

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO



Scuola di Dottorato in

Sanità e Produzioni Animali: Scienza, Tecnologia e Biotecnologie

Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie

Sezione di Radiologia Veterinaria Clinica e Sperimentale

Biotecnologie Applicate alle Scienze Veterinarie e Zootecniche

(XXIII Ciclo)

## **Studio densitometrico nella valutazione dei processi riparativi su lesioni ossee *critical size* in modelli animali**

**(Vet09)**

Dott. Simone BORGONOVO

Matr. R07757

Tutor: Dott.ssa Graziella VANOSI

Coordinatore: Prof. Fulvio GANDOLFI

Anno Accademico 2009 / 2010

---

## Indice

1	Introduzione .....	1
1.1	Scopo della tesi .....	4
2	Principi di anatomia .....	5
2.1	Microstruttura.....	5
2.1.2	Composizione ossea.....	6
2.2	Macrostruttura .....	6
2.2.1	Cranio.....	7
2.2.2	Tibia .....	8
2.2.2.1	Coniglio .....	9
2.2.2.2	Maiale .....	10
2.2.2.3	Pecora.....	11
2.3	Rimodellamento osseo .....	11
3	Densitometria ossea.....	13
3.1	Mineralometria ossea computerizzata (MOC).....	14
3.1.1	SPA e DPA .....	15
3.1.2	DEXA.....	16
4	Riparazione di difetti ossei: tecniche chirurgiche .....	18
4.1	Innesto di osso autologo.....	18
4.2	Innesto di osso eterologo.....	20
4.3	Fattori di crescita.....	20
5	Riparazione di difetti ossei: sostituti sintetici .....	22
5.1	Materiali per scaffold .....	22
5.1.1.1	Ceramiche bioassorbibili .....	24

---

5.1.1.2 Ceramiche bioattive .....	25
5.1.1.3 Ceramiche bioinerti .....	27
5.1.2 Polimeri .....	27
5.1.3 Materiali compositi .....	29
5.1.4 Altri materiali .....	30
5.2 Vantaggi nell'utilizzo di innesti sintetici .....	31
6 Cellule staminali .....	32
6.1 Classificazione .....	33
6.2 Origine .....	33
6.2.1 Cellule staminali embrionali e fetali .....	34
6.2.2 Cellule staminali da annessi embrionali .....	34
6.2.4 Cellule staminali adulte .....	35
6.2.4.1 Cellule staminali mesenchimali (MSCs) .....	36
6.3 Utilizzo clinico delle cellule staminali .....	37
6.3.1 Riparazione di tessuto cartilagineo e osseo .....	38
7 Modelli animali .....	40
7.1 Scelta del modello animale nella ricerca ortopedica .....	40
7.2 Animali più comunemente utilizzati negli studi ortopedici .....	41
7.2.1 Coniglio .....	41
7.2.2 Pecora .....	42
7.2.3 Maiale .....	43
8 Materiali e metodi .....	44
8.1 Fase preliminare .....	44
8.1.1 Studio radiografico .....	46
8.1.2 Studio densitometrico .....	47
8.2 Fase sperimentale .....	49

---

8.2.1 Espianto del tessuto adiposo .....	50
8.2.2 Isolamento, purificazione e crescita delle cellule staminali .....	52
8.2.3 Distaccamento e semina su scaffold .....	54
8.2.4 Valutazione della capacità differenziativa <i>in vitro</i> .....	54
8.2.5 Preparazione chirurgica del sito d’impianto .....	55
8.2.6 Espianto delle porzioni ossee trattate e valutazione .....	57
9 Risultati .....	59
9.1 Fase preliminare .....	59
9.1.1 Cranio di coniglio .....	60
9.1.2 Tibia di coniglio .....	61
9.1.3 Tibia di maiale .....	62
9.1.4 Tibia di pecora .....	63
9.2 Fase sperimentale .....	64
9.2.1 Valutazione della capacità differenziativa <i>in vitro</i> .....	64
9.2.1.1 Isolamento.....	64
9.2.1.2 Capacità proliferativa.....	65
9.2.1.3 Capacità clonogenica .....	67
9.2.1.4 Capacità differenziativa .....	68
9.2.2 Valutazione macroscopica e radiografica dei siti d’impianto .....	71
9.2.2.1 Valutazione al follow up.....	71
9.2.2.2 Valutazione all’espianto .....	72
9.2.3 Valutazione tramite MOC.....	73
9.2.4 Valutazione istologica.....	74
10 Discussione e conclusioni .....	76
10.1 Fase preliminare .....	76
10.1.1 Coniglio.....	77
10.1.2 Maiale.....	78

---

10.1.3 Pecora.....	78
10.1.4 Considerazioni generali .....	78
10.2 Fase sperimentale.....	79
10.2.1 Indagine macroscopica e radiografica .....	81
10.2.2 Studio densitometrico .....	83
10.2.3 Esame istologico .....	84
10.2.4 Considerazioni generali .....	84
10.3 Sviluppi futuri .....	84
11 Bibliografia.....	86

# 1 Introduzione

Negli ultimi anni, l'innesto di tessuto osseo (omologo, eterologo o di sintesi) nella riparazione delle perdite di sostanza in campo ortopedico, neurochirurgico e odontoiatrico è diventato il più comune trapianto/impianto di tessuto, secondo solo a quello di sangue, assumendo quindi un ruolo molto importante nella pratica clinica. Lo sviluppo delle tecniche d'impianto si è concentrato sulla necessità di ottenere un'interazione stabile e duratura tra il tessuto dell'ospite e il materiale attraverso l'accurata valutazione delle caratteristiche chimiche, fisiche e biologiche di quest'ultimo. Col termine di innesto osseo si intende quindi l'impianto di un materiale che, da solo o in combinazione con altri, promuove "in situ" una risposta curativa tissutale, stimolando l'attività osteogenica, osteoconduttiva o osteoinduttiva.

Per attività *osteogenica* si intende l'abilità delle cellule del tessuto osseo di produrre tessuto di nuova formazione. Queste cellule possono essere veicolate con l'innesto o essere già presenti nel sito di impianto (osteoblasti allineati o cellule staminali mesenchimali, precursori indotti che, mediante fattori di crescita, diventano cellule ossee).

L'attività *osteoconduttiva* è la proprietà fisica di un biomateriale che permette la vascolarizzazione e l'infiltrazione di cellule-precursori, funzionando da supporto (*scaffold*) alla formazione di nuovi osteoni.

L'attività *osteoinduttiva* è, invece, la capacità di stimolare la formazione di nuovo tessuto osseo. Questo processo avviene per l'attivazione di una cascata di segnali e di recettori intra/extracellulari, che porta alla formazione di osteoblasti maturi.

Queste tre caratteristiche, unite al legame finale tra osso e impianto, vengono accomunate nel termine *osteointegrazione*, termine che definisce

l'interazione tra organismo e materiale (Giannoudis et al. 2005; M. Miyazaki et al. 2009).

In medicina umana esistono differenti tecniche per la riparazione di lesioni ossee critiche che prevedono l'utilizzo di varie tipologie di innesti. Attualmente, il "gold standard" rimane il trapianto di osso autologo, cioè di osso spongioso prelevato dal medesimo paziente che evidenzia le migliori caratteristiche di osteogenicità, osteoconduttività e osteoinduzione. Tuttavia, la durata e il tipo d'intervento, la possibile permanenza di un difetto estetico e la non applicabilità in pazienti pediatrici e oncologici, hanno portato allo sviluppo di tecniche alternative.

L'impianto di tessuto osseo eterologo è la seconda scelta chirurgica. Questo biomateriale è disponibile in forma surgelata o liofilizzata. Queste tipologie di conservazione permettono sia di eliminare la risposta immunologica avversa da parte del ricevente che la trasmissione di patologie virali. La complessa fase di preparazione comporta però una notevole alterazione della capacità di osteoinduzione, e quindi una significativa riduzione della capacità di stimolare la rigenerazione ossea (Giannoudis et al. 2005).

Le altre tecniche chirurgiche prevedono l'utilizzo dei fattori di crescita osteoinduttivi, conosciuti dal 1965, applicati su *scaffold* realizzati con biomateriali. Dopo anni di studio e sviluppo si è arrivati alla caratterizzazione della proteina morfogenetica ossea o BMPs (*Bone Morphogenetic Protein*). Essa rappresenta solo lo 0,1% della matrice ossea, ma, mediante tecniche di sequenziazione del DNA e clonazione molecolare, è stato possibile ricavare delle proteine senza attività immunologica, come la BMPs-7 o l'OP-1 (*Osteoinductive Protein*). Queste particolari proteine sono in grado di stimolare la differenziazione osteoblastica delle cellule staminali, migliorando inoltre la produzione di matrice ossea e la sua vascolarizzazione (A.R. Vaccaro et al. 2007; K.R. Garrison et al. 2007).

Un ulteriore metodo di più facile applicazione dei fattori di crescita è l'utilizzo del centrifugato piastrinico o PRP (*platelet-rich plasma*), concentrato di trombociti provenienti da sangue autologo. Questo contiene molti fattori di crescita, tra i quali TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 2, che migliorano il processo di guarigione ossea (M. R. Sarkar et al. 2006).

I *biomateriali* con cui sono realizzati gli *scaffold* vengono identificati come tutti quei materiali concepiti per interfacciarsi con i sistemi biologici al fine di dare supporto o sostituire un qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo (II International Consensus Conference on Biomaterials, Chester, Gran Bretagna, 1991). Le prestazioni di tali materiali sono valutate in base alla loro *biofunzionalità* e *biocompatibilità*. La *biofunzionalità* si riferisce alle proprietà che un dispositivo deve possedere per riprodurre una determinata funzione, dal punto di vista fisico e meccanico, mentre la *biocompatibilità* identifica la capacità del dispositivo di continuare a svolgere quella determinata funzione durante tutta la vita utile dell'impianto, ed è strettamente connessa alle interazioni tra i biomateriali e i tessuti con cui vengono a contatto.

Una valutazione qualitativa e quantitativa dell'osteointegrazione è importante per definire l'effettiva capacità riparativa dell'impianto e la sua effettiva biofunzionalità. La diagnostica per immagini (radiologia convenzionale, tomografia e mineralometria), possedendo un'elevata affinità per lo studio del tessuto osseo, offre un valido strumento nel monitorare il processo riparativo in corso, in assenza di metodiche invasive sul paziente.

La radiologia convenzionale, non fornendo dati di valore assoluto sul processo riparativo, ma solo mostrando il quadro generale del grado di ossificazione, rende difficile la valutazione oggettiva dell'impianto, rimanendo troppo operatore-dipendente. Con l'utilizzo di tecniche

tomografiche o mineralometriche, è possibile invece ottenere valori assoluti (in Unità Hounsfield per la prima, e in  $\text{g/cm}^2$  di idrossiapatite di calcio nella seconda) sul grado di ossificazione del difetto osseo e sull'evoluzione del processo riparativo, permettendo uno *screening* completo della sua evoluzione nel tempo.

## **1.1 Scopo della tesi**

I diversi studi effettuati negli ultimi anni sulla riparazione di difetti ossei e l'avanzamento della ricerca hanno permesso di sviluppare nuove tipologie di impianti, con l'utilizzo di cellule staminali mesenchimali, in associazione a *scaffold*; queste tecniche hanno evidenziato una buona capacità di rigenerazione ossea sia *in vitro* sia *in vivo* (S.N. Parikh 2002; K. E. Follmar et al. 2007; L. De Girolamo et al. 2008).

Lo scopo finale di questa tesi è di valutare, in uno studio *in vivo* sul coniglio, la capacità di rigenerazione ossea mediante l'utilizzo di cellule staminali autologhe derivanti da tessuto adiposo, isolate, mantenute in coltura, seminate su di uno *scaffold* di idrossiapatite (HA) e, successivamente, inserite in una lesione critica a livello dell'epifisi prossimale tibiale.

In una fase iniziale sono effettuate misurazioni di densitometria ossea, mediante mineralometria ossea computerizzata (MOC), al fine di ottenere valori normali di riferimento, da paragonare in seguito allo studio effettuato sui soggetti sottoposti al protocollo sperimentale. L'esame MOC è effettuato su tibie di coniglio, maiale e pecora e sul cranio di coniglio, in quanto siti utilizzati comunemente negli studi sperimentali di implantologia (H.A. Yuehuei and J. Friedman 1999, "*Animal Models in Orthopaedic Research*", CRC Press).

## 2 Principi di anatomia

Una volta identificate le sedi anatomiche oggetto dello studio densitometrico, è bene evidenziare le caratteristiche microscopiche e macroscopiche che le caratterizzano, con le relative differenze in relazione al modello animale in esame (R. Barone, “Anatomia Comparata dei Mammiferi Domestici”, Vol. 1 Osteologia, Edagricole, 1974).

### 2.1 Microstruttura

Dal punto di vista microstrutturale, il tessuto osseo haversiano è costituito da osteoni, o sistemi di havers. Si presenta in due varietà: il tessuto compatto e il tessuto spugnoso. Il **tessuto osseo compatto** (Fig. 1) presenta sistemi haversiani regolari, cilindrici e paralleli gli uni agli altri. Ciascuno di questi osteoni presenta un canale vascolare al suo interno (canale di Havers), contenente una piccola quantità di tessuto connettivo. Attorno al canale centrale, le lamelle ossee sono disposte in modo concentrico, attraversate in diversi punti da piccoli canali obliqui, i canali di Volkman.

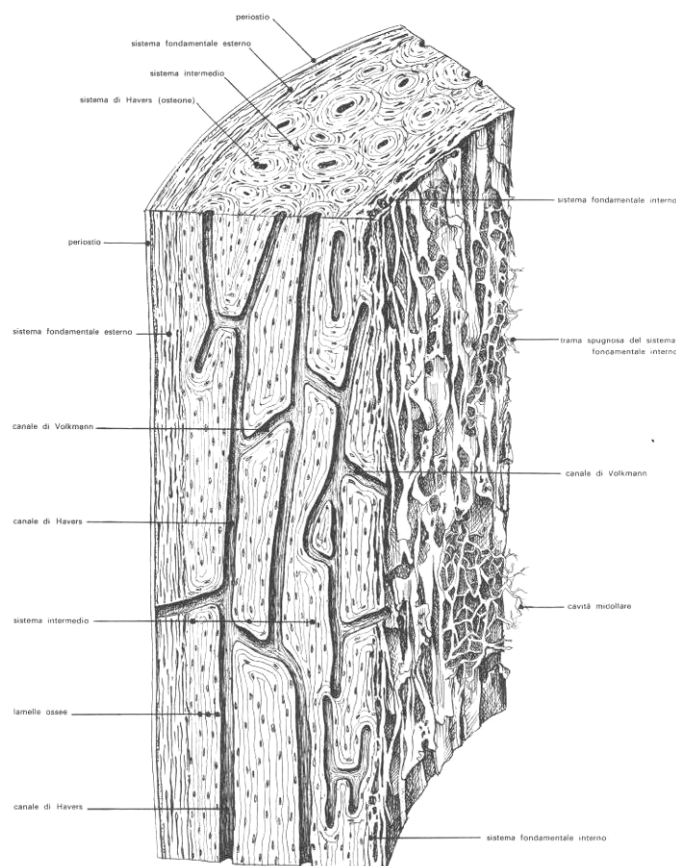


Fig. 1 - Osso compatto

Le cellule ossee (osteociti) sono per la maggior parte disposte tra le lamelle, in file concentriche.

Il **tessuto osseo spugnoso** occupa soprattutto le estremità delle ossa lunghe ed è formato da osteoni brevi, fortemente dilatati e irregolari. I canali di Havers sono rappresentati da cavità (areole), più o meno comunicanti. Le lamelle ossee che le circondano si accollano e si uniscono con quelle di altri sistemi per formare delle trabecole o travate ossee.

Istologicamente, il tessuto osseo presenta primariamente una struttura vascolare longitudinale (Martiniakova 2006), con un'elevata concentrazione di osteoni secondari.

La diafisi delle ossa lunghe è composta principalmente da osso compatto, con un notevole aumento della componente spongiosa a livello epifisario.

Per quanto riguarda le ossa piatte, anche in questo caso la struttura è primariamente riferibile a quella dell'osso compatto.

### **2.1.2 Composizione ossea**

Dal punto di vista della densità minerale, questa è basata sulla concentrazione di idrossiapatite di calcio (HA) all'interno del tessuto osseo, ed è simile tra uomo, coniglio, maiale e pecora, rendendo possibili diretti confronti tra le diverse specie.

## **2.2 Macrostruttura**

Esistono marcate differenze nell'anatomia macroscopica tra l'uomo e il coniglio, il maiale e la pecora, sia per le dimensioni e per la forma delle strutture in esame, sia per l'evidente differenza di postura tra di esse.

## 2.2.1 Cranio

Lo scheletro della testa è costituito da numerose ossa di forma complessa che, generalmente, non possono essere isolate se non nell'animale giovane e che, ad eccezione della mandibola e dello ioide, si saldano nell'animale adulto, formando un massiccio complesso. In questo insieme di ossa si riconoscono sempre due grandi divisioni, il cranio e la faccia. Le ossa del cranio, per la maggior parte piatte, delimitano la cavità cranica. Tra di esse l'occipitale, lo sfenoide e l'etmoide sono impari, mentre il parietale, il temporale e il frontale sono pari. La testa del coniglio è caratterizzata da una regolare curvatura a convessità dorsale e dalla lunghezza della sua regione facciale, estesa quasi quanto il cranio.

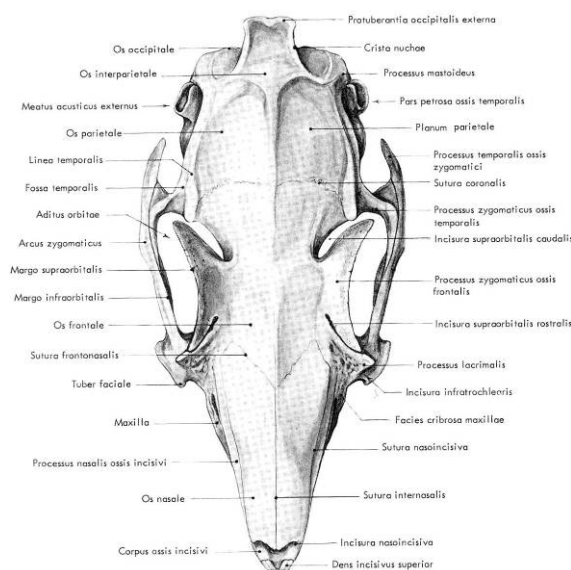


Fig. 2 - Cranio di coniglio, veduta dorsale

La porzione dorsale della parte cranica (Fig. 2) è quadrangolare, con i diametri trasversi equivalenti, ben delimitata rostralmente da due incisure sopra-orbitali e aboralmente dalla protuberanza occipitale esterna, spostata verso la faccia nucale. Le creste temporali formano i margini laterali della lesione. Una cresta longitudinale mediana percorre il planum parietale. L'osso parietale del coniglio è all'incirca rettangolare, ampio, poco

convesso; le linee temporali, poco marcate, sono tra loro molto distanziate e spostate in vicinanza del margine laterale dell'osso. Nella sua porzione rostrale è delimitato dalla sutura coronale, punto di contatto con l'osso frontale.

### 2.2.2 Tibia

La tibia è un osso lungo a forma di prisma triangolare, che si appiattisce notevolmente in senso craniocaudale. Come tutte le ossa lunghe presenta due epifisi, due metafisi e una diafisi. La crescita dell'osso, lungo il suo asse maggiore, è garantita dalla presenza di due strutture fisarie (una prossimale e una distale), interposte tra metafisi ed epifisi (Fig. 3).

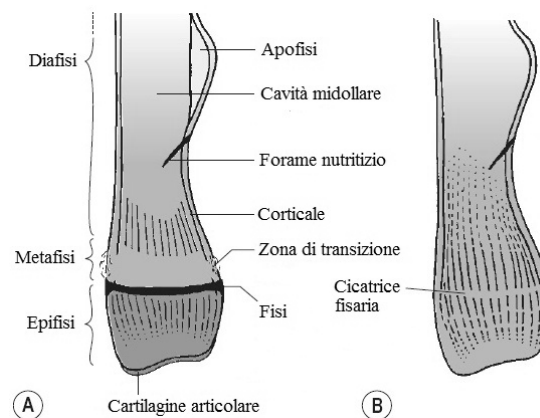


Fig. 3 - Struttura fisaria in ossa scheletricamente immaturo (A) e mature (B)

Dal punto di vista anatomico, l'estremità prossimale della tibia, molto sviluppata, è costituita da tre parti: una anteriore (tuberosità della tibia) e due condili caudali, che sono le superfici articolari per i condili femorali.

La tuberosità presenta cranialmente una depressione per il legamento rotuleo mediano; i condili, mediale e laterale, sono separati cranialmente da una solcatura muscolare per il muscolo estensore anteriore e, caudalmente, dalla incisura poplitea per il tendine del muscolo popliteo. Nella porzione mediana i due condili sono separati dalla cresta tibiale o spina della tibia,

formata dai processi condiloidei mediale e laterale. Il margine laterale del condilo laterale presenta una superficie articolare per la giuntura con la fibula.

Il corpo ha forma di prisma triangolare nella parte prossimale, mentre nella parte distale si appiattisce in senso craniocaudale; esso presenta tre facce: la anteromediale è pianeggiante, la anterolaterale è liscia, la caudale è pianeggiante e presenta medialmente una superficie triangolare molto allungata. Nel limite fra la parte craniomediale e la caudale è presente il foro nutritizio.

L'estremità distale è allungata trasversalmente ed è molto meno voluminosa della prossimale; la superficie articolare per l'astragalo è a forma di coclea e presenta, sia lateralmente che medialmente, una tuberosità: il malleolo tibiale (mediale) e il malleolo fibulare (laterale).

La tibia contiene, nell'estremità prossimale, le lamelle di pressione, che vanno dalla superficie articolare alla compatta della diafisi in linea retta; nell'estremità distale i sistemi che raggiungono la superficie articolare sono curvi e si intersecano tra di loro.

#### *2.2.2.1 Coniglio*

Nel coniglio (Fig. 4) mancano le curve laterali della tibia, che forma una lieve concavità posteriore nella sua parte superiore; nell'estremità prossimale è presente una piccola incisura muscolare. Il corpo, distalmente, è appiattito in senso anteroposteriore e, all'estremità distale, il malleolo laterale fa parte della tibia e presenta un rilievo laterale molto prominente. La fibula, a livello della diafisi tibiale, si fonde completamente con quest'osso, mentre nella parte superiore ne è alquanto allontanata.

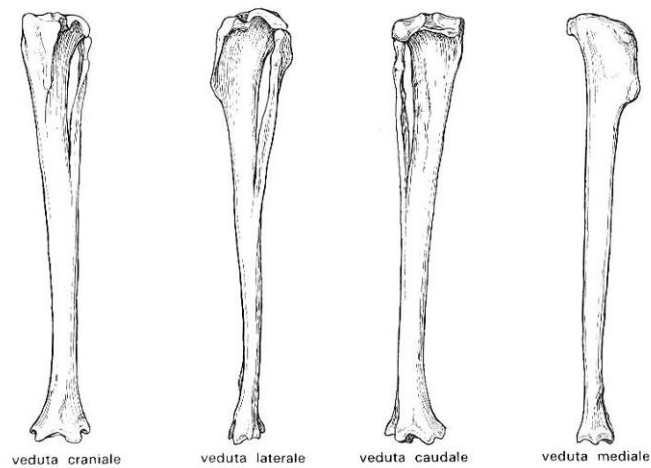


Fig. 4 - Tibia di coniglio

#### 2.2.2.2 Maiale

Nel maiale (Fig. 5) la tibia è grossa, appena convessa dal lato mediale; all'estremità distale è molto appiattita in senso cranio-caudale. La cresta è molto rilevata e termina bruscamente verso la metà dell'osso. La fossa tibiale è lunga e profonda, mentre la faccia caudale è scanalata nella porzione prossimale. All'estremità distale la superficie cocleare presenta gole relativamente meno profonde e il rilievo intermedio poco saliente cranialmente.

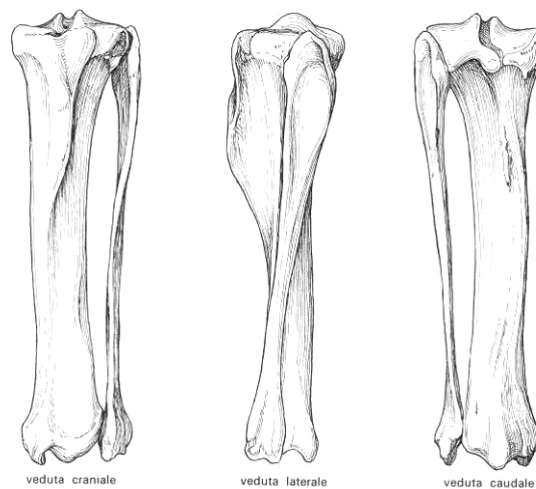


Fig. 5 - Tibia di maiale

### 2.2.2.3 Pecora

Nella pecora (Fig. 6) la tibia è relativamente lunga, superando le dimensioni del femore, ed è arcuata con una netta convessità mediale. Il corpo è quasi cilindroide, essendo la cresta tibiale bassa e breve. All'estremità prossimale, la spina tibiale è relativamente attenuata mentre, all'estremità distale, il rilievo che separa le due gole articolari è appena pronunciato.

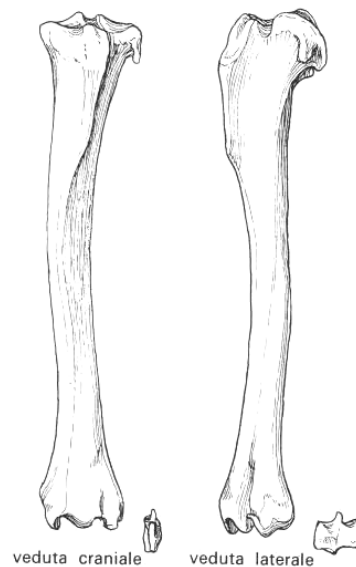


Fig. 6 - Tibia di pecora

## 2.3 Rimodellamento osseo

Il coniglio è il modello animale più comunemente utilizzato negli studi muscolo scheletrici, sia per la facilità di maneggiamento e stabulazione sia in quanto raggiunge la maturità scheletrica a 7 mesi di età (Masoud et al. 1986). A discapito delle dimensioni, il coniglio rimane la specie più popolare per testare nuovi materiali d'impianto (H.A. Yuehuei and J. Friedman 1999, “*Animal Models in Orthopaedic Research*”, CRC Press).

In rapporto ad altri modelli animali, come i primati e alcuni roditori, il coniglio presenta un rimodellamento e un ricambio osseo molto rapidi. Questo, a volte, rende più difficile interpretare e paragonare i risultati tra gli studi svolti su coniglio e i risultati clinici nell'uomo. Tuttavia, il coniglio rimane un ottimo modello di studio per effettuare uno "screening" iniziale sui biomateriali da impianto prima di applicarli su modelli animali più impegnativi.

Le fasi del processo riparativo osseo, schematizzate nella figura seguente (Fig. 7), comprendono il processo infiammatorio post-lesionale e l'iniziale rimodellamento osseo per mezzo degli osteoclasti (2), la formazione del callo fibroso (3), la sua evoluzione, ad opera degli osteoblasti, a callo osseo (4) e il rimodellamento finale ad opera degli osteoclasti, con l'allineamento delle lamelle ossee lungo le linee di forza primarie (5).

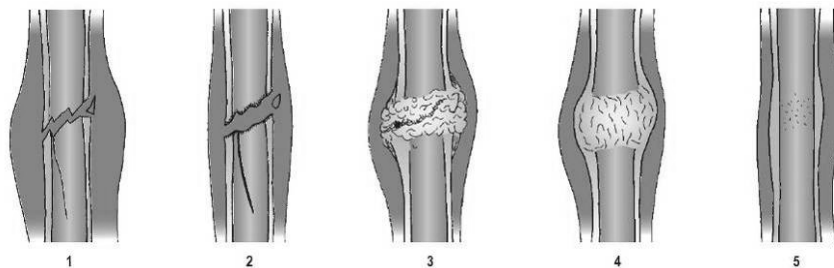


Fig. 7 - Riparazione delle lesioni ossee: 1) danno acuto, 2) reazione infiammatoria, 3) callo fibroso, 4) callo osseo, 5) rimodellamento

### 3 Densitometria ossea

Il primo sistema per la valutazione in vivo della massa ossea è stato l'esame radiografico, con il quale però si potevano solo formulare delle ipotesi sulla mineralizzazione del segmento osseo oggetto di studio. Infatti, è possibile evidenziare delle modificazione radiografiche solamente quando almeno il 30% della massa ossea è andata perduta (A.L. Huddleston, "*Quantitative Methods in Bone Densitometry*", Academic Publishers, 1988).

Le crescenti esigenze di giungere allo sviluppo di metodi più affidabili ed efficaci per la valutazione del patrimonio minerale dello scheletro, prevalentemente costituito da idrossiapatite di calcio (HA), hanno condotto, dapprima, alla creazione di sistemi di misura applicati alla tradizionale radiologia e, successivamente, alla realizzazione di tecnologie diverse e più sofisticate, in grado di fornire un significato clinico anche a minime variazioni della densità ossea. Tra le diverse metodiche impiegate per la valutazione della densitometria ossea si annoverano, oltre appunto alla radiologia convenzionale, la mineralometria ossea computerizzata (MOC), l'ultrasonografia (US), la tomografia computerizzata quantitativa (QCT) e la risonanza magnetica (RM).

Escludendo la MOC, che verrà trattata nello specifico in seguito, le altre tecniche presentano alcuni svantaggi rispetto a tale tecnica:

- lo studio tramite ultrasuoni risulta di veloce esecuzione e con costi limitati, ma permette di effettuare solo rilevazioni di tipo qualitativo, con elevata difficoltà di standardizzazione;
- la tomografia computerizzata quantitativa permette di ottenere un valore numerico assoluto di densità (espresso in Unità Hounsfield – UH), con la possibilità di realizzare acquisizioni volumetriche della regione in esame, ma richiede un software dedicato, con costi di gestione e manutenzione

- elevati, associati a tempi di scansione molto lunghi;
- l'utilizzo della tomografia a risonanza magnetica, tutt'ora in fase sperimentale, permette di ottenere una valutazione sia qualitativa che quantitativa del tessuto osseo in esame ma, allo stesso modo della QCT, presenta costi elevati e tempi lunghi di esecuzione.

### 3.1 Mineralometria ossea computerizzata (MOC)

La determinazione della massa ossea con la densitometria ossea si basa sull'assorbimento fotonico, dove i fotoni emessi vengono assorbiti in modo proporzionale alla densità del materiale indagato (coefficiente lineare di attenuazione, Fig. 8). L'intensità fotonica sarà quindi tanto minore quanto maggiore è lo spessore del tessuto esaminato e quanto più elevato è il suo contenuto in idrossiapatite di calcio (HA).

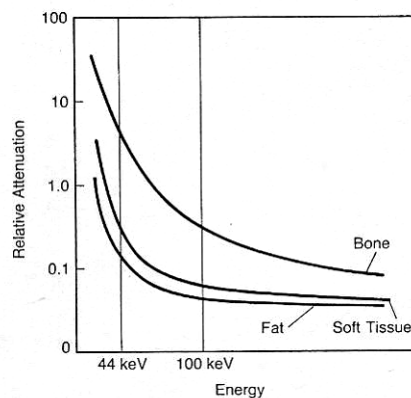


Fig. 8 - Coefficienti lineari di attenuazione nei differenti tessuti

L'evoluzione della densitometria ossea mediante MOC nel tempo ha portato allo sviluppo di differenti generazioni di apparecchiature:

- Single Photon Absometry (SPA);
- Dual Photon Absometry (DPA);
- Single Beam Dual X-Ray Absometry (DEXA);
- Fan Beam Dual X-Ray Absometry (DEXA FAN BEAM).

### 3.1.1 SPA e DPA

La mineralometria ossea a singolo raggio fotonico (**SPA**) si basa sull'attenuazione di un fascio di fotoni emesso da una sorgente radioattiva (es.  $^{125}\text{I}$  - 30 KeV) quando incontra il tessuto osseo. La misurazione della massa ossea richiede che l'osso venga immerso in acqua. Una volta determinata l'attenuazione dovuta alla presenza dello strato di tessuti molli (acqua paragonata ai tessuti molli), il contenuto minerale del segmento scheletrico viene ricavato con il confronto tra le due differenti attenuazioni (acqua e osso), tramite algoritmi convergenti che esprimono la misura in g/cm. Dividendo il valore assoluto per il diametro dell'osso si ottiene g/cm<sup>2</sup>.

Per quanto riguarda la medesima tecnologia, ma a doppio raggio fotonico (**DPA**), questa si basa su una fonte di emissione radioattiva a due diverse energie, in grado di stabilire, in ogni punto della scansione, la quota di attenuazione dell'emissione dovuta ai tessuti molli e quella imputabile al tessuto osseo. In questo modo diventa affidabile la densità ossea, indipendentemente dalla quantità e qualità dei tessuti molli circostanti.

La fonte dell'emissione radioattiva, a due diverse energie, più largamente adottata è il  $^{153}\text{Gd}$  (gadolinio, 44 e 100 KeV), in alternativa  $^{125}\text{I}$  (iodio) e  $^{241}\text{Am}$  (americium).

Gli svantaggi di queste due tecniche sono legati a scarsa riproducibilità dello studio per il decadimento del radioisotopo, bassa risoluzione delle immagini con tempi lunghi di scansione (7' - 30'), elevati costi di gestione e misure radioprotezionistiche restrittive.

### 3.1.2 DEXA

Il principio alla base del funzionamento della mineralometria ossea a raggi x (DEXA) è analogo a quello della DPA, ma in questo caso, impiegando una sorgente a raggi x, si ottengono maggiori valori di energia spettrale a bassa ed elevata frequenza, indipendenti dal decadimento della sorgente stessa.

Esistono due differenti tecniche di emissione dei raggi x, a energia filtrata e a energia pulsata. La prima (Fig. 9-A) impiega un tubo radiogeno (ad anodo fisso alimentato con due voltaggi differenti, che si alternano per produrre i due livelli di alta e bassa energia (tensione tipica 100-140 kVp). Nella seconda (Fig. 9-B) il tubo radiante (ad anodo fisso o rotante) viene alimentato con un solo voltaggio, in cui si interpone sul fascio prodotto un filtro di terra rara per produrre i due livelli di diversa energia (tensione tipica 84 kVp).

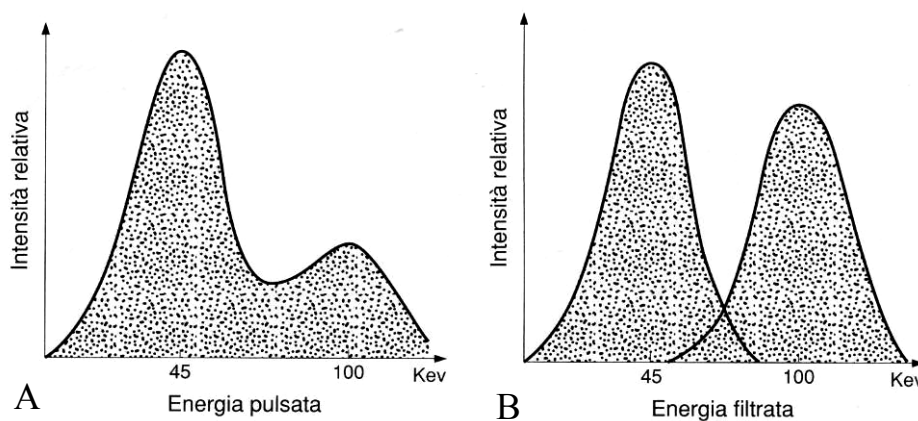


Fig. 9 - Emissione dei raggi X a energia pulsata (A) e filtrata (B)

Come per l'emissione dei raggi x, esistono anche due tecniche di lettura per questi sistemi, cosiddetti *single beam* e *fan beam*. Il primo (Fig. 10-A) presenta un sistema di lettura a singolo (o doppio) detector con emissione di raggi x a "pennello", tramite un collimatore circolare (*spinhole*) sul

complesso radiogeno; il secondo (Fig. 10-B) possiede un sistema di lettura “multi detector” con emissione di raggi x a “ventaglio”, tramite un collimatore a fessura sul complesso radiogeno.

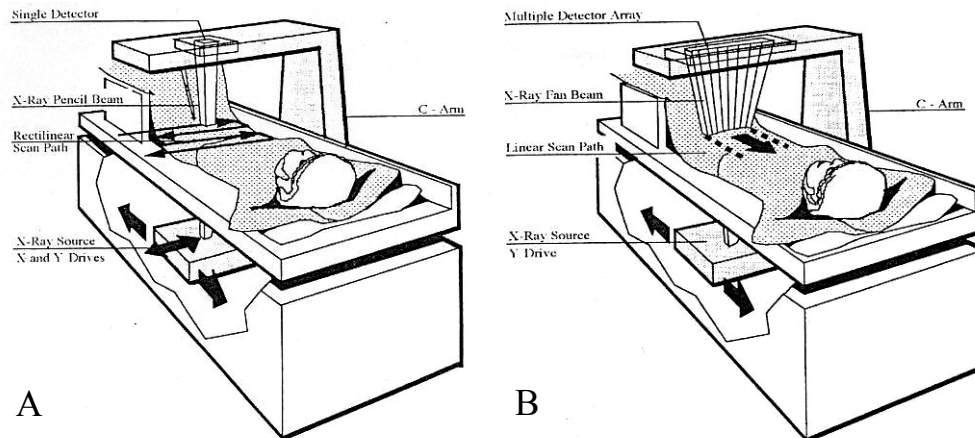


Fig. 10 - Schema di funzionamento del detettore DEXA *single beam* (A) e *fan beam* (B)

Al termine dello studio, l'elaboratore analizza i dati acquisiti, li converte in immagine in scala di grigi e, mediante particolari algoritmi matematici, mostra la densità ossea, espressa in  $\text{g/cm}^2$  della regione di interesse (ROI) da noi indicata.

La DEXA è considerata il gold standard nella valutazione della densitometria ossea, possiede elevata accuratezza e precisione (anche *long term*) con standardizzazione del dato. A suo favore presenta anche velocità di esecuzione e facile interpretazione dei dati. Gli svantaggi sono legati alla visualizzazione monoplanare della regione in esame, rispetto alla QCT, e alla valutazione unicamente quantitativa del tessuto in esame (A.L. Huddleston, “*Quantitative Methods in Bone Densitometry*”, Academic Publishers, 1988; J.N. Fordham, “*Manual of Bone Densitometry Measurements: An Aid to the Interpretation of Bone Densitometry*”, Springer, 2000).

## 4 Riparazione di difetti ossei: tecniche chirurgiche

Nell'ambito della medicina umana, soprattutto in campo ortopedico, interventi di ricostruzione del tessuto osseo si rendono necessari per la riparazione dei grossi difetti ossei conseguenti a gravi malformazioni congenite, eventi traumatici, ipoplasie, necrosi ischemiche, lesioni neoplastiche primarie (osteosarcomi, tumori ossei benigni) o secondarie (metastasi).

Tra le differenti tecniche chirurgiche attualmente impiegate si annoverano l'innesto di osso autologo, l'innesto di osso eterologo e l'utilizzo dei fattori di crescita (proteina osteogenica OP-1 e concentrato piastrinico PRP).

### 4.1 Innesto di osso autologo

Attualmente il trattamento chirurgico per perdite ossee estese si avvale di due alternative: l'**innesto di tessuto autologo** e l'ingegneria tissutale. Il primo, definito come 'gold standard' per la rigenerazione, rappresenta una soluzione sicura per la compatibilità e l'assenza di risposta immunitaria, ma anche disagiata per il paziente per la necessità di un secondo intervento e per il rischio di morbidità associato al prelievo. Inoltre è spesso difficile sopperire alla quantità di tessuto necessaria alla sostituzione della porzione mancante, o la qualità dell'osso recuperato non consente buoni risultati al reimpianto.

Il tessuto osseo prelevato può essere corticospongioso o solo spongioso e, solitamente, viene prelevato per via chirurgica dall'ala iliaca (Fig. 11, Gallinaro 2007, "Manuale di ortopedia e traumatologia", ed. McGraw-Hill).

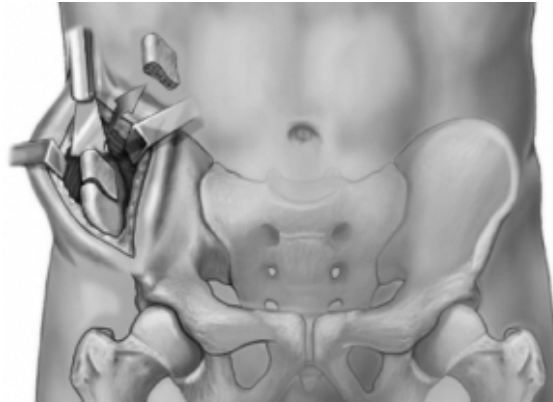


Fig. 11 - Prelievo di osso spongiosa dall'ala iliaca

L'osso spongioso rappresenta un tessuto altamente cellulare con elevate capacità osteoinduttive ma meccanicamente debole non adatto a fornire un sostanziale sostegno meccanico in caso di frattura. Tale sostegno può essere assicurato mediante sistemi di fissazione esterna o interna.

La rivascularizzazione di trapianti di osso spongioso ha inizio pochi giorni dopo l'applicazione e si completa in 14-21 giorni. Gli osteoblasti presenti nel sito secernono sostanza osteoide che quando mineralizzata origina tessuto osseo di nuova formazione che gradualmente colonizza completamente il trapianto. A questo punto inizia la fase di rimodellamento.

Questa tecnica, pur essendo considerata il “gold standard”, non elimina la possibile insorgenza di complicanze, quali lesioni nervose e/o vascolari, infezioni o fratture, sia nel sito donatore che in quello ricevente. Non bisogna poi sottovalutare il possibile danno estetico (Zijderd 2004) e la non applicabilità della tecnica in pazienti oncologici e pediatrici (Giannoudis et al. 2005).

## 4.2 Innesto di osso eterologo

Grazie all'esistenza di banche dell'osso, da tempo è disponibile anche l'**innesto di tessuto allogenico**; l'impianto di tessuto osseo eterologo ha assunto una certa importanza in chirurgia ortopedica, diventando in molti casi indispensabile (Giannoudis et al. 2005; Gallinaro 2007, Manuale di ortopedia e traumatologia, ed. McGraw-Hill). Tuttavia, ha mostrato essere spesso soggetto a scarso rimodellamento e insufficiente rivascolarizzazione, funzionando quindi solo da supporto; non sono da sottovalutare anche problematiche quali il rigetto e il rischio di infezioni legate all'impianto di tessuti di origine omologa.

Gli impianti ossei eterologhi, preparati e conservati, si dividono in **osso prelevato da donatore vivente** e **osso prelevato da donatore cadavere**.

Il processo biologico attraverso il quale l'impianto si rimodella è complesso: il tessuto è puramente osteoconduttivo e svolge solo la funzione di supporto (*scaffold*) per le cellule osteoblastiche del ricevente e viene progressivamente sostituito dall'osso neoformato (processo nominato *creeping substitution*). Dopo il prelievo, i segmenti vengono congelati e, se ritenuti idonei, subiscono processi di crioconservazione o liofilizzazione. Queste procedure ne modificano le caratteristiche, eliminandone anche la capacità antigenica. Per incrementare la proprietà osteoinduttiva, carente in questo tipo di impianto, si possono associare fattori di crescita, quali il concentrato piastrinico (PRP).

## 4.3 Fattori di crescita

I fattori di crescita sono polipeptidi sintetizzati sia dalle cellule residenti nel sito di lesione (fibroblasti, cellule endoteliali, cellule staminali

mesenchimali), sia dalle cellule riparative o infiammatorie (piastrine, macrofagi e monociti), migrate in tale sede. Queste proteine sono in grado di stimolare la proliferazione cellulare, la migrazione, la differenziazione e la sintesi di matrice. Caratteristiche fondamentali dei fattori di crescita sono la capacità di agire in modo finemente regolato, a concentrazioni molto basse, e l'estrema specificità, legata ai recettori specifici, espressi dalle cellule bersaglio sulla membrana plasmatica. Tutti i tessuti muscolo-scheletrici sintetizzano fattori di crescita e ne subiscono l'azione.

I fattori di crescita vengono classificati in base al sito d'azione primaria attribuitogli, tuttavia la loro azione spesso si esplica a livello di più tessuti.

- **PDGF** (*Platelet Derived Growth Factor*): molecola dimerica con due isoforme (A e B), che le permettono di formare omodimeri (AA, BB) o eterodimeri (AB). Svolge la sua attività fitogenica su un'ampia gamma di cellule e, essendo presente in elevata concentrazione nelle piastrine e nell'endotelio vascolare, la si ritrova nel plasma autologo ricco di piastrine (o concentrato piastrinico PRP).
- **TGF- $\beta$**  (*Transforming Growth Factor- $\beta$* ): si tratta di una superfamiglia di fattori di crescita dimerici che inducono proliferazione, non solo nelle cellule di origine mesenchimale. Ne esistono quattro forme: TGF- $\beta$ 1, 2, 3 e 4. TGF- $\beta$ 1 ha la maggior attività su osso e cartilagine di accrescimento (A.R. Vaccaro et al. 2007; K.R. Garrison et al. 2007).
- **BMP** (*Bone Morphogenetic Protein*): famiglia di 15 proteine, inclusa nella superfamiglia delle TGF- $\beta$  e coinvolta nella crescita e nello sviluppo dell'apparato muscolo-scheletrico. In particolare, BMP-7 (conosciuta anche come OP-1 - *Osteogenic Protein 1*) viene utilizzata, veicolata con *scaffold* a base di gel colla genici, per indurre rigenerazione ossea nella riparazione di ampi difetti ossei (A.R. Vaccaro et al. 2007; K.R. Garrison et al. 2007).

## 5 Riparazione di difetti ossei: sostituti sintetici

Un'alternativa promettente agli approcci tradizionali è costituita dall'**ingegneria tissutale**. Per la riparazione tissutale, si possono distinguere due percorsi alternativi: la *tissue engineering* e la *in situ tissue regeneration*. Il primo prevede la semina e il differenziamento *ex-vivo* di cellule osteoprogenitrici autologhe su supporti tridimensionali modificati e riassorbibili (*scaffolds*); i costrutti così ingegnerizzati, una volta reimpiantati nel paziente, dovrebbero essere gradualmente riassorbiti e sostituiti da tessuti vitali grazie all'apporto vascolare e nervoso.

Il secondo approccio associa agli *scaffolds* materiali in forma di polveri, soluzioni o microparticelle capaci di promuovere la riparazione locale. Molecole o fattori che attivano la proliferazione cellulare, come le Bone morphogenetic proteins (BMPs), possono essere coniugate chimicamente al materiale e rilasciate nei tessuti a velocità controllata, per diffusione o frammentazione del supporto.

L'utilizzo di questi materiali sintetici, denominati *scaffold*, permette di soddisfare le caratteristiche di quantità, resistenza e di non trasmissibilità di patologie legate all'utilizzo di tessuto osseo (Hing et al. 2006).

### 5.1 Materiali per scaffold

Gli *scaffolds* sono strutture altamente sofisticate, studiate per favorire inizialmente l'attacco, l'adesione e la distensione cellulare, e in seguito la deposizione di nuovo tessuto osseo.

### 5.1.1 Ceramiche

Le ceramiche sono un'ampia classe di materiali inorganici non metallici (allumina, idrossiapatite, vetri ecc.) i cui atomi sono legati da legami ionici o covalenti. Formano un reticolo cristallino simile a quello dei metalli, ma a causa della presenza di specie cariche subiscono difficilmente deformazione meccanica; per questo motivo hanno resistenza meccanica migliore dei metalli e dei polimeri, ma sono estremamente fragili.

Per legge (ISO 6474, ASTM F603-83), le bioceramiche devono possedere le seguenti proprietà: densità  $> 3,9 \text{ g/cm}^3$ , dimensioni medie del grano  $< 0,7 \text{ mm}$ , microdurezza 23000 MPa, resistenza alla compressione 4000 MPa, resistenza alla flessione  $> 400 \text{ MPa}$  e modulo di Young 380 GPa.

Le sostanze bioassorbibili e bioattive sono in grado di legarsi direttamente al tessuto ospite, mentre quelle bioinerti non sono in grado di formare legami con l'osso. Alcuni materiali possono essere sia riassorbibili che bioattivi (Carson et al. 2007; J.Black, "*Orthopaedic Biomaterials in Research and Practice*", ed. Churchill Livingstone Inc. 1988).

Le ceramiche vengono classificate in tre principali categorie, in base alle interazioni col tessuto ospite:

- **ceramiche bioassorbibili** (fosfato di calcio), idrossifosfato di calcio (idrossiapatite, HA),  $\beta$ -trifosfato di calcio (gesso di Parigi,  $\beta$ -TCP);
- **ceramiche bioattive**, biovetri e biovetroceramiche a base di silice, ottenute mediante tecniche di nucleazione controllata;
- **ceramiche bioinerti**,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{ZrO}_2$  stabilizzata con  $\text{Y}_2\text{O}_3$  e  $\text{CeO}_2$ ,  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ , con purezza  $> 99,5\%$  ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{O} < 0,1\%$ ).

### 5.1.1.1 Ceramiche bioassorbibili

Le ceramiche bioassorbibili sono state il primo materiale sintetico utilizzato per gli innesti ossei. La loro composizione e struttura chimica hanno un ruolo molto importante nel determinare il grado stesso di riassorbimento. Ad esempio, il  $\beta$ -TricalcioFosfato ( $\beta$ -TCP) viene riassorbito 10-20 volte più velocemente rispetto all'idrossiapatite (HA), nonostante siano entrambe ceramiche di calcio fosfato (Fig. 12). La stessa struttura cristallina determina il diverso grado di riassorbimento.



Fig. 12 - Idrossiapatite (HA)

Le dimensioni ottimali dei pori devono essere comprese tra i 150 e 500  $\mu\text{m}$ . Le principali bioceramiche di calcio fosfato, analizzate in molti studi, sono HA e  $\beta$ -TCP, oppure miscele di questi due elementi. Queste ceramiche vengono prodotte in forma di polveri, in modo da poter essere modellate in *pellet*, tramite compattamento ad alta pressione. L'uso di questi composti a base di calcio fosfato ha come svantaggio l'incapacità di sopportare forze di taglio e di torsione ed inoltre, la resistenza alla compressione diminuisce nel giro di circa 4 mesi. Questi materiali, pur non avendo proprietà osteoinduttive, creano un ottimo legame tra innesto e osso, tale da stimolare i fattori di crescita a indurre il processo rigenerativo (Carson et al. 2007).

Il  $\beta$ -TricalcioFosfato è un emiidrato di calcio solfato ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) ed è stato il primo materiale sintetico utilizzato come sostituto del tessuto osseo.

Possiede un rapido *turnover* e la maggior parte del suo riassorbimento avviene nel giro di alcune settimane. Non inibisce l'osteogenesi e non aggrava l'infezione in cavità infette, inoltre è molto economico, facile da preparare e ha una durata quasi infinita. Lo svantaggio è che, a causa della sua bassa porosità naturale, può essere usato per colmare solo piccoli difetti (cisti ossee). Tuttavia, negli ultimi anni, è stato impiegato in forma di tavolette per colmare difetti ossei più estesi (Carson et al. 2007).

L'idrossiapatite è un minerale avente composizione chimica  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ , il cui rapporto Ca/P=10/6. Fa parte della famiglia delle apatiti e contiene un gruppo OH. Cristallizza nella forma esagonale e possiede una durezza pari a 5 e peso specifico tra 2,9 a 3,2 g/cm<sup>3</sup>. Nell'osso naturale è presente in forma micro-cristallina e, a livello di osso corticale, ne rappresenta la totalità della sua struttura minerale (70%), assieme al 30% di collagene. L'idrossiapatite, preparata per via sintetica, rappresenta un buon sostituto dell'osso naturale poiché atossico e in assenza di risposta infiammatoria o reazioni da corpo estraneo. L'idrossiapatite può essere non porosa, ma in tal caso non è riassorbibile, solo bioattiva. La porosità per coinvolgere le strutture cellulari deve essere di almeno 150 µm e, inoltre, per favorire il riassorbimento è importante il microambiente (J. Black, "*Orthopaedic Biomaterials in Research and Practice*", ed. Churchill Livingstone Inc., 1988; Carson et al. 2007).

Ricordiamo per completezza le ceramiche derivate da materiali quali il corallo, in cui i pori sono interconnessi in una rete di maglia (Carson 2007).

#### 5.1.1.2 Ceramiche bioattive

Le ceramiche bioattive (Fig. 13) sono in grado di formare un legame fisico tra innesto e tessuto ospite.

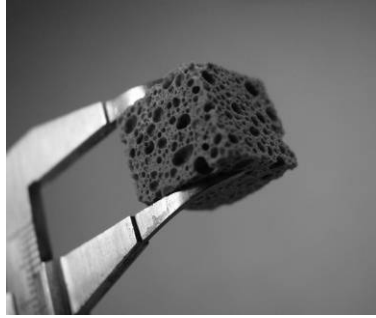


Fig. 13 - Ceramica bioattiva

Questo processo si evidenzia nelle vetroceramiche, formate da almeno il 60% di  $\text{SiO}_2$ , e contenenti alte quantità di  $\text{Na}_2\text{O}$  e  $\text{CaO}$ , mantenendo un rapporto Ca/P molto vicino a quello dell'osso di destinazione (Tab. 1).

Ioni	Funzione biologica
$\text{SiO}_4$	Produzione di gel di silice
$\text{PO}_4$	Stimolatore di funzioni cellulari
Na	Attivatore di funzioni cellulari
K	Antagonista a Na
Ca	Attivatore di funzioni cellulari
Mg	Antagonista a Ca
F	Stimolatore del sistema ricostruttivo

Tab. 1 - Principali componenti delle bioceramiche

L'esposizione a un medium acquoso determina intense reazioni sulla superficie delle ceramiche bioattive, che determinano una rapida formazione di cristalli di idrossicarbonatoapatite (HCA) che si legano tenacemente al tessuto ospite. Le ceramiche non sono riassorbibili, ma formano un supporto molto stabile tra innesto e osso. In generale i biovetri, in assenza di ceramiche addizionate, hanno una minor resistenza e per questo vengono utilizzati in lesioni di dimensioni medie o in assenza di forze di carico (es. ampie lesioni della scatola cranica) (Carson et al. 2007).

### 5.1.1.3 Ceramiche bioinerti

Le ceramiche bioinerti non reagiscono col tessuto vivente, possiedono un'altissima resistenza meccanica e sono largamente biocompatibili. Sono spesso dei composti a base di metalli ossidati come l'Allumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), la Zirconia ( $\text{ZrO}_2$ ) e la Titania ( $\text{TiO}_2$ ). Per le loro caratteristiche di alta resistenza alla compressione, sono utilizzate prevalentemente per ampie lesioni ossee e inoltre vengono largamente impiegate per la costruzione di protesi articolari (es. testa del femore). Poiché non si legano all'osso, la loro applicazione è limitata a riparazioni in assenza di bruschi spostamenti o forze di torsione (J.Black, *“Orthopaedic Biomaterials in Research and Practice”*, ed. Churchill Livingstone Inc., 1988; Carson et al. 2007).

Tra le ceramiche bioinerti, l'allumina pura è utilizzata sin dai primi anni 70 come materiale da innesto, specialmente per protesi articolari e impianti dentali. Nel corso degli ultimi anni ha assunto un ruolo fondamentale anche nel campo della chirurgia maxillofacciale. Possiede però una bassa resistenza a trazione, motivo per cui il suo uso è limitato alle condizioni di carico di sola compressione (J.Black, *“Orthopaedic Biomaterials in Research and Practice”*, ed. Churchill Livingstone Inc., 1988).

### 5.1.2 Polimeri

I polimeri sono materiali organici generati da polimerizzazioni controllate di singole molecole, dette monomeri. Le reazioni di polimerizzazione possono essere a step (reazioni di condensazione) per ottenere ad esempio poliesteri, oppure reazioni radicaliche di addizione per ottenere polistirene o polietilene.

I polimeri biomedici, a seconda del loro comportamento dopo l'impianto possono essere classificati in non degradabili o biodegradabili. Tipici polimeri non degradabili sono: polietilene a elevato peso molecolare (UHMWPE), usato in ortopedia; polimetilmetacrilato (PMMA, Fig. 14), polimerizzato *in situ* per i cementi ossei o utilizzato per lenti a contatto; polidimetilsilossano, usato per tessuti molli e lenti intraoculari.

Il PMMA, quando frammentato, stimola una reazione osteolitica da corpo estraneo, ma non può essere riassorbito, quindi non forma nuovo tessuto osseo nell'area della lesione.



Fig. 14 - PMMA

I polimeri bioriassorbibili sono materiali polimerici, generalmente poliesteri alifatici, che si degradano in ambiente fisiologico attraverso l'idrolisi del legame estereo. Per questa proprietà sono studiati per applicazioni a breve termine che richiedono solo la presenza temporanea dell'impianto polimerico: materiali di sutura, mezzi di fissaggio ortopedici, membrane periodontali, sistemi a rilascio controllato di farmaci. Queste diverse applicazioni richiedono impianti con velocità di biodegradazione diversa, che quindi deve essere programmata e predeterminata sulla base delle specifiche applicazioni cliniche.

I poliesteri alifatici sono i polimeri più usati nell'ingegneria del tessuto muscoloscheletrico (osso, cartilagine, menisco): l'acido poliglicolico (PGA), l'acido polilattico (PLLA), i loro copolimeri (PLGA), e il poli- $\epsilon$ -caprolattone (PCL) fanno parte di questa famiglia. La degradazione avviene in tempi veloci (settimane) per PGA e PLLA e lenti (mesi) per PCL; i primi sono degradati per scissione idrolitica dei legami con produzione di acido lattico e glicolico, che vengono infine rimossi attraverso i processi metabolici.

Le polianidridi, proposte per il rilascio controllato di farmaci, si degradano per erosione superficiale e idrolisi. Tra queste, la poli(anhydride-*co*-imide) è indicata per la sostituzione dell'osso sottoposto a carico, mentre il poli(propilene-fumarato) (PPF) che ha proprietà simili a quelle dell'osso trabecolare, sono utilizzati come riempitivo per difetti scheletrici (Gunatillake et al., 2003).

Questi polimeri possono essere utilizzati nella riparazione di ampi difetti ossei, inoltre possono svolgere il ruolo di cotrasportatori di sostanze, quali antibiotici o agenti osteoinduttivi (Carson et al. 2007).

### **5.1.3 Materiali compositi**

I compositi sono materiali che contengono, su scala macroscopica o microscopica, due o più fasi (plastiche rinforzate, vetroresina), di materiali diversi per composizione, morfologia e proprietà fisiche, sintetizzati per ottenere specifiche proprietà fisiche, chimiche e meccaniche. Il vantaggio dei compositi è quello di mostrare le migliori caratteristiche dei diversi costituenti e talvolta di possederne altre che i singoli componenti non hanno.

Solitamente consistono di una matrice cui è aggiunta una fase rinforzante adeguatamente dispersa. Le fibre possono essere in vetro, carbonio o polimeri a loro volta e possono essere lunghe (compositi a matrice continua) o piccole (discontinua).

I materiali compositi hanno finora trovato applicazione in quasi tutti i campi della medicina rigenerativa (applicazioni cardiovascolari, materiali e protesi dentarie, materiali ortopedici, cementi e articolazioni artificiali).

I biomateriali compositi sono in grado di fornire prestazioni migliori rispetto ai materiali omogenei e, attraverso la variazione delle frazioni in volume e delle interfacce (granulometria, porosità, dimensione delle fasi), è possibile controllare le proprietà macroscopiche e microscopiche finali del materiale.

Tra questi materiali è presente una bioceramica, formata da idrossiapatite porosa, derivata dallo scheletro di calcio carbonato del corallo marino.

#### **5.1.4 Altri materiali**

Gli *scaffolds* per tessuto osseo possono essere costituiti da materiali naturali come collagene, fibrina, acido ialuronico e membrane biologiche, che hanno struttura simile ai tessuti originali. Nonostante questo, tali materiali risultano spesso di difficile preparazione e modellazione nei formati necessari, nonché possibili veicoli di malattie o infezioni; inoltre anche la proprietà meccaniche sono difficilmente quelle richieste. Recentemente sono stati messi a punto supporti biodegradabili (schiume, 'idrogel' iniettabili, sospensioni di collagene occasionalmente combinato con acido ialuronico) temporanei, per il rilascio controllato di fattori osteogenici che favoriscono il processo di rigenerazione *in situ*.

## 5.2 Vantaggi nell'utilizzo di innesti sintetici

Attualmente gli innesti sintetici mancano di resistenza alle forze di taglio che non permette il loro impiego nei diversi tessuti senza un adeguato rinforzo. La ricerca sui tessuti ingegnerizzati è rivolta ad ottenere un aumento della resistenza meccanica e l'osteoconduttività, senza compromettere le caratteristiche biologiche e il riassorbimento.

Gli *scaffold* sintetici sono molto importanti nella riparazione delle lesioni ossee poiché rappresentano un ottimo supporto per i fattori di crescita, al contrario dei supporti di gel o della sola disseminazione su *pellets*. La morfologia migliore per dare supporto ai fattori di crescita è la struttura porosa, che permette anche un miglior riassorbimento e rimodellamento osseo, fino alla sostituzione completa dello *scaffold* con tessuto osseo neoformato (Carson et al. 2007).

Si può affermare inoltre che gli *scaffold* non solo possiedono un effetto osteoconduttivo, ma anche osteoinduttivo, infatti la loro geometria è tale da influenzare le proprietà del microambiente, da permettere una iniziale neoangiogenesi e da opporre una certa resistenza all'infiltrazione di tessuto fibroso. Questi fattori, stimolando la crescita ossea, spiegano l'effetto induttivo degli *scaffold* (Carson et al. 2007).

L'obiettivo finale nel produrre *scaffold* sintetici è quindi quello di arrivare a ottenere supporti con caratteristiche di resistenza alla compressione maggiori rispetto all'osso spongioso, rimanendo riassorbibili e ottenendo una buona vascolarizzazione e rimodellamento osseo (Carson et al. 2007).

## 6 Cellule staminali

Ormai da una trentina di anni, le cellule staminali vengono comunemente utilizzate nella riparazione di tessuti e organi danneggiati (Gardner 2007). La prospettiva di sfruttare questa tipologia di cellule in maniera più ampia, all'interno della medicina rigenerativa, è stata incoraggiata dall'utilizzo di cellule somatiche (o adulte), localizzate in tutti i tessuti corporei, e in particolare di cellule staminali mesenchimali (MSCs), il cui prelievo da tessuto autologo eliminerebbe le problematiche legate a reazioni di rigetto. Le cellule staminali sono cellule indifferenziate, in grado di dividersi in cellule figlie e mantenersi per lunghi periodi (capacità di automantenimento), non specializzate e in grado di dare luogo a linee cellulari specializzate (capacità di differenziazione) (Fig. 15).

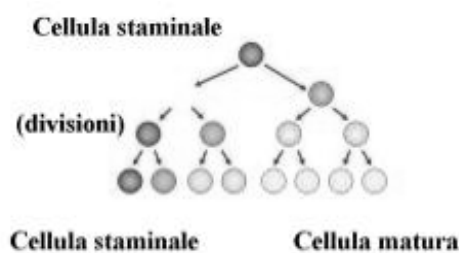


Fig. 15 - Divisione delle cellule staminali

La **capacità di automantenimento** è la proprietà che possiedono le cellule staminali di dividersi molteplici volte, dando luogo a una popolazione di cellule identiche alle progenitrici, dette cellule figlie. Questa capacità, nel caso di crescita staminali embrionali *in vitro*, può dar luogo a un numero considerevole di cellule, in un periodo di tempo relativamente breve (mesi). Le cellule staminali sono **non specializzate**, ossia non sono in grado di compiere funzioni specifiche, mantenendo però la possibilità di specializzarsi in seguito.

Il processo, che permette alle cellule di specializzarsi, è chiamato **differenziazione** ed è formato da diverse fasi, regolate da segnali interni (codificati da geni) ed esterni (contatto con cellule vicine, segnali chimici secreti e microambiente in cui risiedono).

## 6.1 Classificazione

Esistono diversi tipi di cellule staminali, classificabili in base al loro grado di differenziazione:

- **totipotenti**, quando danno origine a tutte le possibili cellule di un determinato organismo, sia tessuti embrionali che extraembrionali. Attualmente è noto che solo le cellule che compongono l'embrione ai primi stadi di vita possiedono questa capacità.
- **pluripotenti**, quando possono dare origine a diversi tipi di cellule, appartenenti ai tre differenti foglietti germinativi: endoderma, mesoderma ed ectoderma. Non danno origine a tessuti extraembrionali e non sono in grado di generare un organismo completo.
- **multi potenti**, quando possono dare origine a più tipi di cellule, appartenenti allo stesso foglietto germinativo.
- **uni potenti**, quando possono dare origine a un solo tipo di cellula specializzata, mantenendo però la capacità di autorinnovamento.

## 6.2 Origine

Le cellule staminali possono essere classificate, in base alla loro provenienza, in cellule staminali embrionali, fetali, da annessi embrionali, adulte e mesenchimali.

### 6.2.1 Cellule staminali embrionali e fetali

Le cellule staminali embrionali (ESCs) vengono prelevate dall'embrione allo stadio di blastocisti, costituita da una cavità (blastocoele) circondata dal trofoblasto; da questo si possono prelevare le cellule staminali, a partire da 4-5 giorni dopo la fecondazione (Fig. 16, Pal 2009). In questo stadio le cellule non sono già più totipotenti, bensì pluripotenti, mantenendo un'illimitata capacità di replicazione, la cui differenziazione cellulare è però poco controllabile.

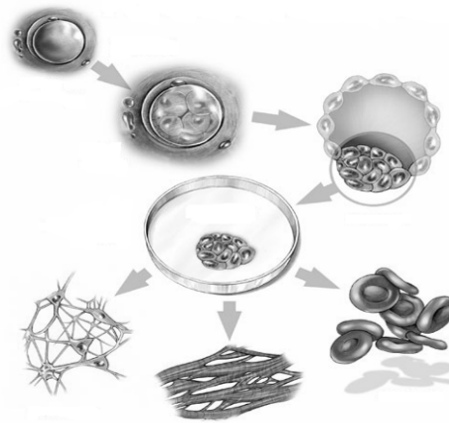


Fig. 16 - Cellule staminali embrionali

Le cellule staminali fetali (FSCs) sono cellule pluripotenti, presenti nel feto durante la gestazione, che permettono lo sviluppo di organi e tessuti. In alcuni casi, le cellule staminali in coltura possono differenziarsi spontaneamente, portando allo sviluppo di linee cellulari specifiche, a volte di possibile natura tumorale.

### 6.2.2 Cellule staminali da annessi embrionali

Il liquido amniotico rappresenta una fonte alternativa di cellule staminali. Al suo interno si trova un particolare tipo di cellule staminali, a uno stadio intermedio tra embrionali e adulte, facilmente isolabili e con una buona

velocità di replicazione. Queste cellule, classificate come staminali pluripotenti, hanno mostrato di potersi differenziare *in vitro* in diversi fenotipi: osteogenico, adipogenico, miogenico, neurogenico, endoteliale ed epatico (Gearhart et al., “*Essentials of stem cells biology*”, ed. Elsevier academic press, 2006).

Le cellule staminali derivate dal cordone ombelicale, sono cellule multipotenti, utilizzate per la cura di patologie del sistema emopoietico, in particolare in pazienti pediatrici, come alternativa al trapianto di midollo osseo. Il loro limite rimane lo scarso numero di cellule recuperabili da questa sede (Gearhart et al., “*Essentials of stem cells biology*”, ed. Elsevier academic press, 2006).

Un'altra fonte di cellule staminali, appartenenti alla linea emopoietica e con le medesime caratteristiche delle staminali prelevate dal cordone ombelicale, è rappresentata dalla placenta. In genere il prelievo risulta essere più complesso rispetto a quello effettuato dal cordone, ma il numero di cellule raccolte è maggiore. Le staminali prelevate dai villi corionici di placenta umana, inoltre, hanno mostrato la capacità di differenziarsi *in vitro* in osteoblasti, condrociti, adipociti e cellule neurali (Zhang et al. 2006).

#### **6.2.4 Cellule staminali adulte**

Le cellule staminali adulte sono cellule indifferenziate, localizzate in organi e tessuti, che possono differenziarsi in seguito in cellule specifiche appartenenti a linee cellulari dello stesso foglietto germinativo (multipotenti). La loro funzione fisiologica consiste nel mantenere e riparare il tessuto nel quale si trovano; queste cellule sono state isolate in molti tessuti (cervello, midollo osseo, pelle, cuore, denti, muscoli, ecc.), localizzate in determinate “nicchie”. Il loro microambiente è in grado di

sviluppare segnali capaci di indirizzare le cellule figlie a uno specifico differenziamento, localizzandole al di fuori di tale nicchia dove, mancando il segnale di auto mantenimento, portano avanti il loro differenziamento cellulare. Nella “nicchia” il numero di staminali rimane costante e, in tale sede, le cellule si automantengono in stato quiescente, finché non vengono attivate da stimoli proliferativi da parte del tessuto (Gearhart et al., “*Essentials of stem cells biology*”, ed. Elsevier academic press, 2006).

Esistono differenti linee di differenziazione delle staminali adulte:

- emopoietica (HSCs), differenziano in globuli rossi, linfociti B, linfociti T, neutrofili, basofili, eosinofili, monociti e macrofagi;
- mesenchimale (MSCs), differenziano in condrociti, adipociti e osteoblasti;
- neurale (NSCs), in grado di dar luogo a tre tipi di cellule, neuroni, astrociti e oligodendrociti;
- epiteliale, localizzate a livello di cripte dell’epitelio intestinale.
- cutanea, che si trovano in profondità a livello di follicolo pilifero. Differenziano in cheratinociti, per poi migrare in superficie. Le cellule staminali follicolari si specializzano in follicoli piliferi.

#### 6.2.4.1 Cellule staminali mesenchimali (MSCs)

Le cellule staminali mesenchimali sono cellule staminali multipotenti. Sono isolabili da diversi tipi di tessuto (Gearhart et al., “*Essentials of stem cells biology*”, ed. Elsevier academic press, 2006), tradizionalmente dallo stroma del midollo osseo. Negli ultimi anni sono state isolate anche da altri tessuti adulti, tra i quali il midollo spinale, le ossa trabecolari, il muscolo scheletrico, la cute, il periostio, la membrana sinoviale e il tessuto adiposo (De Girolamo 2008).

Le cellule staminali mesenchimali possiedono diverse proprietà:

- capacità di espansione *in vitro* per numerose generazioni, mantenendo sia la capacità proliferativa che lo stato indifferenziato;
- abilità di migrazione verso i tessuti danneggiati e i siti d'inflammazione;
- scarsa immunogenicità e quindi una scarsa reazione di rigetto nei trapianti autologhi e allogenici (Gearhart et al., "*Essentials of stem cells biology*", ed. Elsevier academic press, 2006).

Il tessuto adiposo è considerato una risorsa importante di cellule staminali mesenchimali, poiché è un tessuto presente in grandi quantità, facilmente accessibile e con una resa elevata di cellule. Mediante lipoaspirazione la vitalità delle cellule staminali prelevate si aggira intorno al 98-100%. Le staminali da tessuto adiposo (ASCs) presentano una buona capacità di differenziazione nelle linee cellulari dei tre foglietti germinativi (Locke 2009) e, se sottoposte a opportuni stimoli chimici e fisici, sono in grado di differenziare in tessuti del mesoderma (osso, cartilagine, tessuto adiposo, muscoli), e di transdifferenziare in tessuti dell'endoderma (epatociti e cellule  $\beta$  delle isole pancreatiche) e dell'ectoderma (neuroni) (De Girolamo 2008).

### **6.3 Utilizzo clinico delle cellule staminali**

Le cellule staminali mesenchimali sono cellule staminali adulte, presenti in tutti i tessuti, come parte della popolazione cellulare perivascolare. La loro capacità di differenziare in tessuti mesodermici e non mesodermici e le limitate proprietà immunosoppressive ne hanno permesso l'utilizzo in molteplici applicazioni cliniche, in particolar modo nell'ambito della medicina rigenerativa. Grazie alla loro capacità di produrre effetti trofici,

mediante la liberazione di fattori di crescita e citochine (Sensebé et al. 2009), svolgono un ruolo importante nella riparazione dei tessuti.

A oggi le cellule staminali ematopoietiche, siano esse provenienti dal midollo osseo, dal sangue periferico o dal cordone ombelicale, sono le più usate nella pratica clinica, soprattutto nel campo delle patologie ematopoietiche. L'applicazione all'apparato cardiocircolatorio è improntata sulla capacità di differenziazione delle staminali adulte in cardiomiociti.

Le cellule staminali adulte sono anche in grado di differenziarsi in alcuni tipi di cellule epiteliali e, allo stato attuale della ricerca, si è ottenuta una completa differenziazione neuronale solo dopo colture in associazione con cellule dell'astroglia o neuroni.

### **6.3.1 Riparazione di tessuto cartilagineo e osseo**

La capacità di differenziamento in osteoblasti e condrociti si è rilevata molto utile in diverse patologie dell'apparato scheletrico. Il potenziale osteoblastico è stato sfruttato per il trattamento di disordini ossei in patologie come l'osteogenesi imperfetta (OI) (Horwitz et al. 2002), per i processi di cicatrizzazione ossea e per la riparazione di difetti ossei delle ossa lunghe (Cancedda et al. 2007; Hemigou et al. 2005).

La ricerca nel settore delle malattie del tessuto osseo apre nuove e importanti prospettive in molteplici aree, quali quelle della chirurgia medica e ortopedica. Nella medicina rigenerativa applicata alle patologie che interessano l'apparato scheletrico, sono emerse tre componenti importanti per lo sviluppo di tessuti ingegnerizzati per la riparazione dello scheletro:

- cellule multipotenti progenitrici del tessuto scheletrico (MSCs);

- aumento della rigenerazione scheletrica endogena, ottenuta attraverso manipolazione molecolare del segnale inerente al processo di differenziazione osteogenica;
- *scaffold* (supporti) biomeccanici.

Le cellule staminali adulte (o mesenchimali), sono quelle più utilizzate in campo ortopedico, poiché sono reperibili in diversi tessuti nell'adulto e non creano problemi di natura etica. In particolare, vengono utilizzate quelle provenienti dal midollo osseo (BMSCs) e dal tessuto adiposo (ASCs). Queste ultime sono da preferirsi per la facilità di prelievo e la maggior quantità disponibile sul singolo donatore; inoltre, si è visto che le ASCs possiedono le caratteristiche necessarie per aumentare il processo riparativo osseo.

Per evitare dispersione delle cellule nel sito d'impianto è necessario un supporto biomeccanico che mimi per composizione, struttura e funzione, le caratteristiche dell'osso nativo. L'interazione tra le cellule e lo *scaffold* deve garantire, in particolare nelle prime fasi di guarigione, una buona differenziazione cellulare osteogenica, associata a una certa resistenza strutturale, senza dare reazioni indesiderate nel punto d'impianto (Panetta et al. 2009).

## 7 Modelli animali

I modelli animali sono un'importante fonte di conoscenza per lo sviluppo di nuove terapie cliniche e chirurgiche, sia per l'uomo che per gli animali. Tali modelli sono una componente fondamentale della ricerca medica, poiché fanno da ponte tra gli studi *in vitro* e gli studi preclinici nell'uomo (Fig. 17, H.A. Yuehuei and J. Friedman, “*Animal Models in Orthopaedic Research*”, 1999 CRC Press).

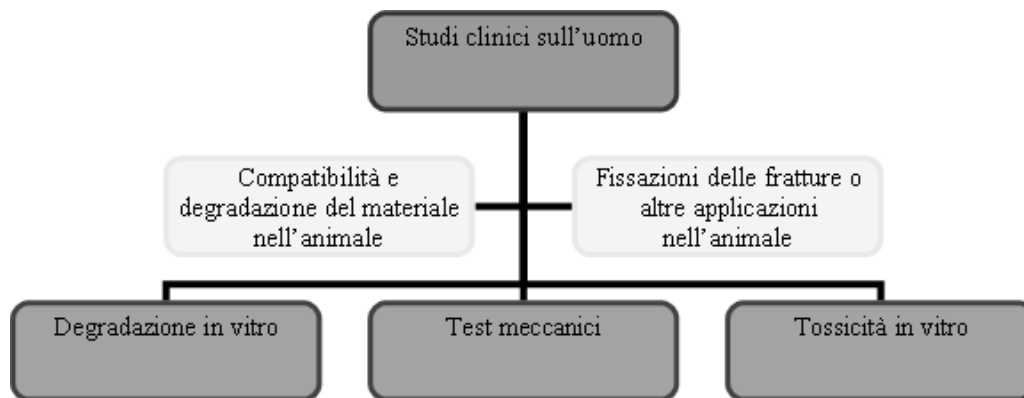


Fig. 17 - Fasi di sviluppo di un'applicazione clinica di un materiale bioassorbibile.

### 7.1 Scelta del modello animale nella ricerca ortopedica

La scelta del modello animale si basa su differenti fattori. Per prima cosa si valutano le caratteristiche anatomiche e fisiologiche delle diverse specie, in rapporto al tipo di studio da intraprendere. Nella fase iniziale dello studio, che valuta semplicemente le reazioni del tessuto vivente nei confronti di un nuovo materiale, la scelta ricade su una specie a un livello basso della scala evolutiva (ad esempio ratti, topi e conigli). Nella seconda fase, in cui si testano le possibili applicazioni e la tecnica chirurgica, si utilizzeranno animali evolutivamente “superiori” (ad esempio maiali, pecore, capre e cani).

Oltre a questi criteri di scelta, bisogna considerare i limiti legati alla disponibilità dell'animale, alla stabulazione, alla maneggevolezza, la predisposizione di determinate specie a particolari malattie e il costo (Tab. 2). Non sono poi da sottovalutare le problematiche di tipo etico.

Animali	Vita media (anni)	Patologie comuni	Peso medio (Kg)	Costo/animale (E/animale)	Costo stabulazione (E/giorno/animale)	Requisiti di stabulazione	Tipo di maneggevolezza
Ratto (convenzionale)	2-3	Infezioni multiple	0,2-0,4	15-25	0,2	Ambiente monitorato (temperature e umidità)	Facile
Ratto (VAF <sup>o</sup> o SPF*)	2-3	Nessuna	0,2-0,4	15-25	0,2	Ambiente monitorato (temperature e umidità)	Facile
Coniglio (convenzionale)	7-8	Pasteurellosi	3-5	25-35	1-2	Temperatura e umidità	Facile
Coniglio (SPF*)	7-8	Nessuna	3-5	35-55	1-2	Ambiente monitorato (temperature e umidità)	Facile
Cane	10-12	Filaria, epatite	10-25	300	4-5	Gabbia spaziosa	Facile (2 persone)
Capra	10-15	Polmonite batterica o virale	50-70	250	4-5	Niente	Difficoltosa
Pecora	10-15	Polmonite batterica o virale	50-70	250	4-5	Nessuna	Difficoltosa
Maiale	10	Forme respiratorie	50-110	250	4-5	Nessuna	Difficoltosa

Tab. 2 - Scelta del modello animale, fattori influenzanti  
<sup>o</sup> virus antigen free, \* specific pathogen free

## 7.2 Animali più comunemente utilizzati negli studi ortopedici

Nello sviluppo di uno studio ortopedico sono numerosi i modelli animali utilizzabili: ratti, topi, conigli, cani, pecore, capre, maiali, cavalli, primati e altri animali, considerati non convenzionali.

### 7.2.1 Coniglio

Il coniglio è l'animale più utilizzato negli studi ortopedici. Il “*Journal Of Orthopaedic Research*” (Grafico 1, H.A. Yuehuei and J. Friedman, CRC Press, 1999) mostra che questo modello animale viene utilizzato nel 26%

del totale degli studi (4 su 171). Inoltre, il coniglio risulta più adatto a studi che riguardino le riparazioni della cartilagine articolare, le fratture o le osteotomie, la crescita ossea e la riparazione di difetti ossei.

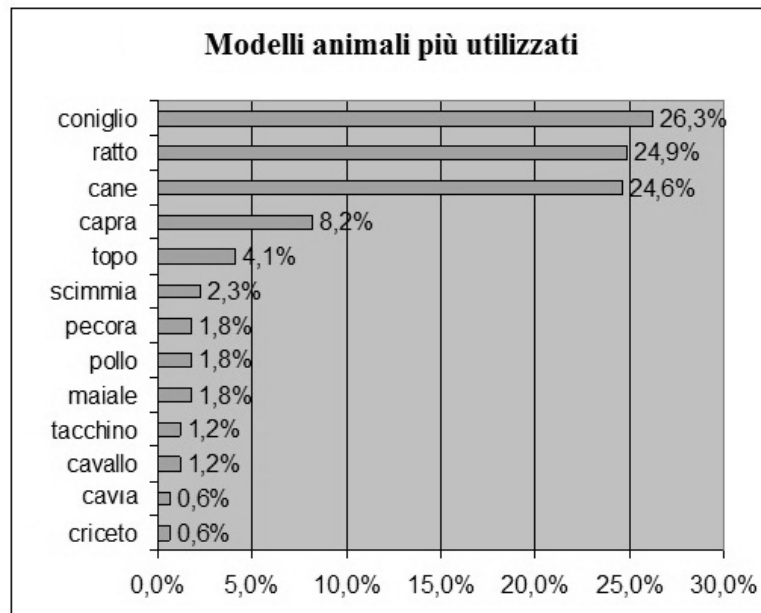


Grafico 1 - Frequenza di utilizzo dei modelli animali  
The Journal of Orthopaedic Research 1992-1996

Il coniglio è a un livello relativamente superiore nei vertebrati, possiede un'ottima taglia, che rende più semplici gli interventi chirurgici e comoda l'esecuzione dello studio radiografico, dell'istologia e delle analisi meccaniche. Un difetto nell'utilizzo del coniglio consiste nella maggior fragilità intrinseca rispetto agli altri animali; inoltre, presenta più decessi imprevisti, da complicazioni o patologie (H.A. Yuehuei and J. Friedman, *"Animal Models in Orthopaedic Research"*, 1999 CRC Press).

### 7.2.2 Pecora

La pecora, come dimensioni, maneggevolezza e struttura, presenta gli stessi accorgimenti della capra. La struttura ossea è più primitiva, con una densità ossea elevata e una notevole resistenza alle fratture. Avendo un peso

corporeo e dimensioni delle ossa lunghe del tutto paragonabili all'uomo, costituisce un ottimo modello per impianti e protesi. Le pecore sono state selezionate in letteratura per riparazione di difetti ossei, di difetti cartilaginei, osteoartrite e allungamento di arti (H.A. Yuehuei and J. Friedman, "*Animal Models in Orthopaedic Research*", 1999 CRC Press).

### **7.2.3 Maiale**

Il maiale presenta come svantaggi l'enorme crescita e il notevole incremento di peso, che può creare difficoltà negli studi ortopedici. Ultimamente si è ovviato a questi svantaggi utilizzando *mini pig*, che raggiungono dimensioni più accettabili per questo tipo di ricerche. I vantaggi di questa specie sono molti, poiché sia per l'anatomia, che per la morfologia ossea e per il rimodellamento osseo è risultata la specie più simile all'uomo, e quindi più adatta rispetto alle altre specie. Il maiale è stato utilizzato come soggetto di studio dell'attività della corticale dell'osso, studi sull'osteoporosi, sull'osteonecrosi postraumatica della testa del femore, fratture a livello di ginocchio con interesse cartilagineo e dell'integrazione ossea a livello di impianti in titanio con diverse superfici. (H.A. Yuehuei and J. Friedman, "*Animal Models in Orthopaedic Research*", 1999 CRC Press).

## 8 Materiali e metodi

Lo studio è stato sviluppato in due fasi separate. La prima (fase preliminare) è stata impostata al fine di ottenere, tramite MOC, valori mineralometrici di normalità in differenti modelli animali (coniglio, maiale, pecora). La seconda fase (fase sperimentale), eseguita in collaborazione con l'Istituto Ortopedico Galeazzi IRCCS di Milano e il Dipartimento di Farmacologia, Chemioterapia e Tossicologia Medica dell'Università degli Studi di Milano, nata dai risultati ottenuti da precedenti studi *in vitro* eseguiti da questi Dipartimenti e rivolti alla valutazione della capacità differenziativa osteogenica delle cellule staminali umane di origine adiposa (hASCs) (L. De Girolamo et al. 2007-2008), è stata rivolta allo studio *in vivo* della capacità rigenerativa ossea delle cellule staminali autologhe di derivazione adiposa, mediante follow-up radiografico, studio densitometrico *ex vivo* e valutazione istologica del tessuto osseo neoformato.

### 8.1 Fase preliminare

La fase preliminare è stata eseguita su preparati anatomici di segmenti ossei, appartenenti a soggetti sacrificati per cause non inerenti allo studio. L'unico criterio di inclusione era rappresentato dall'assenza di patologie o lesioni tali da modificare la componente ossea in esame.

I modelli animali inseriti nello studio sono stati coniglio (New Zealand White Rabbit), maiale (ibrido Goland pesante) e pecora (Bergamasca), prendendo in considerazione la seguente sede anatomica e numerosità relativa del campione seguenti:

- coniglio 30 crani (osso parietale), soggetti di ~ 7 mesi di età

- 30 crani (osso parietale), soggetti di ~ 12 mesi di età
- 30 tibie (epifisi prossimale), soggetti di ~ 4 mesi di età
- 30 tibie (epifisi prossimale), soggetti di ~ 7 mesi di età
- 30 tibie (epifisi prossimale), soggetti di ~ 12 mesi di età
- maiale 30 tibie (epifisi prossimale), soggetti di ~ 4 mesi di età
- 30 tibie (epifisi prossimale), soggetti di ~ 7 mesi di età
- pecora 30 tibie (epifisi prossimale), soggetti di età > 18 mesi

La scelta delle sedi anatomiche da valutare è stata effettuata in base alle aree maggiormente impiegate in studi ortopedici sperimentali su questi modelli animali (H.A. Yuehuei and J. Friedman, “*Animal Models in Orthopaedic Research*”, 1999 CRC Press), mentre la suddivisione in fasce di età è stata effettuata prendendo spunto dai lavori di Masoud et al. (1986), sulla scala di crescita e di maturazione scheletrica del coniglio.

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 (Fig. 18).

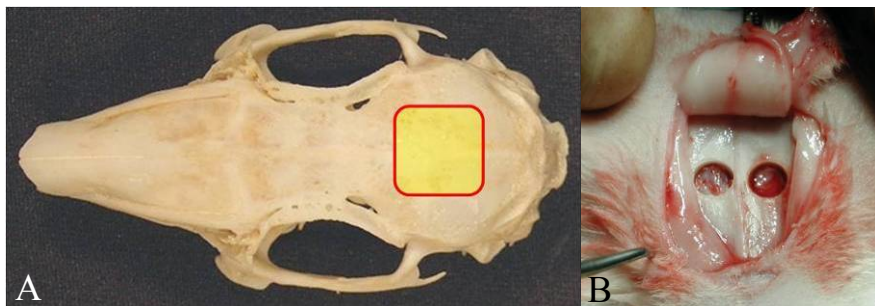


Fig. 18 - Sito di prelievo del tassello osseo (A) e suo aspetto macroscopico (B)

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.

### 8.1.1 Studio radiografico

Lo studio radiografico è stato eseguito presso la Sezione di Radiologia Veterinaria Clinica e Sperimentale della Facoltà di Medicina Veterinaria di Milano mediante l'utilizzo di un sistema CR Agfa COMPACT<sup>®</sup>, assemblato con un tubo radiogeno trifase a impianto fisso e ad anodo rotante (potenza 72 kV, filtrazione inerente 3,5 mm di Al) con doppia macchia focale (1,2 x 1,2 mm e 2 x 2 mm) e con DFP (distanza fuoco-pellicola) pari a 100 cm (Fig. 19).



Fig. 19 - Tavolo radiologico

Il sistema è composto di sei elementi funzionali:

- cassetta contenente una plates ai fosfori fotostimolabili;
- stazione di identificazione (ID station);
- digitalizzatore x la lettura dell'immagine latente;
- stazione di elaborazione dell'immagine;
- computer di archiviazione;
- stampante digitale.

Per lo studio radiografico del segmento tibiale, è stata effettuata su ogni campione una proiezione M-L, posizionando il segmento osseo a contatto con la cassetta (Fig. 20).



Fig. 20 - Proiezione M-L delle tibie: A) coniglio, B) maiale, C) pecora

### 8.1.2 Studio densitometrico

Anche lo studio densitometrico è stato eseguito anch'esso presso la Sezione di Radiologia Veterinaria Clinica e Sperimentale della Facoltà di Medicina Veterinaria di Milano mediante l'utilizzo del sistema Hologic QDR 1000/Plus<sup>®</sup>, densitometro DEXA *single beam* a energia pulsata (70-140 kVp) (Fig. 21).



Fig. 21 - Apparecchiatura MOC (A) e interfaccia utente (B, C)

Il posizionamento del pezzo anatomico da analizzare (tibia isolata) è stato effettuato simulando il decubito laterale e in modo da mantenere l'asse anatomico del segmento osseo indagato il più parallelo possibile rispetto al piano di appoggio con l'asse del foro monocorticale perpendicolare a esso. Per lo studio dell'epifisi prossimale della tibia sono state eseguite quattro misurazioni mineralometriche: una generale del segmento osseo in esame e tre, con differenti ROI (*region of interest*), a livello di metafisi prossimale (R1), a livello di diafisi prossimale (R2) e a livello di corticale diafisaria (R3) (Fig. 22).

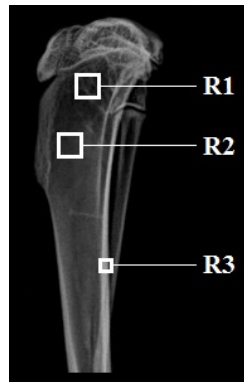


Fig. 22 - Localizzazione delle ROI a livello di epifisi prossimale tibiale (immagine radiografica)

A seconda del modello animale indagato, le ROI hanno subito variazioni nelle loro dimensioni (Tab. 3).

	Coniglio	Maiale	Pecora
R1	0,25	1,21	1,21
R2	0,25	1,21	1,21
R3	0,09	0,09	0,09

Tab. 3 - Dimensione delle ROI in base al modello animale  
(valori espressi in cm<sup>2</sup>)

Per lo studio del cranio, oltre al valore generale del segmento osseo, sono state prese in esame due ROI (R1 e R2), aventi la medesima area (0,49 cm<sup>2</sup>), situate lateralmente alla cresta longitudinale mediana, in corrispondenza dell'osso parietale (Fig. 23).

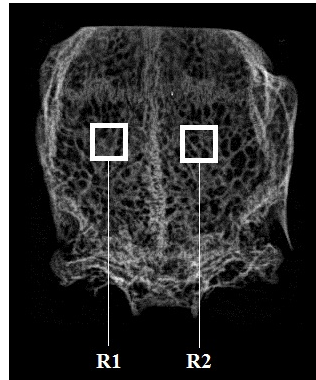


Fig. 23 - Localizzazione delle ROI a livello di tassello cranico (immagine radiografica)

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.

## 8.2 Fase sperimentale

Precedenti studi, eseguiti presso i laboratori del dipartimento di Farmacologia, avevano messo in evidenza la possibilità di isolare cellule staminali da tessuto adiposo nell'uomo, in grado di differenziarsi in cellule della linea osteogenica. Inoltre era già stata valutata la possibilità d'isolamento delle stesse cellule staminali dal coniglio (rbASCs), con un'ottima capacità clonogenica (E. Arrigoni et al., "*Cell and Tissue research*", in press), utilizzando le medesime metodiche applicate in medicina umana. Sulla base di questi risultati e dei lavori presenti in letteratura, che utilizzano il coniglio come modello animale per studi preclinici di ingegneria tissutale applicata alla riparazione del tessuto osseo, si è scelto di utilizzare, per questo progetto, un gruppo di 12 conigli di razza New Zealand White Rabbit (*Oryctolagus Cuniculus*) del peso di circa 2,5/3 kg e di 5 mesi d'età.

In ciascun soggetto è stata praticata, bilateralmente a livello della cresta tibiale, una lesione critica ossea di forma circolare (larghezza 8 mm,

profondità 2 mm). Sono stati allestiti 2 gruppi sperimentali a seconda della procedura impiegata per trattare la lesione, ulteriormente suddivisi in:

Gruppo A tibia destra, gruppo controllo (solo lesione);

Gruppo B tibia sinistra, *scaffold* non seminato;

Gruppo C tibia destra, cellule autologhe in sospensione semi-liquida;

Gruppo D tibia sinistra, *scaffold* seminato con cellule autologhe.

Lo studio ha previsto l'esecuzione di diversi *step*:

1. Prelievo del tessuto adiposo;
2. Isolamento, coltura delle MSC dal tessuto adiposo e semina delle cellule sugli *scaffold*;
3. Valutazione della capacità differenziativa in vitro di ogni popolazione cellulare;
4. Preparazione chirurgica del sito d'impianto per l'innesto degli *scaffold*;
5. Espianto delle porzioni ossee trattate e valutazione mineralometrica, istologica e istochimica del neo-rigenerato osseo.

Un esame radiografico convenzionale è stato effettuato in sede post-operatoria, a 6 settimane dall'intervento e al momento dell'espianto.

### **8.2.1 Espianto del tessuto adiposo**

Gli animali sono stati sottoposti ad anestesia generale utilizzando, per l'induzione, l'associazione di ketamina e xilazina (rispettivamente alle dosi di 44 mg/kg e 6-8 mg/kg I.M.) e, per il mantenimento, una miscela di ossigeno e isofluorano somministrati tramite maschera oro-nasale. Nel periodo post-operatorio i soggetti sono stati sottoposti a terapia antibiotica, con marbofloxacin alla dose di 5 mg/kg S.C. ogni 24 ore per un periodo di

7 giorni, e antidolorifica con flunixinina alla dose di 1 mg/kg S.C., ogni 12 ore per 5 giorni.

Per l'espianto del tessuto adiposo, necessario all'isolamento delle cellule staminali, sono stati sottoposti a intervento chirurgico sei soggetti. Il prelievo è avvenuto in anestesia generale. Dopo il posizionamento in decubito sternale, si è proceduto alla tricotomia dell'area d'incisione, alla sua disinfezione mediante soluzione di benzalconio cloruro e alla delimitazione del campo operatorio mediante teli sterili. E' stata eseguita una dieresi sagittale della cute e del sottocute, per una lunghezza pari a 2-3 cm a livello della regione interscapolare. È stato quindi effettuato all'espianto del tessuto adiposo (Fig. 24), per una volumetria di circa 1 cm<sup>3</sup>, che veniva immediatamente inserito in un contenitore sterile contenente una soluzione con PBS 1x, al 3% di antibiotico PEN/STREP (per prevenire una possibile contaminazione). Tutti i contenitori, refrigerati, erano trasportati in laboratorio per il successivo trattamento.

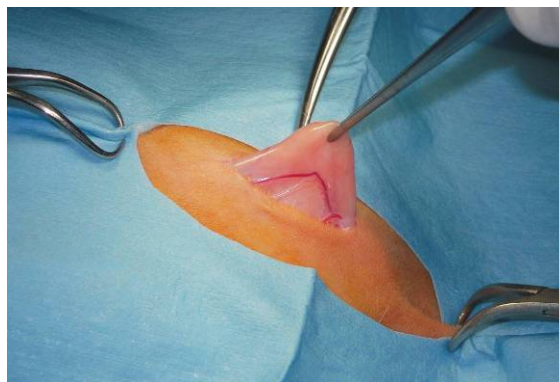


Fig. 24 - Espianto del tessuto adiposo

Terminato l'espianto, il sottocute è stato suturato mediante filo riassorbibile atraumatico di Catgut cromico USP 4-0 e la cute utilizzando un filo non riassorbibile di Polypropilene USP 4-0.

### 8.2.2 Isolamento, purificazione e crescita delle cellule staminali

Il tessuto isolato è stato frammentato e lavato più volte (2-3 volte) con PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 4,3 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,4 mM, pH 7,4), al quale sono stati aggiunti 150 U/ml penicillina e 150 µg/ml di streptomicina (Sigma-Aldrich), al fine di evitare proliferazione di patogeni contaminanti. Il campione è stato centrifugato a 1200 g per 2 minuti; la fase precipitata (ricca di globuli rossi e debris cellulare) e il grasso liquido surnatante sono stati rimossi. Il tessuto adiposo, separato dai globuli rossi, è stato incubato a 37°C per 60 minuti in un bagnetto termostato, in agitazione, in presenza di Collagenasi I (225 U/mg; Worthington, Lakewood, NJ) alla concentrazione di 0,1% in PBS. Al termine della digestione l'attività della Collagenasi I è stata neutralizzata con un egual volume di terreno di crescita completo cDMEM - DMEM (Sigma-Aldrich) + 10% FBS (Fetal Bovine Serum, Sigma-Aldrich) + 2 mM L-Glutamina (Sigma-Aldrich) + 50 U/ml penicillina + 50 µg/ml streptomicina (Sigma-Aldrich).

Per separare la “Stromal Vascular Fraction” (SVF), il campione è stato centrifugato a 1200 g per 10 minuti; successivamente la matrice grassa digerita (surnatante) è stata scartata mentre il pellet così ottenuto è stato risospeso in cDMEM, filtrato attraverso una garza sterile per eliminare eventuali residui di tessuto non digerito e centrifugato a 300 g per 4 minuti. Il nuovo pellet ottenuto è stato risospeso in cDMEM e le cellule sono state contate in camera di Burker con Trypan Blue (Sigma-Aldrich). La SVF è stata quindi seminata a una densità di 10<sup>5</sup> cellule per cm<sup>2</sup> (Passaggio 0) e mantenuta a 37°C in incubatore in ambiente umidificato con una percentuale di CO<sub>2</sub> del 5%; per i primi giorni le cellule sono state lavate con PBS per rimuovere i globuli rossi residui e le cellule contaminanti non

adese (Fig. 25). La popolazione cellulare risultante dal primo passaggio viene chiamata “*Adipose tissue-derived Stem Cells*” (ASC), per distinguerla dalla frazione stromale ottenuta dalla digestione del tessuto grezzo (F.C. Torres et al. 2007).

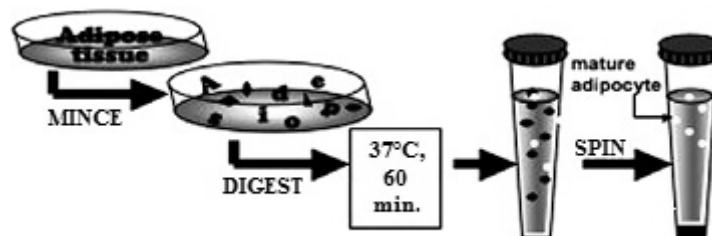


Fig. 25 - Schema del processo d'isolamento di ASCs dal tessuto adiposo

Il medium è stato cambiato 2-3 volte a settimana e le cellule, una volta staccate al raggiungimento del 75-90% della confluenza, sono state lavate rapidamente con PBS e subito incubate con una soluzione contenente tripsina 0,5% e EDTA 0,2% (acido etilendiamina-tetracetico - Sigma-Aldrich) per 3 minuti a 37°C, al termine dei quali la reazione è stata bloccata mediante aggiunta di cDMEM, in rapporto minimo di 3:1. Le cellule, dopo centrifugazione allo scopo di eliminare la tripsina, sono state risospese in cDMEM fresco, contate in presenza di Trypan Blue in camera di Burker, e opportunamente seminate per gli esperimenti o per il loro mantenimento in coltura, al fine di ottenere una popolazione proliferante e omogenea.

Le cellule possono essere congelate ( $10^6$  cellule per vial) mediante la seguente procedura: dopo aver preparato la soluzione di congelamento FBS - DMSO (Dimethyl Sulfoxide - Sigma Aldrich) in rapporto 9:1 (1 ml totale per vial), le cellule vengono raccolte in una falcon da 15 ml e centrifugate a 300 g per 3 minuti. Al termine della centrifugazione viene rimosso il medium e le cellule vengono risospese nella soluzione di congelamento,

trasferita nella vial e posta in un contenitore (nalgene) contenente Isopropanolo 100% (Fluka) a -80°C.

Per lo scongelamento, la vial viene scongelata velocemente in un bagnetto pre-riscaldato a 37°C. La sospensione viene poi diluita con cDMEM, in modo da neutralizzare l'azione tossica del DMSO allo stato liquido, e centrifugata a 300 g per 3 minuti. Il pellet recuperato viene quindi risospeso in cDMEM fresco e stoccato in piastra petri (Ø 100 mm) in incubatore.

### **8.2.3 Distaccamento e semina su scaffold**

Le cellule al II passaggio in coltura sono state utilizzate per il reimpianto autologo.  $1,5 \times 10^6$  cellule sono state poste su un dischetto di idrossiapatite, risospingendole in 80µl di cDMEM per circa 30 minuti, per permetterne l'adesione in una criovial; al termine dei 30 minuti sono stati aggiunti 400µl di medium, in modo da coprire il biomateriale e lasciarlo in coltura overnight a 37°C - 5% CO<sub>2</sub>. Il giorno successivo (giorno del reimpianto), le cellule sono state messe in coltura in medium differenziativo osteogenico per circa 2 ore (in modo da indirizzarle verso la linea osteogenica). Per la sospensione cellulare le cellule sono state staccate lo stesso giorno del reimpianto e  $1,5 \times 10^6$  cellule sono state risospese in eppendorf in 40µl di medium osteogenico e poi iniettate nel sito della lesione.

### **8.2.4 Valutazione della capacità differenziativa *in vitro***

Inizialmente sono state analizzate le caratteristiche delle rbASC (*rabbit Adipose-derived Stem Cells*) allo stato indifferenziato e successivamente è stata valutata la capacità di queste cellule di differenziare verso la linea osteogenica.

### 8.2.5 Preparazione chirurgica del sito d’impianto

Tutti i soggetti sono stati sottoposti, in anestesia generale, mediante il protocollo precedentemente descritto, a intervento chirurgico per la creazione della lesione critica ossea. Il paziente è stato posizionato sul tavolo operatorio in decubito dorsale e le aree d’incisione sono state tricotomizzate e disinfettate tramite soluzione di Benzalconio cloruro, infine si è delimitato il campo operatorio tramite teli sterili. L’incisione di cute e sottocute, di circa 2 cm, è stata eseguita a livello dell’epifisi prossimale della faccia mediale della tibia. Tramite uno scollaperiostio è stata esteriorizzata la cresta tibiale.

La lesione critica è stata effettuata tramite l’uso di una trefina montata su un contrangolo per l’implantologia, che produce una lesione circolare, del diametro di 9 mm, a livello della faccia mediale della cresta tibiale (Fig. 26 A). Questa lesione viene detta critica (*critical size*) poiché, al di sopra di tale dimensione, non si ottiene una riparazione spontanea dei tessuti. Eseguite le lesioni, nelle tibie sinistre (gruppi B e D) sono stati inseriti gli *scaffolds* mediante “*press fit*”. (Fig. 26 B).

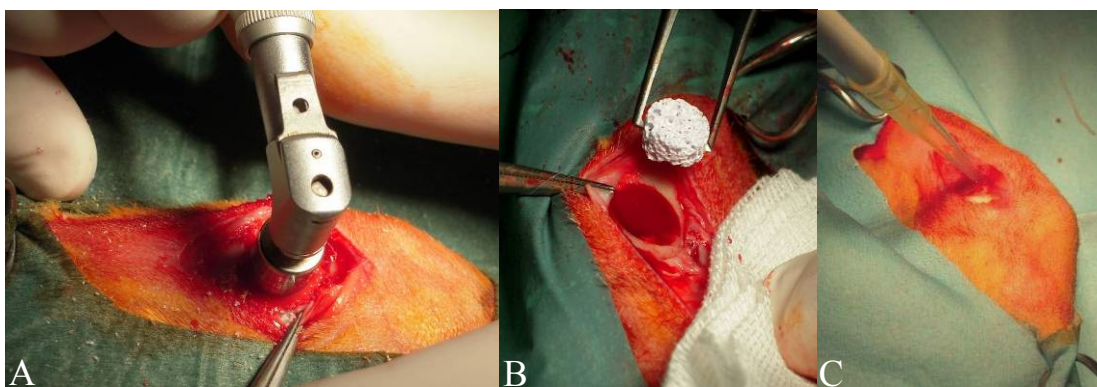


Figura 26 - A) preparazione della lesione critica, B) inserimento dello scaffold, C) semina della sospensione liquida di rbASCs

Questi, nei soggetti del gruppo B non hanno subito ulteriori procedure, mentre in quelli del gruppo D sono stati seminati con cellule staminali autologhe derivanti da tessuto adiposo (rbASCs) (Tab. 4).

Nelle tibie destre, sei animali sono stati mantenuti come controllo (solo lesione, gruppo A), mentre negli altri sono state seminate cellule staminali in sospensione liquida (gruppo C) (Fig. 26 C).

<b>Gruppo A</b>	Lesione	Tibia destra
<b>Gruppo B</b>	Lesione + <i>Scaffold</i> di HA	Tibia sinistra
<b>Gruppo C</b>	Lesione + ASCs	Tibia destra
<b>Gruppo D</b>	Lesione + <i>Scaffold</i> di HA + ASCs	Tibia sinistra

Tab. 4 - Schema riassuntivo dei differenti impianti

Al termine dell'intervento, le fasce muscolari sono state suturate mediante un filo riassorbibile intrecciato di Polyglatine 910 USP 5-0, mentre la cute mediante un filo di Polypropilene non riassorbibile di USP 4-0.

La procedura chirurgica è stata documentata fotograficamente in ogni suo passaggio.

Un esame radiografico di controllo è stato eseguito su tutti gli animali, per valutare possibili micro fratture o mobilizzazioni dello *scaffold* in HA. Tali immagini radiografiche sono state in seguito confrontate con quelle eseguite a 6 settimane e al momento dell'espianto.

Gli animali sono stati quindi mantenuti sotto controllo per otto settimane presso lo stabulario della Facoltà. In nessun soggetto si sono verificate complicazioni postoperatorie come fratture, fenomeni di riassorbimento osseo, formazione di callo osseo abnorme o infezioni. Al termine di questo periodo i soggetti sono stati sacrificati e si è provveduto all'espianto delle tibie.

### 8.2.6 Espianto delle porzioni ossee trattate e valutazione

Al termine dell'esperimento gli animali sono stati soppressi in anestesia generale, mediante il protocollo di induzione precedentemente descritto, con la somministrazione di un'overdose di Tiopentale (50 mg/kg) E.V. seguita, dopo circa 10 secondi, da un bolo E.V. di Potassio Cloruro (60 mEq).

Le tibie di ogni soggetto sono state espianate e scheletrizzate. I preparati anatomici sono stati fotografati, sottoposti a indagine radiografica e mineralometrica e, successivamente, inclusi in formalina per 3 giorni al 10% per l'analisi istologica.

La valutazione del rimodellamento osseo, mediante immagini fotografiche e indagine radiologica, è stata ottenuta utilizzando lo schema di punteggio proposto da Wakitani et al. (1994) (Tab. 5).

	Valutazione macroscopica		Valutazione radiografica
	Riempimento	Durezza	Integrazione ossea
3	Stesso livello	Stessa durezza	Buona riparazione /integrazione
2	Sovrariempimento	Più morbido	Intensa integrazione
1	Sottoriempimento > 1 mm	Molto morbido	Sottointegrazione >1 mm

Tab. 5 - Schema di punteggio (Wakitani et al. 1994)

La valutazione finale si ottiene effettuando la media tra i valori ottenuti separatamente dalla valutazione macroscopica e da quella radiografica.

Per lo studio densitometrico, su ogni soggetto sono state effettuate 4 misurazioni, nelle medesime sedi della fase preliminare (Fig. 27).



Fig. 27 - Localizzazione delle ROI (immagini radiografiche)

Lo studio istologico è stato effettuato dopo decalcificazione dei campioni mediante soluzione di acido formico e sodio citrato. Sono quindi stati inclusi in paraffina, tagliati in sezioni di 5  $\mu\text{m}$  di spessore e colorati con ematossilina-eosina. I vetrini ottenuti sono anche stati analizzati mediante microscopia a luce polarizzata, per valutare l'organizzazione tissutale dell'osso neoformato.

Tutti i dati ricavati sono quindi stati tabulati e analizzati mediante analisi della varianza (ANOVA a due vie), valutando come variabili oggetto di studio i casi con impianto di rbASCs e i casi controllo.

---

## 9 Risultati

Come per il capitolo 8 (materiali e metodi), anche i risultati verranno presentati suddivisi nelle due fasi (preliminare e sperimentale).

### 9.1 Fase preliminare

I valori riferibili alla normale mineralometria ossea dei modelli animali oggetti dello studio, espressi in  $\text{g/cm}^2$  di HA, verranno di seguito presentati suddivisi in base al modello animale di appartenenza, alle regione anatomica indagata e all'età dei soggetti, come riassunto nello schema seguente:

- coniglio    30 crani (osso parietale), soggetti di ~ 7 mesi di età  
              30 crani (osso parietale), soggetti di ~ 12 mesi di età  
              30 tibie (epifisi prossimale), soggetti di ~ 4 mesi di età  
              30 tibie (epifisi prossimale), soggetti di ~ 7 mesi di età  
              30 tibie (epifisi prossimale), soggetti di ~ 12 mesi di età
- maiale     30 tibie (epifisi prossimale), soggetti di ~ 4 mesi di età  
              30 tibie (epifisi prossimale), soggetti di ~ 7 mesi di età
- pecora     30 tibie (epifisi prossimale), soggetti di età > 18 mesi

Come sedi anatomiche, in accordo con H.A. Yuehuei and J. Friedman (*“Animal Models in Orthopaedic Research”*, 1999 CRC Press), sono state prese in esame l'osso parietale e l'epifisi prossimale della tibia. La suddivisione in fasce di età è stata effettuata prendendo spunto dai lavori di Masoud et al. (1986).

### 9.1.1 Cranio di coniglio

	7 mesi			12 mesi		
	R1	R2	GEN	R1	R2	GEN
1	0,203	0,212	0,193	0,194	0,198	0,180
2	0,225	0,218	0,211	0,229	0,226	0,211
3	0,206	0,214	0,194	0,203	0,197	0,201
4	0,216	0,204	0,196	0,210	0,200	0,194
5	0,221	0,229	0,216	0,222	0,229	0,216
6	0,192	0,204	0,184	0,208	0,212	0,203
7	0,220	0,209	0,202	0,220	0,226	0,217
8	0,183	0,196	0,171	0,216	0,223	0,211
9	0,195	0,198	0,216	0,241	0,233	0,218
10	0,203	0,194	0,189	0,191	0,204	0,186
11	0,202	0,193	0,185	0,194	0,197	0,181
12	0,194	0,197	0,183	0,234	0,225	0,212
13	0,198	0,210	0,191	0,237	0,235	0,221
14	0,209	0,218	0,206	0,212	0,202	0,193
15	0,193	0,189	0,180	0,199	0,206	0,187
16	0,199	0,215	0,182	0,218	0,211	0,192
17	0,222	0,231	0,209	0,211	0,223	0,202
18	0,222	0,211	0,198	0,209	0,217	0,198
19	0,203	0,211	0,196	0,222	0,212	0,200
20	0,226	0,219	0,205	0,232	0,224	0,219
21	0,190	0,214	0,214	0,229	0,205	0,227
22	0,209	0,198	0,191	0,187	0,199	0,181
23	0,212	0,206	0,199	0,220	0,213	0,210
24	0,188	0,195	0,176	0,212	0,215	0,198
25	0,195	0,187	0,191	0,197	0,205	0,181
26	0,212	0,226	0,199	0,215	0,222	0,201
27	0,227	0,237	0,214	0,198	0,212	0,186
28	0,210	0,196	0,188	0,212	0,213	0,201
29	0,234	0,222	0,211	0,240	0,232	0,227
30	0,204	0,191	0,183	0,205	0,217	0,194
Media	0,207	0,208	0,196	0,214	0,214	0,202
DS	0,013	0,013	0,013	0,015	0,012	0,014

Tab. 6 - Valori densitometrici del cranio di coniglio, espressi in g/cm<sup>2</sup> di HA

### 9.1.2 Tibia di coniglio

	4 mesi				7 mesi				12 mesi			
	R1	R2	R3	GEN	R1	R2	R3	GEN	R1	R2	R3	GEN
1	0,283	0,384	0,670	0,459	0,301	0,363	0,704	0,477	0,345	0,449	0,820	0,541
2	0,275	0,371	0,680	0,462	0,299	0,339	0,698	0,473	0,343	0,404	0,806	0,550
3	0,278	0,350	0,672	0,503	0,343	0,423	0,731	0,524	0,373	0,434	0,832	0,569
4	0,266	0,353	0,671	0,497	0,289	0,331	0,720	0,471	0,360	0,414	0,838	0,536
5	0,294	0,336	0,706	0,498	0,332	0,397	0,761	0,501	0,352	0,425	0,807	0,576
6	0,316	0,368	0,661	0,496	0,278	0,348	0,688	0,481	0,335	0,411	0,822	0,589
7	0,304	0,371	0,685	0,446	0,311	0,383	0,718	0,486	0,400	0,394	0,804	0,550
8	0,301	0,386	0,653	0,477	0,338	0,386	0,732	0,493	0,350	0,398	0,834	0,566
9	0,291	0,353	0,649	0,472	0,300	0,337	0,696	0,453	0,377	0,438	0,811	0,553
10	0,330	0,373	0,679	0,487	0,326	0,384	0,731	0,496	0,350	0,429	0,828	0,576
11	0,286	0,382	0,691	0,471	0,284	0,312	0,677	0,513	0,378	0,456	0,836	0,572
12	0,269	0,392	0,676	0,477	0,317	0,372	0,723	0,541	0,375	0,424	0,801	0,554
13	0,289	0,359	0,680	0,487	0,341	0,402	0,763	0,524	0,359	0,429	0,806	0,565
14	0,305	0,338	0,694	0,521	0,321	0,367	0,732	0,519	0,364	0,399	0,821	0,590
15	0,321	0,384	0,679	0,490	0,304	0,348	0,707	0,499	0,368	0,417	0,814	0,539
16	0,319	0,340	0,675	0,480	0,302	0,362	0,691	0,493	0,339	0,436	0,804	0,583
17	0,274	0,332	0,721	0,450	0,311	0,380	0,729	0,516	0,351	0,444	0,817	0,541
18	0,307	0,384	0,710	0,458	0,321	0,371	0,733	0,498	0,354	0,425	0,817	0,576
19	0,290	0,357	0,670	0,489	0,318	0,397	0,715	0,521	0,358	0,442	0,795	0,617
20	0,281	0,362	0,689	0,485	0,314	0,369	0,718	0,497	0,387	0,437	0,814	0,582
21	0,279	0,375	0,684	0,447	0,313	0,384	0,699	0,498	0,365	0,441	0,816	0,550
22	0,286	0,339	0,686	0,465	0,319	0,396	0,737	0,522	0,363	0,429	0,806	0,586
23	0,285	0,374	0,681	0,488	0,308	0,354	0,706	0,501	0,317	0,442	0,803	0,588
24	0,291	0,349	0,673	0,444	0,264	0,346	0,686	0,449	0,351	0,422	0,805	0,578
25	0,300	0,326	0,683	0,485	0,297	0,323	0,703	0,467	0,371	0,405	0,811	0,596
26	0,337	0,381	0,684	0,431	0,314	0,401	0,711	0,511	0,351	0,438	0,782	0,529
27	0,317	0,347	0,664	0,468	0,341	0,414	0,757	0,534	0,342	0,419	0,805	0,565
28	0,264	0,369	0,670	0,471	0,302	0,351	0,689	0,502	0,345	0,450	0,793	0,561
29	0,302	0,368	0,699	0,460	0,312	0,394	0,702	0,484	0,361	0,434	0,815	0,544
30	0,296	0,378	0,682	0,457	0,306	0,383	0,678	0,491	0,349	0,405	0,816	0,549
Media	0,295	0,363	0,681	0,474	0,311	0,371	0,715	0,498	0,358	0,426	0,813	0,566
DS	0,019	0,018	0,015	0,020	0,018	0,028	0,023	0,023	0,017	0,017	0,013	0,021

Tab. 7 - Valori densitometrici della tibia di coniglio, espressi in g/cm<sup>2</sup> di HA

### 9.1.3 Tibia di maiale

	4 mesi				7 mesi			
	R1	R2	R3	GEN	R1	R2	R3	GEN
1	0,876	0,668	1,468	0,965	1,044	0,827	1,562	1,045
2	0,888	0,656	1,540	0,960	1,032	0,815	1,552	1,049
3	0,861	0,628	1,508	0,965	1,042	0,816	1,570	1,029
4	0,905	0,685	1,500	0,926	1,036	0,810	1,528	1,101
5	0,867	0,645	1,508	0,943	1,037	0,832	1,575	1,088
6	0,875	0,649	1,482	0,928	1,024	0,796	1,554	1,083
7	0,876	0,684	1,475	0,915	1,039	0,791	1,587	1,072
8	0,895	0,638	1,492	0,954	1,046	0,761	1,536	1,076
9	0,888	0,668	1,483	0,956	1,043	0,804	1,572	1,067
10	0,875	0,658	1,479	0,937	1,036	0,795	1,584	1,083
11	0,883	0,644	1,496	0,912	1,027	0,820	1,593	1,040
12	0,863	0,690	1,478	0,926	1,045	0,835	1,551	1,096
13	0,901	0,671	1,521	0,904	1,029	0,796	1,591	1,062
14	0,842	0,662	1,514	0,926	1,044	0,785	1,570	1,062
15	0,900	0,648	1,519	0,929	1,058	0,767	1,563	1,044
16	0,898	0,655	1,478	0,958	1,034	0,777	1,510	1,057
17	0,933	0,680	1,454	0,948	1,064	0,793	1,530	1,079
18	0,887	0,675	1,517	0,954	1,060	0,787	1,533	1,076
19	0,863	0,693	1,518	0,927	1,042	0,835	1,521	1,104
20	0,884	0,681	1,473	0,931	1,026	0,826	1,561	1,089
21	0,895	0,656	1,475	0,920	1,068	0,818	1,545	1,059
22	0,898	0,667	1,486	0,979	1,029	0,802	1,536	1,067
23	0,885	0,644	1,460	0,911	1,036	0,774	1,570	1,110
24	0,854	0,672	1,485	0,940	1,049	0,822	1,546	1,087
25	0,934	0,657	1,476	0,923	1,049	0,822	1,581	1,069
26	0,889	0,624	1,473	0,961	1,065	0,785	1,565	1,091
27	0,892	0,653	1,441	0,936	1,073	0,807	1,552	1,073
28	0,887	0,638	1,482	0,960	1,038	0,811	1,585	1,069
29	0,883	0,668	1,477	0,986	1,051	0,784	1,565	1,030
30	0,873	0,680	1,511	0,955	1,066	0,782	1,567	1,065
Media	0,885	0,661	1,489	0,941	1,044	0,802	1,558	1,071
DS	0,020	0,018	0,023	0,021	0,013	0,021	0,022	0,021

Tab. 8 - Valori densitometrici della tibia di maiale, espressi in g/cm<sup>2</sup> di HA

### 9.1.4 Tibia di pecora

	R1	R2	R3	GEN
1	0,648	0,797	1,926	1,073
2	0,604	0,813	1,927	1,080
3	0,626	0,821	1,945	1,105
4	0,609	0,795	1,916	1,085
5	0,599	0,803	1,906	1,103
6	0,629	0,793	1,916	1,086
7	0,619	0,845	1,929	1,089
8	0,642	0,816	1,919	1,089
9	0,618	0,791	1,924	1,081
10	0,602	0,791	1,922	1,072
11	0,604	0,833	1,905	1,086
12	0,632	0,811	1,919	1,103
13	0,612	0,819	1,933	1,104
14	0,605	0,793	1,915	1,074
15	0,625	0,812	1,908	1,076
16	0,630	0,798	1,907	1,092
17	0,635	0,802	1,938	1,076
18	0,602	0,799	1,917	1,106
19	0,587	0,795	1,937	1,088
20	0,600	0,826	1,918	1,068
21	0,596	0,792	1,921	1,093
22	0,606	0,806	1,925	1,088
23	0,604	0,818	1,931	1,105
24	0,612	0,788	1,916	1,088
25	0,574	0,798	1,870	1,085
26	0,584	0,791	1,913	1,112
27	0,601	0,806	1,932	1,070
28	0,589	0,801	1,926	1,083
29	0,619	0,784	1,923	1,085
30	0,658	0,786	1,939	1,089
Media	0,612	0,804	1,921	1,088
DS	0,019	0,015	0,014	0,012

Tab. 9 - Valori densitometrici della tibia di pecora, espressi in g/cm<sup>2</sup> di HA

## 9.2 Fase sperimentale

Come primi risultati verranno esposte le valutazioni della capacità differenziativa *in vitro* delle ASC, necessaria per il successivo utilizzo *in vivo* sul modello animale selezionato.

Per quanto riguarda invece la valutazione sulla rigenerazione ossea delle lesioni, nelle diverse condizioni dello studio, è stato necessario avvalersi di strumenti che indagassero sia gli aspetti macroscopici (immagini fotografiche, indagine radiografica e mineralometrica), sia le variazioni microscopiche (da un punto di vista istologico).

### 9.2.1 Valutazione della capacità differenziativa *in vitro*

Per valutare la capacità differenziativa *in vitro* delle ASC autologhe, sono state prese in considerazione le loro caratteristiche relative a resa cellulare, capacità proliferativa, capacità clonogenica e differenziativa.

#### 9.2.1.1 Isolamento

La resa cellulare della “*Stromal Vascular Fraction*” (SVF), subito dopo la digestione e prima della semina (Tab. 10), è stata in media di  $2,80 \times 10^5 \pm 1,89 \times 10^5$  cellule/ml di tessuto adiposo digerito, con una significativa variabilità tra i sei soggetti:

Soggetti	Quantità di grasso (ml)	rbASC/ml tessuto
rb1	5.5	$1.64 \times 10^5$
rb2	8	$4.34 \times 10^4$
rb3	3	$4.33 \times 10^5$
rb4	5	$5.60 \times 10^5$
rb5	5	$2.80 \times 10^5$
rb6	5	$2.00 \times 10^5$

Tab. 10 - Numero di ASC per soggetto

Il numero di cellule per ml di tessuto adiposo è stato ricavato contando le cellule subito dopo il prelievo. Dopo circa 10 giorni dall'isolamento le rbASC hanno raggiunto la confluenza e, al I passaggio, sono state raccolte in media  $2,2 \times 10^5 \pm 3,36 \times 10^5$  cellule progenitrici per ml di tessuto adiposo manipolato. Successivamente, le cellule seminate a una densità di  $5 \times 10^3$  cellule per  $\text{cm}^2$ , hanno cominciato a duplicare rapidamente raggiungendo una confluenza dell'80-90% ogni 2-3 giorni. Le rbASC, in coltura, appaiono come una popolazione omogenea di tipica forma fibroblastoide (Fig. 28); tale morfologia, caratteristica delle cellule staminali, è visibile già pochi giorni dopo l'isolamento, e viene mantenuta oltre il XIV passaggio in coltura.

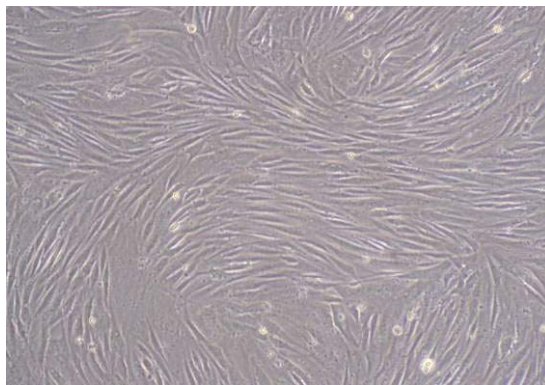


Fig. 28 - Morfologia delle rbASC in coltura.  
Immagine al microscopio ottico a contrasto di fase (10x)

### 9.2.1.2 Capacità proliferativa

Le rbASC provenienti da diversi prelievi mostrano, dopo una fase di latenza nella prima settimana, una crescita generalmente omogenea. Il tempo di duplicazione medio (DT) viene calcolato come  $DT = t \times \ln(2) / \ln(N/N_0)$  dove,  $t$  = tempo in coltura (ore),  $N$  = numero di cellule finali e  $N_0$  = numero di cellule iniziali. La velocità di proliferazione è risultata paragonabile a quella ottenuta da studi precedenti (DT medio di circa  $52 \pm 10$  ore), con un DT medio di  $65 \pm 20$  ore (circa 2-3 giorni), che si mantiene

pressoché costante a passaggi intermedi (I passaggio:  $46 \pm 12$  ore, VI passaggio:  $60 \pm 13$  ore), per poi ridursi fortemente a passaggi tardivi (IX passaggio:  $116 \pm 39$  ore) (Fig. 29).

Le rbASC mantenute in coltura per un mese circa sono state in grado di generare  $2,78 \times 10^8 \pm 9,2 \times 10^7$  cellule.

È stato inoltre osservato che la criopreservazione non influenza in maniera significativa la spinta proliferativa. Infatti, dopo lo scongelamento, sebbene le cellule presentino una breve fase di latenza, il DT medio è risultato sovrapponibile a quello osservato per le cellule fresche al medesimo passaggio ( $68 \pm 31$  ore).

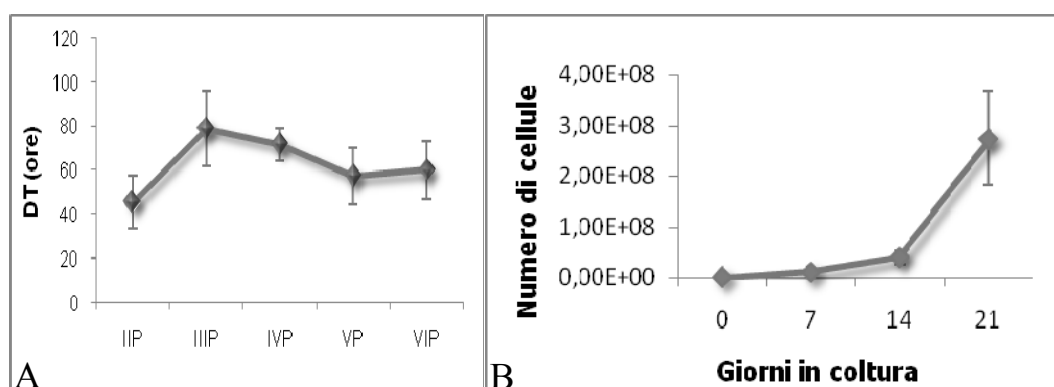


Fig. 29 - Proliferazione cellulare delle rbASC: A) tempo di duplicazione, B) in base ai giorni di coltura

Questi dati sono stati confermati anche mediante saggio del MTT. La vitalità cellulare delle rbASC è stata valutata a diversi passaggi in coltura (I-III) e le cellule sono state analizzate dopo 1, 3, 7 e 10 giorni dalla semina (Tab. 11, Fig. 30). I dati ottenuti mostrano come la crescita delle rbASC sia costante e con un andamento paragonabile, senza significative differenze, a diversi passaggi in coltura.

Passaggi	1 g	3 gg	7 gg	10 gg
I	$0,200 \pm 0,067$	$0,838 \pm 0,104$	$1,286 \pm 0,330$	$1,640 \pm 0,309$
II	$0,325 \pm 0,054$	$0,619 \pm 0,103$	$0,922 \pm 0,103$	$1,075 \pm 0,059$
III	$0,311 \pm 0,110$	$0,667 \pm 0,411$	$0,744 \pm 0,170$	$0,630 \pm 0,148$

Tab. 11 - Vitalità cellulare delle rbASC, valori espressi in media  $\pm$  DS in Abs 570 nm

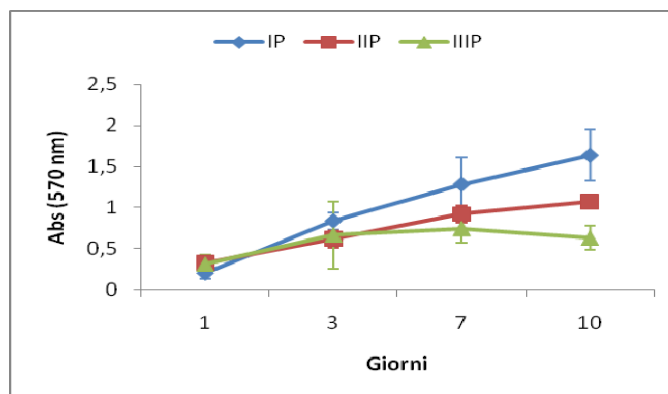


Fig. 30 - Vitalità cellulare delle rbASC

### 9.2.1.3 Capacità clonogenica

La capacità clonogenica delle rbASC è stata valutata utilizzando il saggio CFU-F (*Fibroblast-Colony Forming Unit*), dal quale emerge che il potenziale clonogenico dipende dal periodo di mantenimento in coltura, con una percentuale di precursori clonogenici compresa tra 4,03 al I o II passaggio, e di circa 3,01 - 3,36 % tra il III e il IV passaggio, evidenziando un andamento abbastanza costante. Invece, la capacità clonogenica delle rbASC in differenziamento osteogenico, valutata mediante il saggio CFU-O (*Osteoblast-Colony Forming Unit*), risulta superiore rispetto a quella delle rbASC indifferenziate. Col procedere dei passaggi, si rileva una percentuale di CFU-O (*Osteoblast-Colony Forming Unit*) maggiore (5,91) al I passaggio e una diminuzione progressiva al quarto passaggio (2,84). La capacità clonogenica diminuisce in rapporto al loro mantenimento in coltura, mostrando elevata variabilità tra i diversi conigli. Le rbASC mostrano differenze significative a seconda del coniglio di provenienza. I conigli che presentano maggior potenziale sono l'1, il 5 e il 6. Il coniglio 2 è quello che sembrerebbe avere meno potenziale (inferiore all'1% per le CFU-F e circa dell'1% per le CFU-O).

#### 9.2.1.4 Capacità differenziativa

Il passo successivo è stato quello di determinare la potenzialità differenziativa delle rbASC: cellule allo stato indifferenziato sono state indotte a differenziare, in presenza di specifiche molecole bioattive (L. De Girolamo et al., 2008-2009; E. Arrigoni et al., 2009), verso la linea osteogenica per 7, 14 e 21 giorni. Le cellule sono state poi analizzate o morfologicamente o per determinazione di specifici marcatori differenziativi, quali la produzione di fosfatasi alcalina e la deposizione di matrice extracellulare calcificata.

Le cellule in coltura hanno assunto già dopo 7 giorni una morfologia differente da quella delle cellule cresciute in medium controllo: le cellule in differenziamento hanno perso la caratteristica morfologia allungata simil-fibroblastoide delle cellule staminali mesenchimali, con una disposizione abbastanza uniforme, assumendo una morfologia più tondeggiante, cuboidale, che porta a un maggior raggruppamento delle cellule stesse (Fig. 31).

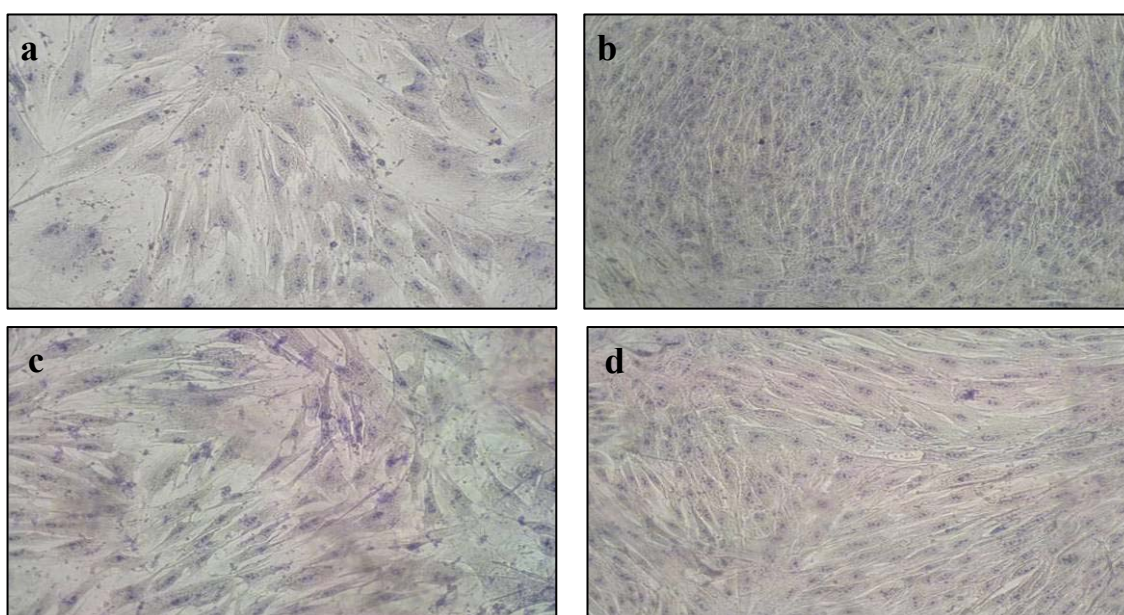


Fig. 31 - Analisi morfologica di cellule ASC mantenute in medium non induttivo (a, c) e osteo-induttivo (b, d). Ingrandimento a e b 15x, c e d 7x

Essendo il coniglio un buon modello animale per gli studi di rigenerazione ossea, ed essendo in grado di isolare cellule progenitrici capaci di proliferare attivamente e di formare colonie, è stata valutata la potenzialità differenziativa di rbASC verso la linea osteogenica. L'attività di fosfatasi alcalina, marcatore precoce del differenziamento osteogenico, è stata valutata in lisati di cellule rbASC dopo 7 e 14 giorni d'induzione. rbASC coltivate in medium osteogenico differenziano efficientemente in cellule simili a osteoblasti rispetto alle rbASC non trattate (di controllo). Dopo circa 7 giorni di coltura si evidenzia un significativo aumento dell'attività fosfatasica, con un incremento del 41,8% rispetto ai valori registrati per le cellule indifferenziate. A 14 giorni l'attività della fosfatasi alcalina in cellule differenziate è risultata ancora molto elevata, con un incremento medio in cellule differenziate del 67,3% (Fig. 32 A).

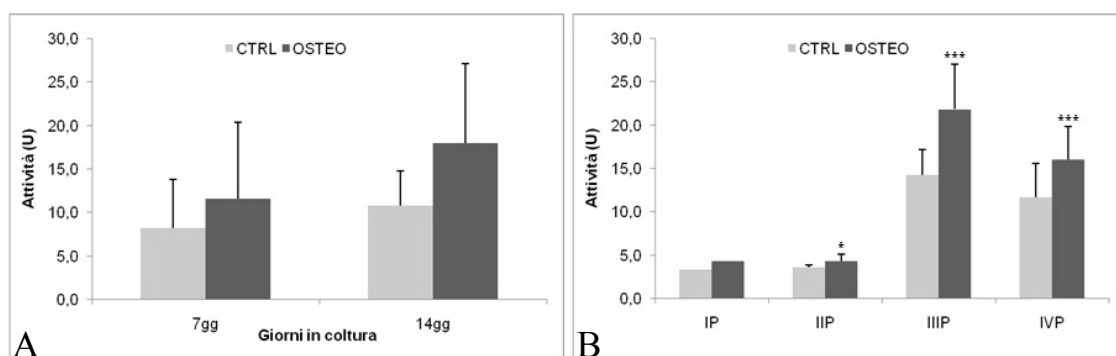


Fig. 32 - Analisi quantitativa dell'attività fosfatasica in rbASC non differenziate (CTRL) e differenziate (OSTEO). A) mediante saggio biochimico con pNPP, B) in base ai differenti passaggi in coltura.

Valori espressi in media  $\pm$  DS (n=6) (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ , Student's T-test)

Per determinare il passaggio ideale al quale utilizzare le rbASC, è stata valutata la loro capacità differenziativa a diversi passaggi in coltura (Fig. 32 B). Sebbene gli incrementi, dopo 7 giorni di coltura, siano risultati significativamente positivi per tutti e quattro i passaggi analizzati (I, II, III e IV passaggio), con percentuali variabili rispettivamente del 28,7%, 19,9%, 53,4% e 36,9%, i valori di attività enzimatica hanno mostrato una

tendenza ad aumentare con il passare del tempo in coltura delle cellule con un migliore indice di differenziamento osteogenico al III passaggio.

La capacità differenziativa delle rbASC è stata ulteriormente confermata valutando, dopo 14 e 21 giorni di differenziamento osteogenico, la deposizione di matrice extracellulare tramite la colorazione con Alizarin Red-S (Fig. 33 a, b).

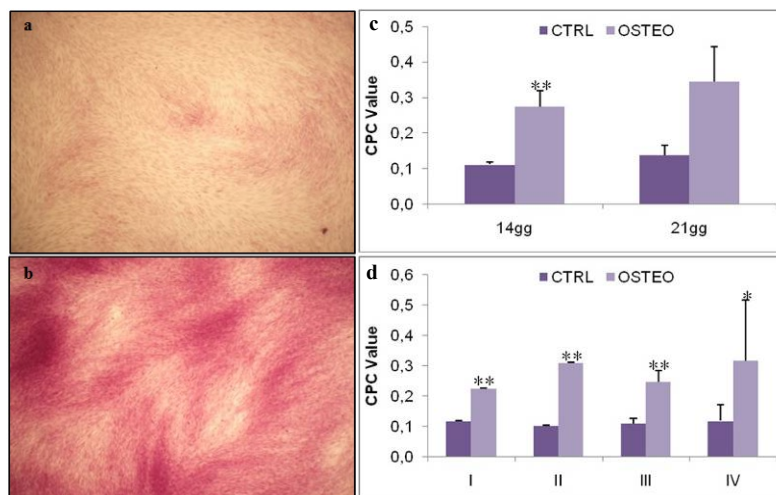


Fig. 33 - Colorazione Alizarin Red-S in medium non induttivo (CTRL, a) e osteogenico (OSTEO, b) (4x) Deposizione di matrice calcificata a 14 e 21 giorni in coltura (c). Produzione di matrice extracellulare calcifica a 14 giorni e a diversi passaggi in coltura (d). Media dei valori di assorbanza a 550nm  $\pm$  DS (n=6) (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001, Student's T-test)

A 14 giorni si ha un incremento percentuale del 145,4% per le cellule mantenute in medium osteogenico rispetto alle rbASC indifferenziate. Tali valori risultano pressoché sovrapponibili anche dopo 21 giorni di differenziamento (+ 148,8%) (Fig. 33 c). Inoltre, valutando il differenziamento a 14 giorni e a differenti passaggi in coltura (I, II, III e IV passaggio), si è osservata una buona percentuale di deposizione di matrice calcificata extracellulare, con incrementi rispettivamente del 90,9%, 201,8%, 126,4% e 168,1% (Fig. 33 d).

### 9.2.2 Valutazione macroscopica e radiografica dei siti d'impianto

Durante le diverse fasi dello studio sono state effettuate alcune valutazioni morfologiche tramite acquisizione di immagini fotografiche e radiogrammi delle lesioni. La valutazione è stata effettuata in tre momenti (Tab. 11):

- alla creazione della lesione e all'inserimento dell'innesto (T0) (Fig. 34);
- a sei settimane dall'intervento (T1);
- post-espianto (T2).



Fig. 34 - Esame radiografico (T0)

	Visione diretta (foto)	Valutazione radiografica
Innesto (T0)	O	O
Follow up (T1, 6 Sett.)		O
Espianto (T2, 8 Sett.)	O	O

Tab. 12 - Fasi della valutazione morfologica delle lesioni

#### 9.2.2.1 Valutazione al follow up

Tutti i soggetti sono stati sottoposti a un esame radiografico di controllo a sei settimane dall'intervento chirurgico. Tale indagine è stata compiuta con l'animale in anestesia generale.

Le immagini radiografiche prodotte sono state confrontate con le immagini radiografiche ottenute a T0 per valutare un'iniziale osteointegrazione o

possibili fenomeni di osteolisi o rarefazione ossea (Fig. 35). Al termine di tale valutazione non si sono notate alterazioni tali da compromettere lo svolgimento dello studio. Solo in un soggetto si è notata la mobilizzazione dello *scaffold* di Ha.

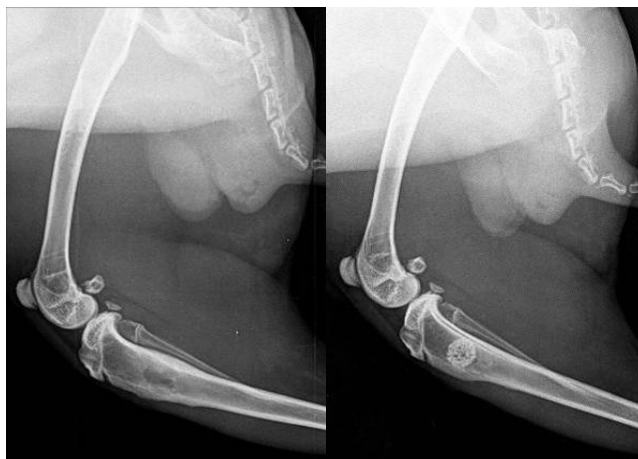


Fig. 35 - Esame radiografico (T1)

#### 9.2.2.2 Valutazione all'espianto

La valutazione dei siti di impianto è avvenuta mediante analisi macroscopica e studio radiografico in cieco (Fig. 36-37), applicando lo schema di punteggio descritto in precedenza (Wakitani et al. 1994).



Fig. 36 - Soggetto 3 A e B, valutazione macroscopica e radiografica di tibia destra e sinistra



Fig. 37 - Soggetto 3 C e D, valutazione macroscopica e radiografica di tibia destra e sinistra

A seguito di questa analisi è stato possibile eseguire due tipi di confronto, in base all'utilizzo di *scaffold* e in base alla semina di cellule staminali autologhe (Tab. 13).

Soggetto	A	B
1	3,3 - 1	3,3 - 3
2	3,3 - 1	3,3 - 3
3	2,2 - 0	2,3 - 3
4	2,2 - 0	2,3 - 3
5	3,3 - 0	3,3 - 2
6	2,2 - 3	3,3 - 3
	C	D
1	3,3 - 3	2,3 - 2*
2	2,2 - 3	2,3 - 3
3	3,3 - 1	3,3 - 3
4	3,3 - 1	3,3 - 3
5	3,3 - 3	3,2 - 3
6	3,3 - 1	3,3 - 3

Tab. 13 - Valutazioni macroscopiche e radiografiche (M - R) dei siti d'impianto  
\* mobilizzazione dell'impianto

### 9.2.3 Valutazione tramite MOC

Le tibie espiantate sono state sottoposte a esame mineralometrico (Tab. 14). I campioni relativi ai soggetti 3, 4, 5 e 6 del gruppo B non rientravano nel campione, in quanto sottoposte subito post-espianto a esame istologico.

Il valore indicato come CTRL rappresenta il contenuto di HA dello scaffold, impiantato *post mortem* su di un preparato anatomico di tibia (Fig. 38).

	A				B			
	R1	R2	R3	GEN	R1	R2	R3	GEN
1	0,303	0,312	0,441	0,471	0,226	0,683	0,619	0,501
2	0,236	0,419	0,617	0,525	0,294	0,749	0,883	0,581
3	0,284	0,400	0,481	0,540	0,264	0,706	0,805	0,579
4	0,375	0,516	0,590	0,556	0,263	0,711	0,736	0,568
5	0,283	0,442	0,602	0,548	0,361	0,808	0,592	0,596
6	0,238	0,307	0,769	0,491	0,249	0,709	0,586	0,536
Media	0,287	0,399	0,583	0,522	0,259	0,712	0,726	0,553
	C				D			
	R1	R2	R3	GEN	R1	R2	R3	GEN
1	0,320	0,479	0,804	0,501	0,300	0,628	0,776	0,528
2	0,306	0,435	0,909	0,544	0,238	0,698	0,762	0,566
Media	0,313	0,457	0,857	0,523	0,269	0,663	0,769	0,547
CTRL	0,329	0,495	0,605	0,469	0,329	0,495	0,605	0,469

Tab. 14 - Valori densitometrici post espianto, espressi in  $\text{g}/\text{cm}^2$  di HA



Fig. 38 - Preparato anatomico CTRL  
(immagine radiografica e macroscopica)

#### 9.2.4 Valutazione istologica

La valutazione istologica è stata eseguita presso il VSA (Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare). Le lesioni non trattate (gruppo A) presentano una lieve, se non assente, presenza di

tessuto osseo neoformato; solamente la reazione periostale ha partecipato ai processi riparativi del difetto osseo. Nel gruppo C all'interno della lesione è presente tessuto osseo neoformato, con una buona conformazione della matrice (Fig. 39c). Questa è confermata anche mediante l'utilizzo di microscopia a luce polarizzata (Fig. 39d)

Nei gruppi B e D (Fig. 39a e 39e rispettivamente) le immagini rivelano differenti quantità di osso neoformato, presente in grandi quantità all'interno dei pori degli impianti. Nel gruppo B la distribuzione di tale tessuto non appare uniforme, ma localizzata sulla parete dei pori, con presenza di midollo osseo al loro interno (Fig. 39a). Le lesioni del gruppo B presentano un maggior numero di pori occupati dal tessuto neoformato, con distribuzione omogenea. In entrambi i gruppi, alla periferia dello *scaffold* sono ben visibili osteoblasti, con iniziale deposizione di tessuto osseo lamellare (Fig. 39b e 39f, con microscopia a luce polarizzata).

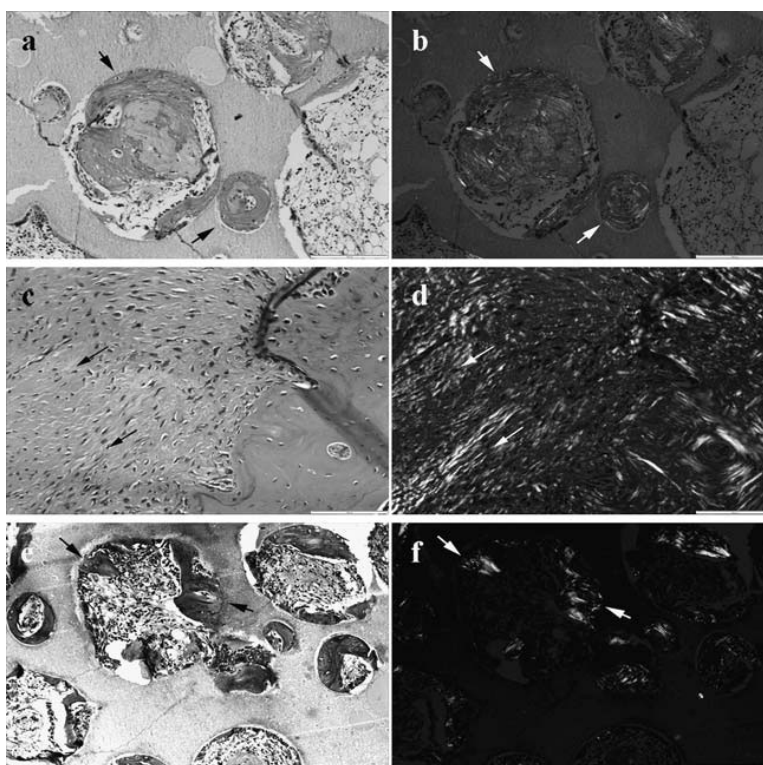


Fig. 39 - Analisi istologica. a, c e e con colorazione ematossilina-eosina, b, d e d f con la medesima colorazione, osservati a luce polarizzata

## 10 Discussione e conclusioni

Come per i capitoli 8 (materiali e metodi) e 9 (risultati), quest'ultima parte del lavoro verrà presentata e discussa in due fasi (preliminare e sperimentale).

### 10.1 Fase preliminare

L'esecuzione dello studio mineralometrico, su differenti modelli animali e a diversi stadi di maturazione scheletrica, ha reso possibile definire un valore "normale" in contenuto osseo di idrossiapatite di calcio, in relazione all'età del soggetto. Qui di seguito (Tab. 15) vengono riportati i valori medi e la relativa deviazione standard dei risultati da noi ottenuti.

		Mesi	R1	R2	R3	GEN
Cranio	Coniglio	7	0,207 ± 0,013	0,208 ± 0,013	X	0,196 ± 0,013
		12	0,214 ± 0,015	0,214 ± 0,012	X	0,202 ± 0,014
Tibia	Coniglio	4	0,295 ± 0,019	0,363 ± 0,018	0,681 ± 0,015	0,474 ± 0,020
		7	0,311 ± 0,018	0,371 ± 0,028	0,715 ± 0,023	0,498 ± 0,023
		12	0,358 ± 0,017	0,426 ± 0,017	0,813 ± 0,013	0,566 ± 0,021
	Maiale	4	0,885 ± 0,020	0,661 ± 0,018	1,489 ± 0,023	0,941 ± 0,021
		7	1,044 ± 0,013	0,802 ± 0,021	1,558 ± 0,022	1,071 ± 0,021
	Pecora	> 18	0,612 ± 0,019	0,804 ± 0,015	1,921 ± 0,014	1,088 ± 0,012

Tab. 15 - Riepilogo dei valori MOC medi + DS nei differenti modelli animali, espressi in g/cm<sup>2</sup> di HA  
X = misurazione non effettuata

L'analisi statistica dei dati inerenti il coniglio e il maiale è stata effettuata mediante ANOVA e post hoc test con correzione di Bonferroni, valutando come variabile oggetto di studio l'età dei soggetti. In tutti i casi tale variabile è risultata significativa ( $p < 0,001$ ).

### 10.1.1 Coniglio

Per quanto riguarda lo studio mineralometrico effettuato sul **cranio**, i soggetti della medesima età presentano la stessa quantità di HA nell'osso parietale destro e sinistro (differenza < 1%). Il valore GEN, se paragonato a R1 e R2, risulta inferiore: questo dato è da imputare alla misurazione di aree a densità aerea attorno al tassello osseo, dovute alla segmentazione manuale della ROI. Confrontando le medie dei dati ottenuti a 7 e 12 mesi, si evidenzia un aumento omogeneo di HA, pari al 4% circa in tutte le aree (R1, R2 e GEN).

Anche nelle misurazioni effettuate sull'epifisi prossimale della **tibia**, si evidenzia un aumento della matrice ossea col passare dei mesi: tra i 4 e i 7 mesi l'aumento è del 4% circa, mentre tra i 7 e i 18 mesi raggiunge il 15%, col medesimo incremento in tutte le aree (R1, R2, R3 e GEN). La differente concentrazione di HA al variare della ROI in esame è legata alla loro specifica sede anatomica e alla conformazione dell'epifisi prossimale della tibia; R1 presenta valori inferiori rispetto a R2 in quanto la prima, per la sua sede, analizza più tessuto osseo spongioso e meno tessuto osseo compatto rispetto alla seconda. R3 invece presenta sempre il valore massimo, in quanto focalizzata sulla sola componente compatta, ad andamento curvilineo (Fig. 40).

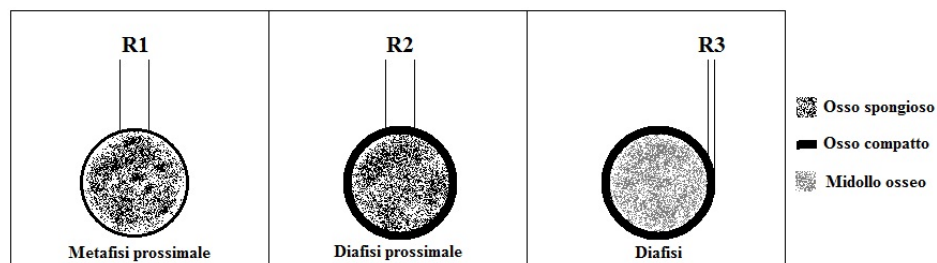


Fig. 40 - Schema di localizzazione delle ROI in relazione alla struttura ossea indagata

### **10.1.2 Maiale**

Anche per il maiale, come per il coniglio, la concentrazione di HA nel tessuto osseo a livello di epifisi prossimale della tibia evidenzia una crescita col passare dei mesi: l'incremento dai 4 ai 7 mesi è circa del 7%, omogeneo in tutte le aree (R1, R2, R3 e GEN). A differenza del coniglio, in questo modello animale il valore medio di R1 risulta maggiore di R2; il motivo è da ricercare nella differente conformazione del segmento osseo in esame, in quanto il diametro trasverso a livello metafisario prossimale è maggiore di circa 1/3 rispetto al diametro a livello diafisario prossimale: aumentando lo spessore del tessuto osseo, aumenta anche l'attenuazione sul fascio radiante.

### **10.1.3 Pecora**

Nel modello animale pecora, avendo sottoposto a esame densitometrico preparati anatomici appartenenti a soggetti della medesima età, non è possibile effettuare una valutazione nel tempo della mineralizzazione ossea. Tuttavia, valutando i dati in nostro possesso, risulta che, come per il coniglio, R1 presenta valori inferiori rispetto a R2. Anche in questo caso, la spiegazione risiede nella conformazione anatomica tibiale, i cui diametri metafisario prossimale e diafisario prossimale sono pressoché sovrapponibili; tra le due aree varie unicamente il rapporto tra tessuto osseo compatto e spugnoso (Fig. 40).

### **10.1.4 Considerazioni generali**

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 (Masoud et al. 1986), nel maiale dai 24 mesi in poi e nella pecora intorno ai 20 mesi (R. Barone, Anatomia comparata dei mammiferi domestici, Vol. 1 Osteologia, Edagricole 1974). Oltre a questo, è ben evidente che all'aumentare delle dimensioni del modello animale in esame, aumenta di conseguenza la concentrazione assoluta di HA.

Il coniglio quindi, presenta valori di densitometria ossea inferiori rispetto a soggetti di mole maggior, come maiale e pecore, ma evidenzia un marcato aumento (+ 15%) della componente minerale ossea dai 7 mesi in poi, dato confermato nel lavoro di Willet et al. (2010).

Nella tabella seguente (Tab. 16) vengono riassunti gli incrementi percentuali nella concentrazione ossea di HA, in relazione all'età dei soggetti.

		Mesi	
		4 ÷ 7	7 ÷ 12
Coniglio	Cranio	4	-
	Tibia	5	15
Maiale	Tibia	7	-

Tab. 16 - Incremento del contenuto di HA in base all'età, valori espressi in percentuale

## 10.2 Fase sperimentale

L'utilizzo di supporti sintetici, come l'innesto osseo, ha spesso sostituito l'utilizzo di osso autologo o eterologo, che non sempre si è rivelato una soluzione ottimale. Le caratteristiche che questo supporto, o *scaffold*, deve possedere sono l'*osteoiduzione*, ossia la capacità di stimolare la neoformazione di tessuto osseo, e l'*osteoconduzione*, intesa come proprietà meccanica di supporto per la formazione di nuovi osteoni.

Lo sviluppo di nuovi materiali ha permesso di creare bioceramiche (ovvero ceramiche biocompatibili) che rispondono a questi requisiti, oltre ad essere

bioassorbibili e bioattive, cioè in grado di legarsi attivamente al tessuto osseo. I calcio-fosfati sono una categoria di ceramiche bioassorbibili, aventi diverse proprietà di assorbimento e di osteoconduttività. Una delle principali bioceramiche di calcio-fosfato, analizzata in diversi studi, è l'idrossiapatite (HA). Questa bioceramica è prodotta commercialmente in forme diverse, ma la caratteristica di maggior interesse è la possibilità di essere modellata in *pellets*, con dimensioni e forme adattabili alle più diverse esigenze. Inoltre, l'idrossiapatite preparata per via sintetica rappresenta un buon sostituto dell'osso naturale, poiché è un materiale atossico e non induce risposta infiammatoria o reazioni da corpo estraneo. Lo stesso osso compatto infatti è costituito per il 70% da HA e per il 30% da tessuto collagene.

L'unica caratteristica assente in questi *scaffolds* sintetici è la capacità osteogenica, ovvero la capacità di sintetizzare nuovo tessuto osseo attraverso cellule ossee vive contenute nell'innesto, o nel sito dell'innesto, tramite osteoblasti allineati, cellule staminali mesenchimali o fattori di crescita.

Le cellule staminali mesenchimali sono cellule multipotenti, in grado di differenziarsi in linee cellulari appartenenti allo stesso foglietto germinativo. Tradizionalmente, venivano isolate dallo stroma del midollo osseo; negli ultimi anni sono state isolate anche da altri tessuti adulti, tra i quali il midollo spinale, le ossa trabecolari, il muscolo scheletrico, la cute, il periostio, la membrana sinoviale e il tessuto adiposo. Quest'ultimo, in particolare, rappresenta una risorsa importante poiché presente in grandi quantità (in particolare a livello sottocutaneo), facilmente accessibile (con minimi disagi per il paziente rispetto ad altri siti) e possiede una resa elevata di cellule. Inoltre, le cellule staminali di derivazione adiposa (ASCs) presentano una buona capacità di differenziazione nelle linee

cellulari dei tre foglietti germinativi. Per questo motivo, nel presente studio *in vivo* si è deciso di utilizzare tale tipologia di cellule, associata a uno *scaffold* di Idrossiapatite (HA).

Per valutare le capacità riparative delle cellule staminali impiegate, in associazione o meno all'utilizzo di scaffold, sono state impiegate differenti metodiche: indagine macroscopica e radiografica, studio densitometrico ed esame istologico.

### 10.2.1 Indagine macroscopica e radiografica

Analizzando i punteggi, ottenuti applicando lo schema sviluppato da Wakitani et al. (1994), riassunti in Tab. 13 (Capitolo 9), si può affermare che, in tutti i gruppi sperimentali (Fig. 41), il difetto osseo risulta ben colmato, non mostrando differenze significative tra gruppo A e C ( $p > 0,05$ ); nel gruppo A si apprezza una diminuzione della consistenza e un minor riempimento del difetto osseo, se paragonate ai campioni del gruppo C. Il medesimo risultato si è ottenuto nei soggetti sottoposti a impianto (gruppi B e D,  $p > 0,05$ ), in presenza o meno di rbASCs, mostrando una buona integrazione e riparazione ossea. L'unico difetto si è osservato in un soggetto del gruppo B, in presenza di una lieve mobilitazione dell'impianto.

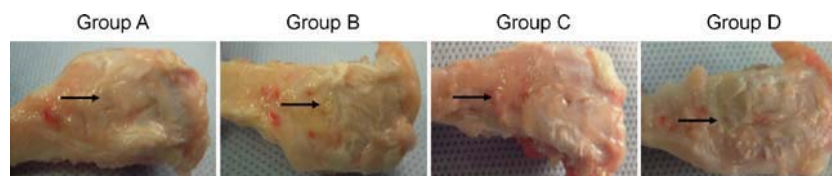


Fig. 41 - Aspetto macroscopico degli espanti

I risultati dello studio radiografico mostrano invece differenze più evidenti (Fig. 42): i soggetti del gruppo A mostrano una chiusura parziale del difetto osseo, con aspetto disomogeneo e lieve reazione periostale perilesionale,

mentre i soggetti del gruppo C presentano un più completo e omogeneo riempimento della lesione. Sia nel gruppo B che nel gruppo D gli *scaffolds* mostrano un'ottima osteointegrazione, nonostante buona parte dell'HA appartenente all'impianto non risulti riassorbita. Tra questi due gruppi non si evidenziano differenze significative nel grado di ossificazione.



Fig. 42 - Studio radiografico a T<sub>0</sub> (impianto), T<sub>6</sub> (6 settimane) e T<sub>8</sub> (espianto)

Pertanto, dall'analisi macroscopica risulta che lo *scaffold* di per sé è in grado di indurre una buona riparazione ossea, indifferentemente dalla presenza delle cellule staminali. Queste ultime invece, già da sole, risultano in grado di dare un miglior risultato rispetto al processo riparativo osseo naturale.

### 10.2.2 Studio densitometrico

Per valutare correttamente i risultati densitometrici effettuati sui soggetti sperimentali, questi sono stati confrontati con i valori di mineralometria acquisiti durante la fase preliminare, sui soggetti della medesima età (7 mesi). Questi valori, assunti come “normali” (NORM), risultavano di circa 0,3-0,4 g/cm<sup>2</sup> di HA nelle aree R1 e R2, e 0,7 g/cm<sup>2</sup> in R3. In tutti i campioni sottoposti alla fase sperimentale si assiste a una diminuzione del valore di R1 e a un aumento di R3 mentre, per quanto riguarda R2, i valori restano simili nei campioni controllo e aumentano in quelli con la presenza dell'impianto. L'aumento dei valori di R2 nei campioni con la presenza dell'impianto è dovuto, oltre alla normale rigenerazione ossea, allo *scaffold*, che già di per sé, come si nota nel valore CTRL, presenta una densità di circa 0,5 g/cm<sup>2</sup>. La variazione in R1 può essere riconducibile, in prima ipotesi, a una demineralizzazione della epifisi prossimale per la mobilitazione del calcio verso il processo riparativo adiacente.

L'aumento invece dei valori in R3 è da collegarsi alla risposta periostale a un insulto iatrogeno, con ispessimento della corticale. Bisogna comunque tener conto che quest'ultimo valore risente molto della variazione del posizionamento del campione durante l'esame MOC, per l'aumentata o diminuita sovrapposizione delle strutture in esame.

Pertanto, i valori di R1, R2 e R3 tra i gruppi trattati risultano relativamente omogenei ( $p > 0,05$ ). Non esistono differenze statisticamente significative tra i valori medi R2 dei gruppi A e C ( $p > 0,05$ ) e B e D ( $p > 0,05$ ) anche se, in quest'ultimo caso, si evidenzia un aumento medio del 15% nel gruppo D rispetto al B.

### **10.2.3 Esame istologico**

I risultati dell'esame istologico permettono di ipotizzare che le cellule staminali siano, in un certo modo, in competizione con lo *scaffold*, portando a una migliore rigenerazione ossea quando sono da sole, rispetto a una loro associazione allo *scaffold* stesso. Bisogna però evidenziare che lo *scaffold* fornisce un'ottima struttura di sostegno per la formazione di tessuto neoformato, in assenza di elevati fenomeni di riassorbimento a suo carico. Inoltre, la matrice del tessuto di riparazione risulta più omogenea in presenza delle rbASCs.

### **10.2.4 Considerazioni generali**

Valutando i risultati ottenuti dalle differenti tecniche d'indagine, si è potuto stabilire che le cellule staminali presentano una buona capacità rigenerativa ossea, anche senza l'ausilio di *scaffold*. Questi, in ogni caso, si sono dimostrati degli ottimi supporti, capaci di indurre una riparazione ossea adeguata. Il presente studio sperimentale è stato pubblicato sul *Journal of Orthopaedic Research* (De Girolamo et al., "Role of autologous rabbit adipose-derived stem cells in the early phase of the repairing process of critical bone defects", Epub ahead of print, 2010).

## **10.3 Sviluppi futuri**

Per quanto riguarda la fase preliminare, il prossimo passo prevede l'ampliamento dei campioni dei modelli sperimentali già studiati, al fine di colmare le lacune relative alle età mancanti (cranio di coniglio 4 mesi, tibia di maiale 12 mesi e tibia di pecora 4, 7 e 12 mesi). In aggiunta, si è previsto

di ampliare lo studio densitometrico al modello animale ratto, prendendo in esame la componente ossea femorale e tibiale.

Il risultato ottenuto nella fase sperimentale risulta essere un ottimo punto di partenza per un ulteriore studio in vivo delle cellule staminali di origine adiposa. Il passaggio seguente a breve termine prevede il trasferimento dello studio a un livello superiore, utilizzando cioè animali di dimensioni maggiori (es. maiale), che possano simulare al meglio le condizioni di carico e stress ponderale delle lesioni rispetto al coniglio, in modo da poter valutare con maggior obiettività la capacità rigenerativa ossea delle ASCs in associazione con *scaffolds* differenti.

L'obiettivo finale proposto è quello di inserire nelle normali procedure chirurgiche ortopediche l'utilizzo dell'associazione cellule staminali - *scaffold*, in grado di riparare agevolmente ampi difetti ossei, limitando al minimo i rischi e le complicazioni. Inoltre, l'utilizzo di cellule staminali di origine adiposa (ASCs) permette di avere un'immensa risorsa di cellule autologhe, aventi buona capacità rigenerativa su differenti tessuti, con ottime prospettive di utilizzo anche in campi differenti da quello ortopedico.

---

## 11 Bibliografia

- Anghileri E, Marconi S, Pignatelli A, Cifelli P, Galie' M, Sbarbati A, Krampera M, Belluzzi O, Bonetti B: *Neuronal differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells*. Stem Cells Dev 2008; 17:909–916.
- Arnalich-Montiel F, Pastor S, Blazquez-Martinez A, Fernandez-Delgado J, Nistal M, Alio L, De Miguel MP: *Adipose derived stem cells are a source for cell therapy of the corneal stroma*. Stem Cells 2008; 26:570-579.
- Arrigoni E, Lopa S, de Girolamo L, et al. 2009. *Isolation, characterization and osteogenic differentiation of adipose derived stem cells: from small to large animal models*. Cell Tissue Res 338:401-411.
- Bianco P, Gehron Robey P: *Stem cells in tissue engineering*. Nature 2001; 414: 118-121.
- Carson JS, Bostrom MPG: *Synthetic bone scaffolds and fracture repair Injury*. Int. J. Care Injured (2007) 38S1, S33-S37.
- Cancedda R, Giannonic P, Mastrogiacomo M : *A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice* Biomaterials 28 (2007) 4240-4250.
- De Girolamo L, Sartori MF, Albisetti W, Brini AT: *Osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells: comparison of two different inductive media*. J Tissue Eng Regen Med 2007; 1: 154-157.
- De Girolamo L, Sartori MF, Arrigoni E, Rimondini L, Albisetti W, Weinstein, RL, Brini AT : *Human adipose-derived stem cells as future tools in tissue regeneration: Osteogenic differentiation and cell-scaffold interaction*. The International Journal of Artificial Organs: 31-6, 2008, 467-479.

- 
- De Girolamo L, Lopa S, Arrigoni E, et al. 2009. *Human adipose-derived stem cells isolated from young and elderly women: their differentiation potential and scaffold interaction during in vitro osteoblastic differentiation*. *Cytotherapy* 11:793-803.
  - Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, Cho H, Matsumoto N, Itokazu Y, Tajima N, Yamada H, Sawada H, Ishikawa H, Mimura T, Kitada M, Suzuki Y, Ide C: *Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation*. *J Clin Invest* 2004; 113:1701-1710.
  - Gardner RL: *Stem cells and regenerative medicine: principles, prospects and problems*. *C. R. Biologies* 330 (2007) 465-473.
  - Garrison KR, Donell S, Ryder J, Shemilt I, Mugford M, Harvey I, Song F: *Clinical effectiveness and cost-effectiveness of bone morphogenetic proteins in the non-healing of fractures and spinal fusion: a systematic review*. *Health Technology Assessment* 2007; Vol. 11: No. 30.
  - Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E: *Bone substitutes: An update*. *Injury, Int. J. Care Injured* (2005) 36S, S20-S27.
  - Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H: *Percutaneous autologous bone-marrow grafting for non unions. Influence of the number and concentration of progenitor cells*. *J Bone Joint Surg Am* 2005; 87:1430-1437.
  - Hing KA, Wilson LF, Buckland T : *Comparative performance of three ceramic bone graft substitutes* *The Spine Journal* 7 (2007) 475-490.
  - Horwitz EM, Gordon PL, Koo WW, Marx JC, Neel M, McNall RY, Muul L, Hofmann T: *Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:8932-8937.

- 
- Locke M, Windsor J, Dunbar PR : *Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery*. ANZ J Surg 79 (2009) 235-244.
  - Martiniakova M, Omelka R , Ryban L, Grosskopf B, Vondrakova M, Bauerova M, Fabis M, Chrenek P : *Comparative Study of Compact Bone Tissue Microstructure between Non-transgenic and Transgenic Rabbits with WAP-hFVIII Gene Construct*. Anat. Histol. Embryol. 35, 310-315 (2006).
  - Masoud I, Shjapiro F, Kent R, Moses A: *A longitudinal study of the growth of the New Zealand white rabbit: cumulative and beweekly incremental growth rates for body length, body weight, femoral length and tibial length*. Journal of Orthopaedic Research (1986) 4:221-231.
  - Masoud I, Shjapiro F, Moses A: *Tibial epiphyseal development: a cross sectional histologic and histomorphometric study in the New Zealand white rabbit*. Jouenal of Orthopaedic Research (1986) 4:212-220.
  - Miyazaki M, Tsumura H, Wang JC: *An update on bone substitutes for spinal fusion*. Eur Spine J (2009) 18:783-799.
  - Morigi M, Introna M, Imberti B, Corna D, Abbate M, Rota C, Rottoli D, Benigni A, Perico N, Zoja C, Rambaldi A, Remuzzi A, Remuzzi G: *Human bone marrow mesenchymal stem cells accelerate recovery of acute renal injury and prolong survival in mice*. Stem Cells 2008; 26:2075-2082.
  - Oh JY, Kim MK, Shin MS, Lee HJ, Ko JH, Wee WR, Lee JH: *The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury*. Stem Cells 2008; 26:1047-1055.

- 
- Pal R: *Embryonic stem (ES) cell-derived cardiomyocytes: A good candidate for cell therapy applications* Cell Biology International 33 (2009) 325 e 336.
  - Panetta NJ, Gupta DM, Quarto N, Longaker MT: *Mesenchymal cells for skeletal tissue engineering* Panminerva Med 2009;51,25-41.
  - Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG: *Animal models for implant biomaterial research in bone*. European Cells and Materials Vol. 13 2007 (1-10).
  - Qian H, Yang H, Xu W, Yan Y, Chen Q, Zhu W, Cao H, Yin Q, Zhou H, Mao F, Chen Y: *Bone marrow mesenchymal stem cells ameliorate rat acute renal failure by differentiation into renal tubular epithelial-like cells*. Int J Mol Med 2008; 22:325-332.
  - Sarkar MR, Augat P, Shefelbine SJ, Schorlemmer S, Huber-Lang M, Claes L, Kinzl L, Ignatius A: *Bone formation in a long bone defect model using a platelet-rich plasma-loaded collagen scaffold*. Biomaterials 27 (2006) 1817-1823.
  - Schuleri KH, Feigenbaum GS, Centola M, Weiss ES, Zimmet JM, Turney J, Kellner J, Zviman MM, Hatzistergos KE, Detrick B, Conte JV, McNiece I, Steenbergen C, Lardo AC, Hare JM: *Autologous mesenchymal stem cells produce reverse remodelling in chronic ischemic cardiomyopathy*. European Heart journal 2009 Jul 8. [Epub ahead of print].
  - Sensebé, Krampera M, Schrezenmeier H, Bourin P, Giordano R : *Mesenchymal stem cells for clinical application*. Vox Sanguinis (articles online in advance of print)published online: 3 Aug 2009.
  - Torres FC, Rodrigues CJ, Stocchero IN, Ferriera MC : *Stem Cells from the Fat Tissue of Rabbits: An Easy-To-Find Experimental Source*. Aesthetic Plastic Surgery 31:574-578, 2007.

- 
- Vaccaro AR, Whang PG, Patel T, Phillips FM, Anderson DG, Albert TJ, Hilibrand AS, Brower RS, Kurd MF, Anoop Appannagari A, Patel M, Fischgrund JS: *The safety and efficacy of OP-1 (rhBMP-7) as a replacement for iliac crest autograft for posterolateral lumbar arthrodesis: minimum 4-year follow-up of a pilot study.* The Spine Journal 8 (2008) 457-465.
  - Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM: *Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage.* J Bone Joint Surg Am. 1994 Apr; 76(4):579-92.
  - Watt S., Contreras M.: *Stem cell medicine: Umbilical cord blood and its stem cell potential.* Seminars in Fetal & Neonatal Medicine (2005) 10, 209e220
  - Willet TL, Wynnckj C, Wang J, Grynblas MD: *The fatigue resistance of rabbit tibiae varies with age from youth to middle age.* Osteoporosis International Journal, 2010, Epub ahead of print.
  - Woodbury D, Reynolds K, Black IB: *Adult bone marrow stem cells express germline, ectodermal, entodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis.* J Neurosci Res 2002; 96:908-917.
  - Zhang X, Mitsuru A, Igura K, Takahashi K, Ichinose S, Yamaguchi S, Takahashi TA: *Mesenchymal progenitor cells derived from chorionic villi of +human placenta for cartilage tissue engineering.* Biochemical and Biophysical Research Communications 340 (2006) 944-952
  - Zijderfeld SA, ten Bruggenkate, van Den Bergh, Schulten EAJM : *Fractures of the Iliac Crest After Split-Thickness Bone Grafting for Preprosthetic Surgery: Report of 3 Cases and Review of the Literature* J Oral Maxillofac Surg 62:781-786, 2004.

---

## BIBLIOGRAFIA CONSULTATA

- Black J: “*Orthopaedic Biomaterials in Research and Practice*” ed. Churchill Livingstone Inc. 1988.
- Barone R: “*Anatomia comparata dei Mammiferi Domestici*”, Vol. 1 Osteologia, Edagricole, 1974.
- Fordham JN, “*Manual of Bone Densitometry Measurements: An Aid to the Interpretation of Bone Densitometry*”, Springer, 2000.
- Gallinaro “*Manuale di ortopedia e traumatologia* “ ed. McGraw-Hill 2007.
- Gearhart et al. “*Essentials of stem cells biology*” ed. Elsevier academic press 2006
- Huddleston AL, “*Quantitative Methods in Bone Densitometry*”, Academic Publishers, 1988.
- Yuehuei HA and Friedman J “*Animal Models in Orthopaedic Research*” ed. CRC Press 1999.
- Decreto legislativo 27 gennaio 1992, n. 116 (in Suppl. ordinario alla Gazz. Uff. n. 40, del 18 febbraio). -- *Attuazione della direttiva (CEE) n. 609/86 in materia di protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici.*, Allegato n. 2 articolo 1.
  
- Altman JI, Eloy JA, Hoch BL, Munoz CM, Shohet MR: *Demineralized bone matrix and fat autograft in a rabbit model of frontal sinus obliteration.* Otolaryngology–Head and Neck Surgery (2007) 137, 264-268.
- Borsari V, Fini M, Giavaresi G, Rimondini L, Consolo U, Chiusoli L, Salito A, Volpert A, Chiesa R, Giardino R: *Osteointegration of Titanium and Hydroxyapatite Rough Surfaces in Healthy and Compromised*

- 
- Cortical and Trabecular Bone: In Vivo Comparative Study on Young, Aged, and Estrogen-Deficient Sheep*. Published online 1 May 2007 in Wiley InterScience.
- Brooke G, Rossetti T, Pelekanos R, Ilic N, Murray P, Hancock S, Antonenas V, Huang G, Gottlieb D, Bradstock K, Atkinson K: *Manufacturing of human placenta-derived mesenchymal stem cells for clinical trials*. British Journal of Haematology (2008) 144, 571-579.
  - Cacchioni A, Spaggiari B, Ravanetti F, Martini FM, Borghetti P, Gabbi C: *The critical sized bone defect : Morphological study of bone healing*. Ann. Fac. Medic. Vet. di Parma (Vol. XXVI, 2006), 97 - 110.
  - Dill T, Schachinger V, Rolf A, MD, Mollmann S, Thiele H, Tillmanns H, Assmus B, Dimmeler S, Zeiher AM, Hamm C: *Intracoronary administration of bone marrow-derived progenitor cells improves left ventricular function in patients at risk for adverse remodelling after acute ST-segment elevation myocardial infarction: Results of the Reinfusion of Enriched Progenitor cells And Infarct Remodelling in Acute Myocardial Infarction study (REPAIR-AMI) cardiac Magnetic Resonance Imaging substudy* Am Heart J 2009;157:541-7.
  - Egermann M, Goldhahn J, Schneider E: *Animal models for fracture treatment in osteoporosis*. Osteoporos Int (2005) 16: S129–S138.
  - Follmar KE, Prichard HL, DeCroos FC, Wang HT, Levin LS, Klitzman B, Olbrich KC, Erdmann D : *Combined Bone Allograft and Adipose-Derived Stem Cell Autograft in a Rabbit Model*. Ann Plast Surg 2007;58: 561-565.
  - Frosch KH, Drengk A, Krause P, Viereck V, Miosge N, Werner C, Schild D, Sturmer EK, Sturmer KM: *Stem cell-coated titanium implants for the partial joint resurfacing of the knee*. Biomaterials 27 (2006) 2542–2549.

- 
- Fuchs B, Ossendorf C, Leerapun T, b, Sim FH: *Intercalary segmental reconstruction after bone tumor resection*. EJSO 34 (2008) 1271e1276.
  - Ghassemi A, Ghassemi M, Riediger D, Hilgers RD, Gerressen M : *Comparison of Donor-Site Engraftment After Harvesting Vascularized and Nonvascularized Iliac Bone Grafts*. J Oral Maxillofac Surg 67:1589-1594, 2009.
  - Hautamäki MP, Aho AJ, Alander P, Rekola J, Gunn J, Strandberg N, Vallittu PK : *Repair of bone segment defects with surface porous fiber-reinforced polymethyl methacrylate (PMMA) composite prosthesis: Histomorphometric incorporation model and characterization by SEM*. Acta Orthopaedica 2008; 79 (4): 555-564.
  - Innocenti M, Abed YY, Beltrami G, Delcroix L, Manfrini M, Capanna R: *Biological reconstruction after resection of bone tumors of the proximal tibia using allograft shell and intramedullary free vascularized fibular graft long-term result*. Microsurgery 29:361–372, 2009.
  - Jamali A, Hilpert A, Debes J, Afshar P, Rahban S, Holmes R : *Hydroxyapatite/Calcium Carbonate (HA/CC) vs. Plaster of Paris: A Histomorphometric and Radiographic Study in a Rabbit Tibial Defect Model*. Calcified Tissue International (2002) 71:172-178.
  - Jee WSS, Yao W: *Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis*. J Musculoskel Neuron Interact 2001; 1(3):193-207.
  - Kandel RA, Grynepas M, Pilliar R, Lee J, Wang J, Waldman S, Zalzal P, Hurtig M : *Repair of osteochondral defects with biphasic cartilage-calcium polyphosphate constructs in a Sheep model*. Biomaterials 27 (2006) 4120–4131.
  - Kasten P, Vogel J, Geiger F, Niemeyer P, Luginbuhl R, Szalay K : *The effect of platelet-rich plasma on healing in critical-size long-bone defects*. Biomaterials 29 (2008) 3983-3992.

- 
- Koch TG, Berg LC, Betts DH: *Current and future regenerative medicine - Principles, concepts, and therapeutic use of stem cell therapy and tissue engineering in equine medicine*. Can Vet J 2009; 50:155-165.
  - Koga H, Engebretsen L, Brinchmann JE, Muneta T, Sekiya I: *Mesenchymal stem cell-based therapy for cartilage repair: a review*. Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc. Epub 31 March 2009.
  - Komaki H, Tanaka T, Chazono M, Kikuchi T : *Repair of segmental bone defects in rabbit tibiae using a complex of  $\beta$ -tricalcium phosphate, type I collagen, and fibroblast growth factor-2*. Biomaterials 27 (2006) 5118-5126.
  - Leach K, Mooney D: *Bone engineering by controlled delivery of osteoinductive molecules and cells*. Expert Opin. Biol. Ther. (2004) 4(7):1015-1027.
  - Le Guehennec L, Goyenvalle E, Aguado E, Houchmand-Cuny M, Enkel B, Pilet P, Daculsi G, Layrolle P : *Small-animal Models for Testing Macroporous Ceramic Bone Substitutes*. Published online 27 August 2004 in Wiley InterScience.
  - Li R, Stewart DJ, von Schroeder HP, Mackinnon ES, Schemitsch EH : *Effect of Cell-Based VEGF Gene Therapy on Healing of a Segmental Bone Defect*. J Orthop Res 27:8-14, 2009.
  - Marcacci M, Kon E, Moukhachev V, Lavroukov A, Kutepov S, Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R: *Stem Cells Associated with Macroporous Bioceramics for Long Bone Repair: 6-to 7-Year Outcome of a Pilot Clinical Study*. TISSUE ENGINEERING Volume 13, Number 5, 2007.
  - Mizuno H: *Adipose-derived Stem Cells for Tissue Repair and Regeneration: Ten Years of Research and a Literature Review*. J Nippon Med. Sch. 2009; 76: 56-66.

- 
- Moodley Y, Atienza D, Manuelpillai U, Samuel CS, Tchongue J, Ilancheran S, Boyd R, Trounson A : *Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Reduce Fibrosis of Bleomycin-Induced Lung Injury*. The American Journal of Pathology, Vol. 175, No. 1, July 2009.
  - Nair MB, Varma HK, Menon KV, Shenoy SJ, John A : *Reconstruction of goat femur segmental defects using triphasic ceramic-coated hydroxyapatite in combination with autologous cells and platelet-rich plasma*. Acta Biomaterialia 5 (2009) 1742-1755.
  - Nishida J, Shimamura T: *Methods of reconstruction for bone defect after tumor excision: A review of alternatives*. Med Sci Monit, 2008; 14(8): RA107-113.
  - Nuss KMR, Auer JA, Boos A, von Rechenberg B: *An animal model in sheep for biocompatibility testing of biomaterials in cancellous bones*. BMC Musculoskeletal Disorders 2006, 7:67.
  - Orsini G, Ricci J, Scarano A, Pecora G, Petrone G, Iezzi G, Piattelli A : *Bone-Defect Healing with Calcium-Sulfate Particles and Cement: An Experimental Study in Rabbit*. J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl Biomater 68B: 199–208, 2004.
  - Parikh SN: *Bone Graft Substitutes: Past, Present, Future*. J. Postgrad. Med. 2002; 48:142-148.
  - Pek YS, Gao S, Arshad MSM, Leck K-J, Ying JY: *Porous collagen-apatite nanocomposite foams as bone regeneration scaffolds*. Biomaterials 29 (2008) 4300-4305.
  - Reichert JC, Saifzadeh S, Wullschlegel ME, Epari DR, Schutz MA, Duda GN, Schell H, van Griensven M, Redl H, Hutmacher DW : *The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research*. Biomaterials 30 (2009) 2149-2163.

- 
- Shao XX, Hutmacher DW, Ho ST, Goh JCH, Lee H: *Evaluation of a hybrid scaffold/cell construct in repair of high-load-bearing osteochondral defects in rabbits*. *Biomaterials* 27 (2006) 1071-1080.
  - Sun Y, Feng Y, Zhang CQ, Chen SB, Cheng XG : *The regenerative effect of platelet-rich plasma on healing in large osteochondral defects*. *International Orthopaedics (SICOT)* Published online 12 May 2009.
  - Swieszkowski W, Tuan BHS, Kurzydowski KJ, Dietmar W. Hutmacher : *Repair and regeneration of osteochondral defects in the articular joints*. *Biomolecular Engineering* 24 (2007) 489-495.
  - Trounson A: *New perspectives in human stem cell therapeutic research*. *BMC Medicine* 2009, 7:2009 10.1186/1741-7015-7-29.
  - Velchuru VR, Satish SG, Petri GJ, Sturzaker HG: *Hernia through an Iliac Crest Bone Graft Site*. *Bulletin of the Hospital for Joint Diseases* Volume 63, Numbers 3 & 4 2006.
  - Viateau V, Guillemain G, Bousson V, Oudina K, Hannouche D, Sedel L, Logeart-Avramoglou D, Petite H : *Long-Bone Critical-Size Defects Treated with Tissue-Engineered Grafts: A Study on Sheep*. *Journal of Orthopaedic Research* June 2007 25:741-749.
  - Walsh WR, Vizesi F, Michael D, Auld J, Langdown A, Oliver R, Yu Y, Irie H, Bruce W :  *$\beta$ -TCP bone graft substitutes in a bilateral rabbit tibial defect model*. *Biomaterials* 29 (2008) 266-271.
  - Wang Y, Ni M, Tang PF, Li G : *Novel Application of HA-TCP Biomaterials in Distraction Osteogenesis Shortened the Lengthening Time and Promoted Bone Consolidation*. *J Orthop Res* 27:477-482, 2009.
  - Zhang X, Awad HA, O'Keefe RJ, Guldberg RE, Schwarz M: *Engineering Periosteum for Structural Bone Graft Healing*. *Clin Orthop Relat Res* (2008) 466:1777-1787.