è importante preservare un ponte osseo di almeno 5 mm tra gli impianti. La stabilità dell'impianto viene testata eseguendo dei cicli di flessione-estensione, sia prima che dopo la rimozione del laccio ischemico. Infine viene posizionato un drenaggio intrarticolare e la ferita viene suturata per strati.

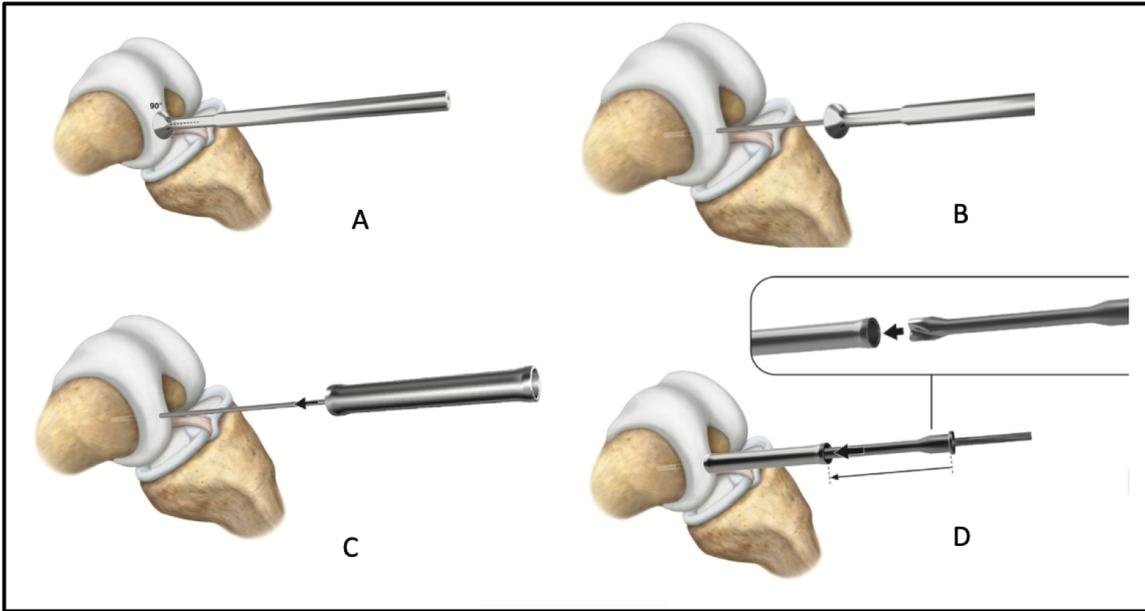


Fig. 16 Tecnica chirurgica. A: misurazione della lesione, B: posizionamento filo di K, C- D: preparazione della lesione con apposite frese

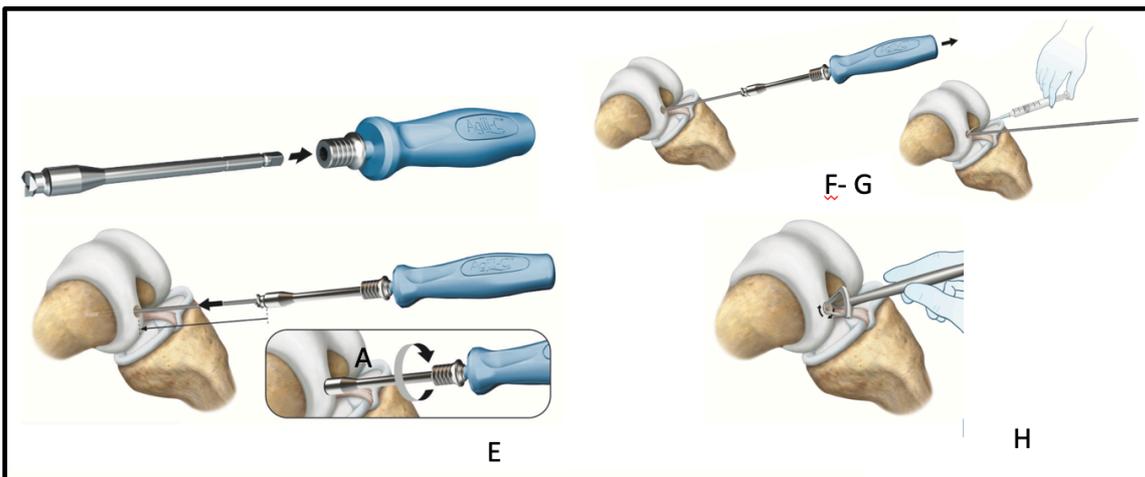


Fig. 17 Tecnica chirurgica. E: rimodellamento conico con apposito shaper, F-G: abbondante lavaggio, H: regolarizzazione cartilagine periferica

5.2.3 – Protocollo riabilitativo

Il protocollo riabilitativo prevede, nell'immediato post-operatorio, la crioterapia, il mantenimento dell'arto in scarico ed in posizione elevata e la compressione con bendaggio.

In seconda giornata inizia la mobilizzazione passiva continua (CPM) (Fig. 18) che viene impostata in modo da permettere delle escursioni di movimento da 0° fino a 70°. Tale

mobilitazione viene adottata per stimolare il rimodellamento della cartilagine neoformata e ridurre la possibilità delle aderenze intrarticolari. Inoltre esercizi di stretching e contrazioni isometriche del quadricipite favoriscono il potenziamento e la ripresa del normale tono muscolare dell'arto.

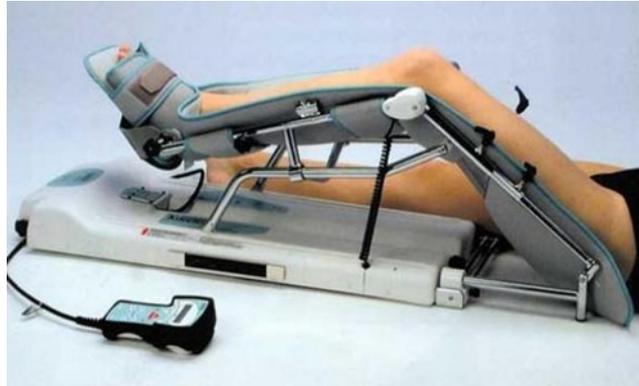


Fig. 18 Kinetec per le mobilizzazioni passive assistite

Dopo due settimane il paziente può iniziare la cyclette, l'idrokinesiterapia è raccomandata a guarigione delle ferite chirurgiche.

Per le prime 4 settimane è permesso solo il carico sfiorato con l'ausilio di due bastoni anti-brachiali, con un successivo carico progressivo fino a raggiungimento del carico totale dopo circa 6 settimane. L'attività sportiva leggera può essere ripresa dopo 6 mesi dall'intervento chirurgico, mentre attività sportiva ad elevato impatto solo dopo un anno. Il livello di attività deve essere commisurato alla tolleranza dimostrata dal paziente, riducendo il carico qualora compaiano segni di intolleranza, come blocchi articolari o idrarti. Ovviamente, lo schema riabilitativo viene adattato al singolo caso; una corretta gestione post-operatoria deve essere relazionata al tipo ed all'entità del danno riparato, oltre che alla risposta del paziente.

5.2.4 – Valutazione dei pazienti

I pazienti sono stati valutati clinicamente in modo prospettico prima dell'intervento chirurgico e a un follow-up di 6-12-18 e 24 mesi, in cui sono stati intervistati per valutare la sintomatologia e la funzionalità del ginocchio, utilizzando la scheda di valutazione soggettiva dell'IKDC, realizzata ricalcando le linee guida dell'ICRS (International Cartilage Preservation and Repair Society) (56). Secondo questo questionario, si può ottenere un punteggio compreso tra 0 e 100, in cui ad uno score alto è associato un alto livello funzionale e una sintomatologia dolorosa di minore entità.

Uno score di 100 viene infatti interpretato come una condizione in cui non ci sono né limitazioni nel condurre le attività della vita quotidiana, né sintomi.

La valutazione oggettiva viene effettuata dal chirurgo sempre utilizzando la scheda di valutazione dell'IKDC. Il grado funzionale del ginocchio dipende dalla presenza di versamento articolare, dalla presenza di limitazione dell'arco di movimento passivo in flessione-estensione, dalla presenza di crepitii articolari e dalla stabilità legamentosa. Il grado finale può essere classificato come normale (A), quasi normale (B), anormale (C) o severamente anormale (D).

Col Tegner Score (57) è stato possibile valutare l'attività fisica e sportiva praticata regolarmente dal soggetto. In questa scala numerica lo 0 equivale ad una condizione di invalidità legata alla patologia del ginocchio, mentre il 10, massimo punteggio ottenibile, corrisponde all'attività professionistica del calcio nelle Serie A, B e C.

Il questionario KOOS (58) è sempre un questionario di valutazione soggettiva completo che indaga sia l'attività quotidiana che quella sportiva, con 9 domande riferite al dolore, 7 ai sintomi, 17 alle funzioni ed attività quotidiane, 5 per l'attività sportiva ed il tempo libero, 4 per la qualità di vita in relazione al problema fisico legato al ginocchio. Ad ogni domanda viene assegnato un punteggio e con una formula dedicata si calcola il punteggio finale (0- condizione grave, 100- condizione buona).

In ultimo, il Lysholm (59) score valuta funzioni della vita quotidiana. Anche qui vengono valutati otto fattori che portano ad un risultato che va da 0 a 100. Il risultato sarà valutato eccellente per un punteggio da 95 a 100, buono da 84 a 94, discreto da 65 a 83 punti e scarso se inferiore a 65 punti. La zoppia, il blocco meccanico del ginocchio e il supporto possono dare un massimo di 25 punti, il dolore e l'instabilità 25 punti ciascuno, la tumefazione e il salire le scale 10 punti ciascuno, lo squat 5 punti.

Tutti i pazienti sono inoltre stati sottoposti a risonanza magnetica a 6-12-18 e 24 mesi per valutare la percentuale di riempimento del difetto fino ad ultimo follow-up a 2 anni.

5.2.5 – Analisi statistica

Il test non parametrico dei ranghi di Wilcoxon per campioni non indipendenti è stato condotto per l'analisi dei risultati (mediane) del campione accoppiato per il periodo di follow-up, fino ai 24 mesi. Il livello di significatività è stato fissato a $\alpha = 0,005$.

È stato inoltre valutato il trend ai diversi follow-up attraverso il test di Cuzick.

Essendo il campione numericamente troppo piccolo, non sono state analizzate ulteriori correlazioni.

5.3 – Risultati

In nessun caso sono stati riscontrati eventi avversi maggiori attribuibili all'intervento.

È stato ottenuto un significativo miglioramento di tutti gli score clinici, dalla valutazione basale fino alla valutazione finale a 24 mesi. Lo score KOOS (Grafico 1) è aumentato significativamente da 47.3 ± 13.6 a 70.3 ± 17.9 a 6 mesi di follow-up ($p=0.005$), per poi aumentare a ancora fino a 78.0 ± 15.5 a 12 mesi di follow-up ($p=0.002$) con un valore finale di 85.6 ± 11.7 a 2 anni dall'intervento chirurgico ($p=0.003$).

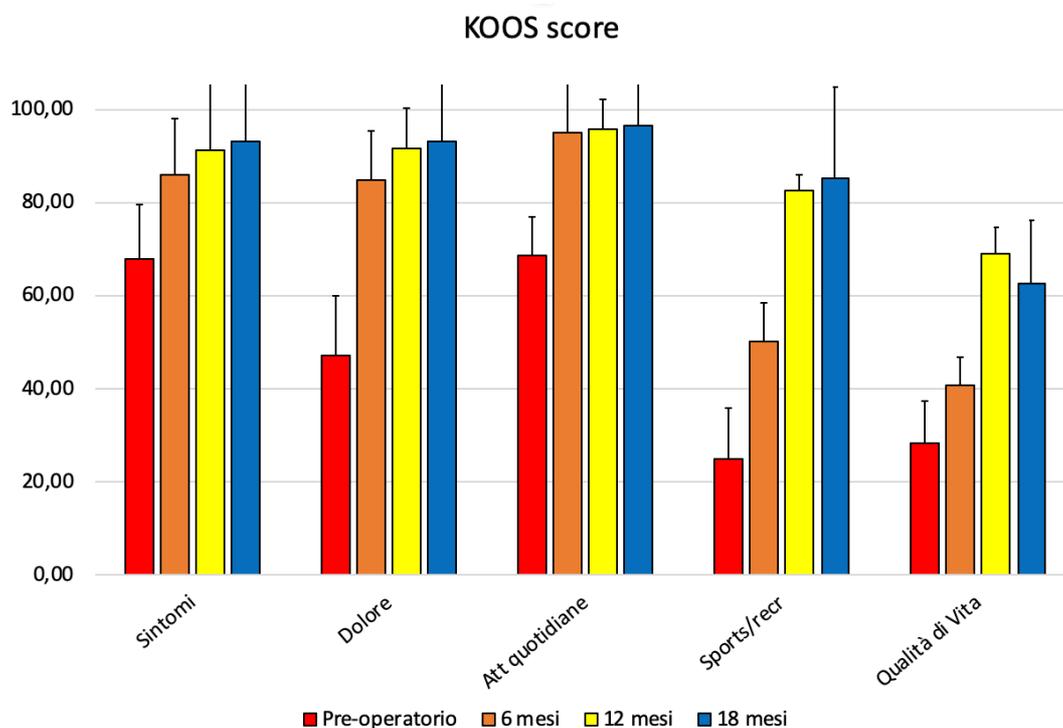


Grafico 1: KOOS score (sintomi, dolore, attività quotidiane, sport, qualità di vita)

L'IKDC soggettivo, da uno score iniziale di $45,59 \pm 12,35$ è passato a $66,48 \pm 16,96$ a 6 mesi, con un ulteriore miglioramento ad ogni follow-up successivo, con un valore al follow-up finale 24 mesi di $82,76 \pm 14,24$, con miglioramento significativo rispetto al valore basale ($p < 0,005$) (Grafico 2).

Un andamento simile si è osservato anche con lo score di Lysholm, che è passato da un valore iniziale di $57 \pm 18,24$ a un valore finale a due anni di follow-up di $88,20 \pm 10,43$, incremento anche in questo caso statisticamente significativo ($p < 0,005$) (Grafico 2).

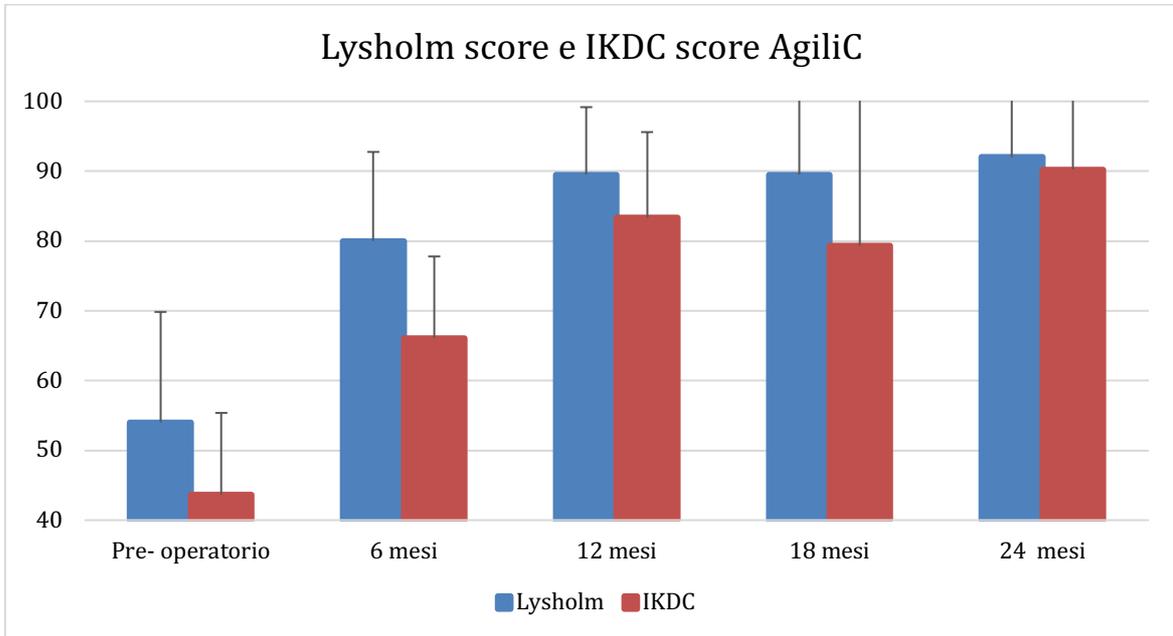


Grafico 2: score IKDC e Lysholm

Anche l'attività sportiva, valutata con il Tegner score, è migliorata significativamente da un valore preoperatorio iniziale di $2,75 \pm 1,6$ fino ad un valore $4,8 \pm 1,2$ a 2 anni ($p=0,027$), ma senza raggiungere il livello di attività sportiva precedente alla lesione (Grafico 3).

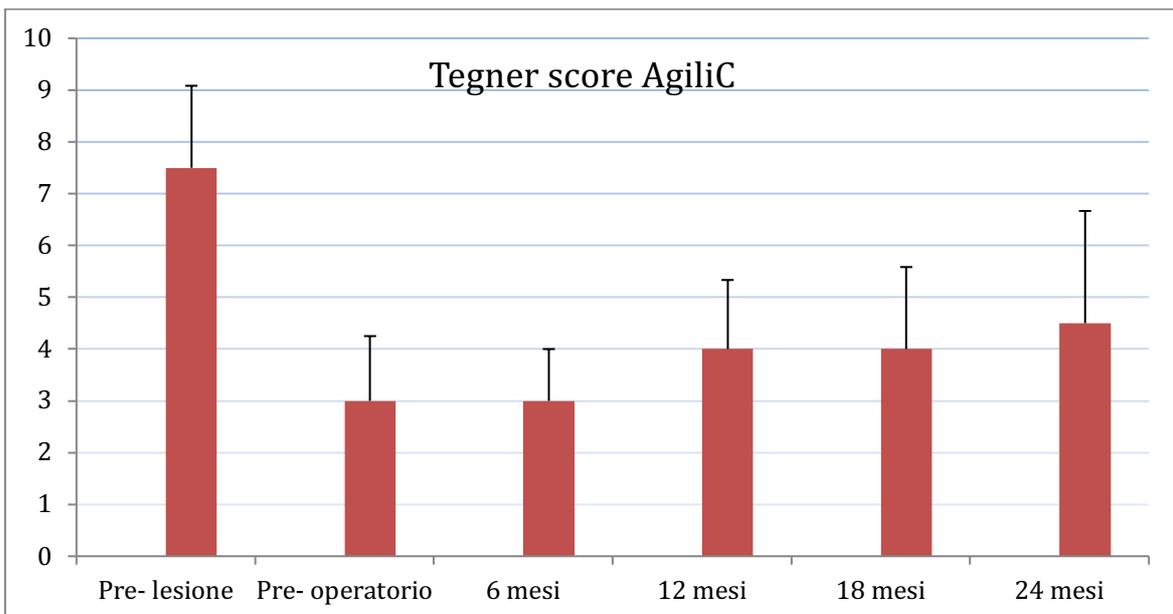


Grafico 3: Tegner, attività sportiva

Dato il limitato numero di pazienti arruolati, non è stato possibile valutare alcuna correlazione con la sede della lesione, gli interventi pregressi, il sesso ed il BMI.

Il difetto osteocondrale è stato riempito alla risonanza magnetica dell'80%±19,4 a 12 mesi di follow-up e del 96.4%±5.7 a 2 anni dall'intervento chirurgico (Figg. 19- 20).

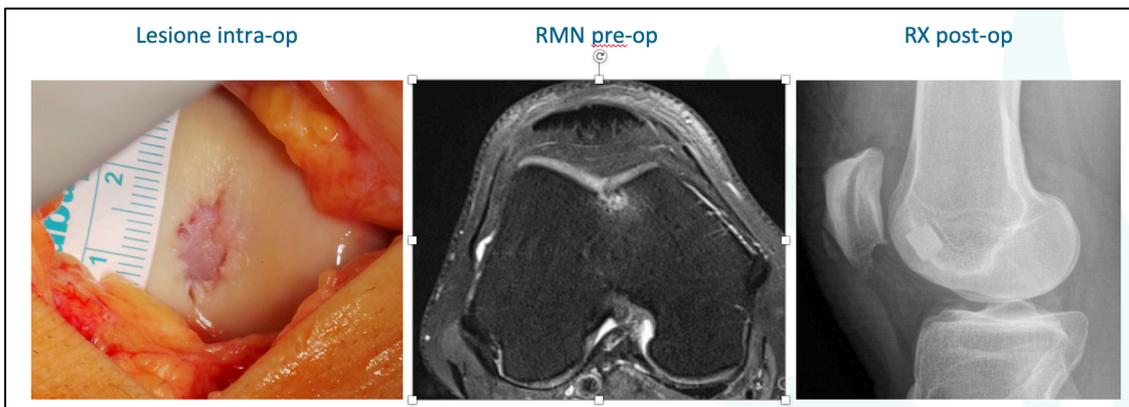


Fig. 19 Immagini in sequenza: lesione intra-operatoria, RMN pre-operatoria, Rx post-operatoria

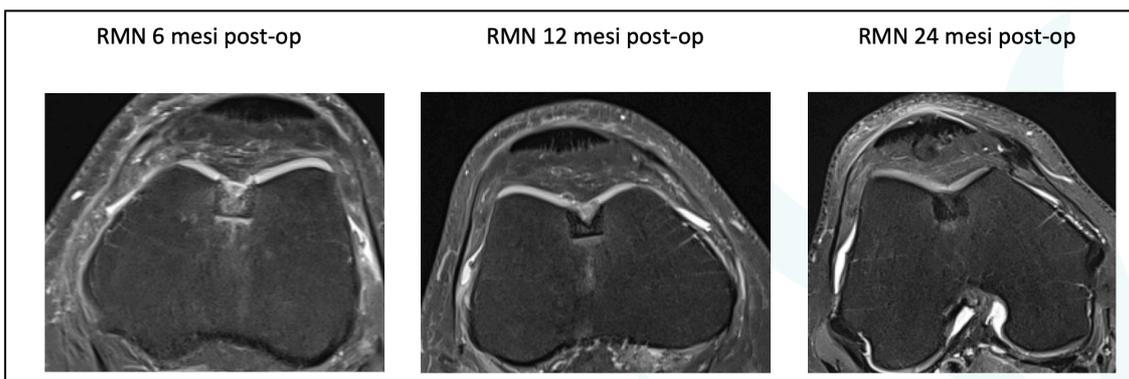


Fig. 20 Immagini RMN in sequenza del riempimento del difetto osteocondrale e formazione del manto cartilagineo a 6-12-24 mesi post-operatori

5.4 – Discussione

Il principale risultato del nostro studio è che l'innovativo scaffold di aragonite Agili-C™ può essere considerato un impianto sicuro, facile da innestare, caratterizzato da una tecnica chirurgica semplice e riproducibile, che riporta dei risultati a breve termine buoni, con un aumento significativo degli score clinici fino all'ultimo controllo a due anni, e nessuna complicanza o fallimento legati all'utilizzo dello scaffold. La tecnica di impianto press-fit è più semplice e meno costosa rispetto alle procedure che coinvolgono le colture cellulari, ma è essenziale preparare accuratamente l'area della

lesione al fine di produrre un sito di impianto adeguato. Se la tecnica chirurgica non viene seguita correttamente, l'impianto può mobilizzarsi o rompersi. La rottura dell'impianto può portare al rilascio di cristalli di aragonite nell'articolazione. Questi hanno un alto potenziale infiammatorio e possono alterare l'omeostasi ambientale dell'articolazione, aumentando anche il rischio di infezione, che è la causa più comune di fallimento e rimozione dell'impianto.

La tecnica è minimamente invasiva per il paziente stesso e il recupero è pari a quello di altri trattamenti chirurgici mirati alla rigenerazione della cartilagine. Al di là di un carico protetto nel primo mese, il paziente a tre mesi ha recuperato completamente quelle che sono le attività quotidiane, anche se, per rientrare a praticare l'attività sportiva, i pazienti devono aver recuperato completamente la muscolatura dell'arto inferiore. Un'attività sportiva ad elevato impatto è comunque sconsigliata per un anno dall'intervento chirurgico.

Non si assiste solamente a un miglioramento degli score clinici, funzionali, ma anche dello score legato all'attività sportiva. I pazienti, pur non raggiungendo il livello di attività sportiva precedente il trauma, presentano un aumento costante del Tegner score fino al controllo dei due anni.

Probabilmente uno degli aspetti più interessanti è anche il riempimento, pressoché completo a due anni di follow-up, della lesione alla risonanza magnetica ed il riassorbimento dello scaffold alla radiografia.

Diversi studi riportano dati incerti non solo riguardo il riempimento delle lesioni alla risonanza magnetica, ma anche per quanto riguarda il tipo di tessuto rigenerato, soprattutto quando si parla dello scaffold bifasico TruFit™ (60), o risultati variabili, cioè un mancato costante riempimento della lesione alla risonanza magnetica, con formazione di cisti ossee nel tessuto osseo subcondrale e persistente edema osseo subcondrale anche a lungo termine, per quanto riguarda lo scaffold biomimetico italiano Maioregen (Finceramica) (61). Questi risultati di risonanza magnetica non correlano però con i risultati clinici, che mostrano invece un costante miglioramento degli score clinici, IKDC e Lysholm score, ed anche del Tegner. In un articolo del 2014 Delcogliano et al. (50) riportano i risultati a due anni di follow-up di 49 pazienti, di età media di 37 ± 14 anni, (15–66 anni), di cui 29 atleti professionisti, con un recupero statisticamente significativo della VAS, dell' IKDC, Lysholm, ed infine del Tegner

score. Esistono diversi studi in letteratura che riportano un miglioramento degli score clinici e funzionali del ginocchio in seguito a trattamento anche di ampie lesioni osteocondrali con lo scaffold MaioRegen, ed anche per particolari tipi di patologie, come l'osteochondrite dissecante (62).

Una recente review della letteratura riporta risultati promettenti a breve e medio termine dei pazienti operati con l'innesto di MaioRegen nelle lesioni osteocondrali del ginocchio, con una bassa percentuale di complicanze e fallimenti, confermando la sicurezza di questo scaffold (63). Verhaegen et al. (64) riportano in una review della letteratura i risultati dello scaffold TriFit™ per il trattamento delle lesioni osteocondrali del ginocchio. I dati non dimostrano la superiorità di questo scaffold rispetto ad altri trattamenti cartilaginei, sia per quanto riguarda i risultati clinici che, come accennato precedentemente, per quanto riguarda la capacità di rigenerare osso e cartilagine, con prove contrastanti sul tipo di tessuto rigenerato e nessuno studio che sia riuscito a dimostrare la capacità osteoconduttiva di questo scaffold.

Le proprietà osteoconduttive invece dello scaffold innovativo di aragonite, Agili-C™, sono state riportate in un recente studio di Matta et al (65) dove gli autori valutano in vitro il potenziale osteogenico della fase ossea dello scaffold bifasico, utilizzando cellule mesenchimali del midollo osseo di esseri umani adulti. Gli autori comparano la differenziazione osteogenica in vitro delle cellule mesenchimali di derivazione del midollo osseo poste unicamente in un medium osteogenico con le stesse cellule poste in un medium osteogenico ed aggiunta della fase ossea dello scaffold bifasico. L'effetto dell'esposizione allo scaffold è stato successivamente valutato tramite test di proliferazione, valutazione fenotipica ed espressione genica. Il tasso di proliferazione e l'espressione genica pro differenziazione osteoblastica sono risultati maggiori nel gruppo esposto allo scaffold, dimostrando chiaramente il potenziale osteogenico dello stesso e confermando i risultati di precedenti studi in cui veniva dimostrata la capacità osteoconduttiva dei prodotti di derivazione corallina (66- 67).

La capacità osteogenica e condrogenica dello scaffold bifasico Agili-C™ è stata dimostrata anche in uno studio animale. Per migliorare il potenziale rigenerativo dello scaffold, sono state apportate modifiche meccaniche come la creazione di una griglia quadrata superficiale con fori di 1-2 mm di profondità, ed è stato inoltre aggiunto acido ialuronico a impregnare lo scaffold. Nello studio gli autori dimostrano che le capre

trattate con questa versione modificata dello scaffold riportano risultati migliori degli altri tre gruppi (lesione lasciata vuota, lesione trattata con scaffold non modificato e lesione trattata con scaffold modificato nella fase ossea) con la formazione di sia di osso che cartilagine ialina all'esame istologico. (68)

In uno studio su donatori umani, il potenziale di stimolare la crescita della cartilagine attraverso la migrazione dei condrociti nella struttura 3D dello scaffold, la capacità di mantenere le cellule viabili e fenotipicamente corrette e la deposizione di una matrice cartilaginea sono stati dimostrati su 14 donatori (69).

Gli stessi risultati riportati nell'animale e nel donatore sono stati riscontrati anche in uno studio in vivo su 21 pazienti, di età media $31 \pm 8,6$ anni, trattati con l'impianto dello scaffold Agili-C nella versione ultima conica per difetti cartilaginei di circa $2,5 \pm 1,7$ cm², con un aumento degli score clinici, con nessuna differenza rispetto alla versione cilindrica se non per un significativo minor rischio di revisione. Anche la risonanza magnetica mostra un miglioramento dell'integrazione dello scaffold, a 12 mesi di follow-up (70).

I limiti di questo studio sono il numero ridotto di pazienti, la mancanza di un gruppo controllo e il breve follow-up. Uno studio multicentrico, randomizzato, che compara i risultati dello scaffold Agili-C versus le microfratture, trattamento attualmente considerato 'gold standard' per i difetti condrali ed osteocondrali, è attualmente in corso in Israele, Europa e Stati Uniti.

5.5 – Conclusioni

I risultati di questo scaffold acellulare, 'off the shelf' sono promettenti, con un aumento significativo degli score clinici e dell'attività sportiva in pazienti giovani, affetti da lesioni osteocondrali di piccola e media dimensione. La tecnica chirurgica è semplice e riproducibile, minimamente invasiva per il paziente.

I risultati della risonanza magnetica, con un riempimento quasi completo (96,4%) della lesione ad un follow-up breve di due anni, sono davvero singolari.

BIBLIOGRAFIA

1. BUCKWALTER JA, MANKIN HJ, "Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions", *Instr Course Lect.* 1998;47:477-86.
2. PRIANO F, ROSA D, "Innesti osteocondrali autologhi: tecnica artroscopica a mosaico", in *Le lesioni cartilaginee: inquadramento diagnostico e terapeutico*, Springer-Verlag, Italia Milano, 2002.
3. FARR J, COVELL D, LATTERMANN C, "Cartilage lesions in patellofemoral dislocations: incidents/locations/when to treat," *Sports med arthroscopy*, pp. 181-186, september 2012.
4. POOLE A, "What type of cartilage repair are we attempting to attain?," *Bone Joint Surg Am.*, pp. 40-44, 2003.
5. MARCACCI M, ZAFFAGNINI S, KON E, ET AL, "Arthroscopic autologous chondrocyte transplantation: technical note", *Knee Surg Sports traumatol arthrosc*, pp. 154-159, may 2002.
6. BRITTBERG M, TALLHEDEN T, SJOGREN-JANSSON B, LINDHAL A, PETERSON L, "Autologous chondrocytes used for articular cartilage repair: an update", *Clin Orthop*, pp. 337-348, october 2001.
7. CURL WW, KROME J, GORDON ES, RUSHING J, SMIT BP, POEHLING GG, "Cartilage injuries: A review of 31,516 knee arthroscopies", *Arthroscopy*, 1997; 13:456-460.
8. NOYES FR, BASSET RW, GROOD ES, BUTLER DL, "Arthroscopy in acute hemarthrosis of the knee. Incidence of anterior cruciate tears and other injuries", *J Bone Joint Surg*, 1980;62A:687-695.
9. WIDUCHOWSKI W, WIDUCHOWSKI J, TRZASKA T, "Articular cartilage defects: study of 25,124 knee arthroscopies", *Knee*, 2007; 14(3):177-82.
10. ZAMBER RW, ET AL, "Articular cartilage lesion of the knee", *Arthroscopy*, 1989;5; 258-268.
11. PIRANI P, PONZETTO G, ZINI R, "Trattamento delle patologie associate a danno condrale: le lesioni meniscali" in *Le Lesioni Cartilaginee: inquadramento diagnostico e terapeutico*, 2002, Springer-Verlag Italia, Milano.

12. HUNTER W, "On structure and disease of articulating cartilage", *Philos Trans R Soc Lond*, 1743; 24B:514-521.
13. BRANCA A, ANNICCHIARICO N, DI PALMA L, "Evoluzione del trattamento chirurgico della patologia osteocondrale", in *Le Lesioni cartilaginee: inquadramento diagnostico e terapeutico*, a cura di Priano F, Rosa D, 2002, Springer-Verlag Italia, Milano.
14. SHAPIRO F, SHAPIRO F, KOIDE S, GLIMCHER MJ, "Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage", *J Bone Joint Surg*, 1993; 75A:532-53.
15. BUCKWALTER JA, ROSENBERG LC, HUNZIGER EB, "Articular Cartilage: Composition, structure, response to injury and methods of repair. In: ERWIN JW, ed. *Articular cartilage and knee joint function: basic science and arthroscopy*", New York: Raven Press, 1990;19-56.
16. McCORMICK F, HARRIS JD, ABRAMS GD, FRANK R, GUPTA A, HUSSEY K, WILSON H, BACH B JR, COLE B, "Trends in the surgical treatment of articular cartilage lesions in the United States: an analysis of a large private-payer database over a period of 8 years", *Arthroscopy*, 2014 Feb;30(2):222-6.
17. TUAN RS, CHEN AF, KLATT BA, "Cartilage regeneration", *J Am Acad Orthop Surg*, 2013 may;21(5):303-11.
18. HANGODY L, KISH G, KARPATI Z, UDVARHELYI I, SZIGETI I, BELY M, "Mosaicplasty for the treatment of articular cartilage defects: Application in clinical practice", *Orthopedics*, 1998; 21(7):751-56.
19. PEDERZINI L, ET AL, "Innesti osteocondrali autologhi: tecnica artroscopica a mosaico", in *Le lesioni cartilaginee: inquadramento diagnostico e terapeutico* a cura di Priano F, Rosa D, 2002, Springer-Verlag, Italia, Milano.
20. MARCACCI M, KON E, ZAFFAGNINI S, VISANI A, "Use of autologous grafts for reconstruction of osteochondral defects of the knee", *Orthopedics*, 1999; 22:595-600.
21. MARCACCI M, KON E, ZAFFAGNINI S, IACONO F, NERI MP, VASCELLARI A, VISANI A, RUSSO A, "Multiple osteochondral arthroscopic grafting (mosaicplasty) for cartilage defects of the knee: prospective study results at 2-year follow-up", *Arthroscopy*, 2005; 21(4):462-70.

22. DOZIN B, MALPELI M, CANCEDDA R, BRUZZI P, CALCAGNO S, MOLFETTA L, PRIANO F, KON E, MARCACCI M, “Comparative evaluation of autologous chondrocyte implantation and mosaicplasty: a multicentered randomized clinical trial”, *Clin J Sport Med*, 2005; 15(4):220-6.
23. TETTA C, BUSACCA M, MOIO A, RINALDI R, DELCOGLIANO M, KON E, FILARDO G, MARCACCI M, ALBISINNI U, “Knee osteochondral autologous transplantation: long-term MR findings and clinical correlations”, *Eur J Radiol*, 2010; 76(1):117-23.
24. ZAK L, KRUSCHE-MANDL I, ALDRIAN S, TRATTNIG S, MARLOVITS S, “Clinical and MRI evaluation of medium- to long-term results after autologous osteochondral transplantation (OCT) in the knee joint”, *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2014 Jun;22(6):1288-97.
25. YAMASHITA F, SAKAKIDA K, SUZU F, TAKAI S, “The transplantation of an autogenic osteochondral fragment for osteochondritis dissecans of the knee”, *Clin Orthop*, 1985;201:43-50.
26. BOBIC V, ”Arthroscopic osteochondral autograft transplantation in anterior cruciate ligament reconstruction: A preliminary clinical study”, *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 1996; 3:262-264.
27. BRUNS J, ROSENBACH B, KAHRS J, “Etiopathogenetic aspects of medial osteochondrosis dissecans tali”, *Sportverletz Sportschaden*, 1992 Jun; 6(2):43-9.
28. HOMMINGA GN, BULSTRA SK, BOUW-MEESTER PSM, VAN DER LINDEN AJ, “Perichondral grafting for cartilage lesions of the knee”, *J Bone Joint Surg*, 1990;72B:1003-7.
29. MINAS T, PETERSON L, “Chondrocyte transplantation. Operative Techniques” in *Orthopedics* 1997; vol 7,n 4 (October): 323-33.
30. RITSILÄ VA, SANTAVIRTA S, ALHOPURO S, POUSSA M, JAROMA H, RUBAK JM, ESKOLA A, HOIKKA V, SNELLMAN O, OSTERMAN K, “Periosteal and perichondral grafting in reconstructive surgery”, *Clin Orthop Relat Res*, 1994;(302):259-65.
31. MINAS T, “Articular cartilage regeneration: Chondrocyte transplantation and other technologies”. Presented at the meeting of the American Academy of Orthopaedic Surgeons, San Francisco, CA, February, 1997.

32. BRITTBERG M, TALLHEDEN T, SJOGREN-JANSSON B, LINDHAL A, PETERSON L, "Autologous chondrocytes used for articular cartilage repair: an update", *Clin Orthop*, 2001; (391Suppl):S337-48.
33. PETERSON L, MINAS T, BRITTBERG M, NILSSON A, SJOGREN-JANSSON E, LINDHAL A, "Two-to 9-years outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee", *Clin Orthop*, 2000; (374):212-34.
34. MINAS T, PETERSON L, "Chondrocyte transplantation. Operative Techniques" in *Orthopedics* 1997; vol 7,n 4 (October): 323-33.
35. PETERSON L, BRITTBERG M, KIVIRANTA I, AKERLUND EL, LINDHAL A, "Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability", *Am J Sports Med*, 2002; 30(1):2-12.
36. SGAGLIONE NA, MINIACI A, GILLOGLY SD, CARTER TR, "Update on advanced surgical techniques in the treatment of traumatic focal articular cartilage lesions in the knee", *Arthroscopy*, 2002; 18:9-32.
37. MICHELI LJ, BROWNE JE, ERGGELET C, FU F, MANDELBAUM B, MOSELEY JB, ZURAKOWSKI D, "Autologous chondrocytes implantation of the knee: Multicenter experience and minimum 3-years follow-up", *Clin J Sport Med*, 2001;11(4): 223-8.
38. FEED LE, MARQUIS JC, NOHRIA A, ET AL, "Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers", *J Biomed Mater Res*, 1993; 27:11-23.
39. CATERSON EJ, NESTI LJ, LI WJ, ET AL, "Three-dimensional cartilage formation by bone marrow-derived cells seeded in polylactide/alginate amalgam", *J Biomed Mater Res*, 2001; 57(3):394-403.
40. GIANNINI S, BUDA R, VANNINI F, ET AL, "Arthroscopic Autologous Chondrocyte Implantation in Osteochondral Lesions of the Talus: Surgical Technique and Results", *Am J Sports Med*, 2008; 36(5):873-80.
41. MARCACCI M, ZAFFAGNINI S, KON E, ET AL, "Arthroscopic autologous chondrocyte transplantation: technical note", *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2002 May; 10:154-9.

42. MARCACCI M, KON E, ZAFFAGNINI S, ET AL, “Arthroscopic second generation autologous chondrocyte implantation”, *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2007;15:610-9.
43. MITHOEFER K, MCADAMS TR, SCOPP JM, MANDELBAUM BR, “Emerging options for treatment of articular cartilage injury in the athlete”, *Clin Sports Med*, 2009; 28(1):25-40.
44. BARBER FA, DOCKERY WD, “A computed tomography scan assessment of synthetic multiphase polymer scaffolds used for osteochondral defect repair”, *Arthroscopy*, 2011; 27(1):60-4.
45. BEDI A, FEELEY BT, WILLIAMS RJ 3RD, “Management of articular cartilage defects of the knee”, *J Bone Joint Surg Am*, 2010; 92(4):994-1009.
46. KON E, GOBBI A, FILARDO G, DELCOGLIANO M, ZAFFAGNINI S, MARCACCI M, “Arthroscopic second-generation autologous chondrocyte implantation compared with microfracture for chondral lesions of the knee: prospective nonrandomized study at 5 years”, *Am J Sports Med*, 2009 ;37:33-41.
47. KON E, DI MARTINO A, FILARDO G, TETTA C, BUSACCA M, IACONO F, DELCOGLIANO M, ALBISINNI U, MARCACCI M, “Second-generation autologous chondrocyte transplantation: MRI findings and clinical correlations at a minimum 5-year follow-up”, *Eur J Radiol*, 2011;79:382-8.
48. KON E, FILARDO G, CONDELLO V, COLLARILE M, DI MARTINO A, ZORZI C, MARCACCI M, “Second-generation autologous chondrocyte implantation: results in patients older than 40 years”, *Am J Sports Med*, 2011; 39:1668-75.
49. KON E, FILARDO G, BERRUTO M, BENZAZZO F, ZANON G, DELLA VILLA S, MARCACCI M, “Articular cartilage treatment in high-level male soccer players: a prospective comparative study of arthroscopic second-generation autologous chondrocyte implantation versus microfracture”, *Am J Sports Med*, 2011; 39:2549-57.
50. DELCOGLIANO M, DE CARO F, SCARAVELLA E, ZIVERI G, DE BIASE CF, MAROTTA D, MARENGHI P, DELCOGLIANO A, “Use of innovative biomimetic scaffold in the treatment for large osteochondral lesions of the knee”, *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2014 Jun; 22(6):1260-9.

51. MARCACCI M, ANDRIOLO L, KON E, SHABSHIN N, FILARDO G, “Aethiology and pathogenesis of bone marrow lesions and osteonecrosis of the knee”, *EFORT Open Rev* 2017, Mar 13; 1(5):219-224.
52. GOMOLL A, MADRY H, KNUTSEN G, VAN DIJK N, SEIL R, BRITTBORG M, KON E, “The subchondral bone in articular cartilage repair: current problems in the surgical management”, *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, n 18(4), pp 434-447, 2010.
53. DEMERS C, HAMDY K, CORSI F, CHELLAT F, TABRIZIAN M, YAHIA L, “Natural coral exoskeleton as a bone graft substitute: a review”, *Biomed Mater Eng*, vol 12, pp 15-35, 2002.
54. SHAHGALDI BF, “Coral graft restoration of osteochondral defects”, *Biomaterials*, 1988 Jan-feb; 19(1-3): 229-37.
55. KON E, FILARDO G, ROFFI A, ANDRIOLO L, MARCACCI M, “New trends for knee cartilage regeneration: from cell- free scaffolds to mesenchymal stem cells”, *Curr Rev Musculoskeletel Med*, vol 5, no 3, pp 236-243, 2012.
56. ICRS cartilage injury evaluation package, 2000, http://www.cartilage.org/evaluation_package/ICRS_evaluation.pdf.
57. TEGNER W, LYSHOLM J, “Rating systems in evaluation of knee ligament injuries”, *Clin Orthop Relat Res*, Vol 198 p 43-49, 1985.
58. ROOS E, LOHMANDER L, “The knee injury and osteoarthritis outcome score (KOOS): from joint injury to osteoarthritis”, *Health Qual Life Outcomes*, 2003.
59. LYSHOLM J, “Evaluation of knee ligament surgery results with special emphasis on use of a scoring scale”, *The American J of Sports Med*, vol.10, n 3, 1982.
60. GELBER PE, BATISTA J, MILLAN-BILLI A, ET AL, “Magnetic resonance evaluation of TruFit plugs for the treatment of osteochondral lesions of the knee shows the poor characteristics of the repair tissue”, *Knee*, 2014 Aug; 21(4):827-32.
61. CHRISTENSE BB, FOLDAGER CB, JENSEN J, JENSEN NC, LIND M, “Poor osteochondral repair by a biomimetic collagen scaffold: 1-3 year clinical and radiological follow-up”, *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2016 Jul; 24(7):2380-7.

62. DELCOGLIANO M, MENGHI A, PLACELLA G, ET AL, “Treatment of osteochondritis dissecans of the knee with a biomimetic scaffold. A prospective multicenter study”, *Joints*, 2014, Aug 1, 2(3): 102-108.
63. D’AMBROSI R, VALLI F, DE LUCA P, URSINO N, USUELLI FG, “MaioRegen Osteochondral Substitute for the Treatment of Knee Defects: A Systematic Review of the Literature”, *J. Clin. Med.*, 2019, 8, 783.
64. VERHAEGEN J, CLOCKAERTS S, VAN OSCH G.J.V.M, SOMVILLE J, VERDONK P, MERTENS P, “TruFit Plug for Repair of Osteochondral Defects—Where Is the Evidence? Systematic Review of Literature”, *Cartilage*, 2015, Vol. 6(1) 12–19.
65. MATTA C, SZUCS-SOMOGYI C, KON E, ET AL, “Osteogenic differentiation of human bone marrow- derived mesenchymal stem cells is enhanced by aragonite scaffold”, *Differentiation*, 2019 May- June; 107:24-34.
66. CHIROFF RT, WHITE EW, WEBER KN, ROY DM, “Tissue ingrowth of replamineform implants”, *J Biomed Mater Res*, 1975 Jul;9(4): 29-45.
67. OLAH L, BORBAS L, “Properties of calcium carbonate- containing composite scaffolds”, *Acta Bioeng Biomech*, 2008; 10(1):61-6.
68. KON E, FILARDO G, ROBINSON D, ET AL, “Osteochondral regeneration using a novel aragonite- hyaluronate bi-phasic scaffold in a goat model”, *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2014 Jun; 22(6):1452-64.
69. CHUBINSKAYA S, DI MATTEO B, LOVATO L, IACONO F, ROBINSON D, KON E, “Agili- C implant promotes the regenerative capacity of articular cartilage defects in an ex-vivo model”, *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2019 Jun; 27(6):1953-64.
70. KON E, FILARDO G, PERDISA F, VENIERI G, MARCACCI M, “Clinical results of multilayered biomaterials for osteochondral regeneration”, *J Exp Orthop*, 2014 Dec; 1(1):10.