



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

Scuola di Dottorato in Sanità e Produzioni Animali:
Scienza, Tecnologia e Biotecnologie

Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica

Dottorato di Ricerca in Biotecnologie Applicate
alle Scienze Veterinarie e Zootecniche
(Ciclo XXV)

Tesi di Dottorato

Studio in vivo di scaffold
per la rigenerazione ossea e cartilaginea
(VET/05)

Dott. Marino Campagnol
Nr. Ro8862

Docente guida: Prof. Giorgio Poli

Coordinatore: Prof. Fulvio GANDOLFI

Anno Accademico 2011-2012

INDICE

INDICE	pag. 1
ABSTRACT	pag. 2
INTRODUZIONE	pag. 3
Biomateriali e scaffold	pag. 3
Biocompatibilità e osteointegrazione	pag. 4
MODELLI ANIMALI	pag. 6
Modelli animali per l'osso	pag. 6
<i>Disegno dell'impianto</i>	pag. 7
<i>Scelta del modello animale</i>	pag. 8
<i>Specie utilizzate</i>	pag. 9
<i>Macrostruttura ossea</i>	pag. 11
<i>Microstruttura ossea</i>	pag. 11
<i>Composizione dell'osso</i>	pag. 12
<i>Rimaneggiamento osseo</i>	pag. 12
Modelli animali per la cartilagine	pag. 14
<i>Microscopia luce polarizzata e microscopia ottica</i>	pag. 15
<i>Microscopia elettronica</i>	pag. 15
<i>Spessore massimo della cartilagine</i>	pag. 18
PROBLEMI CLINICI	pag. 19
Osso	pag. 19
Cartilagine	pag. 19
INGEGNERIA DEI TESSUTI IN ORTOPEDIA	pag. 21
SCOPO DELLA TESI	pag. 22
PRIMO PROGETTO	pag. 23
SECONDO PROGETTO	pag. 32
TERZO PROGETTO	pag. 38
QUARTO PROGETTO	pag. 48
BIBLIOGRAFIA	pag. 56

ABSTRACT

The treatment of large osseous defects remains a challenging clinical problem in orthopedic surgery and, due to the lack of comparative studies, it is not always possible to define the best treatment choice for the different osseous and cartilage pathologies. As the field of tissue engineering develops, researchers face a large number of degrees of freedom regarding the choice of material, architecture, seeding, and culturing. Results from *in vitro* studies can be difficult to extrapolate to the *in vivo* situation. For this reason the use of animal models is often an essential step in the testing of orthopedic implants prior to clinical use in humans.

We have investigated the differences in bone density between various species as factors for consideration when choosing an animal model. We also investigated *in vivo* a possible correlation between osteointegration and the increase in electrical impedance module. Due to the similarity of skeletal parameters and bone-healing rates the swine seem to be a good model in bone and joint surgery. We have examined in two tests, scaffolds for osteochondral tissue repair both in minipigs and in commercial pigs, to verify the differences between the two models and which one is the best.

INTRODUZIONE

Biomateriali e scaffold

In questi ultimi anni è stato possibile assistere ad una rapida ascesa di tutti quei settori che suscitano da sempre estremo interesse in campo biomedico e biotecnologico: la scienza dei biomateriali, l'ingegneria tissutale e le scienze biomediche sono infatti aree in continuo sviluppo presso tutte le strutture che si occupano di Biotecnologie.

Gli studi effettuati nell'ambito della scienza dei biomateriali erano inizialmente condotti con lo scopo di trovare dei materiali che, una volta inseriti nel sito d'impianto prescelto, si limitassero a non provocare effetti tossici o danni ai sistemi biologici. Fortunatamente, nel corso degli anni, il concetto di biocompatibilità si è evoluto, assumendo un più ampio significato: i materiali individuati ed impiantati si dimostrarono, infatti, capaci di promuovere risposte biologicamente favorevoli, messe in atto da parte dell'organismo ospite.

La ricerca nazionale ed internazionale è quindi rivolta allo studio di materiali in grado di stimolare la proliferazione cellulare, permettendo una più veloce rigenerazione del tessuto o dell'organo temporaneamente sostituiti dai biomateriali stessi, considerando inoltre i benefici che si possono trarre dalla guarigione delle patologie trattate.

Nel 1988 un'agenzia governativa degli Stati Uniti, la National Science Foundation, definì l'ingegneria dei tessuti un settore in cui i biomateriali trovassero impiego non solo come supporto per colture di cellule che, una volta andate incontro a moltiplicazione ed organizzazione tissutale *in vitro* venissero impiantate nell'organismo da cui erano state prelevate, ma anche come attivatori e promotori *in vivo* di un processo di proliferazione e riorganizzazione cellulare mirato. L'importanza di tali metodi consiste nel garantire l'assenza di reazioni immunitarie (consuete, generalmente, in ogni xenotrapianto), poiché non si verifica l'impianto di cellule estranee.

I supporti artificiali utilizzati con l'obiettivo di ricostruire i tessuti biologici coltivando le cellule sono chiamati scaffold. Gli scaffold sono costituiti da biomateriali che devono consentire la proliferazione cellulare sia *in vitro*, sia *in vivo*. Una volta impiantati gli scaffold possono essere riassorbiti mediante processi metabolici, oppure rimanere in loco e continuare a fornire un supporto meccanico. Queste possibilità aprono nuovi scenari per la sostituzione di tessuti biologici e costituiscono le fondamenta della medicina rigenerativa.

Numerosi studi di ingegneria tissutale sono stati condotti *in vitro* per trovare dei metodi per sostituire tessuti ed organi malati o danneggiati. Questo approccio prevede l'utilizzo di cellule tissutali specifiche che sono cresciute su di un biomateriale-scaffold, avente una

struttura tridimensionale, con lo scopo di riprodurre la funzionalità organica o tissutale. Una volta impiantate, le cellule ripresentano la funzione desiderata.

Biocompatibilità e osteointegrazione

Nella Consensus Conference di Chester del 1991 i biomateriali sono stati definiti come “Materiali per i quali si prevede una interfaccia con i sistemi biologici al fine di valutare, trattare, migliorare o sostituire qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo umano”.

È evidente che tale definizione identifica i biomateriali non in relazione alle loro proprietà, ma alle finalità d'uso. Il polietilene, ad esempio, non è un biomateriale quando viene impiegato nella fabbricazione di un contenitore alimentare, ma è un biomateriale quando costituisce la coppa acetabolare di una protesi d'anca.

Idealmente, i biomateriali utilizzati come sostituti dell'osso, dovrebbero essere biocompatibili, biodegradabili, osteoconduttivi e/o osteoinduttivi e fornire la competenza meccanica e l'integrità necessarie a sostituire il tessuto duro fino alla guarigione. E' inoltre indispensabile che la perdita di coesione e di resistenza meccanica durante il riassorbimento del biomateriale venga immediatamente bilanciata dall'aumento della funzione di sostegno del tessuto ospite, onde evitare rotture del materiale d'impianto e/o del tessuto.

Il termine osteointegrazione, coniato alla fine degli anni sessanta da Branemark, è usato in odontoiatria e in medicina per definire l'intima unione tra un osso e un impianto artificiale senza tessuto connettivo apparente. Si definisce intima unione quando lo spazio e i movimenti relativi fra osso e impianto non superano i 100 micron.

La velocità del processo di osteointegrazione e la sua quantità sono funzione del tipo di superficie dell'impianto, che può presentare una geometria tale da attrarre cellule osteoblaste detta osteoiduzione. Una superficie liscia è meno adatta a questo scopo, per questo motivo si possono utilizzare particolari trattamenti superficiali o una struttura di aspetto tridimensionale spugnoso con fori e canali confluenti che permettano l'avanzare del tessuto nel biomateriale.

Il termine osteointegrazione fu usato per la prima volta da Albrektsson nel 1981, che la definiva come una “Diretta connessione funzionale e strutturale tra osso vitale e la superficie di un impianto sottoposto a carico”. Lo stesso autore elencò una serie di fattori il cui controllo diventava essenziale per ottenere uno stato di osteointegrazione. Questi fattori coinvolgevano:

- 1) Biocompatibilità;
- 2) Disegno;
- 3) Caratteristiche della superficie dell'impianto;
- 4) Condizione del sito ricevente;
- 5) Tecnica chirurgica;
- 6) Condizioni di carico.

MODELLI ANIMALI

Modelli animali per l'osso

Lo sviluppo di una interfaccia ottimale tra l'osso e gli impianti ortopedici o dentali è da anni l'obiettivo primario di una grande branca della bioingegneria. Poiché l'obiettivo finale è l'utilizzo nell'uomo, sono previsti per legge rigorosi test in vitro ed in vivo al fine di verificare le caratteristiche intrinseche del materiale di biocompatibilità e sicurezza.

I risultati delle prove in vitro possono difficilmente essere estrapolati nell'applicazione in vivo, rendendo i modelli animali un passaggio obbligato per la valutazione degli scaffolds prima del loro utilizzo clinico nell'uomo.

Anche se il coniglio è da sempre il modello animale comunemente utilizzato, è chiaro che questa specie mostra la minor somiglianza con l'osso umano. Nonostante apparentemente ci siano piccole differenze tra l'osso delle varie specie animali e l'uomo, il suino dimostra la maggior analogia. Poiché questa specie è considerata in letteratura di difficile gestione sia per il rapido aumento ponderale delle razze da carne sia per il supposto cattivo carattere di quelle di piccola taglia (minipig e micropigs), spesso i ricercatori si sono indirizzati verso l'utilizzo della pecora e del cane (Pearce A.I. et al 2007)

La valutazione in vitro è intimamente connessa con lo sviluppo di un nuovo biomateriale che costituirà lo scaffold, procedendo con le prove di citotossicità e citocompatibilità che, oltre all'economicità, hanno anche il vantaggio di ridurre la quantità di animali utilizzati eliminando non solo i materiali dotati di proprietà indesiderabili, ma anche tutti quegli additivi insiti nel processo produttivo industriale che potrebbero creare problemi nella realtà clinica. (Nahid and Bottenberg, 2003, Pizzoferrato *et al.*, 1994).

Va ricordato che il termine "biocompatibilità" è utilizzato impropriamente negli studi in vitro e può essere utilizzato a buona ragione solo nelle prove utilizzando gli animali o nell'uomo (Richards *et al.*, 2001).

Le prove in vitro possono anche sovrastimare il livello di tossicità del materiale e sono limitate a studi acuti degli effetti tossici a causa della relativamente breve durata di vita delle cellule in coltura (Pizzoferrato *et al.*, 1994).

Un'importante limitazione della coltura del tessuto osseo è la mancanza di controllo dell'effetto del carico fisiologico poiché senza di questo effetto si ha il riassorbimento della matrice similmente a quanto avviene negli astronauti o nei pazienti dopo un prolungato riposo a letto (Vico *et al.*, 1987). Nessun sistema di coltura cellulare in vitro è in grado di produrre un "effetto carico" che simuli la realtà in vivo e attualmente sono pochissimi

sistemi ex vivo che sono in grado di avvicinarsi all'effetto che si ha con il carico fisiologico (e di solito solo con piccoli campioni di tessuto) (Davies et al., 2006). Per queste ragioni modelli animali sono essenziali per valutare la biocompatibilità, la risposta tissutale e la funzione meccanica di un materiale ortopedico o dentale prima dell'uso clinico nell'uomo.

Modelli animali permettono la valutazione dei materiali in situazioni ortopedico/odontoiatrico di carico o scarico per tempi potenzialmente di lunga durata e in tessuti di diversa qualità ed età, impiegando modelli utilizzando animali dell'età voluta o con osteopenia indotta.

Nonostante i modelli animali possono rappresentare da vicino la meccanica e fisiologica della situazione clinica, si deve ricordare che è comunque solo un'approssimazione in quanto ogni modello animale ha dei vantaggi e dei vantaggi specifici. Attualmente sono disponibili numerosi protocolli per le prove dei materiali in vivo, che valutano dall'adsorbimento proteico e l'aderenza ai tessuti molli all'integrazione ossea e la disseminazione di particelle da usura dell'impianto.

Disegno dell'impianto

Al fine di testare impianti ortopedici e dentali, è necessario utilizzare un modello che sia riproducibile con dimensioni dell'impianto sovrapponibili a quelli utilizzati nell'uomo. Il numero e dimensioni degli impianti da testare influenzerà direttamente la scelta della specie animale utilizzata per lo studio. E' intuibile che a prescindere dal disegno, gli impianti devono avere dimensioni adeguate per le specie scelte e per il sito dell'impianto osseo. Ad esempio, gli impianti di tipo a vite hanno il vantaggio di produrre una buona stabilità iniziale, mentre impianti cilindrici sono dipendenti dalla misura esatta per essere stabili all'interno della matrice e dare risultati precisi per quanto riguarda il loro effetto sull'osteointegrazione (Carlsson et al., 1988).

L'entrata in vigore della direttiva sui dispositivi medici (Direttiva 93/42/CEE recepita con il D.lgs 46/1997 "Attuazione della Direttiva 93/42/CEE concernente i dispositivi medici") ha allargato la richiesta di certificazioni in quanto soggetti a marcatura CE secondo il D.lgs 46/1997, oppure secondo il DL 507/1992 concernente i dispositivi medici impiantabili attivi. Tali leggi rimandano a una serie di norme ISO per la valutazione in vivo dei dispositivi medici e dei biomateriali che li costituiscono.

In quest'ultime sono forniti orientamenti per le dimensioni delle protesi utilizzate negli studi in vivo, in base alle dimensioni delle ossa delle specie animali impiegate e della tecnica di impianto, al fine di evitare la frattura patologica del sito di prova. Ad esempio, gli impianti

cilindrici inseriti nella tibia e nella diafisi femorale di coniglio dovrebbero essere non più grandi di 2 mm di diametro e 6 mm di lunghezza. Per grandi animali come pecore, capre e cani la ISO raccomanda dimensioni di impianti cilindrici di diametro di 4 millimetri e 12 mm di lunghezza per l'impianto in femore e tibia. Impianti quali le viti per ortopedia possono variare da 2 a 4,5 millimetri a seconda delle specie scelte, ovviamente le viti di 4,5 millimetri sono in genere riservate per le specie più grandi quali la pecora, il cane e il maiale.

E' estremamente importante includere nella programmazione dello studio l'utilizzo di impianti di controllo; devono essere di un materiale già in uso clinico (International Standard ISO 10993-6, 2009) e dovrebbe consentire ai dati ottenuti di essere correlati ai prodotti esistenti.

La progettazione dell'impianto scelto determinerà le tecniche e i test meccanici utilizzati per valutare l'efficacia del materiale o del dispositivo nei tessuti espianati alla fine della prova. I più utilizzati includono il torque removal tests per valutare la forza di coppia e i test di pullout e le prove di push-out per valutare la forza di estrazione di cilindri.

Questi test sono utilizzati per valutare la resistenza dell'interazione tra l'osso e la superficie dell'impianto: alte forze incontrate durante queste prove indicano una buona integrazione tra l'osso e la superficie dell'impianto o, nel caso di materiali porosi, un elevato grado di crescita ossea nei pori dello stesso. Molti studi mirano a valutare l'effetto della modifica della superficie dell'impianto sull'aumento dell'interazione dell'interfaccia osso-impianto.

Scelta del modello animale

Kirkpatrick et al. (2002) descrive tre tipi di studi in merito ai fattori che influenzano il biologico risposta a materiali impiantati nell'osso. Si tratta di studi sui biomateriali espianati, in tecniche in vitro e sui modelli animali. Tra gli attributi desiderabili di un modello animale si includono la dimostrata similarità con gli esseri umani, sia in termini di considerazioni fisiologiche che patologiche, e la possibilità di ottenere dati da numerosi soggetti in un intervallo di tempo relativamente breve (Egermann et al, 2005;. Liebschner, 2004; Schimandle e Boden, 1994).

Dovrebbero essere considerati diversi fattori nel decidere quale specie animale utilizzare per un determinato studio.

Secondo Schimandle e Boden (1994), i fattori di selezione della specie includono: il costo di acquisto e stabulazione degli animali, la disponibilità, l'impatto emotivo sulla società civile, la tolleranza alla cattività e la facilità di stabulazione.

Più specificatamente, per quanto riguarda la valutazione di biomateriale e dispositivi medici per l'osso, la comprensione delle caratteristiche specie specifiche delle ossa, sia dal punto di vista della microstruttura e composizione del tessuto osseo che dello sviluppo e del rimaneggiamento, sono basilari per la seguente estrapolazione dei dati per l'applicazione nella realtà clinica. Anche la dimensione dell'animale deve essere considerata al fine di garantire che il numero e le dimensioni degli impianti valutati sia adeguata (Schimandle e Boden, 1994), (International Standard ISO 10993-6, 2009). Ne consegue che, per la valutazione di un biomateriale o dispositivo medico nessun modello animale sarà adatto per tutti gli scopi, né nessuna specie potrà essere respinta come non appropriata a tutti gli effetti (Hazzard et al.1992).

Le norme internazionali stabilite per quanto riguarda le specie appropriate per testare l'impianto di materiali nell'osso, affermano che cani, pecore, capre, maiali e conigli sono specie adatte. Per una robusta valutazione, dovrebbero essere utilizzate per ogni prova e per ogni periodo di impianto, almeno quattro conigli e almeno due di ciascuna delle altre specie di cui sopra. Per periodi di impianto a lungo termine sono codificate tempistiche di 12, 26, 52 e 78 settimane e in taluni casi (con l'eccezione dei conigli) 104 settimane (International Standard ISO 10993-6, 2009)

Anche se i primati non umani sono spesso considerati come il modello più appropriato per l'osso umano (Wang et al, 1998.; Turner, 2001), vi sono evidenti implicazioni etiche nell'uso queste specie per la ricerca medica, a prescindere dai costi , i rischi di zoonosi e le difficoltà di gestione.

Tra le specie elencate, il cane è stato descritto per anni come avente la struttura ossea probabilmente più simile all'uomo; tuttavia, vi sono ovvie e quantomai attuali implicazioni etiche per l'utilizzo. Apparentemente le pecore e i suini hanno un minor impatto emotivo, nonostante possano comportare problemi di stabulazione, movimentazione e disponibilità e sembrano essere un modello meno critico di quello utilizzando i conigli che sembrano essere gli animali meno simili all'uomo per la struttura e proprietà del tessuto osseo.

Posto che nessuna specie soddisfa i requisiti di un ideale modello animale, una comprensione delle differenze sia delle caratteristiche macroscopiche che microscopiche e fisiologiche è in grado di migliorare la scelta delle specie animali e l'interpretazione dei risultati degli studi in vivo.

Specie utilizzate

Il coniglio è uno degli animali più comunemente usati nelle ricerche per il sistema muscoloscheletrico in una percentuale di circa il 35% (Neyt et al., 1998). Ciò è in parte

dovuto alla semplicità di gestione e alle dimensioni oltre che alla convenienza in quanto raggiunge la maturità scheletrica poco dopo la maturità sessuale, a circa 6 mesi di età (Gilsanz et al., 1988). Sono disponibili, inoltre con stato sanitario SPF.

Uno degli inconvenienti dell'utilizzo del coniglio come modello animale per la valutazione di impianti multipli di biomateriali è dato dalle sue limitate dimensioni. Lo standard internazionale per la valutazione in vivo dei dispositivi medici raccomanda un massimo di 6 impianti (3 test e 3 impianti di controllo) per coniglio (International Standard ISO 10993-6, 1994), ovvero la metà del numero massimo di impianti raccomandato per pecore, cani, capre e maiali. Inoltre, le dimensioni dell'impianto che può essere inserito sono limitate: si raccomanda di non usare impianti cilindrici più grandi di 2 mm di diametro e 6 mm di lunghezza, ovvero, anche in questo caso, la metà di quanto raccomandato per le altre specie più grandi (International Standard ISO 10993-6, 1994). Nonostante ciò, il coniglio rimane molto una scelta popolare per la valutazione di materiali impiantabili per l'osso, soprattutto per questioni economiche e organizzative.

Il cane è una delle specie di grandi dimensioni più frequentemente utilizzate per la valutazione di materiali impiantabili per l'osso, in particolar modo in odontoiatria. A differenza delle altre specie animali, vi è una notevole quantità di letteratura in merito alle differenze tra osso canino e umano e in merito all'utilità del cane quale modello per la medicina ortopedica.

Pecore. Nonostante il numero dei cani utilizzati per la ricerca ortopedica ancora oltrepassi quello delle pecore, nel corso degli ultimi dieci anni gli ovini utilizzati sono in aumento. Questo aumentato utilizzo sembra essere dovuto a questioni etiche ed alla negativa percezione pubblica in merito all'utilizzo di animali da compagnia per la ricerca medica.

SUINI sono considerati specie di elezione in una varietà di studi, tra cui quelli sulla necrosi della testa del femore, le fratture della cartilagine e dell'osso, la ricrescita ossea e gli studi per la valutazione di nuovi impianti dentali (An e Friedman, 1999; Buser et al, 1991; Sun ed altri, 1999)

Le razze di suini da carne sono generalmente considerate indesiderabili per la ricerca ortopedica a causa del loro veloce tasso di crescita ed un eccessivo peso corporeo finale. Tuttavia, lo sviluppo di razze di minipigs e micropigs ha, in qualche misura, permesso di superare il problema.

Macrostruttura ossea.

Chiaramente ci sono grosse differenze per quanto riguarda l'anatomia tra il coniglio e l'uomo sia per quanto riguarda la forma e le dimensioni delle ossa che per i vettori delle forze di carico a causa delle differenze di postura tra le due specie. A seconda delle dimensioni e la razza del cane, ci può essere qualche discrepanza nella dimensione e la forma delle ossa canine in confronto quelle umane;

La maggior parte della letteratura riporta che il cane è più adatto come modello per osso umano da un punto di vista biologico delle pecore; tuttavia, gli ovini adulti offrono il vantaggio di essere di un peso corporeo più simile agli quello degli esseri umani e di avere ossa lunghe di dimensioni adatte per l'impianto e protesi di misura indentica a quelli che si utilizzeranno nell'uomo (Newman et al., 1995), cosa che non è possibile attuare in specie più piccole quali i conigli.

Per quanto riguarda l'anatomia ossea, la morfologia, la guarigione e il rimodellamento, il maiale è considerato un modello strettamente rappresentativo dell'osso umano (Thorwarth et al., 2005). Tra suino e uomo sono state evidenziate somiglianze per quanto riguarda il diametro e l'area della sezione trasversale del femore (Raab et al., 1991), nonostante i maiali abbiano una più densa rete trabecolare (Mosekilde et al., 1993).

Microstruttura ossea

Istologicamente, le ossa di coniglio lunghe hanno un ben diversa microstruttura rispetto all'uomo (Wang et al., 1998). In confronto alla struttura ossea secondaria di osso maturo umano, i conigli hanno una struttura vascolare primaria del tessuto longitudinale, comprendente canali vascolari degli osteoni che corrono paralleli all'asse lungo dell'osso, circondanti sia il canale midollare che la superficie periostale. L'osso tra questi strati è composto da osso denso haversiano (Martiniakova et al., 2005).

Mentre le ossa di un uomo adulto hanno una struttura secondaria osteonale, l'osso di cane ha una microstruttura mista comprendente prevalentemente osseo secondario osteonale nel centro di osso corticale, ma con quello che viene chiamato osso in plessiforme nelle aree adiacenti al periostio e all'endostio (Wang et al., 1998). Nonostante le analogie relative alla composizione organica, osso canino ha una densità minerale ossea superiore a quella dell'uomo (Wang et al., 1998). Risultati precedenti di Kuhn et al. (1989), indicano che, mentre l'osso trabecolare della porzione distale del femore degli esseri umani e dei cani è qualitativamente simile, in termini di meccanica e proprietà della massa vi sono differenze nei coefficienti relativi alla resistenza alla deformazione, indicanti che l'osso

trabecolare canino è in grado di sopportare elevate tensioni di compressione prima prima della rottura rispetto all'osso umano (Kuhn et al., 1989).

Mentre macroscopicamente le ossa della pecora sembrano molto simili a quelle umane, istologicamente, la struttura ossea della pecora è molto diversa. Le pecore hanno ossa con struttura prevalentemente primaria (osteoni minori di 100µm di diametro contenenti almeno due vasi sanguigni centrali e l'assenza di una linea di cemento (deKleer, 2006)) in confronto con quella labbondantemente secondaria dell'uomo (Eitel et al., 1981).

Pur avendo una rete trabecolare densa, il maiale è riportato avere una struttura ossea lamellare che è simile a quella umana (Mosekilde et al., 1987).

Composizione dell'osso.

Uno studio condotto da Aerssens et al. (1998) ha esaminato le differenze in merito a composizione ossea, densità e qualità tra varie specie (uomo, cane, pecora, maiale, bovino e pollo) dimostrando una maggiore somiglianza nella composizione ossea (peso cenere, idrossiprolina, proteine estraibili e contenuto di IGF-1) tra il cane e l'uomo. Per quanto riguarda la densità ossea, il cane e maiale sono gli animali che più si avvicinano alla nostra specie. Gli autori concludono che per le componenti testate, le caratteristiche del tessuto osseo umano sono quelle che più si avvicinano alle proprietà dell'osso canino (Aerssens et al., 1998). Esistono differenze di densità ossea tra essere umano e pecore perchè quello ovino ha una maggiore densità e conseguentemente una resistenza maggiore.

Rimaneggiamento osseo

In confronto ad altre specie, come i primati e alcuni roditori, il coniglio ha il più veloce rimaneggiamento e turnover osseo (Castaneda et al, 2006;. Newman et al, 1995.). Ciò può rendere difficile estrapolare i risultati dagli studi eseguiti nei conigli. Tuttavia, questi animali sono comunemente usati per lo screening di materiali impiantabili prima dei test in un grande modello animale.

La letteratura descrive il maiale come un animale con processi di rimodellamento osseo simili a quelli degli esseri umani sia trabecolare che intra-corticale (Mosekilde et al, 1987;. Mosekilde et al, 1993).

Laiblin e Jaeschke (1979) hanno confrontato il tasso di rigenerazione ossea di cani, suini ed esseri umani, riportando che i suini hanno un tasso di rigenerazione ossea più simile agli gli esseri umani di quanto non lo abbiano i cani (cane, 1.5-2.0mm/giorno, suino 1.2-1.5mm/giorno; uomo 1.0-1.5mm/giorno). Inoltre, in uno studio sugli effetti del fluoruro sul

rimodellamento osseo corticale nei suini in accrescimento, i risultati dimostrano che gli animali di controllo hanno un osso corticale con una frequenza di mineralizzazione simile all'uomo (Kragstrup et al., 1989).

Nonostante le differenze nella struttura ossea siano note, diversi studi sostengono che la pecora è ancora un modello valido per lo studio del turnover e dell'attività di rimaneggiamento osseo (Chavassieux et al, 1987;. Den Boer et al, 1999;. Pastoureau et al., 1989). A sostegno di questa teoria, uno studio di osservazione della crescita ossea in impianti porosi inseriti nella porzione distale del femore di pecore ha mostrato come gli ovini e umani abbiano un modello simile di crescita ossea nel tempo in impianti porosi. Anche se le pecore hanno evidenziato una maggiore quantità di crescita ossea rispetto agli esseri umani, si è proposto che questo sia dovuto alla maggiore quantità di osso spongioso nella porzione distale del femore delle pecore, in confronto con gli esseri umani (Willie et al., 2004).

Summary of four key attributes in terms of similarity between animal and human bone.

	Canine	Sheep/Goat	Pig	Rabbit
Macrostructure	++	+++	++	+
Microstructure	++	+	++	+
Bone Composition	+++	++	+++	++
Bone Remodelling	++	++	+++	+

+ least similar, ++ moderately similar, +++ most similar.

Modelli animali per la cartilagine

La base biochimica, biomeccanica e le caratteristiche morfologiche della cartilagine articolare sono spesso studiate in relazione ai cambiamenti patologici e l'efficacia dei differenti metodi di trattamento.

I risultati sperimentali e descrittivi derivano da un'ampia varietà di specie animali. Per esempio, la cartilagine umana e bovina è utilizzata per studi di biomeccanica, il cane è stato una specie popolare per lo studio del deficit del legamento crociato anteriore e il coniglio è spesso usato per studiare gli effetti di meniscectomia o valutare il trattamento dei difetti della cartilagine (Hoch et al. 1983; Torzilli et al. 1983; Korkala et al. 1984; Mow et al. 1984; Wakitani et al. 1989; Moran et al. 1992; Setton et al. 1994; Marshall & Chan, 1996). Tuttavia, le differenze specie-specifiche nelle caratteristiche morfologiche e biomeccaniche devono essere considerate nella scelta degli animali da laboratorio per lo studio della riparazione della cartilagine articolare.

Alcuni lavori hanno confrontato le proprietà morfologiche e biomeccaniche delle cartilagini articolari nelle diverse specie di animali da laboratorio. Per esempio è stata evidenziata una differenza nella densità cellulare della cartilagine femorale del condilo in otto diverse specie di mammiferi (Stockwell, 1971) e Simon (1971) ha calcolato differenti risposte alla compressione della cartilagine articolare in bovini, pecore, cani, ratti e topi.

Esistono notevoli differenze intrinseche nei coefficienti dei materiali costituenti la cartilagine femorale distale di bovino, cane, uomo, scimmia e coniglio (Athanasίου et al. 1991).

La morfologia di articolare della cartilagine diverse specie è stato confrontato in relazione alla struttura del collagene. Benninghoff (1925) ha introdotto la divisione dei costituenti della cartilagine articolare in 4 diversi strati o zone.

Clark (1985, 1990) ha dimostrato mediante SEM la disposizione colonnare delle fibre di collagene nella cartilagine rotulea e distale del femore del coniglio. Il confronto di campioni prelevati dalla cartilagine del piatto tibiale di uomo, cane e coniglio ha mostrato simili modelli generali di disposizione delle fibre del collagene in tutte le tre specie (Speer & Dahners, 1979, Clark, 1991).

In uno studio al microscopio elettronico di trasmissione a luce polarizzata la cartilagine articolare di diversi mammiferi (ratto, cavia, coniglio, cane, maiale, uomo) Zambrano et al. (1982) ha confermato la disposizione a archi a sesto acuto delle fibre del collagene come evidenziato da Benninghoff (1925). Tuttavia, nessuno di questi ricercatori ha affrontato

direttamente la questione delle variazioni tridimensionale della struttura del collagene e le affinità tra le specie.

Solamente Kääb et al (1998) hanno evidenziato la reale morfologia strutturale delle fibre componenti la cartilagine comparando con l'uomo le più comuni specie utilizzate come animale da laboratorio.

Il collagene è l'elemento strutturale della cartilagine articolare e contribuisce alla principale funzione di questo tessuto ovvero quella di trasmettere i carichi.

Tali Autori , inoltre, al fine di valutare se un certo spessore cartilagineo specie-specifico hanno associato a una determinata disposizione delle fibre collagene, è stato misurata e correlata al peso corporeo delle singole specie il massimo spessore della cartilagine nella zona più centrale del piatto tibiale mediale.

Microscopia luce polarizzata e microscopia ottica

La microscopia ottica polarizzata ha rivelato la presenza di fibre di collagene in tutte le specie, evidenziando come fasci di queste componenti percorrano perpendicolarmente dalla cartilagine calcificata verso la superficie l'intera compagine.

Nella zona di transizione le fibre si intersecano, formando strutture simili ad archi che nell'uomo sono ampie e appaiono come fasci giganti. In tutte le altre specie, le fibre di collagene appaiono come sottili fasci o colonne.

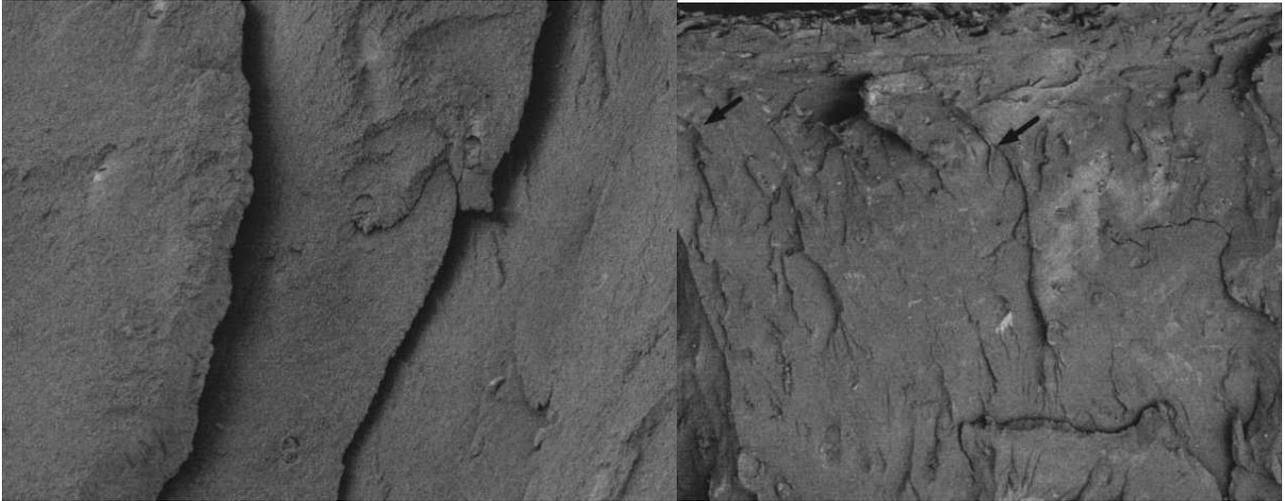
La cartilagine bovina e suina, che appariva più simile all'uomo mediante SEM, non ha mostrato aggregazione delle fibre collagene, evidenziando, viceversa, fasci più sottili. In microscopia ottica non si evidenzia una omogenea organizzazione del collagene della fibra poiché l'andamento delle fibre non, può, in tali specie, essere seguito dalla cartilagine calcificata alla superficie, dimostrando in tal modo significative differenze tra le specie esaminate.

Microscopia elettronica

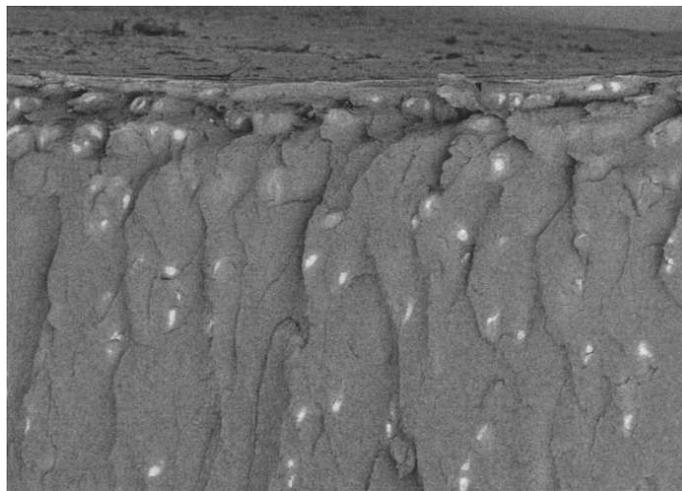
Con la microscopia elettronica a basso ingrandimento, la sezione del collagene evidenzia la disposizione a foglie o colonne delle fibre.

La cartilagine dell'essere umano appare con una disposizione simile a delle foglie, dove il collagene è organizzato in fasci di fogli o foglie fuse una con l'altra.

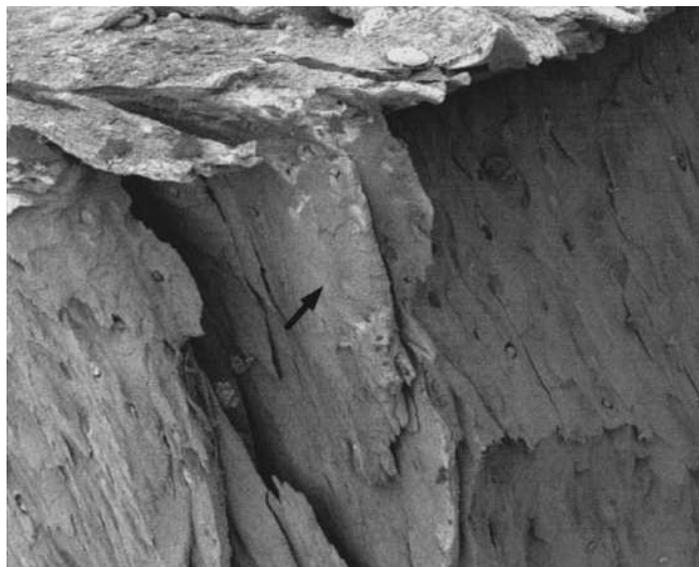
Nel suino, la cartilagine ha mostrato la disposizione più simile a quella delle fibre di collagene umano; anche nel cane si evidenzia una disposizione a foglia.



Cartilagine di uomo

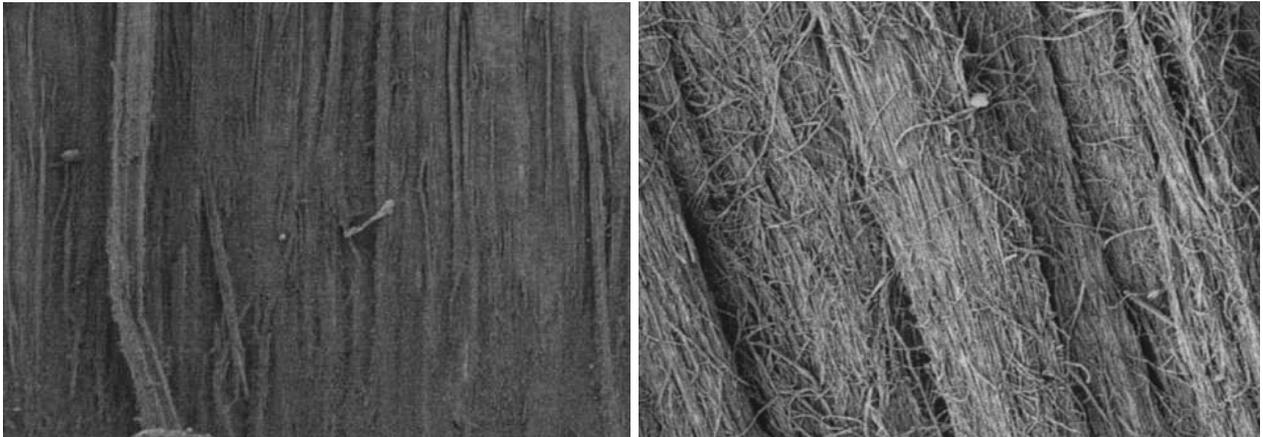


Cartilagine di suino



Cartilagine di cane

Bovini, ovini, conigli e ratti, manifestano, invece, una disposizione colonnare della matrice del collagene.



Cartilagine di bovino



Cartilagine di coniglio

Questa disposizione generale delle fibre collagene come foglie o colonne è coerente in sia nella zona profonda che nella radiale fino alla zona di transizione. Mentre non è possibile evidenziare una sola foglia dalla zona calcificata alla superficie, è possibile rintracciare colonne in tutte le specie che esibiscono il modello colonnare.

A prescindere dal valore assoluto dello spessore, le diverse zone mantengono uguali proporzioni nelle diverse specie: la zona profonda o radiale ha valori tra il 60% e il 80% e la zona di transizione circa il 10% \pm 15% dello spessore totale.

La zona tangenziale, dove le fibre del collagene o foglie sono orientate quasi parallela alla superficie, sono relativamente spesso nell'uomo (circa il 10%) e più sottili in altre specie, come ad esempio nel coniglio (circa $3 \pm 4\%$).

In tutte le specie vi è un maggior numero di condrociti negli strati superiori della cartilagine rispetto alle zone più profonde.

Spessore massimo della cartilagine

Lo spessore massimo della cartilagine del plateau mediale nella tibia è associato normalmente associato al peso corporeo.

Se la cartilagine bovina è la più spessa con il 4,4 mm di spessore in un animale con un peso corporeo di 550 kg, la cartilagine umana è la seconda più spessa con 3,6 mm e un corpo dal peso di soli 78 kg. In tutte le altre specie lo spessore è minore di 2 mm. Non c'è correlazione tra lo spessore della cartilagine o il peso corporeo e la struttura del collagene a foglie o colonne. La cartilagine è relativamente spessa nell'uomo e nel coniglio in relazione al peso corporeo, rispetto alle altre specie (Kääb et al 1998).

Questo può essere spiegato dal fatto che l'uomo è l'unico non quadrupede negli animali che normalmente si considerano, mentre tutti gli altri, tranne il coniglio, sostengono la maggior parte del peso corporeo sulle zampe anteriori. Ne consegue evidenziare che queste due specie possono essere esposte a più alti picchi di sollecitazioni statiche (Simon, 1971; Biewener, 1989).

PROBLEMI CLINICI

Osso

Gli studi effettuati nell'ambito della scienza dei biomateriali erano inizialmente condotti con lo scopo di trovare dei materiali che, una volta inseriti nel sito d'impianto prescelto, si limitassero a non provocare effetti tossici o danni ai sistemi biologici. Fortunatamente, nel corso degli anni, il concetto di biocompatibilità si è evoluto, assumendo un più ampio significato: i materiali individuati ed impiantati si dimostrarono, infatti, capaci di promuovere risposte biologicamente favorevoli, messe in atto da parte dell'organismo ospite. I difetti della ossa lunghe rappresentano uno dei maggiori problemi nell'ambito della medicina rigenerativa. Una possibilità per colmare il sito del difetto è inserirvi del tessuto osseo autologo prelevato da un'altra regione anatomica dello stesso paziente. Esistono, comunque, diversi svantaggi riguardo a tale approccio, come il dolore aggiuntivo nel sito di prelievo ed un maggiore periodo di riabilitazione per i pazienti..

Le nuove metodiche per evitare il trapianto di tessuto autologo includono l'uso di biomateriali conduttivi, induttivi e contenenti molecole bioattive, capaci di promuovere la migrazione cellulare e la colonizzazione del sito del difetto.

Gli studi di ingegneria tissutale sono diventati uno dei punti chiave nell'ambito della medicina rigenerativa. Comunque, gli ostacoli meccanici e geometrici rimangono difficili da superare, anche utilizzando le attuali metodiche; spesso, anzi, le caratteristiche meccaniche dei biomateriali si sono dimostrate non adeguate per l'applicazione in molti impianti biologici; ad esempio i materiali a base di collagene, che presentano un'ottima biocompatibilità, sono scarsamente utilizzati in situazioni dove sono necessarie prestazioni meccaniche elevate.

Risulta arduo, quindi, trovare degli scaffolds che stimolino la proliferazione cellulare ed allo stesso tempo preservino qualità meccaniche e strutturali adatte all'impianto nel tessuto osseo. Si rende, inoltre, indispensabile la messa a punto di una metodologia in grado di monitorare l'osteointegrazione e successivamente fornire informazioni di carattere preventivo sullo stato dell'impianto, per una diagnosi tempestiva della mobilitazione degli impianti protesici.

Cartilagine

Le lesioni della cartilagine articolare rappresentano uno dei principali problemi irrisolti nella chirurgia ortopedica. Questo perché cartilagine articolare ha una limitata capacità di autoriparazione in seguito a un trauma. A seguito di una lesione, una certa riparazione

spontanea può verificarsi, ma solamente quando la lesione è a tutto spessore, cioè coinvolge anche il tessuto osseo sottostante. In questo caso, infatti, le cellule mesenchimali che invadono con il sangue la lesione, formano in ambiente articolare un tessuto fibro-cartilagineo; tuttavia il neotessuto che si ottiene non riproduce le proprietà meccaniche della cartilagine nativa e non ne garantisce, pertanto, le specifiche proprietà funzionali. La mancata formazione di un tessuto simile a quello nativo esita col tempo in un deterioramento dell'intera articolazione. Questo rappresenta la classica evoluzione verso l'artrosi.

Varie sono le diverse opzioni chirurgiche per la riparazione della cartilagine articolare che possono essere suddivise in tre gruppi.

Il primo gruppo comprendente le tecniche senza trapianto di cellule o tessuti, si basa sul debridement articolare e le metodiche basate sul principio di stimolazione del midollo osseo.

Il secondo gruppo comprende le tecniche basate sul trapianto di tessuti e include il trapianto di periostio e di plug osteocondrali autologhi o allogenicici.

Il terzo le tecniche di ingegneria tissutale. Questo gruppo può essere ulteriormente suddiviso in:

- metodiche basate sul trapianto di cellule sia in soluzione che in forma di microsfere o supportate da uno scaffold biocompatibile
- metodiche impieganti il trapianto di frammenti di cartilagine
- metodiche cell-free, basate sull'uso di un scaffold acellulare, in grado di "intrappolare" le cellule riparative reclutate dal tessuto ospite e guidare la loro differenziazione verso un adatto fenotipo condrale.

Oggigiorno, tuttavia, a causa della mancanza di studi comparativi, non è sempre possibile definire quale sia la miglior scelta per il trattamento delle differenti patologie cartilaginee (Peretti GM et al 2011)

INGEGNERIA DEI TESSUTI IN ORTOPEDIA

La possibilità di rigenerare la cartilagine articolare rappresenta una concreta soluzione ai fenomeni degenerativi derivanti da una lesione. Tale realtà è obiettivo di molti studi di ricerca che, mediante l'ingegneria dei tessuti, sviluppano dei supporti cellulati biocompatibili (scaffolds) in grado di sostituire la cartilagine che è andata persa ed integrarsi con quella sana circostante. Tali supporti sono costituiti da un materiale che può essere di diversa natura, spesso di collagene in quanto costituente principale della cartilagine; tale materiale viene combinato a cellule preferibilmente autologhe e di natura condrocitaria; pertanto, condrociti stessi o cellule mesenchimali differenziate in laboratorio verso un fenotipo condrocitario. La natura autologa della componente cellulare richiede che, a seguito del prelievo, le cellule vengano espanse in laboratorio in modo da ottenerne un numero sufficiente da seminare su uno scaffold di dimensioni appropriate all'area lesionata. Tale periodo, che precede l'impianto dello scaffold nell'articolazione, è critico poiché durante l'espansione i condrociti perdono il fenotipo originario; risulta pertanto necessario stimolare il recupero del fenotipo al termine dell'espansione mostrata, ovvero durante la coltura in vitro dello scaffold. Tale problema si presenta anche nel caso vengano utilizzate cellule mesenchimali poiché vanno indirizzate verso un fenotipo condrocitario. Ciò implica che gli scaffolds cellulati vengano coltivati in vitro per un certo periodo prima dell'impianto, in modo da ottimizzare la qualità della componente cellulare e promuovere una preliminare maturazione del composto; durante questa fase in vitro può essere valutata ai fini dell'ottimizzazione della coltura l'utilizzo di specifici fattori di crescita e, possibilmente, di bioreattori.

SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questa tesi è quello evidenziare, attraverso una serie di ricerche da noi svolte, l'iter da noi seguito per valutare quello che, a nostro parere, è il modello animale ideale per lo studio in vivo di scaffold per la rigenerazione ossea e cartilaginea.

Nello specifico, con il primo lavoro abbiamo cercato di compensare la carenza di dati per quanto riguarda la densità ossea al fine di poter confrontare il maiale con il coniglio per il quale non abbiamo trovato nulla in bibliografia e valutare in merito a questo parametro le razze suine disponibili per la ricerca.

Con il secondo lavoro si è voluto indagare una nuova tecnica per la valutazione continua dell'osteointegrazione mediante i dati forniti dal modulo di impedenza elettrica di un apposito sensore impiantato.

Il terzo ed il quarto lavoro hanno permesso di dirimere che, a prescindere dai diversi materiali impiantati e dalle cellule ad essi associati, l'utilizzo di minipigs adulti è l'unica via utilizzabile per avere un robusto modello animale per valutare scaffold per la rigenerazione osteocartilaginea.

PRIMO PROGETTO: “Valutazione della mineralografia ossea computerizzata (MOC) per la valutazione delle caratteristiche densitometriche dei siti di impianto utilizzati nei modelli animali per la valutazione di biomateriali e dispositivi biomedici.”

Introduzione

La valutazione sia di tipo qualitativo che quantitativo dell'osteointegrazione è essenziale per stabilire la capacità dell' impianto di riparare il difetto e la sua reale biofunzionalità.

La diagnostica radiologica (radiologia convenzionale, tomografia e mineralometria), particolarmente indicata per lo studio dei tessuti duri, offre uno strumento ottimo per la monitorizzazione della progressione del processo di guarigione senza essere invasiva.

La radiologia convenzionale valuta il quadro generale dell'ossificazione e del suo procedere, che rimane però strettamente legato alla interpretazione soggettiva dell'operatore, mentre non fornisce dati quantitativi riguardo la mineralizzazione del sito.

Le procedure tomografiche o mineralometriche forniscono invece valori assoluti (in Unità Hounsfield per la tomografia, e in g/cm² di idrossiapatite di calcio nella mineralometria ossea) sul grado di ossificazione, permettendo il monitoraggio del processo di guarigione nel tempo.

Scopo del lavoro

In questo studio si sono effettuate misurazioni di densitometria ossea, mediante mineralometria ossea computerizzata (MOC), in differenti modelli animali, così da ottenere valori normali di riferimento, da paragonare poi coi corrispettivi valori densitometrici nell'uomo, al fine di identificare e suggerire il modello sperimentale che si avvicini il più possibile a quello “ideale”.

Ciò è particolarmente interessante visto che, allo stato attuale, non esiste una pubblicazione che fornisca valori normali di mineralometria ossea in relazione ai diversi siti di impianto, in quanto generalmente si tende ad identificare come valori di “normalità” quelli ottenuti da controlli positivi.

L'esame MOC è stato effettuato su tibie e femori di ratto, tibie e mandibole di maiale, tibie e crani di coniglio e tibie di pecora, aree anatomiche utilizzate abitualmente negli studi sperimentali di implantologia, cercando di variare per quanto possibile razza e età, così da ottenere anche una visione d'insieme delle variabilità interspecifiche.

Materiali e metodi

- Pezzi anatomici

Nel corso di questo studio sono state eseguite scansioni densitometriche su oltre 380 pezzi anatomici, suddivisi in base alla specie, all'età o alla classe dimensionale presa in esame.

I pezzi anatomici di coniglio considerati, di razza New Zeland White, sono stati tibie e crani. Le 90 tibie di coniglio misurate erano equamente suddivise in gruppi di 4, 7 e 12 mesi di età.

Le 60 volte craniche invece provenivano da 30 soggetti di 7 mesi e da 30 i 12 mesi.

Per quanto riguarda le pecore, sono state misurate 60 tibie, di cui 30 provenienti da animali con meno di 18 mesi e 30 da animali con un'età superiore.

Per il maiale, specie della quale si sono misurate le tibie e le mandibole, sono state prese in esame oltre 100 tibie e 9 mandibole.

Per quanto riguarda le tibie, 30 erano provenienti da animali SPF (Specific Patogen Free) di 4 mesi, 30 da animali SPF di 7 mesi, 22 da animali da carne di 50 kg, 2 da animali da carne di 150 kg, 8 da scrofe da carne da riproduzione a fine carriera, di circa 300 kg, e 12 da minipig di circa 20 mesi di età.

Le 9 mandibole misurate provenivano da 7 minipig di circa 20 mesi, e 2 da maiali di 50 kg.

- Esame radiografico

Tutti i preparati anatomici della tibia, prima di essere sottoposti a esame mineralometrico, sono stati valutati mediante esame radiografico, al fine di escludere la presenza di lesioni ossee macroscopiche.

- Studio densitometrico

Lo studio densitometrico è stato eseguito presso la Sezione di Radiologia Veterinaria Clinica e Sperimentale del Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie della Facoltà di Medicina Veterinaria di Milano utilizzando il sistema Hologic QDR 1000/Plus®, un densitometro DEXA single beam a energia pulsata (70-140kVp).

Per lo studio dell'epifisi prossimale della tibia, della pecora, del maiale e del coniglio, sono state eseguite quattro misurazioni mineralometriche: una generale (GEN) del segmento osseo in esame e tre, su differenti ROI (Region Of Interest), a livello di metafisi prossimale (R1, 0,09 cm² nel coniglio e 0,25 cm² in maiale e pecora), a livello di diafisi prossimale (R2, 0,09 cm² nel coniglio e 0,25 cm² in maiale e pecora) e a livello di corticale diafisaria (R3, 0,09 cm² in tutti i soggetti).

Per quanto riguarda il ratto, a causa delle esigue dimensioni, si è preferito misurare due sole ROI nella tibia e una singola nel femore (0,02 cm²), specificatamente nella tibia una ROI a livello di epifisi prossimale e una a livello diafisario, mentre nel femore si è valutata la densità della corticale diafisaria.

Per quanto riguarda la mandibola di maiale si è misurata una sola ROI 0,25 cm² a livello di corticale nella porzione aborale del corpo mandibolare.

Per quanto riguarda le misurazioni effettuate sul cranio, il campione in esame era costituito da un tassello osseo di 3x3 cm, prelevato in sede parietale, sulla linea mediale, in modo da comprendere entrambe le ossa in esame.

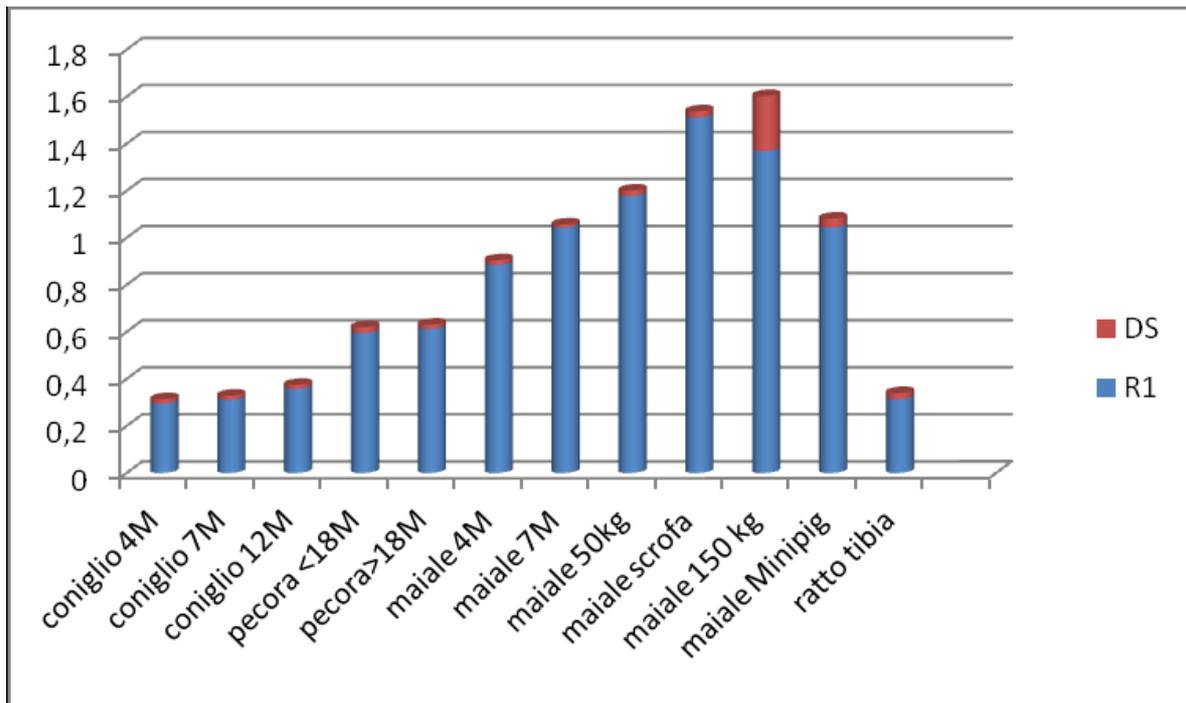
Sono inoltre state prese in esame due ROI (R1 e R2), aventi la medesima area (0,49 cm²), situate lateralmente alla cresta longitudinale mediana, in corrispondenza dell'osso parietale.

Tutti i dati ricavati sono quindi stati tabulati e analizzati mediante analisi della varianza (ANOVA) e post hoc test con correzione di Bonferroni, valutando come variabile oggetto di studio l'età dei soggetti.

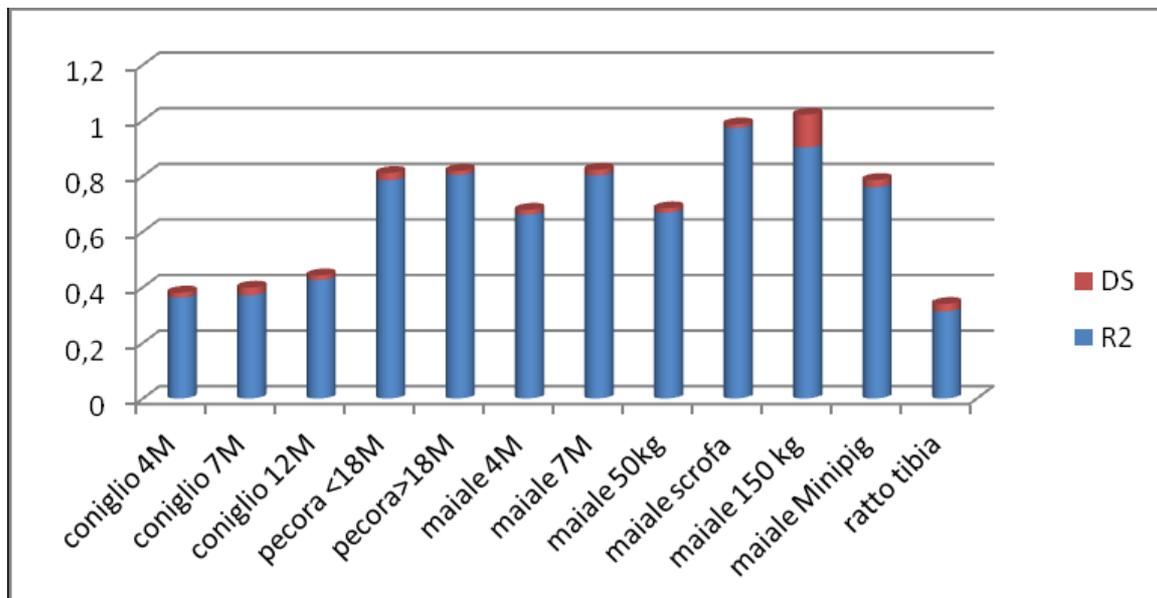
Di seguito sono illustrati i grafici che rappresentano i dati medi da noi ottenuti, con deviazione standard, suddivisi in base alla Region Of Interest, per facilitarne il confronto.

I dati medi e le deviazioni standard delle mandibole di minipig e del cranio di coniglio sono stati inseriti nel grafico di R3 in quanto, anche se effettuati in diversa sede anatomica, si tratta di misurazioni solo corticali.

Il primo grafico rappresenta i dati ottenuti in R1. La R1 analizza la metafisi prossimale della tibia (0,09 cm² nel coniglio e 0,25 cm² in maiale e pecora). È anche compresa la media e deviazione standard dei dati ottenuti nel ratto a livello di epifisi prossimale (0,02 cm²) dello stesso segmento osseo.

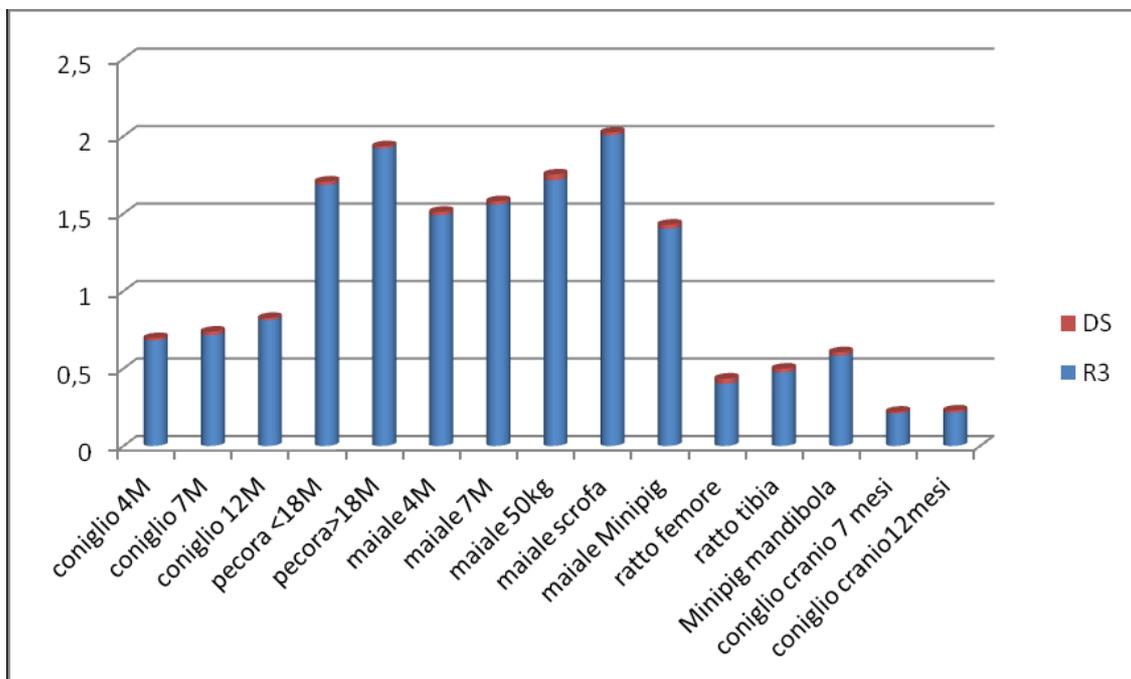


Il secondo grafico rappresenta i dati ottenuti in R2. La R2 analizza la diafisi prossimale della tibia (0,09 cm² nel coniglio e 0,25 cm² in maiale e pecora). È anche compresa la media e deviazione standard dei dati ottenuti nel ratto a livello di epifisi prossimale (0,02 cm²) dello stesso segmento osseo.



L'ultimo grafico rappresenta i dati ottenuti in R3. La R3 analizza la corticale diafisaria tibiale (0,09 cm² in tutti i soggetti). Sono anche compresi i valori relativi alle misurazioni ottenute a livello diafisario sulle tibie e sui femori di ratto (0,02 cm²), a livello di corticale

del corpo mandibolare di minipig (0,25 cm²) e a livello dell'osso parietale (0,49 cm²) sui crani di coniglio.



Lo studio mineralometrico eseguito ha permesso di identificare i valori di idrossiapatite di calcio che possono essere considerati normali per i siti indagati in relazione ai differenti modelli animali, all'età, alla razza ed al peso dei soggetti.

L'analisi statistica dei dati ottenuti, che ha portato all'identificazione dei valori medi ed alla deviazione standard dei dati da noi raccolti, è stata effettuata con metodo ANOVA e post hoc test con correzione di Bonferroni, valutando come variabile oggetto di studio l'età dei soggetti.

Nel valutare il processo di mineralizzazione ossea, bisogna sempre tener presente il grado di maturazione scheletrica dei soggetti e la loro conformazione fisica.

Nel coniglio, la chiusura della fisi tibiale prossimale avviene attorno ai 6-7 mesi, nel maiale dai 24 mesi in poi e nella pecora intorno ai 20 mesi.

Oltre a questo, è ben evidente che all'aumentare delle dimensioni del modello animale in esame, aumenta di conseguenza la concentrazione assoluta di idrossiapatite.

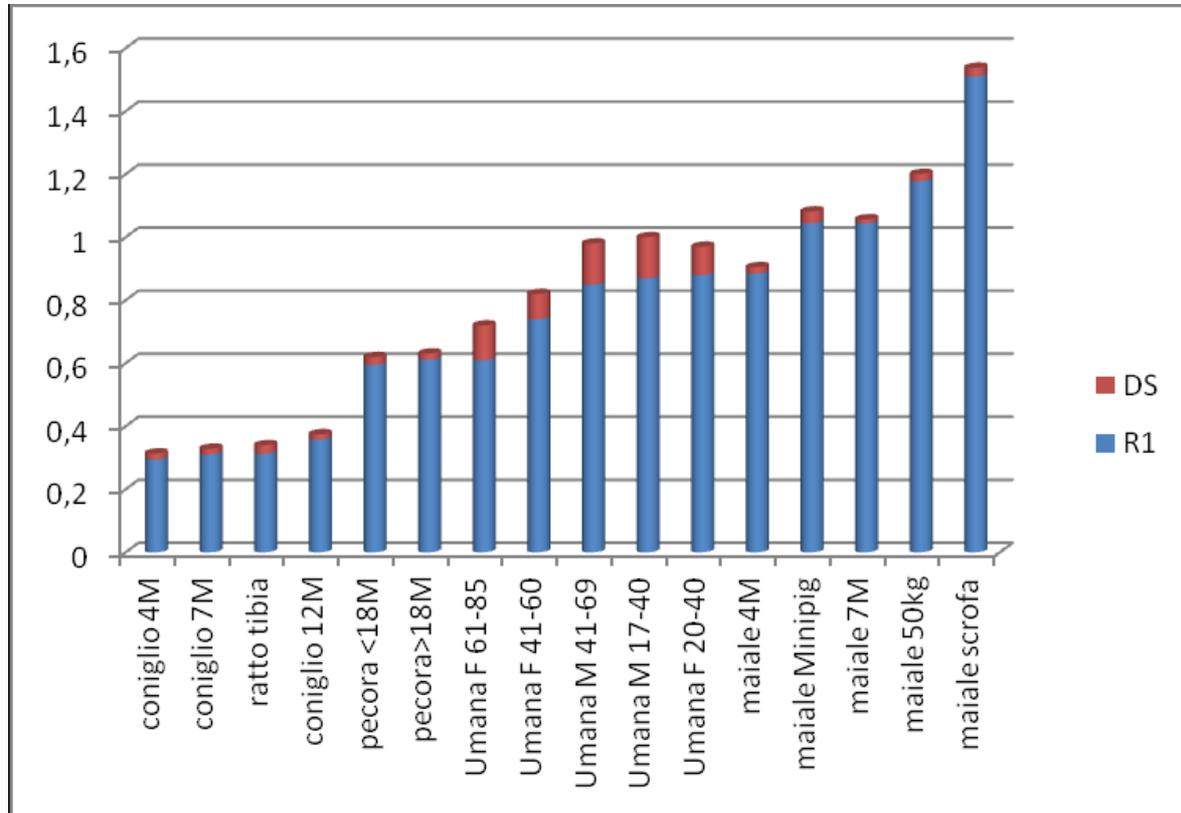
Il ratto e il coniglio quindi presentano valori di densitometria ossea inferiori rispetto a soggetti di mole maggiore, come maiale e pecora, ma il secondo evidenzia un marcato aumento (+ 15%) della componente minerale ossea dai 7 mesi in poi.

Per validare i nostri risultati si è deciso di confrontarli con i corrispettivi in campo umano, già presenti in letteratura. Dalla presente analisi è stato deciso di escludere le tibie di maiale di 150 kg e le mandibole di maiale da 40 kg, in quanto il campione analizzato risultava numericamente insufficiente per ottenere una normalizzazione dei dati e una sua validazione statistica.

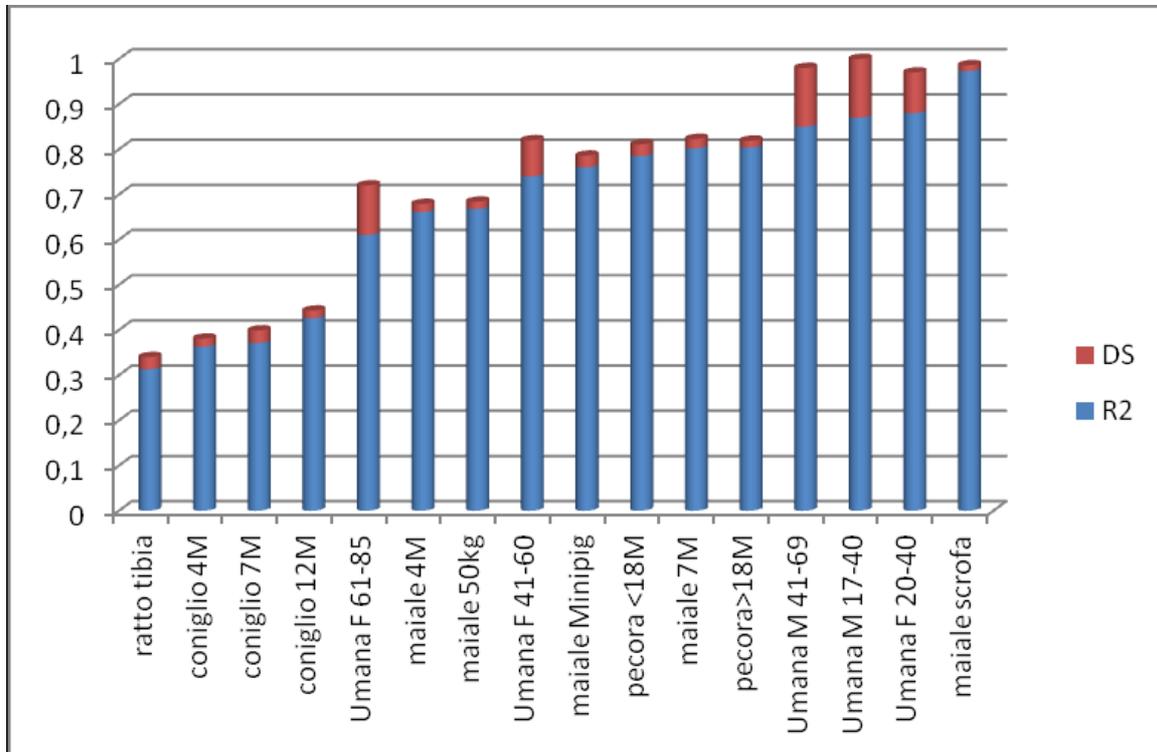
I dati riferiti alla parte prossimale della tibia (R1 ed R2 delle tibie ovine, suine e di coniglio e la misurazione epifisaria delle tibie di ratto) sono stati confrontati con dati normali umani rilevati nella parte distale della tibia.

Si sono inoltre confrontati i dati relativi all'osso compatto (R3 delle tibie, misurazione diafisaria della tibia e del femore di ratto, misurazione delle mandibole di maiale e del cranio dei conigli) sono stati confrontati con valori normali di densità ossea mascellare e mandibolare umana, riportati in letteratura e con valori riferiti alla porzione mediana della tibia.

Riportiamo di seguito il grafico rappresentante i dati ottenuti in R1 (medie e relative deviazioni standard) a confronto con i valori medi e le deviazioni standard di densità rilevate nell' uomo, in diversi gruppi divisi per sesso ed età a livello di epifisi prossimale della tibia.



Il grafico successivo rappresenta i dati ottenuti in R2 (medie e relative deviazioni standard) a confronto con i valori medi e le deviazioni standard di densità rilevate nell'uomo, in diversi gruppi divisi per sesso ed età a livello di epifisi prossimale della tibia.



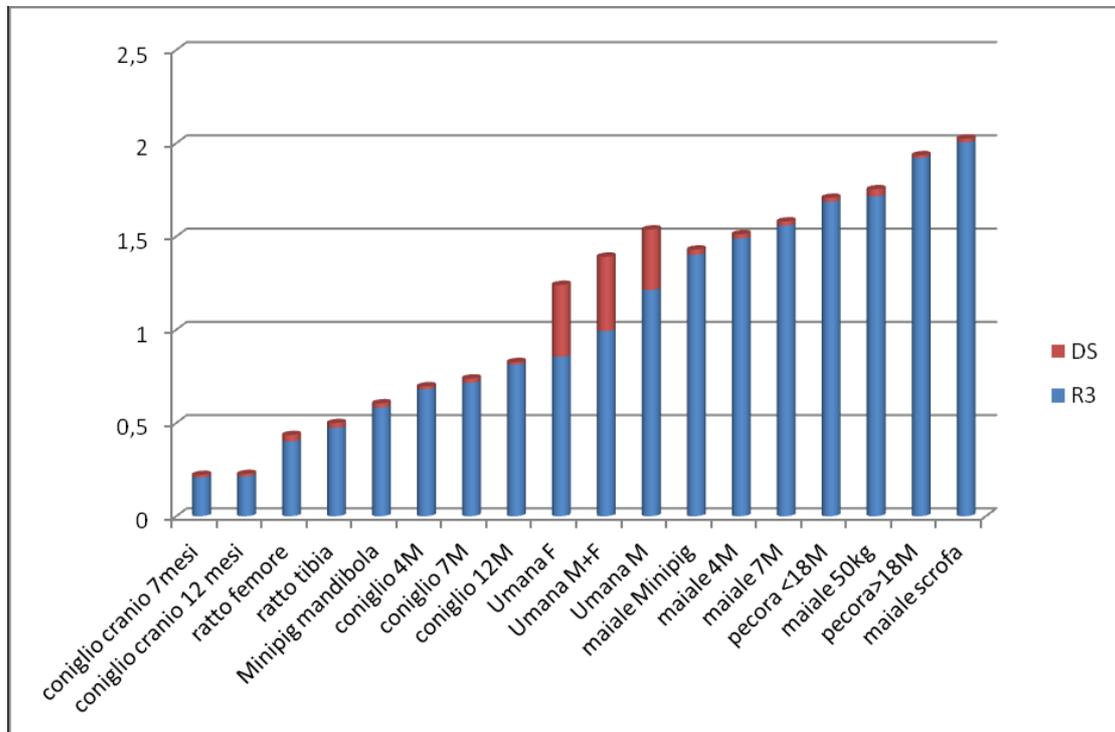
Rispetto ai nostri valori di R2 però quelli dell'uomo, nelle diverse fasce di età e sesso, vanno a distribuirsi in maniera randomizzata nel grafico.

In particolare si rileva come i valori riferiti alla popolazione di sesso femminile di età compresa tra 20 e 40 anni e i valori della popolazione di sesso maschile di tutte le età, pressochè sovrapponibili anche in queste misurazioni, sono compresi, in ordine decrescente tra quelli della scrofa (i massimi rappresentati nel nostro studio) e quelli della pecora adulta.

I valori della popolazione di sesso femminile di età compresa tra 40 e 60 anni si posizionano fra minipig e maiale di 50 kg mentre quelli della popolazione di sesso femminile di età compresa tra 61 e 85 anni sono compresi fra maiali di 4 mesi e coniglio adulto.

Il grafico seguente rappresenta i dati ottenuti in R3 sulle tibie, a livello diafisario sulle tibie e sui femori di ratto, a livello di corticale del corpo mandibolare di minipig e a livello dell'osso parietale sui crani di coniglio (valori "monocorticali", medie e relative deviazioni

standard) confrontati con i valori medi e le deviazioni standard di densità rilevate nell'uomo, in diversi gruppi divisi per sesso ed età, a livello di porzione mediana della dialisi della tibia.



CONCLUSIONI

In relazione ai dati ottenuti nel nostro lavoro si può supporre che, per una sperimentazione che scelga come sito di interesse la tibia prossimale per la valutazione di una procedura da applicare successivamente nell'uomo, il modello migliore sia lo stesso segmento anatomico del maiale di 4 mesi, seguito, usando il medesimo punto anatomico, dal modello animale pecora, rispetto ad altri modelli come il coniglio.

Se, invece del piatto tibiale, si ipotizzi di utilizzare l'area metafisaria della cresta tibiale, i valori di densimetria di pecora e maiale, ad eccezione delle scrofe, si concentrano all'interno dei due gruppi estremi dell'uomo (donna giovane e donna anziana). Diversamente, andando a valutare la zona di tessuto osseo compatto della tibia di coniglio adulto e di minipig si osserva che racchiudono il cluster relativo all'uomo.

Andando invece a valutare zone di interesse ortodontico nell'uomo, il femore di ratto e il cranio di coniglio presentano valori più vicini al valore medio dell'osso mascellare umano, nella sua zona più posteriore, mentre il mascellare umano nella sua zona più anteriore ha valori più vicini alla mandibola di minipig o alla tibia di ratto.

I valori del corpo mandibolare umano vengono invece approssimati per difetto dalla corticale della tibia di coniglio adulto e, per eccesso, dalla corticale della tibia di minipig.

È chiaro che ciascuna delle specie qui discusse dimostra vantaggi e svantaggi in termini di adeguatezza come modello sperimentale per la valutazione della risposta biologica del tessuto osseo

Mentre nessuna specie soddisfa i requisiti di un ideale modello animale, la comprensione delle differenze macroscopiche e microscopiche, dei diversi meccanismi di rimodellamento e di deposizione ossea è in grado di migliorare la scelta dei modelli animali e l'interpretazione dei risultati degli studi in vivo.

SECONDO PROGETTO: “Valutazione in vivo del grado di osteointegrazione rispetto alla variazione di impedenza.”

Problema clinico

Attualmente la tipologia d'impianto di protesi d'anca a cui si ricorre più frequentemente nella pratica clinica è l'impianto a press-fit. Se l'impianto è avvenuto con successo è molto affidabile nel garantire la stabilità secondaria (stabilità a lungo termine) Tale protocollo terapeutico è problematico per quanto riguarda la stabilità primaria (immediatamente successiva all'intervento): possono insorgere fenomeni di mobilizzazione della protesi. La mobilizzazione più frequente è quella a carico dell'interfaccia stelo-femore che è quasi sempre causata da una mancata osteointegrazione dovuta ad un intervento d'impianto non perfetto.

Le indagini che vengono attualmente condotte nella pratica clinica per la diagnosi e la valutazione della mobilizzazione vengono svolte dopo la manifestazione sintomatologica del paziente. Il paziente portatore di una protesi d'anca mobilizzata lamenta una forte sintomatologia dolorosa che limita i movimenti dell'anca e la deambulazione. Questa però è una fase in cui la situazione è ormai compromessa: l'unica soluzione risolutiva al problema, infatti, risulta attualmente il reimpianto della protesi.

Si potrebbe dunque evitare il reimpianto della protesi, a patto di riuscire a diagnosticare la mobilizzazione prima che la situazione sia troppo grave (cioè prima ancora che il paziente avverta dolore). Si rende quindi indispensabile la messa a punto di una metodologia in grado di monitorare l'osteointegrazione e successivamente fornire informazioni di carattere preventivo sullo stato dell'impianto, per una diagnosi tempestiva della mobilizzazione.

Una valida possibilità per il raggiungimento di questo scopo potrebbe essere offerta dalla sensorizzazione della struttura protesica, per un monitoraggio post-operatorio (fase di osteointegrazione 0-12 mesi) e a lungo termine (1-15 anni) dello stato dell'impianto.

Per simulare l'impianto protesico, sono state impiantate nell'osso dei suini delle viti in titanio sabbiato munite di elettrodo e verrà collocato sottopelle un circuito di misura collegato alle viti mediante cateteri bipolari

Materiali e metodi

I suini sono stati sottoposti ad un intervento che prevedeva l'impiantato di 4 viti (diametro 8 mm lunghezza variabile: 20mm, 25mm) in titanio (2 per ogni tibia, una a contatto con osso spongioso, una a contatto con osso corticale) munite di elettrodo. In 3 animali sono stati alloggiati sottocute sulla faccia interna della coscia due sistemi wireless a bassa potenza

(bluetooth con potenza emissiva minore di 1mW) in grado di misurare l'impedenza, collegati alle viti attraverso cateteri di collegamento (40 cm – standard IS-1).

Sono state posizionate bilateralmente 2 viti in ciascuna cresta tibiale, 4 impianti in ciascun animale, per un totale di 24 impianti posizionati con la piattaforma rasente la cresta ossea mesiale e distale.

E' stata preparata chirurgicamente una piccola tasca sottocutanea nella faccia mediale della coscia per l'alloggiamento del trasduttore e l'elettrodo collegato è stato fatto scorrere sottocute sino a raggiungere le viti.

Test Biomeccanico (Rtq)

Il Mark 10 strumento per la valutazione del torque calibrato a valori ASTM standard viene usato per effettuare il test del torque di rimozione. (RTQ). L'apparecchio è uno strumento digitale che registra il picco massimo di forza liberata misurata in Newton/cm.

Risultati

A causa di problematiche dovute alla rottura del sistema wireless impiantato si sono potute analizzare solo le misure effettuate con l'impedenziometro professionale RLC300.

Per ciascuna serie di misure a frequenza diversa è stata effettuata un'analisi di tipo non parametrico.

Per ciascuna vite è stata calcolata la mediana, il 25° e 75° percentile per ogni frequenza di misura.

Data l'elevata disomogeneità delle misure tra una vite e l'altra e visto che l'interesse dell'esperimento era quello di correlare il grado di osteointegrazione rispetto alla variazione di impedenza, per ciascuna vite è stato calcolata la variazione di impedenza rispetto al suo valore iniziale.

Tutte le viti sono state classificate in tre gruppi in funzione dell'esito iniziale e finale dell'impianto.

- Impianto stabile ed espianto stabile: Successo
- Impianto stabile ed espianto mobilizzato: Fallimento
- Impianto mobilizzato: Escluse dall'analisi seguente.

MAIALE		MESE											
		0				1				2			
		SXp	SXd	DXp	DXd	SXp	SXd	DXp	DXd	SXp	SXd	DXp	DXd
M1	1	M	OK										
M2	2	OK	M	OK	OK	OK	OK	OK	OK				
M3	368	OK	OK	OK	OK					OK	OK	OK	OK
M4	369	M	OK	OK	OK					M	M	M	M
M5	371	OK	OK	OK	OK	M	M	M	M				
M6	372	OK	OK	OK	OK					OK		OK	OK

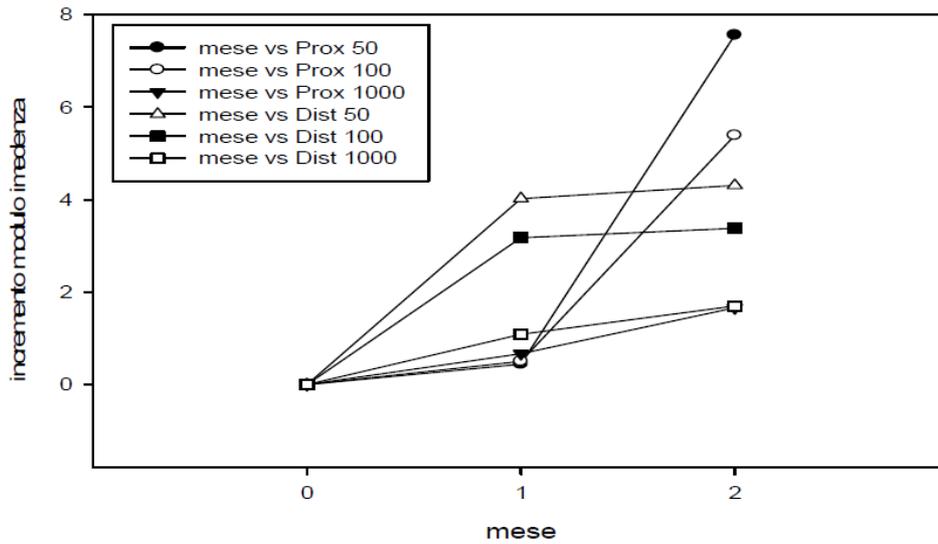
LEGENDA	
	successo
	fallimento
	non valido
M	Mobilizzato
OK	stabile

CLASSIFICAZIONE DELLE VITI.

Seguendo la classificazione precedente i dati relativi alle singole viti sono stati raggruppati e mediati secondo i due gruppi: Successo e Fallimento al variare della posizione e della frequenza.

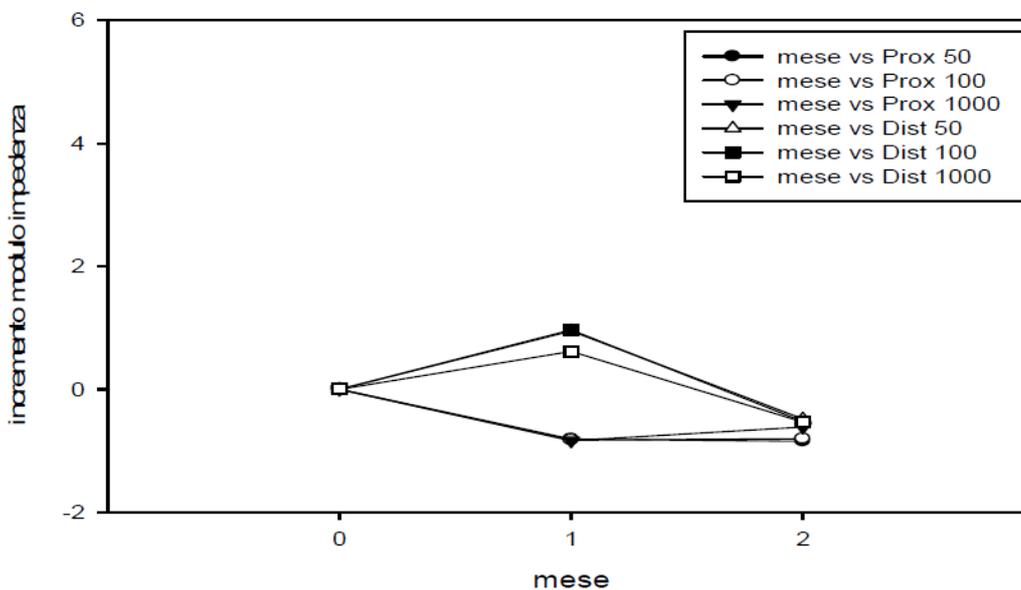
Potendo effettuare per ciascun animale solo due misure (impianto ed espianto) ed essendoci 3 espienti ad un mese e tre espienti a due mesi, i successivi grafici sono stati fatti ipotizzando di aver fatto tre misure (2 vere ed una virtuale) su tre maiali ciascuno con la durata dell'impianto pari a due mesi.

Successo (Posizione, Frequenza)



Tutti gli impianti classificati con successo presentano un incremento del modulo dell'impedenza monotono crescente

Fallimento (Posizione, Frequenza)

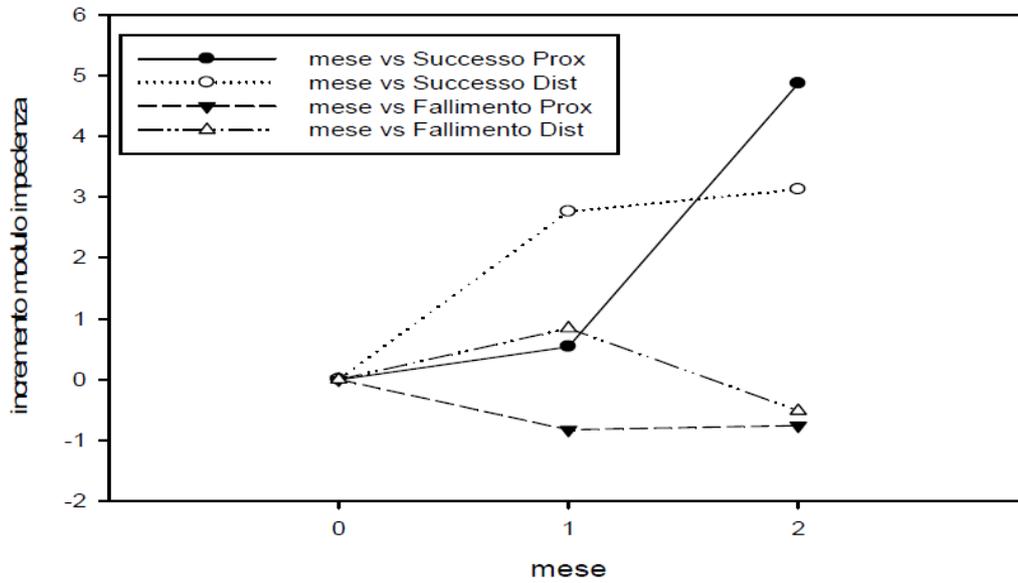


Tutti gli impianti classificati con Fallimento presentano un incremento del modulo dell'impedenza non monotono

Nei due grafici precedenti la tendenza dell'incremento del modulo dell'impedenza rispecchia bene la classificazione di Successo fatta dal chirurgo mentre per quanto riguarda l'insuccesso, tale classificazione vale solo per il secondo mese.

Mediando le misure a frequenze dei due gruppi, si può notare come anche in questo caso la separazione tra i due gruppi (successo e fallimento) è notevole solo al secondo mese.

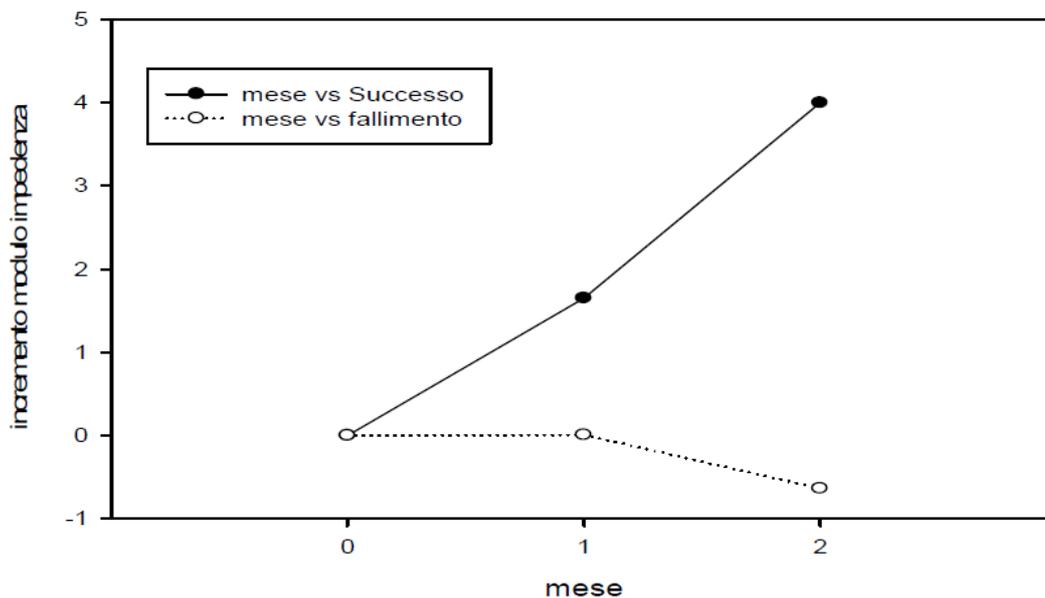
Riepilogo (Posizione)



Suddivisione dei due gruppi in funzione della sola posizione

Infine mediando tutte le misure all'interno dei due gruppi, si ottiene il grafico seguente, dove è possibile notare una netta distinzione dei due gruppi sin dal primo mese.

Riepilogo



Media complessiva dei due gruppi

CONCLUSIONI

Dalle misure effettuate è evidenziabile una possibile correlazione tra l'osteointegrazione e l'incremento del modulo dell'impedenza elettrica.

Essendo un esperimento pilota, il numero degli animali coinvolti non è sufficiente a confermare o smentire tale interpretazione.

Un primo passo che potrebbe risultare interessante potrebbe essere quello di comparare il valore dell'impedenza con l'analisi istologica dei campioni espantati rispettivamente a 1 e 2 mesi.

TERZO PROGETTO: “Valutazione ortotopica nel suino della riparazione osteocondrale mediante un nuovo scaffold composito”

Ipotesi di lavoro

Si è ipotizzato che la realizzazione di un modello osteocondrale possa rappresentare un possibile strumento per la riparazione delle lesioni della cartilagine articolare. Infatti, la problematica legata alla integrazione osso-cartilagine, che rappresenta uno dei limiti delle attuali metodiche di riparazione, sarebbe superata in laboratorio, per mezzo di un modello osteocondrale, dove la componente di cartilagine ingegnerizzata verrebbe integrata in vitro, macroscopicamente e microscopicamente ad un supporto osseo o osteocompatibile. La necessità di ottenere un sostituto osteocondrale costituito da due parti così strutturalmente differenti tra loro, quali la componente ossea e la componente cartilaginea, ha portato alla decisione di creare un unico composito bistrato i cui due strati risultavano saldamente interfacciati tra loro.

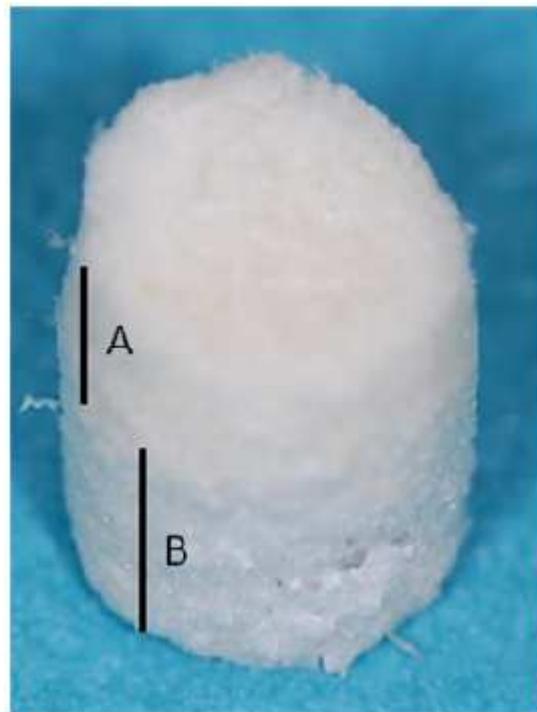


Immagine rappresentativa dello scaffold osteocondrale realizzato in questo studio. La “porzione condrale” (A) presenta le seguenti dimensioni: 2 mm di altezza x 9 mm di larghezza (diametro). La “porzione ossea” (B) presenta le seguenti dimensioni: 6 mm di altezza x 9 mm di larghezza (diametro).

La “porzione condrale” dello scaffold è stata quindi abbinata alla componente cellulare, rappresentata da condrociti autologhi, mentre la “porzione ossea” è acellulata, con lo

scopo di integrarsi con l'osso nativo sottostante la lesione cartilaginea e di poter essere eventualmente popolata successivamente dalle cellule dell'osso. Tale studio è stato strutturato in due parti:

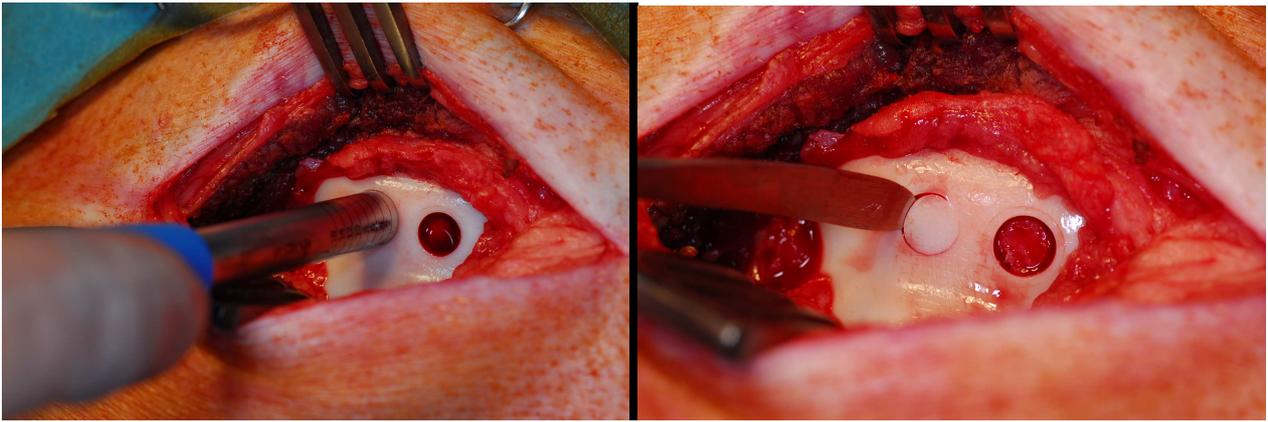
- 1) Ottimizzazione della coltura in vitro pre-impianto (solo sulla fase condrale dello scaffold): utilizzo componenti additivi e di diversi tempi di coltura per ottimizzare la maturazione in vitro del composto;
- 2) Validazione dello scaffold (fase condrale e fase ossea) *in vivo* in lesioni sperimentalmente indotte in suini ibridi Goland di 80 kg: confronto tra scaffold cellulato, acellulato e riparazione spontanea a distanza di 3 mesi dall'impianto

Materiali e metodi

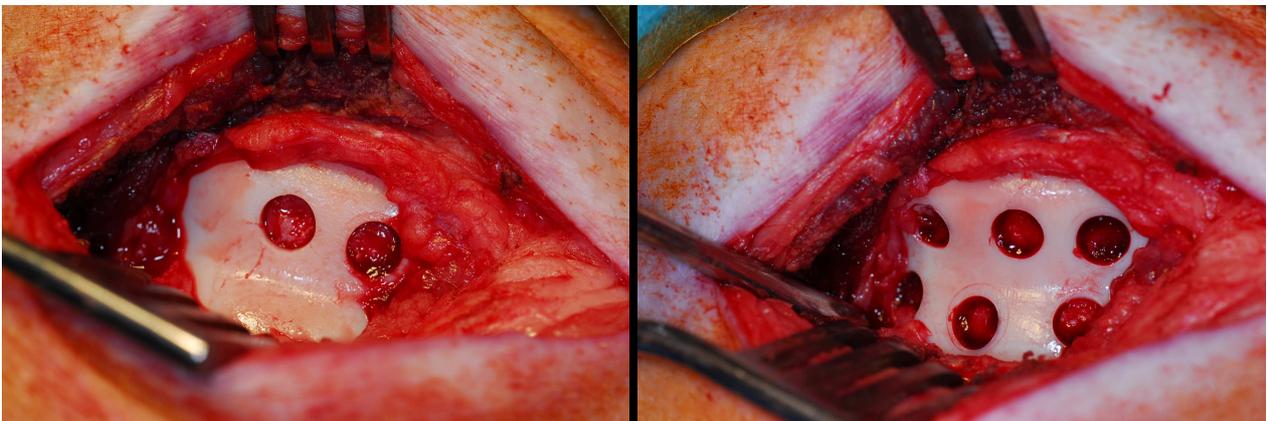
Il modello osteocondrale proposto in questo progetto è stato validato in lesioni cartilaginee sperimentalmente indotte in suini convenzionali ibridi Goland di circa 80 kg. Il protocollo sperimentale è stato articolato in diverse fasi, che hanno previsto due interventi chirurgici:

- 1) Prelievo di 6 biopsie condrali (7x2mm) dalla troclea tibiale di ciascun maiale (n°= 6) [1° chirurgia].
- 2) Isolamento dei condrociti autologhi dalle 6 biopsie di ciascun animale.
- 3) Espansione dei condrociti autologhi in coltura monostrato (2 passaggi, 2 settimane).
- 4) Semina dei condrociti autologhi nella porzione condrale dello scaffold.
- 5) Coltura in vitro dello scaffold osteocondrale per 3 settimane.
- 6) Impianto dello scaffold cellulato e, come controllo, di quello non cellulato [2° chirurgia].

Nella prima chirurgia sono state indotte delle lesioni condrali, in seguito al prelievo delle biopsie, che nell'arco di un mese circa, ovvero il tempo necessario per sviluppare in vitro il sostituto osteocondrale, hanno riparato spontaneamente in maniera non completa e con un tessuto biomeccanicamente non valido.

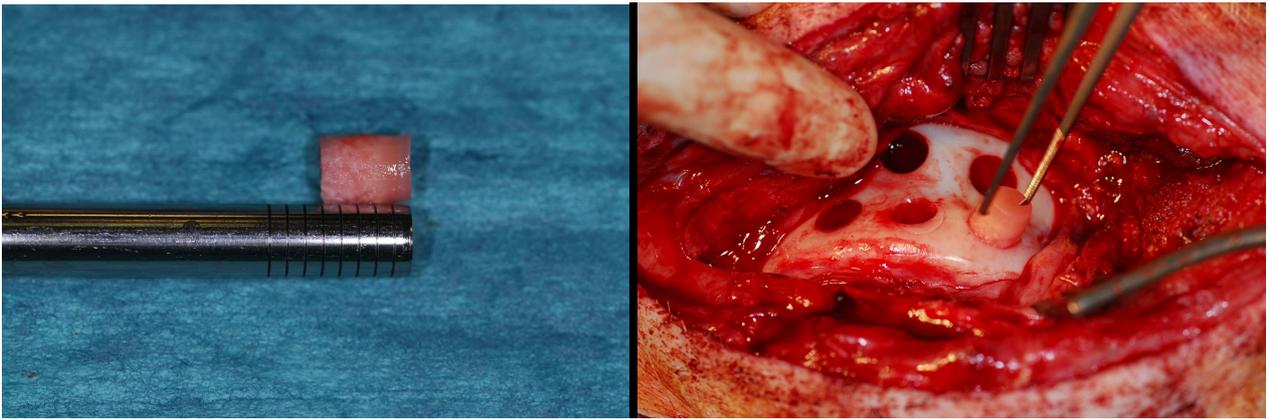


Prelievo del tessuto cartilagineo.



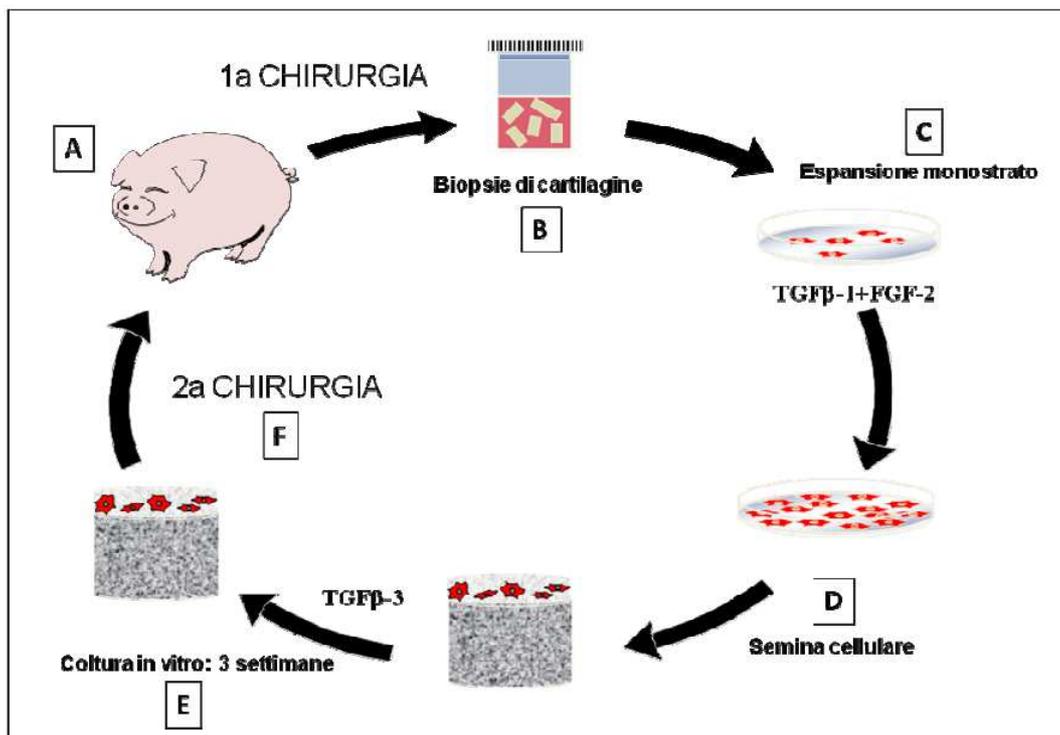
Lesioni condrali in seguito al prelievo delle biopsie

Nella seconda chirurgia tale tessuto di riparazione è stato rimosso creando una lesione osteocondrale di dimensioni maggiori (9mm di diametro x10mm di profondità) tale da accogliere perfettamente lo scaffold osteocondrale. In ciascuna troclea, sono stati impiantati due scaffold seminati con cellule autologhe e due scaffold acellulati, mentre due lesioni non sono state trattate in modo da ottenere un tessuto di riparazione spontanea come controllo.



Impianto degli scaffold

Per quanto riguarda lo scaffold cellulato, questo è stato seminato con fibrina e coltivato in vitro per 3 settimane, come stabilito dagli esperimenti di ottimizzazione in vitro.



Disegno sperimentale. A) Con una prima chirurgia, sono state indotte 6 lesioni condrali, nella troclea dx di 6 animali, prelevando 6 biopsie condrali di dimensioni 2mm di altezza x 7mm di diametro. B) Le biopsie di cartilagine di ciascun animale sono state digerite e i condrociti derivanti dalla digestione sono stati messi in coltura per l'espansione in monostrato. C) I condrociti sono stati espansi in vitro per 2 passaggi in presenza di TGF β -1 e FGF-2. D) Una volta espansi, i condrociti di ciascun animale sono stati risospesi in fibrinogeno e seminati sulla fase condrale di uno scaffold osteocondrale. E) Con una seconda chirurgia, gli scaffold cellulati sono stati impiantati, insieme ai rispettivi controlli non cellulati, nella troclea di ciascun animale dopo aver rimosso il tessuto di riparazione formatosi nella lesione.

Al termine del periodo di sperimentazione (3 mesi) gli animali sono stati soppressi, gli scaffold e i tessuti di riparazione sono stati espantati e valutati in base alle proprietà biochimiche e alla morfologia (SAFRANIN-O). I diversi gruppi sperimentali sono stati confrontati tra loro (cartilagine nativa, scaffold senza cellule, scaffold con cellule, tessuto di riparazione)

Gruppi sperimentali/animale



Schema dei gruppi sperimentali. Nella troclea di ciascun animale sono stati impiantati 2 scaffold seminati con cellule autologhe, 2 scaffold non cellulati, mentre 2 lesioni non sono state trattate consentendo la formazione di un tessuto di riparazione spontanea.

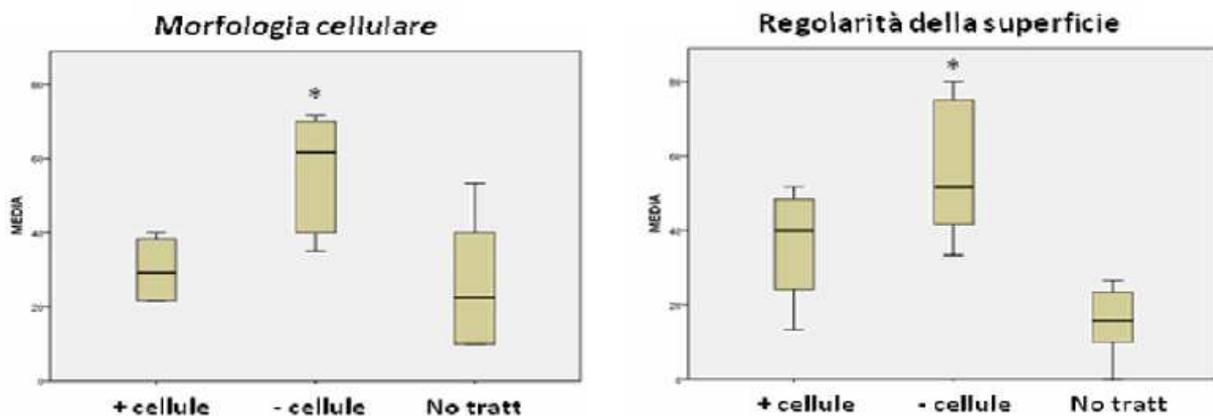
Dal punto di vista morfologico, i diversi campioni sono stati assegnati diversi valori in base a diverse caratteristiche, secondo i parametri e la scala di punteggio ICRS II.

ICRS II Parameters^a

Histological Parameter	Score
1. Tissue morphology (viewed under polarized light)	0%: Full-thickness collagen fibers 100%: Normal cartilage birefringence
2. Matrix staining (metachromasia)	0%: No staining 100%: Full metachromasia
3. Cell morphology	0%: No round/oval cells 100%: Mostly round/oval cells
4. Chondrocyte clustering (4 or more grouped cells)	0%: Present 100%: Absent
5. Surface architecture	0%: Delamination, or major irregularity 100%: Smooth surface
6. Basal integration	0%: No integration 100%: Complete integration
7. Formation of a tidemark	0%: No calcification front 100%: Tidemark
8. Subchondral bone abnormalities/marrow fibrosis	0%: Abnormal 100%: Normal marrow
9. Inflammation	0%: Present 100%: Absent
10. Abnormal calcification/ossification	0%: Present 100%: Absent
11. Vascularization (within the repaired tissue)	0%: Present 100%: Absent
12. Surface/superficial assessment	0%: Total loss or complete disruption 100%: Resembles intact articular cartilage
13. Mid/deep zone assessment	0%: Fibrous tissue 100%: Normal hyaline cartilage
14. Overall assessment	0%: Bad (fibrous tissue) 100%: Good (hyaline cartilage)

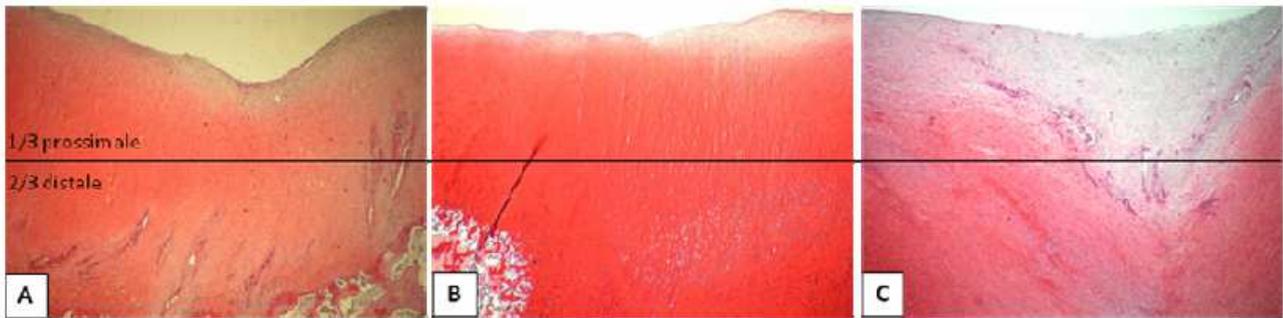
Parametri secondo la scala ICRS II (International Cartilage Repair Society). Ciascun parametro viene valutato secondo una scala da 0 a 100.

Tale analisi ha mostrato una significativa differenza degli scaffold non cellulati, rispetto a quelli cellulati e al tessuto di riparazione, in termini di morfologia cellulare e recupero della zona di superficie della cartilagine articolare:



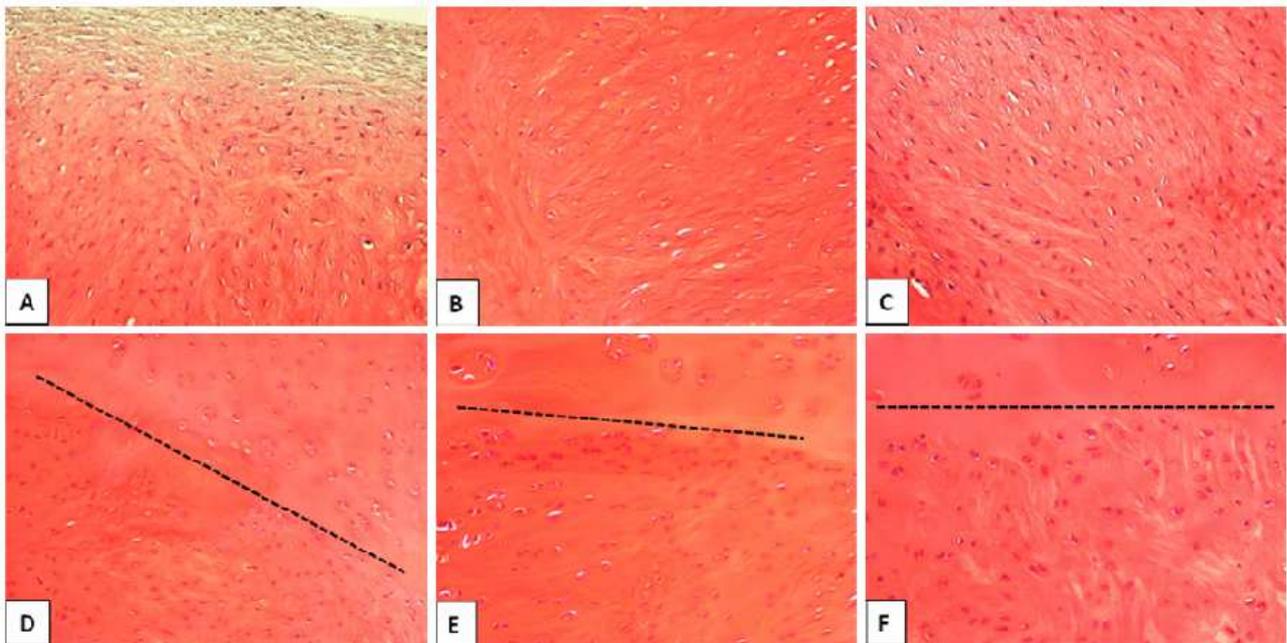
Parametri ICRS II risultati significativi nel confronto tra i diversi gruppi sperimentali. Gli scaffold non cellulati mostrano un significativo ($P < 0.05$) incremento negli indici di morfologia cellulare e regolarità della superficie.

tali indici sono infatti maggiori nello scaffold non cellulato rispetto agli altri gruppi sperimentali e trovano riscontro nell'analisi istochimica per i GAGs con SAFRANINA-O.



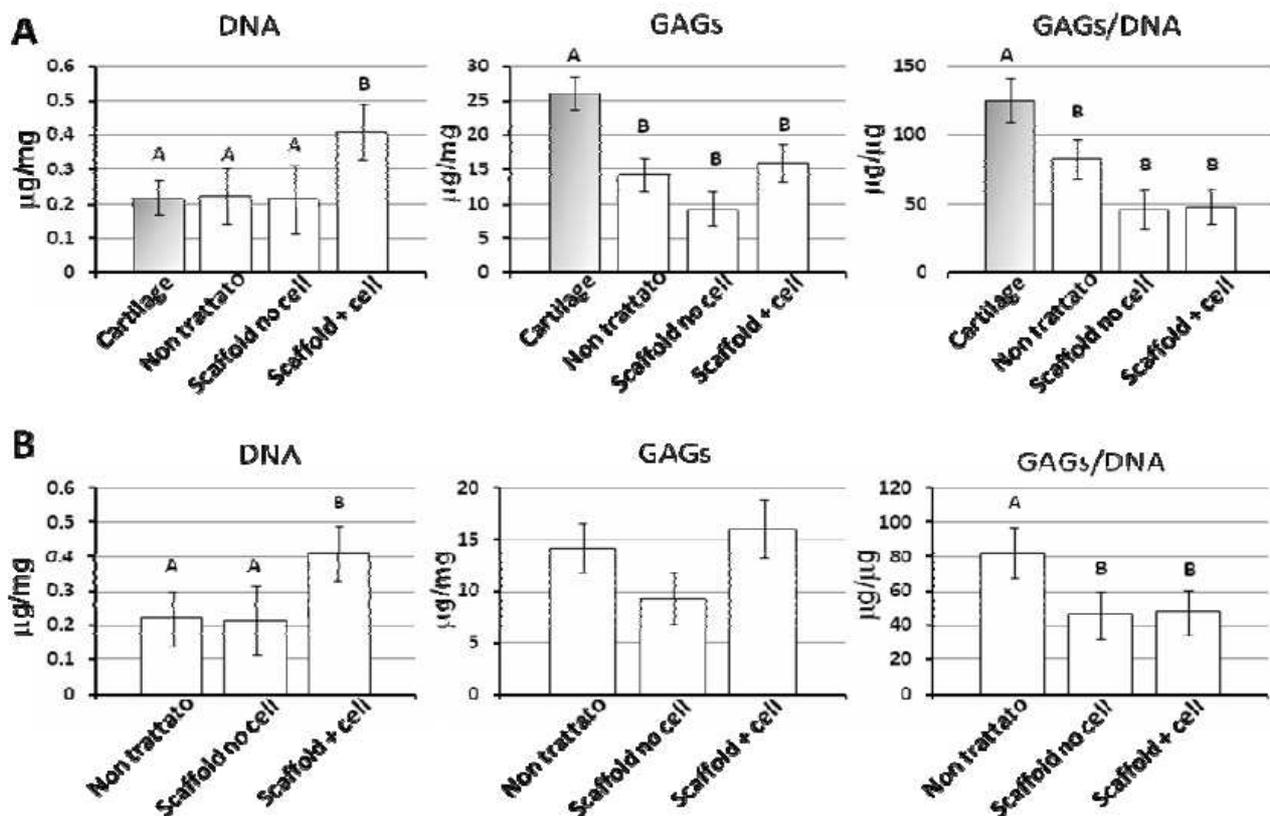
Analisi istochimica (SAFRANINA-O) dei campioni sperimentali prelevati dalla troclea dei diversi animali a distanza di 3 mesi dall'impianto. Valutazione del terzo superficiale della zona di riparazione: A) Tessuto di riparazione: si osserva un avvallamento del tessuto con irregolarità del margine superficiale. La metacromasia per SAFRANINA-O risulta diminuita; si osserva anche neoformazione vasale; B) Scaffold non cellulato: la superficie risulta abbastanza lineare, con modesta irregolarità superficiale. Metacromasia buona ed uniforme in tutta la zona considerata. Assenza di neoformazione vasale; C) Scaffold cellulato: la superficie presenta un lieve avvallamento, con modesta irregolarità superficiale. La metacromasia risulta scarsa. Evidente neoformazione vasale.

Dall'analisi morfologica emerge infatti un miglior quadro di riparazione nel gruppo sperimentale dello scaffold non cellulato caratterizzato dalla presenza di un margine superficiale più regolare, senza avvallamenti, e da una componente cellulare con morfologia prevalentemente condrocitaria o simil-condrocitaria; al contrario, i gruppi sperimentali rappresentati dallo scaffold cellulato e dal tessuto di riparazione sono caratterizzati da un margine superficiale più irregolare, avvallato e caratterizzato dalla presenza di cellule prevalentemente a morfologia simil-fibroblastica.



Analisi istochimica (SAFRANINA-O) dei campioni sperimentali prelevati dalla troclea dei diversi animali a distanza di 3 mesi dall'impianto. Valutazione della morfologia cellulare nella zona centrale di riparazione (A-C): A) Tessuto di riparazione: la porzione più superficiale si presenta acellulata; nella zona sottostante le cellule si presentano allungate e prive di lacune (simil fibroblasti). B) Scaffold non cellulato: le cellule si presentano con morfologia ovale e con presenza di lacune in alcuni casi. C) Scaffold cellulato: le cellule si presentano allungate e con qualche lacuna (rimane l'aspetto di simil fibroblasti). Valutazione della morfologia cellulare nella zona di margine (indicata dal tratteggio) tra tessuto sano e quello di riparazione(D-F). D) Tessuto di riparazione: si osserva la presenza di qualche cluster di condrociti in entrambi i margini; le cellule si presentano rotondeggianti, senza la presenza di lacune. E) Scaffold non cellulato: si osserva la presenza di qualche cluster di condrociti in entrambi i margini; le cellule si presentano rotondeggianti, ed in alcuni casi circondati da lacune. F) Scaffold cellulato: si osserva la presenza di qualche cluster di condrociti in entrambi i margini; le cellule si presentano rotondeggianti, senza la presenza di lacune.

L'analisi biochimica dei campioni ha permesso di determinarne la cellularità, in termini di contenuto di DNA, e la produzione di GAGs. Da tale analisi è emerso un livello di cellularità maggiore negli scaffold cellulati e costante tra gli altri gruppi sperimentali rispetto alla cartilagine nativa; la produzione di GAGs è invece inferiore in tutti i campioni rispetto alla cartilagine articolare e risulta minore negli scaffold cellulati e non cellulati rispetto al tessuto di riparazione.



Analisi biochimica (DNA, GAGs, GAGs/DNA ratio) dei campioni sperimentali prelevati dalla troclea dei diversi animali a distanza di 3 mesi dall'impianto. A) Test di Dunnett, A e B indicano alta significatività statistica ($P < 0.01$) dei diversi campioni sperimentali rispetto alla cartilagine nativa. Dall'analisi biochimica emerge un significativo aumento di cellularità esclusivamente negli scaffold cellulati, mentre tutti i campioni sperimentali presentano livelli di GAGs e del rapporto GAGs/DNA significativamente inferiori rispetto a quelli della cartilagine. B) Anova Test. A e B indicano alta significatività statistica ($P < 0.01$) dei diversi campioni sperimentali tra loro. Gli scaffold cellulati presentano livelli di cellularità maggiori rispetto allo scaffold non cellulato e al tessuto di riparazione; tuttavia, in questo gruppo sperimentale emerge un ridotto livello del rapporto GAGs/DNA a dimostrazione di una ridotta produttività di GAGs da parte della componente cellulare.

CONCLUSIONI

I dati ottenuti in vitro ed in vivo nella realizzazione del composto osteocondrale in oggetto hanno permesso di trarre alcune importanti conclusioni:

1. I condrociti sono in grado di sopravvivere e produrre una matrice simil-cartilaginea in vitro se supportati da un'opportuna matrice di crescita, rappresentata in questo studio dalla combinazione di un composto di collagene I e colla di fibrina: tale matrice è in grado di favorire la maturazione in vitro del composto cellulato in un tessuto con proprietà morfologiche, biochimiche e biomeccaniche similcartilaginee. Tale risultato offre un'interessante soluzione ai problemi associati all'instabilità ed integrazione dello scaffold nel tessuto nativo: una preliminare maturazione in vitro rende infatti il composto cellulato

più stabile alla manipolazione chirurgica e già parzialmente funzionale al momento dell'impianto.

2. Il modello osteocondrale proposto in questo studio ha mostrato una buona integrazione nella lesione sperimentalmente indotta nella cartilagine articolare di suini adulti, come mostrato dai margini tra tessuto sano e sito di lesione. Tuttavia esso è risultato inaspettatamente più efficace quando privo di cellule, a dimostrazione del fatto che esso è in grado di accogliere al suo interno le cellule provenienti dall'osso sottostante, sia nella parte condrale che nella parte ossea di idrossiapatite, favorendo una migliore riparazione. Molto incoraggiante è il fatto che le cellule midollari penetrate nella parte condrale dello scaffold si sono differenziate in cellule simil-cartilaginee, mentre quelle penetrate nella parte ossea, si sono differenziate in senso osteogenico. Questo aspetto apre interessanti prospettive per studi futuri utilizzando scaffolds acellulati per la riparazione delle lesioni osteocondrali mediante scaffold misti di collagene ed idrossiapatite.

3. I risultati ottenuti con lo scaffold cellulato sono comparabili a quelli del tessuto di riparazione spontanea a 3 mesi dall'impianto, un tempo d'osservazione ancora precoce perché le cellule dello scaffold si possano ri-differenziare e produrre matrice cartilaginea in risposta agli stimoli biomeccanici nel ginocchio. Tale evidenza suggerisce la necessità di stabilire dei tempi d'osservazione più lunghi in modo da avere un quadro più completo delle potenzialità del modello osteocondrale proposto in questo studio. Sono in programmazione inoltre studi futuri utilizzando uno scaffold di idrossiapatite con porosità differenti rispetto a quello utilizzato in tale studio. Si ritiene infatti che l'eccessivo spessore delle trabecole di idrossiapatite dello scaffold abbiano in alcuni casi alterato la normale ossigenazione delle cellule in esso penetrate. E' in ogni caso da valutare l'utilizzo di suini adulti e, pertanto, l'impiego di minipigs.

QUARTO PROGETTO: “Trattamento di lesioni osteocondrali con cellule staminali mesenchimali derivate dal tessuto adiposo in modello suino”

Ipotesi di lavoro

E' stata valutata l'efficacia dell'utilizzo di uno scaffold bifasico innovativo di polietilen-glicol fumarato associato a cellule staminali mesenchimali derivate dal tessuto adiposo, per il trattamento di lesioni osteocondrali di medie–grandi dimensioni in un modello animale impiegante suini adulti (Yucatan minipig > 16 mesi).

Un approccio combinato, dato dall'associazione dello scaffold bifasico con cellule condro- e osteoprogenitrici è un metodo promettente ed efficace per il trattamento delle lesioni osteocondrali di medie-grandi dimensioni. Nella Medicina Rigenerativa dell'apparato muscolo-scheletrico da alcuni decenni vi è ampio interesse per le cellule staminali mesenchimali (MSC), inizialmente ritrovate solo nel midollo osseo, ma oggi isolabili anche in numerosi altri tessuti e organi tra cui il tessuto adiposo. La grande utilità delle MSC cellulare risiede nella sua capacità di differenziare, sotto opportune condizioni di crescita, verso cellule della linea mesenchimale, quali osteoblasti, condrociti, miociti e tenociti. In particolare le cellule mesenchimali del tessuto adiposo presentano caratteristiche del tutto sovrapponibili a quelle isolate dal midollo osseo stesso, con l'ulteriore vantaggio di poter essere più facilmente e maggiormente reperibili, data l'elevata disponibilità del tessuto donatore. Esse, quindi, rappresentano una valida soluzione per il trattamento delle varie patologie dei tessuti e rappresentano pertanto una fonte importante per le terapie cellulari autologhe.

Lo scopo specifico dello studio è stato quello di valutare la qualità e la velocità di rigenerazione delle lesioni osteocondrali, praticate sperimentalmente a livello dei condili e della troclea nei suini, trattate con l'approccio combinato cellule + scaffold bifasico.

Materiali e Metodi

Sono stati utilizzati suini adulti (> 16 mesi), al fine di evitare di effettuare lo studio su soggetti ancora in fase di sviluppo e accrescimento e dunque poco rappresentativi di quanto avverrebbe in un soggetto umano adulto. Onde evitare di lavorare con soggetti troppo pesanti è stata selezionata una razza di piccole dimensioni lo Yucatan minipig.

Descrizione della timeline dello studio

Fase	Sett 1	Sett 2	Sett 3	Sett 4	Sett 5	Sett. 6-30	Sett 31	Sett 32-38
Stabulazione dei suini	■							
Prelievo del tessuto adiposo		■						
Isolamento e coltura delle MSC dal tessuto adiposo		■						
Semina delle cellule sugli scaffolds				■				
Innesto degli scaffold nei suini				■				
Mantenimento dei suini operati						■		
Espianto delle porzioni ossee trattate						■	■	
Valutazione radiologica, istologica e istochimica del neo-rigenerato osteocondrale						■	■	■

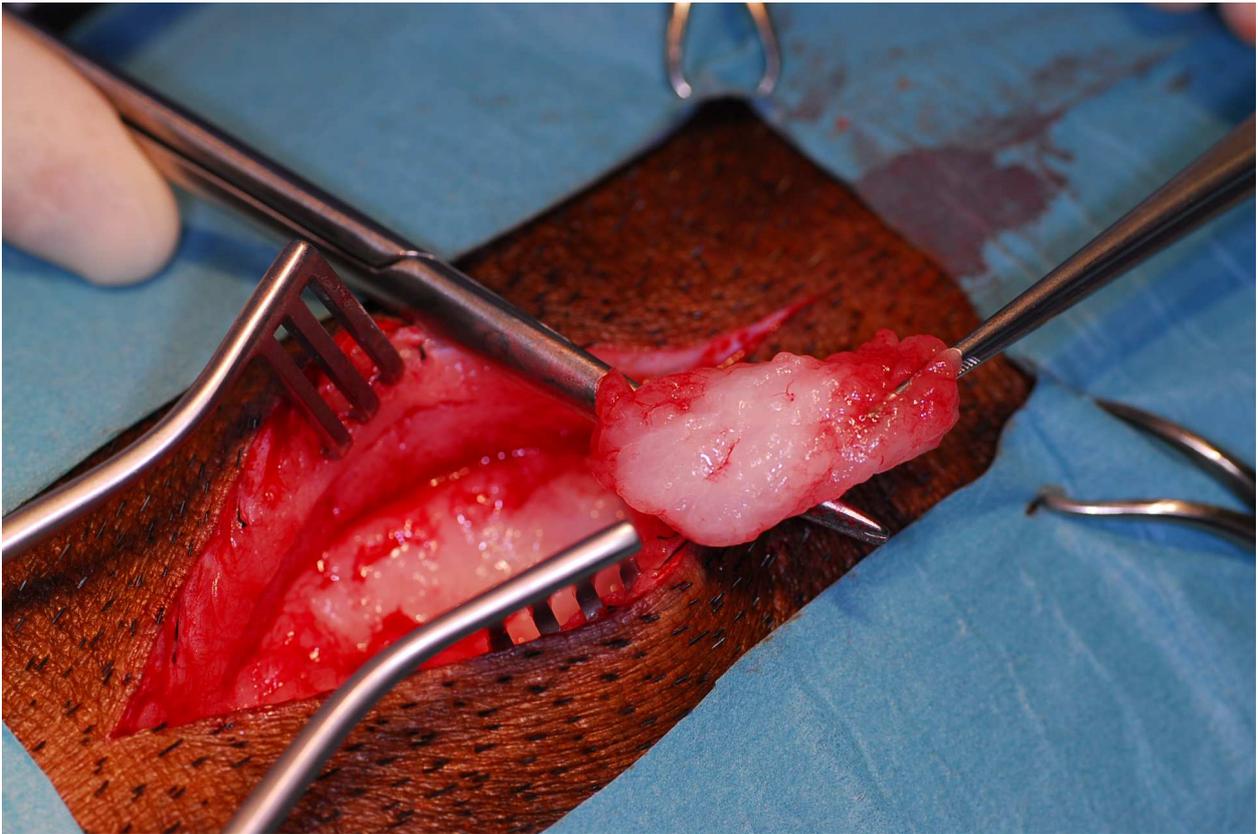
L'anestesia generale è stata ottenuta utilizzando in associazione ketamina e midazolam, alle dosi rispettivamente di 10mg/kg e 0.5 mg/kg per via intramuscolare, cui è seguita la somministrazione di una miscela di ossigeno ed isofluorano tramite maschera oro-nasale. I soggetti sono stati intubati mediante un tubo orotracheale di 7,5mm di diametro.

Prima procedura chirurgica:

Posto il suino in decubito sternale, praticata l'antisepsi e la delimitazione del campo operatorio, si è provveduto ad incidere la cute nella regione inerscapolare e a prelevare il grasso sottocutaneo nella quantità di 10 ml circa. La cute è stata suturata mediante un filo atraumatico monofilamento non riassorbibile di nylon 2-0. E' stata somministrata una terapia antibiotica intraoperatoria consistente in enrofloxina (5 mg/Kg IV) e amoxicillina (7 mag/Kg IV); la copertura antibiotica è stata mantenuta con amoxicillina e ac.clavulanico per OS nei 7 giorni seguenti la chirurgia. L'analgesia intraoperatoria ha utilizzato il tramadolo (2mg/kg IV) e la postoperatoria il ketorolac (1mg/kg IV) seguita, nei 7 giorni seguenti, da meloxicam (0,5mg/kg IM).



Posizionamento dei minipigs e campo operatorio precedentemente l'antisepsi e la dieresi cutanea.



Prelievo del grasso sottocutaneo



I minipigs il quindicesimo giorno dopo il prelievo del grasso sottocutaneo

Descrizione del procedimento in laboratorio

Il tessuto adiposo, prelevato dalla zona interscapolare dei suini, è stato digerito mediante collagenasi di tipo I per liberare la componente cellulare dalla matrice tissutale. Successivi passaggi di centrifugazione hanno permesso di isolare la componente cellulare mesenchimale che è stata coltivata in vitro al fine di renderla una popolazione omogenea. Dopo alcuni giorni di coltura in terreno non differenziativo (DMEM, 10% siero fetale bovino), le cellule sono state staccate dalla piastra di coltura con tripsina e seminate sugli scaffold bifasici di polietilen-glicol fumarato, mantenendo i costrutti per una notte in coltura in incubatore in condizioni statiche onde favorire l'adesione cellulare alla struttura tridimensionale dello scaffold stesso.

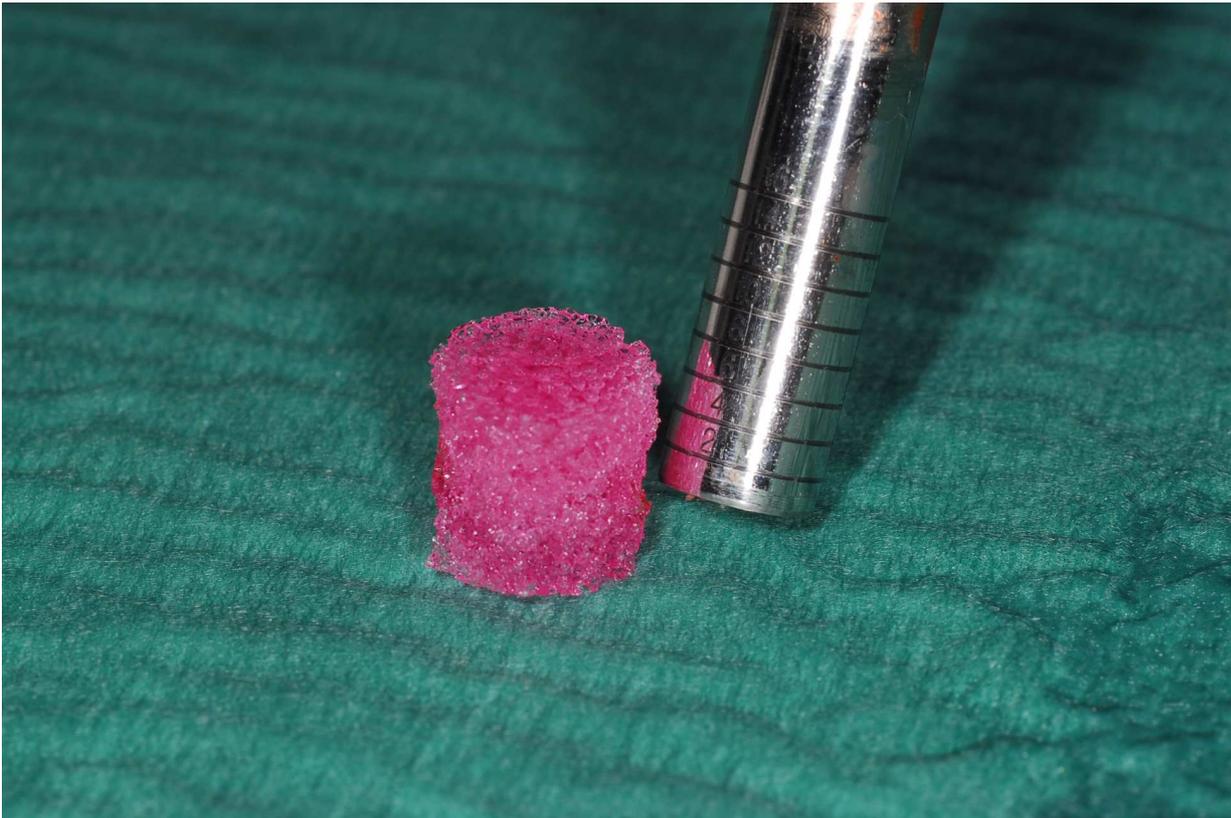
Contemporaneamente è stata valutata la capacità differenziativa in vitro di ogni popolazione cellulare verso la linea osteogenica e condrogenica coltivando le cellule negli specifici terreni differenziativi e valutando la comparsa di specifici marcatori delle due linee cellulari in esame (fosfatasi alcalina, deposito di matrice calcificata, espressione di osteopontina per l'osso; deposizione di glicosaminoglicani ed espressione di collagene di tipo II per la cartilagine).

Seconda procedura chirurgica

Praticata un'incisione longitudinale, anteriore mediale alla rotula, di cute e sottocute della lunghezza di circa 8-9 cm, si è raggiunto il piano muscolare (vasto mediale) che è stato separato dal legamento alare fino al raggiungimento del piano capsulare. Incisa la capsula pararotulea mediale con esposizione della cavità articolare del ginocchio e lussazione laterale della rotula per consentire l'esposizione della troclea femorale, sono state prodotte 4 lesioni osteocondrali profonde 8 mm e a sezione circolare mediante apposito carotatore del diametro di 9 mm.

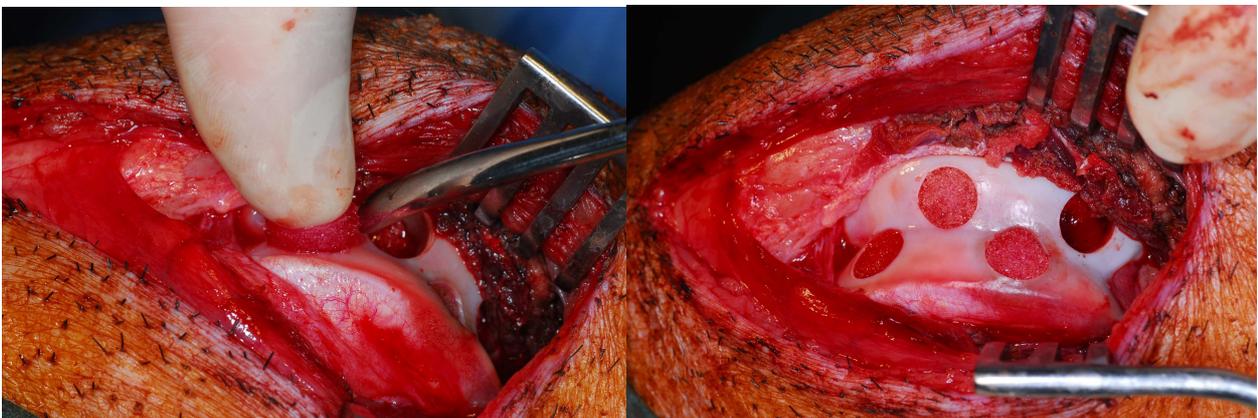
Trattamento delle lesioni:

- a) gruppo controllo (solo lesione)
- b) cilindro osteocondrale (tecnica gold standard nell'attuale pratica clinica)
- c) scaffold non seminato
- d) scaffold seminato con cellule MSC autologhe derivate dal tessuto adiposo



Lo scaffold bifasico di polietilen-glicol fumarato immediatamente prima del posizionamento.

Una delle lesioni è stata trattata con l'impianto dello scaffold seminato con adipociti autologhi, precedentemente prelevati, espansi in coltura monostrato e ridifferenziati in senso condrogenico mediante coltura in 3D e fattori di crescita; la seconda lesione con l'impianto dello scaffold non seminato, la terza è stata lasciata senza trattamento come controllo negativo. La quarta ed ultima lesione è stata riparata mediante la tecnica standard utilizzata attualmente in clinica impiegando uno dei cilindri osteocartilaginei prelevati da una delle altre lesioni e inserendolo secondo tecnica *pressfit*.



Particolari intraoperatori: posizionamento tramite tecnica *pressfit* e troclea prima del riposizionamento della rotula.

Prima della chiusura degli strati legamentosi e muscolari, sono state effettuate opportune manovre di verifica della stabilità dell'impianto e del suo corretto posizionamento. In tutti gli animali è stata ridotta la lussazione della rotula e si è provveduto a suturare la capsula articolare mediante un filo atraumatico monofilamento riassorbibile 3-0 di poligliconato, ripristinando quindi la normale anatomia del ginocchio. La cute è stata suturata mediante un filo atraumatico monofilamento non riassorbibile di nylon 2-0.

Gli animali sono stati fatti risvegliare direttamente nello stabulario in gabbie singole ed è stata somministrata una terapia antibiotica intraoperatoria consistente in enrofloxina (5 mg/Kg IV) e amoxicillina (7 mg/Kg IV); la copertura antibiotica è stata mantenuta con amoxicillina e ac.clavulanico per OS nei 7 giorni seguenti la chirurgia. L'analgesia preoperatoria ha utilizzato il tramadolo (2mg/kg IV) e la lidocaina (2mg/kg IV) e la postoperatoria il ketorolac (1mg/kg IV) seguita, nei giorni seguenti, da meloxicam (0,5mg/kg IM).

Tutti gli animali trattati sono stati monitorati costantemente durante le prime 72 ore dall'intervento chirurgico al fine di valutarne il corretto recupero della funzionalità articolare, e mantenuti per la prima settimana in stabulazione singola in box riscaldati a 20C° ma con la possibilità di interagire con altri maiali.

Terminato tale periodo, dopo la valutazione del veterinario responsabile della salute ed del benessere degli animali, si è provveduto ad imbastare i soggetti ricostituendo i gruppi di arrivo.

Dopo 6 mesi di stabulazione gli animali sono stati sacrificati riutilizzando la stessa procedura anestesologica impiegata durante l'intervento chirurgico; in anestesia generale profonda è stata praticata una iniezione endovenosa letale di potassio cloruro.



I soggetti perfettamente deambulanti ed in ottimo stato di salute nell'Agosto 2011, 4 mesi dopo il secondo intervento. (Il pelo rado è il manto estivo; presenti interessanti variazioni individuali confermate dall'allevamento di provenienza).

Le porzioni articolari espianate in questi giorni saranno valutate mediante tecniche di imaging radiografiche al fine di studiare particolari fenomeni di riassorbimento della componente ossea. Il tessuto osteocondrale neoformato verrà quindi studiato istologicamente e immunohistologicamente al fine di determinarne la composizione. Inoltre il neo-tessuto sarà sottoposto a prove di biomeccanica, mediante nano indentazione, volte alla valutazione della resistenza.

BIBLIOGRAFIA

Aerssens J, Boonen S, Lowet G, Dequeker J Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology* 1998 139, 663-670.

Albrektsson, T. , Branemark, P. I. , Hansson, H. A. , and Lindstrom, J. , " Osteointegrated Titanium Implants," *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 1981 Vol. 52

Athanasίου KA, Rosenwasser MP, Buckwalter JA, Malinin TI, Mow VC Interspecies comparisons of in situ intrinsic mechanical-properties of distal femoral cartilage. *Journal of Orthopaedic Research* 1991 9, 330-340.

Benninghoff A Form und Bau der Gelenkknorpel in ihren Beziehungen zur Funktion. *Zeitschrift für Zellforschung* 1925 2, 783-862.

Biewener AA Scaling body support in mammals: limb posture and muscle mechanics. *Science* 1989 245, 45-48.

Carlsson L, Rostlund T, Albrektsson B, Albrektsson T Implant fixation improved by close fit. Cylindrical implant-bone interface studied in rabbits. *Acta Orthop Scand* 1988;59: 272-275.

Castaneda S, Largo R, Calvo E, Rodriguez-Salvanes F, Marcos ME, Diaz-Curiel M, Herrero-Beaumont G Bone mineral measurements of subchondral and trabecular bone in healthy and osteoporotic rabbits. *Skeletal Radiol* 2006 35, 34-41.

Chavassieux P, Pastoureau P, Boivin G, Charhon S, Chapuy M, Delmas P, Meunier P Effects of sodium fluoride on bone remodeling in ewes. *J Bone Miner Res* 1987 2 Suppl 1, abstract 359.

Clark JM (1985) The organization of collagen in cryofractured rabbit articular-cartilage - a scanning electron-microscopic study. *Journal of Orthopaedic Research* 1985 3, 17-29.

Clark JM (1990) The organization of collagen fibrils in the superficial zones of articular cartilage. *Journal of Anatomy* 1990 171, 117±130.

Clark JM (1991) Variation of collagen fiber alignment in a joint surface - a scanning electron-microscope study of the tibial plateau in dog, rabbit and man. *Journal of Orthopaedic Research* 1991 9, 246-257.

Consensus Conference, Chester, UK, 1991.

Davies CM, Jones DB, Stoddart MJ, Koller K, Smith E, Archer CW, Richards RG Mechanically loaded ex vivo bone culture system 'Zetos': systems and culture preparation. *Eur Cell Mater* 1988;11: 57-75.

deKleer, V Development of bone. In: *Bone in Clinical Orthopaedics*, (Sumner-Smith G, ed) W.B. Saunders Co, Philadelphia, PA, pp 1-80 2006

den Boer FC, Patka P, Bakker FC, Wippermann BW, van Lingen A, Vink GQ, Boshuizen K, Haarman HJ New segmental long bone defect model in sheep: quantitative analysis of healing with dual energy x-ray absorptiometry. *J Orthop Res* 1999 17, 654-660.

Egermann M, Goldhahn J, Schneider E Animal models for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2005 Mar;16 Suppl 2:S129-38.

Eitel F, Klapp F, Jacobson W, Schweiberer L Bone regeneration in animals and in man. A contribution to understanding the relative value of animal experiments to human pathophysiology. *Arch Orthop Trauma Surg* 1981 99, 59-64.

Hazzard DG, Bronson RT, McClearn GE, Strong R Selection of an appropriate animal model to study aging processes with special emphasis on the use of rat strains. *J Gerontol* 1992, 47, B63-B64.

Hoch DH, Grodzinsky AJ, Koob TJ, Albert ML, Eyre DR Early changes in material properties of rabbit articular cartilage after meniscectomy. *Journal of Orthopaedic Research* 1983 1, 4-12.

ISO 10993-6 (UNI EN ISO 10993-6:2009 Valutazione biologica dei dispositivi medici - Parte 6: Prove relative agli effetti locali dopo l'impianto)

Kääb MJ, Gwynn IA, Nötzli HP. Collagen fibre arrangement in the tibial plateau articular cartilage of man and other mammalian species. *J Anat.* 1998 Jul;193 (Pt 1):23-34.

Kirkpatrick CJ, Krump-Konvalinkova V, Unger RE, Bittinger F, Otto M, Peters K Tissue response and biomaterial integration: the efficacy of in vitro methods. *Biomol Eng* 20002 19: 211-217.

Korkala O, Karaharju E, Gronblad M, Aalto K Articular-cartilage after meniscectomy - rabbit knees studied with the scanning electron-microscope. *Acta Orthopaedica Scandinavica* 1984,55, 273-277.

Kragstrup J, Richards A, Fejerskov O Effects of fluoride on cortical bone remodeling in the growing domestic pig. *Bone* 1989 10, 421-424.

Kuhn JL, Goldstein SA, Ciarelli MJ, Matthews LS The limitations of canine trabecular bone as a model for human: a biomechanical study. *J Biomech* 1989 22, 95-107.

Laiblin C, Jaeschke G Klinisch-chemische Untersuchungen des Knochen- und Muskelstoffwechsels unter Belastung beim Göttinger Miniaturschwein – eine experimentelle Studie (Clinical-chemical investigations of the metabolism of bone and muscle under stress in the Göttingen miniature pig – an experimental study), *Berl Münch Tierärztl Wschr* 1979 92, 124

Liebschner MA Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. *Biomaterials* 2004, 25, 1697-1714.

Marshall KW, Chan ADM Arthroscopic anterior cruciate ligament transection induces canine osteoarthritis. *Journal of Rheumatology* 1996 23, 338-343.

Martiniakova M, Omelka R, Chrenek P, Ryban L, Parkanyi V, Grosskopf B, Vondrakova M, Bauerova M Changes of femoral bone tissue microstructure in transgenic rabbits. *Folia Biol (Praha)* 2005 51, 140-144.

Moran ME, Kim HKW, Salter RB Biological resurfacing of full-thickness defects in patellar articular-cartilage of the rabbit - investigation of autogenous periosteal grafts subjected to continuous passive motion. *Journal of Bone and Joint Surgery* 1992 74B, 659-667.

Mosekilde L, Kragstrup J, Richards A Compressive strength, ash weight, and volume of vertebral trabecular bone in experimental fluorosis in pigs. *Calcif Tissue Int* 1987 40, 318-322.

Mosekilde L, Weisbrode SE, Safron JA, Stills HF, Jankowsky ML, Ebert DC, Danielsen CC, Sogaard CH, Franks AF, Stevens ML, Paddock CL, Boyce RW Calcium-restricted ovariectomized Sinclair S-1 minipigs: an animal model of osteopenia and trabecular plate perforation. *Bone* 1993 14, 379-382.

Mosekilde L, Weisbrode SE, Safron JA, Stills HF, Jankowsky ML, Ebert DC, Danielsen CC, Sogaard CH, Franks AF, Stevens ML, Paddock CL, Boyce RW Calcium-restricted ovariectomized Sinclair S-1 minipigs: an animal model of osteopenia and trabecular plate perforation. *Bone* 1993 14, 379-382.

Mow VC, Holmes MH, Lai WM (1984) Fluid transport and mechanical-properties of articular cartilage - a review. *Journal of Biomechanics* 1984, 17, 377-394.

Nahid M, Bottenberg P L'intérêt des cultures cellulaires dans la recherche de matériaux dentaires biocompatibles. *Rev Belge Med Dent* 2003 58: 189-196.

Newman E, Turner AS, Wark JD The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. *Bone* 1995 16, 277S-284S.

Newman E, Turner AS, Wark JD The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. *Bone* 1995 16, 277S- 284S.

Pastoureau P, Arlot M, Caulin F, Barlet J, Meunier P, Delmas P Effects of oophorectomy on biochemical and histological indices of bone turnover in ewes. *J Bone Miner Res* 1989 4, S237, abstract 477.

Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater*. 2007 Mar 2;13:1-10.

Peretti GM, Pozzi A, Ballis R, Deponti D, Pellacci F. Current surgical options for articular cartilage repair. *Acta Neurochir Suppl*. 2011;108:213-9.

Pizzoferrato A, Ciapetti G, Stea S, Cenni E, Arciola CR, Granchi D, Savarino L Cell culture methods for testing biocompatibility. *Clin Mater* 1994 15: 173-190.

Raab DM, Crenshaw TD, Kimmel DB, Smith EL A histomorphometric study of cortical bone activity during increased weight-bearing exercise. *J Bone Miner Res* 1991 6, 741-749.

Richards RG, Stiffanic M, Owen GR, Riehle M, Gwynn I, Curtis AS Immunogold labelling of fibroblast focal adhesion sites visualised in fixed material using scanning electron microscopy, and living, using internal reflection microscopy. *Cell Biol Int* 2001 25: 1237-1249.

Schimandle JH, Boden SD Spine update. The use of animal models to study spinal fusion. *Spine* 1994 19, 1998-2006.

Setton LA, Mow VC, Muller FJ, Pita JC, Howell DS Mechanical properties of canine articular cartilage are significantly altered following transection of the anterior cruciate ligament. *Journal of Orthopaedic Research* 1994 12, 451-463.

Simon WH Scale effects in animal joints. I. Articular cartilage thickness and compressive stress. *Arthritis and Rheumatism* 1971 13, 244-256.

Speer DP, Dahners L The collagen architecture of articular cartilage. Correlation of scanning electron microscopy and polarized light microscopy observations. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1979 139, 267-275.

Stockwell RA The interrelationship of cell density and cartilage thickness in mammalian articular cartilage. *Journal of Anatomy* 1971 109, 411-421.

Thorwarth M, Schultze-Mosgau S, Kessler P, Wiltfang J, Schlegel KA Bone regeneration in osseous defects using a resorbable nanoparticulate hydroxyapatite. *J Oral Maxillofac Surg* 2005 63, 1626-1633.

Torzilli PA, Dethmers DA, Rose DE, Schryuer HF Movement of interstitial water through loaded articular cartilage. *Journal of Biomechanics* 1983,16, 169-179.

Turner AS Animal models of osteoporosis - Necessity and limitations. *Eur Cells Mater.* 2001, 1, 66-81.

Vico L, Chappard D, Alexandre C, Palle S, Minaire P, Riffat G, Morukov B, Rakhmanov S Effects of a 120 day period of bed-rest on bone mass and bone cell activities in man: attempts at countermeasure. *Bone Miner* 1987 2: 383-394.

Wakitani S, Kimura T, Hirooka A, Ochi T, Yoneda M, Yasui N et al. Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel. *Journal of Bone and Joint Surgery* 1989 71B, 74-80.

Wang X, Mabrey JD, Agrawal CM An interspecies comparison of bone fracture properties. *Biomed Mater Eng* 1988, 8, 1-9.

Willie BM, Bloebaum RD, Bireley WR, Bachus KN, Hofmann AA Determining relevance of a weightbearing ovine model for bone ingrowth assessment. *J Biomed Mater Res A* 2004 69, 567-576.

Zambrano NZ, Montes GS, Shigihara KM, Sanchez EM, Junqueira LC Collagen arrangement in cartilages. *Acta Anatomica* 1982 113, 26-38.