

Alma Mater Studiorum - Università degli Studi di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CHIRURGICHE

Ciclo XXXI

Settore Concorsuale:

**Area 06 - Scienze mediche > 06/F - Clinica chirurgica integrata >
06/F4 Malattie apparato locomotore e medicina fisica e riabilitativa**

Settore Scientifico Disciplinare:

Area 06 - Scienze mediche > MED/33 Malattie apparato locomotore

Confronto tra l'impiego di midollo osseo
concentrato, matrice ossea demineralizzata e PRF
e le cellule mesenchimali espanse e granuli di
calcio fosfato nel trattamento dei ritardi
consolidazione

Presentata da: Dott. Cevolani Luca

Coordinatore Dottorato

Prof.ssa Annalisa Patrizi

Supervisore

Prof. Davide Maria Donati

Esame finale anno 2019

Indice

ABSTRACT	1
1 – INTRODUZIONE	5
1.1 – DEFINIZIONI	5
1.2 – TRATTAMENTO DEI RITARDI DI CONSOLIDAZIONE	5
1.3 – EZIOLOGIA	8
1.4 – OBIETTIVI	10
1.4.1 – RAZIONALE DELL’UTILIZZO DEL MIDOLLO OSSO AUTOLOGO	12
1.4.2 – RAZIONALE DELL’UTILIZZO DEL PRF	13
1.4.3 – RAZIONALE DELL’UTILIZZO DELLA MATRICE OSSEA DEMINERALIZZATA	14
1.4.4 – RAZIONALE DELL’UTILIZZO DELLE CELLULE MESENCHIMALI ESPANSE	15
2 – MATERIALI E METODI	17
2.1 – CRITERI DI INCLUSIONE	17
2.2 – GRUPPO 1: CELLULE MIDOLLARI CONCENTRATE E MATRICE OSSEA DEMINERALIZZATA	17
2.3 – GRUPPO 2: CELLULE MESENCHIMALI ESPANSE E GRANULI DI CALCIO FOSFATO	22
2.4 – TECNICA CHIRURGICA	23
2.5 – FOLLOW-UP	23
2.6 – CASISTICA	25
2.7 – ANALISI DEI DATI	27

4 – RISULTATI	29
4.1 – CASE REPORT 1	31
4.2 – CASE REPORT 2	32
5 – DISCUSSIONE	35
6 – CONCLUSIONI	38
7 – BIBLIOGRAFIA	40
8 – INDICE DELLE FIGURE	48
9 – RINGRAZIAMENTI	50

Abstract

Obiettivo

L'obiettivo dello studio è determinare l'efficacia di una singola applicazione di cellule mesenchimali del midollo osseo espanse addizionate a granuli di fosfato tricalcico rispetto ad una singola infiltrazione con midollo osseo concentrato e matrice ossea demineralizzata. Lo studio prevede il raffronto di due tecniche mininvasive utilizzate per il trattamento dei ritardi di consolidazione. Lo studio si articola in due gruppi. Nel Gruppo 1 sono raccolti i pazienti trattati con cellule midollari concentrate, matrice ossea demineralizzata e PRF; nel gruppo 2 sono raccolti i pazienti trattati con cellule mesenchimali espanse e granuli di fosfato tricalcico (progetto Europeo REBORN). Obiettivo dello studio è testare la superiorità dell'utilizzo di MSCs espanse rispetto alle sole cellule midollari concentrate.

Materiali e metodi

Dal novembre 2008 al dicembre 2017 sono stati trattati 30 pazienti. I pazienti erano 17 maschi e 13 femmine, di età compresa fra 17 e 73 anni (età media di 42 anni). Tra questi, 23 pazienti sono stati trattati con una singola infiltrazione con MSCs concentrate e DBM (Gruppo 1); i restanti 7 con MSCs espanse e granuli di β -TCP (Gruppo 2). La sede di trattamento era la tibia in 12 casi ed il femore in 18 casi. I ritardi di consolidazione trattati provenivano in 12 casi da fratture a due

frammenti, in 20 casi da fratture a tre frammenti ed in 2 casi da fratture comminute.

Risultati

Dopo il primo trattamento, 17 pazienti su 23 (73%) di pazienti del Gruppo 1 potevano considerarsi guariti a fronte di 7 su 7 (100%) pazienti del Gruppo 2. Il tempo medio di guarigione è stato di 12 mesi nel Gruppo 1 (range 3 – 34 mesi) e di 6 mesi (range 3 – 8 mesi) nel Gruppo 2.

In nessuno dei pazienti di entrambi i Gruppi sottoposti a procedura si sono registrate complicanze locali successivamente quali febbre, rigetto, infezione e dolore.

Nei 7 pazienti del Gruppo 1 che non sono guariti dopo l'intervento, è stato necessario procedere alla sostituzione dei mezzi di sintesi. Dopo tale procedura, lo stato di mancata consolidazione si risolveva in un periodo di 7 mesi in media (range 6 – 12 mesi).

I ritardi di consolidazione localizzati al femore hanno mostrato un maggior rischio di fallimento indipendentemente dal tipo di trattamento eseguito rispetto alle mancate consolidazioni della tibia. La percentuale di fallimento del trattamento nelle fratture del femore è stata del 33% dopo la procedura, mentre nessun ritardo di consolidazione di tibia è andata incontro a fallimento. Tale dato è risultato statisticamente significativo all'analisi univariata ($p < 0,05$).

Non si è trovata correlazione tra la sede della mancata consolidazione (diafisaria o meta/epifisaria), il sesso, il tipo di frattura (semplice o comminuta) o la presenza di callo ipertrofico o atrofico.

Nessuno dei pazienti di entrambi i Gruppi in cui è stata raggiunta la consolidazione lamentava dolore in corrispondenza della sede in cui era stata effettuata l'infiltrazione e dove era presente il ritardo di consolidazione. Non presentavano alcuna limitazione al movimento delle articolazioni adiacenti alla sede della frattura.

I pazienti che avevano un lavoro prima della frattura hanno potuto riprenderlo in media dopo 3 mesi dall'intervento infiltrativo (minimo dopo 1 mese massimo dopo 6 mesi).

Conclusioni

Il trattamento dei ritardi di consolidazione delle ossa lunghe con MSCs espanse e granuli di fosfato tricalcico rappresenta un sistema valido in quanto si è potuto applicare in una chirurgia di breve durata (massimo due giorni di degenza), con applicazione mininvasiva (ridotta esposizione, ridotti tempi chirurgici) in assenza di complicazioni locali ed eventi avversi (febbre, rigetto, infezione, dolore). La metodica è risultata ben accettata dai pazienti che hanno potuto riprendere l'attività fisica (carico) e funzionale in tempi relativamente brevi. Inoltre, questo trattamento ha dimostrato una migliore capacità di ottenere la risoluzione della mancata consolidazione rispetto all'impiego di cellule concentrate e DBM.

Considerata la semplicità della metodica ed il veloce ripristino dell'attività, noi riteniamo che vi sia indicazione al trattamento in tutti i casi in cui ci si trova ad affrontare un ritardo di consolidazione anche a lungo termine. Tuttavia, nei casi in cui ci si trova di fronte ad un ambiente atrofico o con scarso contatto fra i capi di frattura, si deve considerare l'utilizzo di un diverso materiale di supporto per la

guarigione.

1 – Introduzione

1.1 – Definizioni

Sono circa due milioni le fratture che interessano le ossa lunghe che ogni anno vengono trattate negli Stati Uniti il 5% delle quali esita in ritardo di consolidazione o in pseudoartrosi.

Il trattamento precoce attuato su certi tipi di fratture ne ha ridotto l'incidenza, anche se, paradossalmente, l'ha aumentata in altri tipi di fratture, come ad esempio quelle della tibia.

In condizioni fisiologiche, la maggior parte delle fratture esitano in guarigione entro le 6-8 settimane dal trauma. In presenza di una compromissione del processo di guarigione ossea a causa di un ambiente biologico o meccanico alterato, nel caso in cui siano coinvolte ossa lunghe che presentino una corticale spessa, come nel caso della diafisi di femore uditive, il tempo di guarigione delle fratture può aumentare [1]. Per definizione, si definisce “ritardo di consolidazione” una frattura che non sia guarita ad una distanza di 4-6 mesi dal trauma. Viene definita invece “pseudoartrosi” una frattura che non mostri segni di guarigione ad una distanza di 6-9 mesi dal trauma.

1.2 – Trattamento dei ritardi di consolidazione

Per il corretto trattamento delle pseudoartrosi o dei ritardi di consolidazione, è di primaria importanza individuare i fattori di rischio locali e generali che hanno determinato il fallimento della riparazione ossea [2]. Recentemente, è stato codificato il “*Diamond Concept*”

(Figura 1) che ha puntualizzato le differenti pertinenze meccaniche e biologiche, queste ultime distinte per cellule, *scaffold* e fattori di crescita [3].

Sotto il profilo meccanico deve essere ripristinato lo spettro di stabilità che considera l'insieme dell'osso e dell'impianto di osteosintesi. Lo spettro di stabilità interpreta la legge di Wolff fornendo indicazioni circa la necessità di modulare la rigidità della sintesi in ragione del grado di instabilità intrinseca della pseudoartrosi [4].

Tenendo in considerazione l'aspetto meccanico e biologico del problema, avranno differenti indicazioni di trattamento a seconda che siano localizzate a livello diafisario, metaepifisario o epifisario. Così definite si può ipotizzare un algoritmo di trattamento che prenda in considerazione tutti i punti sovraesposti ovvero:

1) Pseudoartrosi assenza *bone defect*:

- a) Diafisaria: inchiodamento endomidollare (IEB) con o meno applicazione di fattori di crescita ossea (BMP);

- b) Metaepifisaria: IEB o fissazione interna a stabilità angolare (ASIF) con o meno applicazione di BMP;
- c) Epifisaria, ASIF con o meno applicazione di BMP.

2) Pseudoartrosi con piccolo *bone defect*:

- a) Diafisaria: IEB in associazione a BMP, *scaffold* con o meno applicazione di cellule mesenchimali autologhe concentrate (MSC);
- b) Metaepifisaria: ASIF preferibile alla fissazione esterna (EF) non in ligamentotassi in associazione a BMP, *scaffold* con o meno applicazione di MSC;
- c) Epifisaria: ASIF preferibile EF in ligamentotassi in associazione a BMP, *scaffold* con o meno applicazione di MSC.

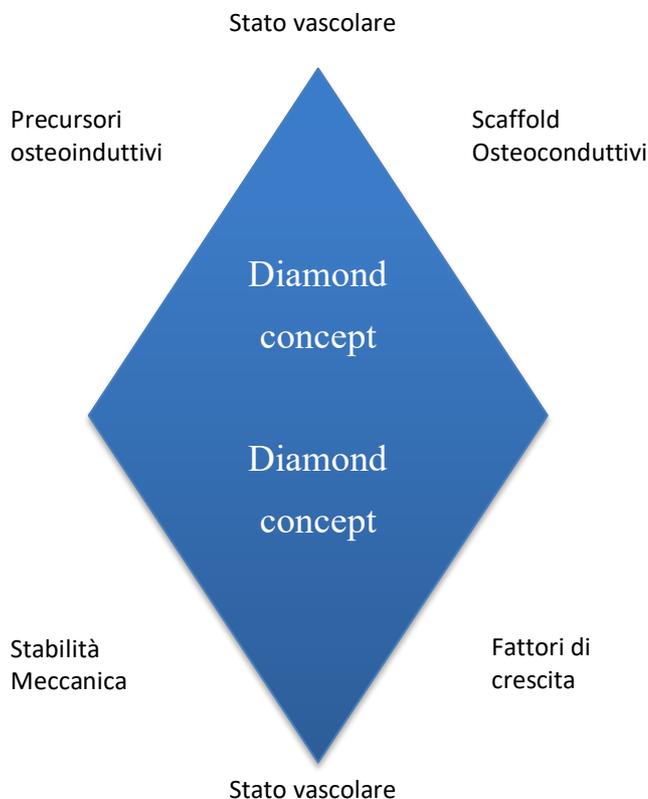


Figura 1 Il modello del *diamond concept* per l'interazione dei processi di guarigione delle fratture.

- 3) Pseudoartrosi con *critical bone defect*:
- a) Diafisaria: trasporto con EF in associazione a BMP al *docking point*, o ASIF in associazione ad alloinnesto massivo imbibito con MSC adiuvato da BMP-7, ASIF in associazione a *scaffold* (xeno + allo) imbibito con MSC adiuvato da BMP-7;
 - b) Metaepifisaria: ASIF con allo innesto massivo imbibito con MSC adiuvato da BMP-7;
 - c) Epifisaria: artrodesi.

In caso di pseudoartrosi settiche diventa mandatario la rimozione dei mezzi di sintesi, un'adeguata toilette chirurgica, l'asportazione completa del tessuto malacico pseudoartrosico infetto, la costituzione di una nuova camera biologica ottenibile attraverso diverse metodiche: trasporto con EF in associazione a BMP al *docking point*, innesto di matrice ossea demineralizzata antibiotata in associazione a *scaffold* e *cast*, cemento antibiotato fino alla normalizzazione degli indici di flogosi e delle indagini radiologiche con EF, seguita dall'asportazione del cemento antibiotato, applicazione di autograft ottenuto con tecnica RIA adiuvato da BMP e osteosintesi con ASIF [5-7].

1.3 – Eziologia

Esistono due tipi differenti di pseudoartrosi che sottendono ad un differente processo biologico o meccanico. Le pseudoartrosi “*Ipertrofiche*” sono caratterizzate dalla presenza di un abbondante callo osseo, anche se è molto efficiente. Alla RX si evidenzierà la presenza di un abbondante callo osseo che si estenderà oltre la rima di frattura in assenza di evidenti ponti ossei assumendo l'aspetto tipico definito “*a zampa d'elefante*” [8]. La causa principale di questo tipo di ritardo di

consolidazione è da ricercarsi nell'inadeguata stabilità meccanica legata al tipo di tecnica chirurgica. In altre parole, la sintesi chirurgica della frattura risulta instabile e ciò comporta il verificarsi di micromovimenti a livello del focolaio di frattura. In particolare, le microrotazioni o i movimenti in senso trasversale alla rima di frattura sono maggiormente responsabili della mancata consolidazione [9] a differenza dei limitati movimenti in compressione che invece sembrano giocare un ruolo favorevole nei confronti dei processi di guarigione [10]. Entro certi limiti il movimento tra i vari frammenti di una frattura stimola la formazione di callo osseo purché non ci sia un eccessivo *gap* tra i vari monconi di frattura; in tal caso la somma dei due fattori porterà allo sviluppo di un ritardo di consolidazione [10–12].

Nella maggioranza dei casi il trattamento è chirurgico e si basa sulla sostituzione dei mezzi di sintesi. Questo approccio ha come scopo principale il confezionamento di un'osteosintesi più stabile tale per cui vi sia una riduzione dei micromovimenti a livello del focolaio di frattura a cui si può associare anche la riduzione del *gap* di frattura [13,14]. In seconda battuta trattamenti supplementari con onde d'urto o campi elettromagnetici possono favorire la guarigione delle fratture benché manchino forti evidenze scientifiche in merito [15,16].

Di tutt'altro genere le cause che portano alle pseudoartrosi "*atrofiche*". Nella maggior parte dei casi, sono espressione di un danno biologico al processo di guarigione dell'osso come, ad esempio, un danno a livello del periostio oppure una marcata compromissione dell'apporto vascolare al focolaio di frattura. Questi eventi si presentano frequentemente nel politrauma o in caso di danno ai tessuti molli [17]. Ne consegue che la frattura stenti a guarire a causa del mancato apporto vascolare, della deficienza di mediatori così come la

mancanza di un adeguato supporto allo stimolo biologico. Tuttavia, è possibile riscontrare anche un problema legato alla meccanica della sintesi in questo tipo di pseudoartrosi come ad esempio una sintesi troppo rigida, l'assenza di adeguate forze di compressione, un gap di frattura troppo esteso tale per cui venga ostacolata la deposizione di ponti ossei. Alle radiografie sarà evidente la pressoché totale assenza di callo osseo e la presenza di una rima di frattura ancora evidente. Il trattamento, anche in questo caso solo chirurgico, prevede la modifica dell'osteosintesi, la riduzione per quanto possibile del gap di frattura, l'incremento delle forze in compressione e la stimolazione biologica del focolaio allo scopo di aumentare l'apporto vascolare il numero di cellule osteoprogenetiche [18].

1.4 – Obiettivi

Lo scopo del nostro studio è di valutare l'efficacia di un prodotto di medicina rigenerativa il cui componente principale è costituito da cellule staminali mesenchimali autologhe espanse rispetto ad un gruppo di pazienti trattato con cellule midollari concentrate. Le MSCs utilizzate sono state raccolte, in entrambe i casi, dal midollo osseo prelevato dalla cresta iliaca. Per aumentare la capacità osteogenica ed osteoinduttiva delle cellule staminali mesenchimali e dei precursori presenti nel focolaio di frattura, alle cellule mesenchimali si associano granuli di fosfato tricalcico nel caso di utilizzo di cellule espanse (progetto REBORN) nel primo caso e matrice ossea demineralizzata e gel piastrinico indicato dal termine inglese PRF nel secondo.

Il prodotto deve essere capace di portare a guarigione pazienti che mostrano un ritardo di consolidazione di fratture delle ossa lunghe.

Si tratta di uno studio prospettico confrontato con l'attuale terapia standard: infatti per questo tipo di problematica si preferisce un approccio più cautelativo che concede tempo alla frattura per guarire, durante il quale per fornire il massimo degli stimoli al processo di guarigione, si possono eseguire anche terapie riabilitative fisiche e manuali.

Il momento in cui viene presa in considerazione l'opzione di intervenire chirurgicamente, pertanto, è solo la fase tardiva del piano terapeutico che si associa non più a un ritardo di consolidazione ma ad una pseudoartrosi, accompagnata nella maggior parte dei casi da insufficienza dei mezzi di sintesi.

Tutto ciò per il paziente si traduce in un'immobilizzazione prolungata o per lo meno in una deambulazione non autonoma ma praticata con l'ausilio di antibrachiali a cui consegue la perdita di tono muscolare dell'arto interessato e della flessibilità articolare delle articolazioni vicine alla sede di pseudoartrosi, l'insorgenza di dolore all'arto controlaterale per la concessione del peso corporeo soprattutto su di esso e dolori a polsi e spalle per l'uso degli antibrachiali.

In termini sociali ed economici questa fase comporta una prolungata assenza dal lavoro con conseguente perdita di eventuali chance lavorative ed elevate spese per le terapie riabilitative disponibili solo in apposite strutture e per determinati periodi di tempo.

Questo nuovo tipo di trattamento con cellule espanse si propone, invece, come un provvedimento da attuare in una fase più precoce quando è presente un ritardo di consolidazione che rappresenta il substrato ancora vitale a cui fornire uno stimolo per la guarigione per evitare così lo stadio finale di pseudoartrosi.

Inoltre, i presupposti dell'intervento chirurgico proposto mostrano

dei vantaggi in termini di accesso chirurgico mininvasivo, minore tempo operatorio, minore perdita ematica, minore morbilità per il paziente, minore tempo di ospedalizzazione che complessivamente permettono una più precoce ripresa nel postoperatorio.

Lo studio prevede il raffronto di due tecniche mini-invasive utilizzate per il trattamento dei ritardi di consolidazione. Lo studio si articola in due gruppi. Nel Gruppo 1 sono raccolti i pazienti trattati con cellule midollari concentrate, matrice ossea demineralizzata e PRF; nel Gruppo 2 sono raccolti i pazienti trattati con cellule mesenchimali espanse e granuli di fosfato tricalcico (progetto Europeo REBORN).

Obiettivo dello studio è testare la superiorità dell'utilizzo di MSCs espanse rispetto alle sole cellule midollari concentrate.

1.4.1 – Razionale dell'utilizzo del midollo osso autologo

Nei tessuti attorno ai ritardi di consolidazione si osserva una riduzione delle cellule staminali mesenchimali progenitrici. Campioni di midollo osseo prelevati negli adulti dai siti di ritardo di consolidazione della tibia ha mostrato, dopo espansione in vitro, che il numero di cellule progenitrici era molto basso se comparato con quello prelevato da una tibia di pazienti sani [19]. Questa differenza la si può inoltre riscontrare nelle zone affette da infezione in seguito ad un trauma, a perdite di sostanza o cicatrici così come una vascolarizzazione compromessa frequentemente si associa con i ritardi di consolidazione [20]. Questo suggerisce che i fisiologici processi di riparazione dei tessuti possono essere limitati dalla diminuzione locale di cellule osteogeniche.

La relazione tra la consolidazione di una frattura e l'attivazione del midollo osseo è stata descritta per la prima volta da Ilizarov [21] che ha dimostrato come la perdita dell'1% di sangue inducesse un'accelerata consolidazione di una rima di osteotomia nei ratti. Nello stesso studio dimostrava che, in seguito ad abbondanti perdite ematiche, si riscontrava un'iperattività ematopoietica del midollo osseo della cresta iliaca. Questo suggeriva un collegamento tra l'attività ematopoietica della cresta iliaca e l'osteogenesi attorno alla sede di osteotomia. Questo fenomeno è stato inoltre confermato da esperimenti in ratti e topi da Bab [22] ed in ratti da Lippiello [23]. Un'altra ipotesi che collega l'osteogenesi in un focolaio di osteotomia e la perdita di sangue può essere data da un fattore di crescita chiamato *osteopoietina* la cui secrezione potrebbe essere indotta dalla perdita di sangue. Lo studio di Lippiello ha inoltre evidenziato nell'animale che quando il midollo osseo della cresta iliaca contiene più sangue, il consolidamento di una frattura più rapido.

1.4.2 – Razionale dell'utilizzo del PRF

L'impiego del PRF nella preparazione di concentrati midollari e scaffold trova una duplice indicazione. Infatti il coagulo fibrinico che si produce funge da *carrier* per le CSM in quanto ne evita la dispersione al momento dell'impianto e ne facilita l'adesione allo scaffold. Inoltre è stato dimostrato da Trombi [24] che il PRF esercita un'azione stimolante la differenziazione in senso osteoblastico delle MSC grazie alla presenza dei fattori di crescita.

1.4.3 – Razionale dell'utilizzo della matrice ossea demineralizzata

Gli innesti ossei autologhi rappresentano il modo più sicuro ed efficace di innesto osseo. Ciò è dato dal fatto che gli innesti ossei autologhi contengono sia cellule osteoprogenitrici (per favorire l'osteogenesi), sia proteine (per favorire l'osteoiduzione) che vanno a costituire una struttura di supporto per la deposizione di nuovo osso (osteococonduzione). Tuttavia, la quantità di innesti ossei utilizzabili è limitata a circa 20 cm³ ed il suo prelievo dalla cresta iliaca rappresenta un ulteriore intervento chirurgico [25].

In alternativa all'impiego di osso autologo, può essere utilizzato osso proveniente da banca dell'osso sia fresco che congelato oppure lavorato sino ad ottenere una polvere d'osso, osso liofilizzato, matrice ossea demineralizzata (DBM).

La matrice ossea demineralizzata è costituita da tessuto osseo privato della componente minerale. Ha effetti sia "osteococonduttivi" ed "osteoiduttivi" grazie alla presenza nella matrice extracellulare di *bone morphogenetic proteins* (BMPs). È stato dimostrato che questa famiglia di proteine, facenti parte della super-famiglia del TGF- β , risulta di primaria importanza in tutti i fenomeni riparativi dell'osso, e pertanto è in grado di stimolare in maniera molto potente i processi di angiogenesi e osteogenesi (Figura 2).

In commercio esistono molti biomateriali; la scelta di questi materiali di sintesi dipende dal tipo di obiettivo che si vuole raggiungere (tenuta meccanica piuttosto che riempimento di una perdita di sostanza) o dal tipo di approccio chirurgico che si vuole utilizzare (intervento chirurgico a cielo aperto oppure per via percutanea o mini-invasiva).

Tra i più diffusi biomateriali c'è sicuramente il calcio-fosfato grazie

alla sua capacità di stimolare l'adesione, la proliferazione e la differenziazione in senso osteoblastico delle MSCs così come la produzione della matrice di collagene che successivamente andrà incontro a mineralizzazione.

1.4.4 – Razionale dell'utilizzo delle cellule mesenchimali espanse

L'impiego di cellule mesenchimali espanse associato ad un biomateriale che funga da carrier è da tempo considerata una tecnica valida per sostituire gli innesti ossei autologhi [26,27]. Tuttavia, non c'è uniformità di pensiero circa l'adeguatezza sull'origine delle diverse MSCs, la metodica di espansione, la riproducibilità e la variabilità del prodotto ottenuto e la qualità del prodotto finale.

Tuttavia, sono molteplici gli studi, a partire dal primo lavoro di Connolly et al. del 1991 [28], sono molteplici gli studi che dimostrano come il numero di cellule impiantate aumenti significativamente la possibilità di guarigione nei ritardi di consolidazione [19,29–41].

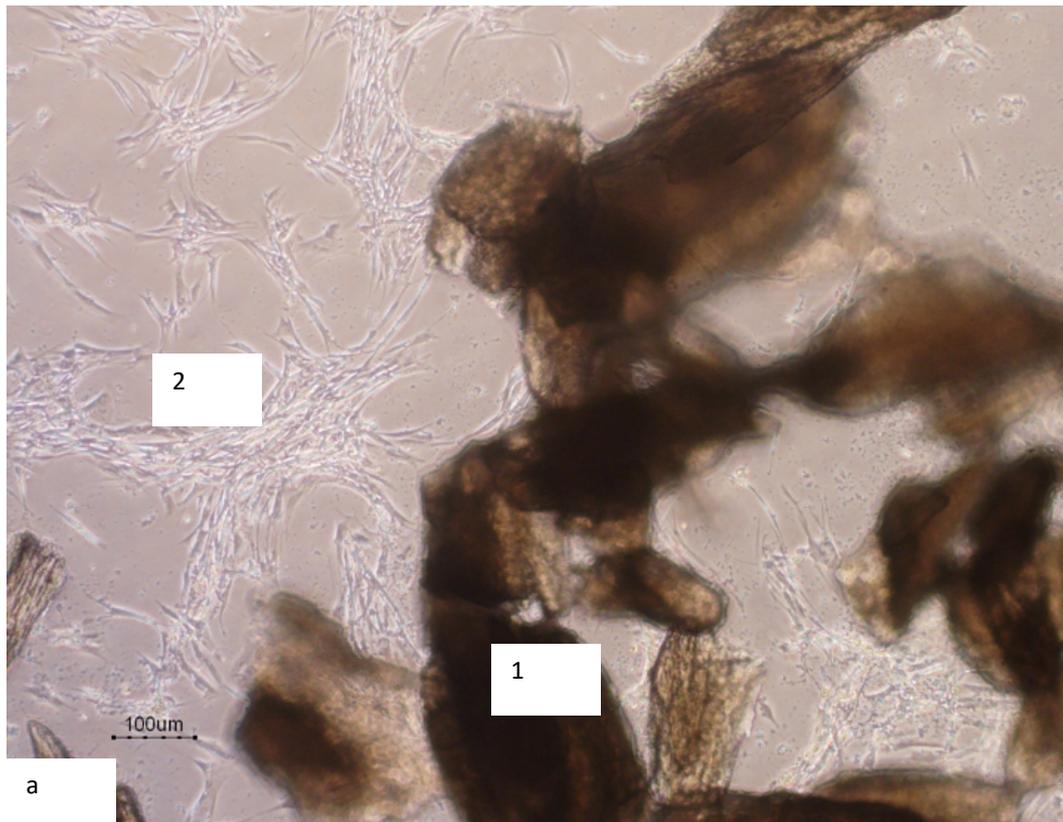


Figura 2 a, b Preparati istologici in cui si ritrova il DBM (1) e le CSM (2). Si noti come le cellule tendano ad aderire ed organizzarsi in colonie attorno alle particelle di DBM.

2 – Materiali e metodi

2.1 – Criteri di inclusione

I criteri di inclusione per l'arruolamento dei pazienti sono:

- Pazienti in buone condizioni cliniche generali;
- Età maggiore di 18 anni;
- Fratture non esposte di tibia e femore.

I criteri di esclusione sono:

- Pseudoartrosi infetta;
- Gap tra i monconi di frattura maggiore di 2 cm;
- Patologie sistemiche gravi (tumori, insufficienza d'organo, decadimento cognitivo);
- Frattura esposta.

Lo studio è stato approvato dal Comitato etico dell'ospedale ed un consenso informato è stato prodotto per ogni singolo paziente.

2.2 – Gruppo 1: Cellule midollari concentrate e matrice ossea demineralizzata

Il giorno del ricovero il paziente eseguirà il prelievo di 120 ml di sangue venoso per la produzione di PRFA (Platelet Rich Fibrin Autologous). Il sangue raccolto viene processato con il sistema automatico di Seda AVM, "Vivostat". Il prodotto finale (PRFA 6 ml) viene congelato a -35°C. Il prodotto dovrà contenere 6 ± 1 ml di PRFA,

con $1.000.000 \pm 200.000 \times 10^3$ PLT.

Il giorno dell'intervento chirurgico, in sala operatoria e con paziente anestetizzato si effettua il prelievo dell'aspirato midollare dalla cresta iliaca posteriore, preferibilmente omolaterale rispetto alla lesione. Si preparano 10 ml di soluzione anticoagulante di eparina sterile, contenente 500 U totali di eparina in soluzione fisiologica, che verrà inserita sterilmente in una sacca di trasferimento per emoderivati da 300 ml, dotata di connettore Luer-Lock.

Il prelievo si effettua introducendo la punta dell'ago trocar da prelievo di midollare attraverso un'incisione cutanea di 2 mm (Figura 3 a-b). Una volta raggiunto l'osso spongioso, si disarma la punta dell'ago così da collegare una siringa sterile da 30 ml e si eseguono delle brevi aspirazioni di 3-5 ml di sangue midollare. L'aspirato viene immediatamente trasferito nella sacca di trasferimento dopo ogni prelievo (Figura 3 c-d). Inoltre, la cannula viene girata di un quarto di

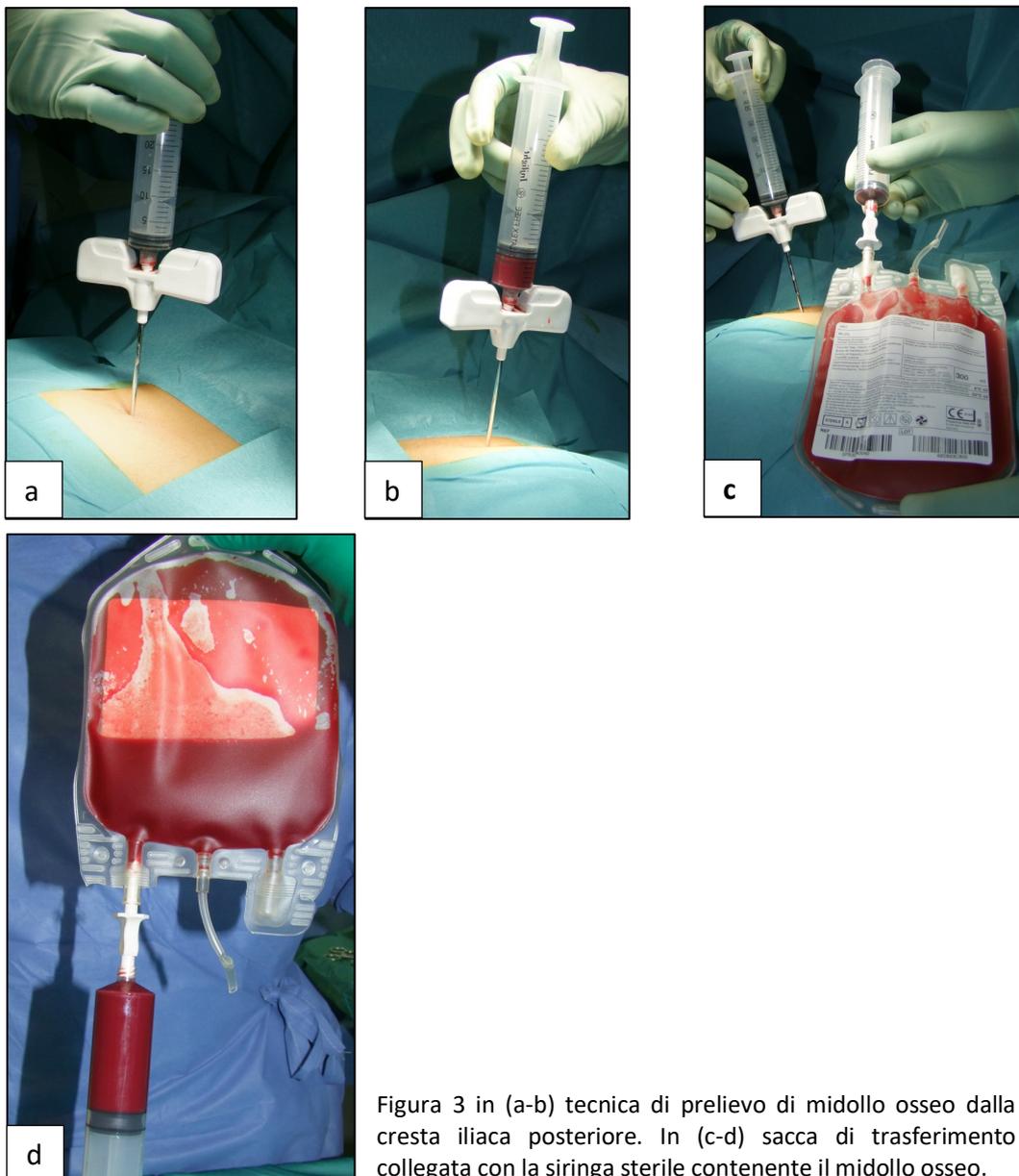


Figura 3 in (a-b) tecnica di prelievo di midollo osseo dalla cresta iliaca posteriore. In (c-d) sacca di trasferimento collegata con la siringa sterile contenente il midollo osseo.

giro dopo ogni aspirazione, per raggiungere zone di osso spongioso dove prelevare altro midollo ricco di MSCs.

È importante mantenere sempre in agitazione manuale la sacca di trasferimento contenente il midollo aspirato, durante tutto il procedimento.

Dopo aver prelevato circa 30 ml di midollo osseo, è opportuno riposizionare l'ago eseguendo una nuova perforazione nell'ala iliaca, a circa 2 cm di distanza dal foro precedente. La procedura dura fino a raggiungere il volume sufficiente di midollo per un'aspirazione (60 ml). Il processo di concentrazione del midollo avviene tramite il kit "IOR-G1" per la rigenerazione osteocondrale. Il contenuto della siringa (midollo osseo ben miscelato con anticoagulante) viene convogliato alla cartuccia di concentrazione ResQ 60, in campo sterile. Si utilizza il filtro fornito, destinato a trattenere tutti i frustoli di fibrina formatesi durante le fasi del prelievo e i depositi di grasso eventualmente presenti, che potrebbero interferire con il dispositivo di separazione.

La cartuccia con il midollo osseo viene trasferita sull'apposito supporto (Figura 4) viene inserita in uno degli alloggiamenti della centrifuga e si posiziona la cartuccia contrappeso nel contenitore diametralmente opposto, onde evitare malfunzionamento della centrifuga. Il ciclo di centrifugazione si svolge a 3200 rpm per 12 minuti.

Al termine del ciclo, la cartuccia viene trasferita nell'alloggiamento del supporto dedicato per iniziare la procedura di risospensione delle cellule (Figura 5 a-b: posizionamento della cartuccia sul dispositivo "ResQ 60").

Il ciclo di agitazione dura 30 secondi; al termine si prelevano i primi 3,5 ml di concentrato midollare (CM) utilizzando una siringa sterile da 60 ml, attraverso la porta laterale del dispositivo ResQ 60. Trascorsi 10 secondi si può procedere alla seconda aspirazione di 3 ml di concentrato midollare, nella medesima siringa. In questo modo si recupera l'85% delle cellule mononucleate originariamente presenti nell'aspirato midollare. Una aliquota di almeno $2 \pm 0,5$ cc verrà inviata al laboratorio per eseguire la conta delle cellule nucleate ed il saggio delle CFU. La procedura di concentrazione midollare deve dare luogo ad almeno 6 ± 1 cc di concentrato midollare (CM) di cui 4 ± 1 cc verranno impiantati e $1 \pm 0,5$ verranno portati in laboratorio per eseguire la conta delle cellule nucleate ed il saggio delle CFU.



Figura 4 Cartuccia contenente midollo osseo prelevato dalla sacca di trasferimento, inserita nella centrifuga.



a



b

Figura 5 a-b: posizionamento della cartuccia sul dispositivo "ResQ 60".

Durante la processazione del midollo si prepara il quantitativo previsto di DBM al quale si aggiunge il PRF. Terminata la preparazione del CM viene anch'esso aggiunto ai due componenti suddetti nella quantità di 4 ± 1 cc.

Il paziente viene posizionato sul letto trasparente (per rendere possibile l'uso dell'amplificatore di brillantezza) nella posizione più accessibile per effettuare la iniezione.

2.3 – Gruppo 2: Cellule mesenchimali espanse e granuli di calcio fosfato

I pazienti arruolati in questo gruppo facevano parte del progetto Europeo REBORN. Questo è un studio Europeo prospettico che raccoglie i pazienti trattati con cellule mesenchimali espanse e fosfato tricalcico in più centri europei di riferimento.

Il prelievo viene effettuato in anestesia loco-regionale o generale. Il midollo osseo prelevato dalla cresta iliaca anteriore o posteriore viene raccolto in una sacca eparinata (500 UI diluita in 10 cc di soluzione fisiologica). La quantità totale di midollo osseo aspirata varia da 30 a 35 mL. Successivamente viene inviato alla GMP di riferimento (Cell Factory “F. Calori” – Milano) e qui processato in modo asettico. Tutte le lavorazioni a partire dalla lavorazione iniziale delle cellule, l'espansione cellulare ed in confezionamento sono eseguite in camera bianca. Le MSCs sono coltivate ed espanse mediante la procedura “Alpha MEM medium supplemented con PL” [42]. Le cellule sono quindi stoccate in una siringa da 20 cc. Il prodotto finale consiste di MSCs concentrate, che esprimono i marker CD90, CD73, CD105 e negative per CD14, CD45, HLA-II, con vitalità del 90%, in dose di 100

$\times 10^6$ in sospensione di albumina umana al 5% in 10 mL. Il composto viene poi aggiunto a granuli di calcio fosfato (MBCP β , Bio-matlante SA, Vigneux de Bretagne, France). Il biomateriale sintetico è composto per il 20% da idrossiapatite (HA) e per l'80% da β -tricalciofosfato (β -TCP) in granuli da 1-2 mm. Il materiale ha una porosità del 73%.

2.4 – Tecnica chirurgica

Per entrambi i gruppi di pazienti l'intervento prevede l'apposizione del laccio emostatico e quindi l'incisione della cute in prossimità della frattura che non deve eccedere gli 8 centimetri nella coscia ed i 4 nella gamba (Figura 6).

Il primo tempo consiste nella asportazione del tessuto di granulazione e cruentazione dei capi di frattura con apposito strumentario. Il secondo tempo prevede l'introduzione del composto cellulare nella sede del focolaio di frattura. Per evitare la fuoriuscita di materiale si deve impostare una sutura della fascia in modo da chiudere il piano subito dopo aver effettuato l'introduzione del materiale (borsa di tabacco).

La chiusura dei piani superficiali segue le modalità standard. Non deve essere utilizzato il drenaggio, il laccio emostatico viene asportato dopo la chiusura della ferita.

2.5 – Follow-up

Il primo controllo viene effettuato dopo 45 giorni (± 10 giorni) tramite colloquio, visita e radiografie in 2 proiezioni. I controlli

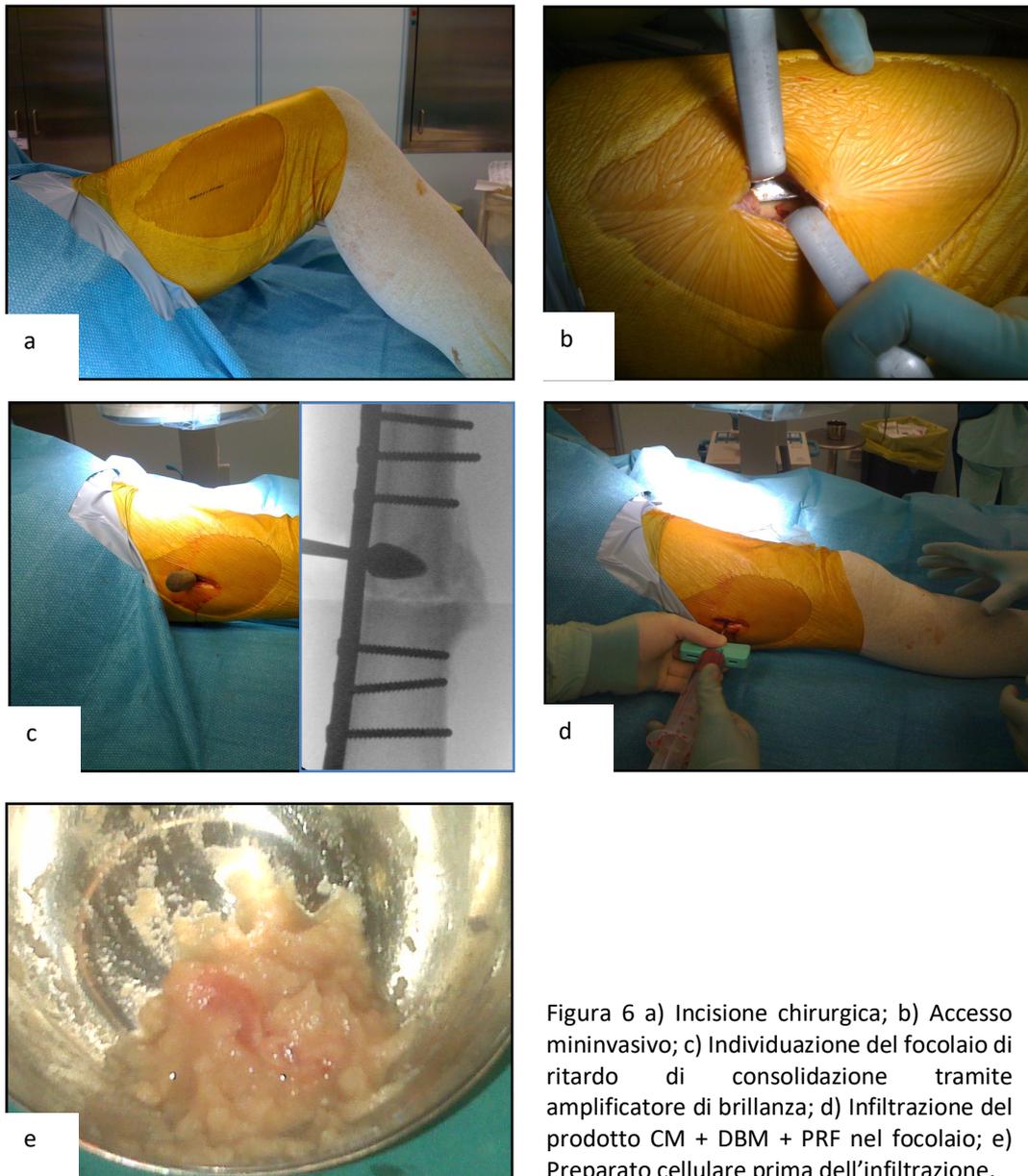


Figura 6 a) Incisione chirurgica; b) Accesso mininvasivo; c) Individuazione del focolaio di ritardo di consolidazione tramite amplificatore di brillantezza; d) Infiltrazione del prodotto CM + DBM + PRF nel focolaio; e) Preparato cellulare prima dell'infiltrazione.

successivi saranno eseguiti a 3, 6, 12 e 24 mesi dall'intervento (± 20 giorni) corredati di RX standard. In tutti gli accessi deve essere registrato l'eventuale presenza di dolore riferita dal paziente corredato dalla assunzione di farmaci e la funzione dell'arto.

2.6 – Casistica

Presso la Clinica III ad indirizzo Oncologico dell'Istituto Ortopedico Rizzoli dal novembre 2008 al dicembre 2017 sono stati trattati 30 pazienti.

I pazienti erano 17 maschi e 13 femmine, di età compresa fra 17 e 73 anni (età media 42 anni).

Tra questi, 23 pazienti sono stati trattati con una singola infiltrazione con MSCs concentrate e DBM (Gruppo 1); i restanti 7 con MSCs espanse e granuli di β -TCP (Gruppo 2).

La sede di trattamento era la tibia in 12 casi ed il femore in 18 casi. Abbiamo riscontrato che in 11 casi i pazienti erano fumatori, di questi 5 erano grandi fumatori (più di 20 sigarette/dì) ed in 2 casi erano affetti da diabete di tipo II compensato.

I ritardi di consolidazione trattati provenivano in 12 casi da fratture a due frammenti, in 20 casi da fratture a tre frammenti ed in 2 casi da fratture comminute (Figura 7).

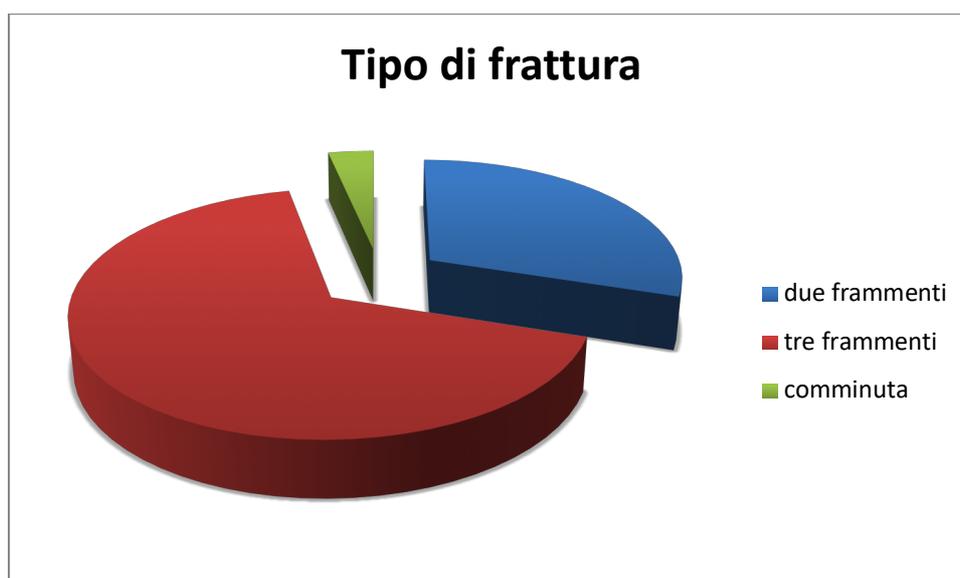


Figura 7 Tipo di frattura.

Il mezzo di sintesi presente al momento del trattamento infiltrativo con il concentrato midollare era la placca in 12 casi (40%), il chiodo endomidollare in 12 (40%) casi ed il fissatore esterno in 6 casi (20%) (Figura 8).



Figura 8 Tipo di mezzi di sintesi al momento dell'infiltrazione.

Per quello che riguarda il numero di interventi chirurgici eseguiti prima del trattamento infiltrativo in 14 casi si aveva avuto un solo intervento, in 9 casi due interventi e in 7 casi 3 o più interventi (Figura 9).

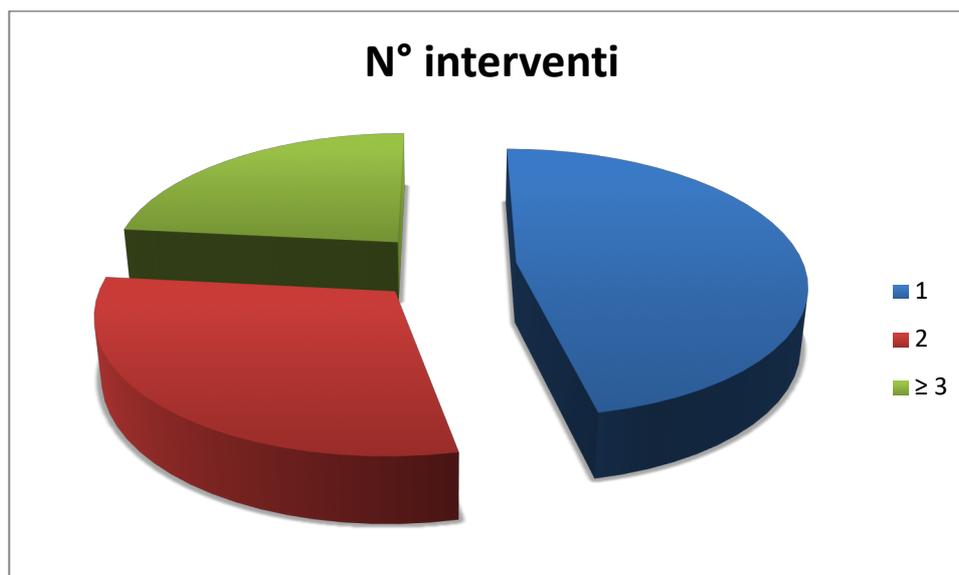


Figura 9 Interventi eseguiti prima del trattamento di studio.

È stato eseguito un unico trattamento infiltrativo in 26 casi, mentre è stato necessario eseguire 2 infiltrazioni in 4 casi.

Nei casi trattati con un'unica infiltrazione il trattamento è avvenuto in media dopo 15 mesi dalla frattura (minimo 3 e massimo 40 mesi).

Il tempo medio di follow-up è stato di 21 mesi (minimo 6 e massimo 50 mesi) per il Gruppo 1 e 12 mesi (minimo 8 e massimo 18 mesi) per il Gruppo 2.

2.7 – Analisi dei dati

Il trattamento veniva classificato come fallito se a distanza di 6 mesi dal trattamento, non si apprezzava progressione dei processi di ossificazione di almeno 3 su 4 corticali alle proiezioni RX in anteroposteriore e latero-laterale.

I due gruppi di pazienti sono stati analizzati al fine di identificare differenze statisticamente significative. Le differenze interne ai gruppi relative al tipo di trattamento è stata determinata mediante lo studio

della curva secondo Kaplan-Mayer [43]. L'analisi multivariate secondo Cox con il metodo Wald backward è stata usata per identificare il modello di fallimento. L'*odds ratio* (OR) per ogni parametro con intervallo di confidenza al 95% è stato impiegato per esprimere i risultati della regressione di Cox. Per gli studi statistici è stato usato il software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software, Version 21.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

4 – Risultati

Dopo il primo trattamento, 17 pazienti su 23 (73%) di pazienti del Gruppo 1 potevano considerarsi guariti a fronte di 7 su 7 (100%) pazienti del Gruppo 2. Il tempo medio di guarigione è stato di 12 mesi nel Gruppo 1 (range 3 – 34 mesi) e di 6 mesi (range 3 – 8 mesi) nel Gruppo 2.

In nessuno dei pazienti di entrambi i Gruppi sottoposti alla procedura si sono registrate complicanze locali successivamente quali febbre, rigetto, infezione e dolore.

Nei 7 pazienti del Gruppo 1 che non sono guariti dopo l'intervento, è stato necessario procedere alla sostituzione dei mezzi di sintesi. Dopo tale procedura, lo stato di mancata consolidazione si risolveva in un periodo di 7 mesi in media (range 6 – 12 mesi).

I ritardi di consolidazione localizzati al femore hanno mostrato un maggior rischio di fallimento indipendentemente dal tipo di trattamento eseguito rispetto alle mancate consolidazioni della tibia. La percentuale di fallimento del trattamento nelle fratture del femore è stata del 33% dopo la procedura, mentre nessuna pseudoartrosi di tibia è andata incontro a fallimento. Tale dato è risultato statisticamente significativo all'analisi univariata ($p < 0,05$).

Non si è trovata correlazione tra la sede della mancata consolidazione (diafisaria o meta/epifisaria), il sesso, il tipo di frattura (semplice o comminuta) o la presenza di callo ipertrofico o atrofico.

Nessuno dei pazienti di entrambi i Gruppi in cui è stata raggiunta la consolidazione lamentava dolore in corrispondenza della sede in cui era stata effettuata l'infiltrazione e dove era presente il ritardo di

consolidazione. Non presentavano alcuna limitazione al movimento delle articolazioni adiacenti alla sede della frattura.

I pazienti che avevano un lavoro prima della frattura hanno potuto riprenderlo in media dopo 3 mesi dall'intervento infiltrativo (minimo dopo 1 mese massimo dopo 6 mesi).

4.1 – Case report 1

Paziente di 31 anni in esiti di frattura biossea di gamba (Figura 10) trattato all'origine con fissatore esterno. La frattura era avvenuta 7 mesi prima del trattamento (a). Il paziente veniva sottoposto ad infiltrazione con MSCs concentrate e DBM. In (b) controllo RX a 2 mesi ed in (c) a 6 mesi. Si noti la progressiva riduzione della rima di radiotrasparenza con la progressiva calcificazione del focolo di ritardo di consolidazione. A 12 mesi dall'infiltrazione si noti la totale assenza di rima di radiotrasparenza e la successiva possibilità di rimuovere il fissatore esterno (d).

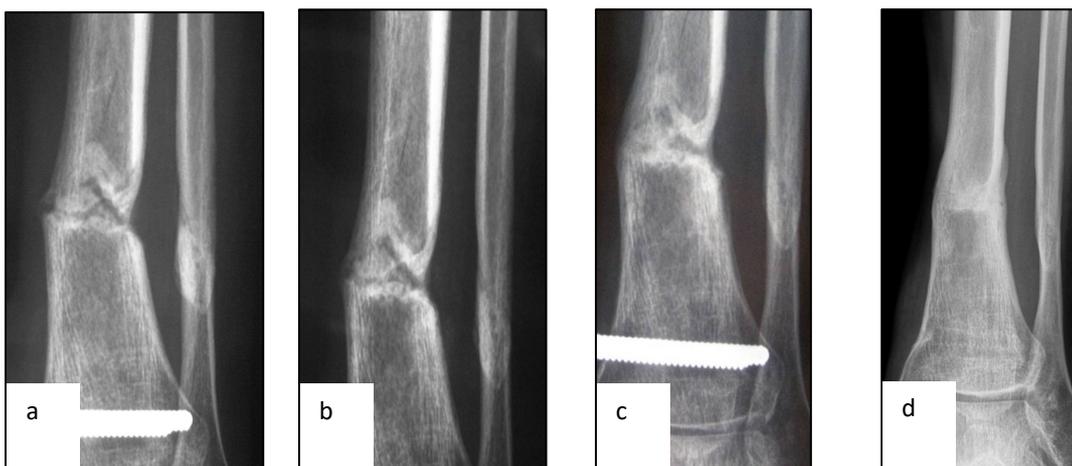


Figura 10 a) pseudoartrosi atrofica in una frattura di tibia distale. b,c) controlli radiografici a 1 e 6 mesi che mostra processi consolidativi in atto; d) rimozione del fissatore esterno per avvenuta consolidazione della frattura.

4.2 – Case report 2

Paziente di 45 anni affetta da pseudoartrosi asettica del terzo distale del femore (Figura 11). La paziente era stata tratta presso altro centro 6 mesi prima del trattamento con MSCs concentrate, DBM e PRF (a). Ai successivi controlli a distanza di 1 (b), 6 (c) e 18 (d) mesi dal trattamento la progressiva calcificazione delle corticali ossee.

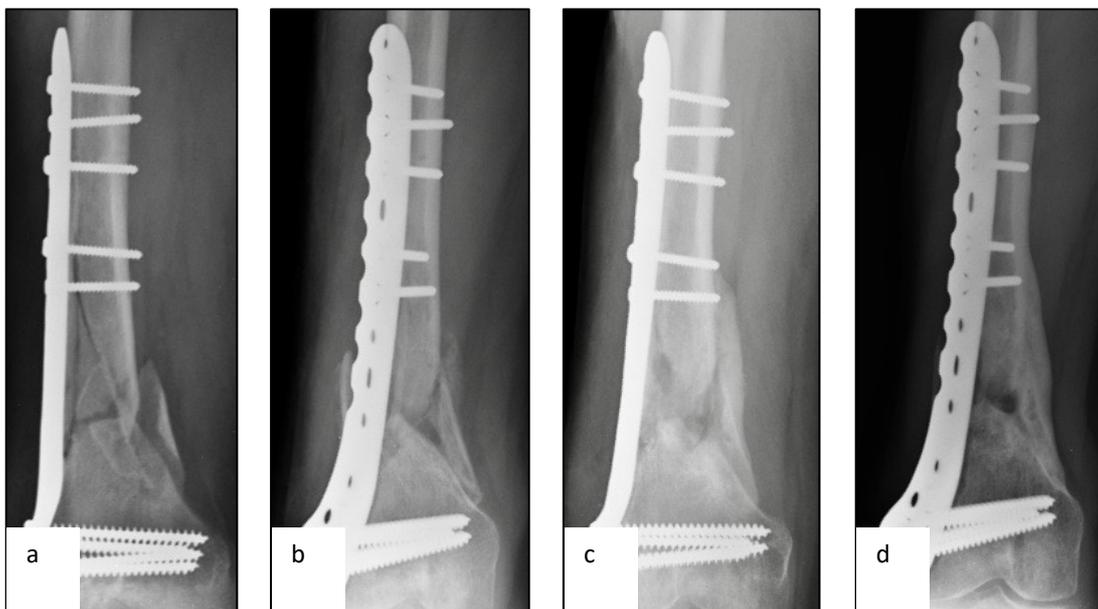


Figura 11 a) pseudoartrosi in una paziente di 45 anni. La frattura era intercorsa 6 mesi prima ed era stata tratta presso altro centro con placca e viti. Si noti la totale assenza di callo a 6 mesi dall'osteosintesi. b, c, d) Controlli radiografici a distanza di 1, 6 e 18 mesi. Si noti la progressiva formazione di callo osseo sino ad ottenere la completa guarigione della frattura.

Tabella 1 Sintesi dei lavori in letteratura che descrivono l'utilizzo di cellule prelevate dal midollo per il trattamento dei ritardi di consolidazione.

	Autore/Anni di pubblicazione	Numero di pazienti	Localizzazione	Età media (anni)	Risultato finale: guarigione (%)	Distanza dal I trattamento	Note
1	Healey et al./1990 [44]	8	Femore (8)	27 (6-60)	5 (62,5)	4,95 (1-9)	BM nativo in pazienti con resezione ossea per neoplasia e ricostruzione con innesto osseo massivo
2	Connolly et al./1991 [28]	10	Tibia (10)	30 (18-82)	8 (80)	6,7 (5-10)	BM nativo
3	Garg et al./1993 [45]	20	Tibia (15) Omero (3) Ulna (2)	35 (18-82)	17 (85)	5 (3-7)	BM nativo
4	Sim et al./1993 [46]	11	Tibia (8) Femore (1) Altro (2)	38 (19-62)	9 (81)	2,5 (1-5,75)	BM nativo
5	Matsuda et al./1998 [47]	7	Femore (7)	53 (24-70)	4 (57)	na	BM nativo
6	Siwach et al./2001 [48]	72	Tibia (42) Femore (8) Omero (12) Altro(10)	41,2 (26-56)	68 (94)	na	BM nativo
7	Wang et al./2001 [49]	56	Tibia (56)	na (19-72)	53 (94)	na	BM nativo
8	Wilkins et al./2003 [50]	69	Tibia (36) Femore (16) Altro (17)	42 (15-81)	61 (88)	8,1 (2-36)	BM nativo e DBM
9	Goel et al./2005 [51]	20	Tibia (20)	37,5 (24-60)	15 (75)	3,5 (1,5-5,5)	BM nativo
10	Hernigou et al./2005 [35]	60	Tibia (60)	40 (18-78)	53 (88)	3 (1-4)	BMC
11	Bhargava et al./2007 [52]	11	Tibia (11)	40,1 (24-51)	9 (81,8)	4,1 (1,7-6,4)	BM nativo
12	Garnavos et al./2010 [53]	5	Omero (5)	na (30-75)	5 (100)	Na (12-20 weeks)	BMC
13	Singh et. Al./2013 [54]	12	Femore (3)	45 (15-70)	10 (83)	4 (2,5-6)	BM nativo

			Altro (9)				
14	Kassem/2013 [55]	20	Tibia (13) Femore (5) Altro (2)	42,3 (25-66)	19 (95)	2,95 (2-5)	BM nativo
15	Sugaya et al./2013 [56]	17	Tibia (5) Femore (10) Altro (2)	40,7 (22-80)	13 (76)	na	BM nativo e LIPUS
16	Braly et al./2013 [57]	11	Tibia (11)	40,1 (24-51)	9 (81,8)	4,1 (1,7-6,4)	BM nativo
17	Scaglione et al./2014 [58]	19	Tibia (7) Radio (3) Omero (3) Ulna (2) Femore (1) Metatarso (1) Ulna (1) Fibula (1)	42,3 (20-73)	15 (78,9)	6.5 (na)	BMC e DBM
18	Barrena et al./2018 [32]	28	Femore (11) Tibia (13) Omero (4)	NA	26 (92%)	14,7 (2,1-36)	Cellule mesenchimali espanse

LIPUS: ultrasuoni a bassa intensità; BM: midollo osseo; BMC: midollo osseo concentrato; NA: non applicabile.

5 – Discussione

Secondo l'AAOS (American Academy of Orthopaedic Surgeons) del 2008 negli USA ogni anno si registrano 7 milioni di fratture ossee, escluse quelle degli anziani e dei bambini; una su dieci interessa la diafisi di un osso lungo. Il 20-25% di queste esita in un ritardo di consolidazione o in pseudoartrosi.

Numerosi metodi sono utilizzati per trattare entrambe le situazioni: innesti ossei autologhi e omologhi, il metodo Ilizarov basato sulla osteogenesi per compressione/distrazione e più recentemente terapie fisiche con ultrasuoni e campi elettromagnetici induttivi o capacitivi, a corrente elettrica continua o alternata. L'innesto di osso autologo è classicamente descritto come la terapia *gold standard*. Tuttavia questa tecnica è spesso associata ad alcune complicanze del sito donatore: ematoma, frattura, infezione, emorragia, ernie muscolari, parestesie, dolore cronico e prolungamento del tempo di ricovero [29,46]. La necessità di aprire in modo ampio il focolaio di frattura inoltre aumenta il rischio di infezione e di devascularizzazione dei monconi ossei non ancora consolidati.

Sono molteplici i lavori nella letteratura recente in cui si utilizza midollo osseo nativo, concentrato e MSCs espanse. I principali lavori sono stati riassunti nella Tabella 1.

Il midollo osseo è una risorsa di cellule dotate di potenziale osteogenico che sono le protagoniste principali della formazione ossea e del processo di consolidazione di una frattura. McGaw per primo nel 1934 rese noto il ruolo del midollo osseo e dell'endostio nel processo di rigenerazione ossea. Il concetto di un innesto osseo introdotto per via

percutanea fu invece proposto da Herzog nel 1951. Così, associando la metodica percutanea all'innesto di midollo osseo si creò una tecnica chirurgica alternativa, minimamente invasiva [59].

Ricerche recenti hanno mostrato che le cellule autologhe mononucleate, presenti nel midollo osseo, in combinazione a diversi materiali di sostegno, sono efficaci nel promuovere la formazione di nuovo osso in vari modelli animali come pecore, conigli, cani e topi. Supportata dai risultati sugli animali, l'applicazione di cellule mononucleate derivanti dal midollo osseo aspirato potrebbe rappresentare una strada alternativa nel trattamento di difetti ossei e nel contempo minimizzare la morbilità associata all'innesto di osso autologo [46]. Infatti questa tecnica minivasiva risulta relativamente semplice da eseguire e presenta numerosi vantaggi e un minor grado di complicanze, confrontata con la metodica "gold standard". Inoltre, il modesto trauma chirurgico ci consente di dimettere il paziente il giorno stesso o al massimo il giorno dopo il trattamento.

Alcuni studi hanno dimostrato che l'infiltrazione con midollo osseo produce effetti ottimali quando praticata precocemente nel processo di consolidazione ossea (dopo non oltre 6 mesi dalla frattura iniziale) ed è invece associata a modesti risultati quando praticata più tardivamente (dopo oltre 18 mesi dalla frattura) [59]. La tabella 3 che segue, mostra un sommario di studi pubblicati aventi almeno dieci pazienti trattati con terapia cellulare per difetti ossei o ritardi di consolidazione. Si può vedere come la terapia con cellule staminali in queste situazioni sia applicata da quasi vent'anni.

Nello studio sono presenti dei limiti dati dall'ancora scarso numero di pazienti trattati con cellule espanse, dalla mancanza di un gruppo di controllo.

Dal nostro studio, risulta che l'impiego delle cellule staminali espanse è correlato ad una maggiore possibilità di riuscita del trattamento per ritardi di consolidazione. Questo fatto conferma quanto esposto in letteratura sull'influenza che ha il numero di cellule impiantate con l'out-come finale.

Questo dato è in linea con quanto conosciuto circa la correlazione del numero di cellule trapiantate e la risposta al trattamento.

6 – Conclusioni

Il trattamento dei ritardi di consolidazione delle ossa lunghe con MSCs espanse e granuli di fosfato tricalcico rappresenta un sistema valido in quanto si è potuto applicare in una chirurgia di breve durata (massimo due giorni di degenza), con applicazione mininvasiva (ridotta esposizione, ridotti tempi chirurgici) in assenza di complicazioni locali ed eventi avversi (febbre, rigetto, infezione, dolore). La metodica è risultata ben accettata dai pazienti che hanno potuto riprendere l'attività fisica (carico) e funzionale in tempi relativamente brevi. Inoltre, questo trattamento ha dimostrato una migliore capacità di ottenere la risoluzione della mancata consolidazione rispetto all'impiego di cellule concentrate e DBM.

Il successo si è verificato nel 100% dei casi senza pregiudicare la possibilità di un intervento successivo con la stessa metodica (nuova infiltrazione) o con una più invasiva (sostituzione dei mezzi di sintesi).

Considerata la semplicità della metodica ed il veloce ripristino dell'attività, noi riteniamo che vi sia indicazione al trattamento in tutti i casi in cui ci si trova ad affrontare un ritardo di consolidazione anche a lungo termine. Tuttavia, nei casi in cui ci si trova di fronte ad un ambiente atrofico o con scarso contatto fra i capi di frattura, si deve considerare l'utilizzo di un diverso materiale di supporto per la guarigione.

Un limite considerevole all'utilizzo su larga scala di questa metodica è dato dall'elevato costo di espansione delle cellule (circa 20.000 € per ogni campione) a cui bisogna aggiungere il costo di utilizzo della sala operatoria legato sia al prelievo che al successivo

impianto.

Infine, è importante ricordare che il supporto all'istologia del focolaio di frattura non deve mai prescindere dalla biomeccanica e dalla stabilità della sintesi. La frattura consolida non solo se le cellule del focolaio sono vitali e se vi è un'osteoaduzione efficace, ma anche e soprattutto se il chirurgo è riuscito con il mezzo di sintesi utilizzato a neutralizzare in corrispondenza del focolaio di frattura le forze di taglio, conservando quelle efficaci di compressione fra i monconi.

Per questa ragione, se vi sono elementi che possono far supporre un'insufficiente stabilizzazione è opportuno indicare la sostituzione del mezzo di sintesi associata alla infiltrazione.

7 – Bibliografia

1. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop.* ottobre 1998;(355 Suppl):S7-21.
2. Calori GM, Albisetti W, Agus A, Iori S, Tagliabue L. Risk factors contributing to fracture non-unions. *Injury.* maggio 2007;38 Suppl 2:S11-18.
3. Giannoudis PV, Einhorn TA, Schmidmaier G, Marsh D. The diamond concept – open questions. *Injury.* settembre 2008;39, Supplement 2:S5–8.
4. Bergmann G, Duda G, Institut CBJW, Wolff J. *Das Gesetz der Transformation der Knochen: Hirschwald, Berlin 1892 - Reprint 300 Seiten - Mit vier Nachworten und historischen Dokumenten.* 1., Auflage. Berlin: Pro Business; 2010. 300 pag.
5. Klaue K, Knothe U, Anton C, Pfluger DH, Stoddart M, Masquelet AC, et al. Bone regeneration in long-bone defects: tissue compartmentalisation? In vivo study on bone defects in sheep. *Injury.* novembre 2009;40 Suppl 4:S95-102.
6. Giannoudis PV, Tzioupis C, Green J. Surgical techniques: how I do it? The Reamer/Irrigator/Aspirator (RIA) system. *Injury.* novembre 2009;40(11):1231–6.
7. Gilg MM, Liegl B, Wibmer C, Maurer-Ertl W, Leithner A. Central low-grade osteosarcoma with an unusual localization in the diaphysis of a 12-year old patient. *Radiol Oncol.* 21 maggio 2013;47(2):192–6.
8. Babhulkar S, Pande K, Babhulkar S. Nonunion of the diaphysis of long bones. *Clin Orthop.* febbraio 2005;(431):50–6.

9. Augat P, Burger J, Schorlemmer S, Henke T, Peraus M, Claes L. Shear movement at the fracture site delays healing in a diaphyseal fracture model. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc.* novembre 2003;21(6):1011–7.
10. Claes LE, Heigele CA, Neidlinger-Wilke C, Kaspar D, Seidl W, Margevicius KJ, et al. Effects of mechanical factors on the fracture healing process. *Clin Orthop.* ottobre 1998;(355 Suppl):S132-147.
11. Carter DR, Blenman PR, Beaupré GS. Correlations between mechanical stress history and tissue differentiation in initial fracture healing. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc.* 1988;6(5):736–48.
12. Claes LE, Heigele CA. Magnitudes of local stress and strain along bony surfaces predict the course and type of fracture healing. *J Biomech.* marzo 1999;32(3):255–66.
13. Hak DJ. Management of Aseptic Tibial Nonunion. *J Am Acad Orthop Surg.* 1 settembre 2011;19(9):563–73.
14. Augat P, Margevicius K, Simon J, Wolf S, Suger G, Claes L. Local tissue properties in bone healing: influence of size and stability of the osteotomy gap. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc.* luglio 1998;16(4):475–81.
15. Bashardoust Tajali S, Houghton P, MacDermid JC, Grewal R. Effects of low-intensity pulsed ultrasound therapy on fracture healing: a systematic review and meta-analysis. *Am J Phys Med Rehabil.* aprile 2012;91(4):349–67.
16. Romano CL, Romano D, Logoluso N. Low-intensity pulsed ultrasound for the treatment of bone delayed union or nonunion: a review. *Ultrasound Med Biol.* aprile 2009;35(4):529–36.

17. Bishop JA, Palanca AA, Bellino MJ, Lowenberg DW. Assessment of compromised fracture healing. *J Am Acad Orthop Surg*. maggio 2012;20(5):273–82.
18. Hobby B, Lee MA. Managing atrophic nonunion in the geriatric population: incidence, distribution, and causes. *Orthop Clin North Am*. aprile 2013;44(2):251–6.
19. Hernigou P, Beaujean F. [Bone marrow in patients with pseudarthrosis. A study of progenitor cells by in vitro cloning]. *Rev Chir Orthopédique Réparatrice Appar Mot*. 1997;83(1):33–40.
20. Brighton CT, Hunt RM. Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus. *J Bone Joint Surg Am*. luglio 1991;73(6):832–47.
21. Ilizarov GA. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues: Part II. The influence of the rate and frequency of distraction. *Clin Orthop*. febbraio 1989;(239):263–85.
22. Bab I, Gazit D, Massarawa A, Sela J. Removal of tibial marrow induces increased formation of bone and cartilage in rat mandibular condyle. *Calcif Tissue Int*. settembre 1985;37(5):551–5.
23. Lippiello L, Chavda D, Connolly J. Colony-forming efficiency response of bone marrow stromal cells to acute blood loss. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc*. gennaio 1992;10(1):145–8.
24. Trombi L, Mattii L, Pacini S, D'Alessandro D, Battolla B, Orciuolo E, et al. Human autologous plasma-derived clot as a biological scaffold for mesenchymal stem cells in treatment of orthopedic healing. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc*. febbraio 2008;26(2):176–83.
25. Goulet JA, Senunas LE, DeSilva GL, Greenfield MLVH. Autogenous Iliac Crest Bone Graft: Complications and Functional Assessment. *Clin Orthop Relat Res*. giugno 1997;339:76.

26. Gómez-Barrena E, Rosset P, Müller I, Giordano R, Bunu C, Layrolle P, et al. Bone regeneration: stem cell therapies and clinical studies in orthopaedics and traumatology. *J Cell Mol Med.* giugno 2011;15(6):1266–86.
27. Gómez-Barrena E, Rosset P, Lozano D, Stanovici J, Ermthaller C, Gerbhard F. Bone fracture healing: Cell therapy in delayed unions and nonunions. *Bone.* 1 gennaio 2015;70:93–101.
28. Connolly JF, Guse R, Tiedeman J, Dehne R. Autologous marrow injection as a substitute for operative grafting of tibial nonunions. *Clin Orthop.* maggio 1991;(266):259–70.
29. Hernigou P, Mathieu G, Poignard A, Manicom O, Beaujean F, Rouard H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Surgical technique. *J Bone Joint Surg Am.* settembre 2006;88 Suppl 1 Pt 2:322–7.
30. Hernigou P, Pariat J, Queinnec S, Homma Y, Flouzat Lachaniette CH, Chevallier N, et al. Supercharging irradiated allografts with mesenchymal stem cells improves acetabular bone grafting in revision arthroplasty. *Int Orthop.* settembre 2014;38(9):1913–21.
31. Gómez-Barrena E, Padilla-Eguiluz NG, Avendaño-Solá C, Payares-Herrera C, Velasco-Iglesias A, Torres F, et al. A Multicentric, Open-Label, Randomized, Comparative Clinical Trial of Two Different Doses of Expanded hBM-MSCs Plus Biomaterial versus Iliac Crest Autograft, for Bone Healing in Nonunions after Long Bone Fractures: Study Protocol. *Stem Cells Int* [Internet]. 22 febbraio 2018 [citato 27 agosto 2018];2018. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5842679/>
32. Gómez-Barrena E, Rosset P, Gebhard F, Hernigou P, Baldini N, Rouard H, et al. Feasibility and safety of treating non-unions

in tibia, femur and humerus with autologous, expanded, bone marrow-derived mesenchymal stromal cells associated with biphasic calcium phosphate biomaterials in a multicentric, non-comparative trial. *Biomaterials* [Internet]. 19 marzo 2018 [citato 27 agosto 2018]; Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961218302059>

33. Hernigou J, Schuind F. Smoking as a predictor of negative outcome in diaphyseal fracture healing. *Int Orthop.* maggio 2013;37(5):883–7.

34. Hernigou P, Poignard A, Manicom O, Mathieu G, Rouard H. The use of percutaneous autologous bone marrow transplantation in nonunion and avascular necrosis of bone. *J Bone Joint Surg Br.* luglio 2005;87(7):896–902.

35. Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am.* luglio 2005;87(7):1430–7.

36. Hernigou P. Bone transplantation and tissue engineering, part I. Mythology, miracles and fantasy: from Chimera to the Miracle of the Black Leg of Saints Cosmas and Damian and the cock of John Hunter. *Int Orthop.* dicembre 2014;38(12):2631–8.

37. Hernigou P. Bone transplantation and tissue engineering. Part II: bone graft and osteogenesis in the seventeenth, eighteenth and nineteenth centuries (Duhamel, Haller, Ollier and MacEwen). *Int Orthop.* 15 novembre 2014;39(1):193–204.

38. Hernigou P. Bone transplantation and tissue engineering, part IV. Mesenchymal stem cells: history in orthopedic surgery from Cohnheim and Goujon to the Nobel Prize of Yamanaka. *Int Orthop.* 7

marzo 2015;39(4):807–17.

39. Hernigou P, Beaujean F. Abnormalities in the Bone Marrow of the Iliac Crest in Patients Who Have Osteonecrosis Secondary to Corticosteroid Therapy or Alcohol Abuse*. *J Bone Jt Surg.* 1 luglio 1997;79(7):1047–53.

40. Hernigou P. Bone transplantation and tissue engineering, part III: allografts, bone grafting and bone banking in the twentieth century. *Int Orthop.* 21 gennaio 2015;39(3):577–87.

41. Homma Y, Zimmermann G, Hernigou P. Cellular therapies for the treatment of non-union: The past, present and future. *Injury.* gennaio 2013;44, Supplement 1:S46–9.

42. Fekete N, Gadelorge M, Fürst D, Maurer C, Dausend J, Fleury-Cappellesso S, et al. Platelet lysate from whole blood-derived pooled platelet concentrates and apheresis-derived platelet concentrates for the isolation and expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells: production process, content and identification of active components. *Cytotherapy.* maggio 2012;14(5):540–54.

43. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *J Am Stat Assoc.* 1 giugno 1958;53(282):457–81.

44. Healey JH, Zimmerman PA, McDonnell JM, Lane JM. Percutaneous bone marrow grafting of delayed union and nonunion in cancer patients. *Clin Orthop.* luglio 1990;(256):280–5.

45. Garg NK, Gaur S, Sharma S. Percutaneous autogenous bone marrow grafting in 20 cases of ununited fracture. *Acta Orthop Scand.* dicembre 1993;64(6):671–2.

46. Sim R, Liang TS, Tay BK. Autologous marrow injection in the treatment of delayed and non-union in long bones. Singapore

Med J. ottobre 1993;34(5):412–7.

47. Matsuda Y, Sakayama K, Okumura H, Kawatani Y, Mashima N, Shibata T. Percutaneous autologous bone marrow transplantation for nonunion of the femur. *Nihon Geka Hokan Arch Für Jpn Chir.* 1 marzo 1998;67(1):10–7.

48. Siwach RC, Sangwan SS, Singh R, Goel A. Role of percutaneous bone marrow grafting in delayed unions, non-unions and poor regenerates. *Indian J Med Sci.* giugno 2001;55(6):326–36.

49. Wang L, Li WS, Zhang QS. [Autogenous bone marrow graft for the management of nonunion of tibia]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi Zhongguo Xiufu Chongjian Waiké Zazhi Chin J Reparative Reconstr Surg.* gennaio 2001;15(1):24–5.

50. Wilkins RM, Kelly CM. The effect of allomatrix injectable putty on the outcome of long bone applications. *Orthopedics.* maggio 2003;26(5 Suppl):s567-570.

51. Goel A, Sangwan SS, Siwach RC, Ali AM. Percutaneous bone marrow grafting for the treatment of tibial non-union. *Injury.* gennaio 2005;36(1):203–6.

52. Bhargava R, Sankhla S, Gupta A, Changani R, Gagal K. Percutaneous autologous bone marrow injection in the treatment of delayed or nonunion. *Indian J Orthop.* gennaio 2007;41(1):67–71.

53. Garnavos C, Mouzopoulos G, Morakis E. Fixed intramedullary nailing and percutaneous autologous concentrated bone-marrow grafting can promote bone healing in humeral-shaft fractures with delayed union. *Injury.* giugno 2010;41(6):563–7.

54. Singh AK, Shetty S, Saraswathy JJ, Sinha A. Percutaneous autologous bone marrow injections for delayed or non-union of bones. *J Orthop Surg Hong Kong.* aprile 2013;21(1):60–4.

55. Kassem MS. Percutaneous autogenous bone marrow injection for delayed union or non union of fractures after internal fixation. *Acta Orthop Belg.* dicembre 2013;79(6):711–7.

56. Sugaya H, Mishima H, Aoto K, Li M, Shimizu Y, Yoshioka T, et al. Percutaneous autologous concentrated bone marrow grafting in the treatment for nonunion. *Eur J Orthop Surg Traumatol Orthopédie Traumatol.* luglio 2014;24(5):671–8.

57. Braly HL, O'Connor DP, Brinker MR. Percutaneous Autologous Bone Marrow Injection in the Treatment of Distal Metadiaphyseal Tibial Nonunions and Delayed Unions: *J Orthop Trauma.* settembre 2013;27(9):527–33.

58. Scaglione M, Fabbri L, Dell'Omo D, Gambini F, Guido G. Long bone nonunions treated with autologous concentrated bone marrow-derived cells combined with dried bone allograft. *Musculoskelet Surg.* agosto 2014;98(2):101–6.

59. Galois L, Bensoussan D, Diligent J, Pinzano A, Henrionnet C, Choufani E, et al. Autologous bone marrow graft and treatment of delayed and non-unions of long bones: technical aspects. *Biomed Mater Eng.* 2009;19(4–5):277–81.

8 – Indice delle figure

- Figura 1 Il modello del *diamond concept* per l'interazione dei processi di guarigione delle fratture. 7
- Figura 2 a, b Preparati istologici in cui si ritrova il DBM (1) e le CSM (2). Si noti come le cellule tendano ad aderire ed organizzarsi in colonie attorno alle particelle di DBM. 16
- Figura 3 in (a-b) tecnica di prelievo di midollo osseo dalla cresta iliaca posteriore. In (c-d) sacca di trasferimento collegata con la siringa sterile contenente il midollo osseo. 19
- Figura 4 Cartuccia contenente midollo osseo prelevato dalla sacca di trasferimento, inserita nella centrifuga. 21
- Figura 5 a-b: posizionamento della cartuccia sul dispositivo "ResQ 60". 21
- Figura 6 a) Incisione chirurgica; b) Accesso mininvasivo; c) Individuazione del focolaio di ritardo di consolidazione tramite amplificatore di brillantezza; d) Infiltrazione del prodotto CM + DBM + PRF nel focolaio; e) Preparato cellulare prima dell'infiltrazione. 24
- Figura 7 Tipo di frattura. 25
- Figura 8 Tipo di mezzi di sintesi al momento dell'infiltrazione. 26
- Figura 9 Interventi eseguiti prima del trattamento di studio. 27
- Figura 10 a) pseudoartrosi atrofica in una frattura di tibia distale. b,c) controlli radiografici a 1 e 6 mesi che mostra processi consolidativi in atto; d) rimozione del fissatore esterno per avvenuta consolidazione della frattura. 31
- Figura 11 a) pseudoartrosi in una paziente di 45 anni. La frattura era

intercorsa 6 mesi prima ed era stata tratta presso altro centro con placca e viti. Si noti la totale assenza di callo a 6 mesi dall'osteosintesi. b, c, d) Controlli radiografici a distanza di 1, 6 e 18 mesi. Si noti la progressiva formazione di callo osseo sino ad ottenere la completa guarigione della frattura. 32

9 – Ringraziamenti

Si ringraziano per la collaborazione, il sostegno e l'aiuto:

- **Prof. Davide Maria Donati** – Direttore Clinica III ad indirizzo oncologico presso l'Istituto Ortopedico Rizzoli
- **Prof. Nicola Baldini** – Direttore f.f. Laboratorio di Biologia cellulare muscoloscheletrica; Responsabile Laboratorio di Fisiopatologia ortopedica e medicina rigenerativa presso l'Istituto Ortopedico Rizzoli
- Dr.ssa Gabriela Ciapetti – Dirigente Biologo Laboratorio di Fisiopatologia ortopedica e medicina rigenerativa
- Dr.ssa Donatella Granchi – Dirigente Medico Laboratorio di Fisiopatologia ortopedica e medicina rigenerativa