

Giornale Italiano di ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA



Organo ufficiale della Società Italiana di Ortopedia e Traumatologia • www.giot.it

Direttore scientifico: F. Pipino (Monza)

Direttore responsabile: Patrizia Alma Pacini

Comitato di Redazione: A. Bova (Napoli), A. Dettoni (Alba), M. d'Imporzano (Milano), L. Fantasia (San Severo), F. Franchin (Genova), M. Marcacci (Bologna), A. Piccioli (Roma), G. Sessa (Catania), U. Tarantino (Roma), P. Tranquilli Leali (Sassari), M. Trono (Rimini)

Coordinatore Comitato Scientifico: P. Bartolozzi (Verona)

Comitato Scientifico: N. Baldini (Bologna); A. Bova (Napoli); D. Capitani (Milano); M. Catagni (Lecco); S. Cervellati (Modena); G. Cicero (Torino); A. Corigliano (Firenze); A. Costanzo (Roma); M.G. Denti (Milano); R.M. Facchini (Milano); M. Guelfi (Genova); G. Guida (Napoli); E. Manes (Pescara); S. Mapelli (Milano); R. Marsano (Milano); G. Monteleone (Roma); V. Monteleone (Battipaglia); B. Moretti (Bari); E. Romanini (Roma); G. Porcellini (Cattolica); F.S. Santori (Roma); F.M. Senes (Genova); G. Zinghi (Bologna); R. Zini (Cotignola)

Referenti

Editoriali: F. Pipino (Genova)

Notiziario S.I.O.T.: E. Cristofari (Roma)

Sito Società Affiliate: M. Marcacci (Bologna)

Congressi e Recensioni: V. Guzzanti (Roma)

Congresso S.I.O.T.: Comitato di Presidenza

Aggiornamento Professionale: G. Sessa (Catania)

Pagina sindacale: M. Saccomanno (Brindisi)

Medicina legale: G.M. Calori (Milano)

Redazione: Stefano Fabbri • Tel. 050 3130237 • Fax 050 3130300 • sfabbri@pacinieditore.it • giot@pacinieditore.it

Consiglio Direttivo S.I.O.T. biennio 2008-2010

Presidente: P. Bartolozzi

Vice-Presidenti: M. d'Imporzano, P. Tranquilli Leali

Consiglieri: A. Bova, A. Dettoni, L. Fantasia, F. Franchin, M. Marcacci, G. Sessa, U. Tarantino, M. Trono

Past-President: L. Del Sasso

Garante: A. Faldini

Segretario: A. Piccioli

Tesoriere: E. Cristofari



Pacini Editore SpA

Via A. Gherardesca 1, 56121 Pisa

Tel. +39-050-313011 • Fax +39-050-3130300 • info@pacinieditore.it

www.pacinimedicina.it

Registrato presso il Tribunale di Roma – n. 14690 del 1972

Il *Giornale Italiano di Ortopedia e Traumatologia* è Organo ufficiale della Società Italiana di Ortopedia e Traumatologia. Esso si pubblica a fascicoli bimestrali in edizione italiana. Esso affianca *Orthopaedics and Traumatology* che è la pubblicazione ufficiale in inglese della S.I.O.T. La rivista pubblica contributi redatti in forma di Editoriali, Notiziari (S.I.O.T. e Società specialistiche), Report Congressuali, Aggiornamenti professionali (anche di Medicina legale), Pagine sindacali, Rassegne stampa, Recensioni, Articoli Originali e Casi Clinici. Gli articoli scientifici originali dovranno essere accompagnati da una dichiarazione firmata dal primo Autore, nella quale si attesti che i contributi sono inediti, non sottoposti contemporaneamente ad altra rivista, ed il loro contenuto conforme alla legislazione vigente in materia di etica della ricerca. Gli Autori sono gli unici responsabili delle affermazioni contenute nell'articolo e sono tenuti a dichiarare di aver ottenuto il consenso informato per la sperimentazione e per la riproduzione delle immagini. La Redazione accoglie solo i testi conformi alle norme editoriali generali e specifiche per le singole rubriche. La loro accettazione è subordinata alla revisione critica di esperti, all'esecuzione di eventuali modifiche richieste ed al parere conclusivo del Direttore. Il Direttore del Giornale si riserva inoltre il diritto di richiedere agli Autori la documentazione dei casi e dei protocolli di ricerca, qualora lo ritenga opportuno. Nel caso di provenienza da un Dipartimento Universitario o da un Ospedale il testo dovrà essere controfirmato dal responsabile del Reparto (U.O.O., Clinica Universitaria ...). **Conflitto di interessi:** nella lettera di accompagnamento dell'articolo, gli Autori devono dichiarare se hanno ricevuto finanziamenti o se hanno in atto contratti o altre forme di finanziamento, personali o istituzionali, con Enti Pubblici o Privati, anche se i loro prodotti non sono citati nel testo. Questa dichiarazione verrà trattata dal Direttore come una informazione riservata e non verrà inoltrata ai revisori. I lavori accettati verranno pubblicati con l'accompagnamento di una dichiarazione *ad hoc*, allo scopo di rendere nota la fonte e la natura del finanziamento.

Norme generali

Testo: in lingua italiana e corredato di: titolo del lavoro (in italiano ed in inglese); parole chiave (in italiano ed in inglese); riassunto strutturato (in italiano ed in inglese); titolo e didascalie delle tabelle e delle figure.

Le bozze dei lavori saranno inviate per la correzione al primo degli Autori salvo diverse istruzioni. Gli Autori si impegnano a restituire le bozze corrette entro e non oltre 7 giorni dal ricevimento; in difetto i lavori saranno pubblicati dopo revisione fatta dalla Redazione che però declina ogni responsabilità per eventuali inesattezze sia del dattiloscritto che delle indicazioni relative a figure e tabelle.

Nella **prima pagina** devono comparire: il **titolo** (conciso, in italiano ed in inglese); le **parole chiave** in italiano ed inglese; i **nomi** degli Autori e l'**Istituto** o **Ente** di appartenenza; la **rubrica** cui si intende destinare il lavoro (decisione che è comunque subordinata al giudizio del Direttore); il **nome**, l'**indirizzo** ed il **recapito telefonico** dell'Autore cui sono destinate la corrispondenza e le bozze. Nella **seconda pagina** comparirà il riassunto in italiano ed inglese (non più di **200** parole, strutturato secondo le sezioni **Background, Obiettivi, Metodi, Risultati, Conclusioni**); nelle **ultime pagine** compariranno la bibliografia, le didascalie di tabelle e figure e l'eventuale menzione del Congresso al quale i dati dell'articolo siano stati comunicati (tutti o in parte). **Tabelle:** devono essere contenute nel numero (evitando di presentare lo stesso dato in più forme) e numerate progressivamente. **Figure:** vanno riprodotte in foto o digitale e numerate con eventuale indicazione dell'orientamento. I grafici ed i disegni possono essere in fotocopia, purché di buona qualità. **Bibliografia:** va limitata alle voci essenziali identificate nel testo con numeri arabi ed elencate al termine del dattiloscritto nell'ordine in cui sono state citate, avvalendosi delle abbreviazioni internazionali. Esempi di corretta citazione bibliografica per:

Articoli e riviste: Bianchi M, Laurà G, Recalcati D. *Il trattamento chirurgico delle rigidità acquisite del ginocchio*. *Minerva Ortopedica* 1985;36:431-438.

Libri: Tajana GF. *Il condrone*. Milano: Edizioni Mediamix, 1991.

Capitoli di libri o atti di Congressi: Krmpotic-Nemanic J, Kostovis I, Rudan P. *Aging changes of the form and infrastructure of the external nose*

and its importance in rhinoplasty. In: Conly J, Dickinson JT, eds. *Plastic and Reconstructive Surgery of the Face and Neck*. New York: Grune and Stratton 1972, p. 84.

Ringraziamenti, indicazioni di grants o borse di studio, vanno citati al termine della bibliografia. Le note, contraddistinte da asterischi o simboli equivalenti, compariranno nel testo a piè di pagina. Termini matematici, formule, abbreviazioni, unità e misure devono conformarsi agli standards riportati in *Science* 1954;120:1078. I farmaci vanno indicati col nome chimico. Solo se inevitabile potranno essere citati col nome commerciale (scrivendo in maiuscolo la lettera iniziale del prodotto).

Norme specifiche per le singole rubriche

Editoriali: sono intesi come considerazioni generali e pratiche su temi d'attualità, in lingua italiana, sollecitati dal Direttore o dai componenti il Comitato di redazione. È omesso il riassunto. **Articoli d'aggiornamento:** possono anche essere commissionati dal Direttore. Di regola non devono superare le 20 cartelle dattiloscritte (una cartella equivale a 2000 caratteri spazi inclusi), comprese tabelle, figure e voci bibliografiche. Legenda di tabelle e figure sono a parte. È omesso il riassunto. **Articoli originali:** comprendono lavori che offrono un contributo nuovo o frutto di una consistente esperienza, anche se non del tutto originale, in un determinato settore. Devono essere suddivisi nelle seguenti parti: introduzione, materiale e metodo, risultati, discussione e conclusioni. Il testo non deve superare le 15 cartelle dattiloscritte comprese iconografia, bibliografia e riassunto in italiano ed inglese (max. 200 parole). Legenda di tabelle e figure a parte. Il riassunto non deve superare le 200 parole e va suddiviso di regola nelle seguenti sezioni: *Obiettivi, Metodi, Risultati, Conclusioni*. Nella sezione *Obiettivi* va sintetizzato con chiarezza l'obiettivo (o gli obiettivi) del lavoro, vale a dire l'ipotesi che si è inteso verificare; nei *Metodi* va riportato il contesto in cui si è svolto lo studio, il numero e il tipo di soggetti analizzati, il disegno dello studio (randomizzato, in doppio cieco ...), il tipo di trattamento e il tipo di analisi statistica impiegata. Nella sezione *Risultati* vanno riportati i risultati dello studio e dell'analisi statistica. Nella sezione *Conclusioni* va riportato il significato dei risultati soprattutto in funzione delle implicazioni cliniche. **Articoli originali brevi:** comprendono brevi lavori (non più di 3 cartelle di testo) con contenuto analogo a quello degli Articoli originali e come questi suddivisi. Sono ammesse 2 tabelle o figure e una decina di voci bibliografiche. **Casi clinici:** vengono accettati dal Comitato di Redazione solo lavori di interesse didattico e segnalazioni rare. La presentazione comprende l'esposizione del caso ed una discussione diagnostico-differenziale. Il testo deve essere conciso e corredato, se necessario, di 1-2 figure o tabelle e di pochi riferimenti bibliografici essenziali. Il riassunto è di circa 50 parole. **Lettere alla direzione:** possono far riferimento a problemi di interesse ortopedico d'attualità oppure ad articoli già pubblicati. Nel secondo caso la lettera verrà preventivamente inviata agli Autori dell'articolo e l'eventuale risposta degli stessi pubblicata in contemporanea. La loro estensione non dovrebbe superare le due pagine dattiloscritte, precedute dal titolo. È richiesta la sola lingua italiana. **Dai Libri:** la rivista si riserva di fare e/o pubblicare le recensioni di libri che le venissero proposti. Il testo, di 1-2 pagine, dovrà essere in italiano.

Gli scritti di cui si fa richiesta di pubblicazione vanno indirizzati (in originale o per E-mail) a: **Pacini Editore SpA – Ufficio Editoriale, Via Gherardesca, 56121 Ospedaletto (PI) – c.a. Stefano Fabbri / Eleonora Lollini • Tel. 050 3130237 • 050 3130283 • E-mail: giot@pacineditore.it, sfabbri@pacineditore.it, elollini@pacineditore.it**

Il *Giornale Italiano di Ortopedia e Traumatologia* è bimestrale. I prezzi degli abbonamenti annuali per i NON Soci sono i seguenti: Italia € 97; estero € 122; istituzionale € 97. Questo fascicolo € 32. Le richieste di abbonamento ed ogni altra corrispondenza relativa agli abbonamenti vanno indirizzate a: *Giornale Italiano di Ortopedia e Traumatologia* • Ufficio Abbinamenti • Pacini Editore S.p.A., via Gherardesca, 56121 Ospedaletto (PI) • Tel. 050 313011 • Fax 050 3130300 • abbonamenti@pacineditore.it • www.pacinimedicina.it

Finito di stampare Ottobre 2010

Le fotocopie per uso personale del lettore possono essere effettuate nei limiti del 15% di ciascun fascicolo di periodico dietro pagamento alla SIAE del compenso previsto dall'art. 68, commi 4 e 5, della legge 22 aprile 1941 n. 633. Le riproduzioni effettuate per finalità di carattere professionale, economico o commerciale o comunque per uso diverso da quello personale possono essere effettuate a seguito di specifica autorizzazione rilasciata da AIDRO, Corso di Porta Romana n. 108, Milano 20122, e-mail segreteria@aidro.org e sito web www.aidro.org

I dati relativi agli abbonati sono trattati nel rispetto delle disposizioni contenute nel D.Lgs. del 30 giugno 2003 n. 196 a mezzo di elaboratori elettronici ad opera di soggetti appositamente incaricati. I dati sono utilizzati dall'editore per la spedizione della presente pubblicazione. Ai sensi dell'articolo 7 del D.Lgs. 196/2003, in qualsiasi momento è possibile consultare, modificare o cancellare i dati o opporsi al loro utilizzo scrivendo al Titolare del Trattamento: Pacini Editore S.p.A. - Via A. Gherardesca 1 - 56121 Ospedaletto (Pisa)

Indice

Introduzione <i>P. Bartolozzi</i>	pag. 171
Premessa <i>G. Sessa</i>	» 172
La medicina rigenerativa in ortopedia: introduzione <i>D.M. Donati</i>	» 173
Applicazioni cliniche: importanza dello <i>scaffold</i> nell'uso combinato di cellule staminali e <i>growth factors</i> <i>R. Capanna, P. De Biase</i>	» 178
Pseudoartrosi e perdite di sostanza <i>G.M. Calori, L. Tagliabue, M. Colombo, E. Mazza, W. Albigetti</i>	» 183
Applicazioni cliniche sull'osso: allungamenti ossei <i>A. Biasibetti</i>	» 190
Il trattamento dei difetti ossei periprotetici nell'anca: il ruolo delle biotecnologie <i>M. D'Imporzano, M. Caforio, L. Pierannunzi</i>	» 196
Rigenerazione tissutale: applicazioni cliniche nel trattamento della cartilagine articolare <i>P. Volpi, L. de Girolamo</i>	» 200
Razionale dell'utilizzo della "bioingegneria tissutale": applicazioni cliniche sui muscoli <i>F. Benazzo, L. Perticarini</i>	» 206
Applicazioni cliniche sui tendini <i>P.S. Randelli</i>	» 212
Aspetti medico legali dei prodotti in medicina rigenerativa e consenso informato <i>E.M. Brach del Prever, D.M. Donati, S. Fiorentino, E. Macrì</i>	» 224

SOCIETÀ ITALIANA DI ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA

Commissione Rigenerazione Tissutale Rigenerazione Tissutale in Ortopedia: stato dell'arte in Italia

Presidente: Prof. Pietro Bartolozzi
Coordinatore: Prof. Giuseppe Sessa
Segretario: Dr. Andrea Piccioli

Membri: Prof. Francesco Benazzo
Dr. Antonio Biasibetti
Prof.ssa Elena Maria Brach del Prever
Prof. Giorgio Maria Calori
Prof. Rodolfo Capanna
Prof. Lanfranco Del Sasso
Prof. Marco d'Imporzano
Dr. Davide Maria Donati
Avv. Stefano Fiorentino
Prof. Franco Laurenza
Avv. Ernesto Macrì
Prof. Mario Mercuri
Dr. Pietro Simone Randelli
Prof. Gianni Randelli
Dr. Piero Volpi

Introduzione

Introduction

P. Bartolozzi

Il rapido sviluppo delle biotecnologie e delle loro applicazioni nel vasto capitolo della rigenerazione tissutale, ha portato nel mondo ortopedico grandi attese, ma anche confusione su ciò che deve essere fatto e su come farlo. Nel mondo di oggi l'informazione viaggia rapidissima, ma spesso senza quel filtro di validazione scientifica necessaria a valutare risultati clinici spesso contraddittori.

È sempre stata mia ferma opinione che una delle missioni principali delle Società scientifiche sia quella di emanare Linee Guida, protocolli diagnostico-terapeutici, raccomandazioni su temi importanti e, come in questo caso, complessi e fortemente dibattuti.

La SIOT, già nel biennio precedente al mio mandato istituì una Commissione per studiare lo stato dell'arte della rigenerazione tissutale in campo ortopedico. Ora con grande soddisfazione personale il C.D. e più specificatamente la Commissione, coordinata da Giuseppe Sessa, con al suo interno i maggiori esperti e studiosi della materia, presenta a tutti i Soci il frutto di questo lavoro in un numero speciale della nostra rivista, il GIOT.

La Commissione Rigenerazione Tissutale ha elaborato un documento valido, aggiornato su di un argomento spesso al confine tra scienza e fantascienza, fotografando uno stato dell'arte e fornendo alcune raccomandazioni utili a tutti quei Colleghi ortopedici che vogliono orientarsi in un ambito così complesso.

Un ringraziamento al Consiglio Direttivo e ai membri della Commissione Rigenerazione Tissutale che hanno lavorato molto impegnandosi a rispettare i tempi e i numerosi paletti posti da un argomento nuovo e difficile.

Grazie al Coordinatore Giuseppe Sessa che ha guidato con mano ferma e capace tanti grandi solisti.

Grazie al Segretario della SIOT e Segretario della Commissione Andrea Piccioli che, come sempre, ha organizzato il lavoro con cura e passione.

Premessa

Foreword

G. Sessa

Quando il prof. Bartolozzi mi ha chiesto di coordinare la commissione sulla rigenerazione tissutale la prima cosa che mi sono chiesto è stata “Quali devono essere i compiti di una commissione scientifica, relativamente ad un problema divenuto di così grandi proporzioni in tutti i settori della medicina e naturalmente anche nelle nostra specialità?”.

Certamente lo scopo che la SIOT si era prefisso, già nel precedente biennio istituendo una commissione di studio, era quello di mettere “ordine” in un settore così delicato.

E mettere “ordine” è un obbligo preciso per la nostra società in quanto le problematiche legate al capitolo della rigenerazione tissutale e delle biotecnologie ad essa legate, vivono oggi un evidente paradosso: se da un lato infatti queste nuove biotecnologie sono in piena espansione nella nostra disciplina, dall’altro bisogna ammettere che a questa diffusione non corrisponde, nella maggioranza dei casi, un’evidenza clinica e alle volte non ne appare giustificato neppure l’utilizzo; e tutto ciò anche in considerazione dei costi e delle difficoltà ad avere un riconoscimento certo nei DRG (*Diagnosis Related Group*).

Per questi motivi ho pensato che la prima cose da fare era quella di portare informazione e cultura su queste tematiche a tutti i soci SIOT.

Approfittando del fatto che i membri di questa commissione sono anche i massimi esperti del settore mi è sembrato appropriato chiedere ad ognuno di loro di mettere per iscritto le loro esperienze, riportando ovviamente anche i dati della letteratura internazionale.

La realizzazione di questa piccola monografia quindi porta a conoscenza di tutti i soci lo stato dell’arte sulla rigenerazione tissutale in Ortopedia e penso che rappresenti un buon punto di partenza per definire quelle che oggi sono le evidenze scientifiche nell’utilizzo di tali tecnologie.

Lavorare in questa direzione permetterà in un prossimo futuro di individuare le patologie in cui c’è una reale indicazione a tali biotecnologie e iniziare il lungo e difficile cammino per il riconoscimento, delle stesse, nei DRG Ministeriali e Regionali.

Direttore Dipartimento di
Specialità Medico-Chirurgiche
Sezione di Ortopedia e
Traumatologia
Università di Catania

La medicina rigenerativa in ortopedia: introduzione

Introduction of regenerative medicine in orthopaedic surgery

D. Donati

RIASSUNTO

La medicina rigenerativa consiste nell'applicazione di uno o più elementi all'interno di un sito di riparazione ossea, cartilaginea o altro al fine di ottenere una guarigione più rapida e completa. Si avvale di cellule staminali mesenchimali derivate da diversi tessuti, più spesso midollo osseo della cresta iliaca e grasso sottocutaneo. Alle cellule possono essere associati fattori di crescita per aumentare la velocità di replicazione cellulare ed il loro differenziamento, ed elementi di supporto per una migliore permanenza nel sito di lesione.

Parole chiave: medicina rigenerativa, ingegneria tissutale, fattori di crescita, supporto di crescita

SUMMARY

Regenerative medicine is the science to speed up and improve healing of bone cartilage or other tissues surgically applying different factors such as mesenchymal stem cells (MSC), growth factors and scaffold. MSC can be derived from different tissue sources, more often by iliac crest bone marrow and fat. Growth factors can be associated to replicating and differentiating stem cells. While to allow adhesion and homing in the damaged tissues, scaffold can be use in association as well.

Key words: regenerative medicine, tissue engineering, growth factors, scaffold

Laboratorio di Rigenerazione
Tissutale Ossea, Dipartimento
di Oncologia Muscoloscheletrica,
Istituto Ortopedico "Rizzoli",
Bologna

Indirizzo per la corrispondenza:
Prof. Davide Donati, Clinica
Ortopedica e Traumatologica II
Laboratorio di Patologia
Ortopedica e Rigenerazione
Tissutale Osteoarticolare,
Istituto Ortopedico Rizzoli,
Via di Barbiano 1/10,
40136, Bologna (BO).
Tel. +39 051 6366595
Fax +39 051 6366799
E-mail: brl@ior.it

La rigenerazione di un tessuto viene attivata da stimoli locali conseguenti a un danno diretto o indiretto. Traumi e interventi chirurgici fanno parte di stimoli a cui l'organismo risponde con un meccanismo riparativo. L'efficienza del fenomeno dipende dalla capacità reattiva dell'individuo basata prevalentemente sull'età, e dall'entità della lesione. Inoltre le lesioni di carattere degenerativo basate sull'invecchiamento (artrosi, osteoporosi) o sui microtraumi ripetuti, tendono per loro natura ad essere più difficilmente riparate a causa della mancanza di fattori locali (fattori di crescita, cellule, vascolarizzazione) in grado di reagire al progressivo danno tissutale.

In ambito ortopedico, il meccanismo di riparazione ossea si presenta efficace innanzitutto se i tessuti vengono messi nella condizione di guarire attraverso la riduzione ed una razionale osteosintesi (stabilità meccanica). Nonostante ciò esistono numerose condizioni patologiche che eccedono la capacità locale di riparare il danno in modo particolare quando vi sia una perdita di sostanza dovuta ad asportazione di tumore,

frattura esposta, fallimento protesico con riassorbimento osseo, o quando vi sia un osso patologico (cisti ossee, displasia fibrosa, osteopsatirosi, displasie scheletriche in generale, necrosi ossea primitiva o secondaria). In tutte queste circostanze con metodiche tradizionali vi è una quota consistente, seppur variabile di fallimenti, associata spesso a terapie di lunga durata.

La ricerca sulle cellule staminali parte dall'osservazione fatta in ambito laboratoristico ormai più di 30 anni fa che in ogni tessuto è presente una riserva di precursori cellulari indifferenziati capaci di rispondere agli stimoli ed intervenire nella riparazione tessutale. Queste cellule (cellule staminali mesenchimali, CSM) si possono quindi prelevare da vari tessuti di sostegno maturi quali cartilagine, periostio e grasso. La fonte più esplorata è il midollo osseo della cresta iliaca in quanto da sempre sorgente di elementi cellulari per la ricostituzione del tessuto ematopoietico. Insieme a queste cellule sono presenti anche i precursori dello stroma connettivale CSM che sono in grado, opportunamente indirizzate, di ricostituire i tessuti di sostegno quali osso, cartilagine, muscoli, tendini, muscolo cardiaco ecc. Purtroppo, la presenza di queste cellule nelle riserve dell'organismo è variabile in relazione all'età ed alle condizioni generali del paziente, e spesso comunque limitata, tale per cui il semplice prelievo dal tessuto sorgente, e la sua re infusione rischia di risultare insufficiente (concentrati midollari).

L'espansione cellulare in laboratorio, la quale consiste nella selezione e indirizzo in senso differenziativo delle cellule, permette di avere un prodotto quantizzabile e riproducibile. La manipolazione in laboratorio delle cellule permette inoltre di indirizzare, differenziare le cellule verso i componenti di un tessuto maturo attraverso l'uso di fattori di crescita (*growth factor*). Queste citochine agiscono sulle cellule staminali inducendole a proliferare e, durante la replicazione a trasformarsi in elementi che contribuiscono a produrre nuovi vasi (angiogenesi riparativa) e la sostanza fondamentale del nuovo tessuto. I fattori di crescita da soli, o l'insieme delle CSM ed i fattori di crescita, possono essere inserite con chirurgia aperta o addirittura con la semplice iniezione, nell'ambito di un tessuto in fase di riparazione (medicina rigenerativa). Normalmente la consistenza desiderata del prodotto da iniettare viene ottenuta attraverso un biomateriale come il collagene o l'acido ialuronico (*carrier*), che permette di fare aderire il fattore di crescita e le CSM.

Un processo più complesso è la costituzione del tessuto direttamente in laboratorio che viene poi inserito

chirurgicamente in una mancanza tessutale (ingegneria tessutale). Tale prodotto comporta la realizzazione di un nuovo tessuto a partire da un substrato (*scaffold*) che costituisce l'ambiente all'interno del quale, attraverso opportune condizioni biofisiche le cellule staminali in via di differenziamento trovano le condizioni per una crescita tridimensionale (coltura in bioreattore).

Gli studi nell'animale da esperimento hanno dimostrato una buona efficacia delle applicazioni di medicina rigenerativa e ingegneria tessutale nella maggior parte delle applicazioni proposte in differenti tessuti, dall'apparato muscolo scheletrico al nervoso, dal cardiaco alla cute. Nonostante ciò il passaggio in clinica si presenta ancora problematico poiché l'utilizzo di CSM espanso in laboratorio è considerata dalla nostra legislazione una terapia farmacologica (farmaco cellulare). Ciò impone la necessità di effettuare l'espansione cellulare in un laboratorio certificato per la produzione farmacologica (laboratorio in *Good Manufacturing Practice* [GMP]). A ciò consegue che, dato l'alto livello di richiesta di caratteristiche tecniche e funzionali del laboratorio, solo pochi fra i laboratori presenti in Italia riescono a conseguire la certificazione, inoltre, la produzione ha costi ancora molto elevati.

Questi limiti nell'applicazione, che sono propri di tutti i paesi più avanzati al mondo, fanno sì che vi siano ancora poche pubblicazioni che riportano trial clinici su sperimentazione in fase I per terapie con farmaco cellulare. Mentre è più abbondante la letteratura che riporta casistiche in cui la rigenerazione ossea (BMP2 e BMP7) o di altri tessuti di sostegno (plasma ricco di piastrine, PRP), sia stata stimolata dai soli fattori di crescita.

Finendo riportiamo qui di seguito alcuni articoli fra i più significativi in letteratura che includono sia l'impianto di concentrato midollare autologo, che di cellule selezionate ed espanso in laboratorio.

TERAPIA CON CONCENTRATO MIDOLLARE AUTOLOGO

- 1 Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, et al. *Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells.* J Bone Joint Surg 2005;87A:1430-7.

Il lavoro si basa sull'iniezione di concentrato midollare autologo nelle pseudoartrosi di tibia (tot 60 pz). Il composto viene iniettato per via per cutanea nel sito di pseu-

doatrosi, senza asportare il tessuto fibroso. Ottengono una guarigione in 53 casi su 60 in 12 settimane, nei 7 casi non guariti affermano che l'unica variabile è stata il numero di cellule iniettate, che è risultato $< 1000/\text{cm}^3$. In questo lavoro viene presentata una valutazione del numero delle cellule staminali mesenchimali (MSC) mediante la conta delle unità formanti colonie (CFU).

2 Hernigou P, Beaujean F. *Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting*. Clin Orthop Res 2002;405:14-23.

Impianto di concentrato midollare autologo nella necrosi della testa del femore di qualsiasi stadio (59 gr I; 86 gr II; 12 gr III; 32 gr IV), dopo *core decompression*. Studio prospettico in 116 pazienti (189 anche) con un follow-up da 5 a 10 anni (senza gruppo di controllo). Nel 20% dei pazienti (32 anche) fra i 3 ed i 5 anni post-op è stato necessario eseguire una protesi (stadio pre-intervento: 2 gr I, 7 gr II, 5 gr III, 20 gr IV). Nei restanti pazienti (155 anche) non è stato necessario eseguire una artroprotesi (stadio pre-intervento: 57 gr I, 79 gr II, 7 gr III, 12 gr IV), e al follow-up più recente si è evidenziato che le necrosi di stadio più basso (I e II) mostravano una significativa riduzione dell'evoluzione verso il collasso rispetto ai gradi più elevati. Nessuna importante complicazione dovuta alla metodica.

3 Gangji V, Hauzeur J-P, Matos C, et al. *Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone-marrow cells. A Pilot Study*. J Bone Joint Surg 2004;86A:1153-60.

Impianto di concentrato midollare autologo nella necrosi della testa del femore di grado I o II dopo *core decompression* (tot 13 pz, 18 anche). Eseguono 2 gruppi di studio: *core decompression* da solo e *core decompression* + impianto di concentrato midollare. Migliore risposta clinica del gruppo con cellule rispetto all'altro, con riduzione del dolore dopo 24 mesi. Solo un caso è avanzato a una osteonecrosi di grado III nel gruppo con le cellule, mentre 5 su 8 casi dell'altro gruppo sono avanzati di grado. Nessun paziente ha poi fatto una protesi d'anca nel gruppo con le cellule, mentre 2 pz del gruppo di controllo hanno fatto la protesi (sempre a 24 mesi). Radiograficamente il volume dell'osso necrotico a 24 mesi è diminuito nei pz con le cellule, mentre è aumentato nei pz senza cellule.

4 Dallari D, Savarino L, Stagni C, et al. *Stromal cells supplemented with platelet gel or platelet gel and bone marrow enhanced tibial osteotomy healing with use of bone grafts*. J Bone Joint Surg 2007;89A:2413-20.

Impianto di concentrato midollare associato o meno a PRP in *chips* d'osso per il trattamento del ginocchio varo mediante cuneo a mettere sulla tibia (tot 33 pz). Eseguono 3 gruppi di studio e mediante valutazioni radiografiche ed istologiche/istomorfometriche viene mostrato che i gruppi con concentrato midollare e quello con PRP hanno una più rapida incorporazione dell'impianto e che istologicamente si ha nuova formazione di tessuto simil-midollare all'interno dell'impianto stesso, mentre questo non succede nel gruppo trattato solo con innesto osseo. Clinicamente nessuna differenza tra i gruppi. Dicono inoltre che il PRP anche da solo serve nella stimolazione della osteogenesi grazie allo stimolo della neoangiogenesi, e la concentrazione ottimale di piastrine deve essere attorno al milione per μl di plasma, altrimenti non si ottengono i risultati sperati. Se però la loro concentrazione è superiore a 2 milioni l'effetto che si ottiene è l'opposto, cioè di inibizione dell'attività osteoblastica.

5 Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, et al. *Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta*. Nat Med 1999;5:309-13.

6 Horwitz EM, Prockop DJ, Gordon PL, et al. *Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta*. Blood 2001;97:1227-31.

In entrambi i lavori, il secondo è l'ampliamento di casistica del primo, viene riportata dallo stesso gruppo l'infusione intravenosa di midollo osseo non manipolato prelevato da donatori con sistema di antigene leucocitario umano (HLA) identico o con un singolo *mis-match* in con grave osteogenesi imperfetta (cellule mesenchimali allogene). Dopo 3 mesi si è avuto un aumento del contenuto minerale osseo e un aumento della velocità di crescita con una riduzione del rischio di frattura. Non sono riportate in letteratura altre esperienze di questo genere dallo stesso gruppo ne da altri.

TERAPIA CON CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI ESPANSE

1 Kitoh H, Kitakoji T, Tsuchiya H, et al. *Transplantation of culture expanded bone marrow cells and platelet rich plasma in distraction osteogenesis of the long bones*. Bone 2007;40:522-8.

Impianto di PRP + MSC autologhe espanse e stimulate in senso osteogenico (dexametasone, β -glicerofosfato, acido ascorbico) in pazienti in cui si esegue un allungamento degli arti (*distraction osteogenesis*). Dopo circa 3 settimane il mix fra PRP e MSC espanse viene introdotto tramite 2 aghi da 18 gouge direttamente nel sito della distrazione, dove è presente il rigenerato osseo. Studio comparativo fra pazienti trattati con MSC + PRP (32 arti, 17 pz) contro controllo (60 arti in 29 pz). Stabiliscono un indice di guarigione (*healing hindex*): tempo richiesto per un completo *bone bridging* diviso il totale dell'allungamento ottenuto. Risultati: non vi sono differenze per età né per allungamento ottenuto. La differenza significativa riguarda il tempo richiesto per il *bone bridging* (l'*healing index*), che va da 27-33 giorni per centimetro di allungamento nei casi con MSC + PRP a 36-73 giorni nei casi di controllo.

2 Quarto R, Cancedda R, Mastrogiacomo M, et al. *Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells*. N Engl J Med 2001;344:385-6.

3 Marcacci M, Kon E, Moukhachev V, et al. *Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study*. Tissue Eng 2007;13:947-55.

In 3 pazienti con perdite di sostanza ossea introducono MSC espanse in laboratorio e fatte crescere su uno *scaffold* di idrossiapatite. Non fanno gruppi di controllo, è il primo e unico lavoro che riporta un'esperienza di vera e propria ingegneria tissutale applicata in ambito osseo. Il risultato è buono non vengono riportate complicazioni. Nel lavoro del 2007 viene aggiornato il tempo di controllo degli stessi pazienti (6-7 anni).

PATOLOGIE OSSEE MAXILLO-FACIALI

1 Yamada Y, Ueda M, Hibi H, et al. *Translational research for injectable tissue-engineered bone regen-*

eration using mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: from basic research to clinical case study. Cell Transplant 2004;13:343-55.

Dopo una prima fase di ricerca di base, nella quale hanno dimostrato una maggiore densità di osso neoformato in cani trattati con PRP + MSC nel riempimento di difetti ossei mandibolari, hanno trasferito la metodica in clinica: In 3 pazienti con necessità di impianti dentari hanno applicato un prodotto costituito da PRP e MSC autologhe e contemporaneamente hanno inserito impianti in titanio. I risultati clinici sono stati ottimali.

2 Kawaguchi H, Hayashi H, Mizuno N, et al. *Cell transplantation for periodontal diseases. A novel periodontal tissue regenerative therapy using bone marrow mesenchymal stem cells*. Clin Calcium 2005;15:99-104.

Trattamento di 7 pazienti con difetti ossei dentali mediante impianto di MSC autologhe espanse + collagene. I risultati clinici si sono dimostrati buoni in tutti i casi.

3 Ueda M, Yamada Y, Ozawa R, et al. *Clinical case reports of injectable tissue-engineered bone for alveolar augmentation with simultaneous implant placement*. Int J Periodontics Restorative Dent 2005;25:129-37.

Trattamento di 6 pazienti con un difetto alveolare dai 3 ai 5 mm che necessitavano di un aumento del seno mascellare. Impianto di un materiale composito costituito da MSC espanse, PRP e beta-tricalcio-fosfato, e contemporaneo impianto di protesi (totale 20 impianti). Tutti gli impianti a 12 mesi dall'intervento hanno dimostrato una ottima stabilità con un incremento dell'altezza del tessuto mineralizzato di 7,3 mm rispetto al preoperatorio.

4 Schimming R, Schmelzeisen R. *Tissue-engineered bone for maxillary sinus augmentation*. J Oral Maxillofac Surg 2004;62:724-9.

Studio clinico di aumento del seno mascellare in 27 pazienti mediante l'utilizzo di matrice ossea derivata da cellule pro-osteoblastiche periostee impiantate su una superficie di Ethisorb. Dimostrano che i risultati clinici, radiografici e istologici sono stati eccellenti in 18 pazienti a 3 mesi dall'intervento, mentre nei restanti casi il risultato è stato poco soddisfacente probabilmente a causa di una superficie trattata troppo estesa. L'istologia

eseguita su biopsie a 3 mesi ha dimostrato la presenza di tessuto osseo mineralizzato all'interno dello *scaffold*, che costituisce la base ottimale per permettere un impianto dentario simultaneo o secondario.

PROTOCOLLI APPROVATI DALLA FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA) GIÀ IN CORSO O TERMINATI

- NCT00250302.
Autologous Implantation of Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Distal Tibial Fractures
24 pazienti con fratture di tibia distale, trattate con inchiodamento o placca e viti, nelle quali si aggiunge l'utilizzo di MSC isolate dal midollo e caricate su un *carrier*. Non si capisce se sono anche espanse (sembra

di no, dovrebbe essere una *one step*) e che tipo di *carrier* è (collagene?)

Studio ancora attivo, nessun risultato disponibile

Principal Investigator: Meir Liebergall, Prof. Hadassah Medical Organization

- NCT00424567
Feasibility Study of Aastrom Tissue Repair Cells to Treat Non-Union Fractures
36 pazienti con pseudoartrosi trattati con i consueti metodi e in aggiunta MSC prelevate dal midollo e impiantate su matrice ossea. Non c'è espansione, *one step surgery*
Studio iniziato nel 2003, completato a luglio 2007. Nessun risultato ancora disponibile
Principal Investigator: Matthew Jimenez, MD Illinois Bone and Joint Institute

Applicazioni cliniche: importanza dello *scaffold* nell'uso combinato di cellule staminali e *growth factors*

Clinical applications of scaffolds engineered with stem cells and growth factors

R. Capanna
P. De Biase
A. Piccoli

RIASSUNTO

L'utilizzo di innesti per ricostruire le perdite di sostanza dell'osso è una metodica di antica data. La novità degli ultimi anni è rappresentata dal fatto di poter avere a disposizione nuovi composti come fattori di crescita e cellule staminali da aggiungere a questi innesti. Nasce quindi il problema di come utilizzare questi composti e anche di quali proprietà sono necessarie affinché lo *scaffold* possa facilitare la sinergia tra tali elementi. La letteratura scientifica presenta i primi risultati di tali metodiche in campo clinico dopo numerosi studi preclinici. Se i risultati appaiono decisamente incoraggianti nell'aiutare una chirurgia sempre meno invasiva per il paziente e sempre più efficace, ancora molta attenzione va posta nel rendere standardizzabili queste metodiche per un uso diffuso.

Parole chiave: innesto osseo, cellule staminali, fattori di crescita, ingegneria tissutale

SUMMARY

The use of grafts to reconstruct bone loss is an ancient technique. During recent years new possibilities to add growth factors and stem cells to bone grafts have been developed. Immediately new questions about the use of these constructs and about the properties of scaffolds necessary to enhance the synergies of different factors. The scientific literature presents the preliminary results of these methods in the clinical field after several preclinical studies. If the results are very encouraging in helping orthopaedists to a less invasive and more effective surgery for the patients, still attention should be paid to make these methods standardized for widespread use.

Key words: scaffold, growth factors, bone graft, tissue engineering

INTRODUZIONE

La riparazione dei difetti ossei siano essi conseguenti a un trauma o a un intervento chirurgico di resezione ossea per cause diverse (infettive o oncologiche) ha sempre rappresentato un'importante prova per l'ortopedico. Fin dagli inizi di questa specialità il chirurgo ha cercato in natura dei materiali che potessero sostituire in qualche modo l'osso mancante. L'osso stesso, di provenienza umana o animale è sempre stato il più ovvio e semplice sostituto e tuttora l'innesto osseo autologo rappresenta la scelta più comune. Ma in alcuni casi o per la ridotta disponibilità o per la qua-

Dipartimento di Ortopedia,
S.O.D. complessa di Ortopedia
Oncologica e Chirurgia
Ricostruttiva, Azienda
Ospedaliero-Universitaria
"Careggi", CTO, Firenze

Indirizzo per la corrispondenza:

Dott. Pietro De Biase
Dipartimento di Ortopedia,
S.O.D. complessa di Ortopedia
Oncologica e Chirurgia
Ricostruttiva, Azienda
Ospedaliero-Universitaria
"Careggi", CTO, Firenze
Tel. +39 055 7948167
Fax +39 055 7948191
E-mail: piedeb@gmail.com

lità dell'osso autologo dobbiamo ricorrere a sostituti. In questo campo si inseriscono le nuove biotecnologie che cercano di ricostruire un sostituto osseo ideale. Se in alcune situazioni cliniche possiamo affidarci solo alle cellule staminali o ai fattori di crescita come adiuvanti della guarigione, in presenza di un difetto critico dobbiamo utilizzare assolutamente uno *scaffold*, cioè un substrato, che può essere associato o meno ad altri fattori biologici.

SCAFFOLD

Gli scaffold a nostra disposizione sono di vari tipi: possiamo avere materiali biologici e materiali sintetici. Tra i materiali biologici l'osso omologo è il più utilizzato. La matrice ossea demineralizzata è un materiale di derivazione biologica e possiede qualità simili all'osso omologo. I materiali sintetici o biomateriali più utilizzati sono principalmente il gruppo dei composti calcio fosfati e delle ceramiche coralline, e in minor misura i vetri bioattivi. Tutti gli *scaffold* hanno in comune capacità osteoconduttive, mentre variano molto le loro capacità osteoinduttive e le proprietà fisiche. A parte l'ovvia capacità dell'innesto osseo di interagire con il tessuto circostante la capacità osteoconduttiva dei biomateriali di sintesi si basa principalmente sulla biomimesi, strettamente legata alla formulazione chimica, sulla porosità del materiale, sulla sua geografia superficiale e sulla sua configurazione tridimensionale. Le capacità osteoinduttive cioè di indurre le cellule circostanti a produrre nuova matrice ossea agendo sul microambiente non sono invece caratteristiche comuni a tutti i materiali. L'osso omologo e la matrice demineralizzata vanno considerati dotati di osteoinduzione.

I composti sintetici a base di calcio fosfato hanno alle loro spalle una lunga pratica clinica. In base alle diverse formulazioni chimiche utilizzate è possibile avere a disposizione un composto con caratteristiche principali di biodegradabilità o un composto che offra principalmente caratteristiche meccaniche. La forma con cui il materiale si presenta può essere variabile: polvere, granuli, pasta morbida, *chips*, blocchi modellabili. All'interno del materiale è presente una porosità che va distinta in microporosità con pori di diametro inferiore al micron e dovuti ad una incompleta sinterizzazione durante la produzione ed una macroporosità, con pori di diametro > 100 micron, che invece dipende da una precisa scelta nella configurazione tridimensionale del materiale per permettere la crescita cellulare all'interno dei macropo-

ri e ricreare una porosità simile all'osso naturale. Se si associano composti sintetici a fattori di crescita e cellule staminali è necessario utilizzare composti che presentino una macroporosità tale da permettere l'adesione cellulare e l'invasione dei vasi neoformati e abbiano una rapida (3-6 mesi) degradabilità. L'utilizzo di un sostituto ceramico accoppiato a fattori di crescita è stata descritta con successo in chirurgia spinale e in odontoiatria^{1,2}.

La matrice ossea demineralizzata (DBM) viene prodotta partendo da una base di tessuto osseo. Il procedimento di demineralizzazione ha il suo tallone d'Achille nella conservazione dell'integrità delle proteine osteogeniche durante il processo di decalcificazione. L'altro fattore negativo è che per la legge italiana ogni singola confezione di DBM utilizzata deve provenire da un singolo donatore, cioè deve prevedere una tracciabilità. Questo fa sì che sussista una variabilità tra le singole partite dovute alla variabilità fisiologica che esiste tra i singoli individui e che sia difficile stabilire l'affidabilità del prodotto utilizzato. L'utilizzo combinato di matrice ossea demineralizzata e cellule staminali è stato descritto in letteratura con buoni risultati³, mentre sono scarsi gli studi sulla DBM isolata e con risultati contrastanti.

L'osso omologo è un innesto che possiede sia capacità osteoconduttive sia osteoinduttive. Infatti durante il riassorbimento a cui va incontro dopo l'impianto si crea una decalcificazione graduale e quindi un'esposizione della matrice collagenica che contiene le proteine osteogenetiche; queste proteine sono le responsabili del processo di osteoinduzione dovuto alla matrice ossea demineralizzata. L'osso omologo si può utilizzare nella forma e spesso nelle dimensioni volute: *chips* di osso spongiosi, *chips* miste di corticale e spongiosi, innesti corticali, innesti massivi o osteoarticolari. L'innesto di osso spongioso offre scarsa resistenza meccanica, ma va incontro ad un processo di riassorbimento abbastanza rapido e viene sostituito da tessuto osseo che in 6-12 mesi recupera una normale resistenza meccanica. L'innesto di osso corticale viene riassorbito in maniera molto più lenta e pertanto per circa 6 settimane mantiene la sua resistenza originaria, almeno fino alla sua graduale rivascularizzazione che comunque in genere non riesce mai a penetrare completamente l'innesto ma rimane limitata alla superficie. Gli innesti corticali trovano la loro applicazione elettiva nella ricostruzione di segmenti in cui è importante ottenere una buona resistenza meccanica già nelle prime fasi dell'impianto come nelle revisioni protesiche o nelle pseudoartrosi dov'è necessario un impianto strutturale.

Per le sue caratteristiche biologiche e fisiche l'osso omologo è il substrato ideale da utilizzare in combinazione a cellule staminali e fattori di crescita sia autologhi che di sintesi e vi sono numerosi lavori in letteratura su questa metodica ⁴.

FATTORI DI CRESCITA

L'utilizzo di fattori di crescita autologhi (AGF) in asso-



Fig. 1a. Esteso difetto dovuto a tumore a cellule giganti del femore distale.



Fig. 1b. Completamento del curettage con fresa ad alta velocità.



Fig. 1c. Inserimento del composto di innesto omologhi, fattori di crescita e midollo osseo concentrato.



Fig. 1d. Particolare del controllo radiografico a 4 mesi con scomparsa della demarcazione tra innesti ossei e spongiosa ospite.

BMP hanno dimostrato, in associazione ad un substrato collagenico o osso omologo di ottenere risultati simili o a volte superiori allo stesso innesto autologo in difetti post-traumatici⁶. In letteratura sono stati presentati anche case report di ingegneria tissutale ottenuta con l'associazione di *scaffolds* a cellule staminali con e senza BMP^{7,8}.

ESPERIENZE CLINICHE

Il più interessante studio clinico sull'associazione tra innesto osso omologo, cellule staminali da midollo osseo concentrato e fattori di crescita autologhi è stato pubblicato da Dallari⁹ e collaboratori su 33 pazienti sottoposti ad osteotomia tibiale alta valgizzante di addizione. Lo studio dimostrava una differenza significativa nei tempi di guarigione, nella qualità e quantità di osso neoformato alla linea di osteotomia tra osso liofilizzato utilizzato da solo rispetto all'osso liofilizzato addizionato di fattori di crescita o fattori di crescita e midollo autologo. Il campione limitato e la mancanza di un difetto osseo critico non ha potuto probabilmente dare risultati più significativi di quelli presentati. Una caratteristica comune di tutti gli studi clinici che si sono cimentati nel risolvere difetti ossei maggiori o nell'ingegneria tissutale è stata quella di cercare una sinergia tra le potenzialità espresse a livello cellulare con quelle meccaniche di un substrato con scopo strutturale, sia con le capacità biologiche derivanti dai fattori di crescita o autologhi o sotto forma di proteine morfogenetiche ricombinanti.

Un altro interessante studio osservazionale che riporta i risultati a distanza di quella che è stata probabilmente la prima esperienza clinica riportata in letteratura sull'utilizzo combinato di uno *scaffold* con cellule staminali espanse in vitro è stato pubblicato da Marcacci e collaboratori¹⁰. Nel loro lavoro i risultati a distanza di pazienti trattati tra 6 e 7 anni prima hanno dimostrato come i risultati ottenibili con tale tecnica possano essere considerati duraturi e definitivi. Particolare importanza è stata attribuita all'utilizzo di uno *scaffold* come l'idrossiapatite, che permette una colonizzazione ottimale delle cellule staminali per la sua affinità e la sua macrostruttura ed in tal senso era stata testata su modelli animali dallo stesso gruppo di ricercatori.

Anche la nostra personale esperienza^{11,12} è indirizzata a cercare di ricreare le condizioni di associazione tra *scaffold*, osteoinduzione e osteogenesi. In particolare l'utilizzo di midollo concentrato e fattori di crescita piastrinici

associati ad un substrato di osso omologo ha dato nel trattamento dei difetti post-traumatici e dei difetti estesi dopo resezione per patologie pseudotumorali risultati positivi per il 90% dei casi, confermando che l'associazione tra uno *scaffold* come l'osso omologo, midollo concentrato e fattori di crescita può ottenere risultati simili all'osso autologo senza i rischi e le complicazioni legate all'auto-prelievo e risolvendo il problema della disponibilità.

Un altro interessante approccio all'ingegneria tissutale nel campo strettamente ortopedico di ricostruire difetti segmentari delle ossa lunghe è l'approccio della scuola di Masquelet e collaboratori¹³. L'idea originale è stata porre in primo piano l'ambiente dove inserire gli innesti ossei e dove la vascolarizzazione è assicurata dalla neomembrana che si forma intorno allo spaziatore. Nell'evoluzione della tecnica originale gli innesti sono diventati omologhi e vengono addizionate cellule staminali prelevate dal midollo osseo, creando quindi un costrutto simile a quello descritto anche nella nostra esperienza.

CONCLUSIONI

Al momento attuale le evidenze cliniche per un uso routinario di *scaffold* associati a cellule staminali e fattori di crescita sono ancora numericamente scarse, anche se decisamente convincenti. L'evidenza scientifica è comunque maggiore per utilizzare fattori di crescita ricombinanti (BMP) rispetto a fattori di crescita autologhi. L'utilizzo di cellule midollari in associazione a *scaffold* ha dato risultati incoraggianti sia nei difetti post-traumatici sia nei difetti conseguenti a lesioni cavitari post-oncologiche. La nostra esperienza personale è sicuramente positiva ed è tuttora la nostra tecnica di scelta nell'affrontare difetti ossei critici.

La nostra raccomandazione è comunque che al momento attuale le metodiche che comportino l'utilizzo di cellule staminali e fattori di crescita in associazione a *scaffold* vadano utilizzate routinariamente in centri che abbiano già esperienza specifica e trattino regolarmente difetti maggiori. Questo soprattutto per ottenere un utilizzo limitato ad indicazioni sicure, con metodiche validate e con un *feedback* sui risultati ottenuti. Tale approccio metodologico è necessario anche per evitare un utilizzo dettato da facili entusiasmi che possono poi dare risultati scoraggianti, come già successo in passato, per indicazioni errate, metodologia poco accurata, aspettative miracolistiche. Al contrario l'utilizzo della BMP isolata nelle indicazioni

accertate (pseudoartrosi) ha una valida base scientifica ed è raccomandabile ove ne sia la necessità, sia da sola che in associazione a *scaffold* autologhi o omologhi.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Marx RE. *Platelet-rich plasma: evidence to support its use*. J Oral Maxillofac Surg 2004;62:489-96.
- ² Weiner BK, Walker M. *Efficacy of autologous growth factors in lumbar intertransverse fusions*. Spine 2003;28:1968-71.
- ³ Docquier PL, Delloye C. *Treatment of aneurysmal bone cysts by introduction of demineralized bone and autogenous bone marrow*. J Bone Joint Surg 2005;87A:2253-8.
- ⁴ Schmidmaier G, Schwabe P, Strobel C, et al. *Carrier systems and application of growth factors in orthopaedics*. Injury 2008;39(Suppl.2):S37-43.
- ⁵ Jenis LG, Banco RJ, Kwon B. *A prospective study of autologous growth factors (AGF) in lumbar interbody fusion*. Spine J 2006;6:14-20.
- ⁶ De Biase P, Capanna R. *Clinical applications of BMPs*. Injury 2005;36(Suppl.3):S43-6.
- ⁷ Warnke PH, Springer IN, Wiltfang J, et al. *Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man*. Lancet 2004;364:766-70.
- ⁸ Marcacci M, Kon E, Moukhachev V, et al. *Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study*. Tissue Eng 2007;13:947-55.
- ⁹ Dallari D, Fini M, Stagni C, et al. *In vivo study on the healing of bone defects treated with bone marrow stromal cells, platelet-rich plasma, and freeze-dried bone allografts, alone and in combination*. J Orthop Res 2006;24:877-88.
- ¹⁰ Capanna R, De Biase P, Saccardi R, et al. *Combinazione tra scaffold, cellule staminali e fattori di crescita nella ingegneria tissutale: dalla sperimentazione alla pratica clinica*. GIOT 2006;32(Suppl.1):S22-7.
- ¹¹ Drosse I, Volkmer E, Capanna R, et al. *Tissue engineering for bone defect healing: an update on a multi-component approach*. Injury 2008;39(Suppl.2):S9-20.
- ¹² Masquelet AC, Begue T. *The concept of induced membrane for reconstruction of long bone defects*. Orthop Clin North Am 2010;41:27-37.

Pseudoartrosi e perdite di sostanza

Long bone nonunions and bone defects

G.M. Calori
L. Tagliabue
M. Colombo
E. Mazza
W. Albigetti

RIASSUNTO

Le pseudoartrosi delle ossa lunghe e i difetti ossei critici sono tra le complicanze più difficili da trattare. Nel corso degli anni molte classificazioni, tutte basate su una valutazione radiologica, sono state proposte nel tentativo di ottenere un corretto inquadramento di questa patologia. Recentemente è stata proposta una nuova classificazione: il *Non Union Scoring System* (Nuss) che pone l'attenzione non solo sulla qualità dell'osso e sui problemi di osteosintesi, ma sulle condizioni del paziente in toto (malattie, stile di vita e utilizzo di farmaci) e quelle dei tessuti molli.

Abbiamo esaminato tutti gli agenti coadiuvanti che possono essere utilizzati in supporto alla sintesi ossea: i fattori di crescita ossea di sintesi, gli *scaffold*, il PRP autologo, il trapianto autologo di cellule mesenchimali totipotenti e la matrice ossea demineralizzata. L'uso di promotori della riparazione ossea sembra dare i migliori risultati di guarigione, ma, nel tentativo di evitare gli sprechi economici, abbiamo proposto un algoritmo di trattamento basato sulla tipologia di pseudoartrosi o perdita di sostanza in rapporto alla sede anatomica colpita.

Parole chiave: pseudoartrosi, perdite di sostanza, fattori di crescita, cellule mesenchimali, scaffolds

SUMMARY

The long bone nonunions and critical bone defects are two of the more difficult complications to treat. Over the years many classifications, all based on a radiological assessment, have been proposed in attempt to obtain a correct classification of this disease. It was recently proposed a new classification: the Non-Union Scoring System (Nuss), which focuses not only on bone quality and osteosynthesis problems, but on the conditions of the patient as a whole (diseases, lifestyle and use of drugs) and those of soft tissue. We examined all adjuvant agents which may be used in support of bone synthesis: synthetic bone growth factors, scaffolds, autologous PRP, transplantation of autologous totipotent mesenchymal cells and demineralized bone matrix. The use of promoters of bone repair appears to give the best results in healing, but in an attempt to avoid economic waste, we have proposed a treatment algorithm based on the type of nonunion or bone defect in relation to the anatomical site affected.

Key words: nonunions, bone defects, growth factors, mesenchymal cells, scaffolds

Istituto "G. Pini", Università di
Milano

Indirizzo per la corrispondenza:
 Prof. G.M. Calori, Azienda
 Ospedaliera Istituto "Gaetano
 Pini", Piazza A. Ferrari 1,
 20122 Milano

INTRODUZIONE

Il trattamento delle pseudoartrosi (PSA) delle ossa lunghe continua ad essere una sfida per il traumatologo con frequenti risultati insoddisfacenti e lunga morbilità. È di primaria importanza individuare i fattori di rischio locali e generali che hanno determinato il fallimento della riparazione ossea¹; solamente la loro intima comprensione permetterà di apportare i giusti correttivi e riavviare i fisiologici meccanismi di guarigione.

Recentemente, è stato codificato il “*Diamond Concept*” che, ha puntualizzato le differenti pertinenze meccaniche e biologiche, queste ultime distinte per cellule, *scaffold* e fattori di crescita².

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 pseudoartrosi³.

Per potere codificare linee guida di trattamento è necessario innanzitutto procedere ad un corretto inquadramento nosologico del problema.

Nel corso degli anni sono stati via via proposti differenti tipi di classificazione delle pseudoartrosi.

Tra queste la più seguita sin’ora è quella proposta da Weber-Cech nel 1976 che distingue forme vitali, ipertrofiche ed oligotrofiche, cioè con possibilità di risposta biologica, da forme non vitali ovvero non reattive di tipo atrofico, frequentemente accompagnate da osteonecrosi ed anche da perdita di sostanza⁴.

Negli anni ’90 sono stati condotti numerosi studi finalizzati a definire la validità dei criteri biomeccanici: la scuola di Verona ha messo a punto una metodica estensimetrica (*strain-gauge bar*) che applicata ad un fissatore esterno monoassiale permetteva di misurarne il grado di stabilità sui differenti piani di riferimento⁵; nel 1991 Kenwright, utilizzando un radiogonometro, calcolava il valore di rigidità (*stiffness*) che caratterizza la guarigione della tibia (15 Nm/degree) e del femore (20 Nm/degree)⁶; nel 1998 Marsh stabiliva che il fallimento di guarigione di una frattura equivale al mancato raggiungimento del valore soglia di 7 Nm/degree a 20 settimane; ovvero definiva pseudoartrosi la cessata formazione di callo endostale o periostale prima del raggiungimento di tale valore⁷.

Appartiene dunque, alla fine degli anni novanta il concetto, già intuito da autori precedenti, che l’atrofia o

l’ipertrofia radiologica non sono espressione di maggior o minore vigore biologico.

Basandosi su questi innovativi criteri, Biasibetti nel 2000 proponeva, pertanto, una classificazione biomeccanica che, mutuando i principi sopra esposti, oltre a considerazioni biologiche sulla vitalità o meno del focolaio focalizzava il problema circa la possibilità di esercitare una compressione assiale o meno sul focolaio di pseudoartrosi; a parte erano, poi, inquadrare le forme settiche che, una volta risolte sotto il profilo dell’infezione, ricadevano nelle altre categorie di classificazione.

Nel 2008, era proposto il NUSS (*Non Union Scoring System*) che rappresenta un innovativo approccio al problema, poiché di fatto, interpreta le ragioni multifattoriali del fallimento, spiega perché in un 20% dei casi non viene raggiunta la guarigione a fronte di un corretto trattamento e soprattutto rende possibile la stesura di un algoritmo di scelta terapeutica⁸.

DISCUSSIONE

In ortopedia, di fatto, una delle patologie più complesse e discusse da trattare è rappresentata dalle pseudoartrosi-postraumatiche, le quali sovente richiedono più trattamenti correttivi e i casi che non guariscono dopo il terzo intervento diventano estremamente refrattari ai trattamenti successivi.

Molteplici studi sono stati condotti in merito al tema delle pseudoartrosi fin dagli anni ’20 quando Albee e Lexer definirono quale pseudoartrosi il momento in cui la consolidazione non può essere portata a termine se non con un nuovo stimolo biologico. Da allora diversi autori hanno apportato conoscenze fondamentali sui meccanismi osteogenetici riparativi, ponendo l’accento sui fattori di rischio di una non-union.

I processi che portano all’instaurarsi di una pseudoartrosi oggi sono stati codificati e possono essere dovuti a fattori legati alla condizione stessa del paziente al momento del trauma e/o durante la fase seguente di riparazione dell’osso. L’età, il sesso, le condizioni fisiche (diabete⁹, osteoporosi¹⁰, massa muscolare¹¹), le abitudini di vita (dieta¹², fumo^{13 14}, alcol¹⁵) e le terapie farmacologiche associate sono tutti fattori di rischio generale, che hanno un sicuro ruolo nel determinare difetti di consolidazione della frattura.

Sono tutti elementi, dunque, che possono condizionare difetti di consolidazione di una frattura –ritardi e PSA

–, come anche determinare differenti tipologie di pseudoartrosi: atrofiche, agendo direttamente a livello delle fasi precoci, inibendo la formazione del coagulo e la formazione dell'osso periostale; ipertrofiche agendo sulla fase del rimaneggiamento senza permettere una corretta unione dei monconi di frattura¹.

Nello specifico i fattori di rischio locali che possono favorire l'evoluzione di una frattura verso una pseudoartrosi sono legati al meccanismo traumatico di produzione del trauma, alle tipologie di fratture ed alle lesioni ad essa associate. Solo con una buona conoscenza del tipo di frattura (semplice-stabili, complesse-instabili¹⁶, comminute-altamente instabili^{17 18}, segmentarie-potenzialmente instabili), del meccanismo con la quale si è verificata (traumi a bassa energia, traumi ad alta energia¹⁹) e delle eventuali situazioni concomitanti determinate dal trauma stesso (danni vascolari²⁰, regione interessata^{21 22}, gap interframmentario²³) è possibile pianificare un trattamento adeguato che riduca, per quanto possibile, le probabilità che la frattura evolva verso un fallimento terapeutico con l'insorgenza di una pseudoartrosi. Le fratture diafisarie di tipo C (Classificazione AO di Muller del 1984) sono quelle che hanno una maggiore tendenza ad evolvere in pseudoartrosi (40% tipo C, 15% tipo B, 6% tipo A di fratture diafisarie di femore²⁴).

Considerata la rilevanza del problema sono state nel tempo proposte numerose strategie di trattamento e l'adozione contemporanea di più tecniche sembrerebbe dare i risultati migliori.

Nella nuova classificazione NUSS del 2008, in pratica, sono considerate tutte le variabili in gioco ed i fattori di rischio, attribuendo a ciascuno un punteggio basato sulla esperienza clinica e sulle evidenze scientifiche e definendo altresì una linea di trattamento a seconda del punteggio finale⁸.

Lo score finale, ricavato dalla somma dei singoli punteggi, di fatto, permette di comparare pazienti diversi con pseudoartrosi diverse, rendendoli oggettivamente confrontabili secondo un principio di complessità.

Forme atrofiche di pseudoartrosi possono infatti avere migliore prognosi e maggiori possibilità di cura da forme oligotrofiche reattive, in pazienti affetti da compromissione dello stato generale di salute, come per esempio per un diabete scompensato.

Le variabili considerate sono:

- l'osso (qualità, tipo di frattura primaria, numero di interventi precedenti e loro invasività, classificazione della pseudoartrosi secondo Weber e Cech, adeguatez-

za del primo intervento in ordine alla stabilità meccanica, allineamento, gap osseo)^{10 18 25};

- i tessuti molli (stato dei tessuti, vascolarizzazione ed eventuali interventi su parti molli/cutanee di copertura)^{19 20 26-31};
- il paziente (grado ASA [*American Society of Anesthesiologists*], diabete, esami di laboratorio, stato infettivo, farmaci assunti e fumo)^{9 13 14 32 33}.

Il valore numerico della pseudoartrosi, misurato in base 100, definisce, così, quattro gruppi di severità con loro indicazione chirurgica:

- 1° gruppo con punteggio 0/25, costituisce un problema di tipo prevalentemente meccanico; il trattamento indicato è necessariamente la stabilizzazione del focolaio, ottimizzando ovvero modificando il sistema di osteosintesi.
- 2° gruppo con punteggio 26/50, costituisce un problema di tipo sia biologico che meccanico; il trattamento richiede correzione della sintesi e stimolazione biologica del focolaio, ottenuta con l'ausilio di mezzi fisici (campi elettromagnetici pulsati [CEMP], onde d'urto extracorporee [ESWT])³⁴⁻³⁷.
- 3° gruppo con punteggio 51/75. È un problema complesso caratterizzato da estrema gravità sia delle condizioni biologiche che meccaniche. È quasi sempre richiesta la resezione del focolaio e quindi presente una perdita di sostanza ossea che deve essere ripristinata. È questo l'ambito che trova maggiore indicazione per le biotecnologie (applicazione di cellule, *scaffold* e fattori di crescita).
- 4° gruppo con punteggio 76/100. Sono pseudoartrosi di tale gravità da essere assimilate ad un problema pressoché irrisolvibile e che pertanto possono richiedere una amputazione attuale primaria.

È indubbio che le pseudoartrosi del gruppo 3 (51-75 punti) siano le più difficili da trattare e spesso corrispondono alle forme recalcitranti che giungono all'osservazione di esperti della materia dopo 2-4 operazioni pregresse di media.

In tale gruppo riteniamo opportuno l'applicazione delle biotecnologie onde evitare inutili utilizzo di risorse economiche³⁸.

È stato dimostrato ormai, già dalla metà degli anni '90, che alcuni fattori di crescita agiscono come potenti stimolatori della proliferazione osteoblastica *in vitro* e della guarigione ossea *in vivo*, tali da rivelarsi assai utili nel favorire i processi di guarigione se correttamente applicati nella sede di lesione³⁹.

Di fatti, grazie all'evoluzione dell'ingegneria tissutale è stato possibile produrre i singoli fattori di crescita con la tecnica del DNA-ricombinante, in particolare le proteine morfogenetiche dell'osso (BMP). Sebbene siano state individuate almeno 40 diverse rh-BMPs/OPs, una chiara dimostrazione clinica del potenziale osteoinduttivo è disponibile ad oggi solo per la rh-BMP-7 detta anche OP-1 (*Osteogenic Protein-1*) e la rh-BMP-2⁴⁰.

L'unica BMP approvata in Europa per il trattamento delle pseudoartrosi delle ossa lunghe è la rh-BMP-7 (3,5 mg eptotermina alfa) mescolata a un *carrier* bio-riassorbibile (1 g di collagene). È un farmaco contenuto in una fiala sterile che deve essere ricostituito con 2-3 ml di soluzione fisiologica; viene quindi applicata sulla lesione, dopo posizionamento del dispositivo di fissazione⁴¹.

L'applicazione prima pre-clinica e poi su umano è ormai consolidata ed ha portato, in vari studi, percentuali di successo tra l'85% e l'89% con abbattimento altresì di tutte le complicazioni arrecate dall'uso nel passato consolidato di osso autologo: difficoltà connesse al prelievo autoplastico (ala iliaca, perone o stecca tibiale) che determinano scarsa *compliance* per il paziente con presenza nel 20% dei casi dolore cronico residuo al sito donatore, penalizzazione dei tempi operatori chirurgici ed anestesiológicos, frequenti complicanze nella sede del prelievo (morbilità del sito donatore), tali da incidere in maniera negativa sia sullo stesso paziente che sulla spesa economica aziendale della struttura sanitaria. Per ultimo, ma non per importanza, l'aumento dei tempi operatori è segnato da un proporzionale aumento del rischio di infezione⁴²⁻⁴⁷.

Dunque studi originali e trial internazionali (di livello 1) hanno dimostrato l'efficacia delle BMP-7 nella guarigione delle pseudoartrosi e la loro capacità osteoinduttiva pari e a volte superiore all'innesto di osso autoplastico. Sempre in tema di rigenerazione tessutali in caso di pseudoartrosi importanti studi hanno validato l'inferiorità di efficacia del PRP (*Platelet Rich Plasma*) sia nei confronti delle BMP-7 sia in paragone all'autograft⁴⁸⁻⁵⁰.

La applicazione di cellule mesenchimali totipotenti autologhe adulte prelevate dal midollo osseo e concentrate

per centrifugazione in sala operatoria ha dimostrato costi inferiori alle espansioni cellulari di laboratorio e discreta efficacia di osteoinduzione cellulo-mediata (livello B di raccomandazione) se in concentrazioni superiori a 60.000 µL secondo i criteri EBM, essendo un concentrato di cellule con capacità osteogeniche e osteopromotrici.

L'uso clinico in pseudoartrosi si è dimostrato efficace nel determinare guarigione delle pseudoartrosi soprattutto se associate a BMP^{51 52}.

Le pseudoartrosi, infine le dobbiamo suddividere in relazione a: assenza, piccolo e critico *bone defect*. Quest'ultima categoria viene diversamente classificata a seconda del distretto anatomico interessato ovvero: > di 3 cm per l'avambraccio; > di 4 cm per la tibia; > di 6 cm per l'omero ed il femore⁵³⁻⁵⁵.

Le pseudoartrosi così inquadrare inoltre, 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 (Fig. 1) che prenda in considerazione tutti i punti sovraesposti ovvero:

1. Pseudoartrosi assenza *bone defect*:
 - diafisaria, inchiodamento endomidollare (IEB) con o meno applicazione di fattori di crescita ossea (BMP-7);
 - metaepifisaria IEB o fissazione interna a stabilità angolare (ASIF) con o meno applicazione di BMP-7;

Fig. 1. Algoritmo di trattamento delle pseudoartrosi.

	A No BD	B Small BD	C Critical BD
α Dia	IMN and/or BMP-7	IMN + BMP-7 + Scaffolds +/- Cells	1. EF (transport) + BMP-7 at docking point 2. ASIF + allograft (massive) + BMP-7 + cells 3. ASIF + Scaffolds (xeno + allo) + BMP-7 + Cells
β Meta	IMN >> ASIF +/- BMP-7	ASIF >> EF (no ligamentotaxis) BMP-7 + Scaffolds +/- Cells	ASIF + allograft (massive) + BMP-7 + Cells
γ Epi	ASIF +/- BMP-7	ASIF > EF (ligamentotaxis) + BMP-7 + Scaffolds +/- Cells	Arthrodesis

A: nessuna perdita ossea (BD); B: piccola perdita ossea; C: perdita ossea critica; α : diafisaria; β : metaepifisaria; γ : epifisaria; IMN: *Intramedullary Locking Nailing*; ASIF: *Internal Fixation With Angular Stability*; EF: *External Fixator*.

- epifisaria, ASIF con o meno applicazione di BMP-7
2. Pseudoartrosi con piccolo *bone defect*:
 - diafisaria, IEB in associazione a BMP-7, *scaffold* con o meno applicazione di cellule mesenchimali autologhe concentrate (MSC);
 - metaepifisaria, ASIF preferibile alla fissazione esterna (EF) non in ligamentotassi in associazione a BMP-7, *scaffold* con o meno applicazione di MSC;
 - epifisaria, ASIF preferibile EF in ligamentotassi in associazione a BMP-7, *scaffold* con o meno applicazione di MSC.
 3. Pseudoartrosi con *critical bone defect*:
 - diafisaria, trasporto con EF in associazione a BMP-7 al *docking point*, o ASIF in associazione ad allinnesto massivo imbibito con MSC adiuvato da BMP-7, ASIF in associazione a *scaffold* (xeno + allo) imbibito con MSC adiuvato da BMP-7;
 - metaepifisaria ASIF con allo innesto massivo imbibito con MSC adiuvato da BMP-7;
 - epifisaria, artrodesi ^{11 42 48-50 52 56-60}.

In caso di pseudoartrosi settiche diventa mandataria la rimozione dei mezzi di sintesi, un'ideale toilette chirurgica tissutale, l'asportazione completa del tessuto malacico pseudoartrosico infetto (*en-block*), la costituzione di una nuova camera biologica ottenibile attraverso diverse metodiche: trasporto con EF in associazione a BMP-7 al *docking point*, innesto di matrice ossea demineralizzata antibiotata in associazione a *scaffold* + 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-7 e osteosintesi con ASIF ⁶¹⁻⁶³.

CONCLUSIONI

Il presente lavoro non vuole fornire un rigido protocollo terapeutico delle pseudoartrosi ma desidera offrire delle linee guida in grado di indirizzarne il trattamento. Oggigiorno abbiamo a disposizione validi aiuti (biotecnologie) che possono essere utilizzati in sostituzione dell'innesto autologo. Sono strumenti efficaci, ma costosi che pertanto necessitano di una rigorosa indicazione terapeutica al fine di evitarne sprechi o mal usi.

Le nostre raccomandazioni nascono da una lunga esperienza clinica e chirurgica e sono basate sull'EBM.

Andando ad analizzare ciò che nel corso degli anni è stato pubblicato in merito alle biotecnologie possiamo concludere, con un livello di evidenza 1, che le BMP sono superiori (4/6), uguali (1/6) ed inferiori (1/6) all'autograft nei 6 studi internazionali di maggiore rilevanza ^{42 43 48 49 50 64}.

Attualmente la ricerca si sta concentrando sulla scoperta di nuovi *carrier* in grado di aumentare la biodisponibilità e l'efficacia delle BMP, fino ad arrivare alla terapia genica ⁶⁵.

L'allograft sembra essere inferiore all'autograft ma non abbiamo studi di classe 1 in merito. Le ceramiche (idrossiapatite e calcio fosfato) sono risultate utili e sicure ma necessitano di un ambiente vitale per potersi integrare ⁶⁶.

Le matrici ossee demineralizzate (DBM) sono inferiori all'autograft presentando un alto tasso di fallimento ⁶⁷.

Le PRP infine possono aumentare le capacità integrative del trapianto autologo ma non riescono da sole ad aumentare il tasso di fusione e non vi sono studi di classe 1 su di esse ⁴⁸.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Calori GM, Albisetti W, Agus A, et al. *Risk factors contributing to fracture non-unions*. Injury 2007;38(Suppl.2):S11-8.
- 2 Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. *Fracture healing: the Diamond Concept*. Injury 2007;38(Suppl.4):S3-6.
- 3 Wolff J. *Das Gesetz der Transformation der Knochen*. Berlin: A. Hirschwald 1982. Transl. *The Law of Bone Remodelling*. Berlin: Springer 1986.
- 4 Weber BG, Cech O. *Pseudarthrosis*. New York, Grune and Stratton 1976.
- 5 Caiaffa V, Corina G, Solarino G, et al. *La dinamizzazione nel trattamento delle fratture di gamba con fissatore esterno*. GIOT 2000;26:S38-42.
- 6 Kenwright J, Richardson JB, Cunningham JL, et al. *Axial movement and tibial fractures-A controlled randomised trial of treatment*. J Bone Joint Surg 1991;73B:654-9.
- 7 Marsh D. *Concepts of fracture union, delayed union, nonunion*. Clin Orthop 1998;355(Suppl.):S22-30.
- 8 Calori GM, Phillips M, Jeetle S, et al. *Classification of non-union: need for a new scoring system?* Injury 2008;39(Suppl.2):S59-63.
- 9 Martin JA, Ellerbroek SM, Buckwalter JA. *Age-related decline in chondrocyte response insulin-like growth factor-I: the role of growth factor binding proteins*. J Orthop Res 1977;15:491-8.
- 10 Lill CA, Hesseln J, Schelegen U, et al. *Biomechanical evaluation of healing in a non-critical defect in a large animal model of osteoporosis*. J Orthop Res 2003;21:836-42.

- 11 Healy WL, White GM, Mick CA, et al. *Nonunion of humeral shaft*. Clin Orthop Relat Res 1987;219:206-13.
- 12 Einhorn TA, Bonnorens F, Burstein AH. *The contributions of dietary protein and mineral in the healing of experimental fracture*. J Bone Joint Surg 1986;68A:1389-95.
- 13 Adam CI, Kenting JF, Court-Brown CM. *Cigarette smoking and open tibial fractures*. Injury 2001;32:61-5.
- 14 Ziran B, Cheung S, Smith W, et al. *Comparative efficacy of 2 different demineralized bone matrix allografts in treating long-bone nonunions in heavy tobacco smokers*. Am J Orthop 1995;34:329-32.
- 15 Chakkalakal DA, Novak JR, Fritz ED, et al. *Inhibition of bone repair in a rat model for chronic and excessive alcohol consumption*. Alcohol 2005;36:201-14.
- 16 Ring D, Barrick WF, Jupiter J. *Recalcitrant non-union*. Clin Orthop 1997;340:181-9.
- 17 Nicoll A. *Fractures of the tibial shaft*. J Bone Joint Surg 1994;46B3:373-87.
- 18 Rodrigues-Marchand EC, Forriol F. *Nonunion: general principles and experimental data*. Clin Orthop 2004;419:4-12.
- 19 Triffin P, Greg J. *Depression of bone blood flow after blunt trauma*. Acta Orthop Scand 1994;65:195-8.
- 20 Dickson K, Katzman S, Delgado E, et al. *Delayed union and non-unions of open tibial fractures: correlation with arteriography results*. Clin Orthop 1994;302:189-93.
- 21 Uhtoff HK, Rahn BA. *Healing patterns of metaphyseal fractures*. Clin Orthop 1981;160:295-303.
- 22 Hayda RA, Brighton CT, Esterhai JL. *Pathophysiology of delayed healing*. Clin Orthop 1998;355(Suppl.):31-40.
- 23 Claes L, Augat P. *Influence of size and stability of the osteotomy gap on success of fracture healing*. J Orthop Res 1997;15:577-84.
- 24 Noumi T, Yokoyam K. *Intramedullary nailing for open fracture of the femoral shaft: evaluation of contributing factors on deep infection and non-union using multivariate analysis*. Injury 2005;35:1085-93.
- 25 Zinghi GF, Rollo G, Trono M. *La pseudoartrosi delle ossa lunghe*. Bologna: Timeo Editore 2004:20-23.
- 26 Crowley DJ, Kanakaris NK, Giannoudis PV. *Debridement and wound closure of open fractures: the impact of the time factor on infection rates*. Injury 2007;38:879-89.
- 27 Amanda D, Marshall W, Bosse MJ. *Timing of closure of open fractures*. J Am Acad Orthop Surg 2002;10:379-84.
- 28 Caudle RJ, Stern PJ. *Severe open fractures of the tibia*. J Bone Joint Surg 1987;69A:801-7.
- 29 Fischer MD, Gustilo RB, Varecka TF. *The timing of flap coverage, bone-grafting, and intramedullary nailing in patients who have a fracture of the tibial shaft with extensive soft-tissue injury*. J Bone Joint Surg 1991;73A:1316-22.
- 30 Keramaris NC, Calori GM, Nikolaou VS, et al. *Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF*. Injury 2008;39(Suppl.2):S45-57.
- 31 Naique SB, Pearse M, Nanchahal J. *Management of severe open tibial fractures, the need for combined orthopaedic and plastic surgical treatment in specialist centres*. J Bone Joint Surg 2006;88(B):351-7.
- 32 Macey LR, Kana SM, Jingushi S, et al. *Defect of early fracture-healing in experimental diabetes*. J Bone Joint Surg 1989;71A:722-33.
- 33 Concia E, De Lalla F, Di Pervi G, et al. *Orientamenti diagnostico-terapeutici nella gestione delle infezioni osteoarticolari*. Varese: Pharma Project Group 2003.
- 34 Ciombor DM, Aaron RK. *The role of electrical stimulation in bone repair*. Foot Ankle 2005;10:579-93.
- 35 Karamitros AE, Kalentzos VN, Soucacos PN. *Electric stimulation and hyperbaric oxygen therapy in the treatment of non-unions*. Injury 2006;37(Suppl.1):S63-73.
- 36 Jingushi S, Mizuno K, Matsushita T, et al. *Low-intensity pulsed ultrasound treatment for postoperative delayed union or non-union of long bone fractures*. J Orthop Sci 2007;12:35-41.
- 37 Bara T, Synder M. *Nine-years experience with the use of shock waves for treatment of bone union disturbances*. Ortop Traumatol Rehabil 2007;9:254-8.
- 38 Dahabreh Z, Calori GM, Kanakaris NK, et al. *A cost analysis of treatment of tibial fracture non-union by bone grafting or bone morphogenetic protein-7*. Int Orthop 2009;33:1407-14.
- 39 Slater M, Patava J, Kingham K, et al. *Involvement of platelets in stimulating osteogenic activity*. J Orthop Res 1995;3:655-9.
- 40 Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. *The role of growth factors in the repair of bone*. J Bone Joint Surg 2002;84A:1032-44.
- 41 EMEA. *European Public Assessment Report*. Procedure n. EMEA/H/C/293, 2000.
- 42 Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, et al. *Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions*. J Bone Joint Surg 2001;83A(Suppl.1-Part2):S151-8.
- 43 Kanakaris NK, Calori GM, Verdonk R, et al. *Application of BMP-7 to tibial non-unions: a 3-year multicenter experience*. Injury 2008;39(Suppl.2):S83-90.
- 44 Gupta AR, Shah NR, Patel TC, et al. *Perioperative and long-term complications of iliac crest bone graft harvesting for spinal surgery: a quantitative review of the literature*. Intern Med J 2001;8:163-6.
- 45 Goulet JA, Senunas LE, DeSilva GL, et al. *Autogenous iliac crest bone graft - complications and functional assessment*. Clin Orth Rel Res 1997;339:75-81.
- 46 Younger EM, Chapman MW. *Morbidity at bone graft donor sites*. J Orthop Trauma 1989;33:192-5.
- 47 St John TA, Vaccaro AR, Sah AP, et al. *Physical and monetary costs associated with autologous bone graft harvesting*. Am J Orthop 2003;32:18-23.
- 48 Calori GM, Tagliabue L, Gala L, et al. *Application of rhBMP-7 and platelet-rich plasma in the treatment of long bone non-unions: a prospective randomized clinical study on 120 patients*. Injury 2008;39:1391-402.
- 49 Zimmermann G, Wagner C, Schmeckenbecher K, et al. *Treatment of tibial shaft non-unions: bone morphogenetic proteins versus autologous bone graft*. Injury 2009;40(Suppl.3):S50-3.

- ⁵⁰ Kanakaris NK, Lasanianos N, Calori GM, et al. *Application of bone morphogenetic proteins to femoral non-unions: A 4-year multicentre experience*. *Injury* 2009;40(Suppl.3):S54-60.
- ⁵¹ Saito A, Suzuki Y, Ogata SI, et al. *Accelerated bone repair with the use of a synthetic BMP-2-derived peptide and bone-marrow stromal cells*. *J Biomed Mater Res* 2005;72A:77-82.
- ⁵² Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, et al. *Percutaneous autologous bone marrow grafting for non-unions. influence of the number and concentration of progenitor cells*. *J Bone Joint Surg* 2005;87A:1430-7.
- ⁵³ Hollinger JO, Kleinschmidt JC. *The critical size defect as an experimental mode to test bone repair methods*. *J Craniofac Surg* 1990;1:60-8.
- ⁵⁴ Mooney MP, Siegel MI. *Animal models for bone tissue engineering of critical-sized defects (CSDs), bone pathologies and orthopaedic disease states*. In: Hollinger JO, Einhorn TA, Doll BA, Sfeir C, editors. *Bone tissue engineering*. Boca Raton - London - New York - Washington: CRC Press 2005:217-44.
- ⁵⁵ Hollinger JO, Einhorn TA, Doll BA, Sfeir C, editors. *Bone tissue engineering*. Boca Raton - London - New York - Washington: CRC Press 2005.
- ⁵⁶ Schmidmaier G, Capanna R, Wildemann B, et al. *Bone morphogenetic proteins in critical-size bone defects: what are the options?* *Injury* 2009;40(Suppl.3):S39-43.
- ⁵⁷ Ring D, Kloen P, Kadzielski J, et al. *Locking compression plates for osteoporotic non-unions of diaphyseal humerus*. *Clin Orthop Relat Res* 2004;425:50-4.
- ⁵⁸ Catagni MA. *Treatment of tibial nonunions*. In: Bianchi Maiocchi A, editor. *Treatment of fractures, nonunions and bone loss of the tibia with the Ilizarov method*. Milano: Il Quadratino 1998:97-158.
- ⁵⁹ Cheng X, Lei D, Mao T, et al. *Repair of critical bone defects with injectable platelet rich plasma/bone marrow-derived stromal cells composite: experimental study in rabbits*. *Ulus Trauma Acil Cerrahi Derg* 2008;14:87-95.
- ⁶⁰ Kanakaris NK, Mallina R, Calori GM, et al. *Use of bone morphogenetic proteins in arthrodesis: clinical results*. *Injury* 2009;40(Suppl.3):S61-5.
- ⁶¹ Klauw K, Knothe U, Anton C, et al. *Bone regeneration in long-bone defects: tissue compartmentalisation? In vivo study on bone defects in sheep*. *Injury* 2009;40(Suppl.4):S95-102.
- ⁶² Huffman LK, Harris JG, Suk M. *Using the bi-masquelet technique and reamer-irrigator-aspirator for post-traumatic foot reconstruction*. *Foot Ankle Int* 2009;30:895-9.
- ⁶³ Giannoudis PV, Tzioupis C, Green J. *Surgical techniques: how I do it? The Reamer/Irrigator/Aspirator (RIA) System*. *Injury* 2009;40:1231-6.
- ⁶⁴ Giltaij LR, Shimmin AS, Friedlander G. *Osteogenic protein-1 (OP-1) in the repair of bone defects and fractures of long bones: clinical experience*. In: Vukicevic S, Sampath K, editors. *Bone morphogenetic proteins. From laboratory to clinical practice. Progress in Inflammation Research Series*. Basel: Birkhauser Verlag 2002:193-205.
- ⁶⁵ Calori GM, Donati D, Di Bella C, et al. *Bone morphogenetic proteins and tissue engineering: future directions*. *Injury* 2009;40(Suppl.3):S67-76.
- ⁶⁶ De Long WG, Einhorn TA, Koval K, et al. *Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis*. *J Bone Joint Surg* 2007;89A:649-58.
- ⁶⁷ Drosos GI, Kazakos KI, Kouzoumpasis P, et al. *Safety and efficacy of commercially available demineralised bone matrix preparations: a critical review of clinical studies*. *Injury* 2007;38(Suppl.4):S13-21.

Applicazioni cliniche sull'osso: allungamenti ossei

Clinical applications on the bone: bone lengthening

A. Biasibetti

RIASSUNTO

Viene valutato l'uso delle proteine osteogeniche nell'ambito degli allungamenti ossei sulla base di un'analisi bibliografica. Dalla bibliografia non emerge una indicazione formale all'uso di strumenti biologici, farmacologici o fisici per stimolare la formazione e la guarigione del rigenerato osseo. Per quanto riguarda il trattamento di difetti nel rigenerato o di ritardate consolidazioni del *docking point* le tecniche classiche, come il trapianto osseo, possono essere usate con successo. È però proponibile l'uso delle proteine osteogeniche in situazioni particolari come un alto rischio di infezione, presenza di cattive condizioni delle parti molli, necessità di trapianti massivi.

Parole chiave: osteogenesi distrazionale, allungamento osseo, proteine osteogeniche

SUMMARY

The use of bone morphogenetic proteins in bone lengthening field is evaluated based on bibliography. A formal indication to use biological, pharmacological or physical tools to enhance the formation and the healing of distractional regenerated bone does not arise from bibliography. Even if in treating regenerated bone defects and delayed unions of docking points classic techniques like bone graft are successfully used, bone morphogenetic proteins can be advised in concerning situations like high infection risk, soft tissue bad conditions, massive graft necessity.

Key words: distraction osteogenesis, bone lengthening, bone morphogenetic protein

DEFINIZIONE DEGLI AMBITI E DEL PROBLEMA

Viene valutata l'efficacia dell'uso delle proteine osteogeniche nell'ambito degli allungamenti ossei. Il riferimento alle proteine osteogeniche è motivato dal fatto che si tratta degli unici fattori morfogenetici clinicamente validati e disponibili in forma farmacologica.

Di tutta la famiglia delle BMP (*Bone Morphogenetic Proteins*), costituita da 13 proteine attualmente conosciute, solo la BMP2 e la BMP7 sono state riconosciute come sicuramente induttrici di tessuto osseo. Queste sono state chiamate "proteine osteogeniche" (OP).

Fissazione Esterna, CTO Torino

Indirizzo per la corrispondenza:
Antonio Biasibetti,
via Monteu da Po 16,
10132 Torino

Per allungamenti ossei si intende la formazione di osso ottenuto per distrazione graduale in condizioni di stabilità meccanica.

Sono molte le situazioni cliniche in cui il rigenerato osseo distrazionale si forma: a) allungamenti di arti per distrazione su compattotomia; b) perdite ossee trattate con la tecnica dell'ascensore; c) correzioni di deformità su compattotomia; d) allungamenti per distrazione o distacco della cartilagine di accrescimento; e) correzione di deformità per distacco o trazione sulla cartilagine di accrescimento; f) allungamenti per trazione su focolai di pseudoartrosi; g) correzione di perdite ossee con tecnica di compressione-distrazione monofocale su sedi di fratture o pseudoartrosi.

L'analisi verrà focalizzata per semplicità di discorso e per l'entità delle casistiche interessate ai punti a (allungamenti su compattotomia) e b (perdite ossee trattate con la tecnica dell'ascensore).

La possibile indicazione all'uso delle proteine osteogeniche in questi due settori può derivare dalle seguenti esigenze:

- accelerazione della formazione e della maturazione del rigenerato osseo;
- trattamento dei difetti del rigenerato;
- trattamento di zone al di fuori della rigenerazione ossea nell'ambito della tecnica dell'ascensore (problematiche del *docking point*).

ACCELERAZIONE DELLA FORMAZIONE E DELLA MATURAZIONE DEL RIGENERATO OSSEO

Esistono molti dati di letteratura che fanno riferimento alle proteine osteogeniche nella formazione e nella maturazione del rigenerato osseo.

C. Eingartner¹ dimostra nel 1999 la presenza di fattori di crescita nella formazione ossea e in zone di rimaneggiamento durante la callotasi. La loro correlazione con l'attività proliferativa e la densità radiografica sostiene il loro coinvolgimento nell'osteogenesi. A questa valutazione derivata dallo studio biotico di tre casi umani non è però seguita alcuna serie clinica o sperimentale su una popolazione umana.

R.C. Hamdy² nel 2003 inietta della rhOP1 nella sede di distrazione in conigli con tre differenti dosaggi (0,80, 800, 2000 µg) al termine del periodo di distrazione previsto.

Al sacrificio dopo tre settimane valuta parametri istologici, densitometrici e biomeccanici. Rileva che per ogni

parametro non c'è differenza significativa tra nessun gruppo. Per spiegare questo "insuccesso" analizza con metodi immunostochimici la presenza di recettori per la rhBMP e ritrova una rilevante espressione di recettori specifici IA, IB e II nelle fasi iniziali della distrazione ma non nelle fasi tardive del processo. L'assenza di recettori nella fase tardiva fa ipotizzare che questo sia il motivo dell'insuccesso dell'applicazione della rhPO1 e pertanto essa andrebbe applicata all'inizio della distrazione.

Y. Mizumoto³ nel 2003 confronta due gruppi randomizzati di ratti in cui esegue una osteotomia e somministra rhBMP7 all'atto della osteotomia in un gruppo e soluzione acquosa nell'altro. Rileva una densità di mineralizzazione dell'osso nel gruppo BMP7 significativamente e consistentemente più elevata al termine della distrazione, alle 2 e 4 settimane dopo il termine della distrazione. Valori analoghi vengono rilevati nella valutazione della rigidità meccanica dei rigenerati ottenuti. Conclude che tale studio dimostra i benefici dell'applicazione della BMP7 sull'accelerazione di formazione del rigenerato osseo e indica la potenziale utilità clinica per ridurre il periodo di trattamento con fissatore esterno durante la osteogenesi distrazionale.

H. Thereyden⁴ nel 2003 in sette ratti adulti esegue una osteotomia bilaterale del ramo orizzontale di mandibola e da un lato applica 50 µg di rh-OP1 sette giorni dopo la distrazione ed il giorno successivo. Dall'altro lato usato come controllo viene iniettata una soluzione placebo. Gli animali vengono sacrificati alla quarta settimana dopo la distrazione. Dal lato della mandibola trattata con OP1 è presente una resistenza significativamente maggiore dell'osso ed un ponte osseo continuo non rilevabile dal lato di controllo. Conclude che l'OP1 può essere un'opzione per accelerare la maturazione del callo nella osteogenesi distrazionale di mandibola.

K. Zakhary⁵ nel 2005 esegue uno studio prospettico randomizzato su 24 conigli sottoposti ad osteogenesi distrazionale di mandibola. In un gruppo inietta al termine del periodo di distrazione rhBMP7 in singola dose di 200 µg associata a tampone lattato, in un gruppo inietta solo tampone lattato e nel terzo gruppo non pratica alcuna iniezione. Analizza con radiografia e densitometria ossea i risultati ottenuti. Rileva la comparsa del rigenerato in tutti e tre i gruppi ma una maggior densità ossea nel gruppo rhBMP7 ancorché non statisticamente significativa. Conclude che lo studio serve come punto di partenza per analizzare in futuro più dettagliatamente gli effetti delle rhBMP nella osteogenesi distrazionale.

Y. Ozec⁶ nel 2006 studia l'effetto della rhBMP2 sull'osteogenesi distrazionale di mandibola. Utilizza un gruppo di sei pecore con scheletro maturo e in tre di esse applica all'atto della osteotomia 3 µg di rhBMP2 con vettore di collagene. Il rigenerato si forma in entrambi i gruppi ma nel gruppo rhBMP2 la formazione di osso appare maggiore all'esame istologico e radiografico ma una TC quantitativa non dimostra una differenza significativa nella densità ossea. Conclude che la somministrazione di rhBMP2 durante la fase distrattiva aumenta la formazione di osso ma non ha effetto significativo sulla sua densità.

H. Yonesawa⁷ nel 2006 analizza l'effetto della rhBMP2 sulla consolidazione nell'osteogenesi distrazionale in mandibola di coniglio. Utilizza 21 conigli che divide in cinque gruppi. In due inietta la rhBMP2 al primo giorno di distrazione (cinque giorni dopo la chirurgia), in uno all'ultimo giorno di distrazione, in due gruppi non pratica iniezione. Rileva che radiopacità e densità minerale sono maggiori nei gruppi trattati con rhBMP2 e che istologicamente la formazione ossea è maggiore che nei gruppi di controllo. Conclude che la rhBMP2 promuove la formazione di osso senza precisare differenze fra applicazione precoce e tardiva.

M. Mandu-Hrit⁸ nel 2006 analizza l'effetto dell'applicazione precoce di rhOP1 nell'osteogenesi distrazionale nei conigli. Valuta il rigenerato ottenuto con radiografia, densitometria, microCT, istomorfometria e immunoistochimica.

Rileva un aumento di volume dell'osso nel gruppo trattato ma soprattutto cambiamenti nell'espressione di vari *ligands*, fattori di crescita e recettori, manifestazione di una sovraregolazione genica. Conclude che lo studio fornisce ulteriori approfondimenti sulle strategie per migliorare il grado di rigenerazione ossea, ma non dice quali (con l'obiettivo di ridurre i tempi di trattamento).

J. Hu⁹ nel 2007 adotta una tecnica di terapia genica ex vivo, iniettando cellule mesenchimali ingegnerizzate per esprimere BMP7 in un gruppo di una popolazione di 54 ratti. Questi vengono sottoposti ad osteotomia mandibolare e randomizzati in tre gruppi. Al termine della distrazione ad un gruppo viene somministrata un'iniezione di cellule mesenchimali autologhe ingegnerizzate con l'introduzione di un plasmidio atto ad esprimere BMP7, ad un altro gruppo vengono iniettate cellule mesenchimali autologhe ingegnerizzate con l'introduzione dello stesso plasmidio ma non attivo per espressione di BMP7 e al gruppo di controllo viene iniettata soluzione fisiologica. Il callo distrazionale si forma in tutti i gruppi e analoga-

mente in tutti e tre i gruppi si manifesta l'immunocollocazione della BMP7 ma l'espressione risulta maggiore nel gruppo delle cellule mesenchimali ingegnerizzate per l'espressione della BMP7 e parallelamente la qualità dell'osso ottenuto (radiologica, istologica, microCT e valutazione Ca/P) appare significativamente più elevata che negli altri gruppi.

Conclude che la terapia genica locale può costituire un approccio alternativo o supplementare per migliorare la tecnica dell'osteogenesi distrazionale specialmente in pazienti con potenziale osteogenico compromesso da patologie come osteoporosi, traumi severi o irradiazioni post-oncologiche.

F. Sailhan¹⁰ nel 2007 presenta però un risultato inaspettato, vale a dire l'assenza di effetto di rhBMP7 sull'osteogenesi distrazionale. Nell'intento di valutare se la rhBMP7 associata a un supporto di collagene di tipo I poteva migliorare la fase di consolidazione nell'osteogenesi distrazionale studia un gruppo di 28 conigli. In metà degli animali al momento dell'osteotomia vengono applicati 70 µg di rhBMP7 sotto forma di 28,5 mg di rhBMP7 e 7 mg di supporto di collagene. Tutte le successive valutazioni radiografiche e tomografiche rivelano una qualità ossea migliore nel gruppo di controllo rispetto a quello trattato nel quale si rileva anche la presenza di cisti all'interno del rigenerato. Il fallimento potrebbe essere attribuito alla grande quantità di vettore collagenico che potrebbe avere agito come ostacolo meccanico all'osteogenesi.

J. Lammens¹¹ nel 2009 studia l'effetto della BMP7 e della matrice ossea demineralizzata in un modello di distrazione tibiale nei ratti. Impianta 800 µg di OP1 oppure 1900 mg di matrice ossea demineralizzata e confronta la guarigione con un gruppo non trattato. Non rileva alcuna differenza di densità nei due gruppi a parte un incremento nell'area di formazione ossea trattata con matrice ossea demineralizzata confrontata con il gruppo OP1. Conclude che questi dati non mostrano effetto di queste sostanze in questo modello di allungamento osseo. Sono quindi necessari ulteriori studi per comprendere i processi di formazione ed i meccanismi di funzionamento di sostanze che potenzialmente sono il trigger della guarigione ossea.

D.C. Moore nel 2009¹² studia l'effetto di un altro fattore di crescita, il fattore di derivazione piastrinica BB. Viene eseguito un allungamento unilaterale di femore in 83 ratti che vengono poi separati in cinque gruppi. Durante il periodo di distrazione ogni animale riceve un'iniezione

settimanale di buffer sodio acetato oppure di collagene bovino dissolto in buffer di sodio acetato o una di tre concentrazioni di fattore di derivazione piastrinica BB (100, 300 o 1000 µg/ml) nella sede di distrazione. Il tasso di consolidazione è del 40,4% nei gruppi trattati contro il 4,5% nei gruppi di controllo. I risultati radiografici e istologici concordano con una neoformazione ossea quantificata da microTC. Conclude che la somministrazione di fattore di derivazione piastrinica BB esogeno nel sito di distrazione migliora la guarigione dell'osso sia nel senso dell'aumento del rigenerato che della sua guarigione.

I.H. Choi nel 2002¹³, in una revisione di lavori, identifica diversi fattori che hanno dimostrato di promuovere la guarigione dell'osso durante la osteogenesi distrazionale.

Questi sono molteplici: trapianto di cellule simil-osteoblastiche nel callo di distrazione, matrice ossea demineralizzata, solfato di calcio, bifosfonati, ormoni, vari tipi di fattori di crescita, ultrasuoni pulsanti a bassa intensità, elettrostimolazioni.

Conclude che la comprensione della biologia della osteogenesi distrazionale è stata incrementata grazie alla scoperta di molti segnali molecolari legati alla formazione del tessuto scheletrico. Tuttavia ulteriori ricerche devono essere approfondite per la comprensione degli esatti meccanismi molecolari attraverso i quali fattori di crescita e differenziazione regolano i processi di formazione e maturazione del rigenerato osseo.

Dalla valutazione della letteratura riportata che rappresenta una selezione ragionata di una letteratura mirata già imponente si possono trarre alcune considerazioni.

Tutti i lavori si riferiscono a studi preclinici su modelli animali. Non sono disponibili allo stato serie cliniche umane di applicazione di fattori di crescita o altre metodiche atte ad accelerare la formazione o la maturazione del rigenerato osseo distrazionale.

Dai lavori non risulta univocamente chiaro che la proteina osteogenica sia efficace e quali siano le modalità ed i tempi più opportuni di applicazione della proteina osteogenica.

Nonostante sia stata evidenziata la presenza di espressioni genetiche delle proteine osteogeniche nel rigenerato osseo anche in ambito umano e molte serie sperimentali diano risultati positivi, ci sono però anche riscontri dubbi o addirittura negativi^{10 11}.

Non è alle attuali condizioni dello stato dell'arte proponibile una univoca indicazione clinica all'uso di strumenti biologici, farmacologici o fisici atti a incrementare la osteogenesi distrazionale o ad accelerarne la maturazio-

ne. È giustificato analizzare serie cliniche umane previa valutazione dei comitati etici. Allo stato, per ridurre i tempi di guarigione nelle procedure di ricostruzione ossea attraverso l'osteogenesi distrazionale, sono disponibili solamente tecniche cliniche, in particolare compattotomie multiple o tecniche di stimolazione meccanica del rigenerato.

TRATTAMENTO DEI DIFETTI DEL RIGENERATO

Sull'uso delle proteine osteogeniche nel trattamento di difetti della rigenerazione ossea non è stato possibile reperire letteratura specifica. Normalmente il rigenerato osseo sia negli allungamenti puri che nei trasporti ossei non presenta problematiche che non possano essere affrontate con tecniche usuali vale a dire trapianti ossei autologhi o stimolazioni mediante distrazione-compresione alternati.

Peraltro la necessità di intervenire con un trapianto osseo autologo sul rigenerato è un evento poco frequente. M. Catagni¹⁴ riferisce tale necessità in 2 casi sui primi 600 allungamenti realizzati nell'Ospedale di Lecco. Un unico caso avrebbe presentato degenerazione cistica del rigenerato anch'esso trattato con trapianto osseo spongioso autologo previo svuotamento. R.J. Velasquez¹⁵, non necessita di alcun trapianto in 40 allungamenti. J. Aronson nel 1997¹⁶ rileva che nella tecnica originale di Ilizarov non è mai previsto l'uso di trapianti ossei ed ipotizza che il loro uso potrebbe essere necessario in caso di degenerazione cistica del rigenerato. M. Catagni nel 2005¹⁷ riferisce di 54 allungamenti eseguiti per motivi esclusivamente estetici, quindi a maggior sensibilità medico-legale. In due casi è stato necessario un trapianto osseo spongioso autologo per atrofia del rigenerato.

Possono però essere ipotizzate situazioni specifiche in cui il trapianto osseo possa essere convenientemente sostituito con l'uso delle proteine osteogeniche.

Se il rigenerato osseo patologico (necessitante di ulteriore trattamento) copre un gap osseo importante, altrettanto importante può essere l'entità del trapianto osseo con conseguente estensione della zona donatrice e quindi maggiore aumento del rischio di patologia iatrogena del sito donatore. Se l'allungamento viene eseguito con indicazioni elettive in soggetti giovani di sesso femminile, potrebbero presentarsi problematiche di tipo medico-legale. L'uso delle proteine osteogeniche, a parità di effetto, può minimizzare questo fattore.

Se il rigenerato osseo patologico si realizza nell'ambito di allungamenti in situazioni post-traumatiche o post-infettive con condizioni di parti molli a rischio l'uso delle proteine osteogeniche può ridurre l'impatto chirurgico in termini di via di accesso.

In assenza di letteratura specifica si riporta l'esperienza del CTO di Torino (dati non pubblicati). Dal 1998 al 2008 sono state eseguite 250 compattotomie per ottenere rigenerato in svariate patologie. In due casi si sono presentati problemi di difetto di rigenerato, un allungamento su ipometria di tibia in esiti di ricostruzione ossea per infezione Cierny 4 post-traumatica in paziente di 40 anni ed un allungamento per ipometria idiopatica in una tibia di paziente femmina di 16 anni. In entrambi i casi, in presenza di rigenerato gravemente atrofico, è stata applicata l'OP1 per le motivazioni citate: rischio infettivo e cattiva qualità cutanea nel primo caso, necessità di non perdere l'allungamento di 5 cm senza utilizzo di importanti quantità di trapianto osseo nel secondo caso. Entro tre mesi in entrambi i casi si è presentato esuberante rigenerato osseo come se fosse stata indotta una tumultuosa calcificazione di un supporto proteico con precedente scarsa induzione alla calcificazione.

TRATTAMENTO DI ZONE AL DI FUORI DELLA RIGENERAZIONE OSSEA NELL'AMBITO DELLA TECNICA DELL'ASCENSORE (PROBLEMATICHE DEL DOCKING POINT)

Non è stata reperita letteratura specifica relativamente all'uso delle proteine osteogeniche in sede di *docking point* nelle procedure di ricostruzione ossea mediante la tecnica dell'ascensore. Tuttavia c'è diffusa concordanza sul fatto che il *docking point* è il punto debole della tecnica del trasporto osseo^{16 18-22} sotto almeno due punti di vista: il *docking point* è la zona che presenta maggiori problemi di consolidazione, mentre la zona di rigenerazione generalmente non pone problemi; di conseguenza è il *docking point* che condiziona la lunghezza dei trattamenti nelle ricostruzioni ossee. Il secondo punto è che la zona di *docking point* presenta generalmente problemi di parti molli per la loro cattiva qualità e per la precedente presenza in tali sedi di patologie in genere infettive. Viene perciò rilevata l'opportunità di mettere a punto tecniche alternative all'uso del trapianto osseo autologo^{18 22}.

Anche sull'uso del trapianto comunque le opinioni non sono affatto univoche. Le casistiche variano da nessun caso^{23 24} a percentuali che non superano il 25% di

trapianti^{25 26} a percentuali costantemente superiori al 60%^{18 19 27 28}. Solamente N. Giotakis²² propone un algoritmo di trattamento per il *docking point* in cui il trapianto osseo trova la sua formale collocazione in caso di incongruenza di contatto delle superfici.

Basandosi sui dati della letteratura non è possibile formulare indicazioni standardizzate sul trattamento del *docking point*. In particolare non viene se non occasionalmente menzionata la finalità di ridurre il tempo di trattamento complessivo mediante atti pianificati. L'uso delle proteine osteogeniche può trovare un razionale per alcuni motivi.

C'è la possibilità di compiere un atto chirurgico su una zona a forte rischio di complicanze infettive e di parti molli.

Il trapianto autologo eventualmente utilizzato non è comunque richiesto in quantità rilevanti poiché non ci si trova di fronte a importanti gap ossei (come può essere il caso di rigenerati atrofici negli allungamenti), bisogna però tenere conto che una morbilità in sede di sito donatore è sempre possibile e controproducente in pazienti che hanno alle spalle storie di trattamenti lunghi e complessi.

Non essendo legati ad atti chirurgici per il prelievo dei trapianti è proponibile una terapia il cui fine non sia quello di trattare un risultato negativo (la non consolidazione del *docking point*) ma quello di abbreviare una procedura lunga.

Nella casistica del CTO di Torino (dati non pubblicati) su 98 *docking points* trattati tra il 1999 ed il 2008 in tre casi è stato utilizzato un trapianto autologo con un insuccesso (riaccensione di un focolaio infettivo) e dal 2002 in 15 casi la rhOP1 con consolidazione ottenuta in tutti i casi entro quattro mesi. In nessun caso però l'indicazione è stata posta come "accelerazione" del tempo di trattamento.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Eingartner C, Coerper S, Fritz J, et al. *Growth factors in distraction osteogenesis. Immuno-histological pattern of TGF-beta1 and IGF-I in human callus induced by distraction osteogenesis.* Int Orthop 1999;23:253-9.
- ² Hamdy RC, Amako M, Beckman L, et al. *Effect of osteogenic protein-1 on distraction osteogenesis in rabbits.* Bone 2003;33:248-55.
- ³ Mizumoto Y, Moseley T, Drews M, et al. *Acceleration of regenerate ossification during distraction osteogenesis with recombinant human bone morphogenetic protein7.* J Bone Joint Surg 2003;85A(Suppl.3):124-30.

- 4 Terheyden H, Wang H, Warnke PH, et al. *Acceleration of callus maturation using rhOP1 in mandibular distraction osteogenesis in a rat model.* Int J Oral Maxillofac Surg 2003;32:528-33.
- 5 Zakhary K, Motakis D, Hamdy RH, et al. *Effect of recombinant human morphogenetic protein7 on bone density during distraction osteogenesis of the rabbit mandible.* J Otolaryngol 2005;34:407-14.
- 6 Ozec Y, Ozturk M, Kylyc E, et al. *Effect of recombinant bone morphogenetic protein2 on mandibular distraction osteogenesis.* J Craniofac Surg 2006;17:80-3.
- 7 Yonezawa H, Harada K, Ikebe T, et al. *Effect of recombinant human bone morphogenetic protein 2(rhBMP2) on bone consolidation on distraction osteogenesis: a preliminary study in rabbit mandibles.* J Craniomaxillofac Surg 2006;34:270-6.
- 8 Mandu-Hrit M, Haque T, Lauzier D, et al. *Early injection of OP1 during distraction osteogenesis accelerates new bone formation in rabbits.* Growth Factors 2006;24:172-83.
- 9 Hu J, Qi MC, Zou SJ, et al. *Callus formation enhanced by BMP7 ex vivo gene therapy during distraction osteogenesis in rats.* J Orthop Res 2007;25:241-51.
- 10 Sahilan F, Chotel F, Chousta A, et al. *Unexpected absence of effect of rhBMP7 on distraction osteogenesis.* Clin Orthop Relat Res 2007;457:227-34.
- 11 Lammens J, Nijs J, Schepers E, et al. *The effect of bone morphogenetic protein7 (OP1) and demineralised bone matrix (DBM) in the rabbit tibial distraction model.* Acta Orthop Belg 2009;75:103-9.
- 12 Moore DC, Ehrlich GM, McAllister SC, et al. *Recombinant human platelet derived growth factor-BB augmentation of new bone formation in a rat model of distraction osteogenesis.* J Bone Joint Surg 2009;91A:1973-84.
- 13 Choi IH, Chung CY, Cho TJ, et al. *Angiogenesis and mineralization during distraction osteogenesis.* J Korean Med Sci 2002;17:435-47.
- 14 Catagni MA. *Il rigenerato osseo: aspetti clinici.* XVIII Congresso Nazionale SIBOT, 2009. Atti:13-16.
- 15 Velasquez RI, Bell DF, Armstrong PF, et al. *Complications of use of the Ilizarov technique in the correction of limb deformities in children.* J Bone Joint Surg 1993;75A:1148-56.
- 16 Aronson J. *Limb-lengthening, skeletal reconstruction and bone transport with the Ilizarov method.* J Bone Joint Surg 1997;79A:1243-58.
- 17 Catagni MA, Lovisetti L, Guerreschi F, et al. *Cosmetic bilateral leg lengthening. Experience of 54 cases.* J Bone Joint Surg 2005;87B:1402-5.
- 18 Marsh DR, Shah S, Elliott J, et al. *The Ilizarov method in non-union, malunion and infection of fractures.* J Bone Joint Surg 1997;79B:273-84.
- 19 Paley D, Maar DC. *Ilizarov bone transport treatment for tibial defects.* J Orthop Trauma 2000;14:76-85.
- 20 Mekhail AO, Abraham E, Gruber B, et al. *Bone transport in the management of postraumatic bone defects in the lower extremity.* J Trauma 2004;56:368-78.
- 21 Sen C, Kocaoglu M, Levent E, et al. *Bifocal compression-distraction in the acute treatment of grade III open tibia fractures with bone and soft tissue loss: a report of 24 cases.* J Orthop Trauma 2004;18:150-7.
- 22 Giotakis N, Narayan B, Nayagam S. *Distraction osteogenesis and nonunion of the docking point site: is there an ideal treatment option?* Injury 2007;38(Suppl.1):100-7.
- 23 Cattaneo R, Catagni MA, Johnson EE. *The treatment of infected nonunion and segmental defects of the tibia by the method of Ilizarov.* Clin Orthop 1992;280:143-52.
- 24 Kokaoglu M, Eralp L, Rashid HU, et al. *Reconstruction of segmental bone defects due to chronic osteomyelitis with use of an external fixator and an intramedullary nail.* J Bone Joint Surg 2006;88A:2137-45.
- 25 Dendrinou GK, Koutos S, Lyritsis E. *Use of the Ilizarov technique for treatment of non-union of the tibia associated with infection.* J Bone Joint Surg 1995;77A:835-46.
- 26 Saridis A, Panagiotopoulos E, Tyllianakis M, et al. *The use of Ilizarov method as a salvage procedure in infected non-union of the distal femur with bone loss.* J Bone Joint Surg 2006;88B:232-7.
- 27 Saleh M, Rees A. *Bifocal surgery for deformity and bone loss after limb fractures.* J Bone Joint Surg 1995;77A:429-34.
- 28 El-Rosasy MA. *Acute shortening and re-lengthening in the management of bone and soft tissue loss in complicated fractures of the tibia.* J Bone Joint Surg 2007;89B:80-8.

Il trattamento dei difetti ossei periprotetici nell'anca: il ruolo delle biotecnologie

Management of periprosthetic bone loss in revision total hip arthroplasty: the role of biotechnology

M. D'Imporzano
M. Caforio
L. Pierannunzii

RIASSUNTO

Fattori di crescita di sintesi, concentrato piastrinico, cellule staminali stromali offrono promettenti soluzioni nel trattamento dei difetti ossei periprotetici, in alternativa o meglio in aggiunta al tradizionale innesto osseo. La revisione sistematica della letteratura dimostra però una preoccupante carenza di studi clinici, impedendo così di tracciare linee guida che ne regolamentino l'impiego.

Parole chiave: fattori di crescita di sintesi, concentrato piastrinico, cellule staminali stromali, difetti ossei periprotetici

SUMMARY

Recombinant growth factors, platelet-rich plasma, stromal stem cells offer interesting solutions to periprosthetic bone loss management, next to standard bone grafting. Unfortunately the systematic review of the relevant literature shows a serious lack of evidence, that prevents from drawing guide lines useful for clinical practice.

Key words: recombinant growth factors, platelet-rich plasma, stromal stem cells, periprosthetic bone loss management

INTRODUZIONE

Lo scopo della chirurgia di revisione dell'artroprotesi d'anca è quello di ristabilire la funzione articolare e di garantire una fissazione ottimale delle nuove componenti.

La qualità del tessuto osseo residuo ed il tipo di difetto sono fattori determinanti nella scelta della strategia chirurgica da seguire.

Il Gruppo Italiano di Ripotesizzazione (GIR), oggi Associazione Italiana Ripotesizzazione, ha classificato i difetti ossei in quattro categorie di gravità progressiva (Pipino, 2000)¹, sia sul versante acetabolare, sia su quello femorale. La precisa conoscenza della localizzazione delle lesioni e della loro estensione è dunque presupposto fondamentale per la stadiazione prima, e per la ricostruzione poi.

Le osteolisi periprotetiche sono prevalentemente prodotte da una reazione flogistica irritativa da detriti di piccolo calibro (< 1 µm)²⁻⁴. Il polietilene è il materiale più irritante, mentre i detriti ceramici e metallici sembrano essere piuttosto inerti. In rari

III Divisione, Istituto Ortopedico
"Gaetano Pini", Milano

Indirizzo per la corrispondenza:
Prof. M. D'Imporzano, Azienda
Ospedaliera Istituto "Gaetano
Pini", Piazza A. Ferrari 1,
20122 Milano

casi i detriti metallici possono provocare osteolisi su base flogistica immunologia (Hallab, 2001)⁵: in questo caso, la reazione è sostanzialmente dose-indipendente e può manifestarsi precocemente dopo l'impianto.

La storia naturale delle osteolisi focali ha un *end point* comune nella confluenza delle lesioni, che porta alla mobilitazione dell'impianto quando gran parte dell'interfaccia osso-protesi è stata intaccata.

Sebbene siano disponibili sul mercato dispositivi da revisione massivi in grado di riempire il difetto osseo grazie ad un volume aumentato (*jumbo cup*) e ad una forma adattata al difetto presumibile (ad es. coppe ellittiche), il ripristino del *bone stock* resta un imperativo categorico nella riptotesizzazione del paziente relativamente giovane.

Accanto alle tradizionali tecniche di innesto osseo strutturato o morcellizzato, le moderne biotecnologie offrono opzioni diverse, da impiegare singolarmente o insieme agli innesti, al fine di riabilitare in modo possibilmente più veloce e completo il difetto osseo.

Dopo aver osservato che i granuli alfa piastrinici contengono elevate quantità di fattori di crescita (fattore di crescita trasformante beta [TGF- β], fattore di crescita dell'endotelio vascolare [VEGF], fattore di crescita dell'epidermide [EGF], proteine morfogenetiche ossee [BMP]) è iniziato l'utilizzo, dapprima in chirurgia maxillo facciale e successivamente in chirurgia ortopedica, di gel piastrinico, composto derivato da una centrifugazione del sangue del paziente stesso⁶⁻¹⁰.

Le biotecnologie hanno inoltre permesso di produrre fattori di crescita umani ricombinanti, dei quali le BMP-2 e BMP-7 hanno ottenuto già importanti validazioni in ambito traumatologico¹¹⁻¹³ e in ambito di chirurgia vertebrale^{14 15}.

Da alcuni anni, anche alla luce delle ricerche derivanti da altri settori, hanno assunto particolare interesse le cellule staminali stromali, ottenute mediante prelievo dal midollo osseo del paziente durante l'intervento e opportunamente concentrate. Essendo indifferenziate e presentando recettori per i fattori di crescita, se stimolate possono differenziarsi in cellule progenitrici del tessuto osseo^{16 17}.

Tutte queste soluzioni vanno confrontate con il *gold standard*, ad oggi rappresentato dall'innesto osseo autologo. *Donor site morbidity* e disponibilità limitata rappresentano ovvie limitazioni al suo impiego.

Le revisioni di protesi d'anca in presenza di gravi difetti ossei rappresentano una sfida particolarmente impegnativa per chirurgo e paziente. Laddove il difetto osseo sia rilevante (stadio GIR [Gruppo Italiano Riptotesizzazione]

III-IV), l'utilizzo di fattori di crescita e/o di cellule staminali mesenchimali, in unione con substrati osteoconduttivi (scaffold ceramici o innesti ossei omologhi), o substrati di per se osteoinduttivi ed osteoconduttivi (*Demineralized Bone Matrix* [DBM]), appare particolarmente promettente¹⁷.

Il risultato atteso è un incremento della velocità e della completezza dell'incorporazione, e dunque un più rapido recupero funzionale.

Questo studio mira a definire linee guida per un utilizzo *evidence-based* di questi presidi nel trattamento dei difetti ossei periprotetici dell'anca.

MATERIALI E METODI

A tale scopo sono stati interrogati i motori di ricerca dei data base universalmente validati in ambito biomedico: Pubmed/Medline, Google Scholar, Scopus, EMBASE.

Le parole chiave "Growth Factors", "Platelet Rich Plasma", "OP-1", "BMP", "BMP-2", "BMP-7", "Demineralized Bone Matrix", "Stem Cell", "Bone Marrow" sono state incrociate con "hip", "revision", "replacement"/"arthroplasty", "bone loss"/"osteolysis".

Gli articoli sono stati selezionati sulla base dell'abstract, considerando pertinenti quelli relativi al trattamento di difetti ossei periprotetici nell'anca umana. Tutta la bibliografia di ogni articolo pertinente è stata vagliata per includere eventuali ulteriori lavori.

I lavori accettati sono dunque stati suddivisi per livello di evidenza clinica.

RISULTATI

La ricerca ha condotto a 308 articoli (Tab. I), dei quali, considerando i criteri di inclusione, sono stati giudicati pertinenti soltanto due: *Retroacetabular osteolytic lesions behind well-fixed prosthetic cups: pilot study of bearings-retaining surgery*, pubblicato su "Journal of Orthopaedics and Traumatology" nel dicembre 2008¹⁸; *Mixing bone graft and OP-1 does not improve cup or stem fixation in revision surgery of the hip*, pubblicato su Acta Orthopaedica nel 2006¹⁹.

L'articolo da noi considerato utile per il nostro scopo è stato ottenuto incrociando le seguenti parole chiave: "Growth Factors", "Hip", "Arthroplasty", e "Growth Factors", "Platelet Rich Plasma", "Osteolysis".

Tab. I. Manca didascalica.

	GF	PRP	OP-1	BMP	BMP-2	BMP-7	DBM	Stem Cells	Bone Marrow
revision AND hip	4	0	4	5	3	3	4	7	24
(replacement OR arthroplasty) AND hip	25	7	4	12	9	2	5	39	190
(bone loss OR osteolysis) AND hip	10	2	0	3	2	1	2	3	24

GF: Growth Factors; PRP: Platelet Rich Plasma; OP-1: Osteogenic Protein-1; BMP: Bone morphogenetic protein.

L'articolo in questione discute una limitata *case series*, ed è pertanto da classificarsi nel livello di evidenza 4. Il secondo, invece, è uno studio caso-controllo e presenta dunque un livello di evidenza 3b.

DISCUSSIONE

Sebbene in letteratura esistano diversi studi che dimostrano l'efficacia delle biotecnologie in campo ortopedico, l'utilizzo di queste nuove metodiche nelle revisioni protesiche dell'anca umana non pare al momento supportato da adeguate pubblicazioni.

Analizzando i risultati in modo settoriale, il numero di articoli trovati risultavano così suddivisi: uso del "Growth Factors": 33; "Platelet Rich Plasma": 7; "BMP": 15; "Demineralized Bone Matrix": 6; "Stem Cell": 39; ed infine "Bone Marrow": 192. Essendo una ricerca suddivisa per parole chiave era plausibile trovare articoli che ne comprendessero più di una. Questa considerazione è testimoniata dal fatto che studi differenti abbiano tentato di conglobare metodiche diverse negli stessi esperimenti, anche se a volte le parole chiave non comparivano nel titolo della pubblicazione²⁰⁻²².

Incrociano le parole chiave "replacement/arthroplasty" e "hip" abbiamo trovato un notevole numero di articoli, la maggior parte di essi però riguarda i primi impianti protesici (come tentativo di migliorare l'osteointegrazione) o il trattamento non protesico della necrosi avascolare cefalica. La considerazione più importante riguarda comunque i criteri di inclusione: la nostra revisione della letteratura si è limitata alle ricerche cliniche sui difetti ossei periprotetici dell'anca umana. Sono stati pertanto scartati tutti i lavori realizzati su animali, osso cadaverico, osso sintetico²³⁻²⁵.

Il primo articolo emerso dalla nostra ricerca¹⁸ descrive i risultati clinici e radiografici ottenuti a 6, 12 e 24 mesi da un intervento di revisione di cotile, mediante utilizzo di osso allogenico associato a gel piastrinico. Sebbene sia l'unico lavoro trovato riguardante un beneficio applicativo di procedure bioingegneristiche sui difetti ossei

periprotetici umani, rimane un *pilot study* ed il basso il numero di pazienti arruolati (quattro pazienti) ci permette soltanto di ribadire l'importanza delle biotecnologie in ambito di revisione, senza però delineare linee guida.

Inoltre, il lavoro suddetto esamina un caso estremamente particolare di revisione protesica, quella a conservazione degli elementi, e dunque i suoi risultati, peraltro favorevoli, potrebbero non collimare con future esperienze di chirurgia sostitutiva. Il secondo articolo riporta i risultati fallimentari dell'impiego di BMP-7 (OP-1) nella revisione protesica con tecnica di *impaction grafting*, esitato in re-revisioni precoci di entrambe le componenti e in aumentati micromovimenti sul versante femorale. Quali possibili cause dell'insuccesso, gli Autori ipotizzano l'inibizione della formazione di tessuto fibroso e la stimolazione osteoclastica.

CONCLUSIONI

Nell'ultimo decennio le biotecnologie sono venute a sostegno della chirurgia ortopedica mettendo a disposizione una serie di metodiche promettenti per affrontare il difetto di tessuto osseo.

Ciò ha permesso di rinnovare il classico approccio a diversi problemi quali le artrodesi vertebrali, le pseudoartrosi e forse i primi impianti protesici, le necrosi avascolari, le fratture a basso potenziale riparativo.

Tuttavia non esistono studi clinici di alto livello per tracciare linee guida nell'impiego di questi strumenti in ambito di revisione protesica d'anca.

La presente analisi della letteratura dimostra una carenza di ricerca clinica che merita negli anni futuri di essere colmata con trial clinici mirati. Allo stato attuale l'impiego di fattori di crescita, cellule staminali e concentrati piastrinici nella riprotesizzazione d'anca può essere sostenuta solo per estrapolazione dei risultati derivanti da applicazioni in sedi e chirurgie diverse, per quanto debole sia questo supporto.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Pipino F, Molfetta L. *GIR classification of acetabular and femoral bone loss in revision hip arthroplasty surgery*. J Orthop Traumatol 2000;2:66-7.
- 2 Bal BS, Jiranek WA, Jasty M, et al. *Periprosthetic femoral osteolysis around an uncemented nonmodular Moore prosthesis*. J Arthroplasty 1997;12:346-934.
- 3 Hallab N, Merritt K, Jacobs JJ. *Metal sensitivity in patients with orthopaedic implants*. J Bone Joint Surg 2001;83A:428-36.
- 4 Rubash HE, Sinha RK, Shanbhag AS, et al. *Pathogenesis of bone loss after total hip arthroplasty*. Orthop Clin North Am 1998;29:173-86.
- 5 Hallab N. *Metal sensitivity in patients with orthopedic implants*. J Clin Rheumatol 2001;7:215-8.
- 6 Zhang Y, Zeng B, Zhang C, et al. *Effects of platelet-rich plasma on proliferation and osteogenic activity of marrow mesenchymal stem cells in vitro*. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi 2005;19:109-13.
- 7 Tao H, Zhang C, Zeng B, et al. *Experimental study on the treatment of femur head necrosis with tricalcium phosphate and platelet-rich plasma*. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi 2005;19:170-3.
- 8 Kasten P, Vogel J, Luginbühl R, et al. *Influence of platelet-rich plasma on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and ectopic bone formation in calcium phosphate ceramics*. Cells Tissues Organs 2006;183:68-79.
- 9 Li S, Zhang C, Yuan T. *Osteogenic potential of platelet-rich plasma combined with cells and artificial bone*. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi 2007;21:58-64.
- 10 Cheng W, Jin D, Zhao Y. *Effect of platelet-rich plasma on proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow stem cells in China goats*. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi 2007;21:386-9.
- 11 Desmyter S, Goubau Y, Benahmed N, et al. *The role of bone morphogenetic protein-7 (Osteogenic Protein-1) in the treatment of tibial fracture non-unions. An overview of the use in Belgium*. Acta Orthop Belg 2008;74:534-7.
- 12 Kanakaris NK, Calori GM, Verdonk R, et al. *Application of BMP-7 to tibial non-unions: a 3-year multicenter experience*. Injury 2008;39(Suppl.2):S83-90.
- 13 Calori GM, Tagliabue L, Gala L, et al. *Application of rhBMP-7 and platelet-rich plasma in the treatment of long bone non-unions: a prospective randomized clinical study on 120 patients*. Injury 2008;39:1391-402.
- 14 Miyazaki M, Sugiyama O, Tow B, et al. *The effects of lentiviral gene therapy with bone morphogenetic protein-2-producing bone marrow cells on spinal fusion in rats*. J Spinal Disord Tech 2008;21:372-9.
- 15 Alanay A, Chen C, Lee S, et al. *The adjunctive effect of a binding peptide on bone morphogenetic protein enhanced bone healing in a rodent model of spinal fusion*. Spine (Phila Pa 1976) 2008;33:1709-13.
- 16 Korda M, Hua J, Heidari N, et al. *The effect of mesenchymal stromal cells on the osseointegration of impaction grafts*. Tissue Eng Part A 2010;16:675-83.
- 17 Jäger M, Jelinek EM, Wess KM, et al. *Bone marrow concentrate: a novel strategy for bone defect treatment*. Curr Stem Cell Res Ther 2009;4:34-43.
- 18 Pierannunzii L, Fischer F, d'Imporzano M. *Retroacetabular osteolytic lesions behind well-fixed prosthetic cups: pilot study of bearings-retaining surgery*. J Orthop Traumatol 2008;9:225-31.
- 19 Karrholm J, Hourigan P, Timperley J, et al. *Mixing bone graft and OP-1 does not improve cup or stem fixation in revision surgery of the hip*. Acta Orthopaedica 2006;77:39-48.
- 20 Carpenter RS, Goodrich LR, Frisbie DD, et al. *Osteoblastic differentiation of human and equine adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells when BMP-2 or BMP-7 homodimer genetic modification is compared to BMP-2/7 heterodimer genetic modification in the presence and absence of dexamethasone*. J Orthop Res 2010 [Epub ahead of print].
- 21 Ilgenli T, Dundar N, Kal BI. *Demineralized freeze-dried bone allograft and platelet-rich plasma vs. platelet-rich plasma alone in infrabony defects: a clinical and radiographic evaluation*. Clin Oral Investig 2007;11:51-9.
- 22 Dallari D, Fini M, Stagni C, et al. *In vivo study on the healing of bone defects treated with bone marrow stromal cells, platelet-rich plasma, and freeze-dried bone allografts, alone and in combination*. J Orthop Res 2006;24:877-88.
- 23 Burastero G, Scarfi S, Ferraris C, et al. *The association of human mesenchymal stem cells with BMP-7 improves bone regeneration of critical-size segmental bone defects in athymic rats*. Bone 2010;47:117-26.
- 24 Hoshino M, Namikawa T, Kato M, et al. *Repair of bone defects in revision hip arthroplasty by implantation of a new bone-inducing material comprised of recombinant human BMP-2, Beta-TCP powder, and a biodegradable polymer: An experimental study in dogs*. J Orthop Res 2007;25:1042-51.
- 25 Narumichi M, Naoto S, Jun T, et al. *Repair of a proximal femoral bone defect in dogs using a porous surfaced prosthesis in combination with recombinant BMP-2 and a synthetic polymer carrier*. Biomaterials 2003;24:2153-9.

Rigenerazione tissutale: applicazioni cliniche nel trattamento della cartilagine articolare

Tissue regeneration: clinical application for the treatment of articular cartilage defects

P. Volpi¹
L. de Girolamo²

RIASSUNTO

A causa delle limitate capacità riparative e rigenerative, la degenerazione di lesioni cartilaginee può avere conseguenze molto importanti. Infatti lesioni focali non trattate possono progredire aumentando considerevolmente le proprie dimensioni ed arrivare ad uno step in cui potrebbe essere necessario ricorrere alla sostituzione articolare con protesi, qualora gli approcci più conservativi avessero fallito. Gli attuali approcci conservativi per le lesioni cartilaginee hanno il solo scopo di ridurre l'infiammazione e la sintomatologia algica, ma non sono in grado di ritardare o di evitare la progressione della patologia. Negli ultimi anni sono stati proposti numerosi trattamenti basati sull'impiego di elementi cellulari, con lo scopo di ottenere una buona rigenerazione dei difetti cartilaginei. Tra queste tecniche la più diffusa è il trapianto autologo di condrociti (ACT); la tecnica prevede l'isolamento dei condrociti da un frustolo cartilagineo del paziente stesso, la coltura delle cellule in vitro e la successiva semina su un'apposita matrice, che viene quindi apposta sul difetto condrale da trattare. Recentemente è stata introdotta una nuova tecnica chiamata *Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis technique* (AMIC®): la tecnica, eseguibile in un unico step chirurgico, combina le microfratture, e dunque i progenitori mesenchimali contenuti nel midollo osseo, all'utilizzo di una matrice collagenica per il trattamento di difetti focali della cartilagine. Ad oggi sono stati ancora condotti pochi studi per poter correttamente valutare la reale efficacia di questo tipo di approcci basati sull'uso di cellule. Tuttavia, il grande potenziale delle cellule, in particolare di quelle staminali mesenchimali, insieme all'impiego di *scaffold* appositamente studiati, sembra promettere importanti risultati nel trattamento di difetti condrali.

Parole chiave: cartilagine articolare, ingegneria tissutale, medicina rigenerativa, cellule staminali mesenchimali

¹ Centro di Traumatologia dello Sport e di Chirurgia Artroscopica, IRCCS Istituto Ortopedico "Galeazzi", Milano

² Laboratorio di Biotecnologie Applicate all'Ortopedia, IRCCS Istituto Ortopedico "Galeazzi", Milano

Indirizzo per la corrispondenza:

Piero Volpi
Centro di Traumatologia dello Sport e di Chirurgia Artroscopica, IRCCS Istituto Ortopedico "Galeazzi", Milano, via R. Galeazzi 4, 20161 Milano
Tel. 02 66214844
E-mail: volpi.piero@libero.it

SUMMARY

Due to its limited capacity for regeneration and self-repair, degeneration of articular cartilage may have severe consequences. Indeed focal cartilage lesions left untreated can progress to more extensive defects, and may ultimately require treatment with joint replacement surgery if conservative options fail. Current conservative treatments of articular injury and disease aim to relieve inflammation and pain but they are not able to delay or avoid the disease progression. In the last years several cell-based treatments have been proposed in order to obtain good regeneration of cartilage defects, including the Autologous Chondrocyte Transplantation (ACT); in this

technique chondrocytes are harvested from a small cartilage biopsy, expanded in in vitro culture and then seeded onto a suitable matrix (commonly composed of collagen or hyaluronic acid), which is ready to be implanted in the chondral defect. Recently a new technique called Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis technique (AMIC®) has been introduced; it combines, in a single surgical step, microfractures, and thus bone marrow progenitor cells, with the use of a specific biologic matrix for the treatment of chondral defect. Still few studies have been carried on to clearly evaluate the real effectiveness of these kinds of cell-based approach. However, the great potential of mesenchymal stem cells together with the use of suitable scaffolds seem to be promising approaches for the treatment of articular cartilage defects.

Key words: articular cartilage, tissue engineering, regenerative medicine, mesenchymal stem cells

L'INGEGNERIA TISSUTALE NELLA MEDICINA RIGENERATIVA

L'ingegneria tissutale (*Tissue Engineering* [TE]) è un emergente settore scientifico nato per fornire un'alternativa per la rigenerazione di tessuti od organi persi o lesionati. La TE si propone di riparare o rigenerare i tessuti utilizzando tessuti ingegnerizzati in grado di sostituire funzionalmente, durante la rigenerazione, la porzione lesa e di integrarsi, alla fine del processo, con il tessuto ospite, evitando il ricorso a "pezzi di ricambio"¹. Il principio fondamentale su cui si basa la TE è l'impiego integrato di fattori di crescita, di cellule e di adeguate strutture tridimensionali (*scaffold*); tale approccio ha registrato indubbiamente, nell'ultimo ventennio, importanti sviluppi, promettendo di migliorare l'*outcome* clinico dei pazienti, pur mantenendo costi contenuti².

Ad oggi in ambito ortopedico i maggiori investimenti sono stati effettuati nel campo della rigenerazione del tessuto osseo e cartilagineo, dove le tecniche di TE sembrano poter trovare particolarmente applicazione^{3,4}.

Gli approfonditi studi condotti hanno permesso di identificare un elevato numero di cellule, di fattori di crescita e di citochine dal ruolo chiave all'interno dei processi cellulari, biochimici e molecolari che avvengono durante lo sviluppo e la riparazione dei tessuti scheletrici. Da un punto di vista biologico, per permettere ai tessuti di rigenerarsi, è necessaria la presenza di cellule, di matrice

extracellulare, di comunicazioni intercellulari, di interazioni cellule-matrice e di fattori di crescita⁴. Molti tessuti, tra cui in particolare quelli scheletrici, sono dotati di una precisa configurazione tridimensionale e dunque, per permettere alle cellule di crescere e distribuirsi correttamente nello spazio, deve essere fornito loro uno *scaffold*, che mima la struttura originaria della matrice tissutale.

Riguardo alla fonte cellulare, l'utilizzo a scopo rigenerativo di cellule staminali appare una concreta e valida opzione alle cellule terminalmente differenziate, come ad esempio i condrociti, da anni impiegati in tecniche di rigenerazione di lesioni condrali.

Per motivi pratici e anche etici, le cellule che già attualmente trovano un concreto utilizzo in medicina, sono le cellule staminali che risiedono nei tessuti adulti⁵.

Nella medicina rigenerativa dell'apparato muscoloscheletrico vi è ampio interesse per le cellule di derivazione midollare, che Caplan⁶ nel 1991 definì cellule staminali mesenchimali (*Mesenchymal Stem Cells* [MSC]). Oltre che nel midollo osseo, esse risiedono, seppur in concentrazioni diverse, in numerosi tessuti e organi, tra cui il tessuto adiposo, la membrana sinoviale, il muscolo scheletrico, il cordone ombelicale e la placenta⁷⁻¹⁰. Questa popolazione cellulare, posta in opportune condizioni di crescita, è in grado di differenziare verso cellule della linea mesenchimale, dando origine a osso, cartilagine, tessuto adiposo, muscoli, cute, tendini, attraverso il cosiddetto processo mesengenico^{11,12}. Le MSC rappresentano dunque un ottimo candidato per applicazioni di medicina rigenerativa nell'ambito delle patologie muscoloscheletriche.

LA CARTILAGINE ARTICOLARE

Il trattamento delle lesioni cartilaginee rappresenta un problema di non facile soluzione e di rilevante e attuale interesse pratico e scientifico. La cartilagine articolare è, infatti, un tessuto altamente sofisticato, costituito solo per l'1-2% in volume da un'unica popolazione cellulare, i condrociti, che tuttavia sono in grado di mantenere l'omeostasi tissutale. La quasi totalità del tessuto cartilagineo è dunque costituito dalla matrice extracellulare, ricca in proteoglicani e glicosamminoglicani, che sono in grado di trattenere una grande quantità di acqua che conferisce elasticità alla struttura, e in altre macromolecole, quali il collagene, principalmente di tipo II, che consentono legami e ponti robusti per mantenere la forma e sopportare sollecitazioni. Essendo la cartilagine

un tessuto non vascularizzato e non innervato, il liquido sinoviale provvede al suo nutrimento e alla lubrificazione dei capi articolari. L'alta resistenza alle forze di carico e il basso attrito durante i movimenti articolari rappresentano le proprietà biomeccaniche peculiari, mentre le caratteristiche biochimiche della cartilagine e del liquido sinoviale regolano un delicato equilibrio ambientale di lubrificazione idrodinamica.

La cartilagine che riveste i capi articolari è spesso interessata da traumi sportivi, lavorativi e da incidenti stradali; nei soggetti giovani è preminente l'etiologia traumatica, mentre nei soggetti di età più avanzata prevalgono le cause infiammatorie e degenerative¹³. Come riportato da numerosi studi, le lesioni condrali si manifestano con un'incidenza all'incirca del 60%¹⁴⁻¹⁶. Tuttavia, la loro diagnosi clinica e strumentale non sempre è agevole a causa della difficoltà nell'evidenziare segni specifici che spesso non si manifestano nelle lesioni minori e che nei danni maggiori possono dipendere da lesioni legamentose e/o meniscali associate. Per questo l'indagine artroscopica si è dimostrata una metodica essenziale per la conoscenza e la stadiazione dei vari aspetti patologici della cartilagine, rappresentando la metodica più certa per la classificazione e l'indicazione al trattamento.

La classificazione delle lesioni condrali universalmente utilizzata è quella di Outerbridge, rivista ultimamente dall'*International Cartilage Repair Society*^{17 18}, che comprende quattro gradi (normale, quasi normale, molto anormale, severamente anormale) e diversi sottogruppi.

TRATTAMENTO DELLE LESIONI DELLA CARTILAGINE ARTICOLARE

In base al grado della lesione sono stati proposti diverse soluzioni terapeutiche. Le moderne metodiche di rigenerazione tissutale trovano un valido impiego nel trattamento di difetti della cartilagine di grado III e IV secondo Outerbridge, con dimensioni comprese tra i 2 e gli 8 cm², laddove la cartilagine circostante sia sana. Sono ammessi non più di due difetti cartilaginei, ma preferibilmente non lesioni combacianti. Il ginocchio deve essere stabile, non deve essere stata praticata meniscectomia totale e non devono essere presenti malallineamenti. Tuttavia tali tecniche possono essere combinate a ricostruzioni legamentose o procedure di riallineamento assiale. Dal momento che pazienti devono essere di età compresa

tra i 16 e i 45/50 anni, in quanto l'attività biologica cellulare sia dei condrociti che delle cellule mesenchimali decresce all'aumentare dell'età. I requisiti biologici e biomeccanici di corretta assialità e stabilità articolare sono infatti presupposti imprescindibili per ottenere un buon risultato finale. L'etiopatogenesi rappresenta un ulteriore importante fattore che condiziona la strategia chirurgica: occorre differenziare le lesioni traumatiche e le osteocondriti dalle lesioni degenerative, per le quali solitamente vengono utilizzate altri approcci terapeutici. È importante inoltre distinguere le lesioni puramente condrali da quelle osteocondrali, per le quali spesso è richiesto un trattamento combinato dell'osso subcondrale e dello strato cartilagineo.

Ovviamente i trattamenti chirurgici consolidati si avvalgono di più opzioni che possono essere distinte in due grandi gruppi in relazione al loro meccanismo d'azione¹⁹⁻²¹: tecniche di riparazione basate sulla stimolazione midollare, che includono l'artroplastica per abrasione²², la perforazione subcondrale²³ e le microfratture²¹, e tecniche di rigenerazione condrale, come gli innesti osteocondrali autologhi o eterologhi (OCT), l'innesto autologo di condrociti (ACI o MACI), oggi arrivato alla sua terza generazione e il più recente impiego di cellule staminali mesenchimali normalmente associate ad opportuni *scaffolds*.

Le tecniche di stimolazione midollare, in particolare le microfratture, sono le più utilizzate dai chirurghi ortopedici, in quanto semplici, eseguibili senza l'ausilio di strumentari particolari e caratterizzate da costi contenuti. I risultati ottenuti sono buoni, anche se il tessuto di riparazione risulta essere di tipo prevalentemente fibrocartilagineo²⁴.

La tecnica del trapianto autologo di condrociti per la riparazione di lesioni cartilaginee del ginocchio, pubblicata per la prima volta nel 1994 sul "New England Journal of Medicine" da L. Peterson e M. Brittberg, suscitò grande curiosità e interesse in ambito ortopedico²⁵. La tecnica originaria metodica prevedeva di ottenere dal prelievo di un piccolo frustolo cartilagineo del paziente stesso, condrociti articolari, i quali, dopo essere stati espansi *in vitro*, venivano reimpiantati chirurgicamente, mantenendoli in sede con un lembo periostale autologo. Questa tecnica, che combina la biologia alla chirurgia, si prefigge di rigenerare cartilagine ialina. Tuttavia, il fattore biologico determinato dalla vitalità, dalla densità e dal potenziale condrogenico delle cellule cartilaginee trasferite nel difetto da riparare, rappresenta un punto cruciale per il successo di questa metodica, dal momento che la coltura

in vitro dei condrociti in monostrato può portare alla perdita del fenotipo condrogenico (de-differenziazione in senso fibroblastico), con conseguente formazione di fibrocartilagine a livello del difetto.

L'evoluzione di questa promettente tecnica ha portato all'avvento di metodiche di "seconda generazione" che, utilizzando differenti biomateriali (*scaffolds*), quali gel e membrane di collagene o di acido ialuronico, consentono una cultura tridimensionale che è in grado di garantire *in vitro* un ridotto tasso di de-differenziazione in senso fibroblastico e *in vivo* una migliore distribuzione cellulare nel difetto da riparare mediante una cultura tridimensionale²⁶⁻²⁸. Si tratta, in ogni caso di metodiche che prevedono due tempi chirurgici, con difficile possibilità d'impianto in artroscopia e con costi elevati, i cui risultati acquisiti in questi anni ne incoraggiano l'utilizzo in casi opportunamente selezionati²⁹.

Una "terza generazione" di procedure di trapianto di condrociti autologhi prevede la caratterizzazione fenotipica delle cellule in laboratorio, garantendo così la selezione di popolazioni cellulari con una più elevata capacità di produrre *in vivo* una neo-cartilagine più duratura e stabile³⁰.

Le intrinseche limitazioni connesse all'utilizzo di cellule terminalmente differenziate, quali i condrociti, hanno portato i ricercatori ad ipotizzare l'utilizzo di cellule non ancora differenziate. In particolare, le cellule staminali adulte, di facile reperimento e non legate a controversie etiche, sembrerebbero essere dei buoni candidati per la medicina rigenerativa.

Le cellule staminali mesenchimali (MSC) sono dotate di un elevato potenziale rigenerativo: *in vitro* queste cellule sono in grado di proliferare e, se opportunamente stimolate, di differenziare in cellule condrocitarie. L'idea di arricchire una matrice con elementi cellulari indifferenziati in grado di promuovere la rigenerazione del difetto tissutale non è nuova, ma le strategie fino ad ora proposte prevedevano una fase di crescita delle cellule in coltura, con un aumento notevole della manipolazione delle cellule e dunque dei fattori di rischio e delle variabili biologiche legate all'isolamento e al differenziamento delle cellule *in vitro*. Inoltre, l'isolamento e il differenziamento *in vitro* richiede tempi e costi non indifferenti e, per quanto riguarda le MSC, non sono ancora state definitivamente stabilite e standardizzate le condizioni di coltura ottimali per indurre la condrogenesi *in vitro*, utilizzando reagenti che soddisfino le richieste della *Good Manufacturing Practice* (GMP).

Ad oggi è stato condotto un solo studio prospettico comparato riguardante l'impiego di cellule mesenchimali in associazione ad un opportuno *scaffold*, con tecnica a due *step*, per il trattamento di lesioni condrali. Clinicamente gli autori non hanno osservato differenze significative tra pazienti nei quali è stato utilizzato lo *scaffold* arricchito con le MSC e pazienti in cui è stato impiegato il solo *scaffold* per il trattamento del difetto. Tuttavia, i punteggi attribuiti artroscopicamente e dall'analisi istologica del neo-tessuto formatosi in corrispondenza dei difetti trattati con le MSC, sono risultati significativamente più elevati³¹. Lo stesso gruppo di Autori ha pubblicato altri tre *case reports*, in cui è dimostrato un miglioramento della sintomatologia clinica dopo il trattamento della lesione condrale con le MSC.

Alcuni ricercatori stanno sperimentando l'efficacia delle MSC con metodiche meno invasive, ad esempio senza l'utilizzo di *scaffolds*. Se tali metodiche dovessero fornire risultati soddisfacenti, le terapie basate sull'impiego di questa tipologia di cellule potrebbero essere estese a un numero maggiore di casi di lesioni condrali^{32,33}.

In questo complesso panorama appare difficile essere certi di quali saranno le tecniche più efficaci per il trattamento di difetti cartilaginei, soprattutto in un contesto in cui la chirurgia risentirà delle modifiche di tutti i fattori in campo (cellule, fattori di crescita, *scaffolds*, ecc.)³⁴.

Una valida tecnica è, a nostro giudizio, rappresentata dalla AMIC (*Autologous Matrix Induced Chondrogenesis*, condrogenesi autologa indotta da matrice); si tratta di una tecnica di stimolazione midollare "matrix-based", che sfrutta il potenziale di guarigione dell'organismo dato dalle cellule staminali mesenchimali in combinazione con l'utilizzo di membrana in collagene I/III dotata di particolari caratteristiche capaci di indirizzare le MSC verso il differenziamento condrocitario. È una metodica *one-step* e permette quindi di trattare la problematica cartilaginea in un unico intervento, evitando i processi di prelievo e coltivazione delle cellule, avvalendosi delle sole microfratture dell'osso subcondrale per richiamare le MSC nel sito del difetto.

La tecnica prevede una prima fase artroscopica in cui viene completamente rimossa tutta la cartilagine malata; successivamente viene praticato un accesso mini-invasivo attraverso il quale, dopo aver praticato alcune microfratture nell'osso subcondrale, viene posizionata sul difetto la membrana collagenica (Chondro-Gide®, Geistlich Pharma), fissandola con colla di fibrina. In questo modo il coagulo midollare richiamato dalle microfrat-

ture viene stabilizzato e mantenuto nella sede della lesione dalla membrana, cui si legano le cellule mesenchimali trovando così un ambiente idoneo per la rigenerazione di nuovo tessuto cartilagineo. La colla evita di dover ricorrere alla sutura della membrana stessa e ottimizza la migrazione delle MSC e il differenziamento in condrociti nel sito del difetto cartilagineo.

Il trattamento post-operatorio prevede attivazione muscolare fin dai primi giorni, il carico è concesso in modo parziale dopo tre settimane e completo dopo sei settimane, con alcune differenze in base alla localizzazione della lesione. Studi precedenti hanno messo in luce come la tecnica AMIC dia risultati sovrapponibili a quelli ottenibili con altre tecniche basate sull'utilizzo di cellule³⁵.

Un aspetto inerente alle tecniche di stimolazione midollare che non va però sottovalutato riguarda l'effettivo numero di MSC presenti nel coagulo midollare: sebbene le microfratture della regione subcondrale permettano l'arrivo di sangue midollare, le cellule mesenchimali effettivamente richiamate sono in numero esiguo e legato a un'alta variabilità interindividuale, con concentrazioni che vanno da 200 a 2000 MSC per ml di midollo osseo. Sulla base di questa osservazione, è in corso uno studio prospettico randomizzato controllato che prevede l'arricchimento della membrana con concentrato midollare (*concentrated Bone Marrow* [cBM]) prelevato dalla cresta iliaca, notoriamente ricca di elementi progenitori. La tecnica AMIC, associata all'utilizzo di cBM, contenente cellule mesenchimali in grado di differenziare verso la linea condrogenica, potrebbe favorire una più rapida rigenerazione del difetto cartilagineo, riducendo dunque anche i tempi di recupero.

CONCLUSIONI

Il trattamento delle lesioni cartilaginee ha conosciuto un notevole sviluppo negli ultimi anni, rappresentando un'autentica sfida per ricercatori e clinici. Le scarse capacità riparative intrinseche del tessuto cartilagineo richiedono lo sviluppo di valide e innovative soluzioni terapeutiche. Le tecniche chirurgiche tradizionali, microfratture e mosaico-plastiche in particolare non sembrano garantire una riparazione del tutto efficace e durevole. I trapianti autologhi condrocitari, pur garantendo buoni risultati nel tempo presentano molti limiti dovuti al doppio intervento chirurgico e al costo elevato della procedura. La terapia cellulare con MSC sembra essere un percorso affascinante e perseguibile per la semplice reperibilità di queste cellule presenti in molti tessuti, per la grande capacità proliferativa e la loro

potenzialità condrogenica. Gli studi sugli animali e i primi studi clinici sembrano confermare le possibilità terapeutiche nella riparazione della cartilagine articolare. Servono doverosamente ulteriori studi clinici prospettici e randomizzati che confermino i riscontri iniziali sulla potenzialità condrogenica e sulla stabilità genetica delle MSC.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Vacanti JP, Langer R. *Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation*. Lancet 1999;354(Suppl.1):32-4.
- ² Vacanti CA. *The history of tissue engineering*. J Cell Mol Med 2006;10:569-76.
- ³ Roberts SJ, Howard D, Buttery LD, et al. *Clinical applications of musculoskeletal tissue engineering*. Br Med Bull 2008;86:7-22.
- ⁴ Salgado AJ, Oliveira JT, Pedro AJ, et al. *Adult stem cells in bone and cartilage tissue engineering*. Curr Stem Cell Res Ther 2006;1:345-64.
- ⁵ Arthur A, Zannettino A, Gronthos S. *The therapeutic applications of multipotential mesenchymal/stromal stem cells in skeletal tissue repair*. J Cell Physiol 2009;218:237-45.
- ⁶ Caplan AI. *Mesenchymal stem cells*. J Orthop Res 1991;9:641-50.
- ⁷ Bosch P, Musgrave DS, Lee JY, et al. *Osteoprogenitor cells within skeletal muscle*. J Orthop Res 2000;18:933-44.
- ⁸ De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, et al. *Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane*. Arthritis Rheum 2001;44:1928-42.
- ⁹ Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, et al. *Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source*. Arthritis Rheum 2005;52:2521-9.
- ¹⁰ de Girolamo L, Sartori MF, Arrigoni E, et al. *Human adipose-derived stem cells as future tools in tissue regeneration: osteogenic differentiation and cell-scaffold interaction*. Int J Artif Organs 2006;31:467-79.
- ¹¹ Caplan AI. *The mesengenic process*. Clin Plast Surg 1994;21:429-43.
- ¹² Bajada S, Mazakova I, Richardson JB, et al. *Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine*. J Tissue Eng Regen Med 2008;2:169-83.
- ¹³ Volpi P, Denti M, Bait C. *Il trattamento delle lesioni condrali in ginocchia con instabilità anteriore*. In: *Le lesioni cartilaginee: inquadramento diagnostico e terapeutico*. Milano: Springer-Verlag Italia 2002:197.
- ¹⁴ Hjelle K, Solheim E, Strand T, et al. *Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies*. Arthroscopy 2002;18:730-4.
- ¹⁵ Volpi P, Denti M, Schoenhuber H, et al. *Frequency and strategy of treatment of chondral lesion in cases of anterior instability: a summary of 500 ACL reconstructions*. J Orthop Traumatol 2004;5:147-50.

- ¹⁶ Widuchowski W, Widuchowski J, Trzaska T. *Articular cartilage defects: study of 25,124 knee arthroscopies*. Knee 2007;14:177-82.
- ¹⁷ Outerbridge RE. *The etiology of chondromalacia patellae*. J Bone Joint Surg 1961;43B:752-7.
- ¹⁸ Bauer M, Jackson RW. *Chondral lesions of the femoral condyles: a system of arthroscopic classification*. Arthroscopy 1988;4:97-102.
- ¹⁹ Kramer J, Bohrnens F, Lindner U, et al. *In vivo matrix-guided human mesenchymal stem cells*. Cell Mol Life Sci 2006;63:616-26.
- ²⁰ Knutsen G, Engebretsen L, Ludvigsen TC, et al. *Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee*. J Bone Joint Surg 2004;86A:455-64.
- ²¹ Steadman JR. *Microfracture technique for full, thickness chondral defects: technique and clinical results*. Op Tech Orthop 1997;7:300.
- ²² Johnson LL. *Arthroscopic abrasion arthroplasty historical and pathologic perspective: present status*. Arthroscopy 1986;2:54-69.
- ²³ Pride KH. *A method of resurfacing osteoarthritis knee joints*. J Bone Joint Surg 1959;41B:618-9.
- ²⁴ Steadman JR, Briggs KK, Rodrigo JJ, et al. *Outcomes microfractures for traumatic chondral defect of the knee: average 11 year follow-up*. Arthroscopy 2003;19:477-84.
- ²⁵ Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, et al. *Treatment of deep cartilage defects of the knee with autologous chondrocyte implantation*. N Engl J Med 1994;331:889-95.
- ²⁶ Ochi M, Uchio Y, Kawasaki K, et al. *Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in the treatment of cartilage defects of the knee*. J Bone Joint Surg 2002;84B:571-8.
- ²⁷ Bartlett W, Skinner JA, Gooding CR, et al. *Autologous chondrocytes implantations versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects of the knee: a prospective, randomised study*. J Bone Joint Surg 2005;87B:640-5.
- ²⁸ Kon E, Filardo G, Delcogliano M, et al. *Second generation autologous chondrocyte implantation. Systematic review*. Sports Med Arthrosc 2008;16:221-9.
- ²⁹ Gigante A, Enea D, Greco F, et al. *Distal realignment and patellar autologous chondrocyte implantation. mid-term results in a selected population*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 2009;17:2-10.
- ³⁰ Saris DB, Vanlauwe J, Victor J, et al. *Characterized chondrocyte implantation results in better structural repair when treating symptomatic cartilage defects of the knee in a randomized clinical trial versus microfracture*. Am J Sports Med 2008;36:235-46.
- ³¹ Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, et al. *Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees*. Osteoarthritis Cartilage 2002;10:199-206.
- ³² Ando W, Tateishi K, Kart DA, et al. *Cartilage repair using an in vitro generated scaffold-free tissue-engineered construct derived from porcine synovial mesenchymal stem cells*. Biomaterials 2007;28:5462-70.
- ³³ Koga H, Shimaya M, Muneta T, et al. *Local adherent technique for transplanting mesenchymal stem cells as a potential treatment of cartilage defects*. Arthritis Res Ther 2008;10:R84.
- ³⁴ Martin I, Miot S, Barbero A, et al. *Osteochondral tissue engineering*. J Biomech 2007;40:750-65.
- ³⁵ Steinwachs MR, Guggi T, Kreuz PC. *Marrow stimulation techniques*. Injury 2008;39(Suppl.1):S26-31.

Razionale dell'utilizzo della "bioingegneria tissutale": applicazioni cliniche sui muscoli

Use of "tissue bioengineering": clinical applications on muscles

**F. Benazzo
L. Perticarini**

RIASSUNTO

Le lesioni muscolari rappresentano una delle più comuni lesioni che si verificano durante l'attività sportiva, con un'incidenza variabile tra il 10 ed il 55% di tutti i traumi. Il processo di guarigione di una lesione muscolare avviene attraverso le fasi di distruzione, riparazione e di rimodellamento. La velocità della progressione di queste fasi dipende dalla severità del trauma, dalla biologia del paziente stesso così come dal protocollo terapeutico e riabilitativo intrapreso. Dal punto di vista terapeutico, i trattamenti standard mirano a ridurre il sanguinamento e la tumefazione associati al trauma. Il trattamento ideale per i traumi muscolari dovrebbe accelerare il processo di guarigione e migliorare la qualità del tessuto riparato intervenendo sull'infiammazione, sulla riparazione del tessuto lesso e sulla fibrosi che ne residua. È in questi processi che si inseriscono la medicina rigenerativa e l'ingegneria tissutale mediante l'utilizzo terapeutico di fattori di crescita, inibitori della fibrosi, cellule staminali ed attraverso la terapia genica. Il PRP rappresenta una possibile ed efficace opzione terapeutica per stimolare ed accelerare la guarigione e la rigenerazione del tessuto muscolare. Vista la carenza di dati in letteratura, sono necessari studi multicentrici per valutare l'efficacia di queste terapie. Ci sentiamo di riservare l'utilizzo di PRP negli atleti in caso di lesioni muscolari con un protocollo standard di applicazioni.

Parole chiave: lesione muscolare, PRP, gel piastrinico, medicina rigenerativa, bioingegneria tissutale

Fondazione IRCCS Policlinico
"San Matteo", Clinica
Ortopedica e Traumatologica,
Università di Pavia

Indirizzo per la corrispondenza:
Prof. F. Benazzo, Fondazione
IRCCS Policlinico
"San Matteo", Clinica
Ortopedica e Traumatologica,
Università di Pavia.
E-mail: fbenazzo@unipv.it

SUMMARY

Muscle lesions are one of the most common injuries occurring during sports. Their incidence is among 10% and 55% of all injuries. Muscle healing is made of different phases: destruction, repair and remodeling. The rate between these phases depends on severity of the trauma, patients' characteristics, therapeutic pathway and rehabilitation protocol. Standard treatments aim to reduce bleeding and swelling associated with trauma. The ideal treatment for muscle injuries should improve the healing and the quality of the tissue repair by acting on inflammation, on the process repair of the injured tissue and on the residual fibrosis. Regenerative medicine and tissue engineering are able to improve muscle healing phases through the use of growth factors, inhibitors of fibrosis, stem cells and gene therapy. The PRP is an effective therapeutic choice to stimulate and to accelerate the healing and the regeneration of muscle tis-

sue. Because of poor literature, multicentric studies are needed to define the effectiveness of these treatments. We suggest the use of PRP in athletes' muscle injuries with a standardized protocol.

Key words: muscle injury, PRP, platelet-rich plasma, regenerative medicine, tissue bioengineering

Le lesioni muscolari rappresentano una delle più comuni lesioni che si verificano durante l'attività sportiva, con un'incidenza variabile tra il 10 ed il 55% di tutti i traumi¹.

Possono essere distinte in contusioni, distrazioni e rotture.

Le rotture muscolari sono le meno frequenti, rappresentando meno del 10% di tutte queste delle lesioni².

La contusione muscolare avviene quando un muscolo è sottoposto ad una forza compressiva, improvvisa e violenta, come un colpo diretto. Questo tipo di trauma tipicamente avviene negli sport di contatto.

La distrazione muscolare si ha invece nelle attività sportive in cui si sprinta o si salta, nelle quali si può creare una situazione in cui il muscolo è soggetto ad un carico sovramassimale che avviene o durante la fase di contrazione eccentrica, o durante la fase concentrica, nel momento in cui viene espressa la massima velocità. Ne deriva un eccessivo stiramento delle miofibrille ed una conseguente loro rottura generalmente in prossimità della giunzione mio-tendinea³. Ciò avviene tipicamente in muscoli a ponte tra 2 articolazioni, come il retto femorale, il semitendinoso ed il gastrocnemio.

Le lesioni muscolari si possono classificare in base all'entità del danno clinico ottenuto in:

- *lievi* (o di I grado);
- *moderate* (o di II grado);
- *severe* (o di III grado).

Le lesioni di I grado sono quelle nelle quali si ha la rottura di solo alcune fibre muscolari, con una piccola tumefazione e lieve dolore accompagnato da una minima o da nessuna perdita di forza e di limitazione del movimento. Nelle lesioni di II grado invece, il coinvolgimento delle miofibrille è maggiore ed il muscolo presenta una chiara riduzione della sua capacità contrattile.

Nelle lesioni di III grado la lesione si estende lungo l'intera sezione del muscolo. Ne risulta una completa perdita della funzione muscolare.

Il processo di guarigione di una lesione muscolare avviene attraverso una serie costante di tappe, indipendentemente dalla causa che ha determinato il danno. Possiamo distinguere in questo processo tre fasi:

- *fase di distruzione*, caratterizzata dalla rottura e dalla conseguente necrosi delle miofibrille, con formazione di un ematoma intralesionale e di una reazione delle cellule infiammatorie;
- *fase di riparazione*, nella quale si ha la fagocitosi del tessuto necrotico, la rigenerazione delle miofibrille e la concomitante produzione di tessuto connettivo cicatriziale, così come la crescita di capillari nell'area lesionata;
- *fase di rimodellamento*, cioè il periodo nel quale si ha la maturazione delle miofibrille rigenerate, la riduzione e la riorganizzazione del tessuto cicatriziale ed il recupero della capacità funzionale del muscolo leso.

Le ultime 2 fasi sono generalmente strettamente associate e sovrapposte.

Queste fasi vengono coordinate da fattori di crescita, quali il *Tumor Necrosis Factor* (TNF)- α , il *Fibroblast Growth Factor* (FGF), l'*Insuline-like Growth Factor* (IGF), il *Transforming Growth Factor* (TGF)- β , l'*Hepatocyte Growth Factor* (HGF), da interleuchine come l'IL-1 β e l'IL-6 e da interazioni cellula-cellula. La guarigione dipende anche dalla vascolarizzazione locale e dalla rigenerazione dei fasci nervosi intramuscolari.

La velocità della progressione di queste fasi dipende dalla severità del trauma, dalla biologia del paziente stesso così come dal protocollo terapeutico e riabilitativo intrapreso. Dal punto di vista terapeutico, i trattamenti standard mirano a ridurre il sanguinamento e la tumefazione associati al trauma. Il trattamento ideale per i traumi muscolari dovrebbe accelerare il processo di guarigione e migliorare la qualità del tessuto riparato.

Per far questo, bisogna intervenire sulle tappe fondamentali del processo riparativo cioè sulla fase infiammatoria, sulla riparazione del tessuto leso e sulla fibrosi che ne residua.

È in questi processi che si inseriscono la medicina rigenerativa e l'ingegneria tissutale mediante l'utilizzo terapeutico di fattori di crescita, inibitori della fibrosi, cellule staminali e attraverso la terapia genica.

Purtroppo allo stato attuale non ci sono studi clinici prospettici randomizzati che ci diano le giuste indicazioni per favorire ed accelerare il processo di guarigione delle lesioni muscolari.

FATTORI DI CRESCITA E PRP (PLATELET-RICH PLASMA)

Molti studi *in vitro* hanno dimostrato che i fattori di crescita sono in grado di migliorare la rigenerazione muscolare ed aumentare la forza muscolare dopo un trauma.

In studi su modelli murini è stato visto che l'IGF-1, il bFGF e il *Nerve Growth Factor* (NGF) sono potenti stimolatori della proliferazione e della fusione dei mioblasti. Nello specifico, l'IGF-1, il bFGF e l'NGF venivano iniettati al secondo, quinto e settimo giorno dopo la lesione, ottenendo un miglioramento della rigenerazione muscolare. Il numero di miofibrille rigenerate incrementava in modo significativo dopo 7 giorni dall'iniezione. Il diametro delle fibre rigenerate nei muscoli trattati era aumentato in maniera significativa, mostrando quindi un'accelerazione della rigenerazione muscolare nei tessuti lesionati ed un complessivo aumento della forza muscolare a 15 giorni dalla lesione.

Una delle problematiche legate all'utilizzo dei fattori di crescita per accelerare il processo riparativo è il fatto che essi necessitano di alte concentrazioni a livello del focolaio leso per essere efficaci. Infatti, è stato dimostrato che i GF somministrati *in vitro* presentano un effetto dose-dipendente sulla proliferazione e sulla differenziazione dei mioblasti mentre, *in vivo*, 3 somministrazioni consecutive a dosi relativamente alte di GF sono di solito richieste per rilevare un miglioramento nella guarigione a livello del muscolo scheletrico nel topo. La rapida *clearance* da parte del sangue delle molecole e la loro breve emivita sono i motivi per cui sono richieste alte concentrazioni di GF nei muscoli lesi⁴⁻⁹.

Questi dati confermano quelli ottenuti da lavori precedenti in cui veniva dimostrato che il bFGF stimola la proliferazione dei mioblasti in colture cellulari bovine e che IGF-1 è capace di potenziare la stimolazione della proliferazione e della differenziazione dei mioblasti *in vitro*¹⁰⁻¹⁷.

Il meccanismo per il quale bFGF stimola la proliferazione sembra essere dovuto alla capacità di stimolare il passaggio delle cellule dalla fase G0 alla fase G1 del ciclo cellulare^{18 19}.

Questi fattori di crescita, insieme ai macrofagi e ai prodotti della via dei COX-2 (ciclo-ossigenasi-2), regolano la fase infiammatoria della guarigione del muscolo scheletrico. Il TGF- β 1 e le prostaglandine di seconda serie (PGE₂) potrebbero anche agire in maniera sinergica per regolare il livello di fibrosi durante la guarigione del muscolo²⁰.

Concentrati di piastrine autologhe sono stati utilizza-

ti per trattare lesioni muscolari in modelli di ratti con contusioni provocate a livello dei gastrocnemi ed è stato evidenziato, rispetto ai gruppi di controllo, un incremento dell'attivazione delle cellule satelliti e dell'ampiezza delle miofibrille²¹.

Carda et al. hanno visto che in lesioni muscolari indotte chirurgicamente in pecore, il trattamento con PRP accelerava il processo di guarigione²².

Hammond et al. hanno promosso un modello sperimentale *in vivo* di ratti nei quali, a livello del tibiale anteriore, è stata generata una lesione mediante singole o multiple contrazioni eccentriche in modo da riproporre una condizione che sia il più vicino possibile a quella che avviene normalmente nell'uomo. I gruppi di studio sono stati così divisi:

- iniezione di PRP con singola somministrazione nel sito della lesione;
- somministrazioni multiple di PRP intralesionali;
- iniezioni di PPP a livello della lesione;
- nessuna terapia.

È stato visto che il rilascio locale di PRP può accorciare i tempi di recupero dopo una lesione muscolare e che lo stesso è migliore nei protocolli in cui vi sono state applicazioni ripetute di PRP rispetto a quelli sottoposti a monosomministrazione²³.

Nell'uomo, l'accelerazione del recupero funzionale è stata vista in un trial in atleti d'élite nei quali è stato iniettato il PRP sotto guida ultrasonografica in seguito ad una lesione muscolare. Questi atleti sono tornati all'attività sportiva completa nella metà del tempo che ci si poteva attendere per il recupero e senza evidenza di eccesso di fibrosi. Peraltro si tratta di un lavoro presentato alla Seconda Conferenza Internazionale di Medicina Rigenerativa del 2005 sotto forma di poster e mai pubblicato in letteratura scientifica²⁴.

Il PRP rappresenta quindi una possibile opzione terapeutica per stimolare ed accelerare la guarigione e la rigenerazione del tessuto muscolare. Non ci sono comunque studi randomizzati controllati sugli uomini che ne supportino l'uso nelle lesioni muscolari. Alcuni studi sono iniziati ed i loro risultati potranno fare da guida a future indicazioni da fornire in questo tipo di traumi. Sono necessari quindi dati clinici più importanti per determinarne l'efficacia, le preparazioni e le composizioni standardizzate, il timing dell'iniezione di PRP nell'algoritmo terapeutico e gli *outcome* da considerare per paragonare risultati clinici²⁵.

Sarà importante comunque definire qual è il miglior tipo di lesione muscolare da trattare. Ad esempio, Mishra et al. affermano che lesioni muscolari acute a livello della

giunzione mio-tendinea potrebbero essere trattate con l'aspirazione dell'ematoma e l'iniezione di PRP²⁶.

Occorrerà definire il valore della guida ultrasonografica o di altri tipi di guide necessarie per iniettare il PRP nell'esatto focus della lesione.

Serviranno inoltre protocolli riabilitativi adeguati per ottenere una ottimale riparazione del tessuto muscolare dopo tali applicazioni.

È da considerare infine il rapporto tra l'iniezione di fattori di crescita e le regole dell'antidoping. Per quel che riguarda il PRP, la WADA (*World Anti-Doping Agency*) nella nuova lista di farmaci proibiti per il 2010 recentemente pubblicata, proibisce l'utilizzo intramuscolare di PRP ma viene indicato che l'utilizzo mediante altre vie di somministrazione deve essere dichiarato ed approvato dall'*International Standard for Therapeutic Use Exemptions*.

CELLULE STAMINALI DI DERIVAZIONE MUSCOLARE (MDSC)

Ad oggi, i maggiori risultati della ricerca sull'utilizzo delle cellule staminali per la rigenerazione muscolare sono limitati a modelli animali.

Sebbene i laboratori stiano valutando il ruolo delle MDSC impiantate direttamente sul focolaio muscolare lesionato, i loro benefici non sono stati ancora determinati.

Per le tecniche di ingegneria tissutale il muscolo richiede uno *scaffold* per il supporto strutturale e per regolare la proliferazione e la differenziazione delle cellule progenitrici muscolari. I dati in letteratura suggeriscono che lo *scaffold* ideale potrebbe essere costituito da un gel di fibrina e un monostrato di cellule muscolari satelliti.

L'ingegneria tissutale muscolare necessita di un'adeguata connessione al sistema vascolare per un trasporto efficiente di ossigeno, CO₂, nutrienti, metaboliti e di una corretta giunzione neuromuscolare. A tale scopo sembra importante applicare stimolazioni meccaniche, elettriche e molecolari durante il processo di sviluppo del costrutto muscolare da impiantare.

A livello del sito di impianto, è fondamentale garantire una corretta vascolarizzazione locale. A tal fine è stato visto che la contrazione muscolare mediante esercizio fisico volontario o con stimolazione elettrica neuromuscolare (NMES) induce la formazione di nuovi vasi e l'espansione del sistema vascolare preesistente^{27 28}.

TERAPIA GENICA

Data l'importanza dell'IGF-1 nella rigenerazione muscolare, sono stati sviluppati degli adenovirus con funzione di *carriers* per il gene dell'IGF-1 ed è sono state valutate le capacità di migliorare la qualità del muscolo lesio.

In modelli murini, l'iniezione diretta dell'adenovirus vettore di IGF-1 a livello della lesione non aumenta significativamente la forza muscolare a 2 settimane dopo l'applicazione. Tuttavia, il trasferimento genico di adenovirus portatore del gene codificante per l'IGF-1 mioblasto-mediato aumenta la guarigione muscolare dopo una lesione in topi immunocompetenti, con evidenza però di fibrosi nel sito di iniezione²⁹.

Questo dimostra come la terapia genica basata sull'IGF-1 può migliorare il processo di guarigione muscolare ma il recupero funzionale rimane incompleto. Lo sviluppo della fibrosi locale potrebbe interferire con l'azione del GF suggerendo che la prevenzione della fibrosi può rappresentare la migliore strategia per migliorare la guarigione delle lesioni muscolari.

Resta però il problema ancora irrisolto dell'utilizzo dei vettori virali in terapia genica, con il rischio di infezioni e il ben più importante rischio cancerogeno che ne può derivare.

INIBITORI DELLA FIBROSI

Per quel che riguarda gli *inibitori della fibrosi*, quelli che da un punto di vista sperimentale si sono dimostrati efficaci sono la decorina, la suramina e l'interferone (INF)- γ .

La decorina inattiva il TGF- β 1 ed è stato visto ridurre la fibrosi muscolare e di conseguenza migliora la guarigione del muscolo scheletrico con un recupero pressoché completo dopo un trauma.

La suramina degrada le fibre collagene dopo la loro deposizione³⁰. Per questo motivo potrebbe essere usata per eliminare cicatrici muscolari già presenti.

Per quel che riguarda l'INF- γ , possiamo dire che è una molecola già utilizzata per trattare la fibrosi epatica nell'uomo (approvato dalla *Food and Drug Administration* [FDA]), e quindi non ci sono problemi al suo utilizzo clinico.

Queste molecole potrebbero diventare un bersaglio per lo sviluppo di strategie di terapia genica locale per prevenire la fibrosi nella guarigione delle lesioni muscolari.

PROPOSTE DI UTILIZZO DEL PRP

Vista la carenza di dati in letteratura, ci sentiamo di riservare l'utilizzo di PRP negli atleti in caso di lesioni muscolari pure, generalmente non di interesse chirurgico, con le seguenti indicazioni:

- lesioni muscolari almeno di II grado;
- entro i 15 giorni dal trauma;
- almeno 2 applicazioni, a distanza di 7-10 giorni l'una dall'altra;
- applicazioni sotto guida ecografica;
- eseguire esame RM prima dell'applicazione del PRP e controllo con nuova RM a 4 settimane dalla prima;
- protocollo riabilitativo: riposo funzionale per 15 giorni, successivamente stretching e potenziamento eccentrico della muscolatura, eventualmente associati a stimolazione elettrica neuromuscolare

Per quel che riguarda le lesioni mio-tendinee dello sportivo invece, vanno distinte quelle di interesse chirurgico, in cui il PRP deve essere applicato in sede intra-operatoria, mentre nel caso delle lesioni non chirurgiche sostanzialmente si può seguire il protocollo scelto per le lesioni muscolari pure. Si può discutere sull'eventualità di una seconda applicazione a livello della lesione nel caso di intervento chirurgico perché si andrebbe a stimolare un sito chirurgico con i rischi che ne conseguono, cioè infettivi e di sofferenza dei tessuti peri-cicatriziali.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Beiner JM, Jokl P. *Muscle contusion injuries: current treatment options*. J Am Acad Orthop Surg 2001;9:227-37.
- 2 Järvinen M, Lehto MUK. *The effect of early mobilization and immobilization on the healing process following muscle injuries*. Sports Med 1993;15:78-89.
- 3 Benazzo F, Barnabei G, Monti G, et al. *Current thinking on the pathogenesis, progression and treatment of muscle haematomas in athletes*. Italian Journal of Sports Traumatology 1989;11:273-302.
- 4 Kasemkijwattana C, Menetrey J, Day C, et al. *Biological interventions in muscle healing and regeneration*. Sports Med Arthrosc Rev 1998;6:95-102.
- 5 Kasemkijwattana C, Menetrey J, Somogyi G, et al. *Development of approaches to improve the healing following muscle contusion*. Cell Transplant 1998;7:585-98.
- 6 Kasemkijwattana C, Menetrey J, Bosch P, et al. *Use of growth factors to improve muscle healing after strain injury*. Clin Orthop 2000;370:272-85.
- 7 Menetrey J, Kasemkijwattana C, Day C, et al. *Growth factors improve muscle healing in vivo*. J Bone Joint Surg 2000;82B:131-7.
- 8 Huard J, Li Y, Fu F. *Current concepts review, muscle injuries and repair: current trends in research*. J Bone Joint Surg 2002;84A:822-32.
- 9 Li Y, Cummins J, Huard J. *Muscle injury and repair*. Curr Opin Orthop 2001;12:409-15.
- 10 Florini JR, Magri KA. *Effect of growth factors on myogenic differentiation*. Am J Physiol 1989;256:701-11.
- 11 Allen RE, Boxhorn LK. *Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by transforming growth factor-beta, insulin-like growth factor 1, and fibroblast growth factor*. J Cell Physiol 1989;138:311-5.
- 12 Ewton DZ, Florini JR. *Relative effects of the somatomedins, multiplication-stimulating activity, and growth hormone on myoblasts and myotubes in culture*. Endocrinology 1980;106:577-83.
- 13 Florini JR, Ewton DZ, Roof SL. *Insulin-like growth factor-1 stimulates terminal myogenic differentiation by induction of myogenin gene expression*. Mol Endocrinol 1991;5:718-24.
- 14 Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweigerer L, et al. *Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor*. Endocr Rev 1987;8:95-114.
- 15 Gospodarowicz D, Weseman J, Moran JS, et al. *Effect of fibroblast growth factor on the division and fusion of bovine myoblasts*. J Cell Biol 1976;70:395-405.
- 16 Kardami E, Spector D, Strohmman RC. *Selected muscle and nerve extracts contain an activity which stimulates myoblast proliferation and which is distinct from transferrin*. Dev Biol 1985;112:353-8.
- 17 Kardami E, Spector D, Strohmman RC. *Myogenic growth factor present in skeletal muscle is purified by heparin-affinity chromatography*. Proc Natl Acad Sci USA 1985;82:8044-7.
- 18 Alameddine HS, Dehaupas M, Fardeau M. *Regeneration of skeletal muscle fibers from autologous satellite cells multiplied in vitro: an experimental model for testing cultured cell myogenicity*. Muscle Nerve 1989;12:544-55.
- 19 Jennische E, Hansson HA. *Regenerating skeletal muscle cells express insulin-like growth factor I*. Acta Physiol Scand 1987;130:327-32.
- 20 Shen W, Li Y, Zhu J, et al. *Interaction between macrophages, TGF-beta1, and the COX-2 pathway during the inflammatory phase of skeletal muscle healing after injury*. J Cell Physiol 2008;214:405-12.
- 21 Wright-Carpenter T, Klein P, Schäferhoff P, et al. *Treatment of muscle injuries by local administration of autologous conditioned serum: a pilot study on sportsmen with muscle strains*. Int J Sports Med 2004;25:588-93.
- 22 Carda C, Mayordomo E, Enciso M, et al. *Structural effects of the application of a preparation rich in growth factors on muscle healing following acute surgical lesion*. Poster presentation at the 2nd International Conference on Regenerative Medicine, 2005.
- 23 Hammond JW, Hinton RY, Curl LA, et al. *Use of autologous platelet-rich plasma to treat muscle strain injuries*. Am J Sports Med 2009;37:1135-42.
- 24 Sanchez M, Azofra J, Anitua E, et al. *Use of a preparation rich in growth factors in the operative treatment of ruptured*

- Achilles tendon*. Poster presentation at the 2nd International Conference on Regenerative Medicine, 2005.
- ²⁵ Hall MP, Band PA, Meislin RJ, et al. *Platelet-rich plasma: current concepts and application in sports medicine*. J Am Acad Orthop Surg 2009;17:602-8.
- ²⁶ Mishra A, Woodall J, Vieira A. *Treatment of tendon and muscle using platelet-rich plasma*. Clin Sports Med 2009;28:113-25.
- ²⁷ Koning M, Harmsen MC, van Luyn MJ, et al. *Current opportunities and challenges in skeletal muscle tissue engineering*. J Tissue Eng Regen Med 2009;3:407-15.
- ²⁸ Quintero AJ, Wright VJ, Fu FH, et al. *Stem cells for the treatment of skeletal muscle injury*. Clin Sports Med 2009;28:1-11.
- ²⁹ Lee C, Fukushima K, Usas A, et al. *Biological intervention based on cell and gene therapy to improve muscle healing following laceration*. J Musculoskel Res 2000;4:265-77.
- ³⁰ Kloen P, Jennings C, Gebhardt M, et al. *Suramin inhibits growth and transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) binding in osteosarcoma cell lines*. Eur J Cancer 1994;30A:678-82.

Applicazioni cliniche sui tendini

Biotechnology in tendon healing

P. Randelli

RIASSUNTO

Le lesioni tendinee, in particolar modo quelle della cuffia dei rotatori, sono una comune sorgente di dolore e di disabilità per numerosi pazienti. Nonostante i notevoli progressi delle tecniche chirurgiche, specie artroscopiche, la percentuale di rirottura della cuffia dei rotatori, resta elevata. L'elevato tasso di rirotture è verosimilmente legato a problematiche biologiche di scarsa guarigione dei tessuti piuttosto che a causa di nuovi traumi. Lo scopo di questo lavoro è quello di illustrare le più recenti strategie biotecnologiche utilizzabili al fine di migliorare gli aspetti biologici. In particolare vengono descritte le potenzialità legate all'utilizzo degli *scaffold*, dei fattori di crescita piastrinici, e delle cellule staminali.

Parole chiave: plasma ricco di piastrine, artroscopia, cuffia dei rotatori, scaffold, cellule staminali, guarigione tendinea

SUMMARY

Tendon's lesion, like Rotator cuff injuries, are a common source of pain and result in an important decrease in patient's life quality. In Italy, it is estimated that 30% of individuals over the age of 60 years experience rotator cuff injuries. Despite surgical techniques advances, after surgical repair there is a high rate of recurrent tears (up to 40%). Tendons heal forming inferior quality tissue and despite the remodelling the healed tendon's tissue never match those of intact tendon. Due to the frequency of these injuries, as well as the rate of re-tear, it is not surprising that have become more appealing new and innovative strategies like tissue engineering. Tissue-Engineering strategies involves the use of scaffolds, cells, and/or bioactive factors to promote tendon regeneration via natural process. The present paper reviews the current state of knowledge regarding the regeneration of tendon's tissues from cells with the support of scaffolds and growth factors.

Key words: platelet-rich plasma (PRP), arthroscopic, rotator cuff repair, scaffold, stem cells, tendon healing

INTRODUZIONE

La rigenerazione tissutale è un processo peculiare e riscontra differenze tessuto specifiche.

Nel caso dei tendini, la rigenerazione è un fenomeno temporalmente lungo e biologicamente assai complesso, in cui le biotecnologie appaiono di notevole importanza.

Dipartimento di Scienze Medico-Chirurgiche, Policlinico "San Donato", IRCCS, San Donato Milanese; Clinica Ortopedica, Università di Milano

Indirizzo per la corrispondenza:
Dott. Pietro Randelli, via Fra polli 22, 20133 Milano
Tel. 02 58018009
Fax 02 70035242
E-mail: pietro.randelli@unimi.it

L'utilizzo delle biotecnologie si è sviluppato negli anni con 2 scopi principali. In primis si sono cercate sostanze in grado di permettere un'accelerazione della guarigione al fine di ridurre l'immobilizzazione post-chirurgica e la seguente fase riabilitativa. Secondo, ma non meno importante scopo, è stato quello di ridurre le percentuali di ri-lesione, che in alcune situazioni quale quella della cuffia dei rotatori sono rilevanti.

Il tasso di ri-lesione dei tendini della cuffia dei rotatori supera il 40% compromettendo il funzionamento della spalla¹.

Recentemente gli sforzi dei ricercatori si sono dunque rivolti allo studio dei meccanismi biologici di guarigione dei tessuti tendinei e alla possibilità di migliorare ed accelerare i meccanismi riparativi.

Scopo di questo lavoro è analizzare in profondità gli studi esistenti esplorando le possibilità di utilizzo delle biotecnologie attualmente più accreditate per l'obiettivo di migliorare i risultati della chirurgia riparativa dei tendini (in particolare della cuffia dei rotatori): i fattori di crescita, gli *scaffolds* biologici, le proteine morfogenetiche ossee (BMP) e le cellule staminali mesenchimali (MSC).

Processo di guarigione del tessuto tendineo

I tendini sono costituiti da cellule altamente specializzate che sono immerse in una rete tridimensionale di matrice extracellulare.

Il processo di guarigione del tessuto tendineo è molto articolato e necessita di separata descrizione. Subito dopo la lesione, il gap creatosi è colmato da un coagulo di sangue che funge da *scaffold* (impalcatura) per la riparazione e rilascia una varietà di fattori di crescita chemiotattici e mitogeni (*fase emorragica*). Le citosine rilasciate all'interno del coagulo attivano i leucociti polimorfonucleati e i linfociti che giungono al sito della lesione entro poche ore. Queste cellule rispondono ai segnali autocrini e paracrini espandendo la risposta infiammatoria e reclutando altri tipi di cellule. I macrofagi arrivano al sito della lesione entro 48 ore e predominano per diversi giorni (*fase infiammatoria*). Essi sono responsabili della fagocitosi del tessuto necrotico e assieme alle cellule dell'epitenone ed endotenone (cellule intrinseche) secernano molteplici fattori di crescita, che inducono la neovascolarizzazione e la formazione del tessuto di granulazione. Dopo tre giorni, al sito della lesione saranno presenti piastrine, macrofagi, leucociti polimorfonucleati, linfociti e le cellule staminali mesenchimali multipotenti. Le piastrine rilasciano i fattori *Platet-Derived Growth Factor* (PDGF),

Transforming Growth Factor-Beta (TGF- β) e l'*Epidermal Growth Factor* (EGF); i macrofagi i fattori PDGF, *Transforming Growth Factor-Alfa* (TGF- α), TGF- β , e *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF). Questi fattori non soli sono chemiotattici per i fibroblasti e altre cellule ma stimolano anche la proliferazione dei fibroblasti e la sintesi del collagene di tipo I, III e V e delle proteine non collagenose. Le ultime cellule ad arrivare sono i fibroblasti che sono reclutati dai tessuti vicini e dal circolo sistemico (*fase proliferativa*). I fibroblasti iniziano a produrre collagene ed altre proteine della matrice entro una settimana dalla lesione. Dopo due settimane, il coagulo di sangue è più organizzato ed iniziano a formarsi i primi capillari. Il contenuto totale di collagene è superiore a quello di un tendine normale, ma la densità è inferiore e la matrice extracellulare è disorganizzata. L'ultima fase è caratterizzata dalla riduzione della cellularità e un aumento della densità di collagene (*fase di rimodellamento*). I segnali biochimici e biomeccanici regolano l'espressione delle proteine strutturali ed enzimatiche incluse la collagenasi, l'attivazione del plasminogeno e la stromolisina. La guarigione continua per diversi mesi e la maturazione del tendine non è completa prima di un anno. Nonostante la fase di rimodellamento, il tendine guarito non raggiungerà le proprietà meccaniche e morfologiche di un tendine normale. La forza di tensione rimane inferiore del 30% rispetto a quella di un normale tendine anche dopo diversi mesi o anni². La riduzione delle proprietà meccaniche è associata a un inferiore diametro delle fibre di collagene e all'alterazione del profilo dei proteoglicani della matrice. La riduzione delle proprietà meccaniche del tendine renderà il tessuto più debole e più predisposto a rilesione³.

FATTORI DI CRESCITA

I fattori di crescita sono proteine utilizzate per la comunicazione tra cellule di un organismo in grado di stimolare la migrazione cellulare, la proliferazione e la sintesi delle proteine. Essi esplicano la loro azione legandosi a specifici recettori di membrana di cellule target. I recettori traducono l'informazione trasportata dalla molecola ligando in un segnale interpretabile dalla cellula. Una volta attivati, i recettori innescano una cascata di reazioni chimiche nel citoplasma che provocano l'attivazione dei geni nel nucleo. I fattori di crescita possono attivare le cellule vicine (azione paracrina) o le

cellule stesse che li hanno rilasciati (azione autocrina). Numerosi studi hanno mostrato che i fattori di crescita sono coinvolti: nella formazione della cartilagine e dell'osso, nella guarigione delle fratture, nella riparazione del tessuto tendineo e legamentoso, nella rigenerazione muscolare. I fattori di crescita coinvolti nel processo di riparazione sono: bFGF, *Insulin-Like Growth Factor* (IGF-1), PDGF, TGF, *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), l'EGF.

Il TGF- β è una citosina secreta dalla maggior parte delle cellule coinvolte nel processo di guarigione come linfociti, piastrine, cellule endoteliali e fibroblasti. Il TGF- β stimola il reclutamento e la proliferazione dei fibroblasti e macrofagi, promuove l'angiogenesi, regola la trascrizione delle proteine della matrice e la proteinasi. Questo fattore è anche implicato nella patogenesi della formazione del tessuto cicatriziale dopo la lesione o l'intervento chirurgico.

Uno studio *in vitro*⁴, ha evidenziato che alti livelli di TGF β -1, sono associati alla formazione d'aderenze che possono limitare l'arco di movimento articolare. Chang et al.⁵ hanno studiato i fattori TGF β -1 e TGF β -2 nella guarigione del tendine flessore. Essi somministrarono, *in vivo*, gli anticorpi delle due isoforme del fattore TGF- β per ridurre la loro attività e l'associata riduzione del *range of motion*. Gli autori osservarono che gli animali che avevano ricevuto l'anticorpo per TGF β -1 mostravano un più alto arco di movimento rispetto al controllo. Il gruppo che aveva ricevuto entrambi gli anticorpi, non mostrava invece alcuna differenza significativa rispetto al gruppo trattato con il solo anticorpo TGF β -1.

Il fattore PDGF è attivo nella fase infiammatoria e proliferativa del processo di guarigione. Uno studio *in vitro*⁶ ha evidenziato la capacità di PDGF di stimolare la produzione delle proteine collagenose/e non, così come la sintesi del DNA in funzione della dose somministrata.

Lynch et al.⁷ hanno mostrato, in uno studio *in vitro*, che la stimolazione della sintesi del DNA da parte del PDGF è mediata da un secondo fattore di crescita messaggero. Lo studio evidenziava che l'aumento di PDGF era legato ad una sovraregolazione dei recettori di IGF e IGF-1 che una volta attivati stimolavano la sintesi del DNA.

Hildebrand et al.⁸ osservarono, in uno studio *in vivo* sul legamento collaterale mediale, che la somministrazione di un alto dosaggio di PDGF-BB si associava ad un incremento del carico massimo di rottura, della energia assorbita e dell'allungamento finale. Letson e Dahners⁹ usarono il fattore PDGF da solo e in combinazione con IGF-1 e con bFGF nel tentativo di migliorare la guarigione

del legamento collaterale mediale. Essi somministrarono 1,2 μ g di ogni fattore di crescita e testarono le proprietà meccaniche del tessuto dei 3 gruppi di animali dopo 12 giorni dalla lesione. Essi osservarono un incremento di forza del 73%, di rigidità del 94%, e d'energia alla rottura del 101%. Nessuno effetto complementare invece fu osservato nei gruppi trattati in combinazione con IGF-1 o bFGF.

L'IGF-1 è un importante mediatore durante la fase infiammatoria e proliferativa. Diversi studi *in vitro*^{10 11} hanno mostrato un aumento locale dei livelli della proteina e del RNA messaggero e la sovra-regolazione dei suoi recettori dopo la lesione. Sciore et al.¹⁰ dimostrarono che il livello del RNA messaggero era 5 volte più alto rispetto al controllo dopo 3 settimane dalla lesione del legamento collaterale mediale in conigli.

L'IGF-1 stimola la migrazione, la proliferazione cellulare e la produzione di collagene e delle altre strutture della matrice.

Esso lavora in sinergia con altre molecole per promuovere la proliferazione cellulare. Tsuzaki et al.¹¹ mostrarono *in vitro* che la mitogenesi cellulare dei fibroblasti era più alta, quando IGF-1 era applicato assieme al fattore PDGF-BB.

In vivo, Kurtz et al.¹² mostrarono che IGF-1 (dose: 25 μ g) aumentava il tasso di guarigione del tendine di Achille lesionato nei ratti. Letson e Dahners⁹ studiarono *in vivo* l'abilità di IGF-1 di migliorare la guarigione in combinazione con bFGF. Essi praticarono una piccola incisione nel legamento collaterale mediale dei ratti che furono trattati con un'emulsione dei due fattori senza riparazione chirurgica. Dopo 12 giorni dalla incisione, l'energia alla rottura era aumentata significativamente del 58%, mentre la forza massima e la rigidità non differivano significativamente dal controllo.

Il bFGF è attivo durante la fase proliferativa e di rimodellamento. Esso è un potente stimolatore della migrazione e proliferazione cellulare e dell'angiogenesi¹³. Chan et al.¹⁴ osservarono che il livello di espressione del collagene tipo III e la proliferazione cellulare, dopo 7 giorni dalla lesione del tendine patellare dei ratti, era correlato con il dosaggio somministrato di bFGF.

Kobayashi et al.¹⁵ mostrarono che il trattamento con bFGF accelerava la guarigione del tessuto. Essi osservarono un rapido riempimento del difetto del legamento crociato anteriore canino con nuovo tessuto a granuli nel gruppo trattato con un alto dosaggio del fattore di crescita rispetto al controllo.

Studi clinici

Le piastrine sono le prime cellule ad arrivare al sito della lesione dove rilasciano i fattori di crescita che si trovano immagazzinati in organelli citoplasmatici (α -granuli). I fattori di crescita rilasciati includono PDGF, TGF- β ed EGF. Slater et al.¹⁶ osservarono che in cultura le piastrine stimolavano la proliferazione degli osteoblasti umani. Essi conclusero che l'aggiunta dei fattori di crescita delle piastrine esogene poteva favorire la guarigione delle fratture.

James et al.¹⁷ trattarono la tenidosi del tendine patellare di 47 ginocchia in 44 pazienti con due iniezioni di sangue autologo a distanza di 2 settimane. Essi osservarono una riduzione della area della tenidosi e delle lesioni intratendinee in questa serie di pazienti per effetto del trattamento. Connell et al.¹⁸ utilizzarono sangue autologo per il trattamento dell'epicondilita laterale. Il trattamento con sangue autologo risultò in una significativa riduzione del dolore a 4 e a 24 settimane.

Il plasma ricco di piastrine contiene una maggiore concentrazione di piastrine rispetto al sangue intero e può essere utile per il trattamento delle lesioni dei legamenti e dei tendini.

Mishra et al.¹⁹ utilizzarono il plasma ricco di piastrine per trattare la tendinosi cronica del gomito di 15 pazienti. Dopo 4 settimane il dolore (*Visual Analog Pain Score*) si era ridotto del 46% nel gruppo trattato verso il 17% del controllo (p -value = 0,028). A sei mesi dall'intervento, il dolore si era significativamente ridotto del 81% e l'indice clinico (*Mayo Elbow Score*) era migliorato del 72% rispetto al valore di *baseline* (*Visual Analogic Pain Score* e *Mayo Elbow Score* prima del trattamento). Al follow-up finale (media: 25,6 mesi) il dolore si era ridotto del 93% rispetto al valore di *baseline*. I risultati di questo studio hanno evidenziato la capacità delle piastrine di ridurre il dolore al follow-up di lungo termine. Sanchez et al.²⁰ utilizzarono il gel piastrinico per trattare la lesione completa del tendine di Achille in associazione alla riparazione chirurgica. I risultati di questo studio hanno mostrato che le piastrine sono in grado di accelerare la guarigione e permettere un rapido recupero delle attività rispetto ad un gruppo di controllo. Il ritorno alle attività sportive fu significativamente più veloce nel gruppo trattato con il concentrato piastrinico (14 settimane per il gruppo trattato e 22 settimane per il controllo).

Secrezione endogena dei fattori di crescita dopo acromionplastica artroscopica

Risultati della ricerca svolta presso il Policlinico "San Donato" e l'Università degli Studi di Milano

L'acromionplastica rappresenta una delle più popolari procedure chirurgiche nel trattamento delle patologie della cuffia dei rotatori. Neer²¹ descrisse per primo l'intervento di acromionplastica per il trattamento dell'*impingement syndrome*. Egli attribuì alla parte anteriore dell'acromion e al legamento coraco-acromiale un'azione lesiva di tipo meccanico sulla cuffia. Lo stesso autore, ha classificato²² le lesioni da *impingement* in grado I, II e III e distinto le lesioni in bursali, articolari e intratendinee. Bigliani e Morrison²³ sancirono con uno studio su cadavere il rapporto tra la morfologia dell'acromion (tipo piatto, curvo e uncinato) e l'incidenza di lesioni della cuffia. L'intervento d'acromionplastica, consiste nel modificare la morfologia irregolare dell'acromion di tipo 2 o 3 eliminando la causa primaria estrinseca del conflitto.

Un'altra indicazione per eseguire l'intervento di acromionplastica in associazione alla riparazione della cuffia dei rotatori è il possibile rilascio di fattori di crescita. L'acromionplastica può favorire la guarigione dei tendini per effetto dell'abbondante formazione di coagulo. Il coagulo di fibrina che si forma durante la normale risposta della guarigione, di una ferita funge da *scaffold* per supportare la riparazione e rilasciare i diversi fattori di crescita che sono chemiotattici e mitogeni per le cellule presenti; i tessuti scarsamente forniti di sangue (ad esempio la cartilagine articolare, menisco) non mostrano la capacità di guarire completamente. Scopo di questo lavoro è stato quello di dimostrare la presenza dei fattori di crescita nello spazio sub-acromiale dopo acromionplastica.

La valutazione della presenza di fattori di crescita all'interno dello spazio sottoacromiale è stata effettuata con una metodica immunoistochimica, in 23 pazienti sottoposti ad intervento artroscopico per patologie sottoacromiali incluse le lesioni di cuffia dei rotatori e la sindrome da conflitto.

Gli interventi sono stati condotti in anestesia locale (blocco interscalenico) o mista plessica associata a generale con il paziente in posizione di decubito laterale. Il braccio

Tab. I. Concentrazioni medie (\pm deviazioni standard) dei fattori di crescita nello spazio subacromiale e nel sangue venoso.

Fattori di crescita	Spazio subacromiale (pg/ml)	Siero (pg/ml)	p-value
TGF β -1	14.798 \pm 4448,8	8685,7 \pm 4556,1	< 0,0001
PDGF-AB	147,08 \pm 80,8	96,3 \pm 40,3	< 0,02
bFGF	488,55 \pm 221,73	10,29 \pm 11,14	< 0,0001

del paziente era mantenuto a 40 gradi di abduzione e 15 di flessione anteriore con una trazione di 4 chilogrammi. La riparazione della cuffia dei rotatori è avvenuta con l'utilizzo di ancore metalliche e tecnica *tendon to bone* oppure *margin convergence*. L'acromionplastica è stata eseguita in accordo alla tecnica descritta da Sampson²⁴. Un campione di 3 ml di fluido della spalla è stato raccolto 15 minuti dopo la fine dell'intervento tramite un tubo di drenaggio. Nello stesso momento è stato raccolto un campione di 3 ml di sangue del paziente come controllo. Si è proceduto all'analisi immunostochimica dei campioni. I fattori di crescita ricercati sono stati il PDGF-AB, il TGFβ-1 e il bFGF.

I risultati hanno mostrata una concentrazione statisticamente più alta dei fattori di crescita nello spazio subacromiale rispetto al sangue venoso dopo l'intervento di acromionplastica (Tab. I).

Utilizzo dei fattori di crescita di derivazione piastrinica nella riparazione artroscopica della cuffia dei rotatori Risultati della ricerca svolta presso il Policlinico San Donato e l'Università degli Studi di Milano

Il plasma autologo ricco di piastrine può migliorare la qualità della guarigione della cuffia dei rotatori per effetto dell'elevata concentrazione delle citosine rilasciate durante la degranolazione delle piastrine. Una quantità superiore di PDGF, può essere reclutata da piastrine esogene aggiunte al sito della lesione¹¹.

Il plasma autologo è stato utilizzato in 14 pazienti sottoposti a riparazione artroscopica della cuffia dei rotatori.

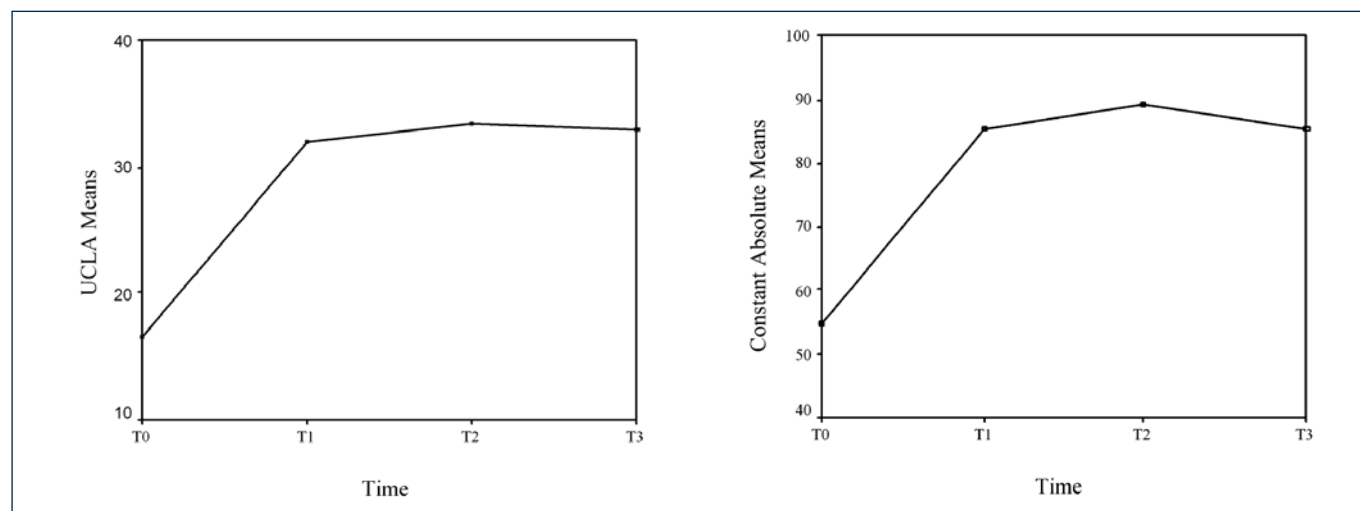
Essi hanno ricevuto localmente, subito dopo la riparazione chirurgica, una soluzione di plasma autologo ricco di piastrine in combinazione con trombina autologa. I criteri di inclusione sono stati:

1. lesione dei tendini della cuffia dei rotatori a tutto spessore;
2. formulazione di consenso informato allo studio;
3. valore preoperatorio delle piastrine > 150.000 e livello di emoglobina non inferiore a 11,0 g/dl.

I criteri di esclusione furono:

1. rilesione dei tendini della cuffia dei rotatori;
2. osteoartrite della articolazione gleno-omeroale;
3. osteomalacia;
4. infezioni attive, osteomielite o sepsi;
5. mancata accettazione del protocollo;
6. insufficienze vascolari, atrofia muscolare;
7. patologie che limitavano il follow-up.

Gli interventi sono stati condotti in anestesia plessica (blocco interscalenico) o mista plessica associata a generale con il paziente in posizione di decubito laterale. Il braccio era mantenuto a 30 gradi di abduzione e 30 gradi di flessione con una trazione di 4 kg. La riparazione completamente artroscopica è stata eseguita con combinazione di punti *side-to-side* e/o *tendon-to-bone* ed utilizzo d'ancore metalliche. A tutti i pazienti è stata eseguita l'acromionplastica. Al termine della riparazione chirurgica è stato applicato localmente con apposito kit sterile e apposite siringhe il plasma arricchito con i fattori di crescita autologhi e la fibrina attivata.



Figg. 1, 2. Valori medi di UCLA (Fig. 1) e Constant (Fig. 2) prima dell'intervento (T₀), dopo l'intervento, a 6 mesi (T₁), 1 anno (T₂), 2 anni (T₃).

Dopo l'intervento ai pazienti è stato prescritto di indossare un tutore per 28 giorni. Essi hanno iniziato una riabilitazione passiva accelerata al decimo giorno dopo l'intervento, mentre la fisioterapia attiva dopo il trentesimo giorno. Per ogni paziente è stata compilata una scheda predisposta di raccolta dei dati. La scheda prevedeva la registrazione dell'anamnesi del paziente, dei questionari clinici e dei dettagli intra-operatori. I questionari clinici includevano il *Visual Analog Score* (VAS) per la misura del dolore, il questionario di *Constant score*, e il questionario soggettivo di *University of California* (UCLA). I pazienti sono stati valutati prima dell'intervento (T_0) e dopo l'intervento, a 6 mesi (T_1), 1 anno (T_2), 2 anni (T_3). Inoltre, il dolore post-operatorio è stato monitorato a distanza di 1 mese dall'intervento.

Risultati

A due anni dopo l'intervento, il dolore si era significativamente ridotto del 82% rispetto al valore di *baseline* (p -value < 0,001). La riduzione del dolore dopo 1 mese dall'intervento era del 31,5%, al limite della significatività statistica (p -value = 0,056). Al follow-up finale, il punteggio di Constant era migliorato del 56% (p -value = 0,001) mentre quello di UCLA del 99% (p -value < 0,001) rispetto al valore di *baseline*. Le Figure 1 e 2 mostrano, l'andamento medio nel tempo del punteggio di UCLA e di Constant. I due indici aumentano linearmente nel tempo, ma la crescita si arresta per invertire il trend all'ultima misurazione (analisi dei contrasti: componente lineare p < 0,001; componente quadratica p < 0,001).

Nonostante i risultati di questa serie di casi facciano ben sperare nell'uso dei fattori di crescita per il trattamento delle lesioni della cuffia dei rotatori, la misurazione dell'efficacia del trattamento con il plasma ricco di piastrine deve avvenire mediante un studio randomizzato, prospettico e controllato. Questo studio pilota ha confermato la capacità delle piastrine di ridurre il dolore e di migliorare l'*outcome* clinico e ha permesso di effettuare l'analisi della potenza per uno studio di tipo prospettico, randomizzato e controllato. Assumendo come *outcome* primario il punteggio di Constant a due anni dopo l'intervento, per rilevare una differenza significativa di almeno 7 punti tra i due gruppi, con una deviazione standard del 8%, un livello di alfa pari a 5% e un potenza del 80%, occorre arruolare 22 pazienti per gruppo. Nella Tabella II è mostrato l'effetto sulla potenza dello studio dei diversi

Tab. II. Valori della potenza (*power*) per diversi valori della deviazione standard (s.d.) a parità di tutti gli altri parametri.

S.d.	6	7	8	9	10
Power	96%	90%	80%	71%	63%

valori della deviazione standard, a parità di tutti gli altri parametri (numerosità del campione; alfa, differenza tra i due gruppi).

SCAFFOLD

Introduzione

Diversi approcci possono essere adottati per migliorare il tasso di guarigione del tessuto tendineo. La medicina rigenerativa si suddivide in: terapia cellulare, che non utilizza *scaffolds* e, in ingegnerizzazione dei tessuti, che usa gli *scaffolds* come supporto per la rigenerazione.

La maggior parte dei tessuti richiede un supporto per la propria rigenerazione. Una cultura tridimensionale offre il vantaggio di ricreare l'organizzazione spaziale del tessuto originale.

Gli *scaffolds* hanno funzioni simili a quelle della matrice extracellulare assistendo la proliferazione, la differenziazione e la biosintesi cellulare. Essi forniscono una superficie che facilita l'adesione, la sopravvivenza, la migrazione, la proliferazione e la differenziazione delle cellule progenitrici.

Diversi *scaffolds* sono disponibili per gli usi clinici e si differenziano per: tipo di materiale, architettura tridimensionale, porosità, caratteristiche di degradazione, proprietà meccaniche e superficiali.

L'architettura della matrice definisce lo spazio a disposizione dei progenitori cellulari per formare nuovo tessuto. I micropori della matrice devono essere in grado di ospitare le cellule seminate sullo *scaffold* e quelle che migrano al suo interno, accrescere la loro numerosità, permettere la formazione dei canali vascolari e il trasporto delle sostanze nutritive.

Una volta impiantati, le superfici dei materiali rapidamente vengono ricoperti da proteine e da lipidi che mediano la risposta cellulare. La proteina assorbita modifica la sua conformazione nascondendo o esponendo siti che interagiscono con i recettori della superficie cellulare. L'adesione, la sopravvivenza, la proliferazione e la differenziazione cellulare dipendono dalle molecole assorbite e possono essere modulate *in vitro* ricoprendo lo *scaffold* con proteine bioattive.

Le proprietà meccaniche degli *scaffolds* dipendono dal tipo di materiale e dalla sua struttura. La guarigione del tessuto non può essere compromessa dal fallimento meccanico. Inoltre, poiché i segnali meccanici sono importanti mediatori della differenziazione cellulare, lo *scaffold* deve poter trasferire carico meccanico al tessuto di nuova formazione.

Gli *scaffolds* che non si degradano, conservano le proprietà meccaniche nel tempo, ma possono compromettere il funzionamento e la riparazione del tessuto. La presenza dell'impianto preclude formazione di nuovo tessuto nello spazio occupato e può modificare i segnali meccanici agenti sul tessuto adiacente determinandone una sua perdita.

Gli *scaffolds* riassorbibili sono stati sviluppati per superare le problematiche che derivano dagli impianti fissi. Essi si caratterizzano per: tasso di riassorbimento, degradazione delle proprietà meccaniche, natura e concentrazione dei prodotti rilasciati.

La cinetica d'assorbimento varia dal tipo di tessuto che si vuole rigenerare. Nel caso del tessuto tendineo la degradazione deve essere relativamente lenta, per supportare il carico meccanico fino alla rigenerazione del nuovo tessuto. Nella prima fase del processo di riparazione, lo *scaffold* deve proteggere le cellule e il nuovo tessuto da forze elevate, ma permettere una graduale esposizione ai carichi nelle fasi successive. Idealmente, l'impianto dovrebbe degradarsi alla stessa velocità di rigenerazione del nuovo tessuto. I prodotti di degradazione non devono essere nocivi ai tessuti circostanti, indurre infiammazione cronica o altra risposta biologica dannosa.

Diversi *scaffolds* biocompatibili e biodegradabili sono stati sviluppati in materiale sintetico e biologico per le applicazioni cliniche (pelle, submucosa intestinale, pericardio, polimeri ecc.).

Essi presentano struttura tridimensionale e sono disponibili con diverse architetture e porosità della matrice e con un largo *range* di proprietà meccaniche e di degradazione.

Gli *scaffolds* sintetici, tuttavia, presentano diversi svantaggi, poiché possono alterare le proprietà meccaniche del tendine riparato, perdere resistenza e integrità nel tempo, limitare la crescita del tendine, causare abrasione del tessuto circostante, provocare una risposta infiammatoria e iperplasia della cicatrice e sono pertanto vivamente sconsigliati dagli autori di questo lavoro.

Scaffolds biologici

Gli *scaffolds* che derivano dalla matrice extracellulare dei tessuti viventi di diversa specie (umana, equina, bovina e porcina) costituiscono un appropriato substrato per indurre la formazione di tessuto funzionale. I *bioscaffolds* contengono fibre di collagene che forniscono il supporto meccanico e molecole biologicamente attive che stimolano la crescita e il rimodellamento tessutale.

La presenza di collagene di tipo I, li rende particolarmente adatti per la riparazione della cuffia dei rotatori. Questi materiali forniscono un temporaneo supporto meccanico e presentano proprietà biologiche che possono influenzare l'adesione, la proliferazione e la differenziazione cellulare migliorando la guarigione del tessuto.

Matrici biologiche provenienti da diversi tessuti sono commercialmente disponibili per il rinforzo della cuffia dei rotatori e comprendono: derma (GraftJacket, TissueMend e Zimmer Collagen Repair Patch), submucosa del piccolo intestino di suino (Restore e CuffPatch), pericardio (OrthADAPT Bioimplant) e fascia lata (AlloPatch) (Tab. III)^{25 26}.

I prodotti biologici che derivano da animale sono classificati come device e regolamentati (premarket approval 510(k)) dagli US *Food and Drug Administration* (FDA) che non richiede prova della loro efficacia in studi preclinici e clinici²⁶. Le matrici d'origine umana (GraftJacket, AlloPatch) sono classificate come tessuti umani per il trapianto e non sono regolamentate dalla FDA²⁶.

Le matrici a disposizione per la riparazione della cuffia dei rotatori si differenziano per caratteristiche meccaniche e biologiche (Tab. IV)²⁶.

Le proprietà meccaniche descritte nella Tabella II, suggeriscono che le membrane bovine ed epidermiche possono non essere adeguate come rinforzo della cuffia dei rotatori e che la fascia lata presenta caratteristiche meccaniche simili a quelle di un tendine.

Inoltre, la Tabella II, mostra che le matrici epidermiche, hanno una capacità superiore di ritenere le suture rispetto alle matrici di submucosa intestinale (interfaccia *graft-tendine* e *graft-osso*).

L'utilizzo degli *scaffolds* è sempre più frequente, ma la loro efficacia nel trattamento della riparazione della cuffia dei rotatori va ancora dimostrata. Inoltre, pochi sono i dati della letteratura che descrivono le complicazioni o effetti collaterali associati a questi prodotti.

Tab. III. *Scaffolds* biologici disponibili per il rinforzo della cuffia dei rotatori.

Prodotto	Provenienza	Tipo di tessuto	Produttore	Commercializzato da
Restore	Porcina	Submucosa piccolo intestino	DePuy Orthopedics, Warsaw, IN, USA	DePuy Orthopedics
CuffPatch	Porcina	Submucosa piccolo intestino	Organogenesis, Canton, MA, USA	Arthrotek, Warsaw, IN, USA
GraftJacket	Umana	Derma	LifeCell Corporation, Branchburg, NJ, USA	Wright Medical, Arlington, TN, USA
TissueMend	Bovina	Derma	TEI Biosciences, Boston, MA, USA	Stryker Orthopedics, Mahwah, NJ, USA
Zimmer Collagen Repair Patch	Porcina	Derma	Tissue Sciences Lab, Andover, MA, USA	Zimmer, Warsaw, IN, USA
OrthADAPT Bioimplant	Equina	Pericardio	Pegasus Biologics, Irvine, CA, USA	Pegasus Biologics
AlloPatch	Umana	Fascia lata	Musculoskeletal Transplant Foundation, Edison, NJ, USA	Musculoskeletal Transplant Foundation

Tab. IV. Proprietà meccaniche degli *scaffolds* biologici.

Materiale	Deformazione lineare (%)	Modulo di elasticità lineare (MPa)	Rigidità lineare (N/mm)	Carico di rottura delle suture (N)
Tendine infraspinato canino	5-12	405 ± 86	–	–
AlloPatch	3-11	304 ± 52	98,2 ± 16,2	–
Restore	22-25	35,5 ± 9,1	7 ± 1,5	38,2 ± 2,8
CuffPatch	20-22	40,1 ± 15	6,8 ± 2,3	32 ± 4,1
GraftJacket	53-93	22,5 ± 5,3	16,4 ± 5,9	229 ± 72
TissueMend	37-53	15,2 ± 3,5	7,4 ± 1,4	76 ± 21,5
Zimmer Collagen Repair Patch	–	–	–	128 ± 26,3

Studi clinici

Restore e GraftJacket sono al momento le uniche matrici extracellulari che sono state indagate clinicamente nella riparazione della cuffia dei rotatori.

Restore Orthobiologic Implant

Deriva dalla submucosa porcina del piccolo intestino e contiene collagene tipo I, fibronectina, eparina, eparina solfata, condroitina solfata, ialuronani, e numerosi fattori di crescita come FGF-2, TGF- β , VEGF. Le cellule ospiti aderiscono alla matrice e producono nuovo tessuto tendineo all'interno dello *scaffold*. Studi su animali²⁷ hanno evidenziato che la submucosa intestinale è completamente riassorbita entro 6 settimane e perde la maggior parte delle sue proprietà meccaniche nelle prime 4 settimane lasciando sufficiente tempo per la produzione di matrice tessutale. La submucosa porcina del piccolo intestino è stata utilizzata per migliorare la guarigione del tendine d'Achille di cane e di coniglio. Il trattamento con la membrana si associava a formazione di nuovo tendine con modesta adesione o infiammazione cronica^{27,28}.

I buoni risultati degli studi su animale hanno spinto gli ortopedici a utilizzare lo *scaffold* per la riparazione della cuffia dei rotatori.

Slamberg et al.²⁹ hanno riportato, in uno studio retrospettivo, i risultati di 11 pazienti trattati con Restore per una lesione massiva della cuffia dei rotatori. Dopo 6 mesi dall'intervento, la risonanza magnetica aveva mostrato il fallimento della riparazione in 10 pazienti su 11.

Iannotti et al.³⁰ hanno impiantato in aperto la membrana Restore in 15 pazienti con lesione a due tendini della cuffia dei rotatori (infraspinato e sorpaspinato) e hanno confrontato i risultati radiografici e clinici con un gruppo di controllo ad un anno dall'intervento. Gli autori hanno riscontrato che il tasso di guarigione nel gruppo di controllo era significativamente più alto del 7% (*odds ratio* = 1,07; *p-value* = 0,07) rispetto al gruppo trattato con Restore. Il punteggio clinico (*PENN Shoulder Score*) era di 91 punti nel gruppo di controllo, 83 punti nel gruppo trattato con Restore (*p-value* = 0,04).

Questo studio ha evidenziato che la procedura di riparazione della lesione massiva della cuffia dei rotatori con Restore, non migliora il tasso di guarigione e l'*outcome* clinico ad un anno dall'intervento lasciando intravedere un trend sfavorevole dei risultati clinici. Inoltre, l'uso di Restore si associava ad una reazione infiammatoria riscontrata in tre pazienti impiantati.

Altri autori³¹ hanno riportato di reazioni infiammatorie in pazienti trattati con submucosa porcina. Zheng et al.³²

hanno misurato l'efficacia e la sicurezza della membrana e hanno osservato che essa non era completamente acellulare, ma, conteneva tracce di DNA porcino. Una possibile reazione infiammatoria è quindi attribuibile alla presenza degli elementi porcini.

GraftJacket

È un tessuto biologico che deriva dal derma umano e contiene la maggior parte degli elementi biologici del derma come il collagene di tipo I, III, IV, VII, elastina, proteoglicani, laminina, tenacina, fattori di crescita (bFGF) e canali vascolari.

In uno studio retrospettivo, Dopirak et al.³³ hanno osservato buoni risultati clinici in 16 pazienti trattati con la matrice derivante dal derma per lesione massiva della cuffia dei rotatori. L'analisi radiografica, aveva evidenziato il fallimento della riparazione in soli 3 pazienti che tuttavia erano soddisfatti per la riduzione del dolore rispetto al livello preoperatorio e riferivano come disturbo solo una riduzione di forza sopra la testa.

Burkhead et al.³⁴ hanno condotto uno studio prospettico su 17 pazienti con lesione massiva di cuffia operati in aperto e impiantati con GraftJacket. Questo studio ha dimostrato la capacità della membrana di migliorare l'*outcome* clinico (UCLA Score, Range of Motion, Dolore) rispetto ai valori preoperatori. Inoltre, nessun'infezione, risposta infiammatoria, o altra complicazione era stata riscontrata nei pazienti confermando la sicurezza della matrice. L'interpretazione di questi risultati sull'uso della membrana proveniente da derma nella riparazione della cuffia dei rotatori è però limitata dalla mancanza di un gruppo di controllo e da valutazione RMN a distanza.

Un recentissimo studio retrospettivo³⁵ riporta i risultati preliminari di una coorte di 16 pazienti con lesione massiva, retratta e immobile della cuffia dei rotatori trattati in artroscopia con GraftJacket. Lo spessore medio delle matrici impiantate da un unico chirurgo che ha eseguito tutti gli interventi è stata di 1,02 mm. I risultati clinici del follow-up finale (media: 26,8 mesi) hanno evidenziato la capacità della membrana impiantata artroscopicamente di migliorare l'*outcome* clinico rispetto ai valori preoperatori. I punteggi finali delle valutazioni Constant e UCLA sono stati di 84 e 30,4, rispettivamente, significativamente più alti (p -value = 0,0001) dei valori preoperatori (53,8 e 18,4).

Le valutazioni con risonanza magnetica a 3 e 12 mesi dopo l'intervento hanno mostrato il fallimento della riparazione

in 3 pazienti senza tuttavia richiedere la revisione dell'impianto. I pazienti sono infatti stati soddisfatti del risultato clinico raggiunto (eccetto per la mancanza di forza sopra la testa) così come della riduzione del dolore post trattamento. Nei pazienti trattati non si è osservata alcuna complicazione quale, infezione o rigetto del materiale impiantato. Questo studio ha evidenziato la possibilità di impiantare artroscopicamente GraftJacket con tecnica dedicata, in sicurezza, nelle lesioni di cuffia irreparabili, migliorando il risultato clinico e la soddisfazione dei pazienti.

L'interpretazione di questi risultati sull'uso della membrana proveniente da derma nella riparazione della cuffia dei rotatori è però limitata dalla mancanza di un gruppo di controllo, da un *bias* di selezione dei pazienti e da valutazione RMN a distanza.

In fine, in uno studio *in vitro*, Fini et al.³⁶ hanno confrontato, il comportamento di una cultura di tenociti su due membrane collagenose: matrice proveniente dalla submucosa porcina del piccolo intestino *versus* matrice proveniente dal derma umano.

Essi hanno misurato la proliferazione cellulare, la produzione delle proteine della matrice, le citochine proinfiammatorie e i fattori di crescita. Entrambi gli *scaffolds* supportavano la crescita cellulare e la produzione delle proteine collagenose e non collagenose. Tuttavia il derma umano ha presentato caratteristiche più appropriate rispetto alla matrice porcina per i maggiori valori di proliferazione cellulare, fibronectina e interleuchina 6. Lo stesso comportamento è stato osservato nelle culture dei tenociti isolati da soggetti trattati *in vivo* con glucocorticoidi.

In conclusione, GraftJacket presenta caratteristiche più appropriate per il trattamento delle lesioni della cuffia dei rotatori.

Tuttavia, sono necessarie nuove ricerche per determinare lo spessore ottimale della membrana da impiantare, e la tecnica chirurgica più idonea per fissare il *graft* al tendine nativo. È infine da chiarire la correlazione tra età del paziente e presenza di cellule pluripotenti di origine midollare, essendo queste ultime necessarie al ripopolamento cellulare dello *scaffold*, così come i fattori di crescita.

LE BMP

Introduzione

Le proteine morfogenetiche (*Bone Morphogenetic Proteins* [BMP]), sono una famiglia di proteine che agi-

scono come fattore di crescita osteogenetico. Sono numerose e possono essere estratte dall'osso corticale³⁷.

Le BMP sono state rinvenute nella borsa sub-acromiale di spalle con lendinosi della cuffia dei rotatori. La loro presenza è stata associata a processi di degenerazione con trasformazione del tessuto tendineo in osso-cartilagine³⁸. Pertanto ad esse non viene imputato un chiaro ruolo rigenerativo nelle lesioni tendinee.

L'applicazione nei tendini è stata sporadica e sono state sinora solo utilizzate in studi animali. L'impiego delle BMP, in particolare BMP 2-7, è avvenuto al fine di migliorare la giunzione tendine-osso che riveste aspetto critico³⁹.

Studi clinici

Come già evidenziato questi fattori di crescita sono stati utilizzati su animali. L'utilizzo di BMP 2-7 ha mostrato di aumentare la formazione di neo-osso e cartilagine all'interfaccia tendine-osso degli animali trattati, così come ha mostrato un carico di rottura più elevato.

LE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI (MSC)

Introduzione

Le cellule staminali rappresentano un'affascinante potenzialità nella rigenerazione tissutale. La possibilità di facile raccolta dal midollo osseo e la seguente espansione in laboratorio ne permettono l'utilizzo per ora, solo su animale, negli esperimenti sulla rigenerazione tendinea. L'espansione in laboratorio avviene in media in 2 giorni⁴⁰. L'amplificazione delle MSC in laboratorio è grandemente aumentata dai fattori di crescita di origine piastrinica⁴¹. È pertanto ipotizzabile che le i fattori di crescita piastrinici utilizzabili nell'umano migliorino le caratteristiche tissutali a causa di un effetto secondario sulle MSC.

Studi clinici

Come già evidenziato questi fattori di crescita sono stati utilizzati su animali.

Dopo un iniziale entusiasmo dato dai risultati di uno studio sui ratti⁴² che mostrava una guarigione migliore all'interfaccia del flessore lungo dopo inserimento in un tunnel sul calcagno, abbiamo assistito ai deludenti dati di un recente studio di Gulotta⁴⁰. Nello studio appena menzionato, in un modello animale di riparazione della cuffia dei rotatori, non si riportava nessuna differenza rispetto al gruppo controllo riguardo: organizzazione delle fibre

collagene, formazione di neocartilagine, rigidità, qualità biomeccaniche.

Pertanto l'utilizzo di MSC necessita di notevoli approfondimenti in laboratorio su animale, prima di passare all'utilizzo clinico.

CONCLUSIONI

L'approccio biologico rappresenta attualmente un campo di ricerca ed innovazione crescente nella chirurgia riparativa della cuffia dei rotatori.

In questa dettagliata review gli autori hanno posto attenzione all'analisi sistematica della letteratura esistente così come hanno mostrato i risultati dei lavori da loro svolti in prima persona.

Da quanto riportato è possibile trarre alcune conclusioni. Gesti associati quali l'acromioplastica (e dunque la cruentazione ossea vicino al tessuto tendineo da riparare) hanno dimostrato di poter favorire la liberazione di fattori di crescita autologhi. È pertanto opportuno ridiscutere l'effettivo ambito di applicazione di questa metodica in aggiunta alla riparazione della cuffia dei rotatori. Ovviamente sono attesi nuovi studi al fine di chiarire i risultati preliminari da noi mostrati.

Per quel che riguarda l'utilizzo di fattori di crescita autologhi da centrifugazione e degli *scaffolds* la letteratura mondiale è scarna di lavori prospettici, controllati e randomizzati. Pertanto non è opportuno trarre conclusioni tali da estendere le metodiche descritte alla gran parte dei casi trattati giornalmente nelle nostre strutture. Da rammentare inoltre la necessità di informare correttamente i pazienti oggetto di applicazione di queste biotecnologie che a oggi il campo è da definirsi ancora "sperimentale". Al momento è possibile affermare che i fattori di crescita autologhi di derivazione piastrinica sono "sicuri" e che l'evidenza scientifica supporta il loro utilizzo come "acceleratori" di guarigione. È finora dimostrato infatti che nella riparazione della cuffia dei rotatori questi non migliorino in modo rilevante la "qualità" del tessuto riparato.

Per quel che riguarda gli *scaffolds*, infine, l'evidenza scientifica pone accento sugli effetti avversi nell'utilizzo della submucosa porcina. Gli *scaffolds* di provenienza umana, quali quelli derivati dal derma, hanno mostrato risultati preliminari promettenti. Sono attesi con interesse ulteriori studi tra cui quelli commissionati dall'FDA americana.

Infine l'utilizzo delle proteine morfogenetiche (BMP 2-7) così come delle cellule staminali mesenchimali nella rigenerazione tissutale tendinea è da ritenersi solo a scopo puramente "sperimentale", su animali, e ne viene sconsigliato l'uso sull'umano sino all'ottenimento di maggiori evidenze scientifiche.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Butler DL, Juncosa-Melvin N, Boivin GP, et al. *Functional tissue engineering for tendon repair: a multidisciplinary strategy using mesenchymal stem cells, bioscaffolds, and mechanical stimulation*. J Orthop Res 2008;26:1-9.
- 2 Rotini R, Fini M, Giavaresi G, et al. *New perspectives in rotator cuff tendon regeneration: review of tissue engineered therapies*. Chir Organi Mov 2008;91:87-92.
- 3 Molloy T, Wang Y, Murrell G. *The roles of growth factors in tendon and ligament healing*. Sports Med 2003;33:381-94.
- 4 Chan BP, Chan KM, Maffulli N, et al. *Effect of basic fibroblast growth factor. An in vitro study of tendon healing*. Clin Orthop Relat Res 1997;342:239-47.
- 5 Chang J, Thunder R, Most D, et al. *Studies in flexor tendon wound healing: neutralizing antibody to TGF-beta1 increases postoperative range of motion*. Plast Reconstr Surg 2000;105:148-55.
- 6 Yoshikawa Y, Abrahamsson SO. *Dose-related cellular effects of platelet-derived growth factor-BB differ in various types of rabbit tendons in vitro*. Acta Orthop Scand 2001;72:287-92.
- 7 Lynch SE, Colvin RB, Antoniadis HN. *Growth factors in wound healing. Single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds*. J Clin Invest 1989;84:640-6.
- 8 Hildebrand KA, Woo SL, Smith DW, et al. *The effects of platelet-derived growth factor-BB on healing of the rabbit medial collateral ligament. An in vivo study*. Am J Sports Med 1998;26:549-54.
- 9 Letson AK, Dahners LE. *The effect of combinations of growth factors on ligament healing*. Clin Orthop Relat Res 1994;308:207-12.
- 10 Sciore P, Boykiw R, Hart DA. *Semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of mRNA for growth factors and growth factor receptors from normal and healing rabbit medial collateral ligament tissue*. J Orthop Res 1998;16:429-37.
- 11 Tsuzaki M, Brigman BE, Yamamoto J, et al. *Insulin-like growth factor-I is expressed by avian flexor tendon cells*. J Orthop Res 2000;18:546-56.
- 12 Kurtz CA, Loebig TG, Anderson DD, et al. *Insulin-like growth factor I accelerates functional recovery from Achilles tendon injury in a rat model*. Am J Sports Med 1999;27:363-9.
- 13 Folkman J, Klagsbrun M. *Angiogenic factors*. Science 1987;23:442-7.
- 14 Chan BP, Fu S, Qin L, et al. *Effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on early stages of tendon healing: a rat patellar tendon model*. Acta Orthop Scand 2000;71:513-8.
- 15 Kobayashi D, Kurosaka M, Yoshiya S, et al. *Effect of basic fibroblast growth factor on the healing of defects in the canine anterior cruciate ligament*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 1997;5:189-94.
- 16 Slater M, Patava J, Kingham K, et al. *Involvement of platelets in stimulating osteogenic activity*. J Orthop Res 1995;13:655-63.
- 17 James SL, Ali K, Pocock C, et al. *Ultrasound guided dry needling and autologous blood injection for patellar tendinosis*. Br J Sports Med 2007;41:518-21.
- 18 Connell DA, Ali KE, Ahmad M, et al. *Ultrasound-guided autologous blood injection for tennis elbow*. Skeletal Radiol 2006;35:371-7.
- 19 Mishra A, Pavelko T. *Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma*. Am J Sports Med 2006;34:1774-8.
- 20 Sánchez M, Anitua E, Azofra J, et al. *Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices*. Am J Sports Med 2007;35:245-51.
- 21 Neer CS II. *Anterior acromioplasty for the chronic impingement syndrome in the shoulder: a preliminary report*. J Bone Joint Surg 1972;54A:41-50.
- 22 Neer CS II. *Impingement joint lesions*. Clin Orthop 1983;173:70-7.
- 23 Bigliani L, Morrison DV, April EW. *The morphology of the acromion and its relationship to rotator cuff tears*. Orthop Trans 1986;10:216.
- 24 Sampson TG, Nisbet JK, Glick JM. *Precision acromioplasty in arthroscopic subacromial decompression of the shoulder*. Arthroscopy 1991;7:301-7.
- 25 Derwin KA, Baker AR, Spragg RK, et al. *Commercial extracellular matrix scaffolds for rotator cuff tendon repair. Biomechanical, biochemical, and cellular properties*. J Bone Joint Surg 2006;88A:2665-72.
- 26 Aurora A, McCarron J, Iannotti JP, et al. *Commercially available extracellular matrix materials for rotator cuff repairs: state of the art and future trends*. J Shoulder Elbow Surg 2007;16(Suppl.5):S171-8.
- 27 Badylak SF, Tullius R, Kokini K, et al. *The use of xenogeneic small intestinal submucosa as a biomaterial for Achilles tendon repair in a dog model*. J Biomed Mater Res 1995;29:977-85.
- 28 DeJardin LM, Arnoczky SP, Ewers BJ, et al. *Tissue-engineered rotator cuff tendon using porcine small intestine submucosa. Histologic and mechanical evaluation in dogs*. Am J Sports Med 2001;29:175-84.
- 29 Sclamberg SG, Tibone JE, Itamura JM, et al. *Six-month magnetic resonance imaging follow-up of large and massive rotator cuff repairs reinforced with porcine small intestinal submucosa*. J Shoulder Elbow Surg 2004;13:538-41.
- 30 Iannotti JP, Codsì MJ, Kwon YW, et al. *Porcine small intestine submucosa augmentation of surgical repair of chronic two-tendon rotator cuff tears. A randomized, controlled trial*. J Bone Joint Surg 2006;88A:1238-44.
- 31 Malcarney HL, Bonar F, Murrell GA. *Early inflammatory reaction after rotator cuff repair with a porcine small intestine submucosal implant: a report of 4 cases*. Am J Sports Med 2005;33:907-11.

- ³² Zheng MH, Chen J, Kirilak Y, et al. *Porcine small intestine submucosa (SIS) is not an acellular collagenous matrix and contains porcine DNA: possible implications in human implantation.* J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2005;73:61-7.
- ³³ Dopirak R, Bond JL, Synder SJ. *Arthroscopic total rotator cuff replacement with an acellular human dermal allograft matrix.* Int J Shoulder Surg 2007;1:7-15.
- ³⁴ Burkhart SS, Nottage WM, Ogilvie-Harris DJ, et al. *Partial repair of irreparable rotator cuff tears.* Arthroscopy 1994;10:363-70.
- ³⁵ Bond JL, Dopirak RM, Higgins J, et al. *Arthroscopic replacement of massive, irreparable rotator cuff tears using a GraftJacket allograft: technique and preliminary results.* Arthroscopy 2008;24:403-9.
- ³⁶ Fini M, Torricelli P, Giavaresi G, et al. *In vitro study comparing two collagenous membranes in view of their clinical application for rotator cuff tendon regeneration.* J Orthop Res 2007;25:98-107.
- ³⁷ Rodeo SA, Potter HG, Kawamura S, et al. *Biologic augmentation of rotator cuff tendon healing using a mixture of osteo-inductive growth factors: an experimental study in sheep.* J Bone Joint Surg 2007;89A:2485-97.
- ³⁸ Neuwirth J, Fuhrmann RA, Veit A, et al. *Expression of bioactive bone morphogenetic proteins in the subacromial bursa of patients with chronic degeneration of the rotator cuff.* Arthritis Res Ther 2006;8:R92.
- ³⁹ Kovacevic D, Rodeo SA. *Biological augmentation of rotator cuff tendon repair.* Clin Orthop Relat Res 2008;466:622-33.
- ⁴⁰ Gulotta LV, Kovacevic D, Ehteshami JR, et al. *Application of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rotator cuff repair model.* Am J Sports Med 2009;37:2126-33.
- ⁴¹ Mishra A, Tummala P, King A, et al. *Buffered platelet-rich plasma enhances mesenchymal stem cell proliferation and chondrogenic differentiation.* Tissue Eng Part C Methods 2009;15:431-5.
- ⁴² Ouyang HW, Goh JC, Lee EH. *Use of bone marrow stromal cells for tendon graft-to-bone healing: histological and immunohistochemical studies in a rabbit model.* Am J Sports Med 2004;32:321-7.

Aspetti medico-legali dei prodotti di medicina rigenerativa e consenso informato

Regulatory aspects of regenerative medicine products and informed consent

E.M. Brach del Prever*

D.M. Donati**

S. Fiorentino***

E. Macri****

RIASSUNTO

I prodotti di medicina rigenerativa con effetto terapeutico utilizzabili nella clinica e nella ricerca dall'Ortopedico sono molti; il loro uso è regolamentato da direttive Europee e leggi e linee guida nazionali. La conoscenza delle basi giuridiche potrà aiutare l'ortopedico non solo nella pratica quotidiana per assicurare al paziente il trattamento corretto e l'informazione adeguata, ma anche per sviluppare nuove ricerche. Sono esaminati ed analizzati i seguenti prodotti di medicina rigenerativa: tessuti umani muscolo-scheletrici autologhi ed omologhi (o "di banca"), tessuti derivati dalla processazione di osso di banca come la *Demineralized Bone Matrix* (DBM) e tessuti "speciali" o "tecnologici", tessuti eterologhi animali, biomateriali e sostanze naturali o chimiche di sintesi, fattori di crescita umani autologhi o omologhi derivati dalle piastrine del sangue periferico, specialità medicinali e dispositivi medici a base di *Bone Morphogenetic Proteins* ricombinanti umane (rhBMP) e fattori di crescita derivati dalle piastrine umane associati a supporti, cellule umane autologhe sottoposte a "manipolazione minima" ed utilizzate per la stessa funzione, cellule autologhe o omologhe, associate e non a biomateriale, e sottoposte a manipolazione rilevante (Ingegneria Tissutale). Il testo è basato sulla legislazione in atto.

Parole chiave: medicina rigenerativa, legislazione, classificazione, cellule staminali mesenchimali, prodotti ingegneria tissutale

SUMMARY

The regenerative medicine products for clinical use and research in orthopaedics and traumatology are numerous; their use is regulated by European directives and National laws and Guidelines. The key regulatory questions may help Orthopaedic Surgeons not only in their clinical work to assure to the patient the correct treatment and the adequate information, but also in developing innovative academic research. The following products are discussed: autologous and homologous musculoskeletal tissue (also known as "bank tissue"); homologous processed tissues such as Demineralized Bone Matrix (DBM) and other technological products; heterologous tissues; biomaterials and natural or chemical products; autologous and homologous platelet growth factors; medical drugs and devices with recombinant human Bone Morphogenetic Proteins and platelet growth factors associated to different biomaterials; autologous mesenchymal stem cells; new human tissue engineered products. The analysis is based on documentary regulatory materials.

Key words: regenerative medicine, regulation; classification; mesenchymal stem cells; human tissue engineered products

* Dipartimento di Traumatologia, Ortopedia e Medicina del Lavoro, Università degli Studi di Torino – AO CTO/Maria Adelaide di Torino.

** Clinica Ortopedica e Traumatologica II, Laboratorio di Patologia Ortopedica e Rigenerazione Tissutale Osteoarticolare, Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna.

*** Studio Legale Fiorentino, Verona.

**** Studio Legale Casalnuovo & Associati, Consulente Legale S.I.O.T.

Indirizzo per la corrispondenza:
Prof. E.M. Brach del Prever,
Dipartimento di Traumatologia,
Ortopedia e Medicina del Lavoro,
Università degli Studi di Torino,
AO CTO/Maria Adelaide di Torino,
Via Zuretti 29, 10126 Torino.
Tel. +39 011 6933500
Fax +39 011 6963662
E-mail elena.brach@unito.it

I prodotti di medicina rigenerativa con effetto terapeutico utilizzabili dall'ortopedico sono molti; tutti hanno risvolti giuridici e regolatori che devono essere conosciuti e seguiti. In base a questi, il consenso informato assume una valenza particolare. Data la complessità dell'argomento, la prima parte del testo riguarda i soli aspetti medico-legali, la seconda parte il consenso informato.

PARTE 1. GLI ASPETTI MEDICO-LEGALI

Per facilitare la consultazione ed evidenziarne meglio gli aspetti giuridici, nel testo esaminiamo i prodotti di medicina rigenerativa uno per uno, anche se nella comune pratica clinica molti sono associati.

Il testo è impostato in modo da mantenere sempre lo stesso schema:

- Classificazione del “prodotto” di medicina rigenerativa dal punto di vista normativo e regolatorio (per es. medicinale, dispositivo medico, tessuto umano ecc.). Non sono stati richiamati, neppure come esempio, i nomi commerciali per non indurre interpretazioni erronee di carattere autorizzativo.
- Definizione di “terapia clinicamente e scientificamente consolidata” oppure di “terapia sperimentale” adottando la definizione dell'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) utilizzata nella determinazione 21 giugno 2007 (rettificata con successiva determinazione 6 agosto 2007) “Individuazione degli impieghi di medicinali per terapia cellulare somatica considerati clinicamente e scientificamente consolidati”. In particolare: “In seguito alla mancanza del riconoscimento come prodotto medicinale, molte procedure con cellule somatiche viventi sono state sviluppate in assenza di studi preclinici e clinici strutturati. Pertanto una lista di queste tipologie può essere effettuata solo sulla base di pubblicazioni scientifiche e dell'analisi dei prodotti correlati presenti sul mercato. Vengono considerati consolidati le terapie presenti in letteratura da almeno 2 anni”. Ovviamente, se la terapia è sperimentale, deve seguire tutte le relative norme. Si noti, inoltre, che “terapia consolidata” non è sinonimo di “terapia efficace”; in molti casi, infatti, sono auspicabili studi prospettici con adeguati metodi di studio sperimentali e statistici che valutino l'efficacia e l'efficienza dei prodotti e delle procedure con i criteri dell'EBM, anche di fronte ai costi notevoli di cui l'ortopedico deve tenere conto. Precisiamo che la determinazione AIFA (che trova il proprio fondamento

normativo in una normativa di secondo grado, ovvero nel decreto Ministero Salute 5 dicembre 2006) viene applicata in via analogica in quanto costituisce il primo autorevole tentativo, in Italia, di porre un discrimine fra terapie consolidate e sperimentali, basando la differenza su elementi recepibili dal mondo scientifico. Il principio, che costituisce all'evidenza una specie di norma “in bianco”, risulta di interessante applicazione analogica in quei casi, come ad esempio nell'ambito dei prodotti biotecnologici, in cui manca un provvedimento formale di un'autorità costituita che “transiti” il prodotto da una categoria all'altra.

- Le norme e linee guida che ne regolano l'uso per il trattamento di un paziente (si noti che l'uso a scopo di ricerca *in vitro* e nell'animale segue altre norme, non riportate in questo testo).
- Una breve descrizione e uso terapeutico utile per comprendere le implicazioni giuridiche (la discussione estesa ed esauriente è rimandata ai capitoli specifici precedenti di questa monografia).
- Le regole e i risvolti giuridici che l'ortopedico deve conoscere ed applicare.

Una precisazione: sempre l'ortopedico deve attenersi alle indicazioni e modalità di utilizzo riportati sulle schede tecniche e nei foglietti illustrativi di ciascun prodotto. Sono possibili prescrizioni e utilizzi *off label* (per quanto concerne dispositivi medici e/o farmaci) a condizione di seguire le regole relative (legge 94/1998). In particolare:

- Con il termine di *off label* si intende l'utilizzo di un prodotto con una indicazione, dosaggio o via di somministrazione o per una tipologia di pazienti non indicati nella scheda tecnica e nel foglio illustrativo. Si tratta cioè della prescrizione di un prodotto al di fuori della sua indicazione ufficiale e quindi non autorizzata. L'impiego *off label* non significa che il prodotto sia utilizzato in modo inappropriato, ma che la tollerabilità, sicurezza ed efficacia non sono sostenuti da dati sufficienti per quel particolare uso.
- Se si intende prescrivere ed utilizzare un prodotto *off label* bisogna: valutare l'opportunità di coinvolgere preventivamente il comitato etico competente, attivare la procedura di informazione del paziente, documentare l'assenza di altri prodotti utili e regolarmente registrati per quella indicazione terapeutica, disporre di conoscenza (letteratura scientifica) che documenti la razionalità clinica, l'appropriatezza e la sicurezza del prodotto nel contesto clinico in cui lo si vuole utilizzare.

- È inoltre indispensabile che la scelta terapeutica da parte del medico non sia una prassi, ma venga al contrario circoscritta a ipotesi specifiche ed individualmente definite, sulla base di criteri dettati dal beneficio che ci si potrebbe presumibilmente attendere per il paziente.

L'inosservanza di queste regole espone l'ortopedico alle seguenti responsabilità:

- Responsabilità di tipo disciplinare e/o deontologico: qualora la prescrizione e/o l'utilizzo *off label* sia illegittima e non motivata, il comma 5 dell'art. 3 della legge 94/1998 stabilisce che "la violazione, da parte del medico delle disposizioni del presente articolo è oggetto del procedimento disciplinare ai sensi del decreto legislativo del Capo provvisorio dello Stato 13 settembre 1946, n. 233". La violazione sarà in particolare relativa all'art. 12 del Codice Deontologico.
- Responsabilità di tipo civile: qualora al paziente derivi un danno alla salute per effetto della somministrazione e/o utilizzo di un farmaco *off label*, sorgerà in capo al medico una responsabilità di tipo civile, con conseguente obbligo risarcitorio. Nello specifico caso di utilizzo di farmaci *off label* possiamo affermare che la peculiare terapia farmacologica non autorizzata sembra avere le stesse connotazioni giuridiche delle *attività pericolose* di cui all'art. 2050 c.c., con la conseguenza che il medico, oltre a provare l'esistenza di un consenso informato avrà l'onere supplementare di provare in sede processuale di "avere adottato tutte le misure idonee ad evitare il danno".
- Responsabilità di tipo penale: interessante, sotto questo profilo, distinguere, tra l'imputabilità del fatto a titolo di dolo o a titolo di colpa. Il dolo eventuale può sicuramente ravvisarsi nell'ipotesi, probabilmente residuale, del medico che intenda valutare l'efficacia del farmaco in via sperimentale, senza osservare i principi etici e gli adempimenti previsti dalla normativa a tutela del paziente, potendosi in tal caso supporre esistenti i reati di lesioni volontarie o di omicidio volontario. Il reato potrà invece configurarsi come colposo (per inosservanza di leggi, regolamenti, ordini o discipline ex art. 43 c.p.), qualora l'inosservanza dei precetti di legge si sostanzi in scelte cliniche rivelatesi di fatto inadeguate, determinando un diverso grado di colpa in proporzione alla gravità dell'infrazione normativa.

I prodotti di medicina rigenerativa, qui esaminati dal punto di vista giuridico, sono i seguenti:

1. Tessuti umani muscoloscheletrici autologhi a scopo terapeutico per la rigenerazione, riparazione e sostitu-

zione di difetti tissutali, per esempio innesti di osso, tendini e nervi autologhi.

2. Tessuti umani muscoloscheletrici omologhi di banca a scopo terapeutico per la rigenerazione, riparazione e sostituzione di difetti tissutali, per esempio innesti di osso, tendini e nervi omologhi.
3. Tessuti derivati dalla processazione dell'osso umano di banca, per esempio la *Demineralized Bone Matrix* (DBM), le paste d'osso, tessuti "speciali" o "tecnologici" per la rigenerazione e riparazione del tessuto.
4. Osso e altri tessuti animali, definiti tessuti eterologhi, per la sostituzione di difetti tissutali.
5. Biomateriali e sostanze naturali o chimiche di sintesi, utilizzati quali sostituti dell'osso o supporto per la rigenerazione e riparazione tissutale.
6. Fattori di crescita umani autologhi o omologhi derivati dalle piastrine del sangue periferico per la rigenerazione e riparazione dei tessuti, per esempio del tessuto osseo o tendineo.
7. Specialità medicinali e dispositivi medici a base di *Bone Morphogenetic Proteins* ricombinanti umane (rhBMP) e fattori di crescita derivati dalle piastrine umane associati a supporti, per esempio collagene, trifosfato di calcio ecc. per la rigenerazione e riparazione del tessuto osseo e di altri tessuti
8. Cellule umane autologhe sottoposte a "manipolazione minima" e utilizzate per la stessa funzione, per esempio le cellule staminali mesenchimali autologhe presenti nel midollo osseo, prelevate dall'ala iliaca e impiantate per la rigenerazione e riparazione del tessuto osseo (omofunzione). NB: rientrano in questo gruppo anche le cellule staminali omologhe del sangue periferico per il trapianto di midollo, ma sono di pertinenza del servizio ematologico, non dell'ortopedia e pertanto non verranno trattate. Le cellule autologhe minimamente manipolate possono essere utilizzate da sole o associate a "supporti o matrici" quali gli innesti di osso umano autologo o di banca, osso eterologo oppure biomateriali e sostanze chimiche (vedi paragrafi 1, 2, 3, 4, 5).
9. Cellule autologhe o omologhe, associate e non a biomateriale, e sottoposte a manipolazione rilevante (ingegneria tissutale). Sono cellule o tessuti umani o animali, o entrambi (le cellule possono essere vitali o non vitali), sottoposti a "manipolazione rilevante", per esempio i condrociti umani espansi in laboratorio e reimpiantati su matrici o sostanze chimiche (supporti di collagene, acido ialuronico ecc.).

1. Tessuti umani muscoloscheletrici autologhi (osso, tendini, nervi ecc.)

Sono tessuti umani prelevati e innestati nello stesso paziente (il donatore ed il ricevente sono la stessa persona) per la rigenerazione, riparazione o sostituzione di un tessuto. È una terapia consolidata. L'ortopedico conosce benissimo l'innesto di osso autologo per colmare difetti ossei, ma anche l'innesto di nervi periferici autologhi, l'innesto di cute autologa ecc.

Dal punto di vista giuridico bisogna fare due distinzioni:

- Se l'osso autologo è prelevato ed impiantato nella stessa seduta operatoria, sia che venga usato da solo sia che venga impiantato come "supporto o matrice" per le cellule staminali mesenchimali autologhe (vedi paragrafo 8), non vi sono specifiche norme giuridiche che ne regolino l'uso. La procedura è considerata un atto terapeutico normale: l'ortopedico deve seguire le regole di buona pratica clinica, informare il paziente e ottenerne il consenso informato; se l'osso è usato come "supporto", l'ortopedico deve valutare se la tecnica di medicina rigenerativa usata è sperimentale o consolidata e comportarsi di conseguenza.
- Se l'osso autologo è prelevato e poi conservato per essere impiantato in un secondo intervento (per esempio, in caso di anca displasia, si conserva la testa del femore asportata a destra per eseguire in un secondo intervento l'innesto al cotile di sinistra), allora l'osso autologo deve seguire tutte le regole dell'osso di banca (vedi paragrafo seguente). In particolare, dall'entrata in vigore delle linee guida nazionali approvate dalla Conferenza Stato-Regioni nel 2002, non è più possibile conservare l'osso autologo in un congelatore dell'ospedale, ma l'osso deve sempre essere preparato ed inviato presso la banca dei tessuti muscoloscheletrici (BTM) della propria Regione, o presso la banca competente, seguendo le procedure della banca stessa. Sarà la banca che lo distribuirà all'ospedale per quel paziente al momento dell'impianto, certificandone l'idoneità e la rintracciabilità. Dal punto di vista giuridico, il chirurgo deve informare il paziente, ottenerne il consenso informato, e seguire tutte le procedure della banca, compreso l'invio della scheda di avvenuto impianto autologo.

2. Tessuti umani muscoloscheletrici omologhi di banca (osso, tendini, nervi, menisco ecc.)

Sono tessuti umani donati a scopo di trapianto e seguono la legislazione dei tessuti di banca. È una terapia conso-

lidata. La donazione, selezione del donatore, prelievo, certificazione, processazione, conservazione, distribuzione e follow-up sono normati dalle direttive, leggi e linee guida sui trapianti di organi, tessuti e cellule umane (allegato 1).

Il tessuto omologo è donato da un donatore vivente o da un donatore cadavere: il donatore ed il ricevente non sono la stessa persona, ma sono della stessa specie umana. Per brevità, spesso l'osso omologo è definito semplicemente "osso di banca". Oltre all'osso, la banca preleva (dal solo donatore cadavere) anche altri tessuti muscoloscheletrici, quali i menischi del ginocchio, alcuni legamenti, la fascia lata ecc.

Dal punto di vista giuridico l'ortopedico deve sapere che:

- In Italia i tessuti di banca non sono né farmaci né dispositivi medici e pertanto non possono essere acquistati con una gara d'appalto né essere acquistati dal proprio ospedale o dalla casa di cura privata o convenzionata con provvedimento di unicità ecc.
- Indipendentemente dal tipo, tutti questi tessuti ed i loro derivati (vedi paragrafo 3) seguono la legislazione dei tessuti di banca e dei trapianti (allegato 1).

Ciò premesso, le regole attuali sono le seguenti:

- *Che cosa deve fare l'ortopedico per avere uno o più tessuti di banca:* il chirurgo utilizzatore deve sempre richiedere questi tessuti, indipendentemente dal tipo (osso, tendini, DBM, pasta ecc.) alla BTM di riferimento. Nelle regioni italiane in cui vi è una BTM, il chirurgo richiede alla propria BTM il tessuto di cui necessita. Se nel territorio regionale non è presente una banca identificata dall'autorità regionale e questa non ha stipulato una convenzione con una banca di altra Regione, il chirurgo (l'ospedale) è tenuto a trasmettere la richiesta al Centro Regionale Trapianti (CRT), questi autorizzerà la richiesta ad una banca italiana (ricordiamo che tutte le regioni italiane hanno un CRT che lavora in rete con gli altri CRT, e che tutti sono coordinati dal Centro Nazionale Trapianti, CNT - www.trapianti.ministerosalute.it). Si noti che, come risulta dalle linee guida nazionali approvate dalla Conferenza Stato-Regioni nel 2002, è possibile sia la richiesta "nominale", cioè per un paziente specifico, sia la richiesta "per scorta". La direttiva europea del 2004 non prevede più la possibilità per scorta. Alla data di stesura di questo documento, per questo particolare aspetto, il CNT ha dato disposizione di attenersi alle LG del 2002.

- *Come risponde la BTM alla richiesta di tessuto avanzata dall'ortopedico:* la BTM provvederà a fornire il tessuto attenendosi ai criteri di distribuzione e alle priorità descritte nelle proprie procedure operative. Se la banca non dispone del tessuto richiesto, provvederà a ricercarlo presso le altre banche sul territorio nazionale. Se nessuna banca italiana ha il tessuto richiesto, la banca interpellata propone un prodotto alternativo di analoga efficacia e sicurezza: se il prodotto alternativo soddisfa le esigenze del chirurgo, il tessuto viene distribuito; se il prodotto alternativo non soddisfa le esigenze, il chirurgo deve darne immediata notifica alla BTM con documentata motivazione. A questo punto la BTM provvederà a distribuire il tessuto della banca estera convenzionata con le procedure specifiche. Si noti che, in accordo alle “Linee guida ad uso delle banche di tessuto muscoloscheletrico per la valutazione dell’appropriatezza della richiesta di osso umano, dei suoi derivati e sostituti” e del “Protocollo ed algoritmo da utilizzare per le richieste di tessuto muscoloscheletrico”, entrambi del 2003 a cura del CNT, la BTM indicherà sempre un parere sull’appropriatezza della richiesta, in base ai livelli di evidenza scientifica di efficacia. Ricordiamo che nel caso di utilizzo di prodotti liofilizzati, non essendovi la necessità di una preventiva verifica di compatibilità tra donatore e ricevente (in tal senso si è espresso il Ministero della Salute con nota al Centro Nazionale Trapianti del 12 ottobre 2005), la scelta del medico risulta meramente tecnica, basata sulla letteratura scientifica basata sull’evidenza e la fiducia che lo stesso ha in ordine alle caratteristiche di sicurezza e qualità dei tessuti stessi. Nel caso di una richiesta di specifico tessuto effettuata da un medico, allo stesso non può essere imposto, ma semplicemente proposto il tessuto alternativo, come precisano le norme di riferimento emanate dallo stesso Centro Nazionale Trapianti. Infatti l’art. 32 Costituzione riconosce al paziente un diritto alla Salute che nel momento del bisogno il paziente “delega” al chirurgo. Quest’ultimo, oltre che responsabile dell’intervento (operazione), è altresì l’unico soggetto cui la legge attribuisce il diritto/dovere di effettuare per il paziente le migliori scelte terapeutiche o, in ogni caso, quelle che il chirurgo ritenga essere le più opportune in base ai dati clinici e scientifici documentati: da ciò consegue che non esiste alcun diritto/potere, in capo ad enti che svolgono per altro attività di servizio per il chirurgo, di imporre allo stesso scelte terapeutiche diverse da quelle che il medico considera le più opportune per il paziente. Una diversa interpretazione comporterebbe la necessità di riconoscere anche in capo a chi ha imposto il tipo di tessuto la responsabilità in ordine all’esito dell’intervento, ipotesi del tutto impraticabile nell’ambito dell’attuale ordinamento giuridico italiano.
- *Che cosa deve fare l'ortopedico prima di utilizzare il tessuto di banca:* il chirurgo deve informare il paziente e ottenerne il consenso informato. Si noti che, poiché il tessuto può essere stato prelevato da donatore vivente o cadavere, pur non essendovi differenze giuridiche, è bene specificare la provenienza del tessuto donato quando si informa il ricevente per eventuali problemi etici personali, quali per esempio alcune credenze religiose. Il consenso informato deve essere conservato in cartella clinica.
- *Che cosa deve fare l'ortopedico quando impianta il tessuto di banca:* deve seguire tutte le procedure della BTM, in particolare controllare che la confezione ottenuta sia integra, controllare che i dati del tessuto riportati nelle schede di accompagnamento corrispondano a quelli sulla confezione del tessuto, seguire le procedure di preparazione indicate dalla BTM (per esempio quando e come eseguire il controllo batteriologico, come e per quanto tempo reidratare il tessuto osseo liofilizzato ecc.).
- *Che cosa deve fare l'ortopedico subito dopo il termine dell'intervento chirurgico, mentre è ancora nel blocco operatorio:* deve completare le schede di avvenuto impianto, conservarne una copia nella cartella clinica e provvedere a inviarne una alla BTM, seguendo le procedure della BTM stessa. In questo modo è assicurata la “rintracciabilità” completa del tessuto. Anche se il tessuto proviene da una BTM o ditta straniera, la procedura è sempre la stessa: il chirurgo deve inviare alla BTM, che gli ha distribuito il tessuto, le schede di avvenuto impianto; sarà la BTM che provvederà alla rintracciabilità presso la banca straniera.
- *Che cosa deve fare l'ortopedico nelle settimane, mesi, anni seguenti:* seguendo le procedure della BTM, deve segnalare alla BTM stessa tempestivamente ogni evento avverso e/o reazione avversa (schematicamente, per “evento avverso” si intende tutto ciò che succede nel percorso dalla selezione del donatore fino all’impianto e che riguarda il tessuto: per esempio, è un “evento avverso” avere trovato in sala operatoria una confezione aperta, non integra; per “reazione avversa” si intende tutto ciò che succede al paziente e che sia correlato

all'innesto del tessuto, per esempio lo sviluppo di una infezione trasmessa dal donatore).

- Alcune BTM richiedono al chirurgo utilizzatore anche un "follow-up clinico", cioè l'invio periodico di schede in cui l'ortopedico dichiara quale sia la situazione clinica del paziente-ricevente. Questo controllo è particolarmente rilevante per valutare l'efficacia della procedura e si avvale della buona regola clinica di seguire il paziente nel tempo.

3. Tessuti derivati dalla processazione dell'osso umano di banca, per esempio la *Demineralized Bone Matrix (DBM)*, le *paste d'osso*, tessuti "speciali" o tecnologici

Sono tessuti derivati dalla processazione dell'osso umano donato a scopo di trapianto e seguono la legislazione dei tessuti di banca. Sono di solito terapie consolidate. Sono molteplici, per esempio la *Demineralised Bone Matrix (DBM)*, le paste d'osso, e vari tessuti tecnologici. Sono utilizzati per facilitare e accelerare la rigenerazione, riparazione e sostituzione di difetti ossei. Ovviamente, data la maggior quantità di osso da cadavere rispetto all'osso da donatore vivente, la maggior parte di questi prodotti è ottenuta da donatore cadavere. I processi di lavorazione per ottenere questi derivati sono eseguiti presso stabilimenti ad alta tecnologia, che possono essere o all'interno della banca o in un servizio esterno.

In Italia, questi tessuti seguono la legislazione dei tessuti di banca, pertanto le procedure di richiesta, consenso informato, innesto e follow-up sono le stesse dei tessuti ossei di banca (vedi paragrafo 2).

4. L'osso e altri tessuti animali (eterologhi o xenotrapianti)

Sono tessuti animali registrati come "dispositivi medici" ("medical devices"), di cui seguono la legge. Sono di solito terapie consolidate. L'osso eterologo è osso prelevato da un animale (di solito osso equino, bovino, suino ecc.), processato e distribuito con il fine di colmare un difetto osseo e/o servire da trama (*scaffold*) per la rigenerazione ossea. Oltre all'osso, da un animale si possono prelevare e processare altri tessuti, come membrane, collagene ecc. La legislazione è quella dei dispositivi medici, come le protesi, mezzi di sintesi ecc. In Europa devono avere il marchio CE, che assicura che la ditta produttrice ha seguito procedure controllate e ispirate a rigorosi criteri di sicurezza (direttive 93/42/CE e 2003/32/CE, quest'ultima applicabile ai prodotti derivanti da bovini, ovini,

caprini, alci, gatti, visoni, per scongiurare il pericolo di trasmissione all'uomo di BSE).

Dal punto di vista giuridico, è importante che l'ortopedico sappia che:

- non sono farmaci, e pertanto non seguono la legislazione sui medicinali;
- non sono tessuti umani donati a fine di trapianto, e pertanto non seguono la legislazione dei trapianti di organi e tessuti umani;
- sono registrati in Italia come dispositivi medici, devono avere un Codice Nazionale Dispositivi (CND) e un numero di repertorio, devono avere il marchio CE, seguono la legislazione dei dispositivi medici. In particolare, possono essere acquistati con gara d'appalto ed è necessaria la "dispositivo-vigilanza";
- il loro uso a scopo terapeutico richiede che l'ortopedico segua le regole della buona pratica clinica: il medico sceglie il prodotto in quanto effettivamente efficace per il paziente; il medico informa il paziente e ne ottiene il consenso informato; come per tutti i dispositivi medici, l'ortopedico deve seguire le indicazioni e la tecnica di utilizzo indicate nel foglietto illustrativo che accompagna il materiale;
- se l'ortopedico richiede un consiglio alla BTM su quale sia il miglior prodotto da utilizzare in un caso, in particolare se sia meglio utilizzare osso eterologo, oppure un sostituto di sintesi, o ancora un tessuto di banca, la BTM risponde utilizzando le linee guida ad uso delle BTM emesse dal Centro Nazionale Trapianti nel 2003. In particolare, la BTM si basa sulle seguenti considerazioni: "l'idoneità di un tipo di innesto osseo, derivato o sostituto osseo in un certo contesto clinico, non è necessariamente predittivo della sua validità in un'altra sede anatomica. Per *efficacia* si intende la capacità del tessuto di corrispondere alle necessità del paziente, secondo una valutazione delle sue caratteristiche, della sua composizione, del meccanismo d'azione e della documentazione scientifica a supporto della sua utilizzazione, con ricerche sull'uomo e nella sede dell'intervento chirurgico. L'efficacia di un tessuto deve essere documentata attraverso ricerche scientifiche, dalle quali si possa ricavare un'evidenza. L'evidenza, infine, può essere misurata attraverso l'identificazione di livelli. L'efficacia clinica evidente aiuta il chirurgo nella sua libera decisione, finalizzata alla cura del paziente secondo le modalità più efficaci".

5. I biomateriali e le sostanze naturali e chimiche di sintesi

Sono solitamente registrati come “dispositivi medici” (“medical devices”) e ne seguono la legislazione. Sono di solito terapie consolidate; tuttavia possono esservi prodotti sperimentali nuovi per composizione o applicazione oppure possono essere associati a cellule e/o fattori di crescita. Sono biomateriali di origine naturale, per esempio i coralli, alcune ceramiche, il legno ecc.; sono biomateriali chimici di sintesi per esempio alcuni composti di idrossiapatite, tricalcio fosfato ecc.

Dal punto di vista giuridico, seguono la legislazione dei dispositivi medici. Devono avere il marchio CE, che assicura che la ditta produttrice ha seguito procedure controllate e ispirate a rigorosi criteri di sicurezza (direttive 93/42/CE, 2003/32/CE). Devono avere il Codice Nazionale Dispositivi (CND) e un numero di repertorio. Per la loro richiesta e uso valgono le stesse regole dell’osso animale (vedi paragrafo 4).

6. I fattori di crescita autologhi ed omologhi

Sono prodotti derivati dalla processazione del sangue periferico e seguono la legislazione del sangue e degli emoderivati. In particolare, la preparazione e l’uso di questi prodotti, indipendentemente dal tipo, è sempre e solo di pertinenza del servizio trasfusionale (legge 21 ottobre 2005, n 219, “Nuova disciplina delle attività trasfusionali e della produzione nazionale degli emoderivati”, in G.U. n. 51 del 27 ottobre 2005, in particolare art. 5, 21 e 22, comma 1). Sono di solito terapie consolidate.

I fattori di crescita sono ottenuti dalle piastrine del sangue periferico opportunamente processate. Si noti che le piastrine, pur essendo cellule, non sono inserite nel paragrafo sulle cellule autologhe (vedi paragrafo 8) perché non vengono usate come tali a scopo terapeutico, ma devono essere “degranulate” per liberarne i fattori di crescita, di cui si sfrutta l’effetto rigenerativo.

I fattori di crescita sono autologhi se le piastrine sono prelevate dallo stesso paziente (donatore e ricevente sono la stessa persona) oppure omologhi se le piastrine sono donate da un paziente per un altro paziente.

I fattori di crescita piastrinici sono presenti schematicamente in tre preparati di concentrati piastrinici, tutti ottenuti da un prelievo di sangue periferico, che differiscono tra loro per il mezzo in cui le piastrine sono sospese:

- plasma ricco di piastrine (PRP): il mezzo è il plasma;
- plasma ricco di piastrine e fibrina (PRF): il mezzo è un plasma ricco di fibrina;

- concentrato piastrinico in crioprecipitato (anche detto gel di piastrine): il mezzo è il crioprecipitato.

I tre preparati, definiti anche con la sigla PRGF (plasma ricco di “growth factors”), si differenziano per le seguenti caratteristiche:

- hanno differenti concentrazione sia di piastrine che delle molecole che innescano la degranolazione delle piastrine stesse, e pertanto hanno effetti terapeutici differenti;
- il PRP ed il PRF sono ottenuti in pochi minuti in sala operatoria o in ambulatorio con appositi macchinari (centrifughe e separatori cellulari) con marchio CE, che procedono alla processazione del sangue periferico;
- il gel di piastrine deve essere preparato presso il servizio trasfusionale nei giorni-settimane precedenti l’impianto nel paziente, e in sala operatoria o in ambulatorio l’ortopedico procede solo all’attivazione finale.

L’ortopedico, per prelevare, preparare ed utilizzare i fattori di crescita piastrinici, siano essi da PRP, o PRF o da gel di piastrine, deve sempre avvalersi della collaborazione del proprio servizio trasfusionale.

Premesso ciò, schematicamente l’ortopedico ha a disposizione tre procedure per ottenere e utilizzare nel paziente i fattori di crescita piastrinici al fine di rigenerare e riparare un tessuto:

- Previo accordo o convenzione con il servizio trasfusionale competente per territorio, che controlla e autorizza la procedura, in sala operatoria o in ambulatorio a seconda dell’uso dei fattori di crescita, esegue un prelievo di sangue periferico, concentra le piastrine in esso presenti con apposito macchinario con marchio CE (debitamente autorizzato dalla propria Direzione Sanitaria), procede all’attivazione delle piastrine stesse, determinando la liberazione dei fattori di crescita, ed impianta i fattori di crescita così ottenuti; in tutte le fasi l’ortopedico deve seguire le indicazioni del costruttore del macchinario utilizzato.
- Richiede al proprio centro trasfusionale la preparazione di una quantità definita di gel di piastrine in base alla pianificazione terapeutica (per es. la quantità varia per favorire la rigenerazione di un tendine o di un grande difetto osseo). Il medico trasfusionista, dopo valutazione del paziente, procede al prelievo di adeguata quantità di sangue periferico (se sono previsti salassi preoperatori per il buon uso del sangue, esegue il prelievo contemporaneamente al salasso stesso) e alla preparazione del concentrato di piastrine

in quantità nota. Il giorno stabilito, in sala operatoria o in ambulatorio, l'ortopedico procede alla preparazione finale del gel di piastrine seguendo le indicazioni del centro trasfusionale e lo impianta.

- In casi selezionati, per esempio in alcuni pazienti con certi tipi di tumori, soprattutto se in età pediatrica, il medico trasfusionista, valutato il paziente e sentito il parere del chirurgo, può avvalersi di concentrati piastrinici donati da un altro donatore (piastrine omologhe). Eccezion fatta per il donatore, tutta la procedura è eguale alla precedente.

In tutti e tre i casi, dal punto di vista giuridico l'ortopedico deve:

- seguire le regole chirurgiche di buona pratica clinica, compresa la valutazione dell'efficacia terapeutica del prodotto nel singolo caso alla luce della letteratura e dell'EBM;
- concordare con il proprio centro trasfusionale la procedura e ottenerne il controllo e autorizzazione;
- informare adeguatamente il paziente e ottenerne il consenso informato;
- attenersi alle indicazioni o del costruttore del macchinario con marchio CE (nel caso di preparazione autonoma) o del centro trasfusionale (nel caso di utilizzo di gel di piastrine preparato dal centro trasfusionale); in entrambi i casi, segnalare tempestivamente alla propria Direzione Sanitaria e, attraverso questa il Ministero (e la ditta costruttrice), gli eventuali eventi e/o reazioni avversi;
- avvalersi di dispositivi (provette) autorizzati per l'utilizzo clinico sull'uomo e non invece dispositivi autorizzati solo per la diagnostica *in vitro* (IVD).

7. Specialità medicinali e dispositivi medici a base di Bone Morphogenetic Proteins ricombinanti umane (rhBMP) e fattori di crescita derivati dalle piastrine umane associati a supporti

Sono specialità medicinali e dispositivi medici, che consistono di molecole ricombinant human Bone Morphogenetic Protein (rhBMP) oppure di fattori di crescita piastrinici umani, associati a supporti o matrici specifici che ne facilitano l'impianto e l'azione; sono utilizzati con il fine di rigenerare e riparare un tessuto. Sono di solito terapie consolidate. La registrazione come farmaco o dispositivo medico dipende da molti fattori; dal punto di vista giuridico, è importante che l'ortopedico sappia quale sia la classificazione del prodotto utilizzato. In commercio, per esempio, vi sono: rhBMP-7 associata a collagene, la quale

è registrata come "specialità medicinale"; la rhBMP-2 associata a collagene e cage oppure fattori di crescita piastrinici associati a supporto di calcio trifosfato β , i quali sono registrati come "dispositivi medici".

Dal punto di vista giuridico, è importante che l'ortopedico sappia che:

- la legislazione che ne regola la fabbricazione e l'uso è differente se sono specialità medicinali o dispositivi medici;
- in entrambi i casi, possono essere acquistati con una gara d'appalto o in esclusiva ecc. (NB: per redigere questo testo, gli autori hanno controllato diversi prodotti, e in molti casi hanno avuto difficoltà a capire se erano stati registrati come farmaci o dispositivi medici; si consiglia pertanto, al momento del capitolato/acquisto, di richiedere alla ditta fornitrice l'esatta classificazione. Si noti che i medicinali devono avere un codice di Autorizzazione all'Immissione in Commercio, codice AIC, e devono essere reperibili nell'annuario dei medicinali registrati pubblicato a cura del Ministero della Salute);
- devono essere usati seguendo le normali regole della buona pratica clinica;
- devono essere prescritti ed utilizzati seguendo l'indicazione della ditta fornitrice;
- come per tutti i dispositivi medici e le specialità medicinali, l'ortopedico ne deve valutare l'efficacia potenziale nel singolo caso, ovvero il medico deve prescrivere il farmaco in quanto efficace per il paziente;
- il paziente deve essere informato e dare il consenso;
- l'ortopedico deve eseguire la "farmaco vigilanza" e la "dispositivo vigilanza".

8. Le cellule autologhe sottoposte a manipolazione minima e utilizzate per la stessa funzione

Sono cellule autologhe sottoposte a manipolazione minima (cioè centrifugazione, separazione, concentrazione o filtrazione) e destinate ad essere utilizzate per la stessa/le stesse funzioni. Sono di solito terapie consolidate.

Allo stato attuale dell'arte, nella maggior parte dei casi, si tratta di cellule staminali mesenchimali presenti nel midollo osseo dell'ala iliaca, prelevate dall'ala iliaca e impiantate per la rigenerazione e riparazione del tessuto osseo, cioè con la stessa funzione, o "omofunzione".

Se le cellule sono sottoposte a una "manipolazione rilevante" con la finalità di rigenerare, riparare o sostituire, e/o non sono destinate a essere utilizzate per la stessa/le stesse funzioni nel beneficiario e nel donatore, indipen-

dentemente se autologhe o omologhe, sono considerate di “ingegneria tissutale” (vedi paragrafo 9).

La manipolazione minima delle cellule autologhe è eseguita in sala operatoria utilizzando macchinari dotati di marcatura CE, presenti in commercio. Questi macchinari centrifugano l’aspirato midollare, separano le cellule staminali mesenchimali dalle altre cellule staminali periferiche emopoietiche presenti in grande misura nel midollo osseo, ed infine concentrano e/o filtrano le cellule staminali mesenchimali utili per la rigenerazione ossea. In base alla richiesta del chirurgo, basata sul tipo di difetto da riparare e/o il tipo di rigenerazione da stimolare, le cellule staminali mesenchimali possono essere utilizzate da sole oppure fatte depositare o filtrare su un “supporto” o “matrice” che può essere: osso autologo, osso di banca, osso animale, biomateriale o sostanza chimica.

Dal punto di vista giuridico, le caratteristiche precipue dell’utilizzo di cellule staminali mesenchimali autologhe sono le seguenti:

- si tratta di cellule staminali adulte; il prelievo dell’aspirato midollare dal paziente e la manipolazione minima avvengono durante l’intervento chirurgico;
- l’impianto avviene nello stesso paziente (donatore e ricevente sono la stessa persona: cellule autologhe);
- le cellule manipolate minimamente sono destinate ad essere utilizzate per la stessa funzione (omofunzione);

Da queste considerazioni è chiaro che:

- non si tratta di cellule staminali umane embrionali, il cui uso pone problemi etici e giuridici complessi (legge 19/2/2004 n. 40);
- non si tratta di cellule staminali umane periferiche ematopoietiche, indipendentemente se autologhe o omologhe, utilizzate per esempio per il trapianto di midollo osseo nei pazienti con tumore, la cui manipolazione e uso è di pertinenza dei servizi trasfusionali;
- non si tratta di cellule donate da un paziente a un altro paziente (cellule omologhe);
- non si tratta di cellule sottoposte a una rilevante manipolazione con la finalità di rigenerare, riparare o sostituire un tessuto né si tratta di cellule, indipendentemente se autologhe o omologhe, utilizzate per una funzione essenziale diversa nel beneficiario e nel donatore: in questi casi sono “cellule di ingegneria tissutale”, normate dal regolamento (CE) 1394/2007 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 13/11/07 sui medicinali per terapie avanzate recante modifica alla direttiva 2001/83/CE e del regolamento (CE) 726/2004 (vedi paragrafo 9);

- non si tratta di cellule di ingegneria tissutale utilizzate con dispositivi medici impiantabili attivi: questo composto è definito “medicinale per terapie avanzate” ed è normato dalla stesso regolamento delle cellule di ingegneria tissutale (vedi paragrafo 9);
- vengono utilizzate intraoperatoriamente, ovvero in un unico tempo chirurgico, pertanto non hanno necessità di essere sottoposte a banking (con la conseguenza che non si applica la direttiva 2004/23/CE recepita in Italia con d.lgs. 191/2007).

Schematicamente, dal punto di vista giuridico, l’ortopedico che procede all’utilizzo di queste cellule staminali mesenchimali autologhe minimamente manipolate deve:

- se necessario, attivare la procedura di autorizzazione del comitato etico;
- valutare l’efficacia della tecnica e del macchinario scelto e prescrivere la procedura in quanto efficace per il paziente;
- concordare con la Direzione Sanitaria la modalità di uso del macchinario con marchio CE;
- informare il paziente e ottenerne il consenso informato;
- seguire le indicazioni e le procedure di utilizzo scritte nel foglietto illustrativo che accompagna il macchinario.

Vi è ancora da sottolineare un problema tecnico-scientifico critico: la manipolazione minima consiste solo nel concentrare o filtrare le cellule autologhe staminali mesenchimali esistenti nel prelievo di midollo osseo, di conseguenza l’ortopedico non ha nessun dato per sapere quante cellule staminali sta impiantando e quindi quale sarà l’effetto rigenerativo. Considerata l’estrema variabilità individuale, questo aspetto deve essere tenuto presente nella scelta della strategia terapeutica. Sono auspicabili studi prospettici con adeguati metodi di studio sperimentali e statistici che ne valutino l’efficacia e l’efficienza con i criteri dell’EBM, anche di fronte ai costi notevoli.

9. Cellule autologhe o omologhe, associate e non a biomateriale, e sottoposte a manipolazione rilevante (ingegneria tissutale)

L’ingegneria tissutale ad uso umano è considerata una “terapia avanzata” insieme alla terapia genica ed alla terapia cellulare somatica. I prodotti di ingegneria tissutale ad uso umano sono considerati “medicinali per terapia avanzata”. Queste terapie sono normate dal regolamento (CE) 1394/2007 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 13/11/07 sui medicinali per terapie avanzate recante

modifica alla direttiva 2001/83/CE e del regolamento (CE) 726/2004.

Per “prodotto di ingegneria tessutale” si intende un prodotto che:

- contiene o consiste di cellule o tessuti prodotti dall’ingegneria cellulare o tessutale;
- è presentato come avente proprietà atte a rigenerare, riparare o sostituire un tessuto umano oppure viene utilizzato o somministrato ad esseri umani a tal fine.

Il prodotto può contenere cellule o tessuti di origine umana o animale, o entrambe. Le cellule o i tessuti possono essere vitali o non vitali. Il prodotto può contenere anche sostanze supplementari quali prodotti cellulari, biomolecole, biomateriali, sostanze chimiche, supporti o matrici.

Le cellule o i tessuti sono considerati di “ingegneria tessutale” se soddisfano almeno una delle seguenti condizioni:

- le cellule o i tessuti sono stati sottoposti ad una manipolazione rilevante così da ottenere caratteristiche biologiche, funzioni fisiologiche e proprietà strutturali pertinenti alla finalità di rigenerazione, riparazione o sostituzione;
- le cellule o i tessuti non sono destinati a essere utilizzati per la stessa/le stesse funzioni nel beneficiario e nel donatore;

Per “medicinali per terapie avanzate combinate” si intendono i medicinali che soddisfano le seguenti condizioni:

- devono contenere come parte integrante del prodotto uno o più dispositivi medici o dispositivi medici impiantabili attivi;
- la parte cellulare o tessutale deve contenere cellule o tessuti vitali;
- la parte cellulare o tessutale che contiene cellule e tessuti non vitali deve essere capace di agire sul corpo umano con un’azione che possa considerarsi primaria rispetto a quella dei dispositivi in questione.

La donazione, l’approvvigionamento, il controllo, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di cellule e tessuti umani sono regolamentati dalla direttiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio. Ove i medicinali per terapie avanzate contengano cellule o tessuti umani, la direttiva 2004/23/CE dovrebbe applicarsi unicamente per quanto riguarda la donazione, l’approvvigionamento e il controllo, in quanto gli altri aspetti sono contemplati nel regolamento (CE) 1394/2007 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 13/11/07 sui medicinali per terapie avanzate.

Ciò premesso, dal punto di vista giuridico, schematicamente è importante che l’ortopedico sappia che:

- i prodotti di ingegneria tessutale sono terapie avanzate;
- la loro produzione segue le norme farmaceutiche, in stabilimenti certificati e appositamente autorizzati dall’AIFA;
- se il medicinale per terapia avanzata contiene cellule o tessuti umani, alcuni aspetti sono regolamentati dalla legislazione sui trapianti di cellule e tessuti (la donazione, l’approvvigionamento e il controllo), e gli altri da quella sui medicinali per le terapie avanzate;
- alla data della stesura attuale, alcuni centri di alta specializzazione, in alcuni casi correlati alle BTM, stanno producendo in appositi laboratori certificati AIFA questi prodotti e medicinali;
- non vi sono linee guida nazionali né direttive nazionali che regolamentino le modalità con cui un chirurgo deve richiedere ed utilizzare questi prodotti e medicinali; nell’ambito della autonomia regionale, ciascuna Regione può emettere le proprie regole;
- l’uso di tessuti e cellule per applicazioni sull’uomo comporta un rischio di trasmissione di malattie e altri potenziali effetti avversi ai riceventi. Al fine di sorvegliare e ridurre tali effetti sono definite prescrizioni specifiche in materia di rintracciabilità e notifica di reazioni ed eventi avversi gravi.

PARTE 2. IL CONSENSO INFORMATO

La SIOT ha ampiamente affrontato il problema del consenso informato nel 2008; rimandando al documento SIOT la trattazione estesa dell’argomento, qui ricordiamo solo i due concetti fondamentali:

- il paziente può dare il proprio consenso informato solo se informato;
- l’informazione deve riguardare i seguenti elementi:
 - diagnosi o ipotesi diagnostica
 - trattamento proposto
 - modalità di esecuzione
 - potenziali benefici prognostici
 - risultati conseguibili (parziali e definitivi)
 - rischi connessi possibili e/o prevedibili, complicanze, effetti indesiderati
 - condizioni organiche che rendono più complesso l’intervento
 - rischi derivanti dalla mancata effettuazione della prestazione

- alternative terapeutiche
- necessità di eventuali trattamenti successivi
- terapie associate.

Per informare il paziente è indispensabile il colloquio personalizzato, al termine del quale il paziente dà il suo consenso. I passaggi fondamentali sono i seguenti: io, ortopedico, spiego e verifico che tu, paziente, abbia capito; tu, paziente, dichiari che ti è stato spiegato, hai capito e accetti quanto proposto. In questo percorso, le schede informative scritte sono un ottimo strumento che integra il colloquio e facilita l'informazione.

Nel caso delle tecniche di medicina rigenerativa, non è possibile prevedere un unico testo informativo, breve, di facile comprensione, che contenga tutte le possibilità di uso e tutte le variabili: le tecniche sono molte, complesse, talvolta ancora in fase sperimentale o di efficacia non valutata completamente.

Proponiamo due testi-base per informare il paziente, riportati rispettivamente nell'allegato 2 e 3:

- una scheda informativa sull'innesto di tessuti di banca (basata sul testo usato da molti anni dalla banca dei tessuti muscoloscheletrici della Regione Piemonte e Valle d'Aosta);
- una scheda informativa sull'uso delle altre tecniche di medicina rigenerativa.

Per facilitare la comprensione, seguendo le indicazioni degli esperti di comunicazione, i due testi sono stati redatti in forma di "domande e risposte".

Per informare il paziente, il chirurgo ortopedico potrà usare i testi tali e quali oppure preparare un proprio testo utilizzando solo la parte di interesse per le esigenze del singolo paziente (per esempio, se l'ortopedico usa solo i fattori di crescita delle piastrine, può prepararsi un testo focalizzato solo su questa tecnica).

Proponiamo infine uno schema-base di consenso utilizzabile per interventi in cui si applichino tecniche consolidate (non sperimentali): il testo è tratto da quanto già concordato dalla SIOT nel 2008, e deve essere compilato in tutte le parti (allegato 4). Ovviamente la firma del consenso sarà preceduta dall'informazione e, se si usano le schede informative scritte, dalla lettura e discussione delle stesse. Nei casi in cui la medicina rigenerativa sia parte del trattamento chirurgico, ma non l'unica tecnica utilizzata, l'informazione ed il consenso devono coprire l'intervento nell'insieme. Per esempio, l'uso di una o più tecniche di medicina rigenerativa in una pseudoartrosi di omero o in un reimpianto di protesi d'anca deve essere spiegato insieme a tutto l'intervento proposto; in particolare, l'obiettivo ed i limiti del trattamento (che cosa ci si aspetta), i rischi e le complicanze devono riguardare tutto l'intervento, non solo la tecnica specifica di medicina rigenerativa.

Questi testi non servono se l'intervento proposto è sperimentale e/o la tecnica utilizzata fa parte di uno studio sperimentale; in questo caso, l'ortopedico dovrà seguire quanto autorizzato dal Comitato Etico, anche per quanto riguarda il consenso informato.

ALLEGATO 1

Elenco delle direttive europee, leggi nazionali e linee guida nazionali che normano l'uso dei tessuti muscoloscheletrici di banca

- Legge n. 91 del 1° aprile 1999 "Disposizioni in materia di prelievi e di trapianti di organi e di tessuti".
- Direttiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio, del 31 marzo 2004 sulla "Definizione di norme di qualità e di sicurezza per la donazione, l'approvvigionamento, il controllo, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani" (Gazzetta Ufficiale n. 102 del 7 aprile 2004).
- Decreto legislativo 6 novembre 2007, n. 191 "Attuazione della direttiva 2004/23/CE sulla definizione delle norme di qualità e di sicurezza per la donazione, l'approvvigionamento, il controllo, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani" (Gazzetta Ufficiale n. 261 del 9 novembre 2007 - Suppl. Ordinario n. 228).
- Decreto legislativo 25 gennaio 2010, n. 16 "Attuazione delle direttive 2006/17/CE e 2006/86/CE, che attuano la direttiva 2004/23/CE per quanto riguarda le prescrizioni tecniche per la donazione, l'approvvigionamento e il controllo di tessuti e cellule umani, nonché per quanto riguarda le prescrizioni in tema di rintracciabilità, la notifica di reazioni ed eventi avversi gravi e determinate prescrizioni tecniche per la codifica, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani" (Gazzetta Ufficiale Serie Generale n. 40 del 18 febbraio 2010).

- Regolamento (CE) n. 1394/2007 del Parlamento Europeo e del Consiglio, 13 novembre 2007 sui medicinali per terapie avanzate recante modifica della direttiva 2001/83/CE e del regolamento (CE) n. 726/2004.
- Determinazione AIFA 21 giugno 2007 “Individuazione degli impieghi di medicinali per terapia cellulare somatica considerati clinicamente e scientificamente consolidati: pelle espansa *in vitro* - cartilagini artificiali per riparazioni articolari o per ricostruzione dopo traumi - prodotti antitumorali a base di cellule - prodotti per la rigenerazione di tessuti ossei - prodotti per la ricostruzione della cornea”.
- Determinazione 6 agosto 2007 “Rettifica della determinazione AIFA 21 giugno 2007. Individuazione degli impieghi di medicinali per terapia cellulare somatica considerati clinicamente e scientificamente consolidati”.
- Linee guida per il prelievo, la conservazione e l’utilizzo di tessuto muscoloscheletrico approvate dalla Conferenza Stato-Regioni il 21 marzo 2002.
- Linee guida per il prelievo, la processazione e la distribuzione di tessuti a scopo di trapianto; Centro Nazionale Trapianti, 19 giugno 2007.
- Linee guida a uso delle banche di tessuto muscoloscheletrico per la valutazione dell’appropriatezza della richiesta di osso umano, dei suoi derivati e sostituti. Gruppo di Lavoro: Fornasari P.M. (Coordinatore), Aprili G., Brach Del Prever E., Capanna R., Donati D., Farè M., Mancini I., Nanni Costa A., Paolin A.
- Protocollo e algoritmo da utilizzare per le richieste di tessuto muscoloscheletrico. Gruppo Di Lavoro: Fornasari P.M. (Coordinatore), Aprili G., Brach Del Prever E., Capanna R., Donati D., Farè M., Mancini I., Nanni Costa A., Paolin A.

ALLEGATO 2

Note informative sui tessuti muscoloscheletrici umani donati a fine di trapianto distribuiti dalla banca dei tessuti muscoloscheletrici (documento utilizzabile dagli ortopedici SIOT per informare il paziente ed ottenerne il consenso informato)

Le 10 domande più frequenti

1. Che cosa vuol dire “tessuti donati a fine di trapianto”?

Tutti noi, alla nostra morte, potremo donare i nostri organi e tessuti affinché persone malate, con organi e tessuti ormai non più funzionanti, possano beneficiarne. Gli organi prelevabili dopo la morte sono per esempio il cuore ed il fegato; i tessuti sono la cute, le cornee ed i tessuti muscoloscheletrici. Anche una persona in vita può donare alcuni tessuti: la donna dopo il parto può donare la placenta, utilizzabile per curare alcune malattie dell’occhio; tutti possiamo donare il nostro sangue e il midollo osseo; i pazienti che devono essere operati di protesi d’anca per un’artrosi o una frattura del femore possono donare la testa del femore, che viene asportata per permettere l’impianto della protesi. La donazione degli organi e dei tessuti a fine di trapianto è un atto volontario, gratuito, altruistico, civile, di grande solidarietà ed è normata da leggi nazionali ed europee.

Mentre tutti noi possiamo donare i nostri organi e tessuti a fine di trapianto, non tutti gli organi e tessuti donati possono essere prelevati e/o utilizzati; per esempio, se il donatore ha una malattia che potrebbe essere trasmessa al ricevente (AIDS, epatite B e C, infezioni, tumori ecc.) oppure se il tessuto non è di ottima qualità (per es. osso osteoporotico) non si procede al prelievo né alla conservazione e distribuzione.

In Italia il Centro Nazionale Trapianti (CNT) e i Centri Regionali Trapianti (CRT) hanno il compito di far sì che tutte le fasi, dalla donazione al trapianto, siano eseguite nel rispetto delle conoscenze scientifiche ed etiche, e della normativa vigente, per assicurare al donatore la possibilità di donare ed al ricevente di avere tessuti di ottima qualità e della massima sicurezza.

2. Che cosa è una banca dei tessuti muscoloscheletrici (BTM)?

La banca dei tessuti muscoloscheletrici, che d’ora in avanti chiameremo per brevità BTM dalle iniziali delle parole, è un ente pubblico che, insieme al proprio CRT e in coordinamento con il CNT, ha il compito e la responsabilità di selezionare il donatore, eseguire tutti gli esami sul donatore e sul tessuto donato che limitino al massimo i rischi di trasmissione di

malattie, certificare l' idoneità del donatore e del tessuto, se necessario lavorare il tessuto per renderlo del tipo e misura utili, conservarlo, distribuirlo e seguirne i risultati nel tempo (quest'ultima parte viene di solito definita con il termine inglese: "follow-up"). Tutte queste fasi (selezione, prelievo, processazione, certificazione, conservazione, distribuzione, follow-up) in Europa in genere, ed in Italia in particolare, sono regolamentate con leggi e con linee guida, continuamente aggiornate in base alle conoscenze scientifiche ed etiche.

L'ortopedico, che reputi necessario utilizzare tessuti di banca a fine di trapianto per curare un paziente, deve richiedere questo tessuto alla propria banca competente, cioè alla banca della sua Regione o, se non esiste nella Regione, a una delle BTM esistenti in Italia, identificata dalla Regione come competente. Per legge, non è possibile innestare tessuto osseo o altri tessuti di origine umana non distribuiti da una BTM Italiana.

3. Quali sono le BTM in Italia? Quale BTM certificherà e distribuirà il tessuto necessario per la mia cura?

In Italia, alla data di stesura di questa nota informativa (2010), vi sono sei BTM accreditate dal Ministero della Salute mediante ispezione periodica eseguita da esperti afferenti al Centro Nazionale Trapianti, come previsto da una direttiva Europea.

Seguendo il criterio geografico, dal nord al sud le BTM sono in: Piemonte (Torino), Lombardia (Milano), Veneto (Treviso-Verona), Emilia Romagna (Bologna), Toscana (Firenze), Lazio (Roma). Le Regioni che non hanno la banca, tramite il proprio Centro Regionale Trapianti, collaborano con una di queste BTM, che certificherà e distribuirà il tessuto necessario.

4. Quali sono i tessuti muscoloscheletrici donati a fine di trapianto?

I principali tessuti muscoloscheletrici donati a fine di trapianto sono l'osso, alcune fasce muscolari (per esempio la fascia lata), alcuni tendini (per esempio il tendine d'Achille), i menischi del ginocchio ecc.

I tessuti distribuiti dalla banca possono essere processati in tanti modi per renderli adatti a risolvere i tanti problemi biologici e meccanici di ciascun paziente. Per esempio l'osso può essere congelato (a -80°) e utilizzato dopo lo scongelamento, oppure può essere liofilizzato, può essere usato intero o in frammenti (detti "chips"), o sotto forma di "matrice ossea demineralizzata" (in inglese *Demineralised Bone Matrix* [DBM]), o ancora mischiato a prodotti speciali (detti in inglese "carrier", cioè "portatori") formando "pasta d'osso" ecc. I processi di lavorazione per ottenere questi derivati sono eseguiti presso stabilimenti ad alta tecnologia, che possono essere o all'interno della BTM o in un servizio esterno. Dopo l'innesto, l'osso di banca viene "riconosciuto" dal corpo del ricevente, che lo usa come una trama su cui deporre nuovo osso.

Quanto descritto per l'osso vale anche per tutti gli altri tessuti di banca, che sono conservati e processati in molti modi per rispondere meglio ai problemi di ciascun paziente.

5. Perché io ho bisogno di un tessuto osseo di banca?

Per capire meglio, vediamo come è fatto un osso sano: è formato all'esterno da osso "compatto" (anche definito "osso corticale") ed al centro da osso "spugnoso". Il termine "compatto" identifica l'aspetto privo di cavità dell'osso periferico, mentre il termine "spugnoso" identifica l'aspetto "a spugna" (o a nido d'api) formato da trabecole ossee che delimitano piccole cavità, ripiene di midollo osseo. Grazie a questa struttura complessa, ben visibile per esempio nelle radiografie, il nostro osso è resistente, leggero ed elastico. Alcune malattie sono capaci di riassorbire l'osso e di sostituirlo con tessuto "patologico", cioè "malato". Le radiografie fanno vedere bene questa "mancanza di osso", tanto che i medici sono abituati a parlare di "un buco nell'osso". Se avviene ciò, vi sono due problemi importanti da risolvere: curare la malattia che determina il riassorbimento dell'osso e ripristinare l'osso mancante, che altrimenti si romperebbe perché troppo indebolito. La cura di solito consiste nell'asportare "la malattia" (resecando il pezzo malato, oppure "grattando via" la parte malata – in gergo medico "curettage" – oppure...) e nel ricostruire la parte mancante con un innesto osseo (o trapianto).

6. L'osso che mi verrà innestato di chi è? Io posso essere "donatore" per me stesso?

L'osso è prelevato con un intervento chirurgico o direttamente da alcune ossa del paziente stesso oppure da un altro "donatore". Nel primo caso l'osso è definito *autologo* (cioè della "stessa persona"), è prelevato per esempio dall'osso del bacino

chiamato “ala iliaca” (da qui può essere asportato in piccole quantità senza che il bacino si rompa). Nel caso in cui l’osso sia prelevato da un’altra persona, l’osso è *omologo* (cioè della “stessa specie umana”). Per brevità l’osso omologo, poiché è distribuito da una BTM, è anche chiamato “osso di banca”. Vi sono due tipi di “donatore di osso di banca”: il donatore vivente ed il donatore cadavere. Come abbiamo già detto rispondendo alla domanda 1, il donatore vivente è di solito un paziente affetto da artrosi dell’anca o da frattura del femore, che dona la testa del femore. Il donatore cadavere è invece una persona deceduta, che ha donato i suoi organi e/o tessuti, tra cui il tessuto muscoloscheletrico, affinché alcuni pazienti possano usufruire del dono gratuito di tessuto in grande quantità. Come abbiamo anticipato nella risposta 1, mentre tutti possiamo dare la nostra disponibilità alla donazione, non tutti possiamo essere “donatori effettivi”, perché non tutti i donatori rispondono ai criteri di idoneità del donatore e del tessuto, definiti per legge e continuamente aggiornati in base alle scoperte scientifiche.

7. Quali sono i vantaggi e gli svantaggi dell’osso innestato prelevato dal paziente stesso (autologo) rispetto a quello di banca (omologo)?

L’osso autologo (che, come abbiamo detto, è prelevato dal paziente stesso) ha notevoli vantaggi, ma anche tanti svantaggi. Il vantaggio principale è che è del paziente stesso, quindi non vi è il rischio di trasmissione di malattie infettive da un altro donatore; inoltre, è facilmente riconosciuto e ricostruito dall’osso sano circostante. Gli svantaggi sono notevoli: la quantità di osso che può essere prelevata è molto limitata, perché ovviamente l’osso dove si esegue il prelievo non deve essere indebolito troppo, altrimenti si romperebbe; inoltre il prelievo è un intervento chirurgico vero e proprio, con il rischio di infezione della ferita, sanguinamento e dolore nella sede di prelievo per molte settimane.

Anche l’osso di banca ha vantaggi e svantaggi. I vantaggi principali sono:

- assenza del rischio di complicanze nella sede di prelievo;
- disponibilità di tessuto in quantità grandi grazie alle tante persone che hanno deciso di donare i propri organi e tessuti a fine di trapianto quando ne sia stata accertata la morte, per permettere che la vita di altri pazienti possa essere salvata (per esempio con il trapianto del cuore) o possa essere migliorata (per esempio, con un innesto di osso);
- disponibilità di osso e tessuti muscoloscheletrici di vari tipi e misure, perché la banca è in grado di eseguire tagli e lavorazioni particolari, e l’ortopedico ha la possibilità di scegliere il tipo migliore per ciascun paziente.

Uno svantaggio importante è la possibilità di trasferimento di patologie tumorali ed infettive dal donatore al ricevente (per esempio l’epatite, l’AIDS, la malattia della “mucca pazza”, o altre malattie infettive, anche non ancora conosciute e quindi non ancora cercate). La possibilità che vi sia trasmissione di malattie da osso di banca è molto bassa perché:

- la selezione del donatore è sempre molto severa;
- i criteri di selezione del donatore di tessuto muscoloscheletrico sono molto restrittivi: il tessuto di banca non è un “salva vita”, come sono invece il cuore ed il fegato, ma è un tessuto che “migliora la vita”, pertanto il donatore di osso deve rispondere a specifici requisiti di qualità e sicurezza;
- anche i criteri di selezione del tessuto donato sono molto restrittivi per assicurare la massima qualità;
- il tessuto prelevato viene conservato “in quarantena” per almeno alcune settimane per avere tutti i risultati degli esami eseguiti sul donatore e sul tessuto che ne accertino la validità e sicurezza.

Un altro svantaggio dell’osso di banca è che l’osso del ricevente ha una lieve difficoltà a “riconoscere” l’osso innestato ed a ricostruirlo, mentre ovviamente ha meno difficoltà a ricostruire l’osso autologo. Tuttavia, grazie ai trattamenti eseguiti in banca, il tessuto non subisce il “rigo” immunologico, come avviene per gli organi trapiantati, e non vi è necessità di nessuna terapia immunosoppressiva.

8. L’innesto di tessuto, indipendentemente se autologo o di banca, può avere altre complicanze?

Sì. Oltre alla possibilità di trasmissione di malattie dal donatore al ricevente (rischio ovviamente presente solo nel tessuto di banca), le principali complicanze, indipendentemente se il tessuto è autologo o omologo, sono: l’infezione postoperatoria, il riassorbimento dell’innesto per infezione oppure per la ripresa della malattia (per risolvere la quale il paziente è stato operato) oppure per problemi biomeccanici. Tutte queste complicanze provocano il riassorbimento dell’innesto in misura variabile, e ricompare il difetto del tessuto che si era cercato di curare. Vediamo, punto per punto, che cosa tutto ciò significa.

8.1. L'infezione postoperatoria è un rischio presente in tutti gli interventi chirurgici, indipendentemente dall'impianto di tessuti di banca; il rischio aumenta quando il paziente ha alcune malattie che diminuiscono le difese e favoriscono lo sviluppo dei batteri (per esempio: diabete, obesità, terapia cronica con cortisonici, stato nutrizionale insufficiente ecc.) e/o quando i tempi chirurgici sono lunghi (come spesso avviene quando si devono utilizzare i tessuti di banca per riparare un difetto). L'infezione provoca il riassorbimento del tessuto innestato e, talvolta, problemi generali (febbre, malessere ecc.) e locali (secrezione dalla ferita, arrossamento ecc.) con necessità di altre terapie anche chirurgiche.

8.2. Oltre che per un'infezione, il riassorbimento dell'innesto può avvenire perché la patologia, che era stata curata con il tessuto di banca, riprende lo sviluppo (per esempio, un tumore ricomincia a crescere).

8.3. Ancora, il riassorbimento dell'innesto può avvenire per "problemi biomeccanici": l'osso ricostruito non è in grado di sopportare il peso a cui è sottoposto, si riassorbe progressivamente e non si ricostruisce. Per capire questa ultima possibilità, è necessario sapere che, quando noi stiamo bene, cioè mangiamo in modo adeguato, respiriamo bene, ci muoviamo e facciamo sport e/o movimenti giusti, il nostro corpo rimaneggia continuamente l'osso, mantenendolo sempre elastico e resistente: ogni giorno noi riassorbiamo il nostro osso "vecchio" e lo sostituiamo con osso "nuovo". La qualità e quantità dei movimenti a cui lo sottoponiamo fanno sì che l'osso assuma la struttura giusta (per esempio diventi osso corticale e spugnoso) per svolgere la sua funzione. Quando invece non stiamo bene, ci mancano i nutrienti, oppure non usiamo le nostre ossa perché non ci muoviamo, oppure ci muoviamo troppo rispetto a come è fatto il nostro osso ed a come lo nutriamo, il nostro corpo poco per volta riassorbe l'osso e non lo sostituisce più con osso nuovo. Di solito definiamo questa possibilità come causata da "problemi biomeccanici", per sottolinearne l'aspetto biologico e meccanico. È possibile che anche il tessuto di banca sia riassorbito per questi problemi biomeccanici.

9. Esistono alternative all'innesto di osso, ed in genere agli altri tessuti, indipendentemente se autologhi o omologhi?

Tutti gli studi scientifici dimostrano che la migliore soluzione al riempimento di una cavità ossea/sostituzione di un osso è l'innesto di altro osso. I risultati migliori sono con l'innesto autologo, ma ovviamente questo non sempre è possibile o conveniente, pertanto sempre più spesso si usa l'osso di banca. Tuttavia, in molti paesi mancano le banche dei tessuti ed i donatori sono pochi; pertanto la ricerca continua a cercare altre soluzioni. Le alternative all'innesto osseo sono al momento attuale di due tipi: l'osso prelevato da animale, definito anche osso *eterologo* (cioè di una specie animale diversa dalla specie umana) ed i sostituti dell'osso di tipo sintetico (anche detto "osso di sintesi" oppure "cemento osseo"). L'osso di origine animale (di solito bovino, equino, suino) e l'"osso di sintesi" (esempio idrossiapatite, fosfato tricalcico ecc.) non seguono la legislazione dei tessuti di banca, sono certificati dalla ditta commerciale che li produce e non dalla BTM; a differenza dei tessuti di banca, l'uso di questi prodotti non è regolamentato da specifiche norme anche giuridiche, ma solo dalle regole della buona pratica clinica. Lo svantaggio principale è che l'efficacia clinica è inferiore al trapianto autologo e omologo, ed è correlata alla sede di innesto ed alla situazione locale (non tutte le ossa né tutte le malattie traggono beneficio da questa terapia). Ovviamente, come sempre, è indispensabile che l'ortopedico, che decide che questo tipo di prodotto è il migliore per un paziente, lo informi e ne ottenga il consenso, esattamente come avviene per i tessuti di banca, spiegando le ragioni della scelta terapeutica e le alternative.

Anche la sostituzione o riparazione degli altri tessuti di banca, per esempio i tendini o i menischi, può essere eseguita con prodotti alternativi, per esempio di sintesi chimica (tendini e menischi artificiali ecc.), oppure con i tessuti del paziente se possibile (per esempio, il prelievo di una parte di tendine ecc.). La ricerca scientifica continua a cercare soluzioni che siano sempre migliori per il paziente.

10. Come posso, io paziente, collaborare per fare in modo che l'intervento di innesto di tessuto abbia successo?

Come in tutti gli interventi chirurgici, il successo dell'innesto di tessuto, indipendentemente se autologo o di banca, dipende da tantissimi fattori, alcuni determinati dalla malattia, altri dal paziente, altri ancora dalla pratica clinica. L'ortopedico, insieme a tutta l'equipe medica e paramedica, ma anche con tutto il personale della struttura ove avviene la cura (ospedale, ambulatorio ecc.), può agire facendo sì che tutte le regole della buona pratica clinica siano applicate in ciascun paziente. Da parte sua, è importante che il paziente capisca che seguire esattamente le prescrizioni dell'or-

topedico significa diminuire il rischio di complicanze. Per favorire l'integrazione del tessuto innestato, come abbiamo già anticipato nella risposta n. 8, ricordiamo che tutti i nostri tessuti si rimodellano continuamente durante la nostra giornata: è pertanto importante muoversi, respirare bene (attenzione al fumo!) e mangiare in modo equilibrato per quantità e qualità (carboidrati, proteine, zuccheri, grassi, vitamine e sali minerali). I controlli medici periodici servono per identificare e risolvere gli eventuali problemi e/o complicanze che possono insorgere dopo l'intervento, indipendentemente dall'uso di tessuti di banca. Pertanto è buona pratica clinica che periodicamente il paziente si rechi alla visita di controllo e segua le prescrizioni mediche. Nel caso di trapianto di tessuti di banca, alcune banche richiedono anche i risultati dell'intervento nei mesi e anni seguenti all'impianto per migliorare il servizio ai pazienti. In questo caso, è indispensabile che il paziente collabori recandosi ai controlli periodici e, nel caso cambi residenza, avverta i nuovi ortopedici curanti per continuare i controlli ed inviare i risultati alla BTM.

ALLEGATO 3

*Note informative sulle tecniche di medicina rigenerativa più usate in ortopedia e traumatologia
(documento utilizzabile dagli ortopedici SIOT per informare il paziente e ottenerne il consenso informato)*

Le 10 domande più frequenti

1. Che cosa è la medicina rigenerativa?

È una branca della medicina, che usa cellule o farmaci o biomateriali per accelerare la riparazione di tessuti umani, cioè delle parti del nostro corpo che possono essere state danneggiate da una malattia o da un trauma e devono essere riparate o sostituite. Tre esempi:

- un tendine rotto o danneggiato può riparare con il riposo oppure, se la rottura è grave, con il riposo associato all'intervento chirurgico di sutura delle parti rotte. La riparazione, quando avviene, dà luogo ad una cicatrice, che raramente ha la stessa forza meccanica del tendine sano. Per accelerare i tempi di guarigione e per avere una guarigione di migliore qualità, a giudizio del chirurgo, si possono utilizzare prodotti di medicina rigenerativa in modo che il paziente possa non avere più male e possa tornare ad utilizzare il tendine riparato;
- un osso fratturato che non consolida bene o impiega molto tempo per farlo, oppure un "buco nell'osso" causato da un trauma o un tumore o altre malattie, possono essere trattati con tecniche di medicina rigenerativa capaci di fare riparare e rigenerare l'osso stesso, ridando al paziente la funzione dell'arto;
- una lesione della cartilagine del ginocchio, a causa di un trauma, può avere bisogno di essere riparata con cellule o altre soluzioni di medicina rigenerativa per togliere al paziente il dolore e migliorare la funzione del ginocchio.

2. Quali sono le tecniche di medicina rigenerativa più usate in ortopedia e traumatologia?

Le tecniche di medicina rigenerativa sono molte e si basano schematicamente sull'uso dei tre costituenti principali, usati da soli o in associazione: un "supporto" (in inglese "scaffold") formato da osso o biomateriali, i fattori di crescita e le cellule.

2.1. Gli scaffolds sono molti, in particolare vi sono almeno due grandi categorie:

- i tessuti umani distribuiti dalla banca dei tessuti muscoloscheletrici: osso, cartilagine, tendini, legamenti, i prodotti derivati dalla lavorazione di questi tessuti per essere più efficaci nella riparazione, per esempio dall'osso si può asportare la componente minerale ottenendo la matrice senza il calcio (matrice ossea demineralizzata, *Demineralized Bone Matrix* [DBM]) molto utile per riempire o sostituire l'osso mancante. Per maggiori e specifiche informazioni su questi tessuti di banca, si consiglia la lettura delle note informative specifiche;
- i biomateriali, le sostanze naturali animali o vegetali, e le sostanze chimiche di sintesi: sono materiali adatti ad essere impiantati nel corpo umano, possono essere utilizzati da soli o in associazione a fattori di crescita e cellule. Alcuni esempi: l'osso animale (equino, suino, bovino), il legno, il corallo, i composti di idrossiapatite, tricalcio fosfato, alcune ceramiche ecc. Questi prodotti sono di solito considerati "dispositivi medici" (non sono farmaci), e sono distribuiti da

ditte italiane o estere che ne certificano la qualità. Tutti hanno il marchio CE, che assicura che la ditta produttrice ha seguito procedure controllate e ispirate a criteri di sicurezza.

2.2. I fattori di crescita più utilizzati in ortopedia sono quelli derivati dalle piastrine, cioè cellule che scorrono normalmente nel nostro sangue; opportunamente trattate, liberano le sostanze in esse contenute, chiamate “fattori di crescita”, capaci di fare rigenerare o riparare un tessuto. Le piastrine sono ottenute con un semplice prelievo del sangue, che viene centrifugato; sono poi concentrate ed attivate dando luogo a diversi prodotti (plasma ricco di piastrine [PRP]; plasma ricco di fibrina [PRF], gel di piastrine). I fattori di crescita sono autologhi se le piastrine sono prelevate dallo stesso paziente (donatore e ricevente sono la stessa persona) oppure omologhi se le piastrine sono donate da un paziente per un altro paziente, della stessa specie umana. Esistono inoltre specialità medicinali e altri prodotti che contengono proteine specifiche per la ricrescita ossea, chiamate in inglese *Bone Morphogenetic Protein* (BMP). Sia i fattori di crescita piastrinici che queste proteine possono essere utilizzati da soli o associati ad un biomateriale di trasporto.

2.3. Infine si possono utilizzare le cellule staminali dell’adulto, chiamate “mesenchimali”, prelevate dal midollo osseo del paziente oppure da altri tessuti, come la cartilagine o il grasso. Nella maggior parte dei casi le cellule staminali mesenchimali, per essere impiantate, devono essere associate ad un biomateriale; inoltre la loro funzione può essere potenziata dall’uso contemporaneo di fattori di crescita. Nei paragrafi 5 e 6 vedremo in modo più approfondito le loro caratteristiche.

3. Sono terapie consolidate o sperimentali?

Alcune di queste tecniche sono “consolidate”, cioè sono terapie utilizzate normalmente nella pratica quotidiana, basate su studi scientifici pubblicati e condivisi dai maggiori centri nazionali ed internazionali; altre tecniche sono ancora in sperimentazione. In generale sono ancora pochi i medici ortopedici che hanno esperienza con questo tipo di terapie.

4. Quali sono i vantaggi ed i rischi delle tecniche di medicina rigenerativa?

Il principale vantaggio è che la riparazione e la rigenerazione del tessuto avvengono più velocemente ed in modo migliore. Inoltre, nella maggior parte dei casi, queste tecniche integrano la cura necessaria per il paziente, e non sono l’unica terapia, pertanto non richiedono che il paziente sia sottoposto ad un trattamento speciale differente. Per esempio, se la frattura di un osso non è guarita e vi è una mancata consolidazione, l’ortopedico esegue la terapia chirurgica necessaria integrandola con una tecnica di medicina rigenerativa per accelerare e facilitare la guarigione dell’osso. Al momento non si sono verificati eventi avversi gravi che riguardano l’uso della medicina rigenerativa in ortopedia. È necessario continuare con studi clinici controllati per avere una maggiore conoscenza sull’efficacia della terapia e sulle eventuali problematiche.

Alcune specificazioni:

- nel caso di fattori di crescita da piastrine omologhe, vi è lo stesso rischio delle trasfusioni del sangue, cioè che una malattia del donatore (per esempio una infezione, quale l’AIDS, l’epatite B o C ecc.) venga trasmessa al ricevente; tuttavia, tutti gli esami prescritti dalla legge sono eseguiti sul donatore e sul sangue per rendere la terapia la più sicura possibile;
- nel caso di proteine della ricrescita ossea (“BMP”), è possibile che compaia un gonfiore dopo l’intervento, tuttavia si tratta di un fenomeno transitorio, che si risolve da solo entro breve.

5. Che cosa sono le cellule staminali?

Le cellule staminali sono cellule indifferenziate (cioè non differenziate in un tipo specifico, e quindi senza segni caratteristici particolari), presenti in tutti gli organi e tessuti dell’organismo dell’embrione e dell’adulto, le quali hanno la potenzialità di differenziarsi (assumere caratteristiche particolari) per rigenerare un nuovo tessuto. Le cellule staminali dell’adulto sono definite “mesenchimali”.

6. *Come funzionano le cellule staminali mesenchimali adulte?*

Le cellule staminali mesenchimali adulte vengono utilizzate dal nostro organismo quando vi è un tessuto da riparare o rigenerare. Si mobilitano in base a stimoli locali (traumi, lesioni degenerative, infiammatorie ecc.) e vengono richiamate per differenziarsi e contribuire a rigenerare o riparare un tessuto. Se il danno è piccolo, solitamente riescono a produrre una buona riparazione; se il danno è maggiore, spesso risultano insufficienti, per questo si pone l'esigenza di fornire chirurgicamente un supporto a questa funzione.

7. *Come è possibile utilizzare le cellule staminali mesenchimali nella pratica clinica?*

Nella maggior parte dei casi, l'ortopedico le preleva con una siringa da un osso del bacino, chiamato ala iliaca, e le inserisce in appositi macchinari in commercio, che le centrifugano e le concentrano. In base al tipo di difetto da riparare o al tipo di rigenerazione da stimolare, le cellule staminali mesenchimali possono essere utilizzate da sole oppure fatte depositare o filtrare su un supporto, che può essere: osso autologo, osso di banca, osso animale, sostanza vegetale o di sintesi. Queste manovre sono eseguite in sala operatoria. Il limite di questa metodica consiste nel non sapere esattamente quante cellule staminali siano presenti nel midollo osseo di ciascun paziente, e quindi quante ne siano prelevate, concentrate ed impiantate. Da ciò deriva la possibilità che l'efficacia della cura non sia quella sperata. Un'altra fonte di cellule staminali utili in ortopedia è il grasso sottocutaneo.

8. *Come è possibile impiantare un numero di cellule staminali più efficace?*

Dopo aver effettuato il prelievo, le cellule vengono inviate in un laboratorio certificato per la produzione farmacologica. Qui vengono espanse (cioè moltiplicate) in condizioni di sterilità, indotte a differenziarsi attraverso fattori di crescita e, se necessario, impiantate su supporti. Il prodotto che ne scaturisce è un nuovo farmaco, e come tale deve subire un processo di autorizzazione da parte degli organi competenti, incluso uno studio clinico controllato per essere usato comunemente su ogni paziente. Ad oggi esistono pochi farmaci di questo tipo, ma si prevede che in futuro aumentino.

9. *Se dopo l'intervento compaiono eventi avversi correlati alla tecnica di medicina rigenerativa, che cosa succede?*

Come in tutte le terapie, chirurgiche e non, si possono verificare eventi avversi, cioè complicanze specifiche correlate all'uso di un particolare tessuto, farmaco o dispositivo. Se questo avvenisse, l'ortopedico, che ha il compito di sorvegliare e ridurre tali effetti, provvederà alla cura del paziente e notificherà all'autorità competente le reazioni ed eventi avversi gravi.

10. *Io, paziente, posso collaborare per fare in modo che l'intervento abbia successo?*

Il successo di una cura, in particolare di un intervento chirurgico, dipende da tantissimi fattori, alcuni determinati dalla malattia, altri dal paziente, altri ancora dalla pratica clinica. L'ortopedico, insieme a tutta l'equipe medica e paramedica, e a tutto il personale della struttura ove avviene la cura (ospedale, ambulatorio ecc.), può agire facendo sì che tutte le regole della buona pratica clinica siano applicate in ciascun paziente. Da parte sua, è importante che il paziente capisca che seguire esattamente le prescrizioni dell'ortopedico significa diminuire il rischio di complicanze. Per favorire la riparazione e rigenerazione dei tessuti, ricordiamo l'importanza di muoversi, respirare bene (attenzione al fumo!) e mangiare in modo equilibrato per quantità e qualità (carboidrati, proteine, zuccheri, grassi, vitamine e sali minerali). I controlli medici periodici servono per identificare e risolvere gli eventuali problemi e/o complicanze che possono insorgere dopo l'intervento, indipendentemente dall'uso di tecniche di medicina rigenerativa. Pertanto è buona pratica clinica che periodicamente il paziente si rechi alla visita di controllo, segua le prescrizioni mediche e segnali eventuali problemi.

ALLEGATO 4

Schema per il consenso informato di un intervento con utilizzo di una tecnica consolidata di medicina rigenerativa (non sperimentale)

Dichiarazione del Paziente

Io sottoscritto/a _____

nato/a a _____ (provincia) il _____

residente a _____ (provincia) Via _____

recapiti telefonici (telefonia fissa e mobile) _____

Dichiaro:

• di essere stato informato dal Dr. _____

• e di avere capito che:

– la patologia di cui sono affetto è *(inserire la diagnosi o l'ipotesi diagnostica)*:

– il trattamento proposto consiste in *(specificare anche la modalità di esecuzione: per es. specificare se in artroscopia o chirurgia aperta o infiltrazione transcutanea ecc.)*:

– e che verrà utilizzata la seguente tecnica di medicina rigenerativa *(questa specificazione può essere messa a parte, come in questo caso, o inserita nel trattamento al punto precedente)*:

– dopo il trattamento proposto vi sarà la necessità dei seguenti eventuali trattamenti successivi e terapie:

– il trattamento ha i seguenti risultati conseguibili (parziali e definitivi):

– i rischi connessi possibili e/o prevedibili e le complicanze sono:

– nel mio caso, le condizioni organiche che rendono più complesso l'intervento sono:

– i rischi derivanti dalla mancata effettuazione della prestazione sono:

– le alternative terapeutiche sono:

Dichiaro inoltre che ho avuto – sia ora che in occasione dei precedenti colloqui – ogni possibilità di porre domande e di chiarirmi le idee; le risposte sono state chiare, comprensibili ed esaurienti; inoltre ho avuto a disposizione tempo sufficiente per poter leggere, comprendere e farmi spiegare quanto contenuto nella scheda informativa allegata (*MODIFICARE IN BASE A QUANTO FORNITO AL PAZIENTE, per es. “nota sulle tecniche di medicina rigenerativa”*), che conferma quanto mi è stato spiegato a voce, di aver avuto la possibilità di porre domande e di avere avuto risposte soddisfacenti.

Pertanto

Accetto il programma operatorio così come mi è stato presentato, e di autorizzare i medici ad effettuare quelle variazioni che potranno rendersi necessarie od opportune in base alle necessità del momento.

Data _____

Firma del Paziente _____

Nome e Cognome del Medico _____

Firma del Medico _____