

INTRODUZIONE

Sulla base di studi sperimentali effettuati dal team di ricerca del Prof. Per-Ingvar Brånemark presso l'Università di Göteborg (Svezia) effettuati negli anni 60-70¹ i quali portarono alla scoperta del fenomeno dell'osteointegrazione, l'utilizzo di impianti dentali in titanio è diventato un trattamento predicibile e scientificamente accettato per la sostituzione degli elementi dentali perduti. Sono stati definiti fino dall'inizio vari requisiti per ottenere un legame funzionalmente stabile nel tempo tra tessuto osseo e titanio², alcuni di questi sono stati modificati nel corso degli ultimi 30 anni per esempio riguardo alla possibilità di effettuare un carico protesico immediato sulle fixtures rispettando rigidi protocolli operativi e alla possibilità di inserire gli impianti con guarigione trans-mucosa. Alcuni requisiti sono però rimasti fondamentali, quali una tecnica chirurgica atraumatica, evitando il surriscaldamento dell'osso, una sufficiente stabilità primaria delle fixtures e la presenza di un adeguato volume osseo sia in altezza che in spessore.

Le elevate percentuali di successo a lungo termine, ormai ampiamente documentate sia nelle edentulie totali che parziali, ha portato alla maggior richiesta da parte dei pazienti e dei clinici anche di soluzione di gravi atrofie ossee che di per sé non consentono l'inserimento standard di fixtures implantari. In seguito alla avulsione degli elementi dentari i processi alveolari vanno incontro a riassorbimento progressivo che può portare ad insufficiente supporto osseo in volume e densità e ad alterazioni dei rapporti intermassellari. Inoltre esistono delle strutture anatomiche che vanno rispettate nell'inserimento implantare come il nervo alveolare inferiore e il seno mascellare che limitano di fatto la disponibilità ossea sfruttabile per l'inserimento degli impianti. In chirurgia pre-implantologica sono molte le condizioni che richiedono il ricorso ad aumenti di volume osseo mediante innesti che rappresentano di fatto presidi fondamentali per le specifiche finalità ricostruttive quali la correzione di atrofie post-estrattive, deformità congenite ed acquisite, perdite di sostanza legate a patologie traumatiche, infettive, displasiche e tumorali. Sono descritte in letteratura diverse tecniche di rigenerazione ossea (grande rialzo del seno mascellare, tecniche apposizionali a blocco, rigenerazione ossea guidata, distrazione osteogenetica, tecniche interposizionali dopo osteotomie segmentali, etc) e l'utilizzo di vari materiali da innesto (osso autologo, eterologo, omologo, materiali alloplastici).

Tra tutti i materiali, l'osso autologo è stato e continua ad essere il "gold standard" per le sue riconosciute capacità osteogenetiche, osteoinduttive ed osteoconduttive, ma presenta tuttavia svantaggi oggettivi legati alla limitata disponibilità e alla morbilità legata al sito

donatore che si somma a quella del sito ricevente. Per anni la cresta iliaca anteriore ha rappresentato il sito di prelievo di elezione sia per innesto a blocco che per innesti di particolare rivelandosi eccellente nell'utilizzo nel grande rialzo del seno mascellare; tuttavia i blocchi cortico-midollari iliaci si sono dimostrati soggetti a drammatici riassorbimenti nelle tecniche apposizionali per l'aumento verticale e/o laterale dei processi alveolari.

In tali tecniche incrementali si sono dimostrati clinicamente più stabili blocchi monocorticali prelevati intraoralmente dal ramo ascendente della mandibola o dalla sinfisi mandibolare ed extra-oralmente dalla teca cranica.

Nell'ottica di ridurre la morbilità legata alle procedure di innesto autologo, sono stati proposti numerosi materiali sostitutivi sia eterologhi che alloplastici nonché di sintesi, che posseggono solo proprietà osteoconduttive e che sono legati a tempi di guarigione superiore talvolta residuando in maniera indelebile nel contesto dell'osso rigenerato riducendo quindi la performance clinica della rigenerazione ossea.

Per quanto riguarda l'utilizzo dei tessuti omologhi, che hanno la stessa struttura dell'osso autologo, essi vengono sottoposti a processi quali la liofilizzazione (freeze-drying) o trattamenti chimici o radianti che non solo riducono la resistenza meccanica di tali innesti ma di fatto riducono o eliminano la componente cellulare e le proteine della matrice ossea, compromettendo di fatto la capacità osteoinduttiva dell'osso.

Attualmente, grazie all'evoluzione di nuovi protocolli di selezione del donatore, di lavorazione e di sterilizzazione è stato proposto anche in chirurgia ricostruttiva oro-maxillo-facciale l'utilizzo di tessuto osseo omologo congelato (Fresh Frozen Bone), che viene utilizzato da anni in chirurgia ortopedica.

L'osso omologo congelato fornito dalla Banca dell'Osso della Regione Toscana, segue un'attenta selezione del donatore e prevede una serie di screening sierologici per intercettare eventuali trasmissioni di agenti infettivi al ricevente, seguendo scrupolosi protocolli internazionali redatti dal Muskuloskeletal Council of the American Association of Tissue Banks (AATB) e dell'European Association of Muscolo Skeletal Transplantation (EAMST). Immediatamente dopo il prelievo, effettuato in maniera asettica dal donatore, il tessuto osseo viene conservato a -80°C. A questa temperatura le cellule contenute all'interno dell'osso vengono distrutte per la deposizione di cristalli di ghiaccio al loro interno eliminando il problema dell'antigenicità legata agli antigeni presenti sulle membrane cellulari.

L'obiettivo della ricerca è di studiare sia istologicamente che clinicamente e radiograficamente i processi di rigenerazione ossea di gravi difetti alveolari effettuati mediante innesti liberi, con lo scopo di inserire impianti endo-ossei capaci di supportare

protesi dentali fisse mettendo sia nella procedura del rialzo del seno mascellare, sia nelle tecniche apposizionali, mettendo a confronto l'osso autologo con l'osso omologo congelato (FFB).

Non esistono ancora in letteratura dati attendibili che mostrino e spieghino a livello istologico come avvengano, nel tempo, i fenomeni di integrazione, rivascolarizzazione e di rimodellamento dell'osso innestato, soprattutto per quanto riguarda gli innesti di osso omologo congelato e se questi siano dotati della stessa performance clinica dell'osso autologo. Non è ancora chiaro infine quali siano i tempi esatti di guarigione e quali siano i protocolli di carico delle fixtures implantari. Gli autori in letteratura indicano talvolta al riguardo tempi di guarigione, inserimento implantare e timing di carico protesico, spesso contrastanti riportando casistiche cliniche senza nessun supporto istologico.

TESSUTO OSEEO

Il tessuto osseo fa parte, assieme alla cartilagine, dei tessuti connettivi specializzati per la funzione di sostegno³. L'appartenenza del tessuto osseo ai tessuti connettivi è giustificata sia per la sua origine dal mesenchima, il tessuto embrionale che funge da matrice per tutti i tessuti connettivi, sia per la sua costituzione, essendo formato da cellule e da sostanza intercellulare composta da fibre collagene e sostanza fondamentale anista. La peculiarità del tessuto osseo è quella di essere mineralizzato: infatti, la sostanza intercellulare è per la maggior parte impregnata di cristalli minerali, in prevalenza fosfato di calcio. La presenza di minerali, come pure l'abbondanza e la particolare distribuzione delle componenti organiche della sostanza intercellulare, conferiscono a questo tessuto spiccate proprietà meccaniche di durezza e di resistenza alla pressione, alla trazione e alla torsione. In virtù di queste proprietà, il tessuto osseo costituisce un materiale ideale per la formazione delle ossa dello scheletro, che costituiscono nel loro insieme l'impalcatura di sostegno dell'organismo. Inoltre, dato il notevole contenuto in sali di calcio, il tessuto osseo rappresenta il principale deposito di ione calcio per le necessità metaboliche dell'intero organismo. La deposizione del calcio nell'osso e la sua mobilizzazione, finemente controllate da meccanismi endocrini, contribuiscono in modo sostanziale alla regolazione dei livelli plasmatici di questo ione.

L'osso come, del resto tutti gli organi, è organizzato secondo diversi livelli che partono dai componenti elementari (cellule, sostanza intercellulare), a finire a formazioni complesse (segmenti scheletrici)⁴⁻¹³.

- Primo livello: la matrice ossea.
- Secondo livello: le cellule.
- Terzo livello: organizzazione strutturale microscopica.
- Quarto livello: architettura macroscopica.

LA MATRICE

Il tessuto osseo, deve le sue caratteristiche fisiche (resistenza, durezza) alla composizione della sostanza extracellulare, detta matrice ossea.

Essa si distingue in: matrice ossea inorganica (che costituisce il 70% della matrice ossea), costituita per lo più da sali minerali aggregati in forma di cristalli e matrice ossea organica (che costituisce il 30% della matrice ossea), costituita per il 95% di componente fibrillare (macromolecole collageniche) e per il 5% da componenti non fibrillari (biomolecole regolatrici, carboidrati)

MATRICE INORGANICA

La matrice dell'osso inorganica è formata da cristalli, di lunghezza pari a 64nm circa, di idrossiapatite $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$, i quali non sono mai in forma pura ma associati a carbonati, fosfati di calcio non apatitici, anioni citrato, fluoro, cloruro, cationi magnesio, sodio, potassio, ferro etc. I cristalli di apatite sono ben riconoscibili nei preparati di tessuto osseo allestiti per la microscopia elettronica in quanto fortemente elettrondensi; essi tendono a disporsi parallelamente tra sé e alle microfibrille collagene, di cui ricoprono la superficie e permeano le porosità. Una volta formati i cristalli di apatite, la deposizione di nuovo minerale può avvenire sia per formazione di nuovi cristalli che per apposizione sui cristalli preesistenti.

MATRICE ORGANICA

La matrice organica dell'osso è costituita da due componenti: la componente fibrillare e la componente non fibrillare. La componente fibrillare costituisce il 95% della matrice organica ed è rappresentata quasi esclusivamente dal collagene di Tipo I; il rimanente 5% è formato da proteine non collagene specifiche (Fig 1).

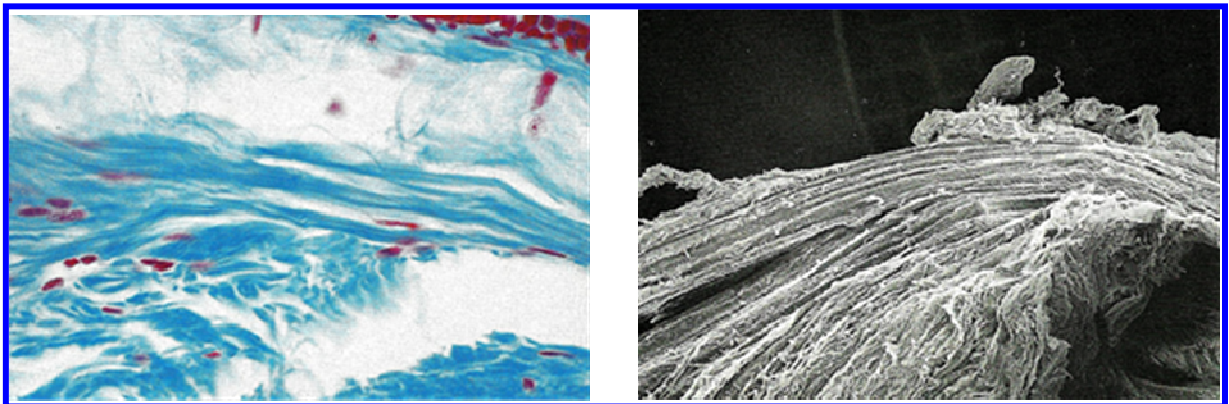


Fig.1: Fibre collagene al microscopio ottico ed al SEM intrecciati con fibroblasti interposti (immagine ottica con colorazione Azan-Mallory).

Il collagene, principale costituente della componente fibrillare, è una proteina fibrosa; la quale unità fondamentale è rappresentata dalla molecola di tropo collagene, costituita da tre catene polipeptidi avvolte tra loro elicoidalmente⁵. Le molecole di collagene si uniscono tra di loro, lungo l'asse lungo, a mezzo di legami trasversali, formando polimeri ordinati, costituenti le fibrille di collagene (strutture filamentose aventi diametro da 10 a 100 nm).

Nel tessuto osseo il collagene è interamente immerso nella matrice ossea minerale con funzione di dare alla struttura caratteristiche di esistenza meccanica. Infatti le fibre collagene hanno una grande flessibilità offrendo una notevole resistenza alla trazione. Inoltre nella fase

di ossificazione, la precipitazione dei cristalli di idrossiapatite sembra cominciare in corrispondenza di particolari siti delle fibre collagene, definite buchi, distribuendosi seguendo lo schema organizzativo delle fibrille ⁶.

La componente non fibrillare, definita anche come componente amorfa, è costituita da un ampio spettro di molecole proteiche e glucidiche coniugate a formare delle glicoproteine, inglobate nella matrice mineralizzata. La maggior parte di queste glicoproteine sono sintetizzate e secrete dagli osteoblasti durante la deposizione, altre invece, vengono dal torrente ematico. Con il processo di mineralizzazione esse rimangono intrappolate nel tessuto osseo ed hanno funzioni regolatrici.

Esse sono:

- Proteoglicani che rappresentano il 10% delle proteine non collageniche e sono costituite da catene di carboidrati carbossilasi e solforati. Ricerche condotte sia in vitro che in vivo hanno permesso di ipotizzare che i proteoglicani sono coinvolti nel controllo della formazione dell'estensione delle fibrille collagene ⁷.
- Osteocalcina è una glicoproteina sintetizzata dagli osteoblasti come proteina costituita da 99 amminoacidi, coniugata con carboidrati. L'osteocalcina rappresenta il 10-20% delle proteine non collageniche dell'osso; essa è in grado di legare sia l'idrossiapatite che gli ioni calcio ⁸.
- Osteonectina è una glicoproteina fosforilata che rappresenta il 15% delle proteine non fibrillari, la sua quantità è in relazione alla quantità di osso lamellare. L'ostonectina mostra legami saturabili e scambiabili sia con il collagene che con l'idrossiapatite, infatti, essa promuove la deposizione di minerali in presenza di collagene di Tipo I ^{9,10}.
- Sialoproteine sono glicoproteine che rappresentano il 7,5-10% delle proteine non fibrillari, e sono costituite da acido sialico o acido N-acetil-neuramminico (oligosaccaridi) attaccate a proteine non collageniche. Le sialoproteine non sono state osservate in nessun altro tessuto diverso da quello osseo, e sembrano essere glicoproteine in grado di legare il calcio e di regolare la dimensione dei cristalli di idrossiapatite ⁹.
- Sieroproteine o proteine sieriche sono tra le proteine non collageniche maggiormente rappresentate nel tessuto osseo, con una percentuale del 13% ⁹.
- Altre glicoproteine che rappresentano il 37% del contenuto della matrice amorfa non sono ancora state identificate ⁹.

CELLULE DELL'OSSO

Le cellule proprie del tessuto osseo sono morfologicamente distinguibili in 3 varietà: gli osteoblasti, gli osteociti, le cellule di rivestimento o lining bone cells e gli osteoclasti. Di queste, gli osteoblasti e gli osteociti sono in realtà fasi funzionali consecutive dello stesso tipo cellulare, a sua volta derivato dalla differenziazione in senso osteogenico della cellula mesenchimale pluripotente dei tessuti connettivi; sono pertanto considerabili come cellule autoctone dell'osso. Gli osteoclasti, per contro, derivano da precursori immigrati nel tessuto osseo dal sangue, i cosiddetti preosteoclasti, i quali a loro volta si differenziano da cellule staminali del midollo osseo ematopoietico.

OSTEOBLASTI

Gli osteoblasti sono cellule dell'osso deputate alla deposizione della matrice. Sono elementi mononucleati di derivazione mesenchimale che originano da precursori comuni ai fibroblasti ed ai condroblasti. Si presentano con forma variabile a seconda della loro attività sintetica, le loro dimensioni variano da 15 ai 30 μm . Gli osteoblasti sono elementi cellulari fortemente impegnati nella sintesi proteica. Infatti, al microscopio elettronico, gli osteoblasti presentano un ergastoplasma sviluppato e un grande apparato di Golgi. I mitocondri contengono numerosi granuli densi, interpretabili come accumuli di ioni calcio. In prossimità dell'apparato di Golgi sono visibili vescicole con vario aspetto contenenti sostanze da esocitare: alcune di queste sono oblunghe contengono un materiale fibrillare a modico arresto elettronico, rappresentato verosimilmente da molecole di procollagene; altre vescicole sono rotonde, a contenuto elettrone trasparente, e si pensa contengano proteoglicani e altre molecole della sostanza intercellulare. Nel citoplasma periferico possono essere presenti dei corpi delimitati da membrana, detti globuli calcificanti, di 0,2-0,5 μm di diametro, contenenti una matrice a medio arresto elettronico, in cui sono localizzati enzimi glicoproteici come la fosfatasi alcalina e la pirofosfatasi. L'osteoblasto è la sede di sintesi delle molecole organiche della sostanza intercellulare dell'osso, le quali vengono successivamente esocitate ed assemblate all'esterno della cellula. L'osteoblasto presiede anche alla mineralizzazione della sostanza intercellulare, secondo modalità che non sono del tutto chiarite ¹¹. Le molecole prodotte per la secrezione sono rappresentate da:

- proteine strutturali: collagene di Tipo I e piccole quantità di Tipo IV
- molecole regolatrici: osteonectina, osteocalcina, prostaglandine E2, sialoproteine, glicosamminoglicani e proteoglicani.

- molecole regolatrici: collagenasi e attivatori del plasminogeno

La produzione della matrice ossea e la sua mineralizzazione avvengono secondo un orientamento ben preciso: inizialmente l'osteoblasto depone osso dal lato rivolto verso la superficie ossea preesistente; successivamente ne depone da ogni lato tutto attorno a sé, di modo che ciascuna cellula si allontana progressivamente dalle circostanti a causa dell'interposizione di sostanza intercellulare. A questo punto l'osteoblasto rallenta sostanzialmente la sua attività metabolica e si trasforma in un osteocita, mentre nuovi osteoblasti si differenziano via via dalle cellule osteoprogenitrici. Quando il processo di formazione di nuovo tessuto osseo si è esaurito, gli osteoblasti che rimangono a ridosso della superficie ossea cessano la loro attività, riducono i loro organuli e si trasformano in una membrana di cellule appiattite, le cosiddette cellule di rivestimento dell'osso (bone lining cells), a cui si attribuisce un ruolo nel mediare gli scambi tra vasi sanguigni e osteociti^{12,13} (Fig. 2).

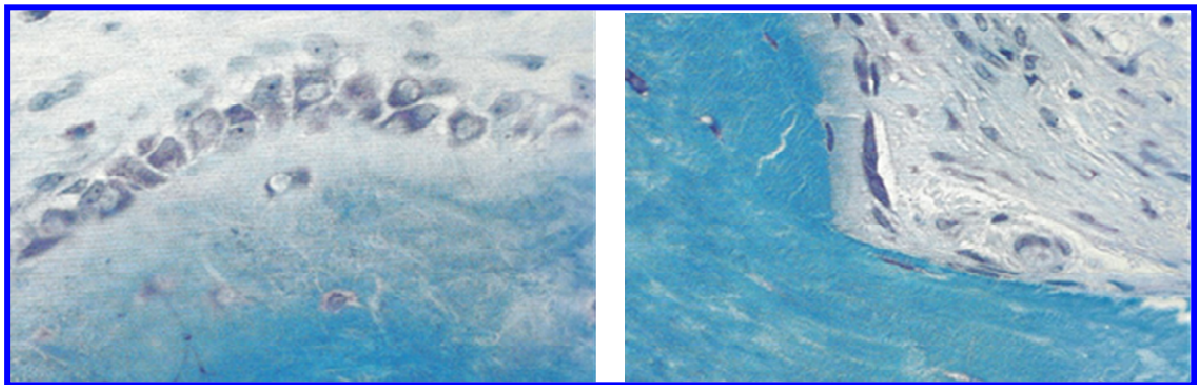


Fig.2: Osteoblasti in fase attiva e alla fine dell'attività produttiva (blu di toluidina).

OSTEOCITI

Gli osteociti sono le cellule tipiche dell'osso maturo, responsabili del suo mantenimento ed anche capaci di avviarne il rimaneggiamento. Sono cellule terminali, con una autonomia di vita finita, finemente regolata da meccanismi endocrini. L'osteocita è una cellula stellata, con un corpo cellulare a forma di lente biconvessa e numerosi prolungamenti citoplasmatici. Al microscopio ottico, l'osteocita presenta un nucleo eterocromatico con un piccolo nucleolo ed un citoplasma perinucleare piuttosto scarso che, negli osteociti più giovani, è tenuemente basofilo. Al microscopio elettronico, gli osteociti mostrano un aspetto diverso a seconda dell'età della cellula: gli osteociti giovani sono caratterizzati dalla presenza di cisterne di reticolo endoplasmatico granulare e da un apparato di Golgi piuttosto esteso; via

via che la cellula invecchia si riduce il reticolo endoplasmico granulare e compaiono vacuoli autofagici e lisosomi secondari; infine compaiono segni di degenerazione quali alterazioni nucleari caratteristiche dell'apoptosi, dilatazione della cisterna perinucleare e condensazione della matrice citoplasmatica che preludono alla dissoluzione dell'intera cellula. Il corpo dell'osteocita rimane racchiuso in una nicchia scavata nella sostanza intercellulare ossea, detta lacuna ossea, la cui forma ricalca quella della cellula, mentre i prolungamenti sono accolti all'interno di sottili canali scavati nel tessuto osseo e definiti canalicoli ossei. Alle loro estremità, i prolungamenti di un osteocita sono connessi mediante giunzioni serrate con quelli degli osteociti circostanti.

Tra la membrana plasmatica del corpo cellulare e dei prolungamenti e la matrice mineralizzata rimane uno spazio sottile occupato da tessuto osteoide che non mineralizza. Quando l'osteocita giunge a termine del suo ciclo vitale, esso ritrae i propri prolungamenti e degenera. Per molto tempo si è ritenuto che la morte degli osteociti fosse alla base del cosiddetto minirimaneggiamento, che avviene a livello di singoli osteociti e che nel suo insieme era ritenuto essere coinvolto nel mantenimento dei livelli circolanti di ione calcio (calcemia). Infatti, dagli osteociti morti si sarebbero liberati nella lacuna acidi organici derivati dal metabolismo cellulare (es. acido lattico) ed enzimi lisosomiali: i primi avrebbero disciolto i cristalli di apatite ed i secondi avrebbero scisso le macromolecole organiche della sostanza intercellulare, operando la cosiddetta osteolisi osteocitica. Si riteneva altresì che l'osteolisi osteocitica fosse promossa dal paratormone (PTH), l'ormone ipercalcemizzante prodotto dalle paratiroidi, il quale interagendo con recettori posti sulla membrana degli osteociti avrebbe determinato un'abbreviazione del loro ciclo vitale. In epoca recente, tuttavia, il ruolo dell'osteolisi osteocitica è stato ridimensionato: la mobilizzazione di ioni calcio dalla matrice ossea stimolata dal paratormone è ritenuta dipendere principalmente dall'azione combinata di osteoblasti ed osteoclasti. Vi sono dati a favore dell'ipotesi che, nelle zone di riassorbimento della matrice ossea da parte degli osteoclasti, gli osteociti non muoiano affatto ma vadano ad arricchire il patrimonio di cellule di rivestimento dell'osso, anche se non è chiaro se esse siano ancora capaci di trasformarsi nuovamente in osteoblasti attivi (Fig. 3).

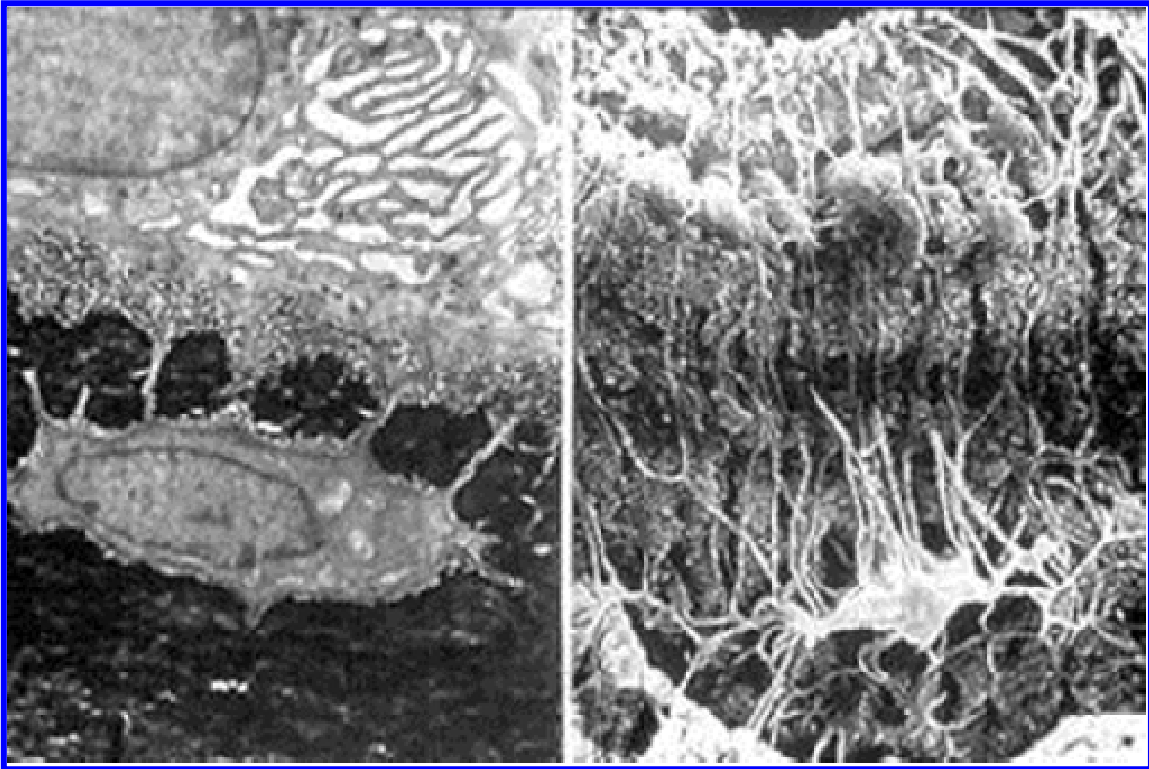


Fig.3: A sinistra, micrografia elettronica a trasmissione di un osteoblasta (in alto) e di un osteocita neoformato, racchiuso da ogni lato da matrice ossea mineralizzata e in connessione con l'osteoblasto mediante prolungamenti citoplasmatici. A destra, micrografia elettronica a scansione di un osteocita dal cui citoplasma si dipartono numerosi prolungamenti, per lo più diretti verso gli osteoblasti sovrastanti.⁶

L'osteocita assolve a due funzioni diverse, a seconda dell'età della cellula. Si ipotizza che gli osteociti giovani prossimi alla lamina ostogenica siano coinvolti nella regolazione dei processi osteoformativi. Gli osteociti a adulti invece sembrano svolgere una funzione di controllo dell'omeostasi scheletrica del tessuto ^{6,-12}.

Altro meccanismo importante degli osteociti sembra essere quello di agire come mecano stati, in grado di rilevare alterazioni meccaniche locali, risentendo degli stati di deformazione che si sviluppano nel tessuto ⁶.

CELLULE DI RIVESTIMENTO (BONE LINING CELLS)

Le cellule di rivestimento insieme agli osteociti, costituiscono la popolazione permanente delle cellule ossee. Al contrario degli osteociti, che sono compresi nella matrice mineralizzata, le cellule di rivestimento formano invece uno strato che ricopre le superfici ossee sia corticali sia endostali ¹⁴.

Le cellule di rivestimento presentano una forma appiattita che ricorda le cellule degli epitelii monostratificati e costituiscono un tappeto cellulare che separa la matrice ossea dall'ambiente extracellulare propriamente detto, isolandola da quest'ultimo. Formano una

sorta di barriera tra territorio osseo ed ambiente circostante e mediano gli scambi molecolari tra i due compartimenti (Fig. 4).

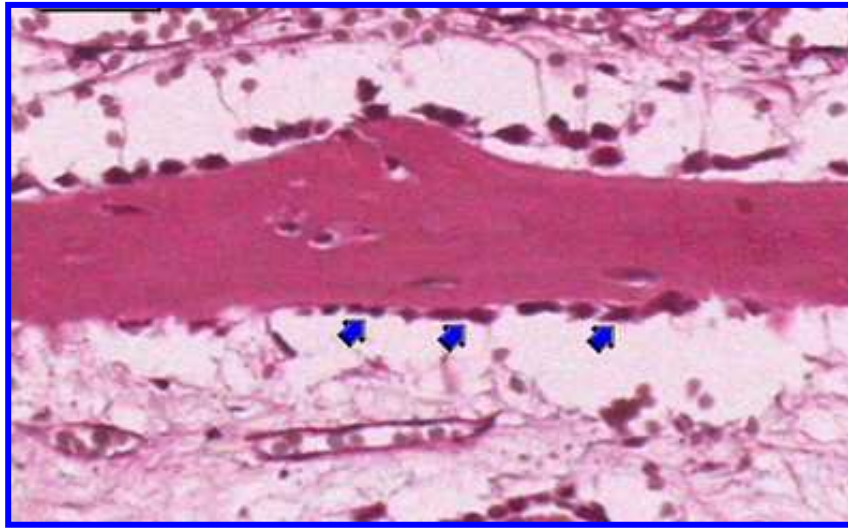


Fig.4: Bone lining cells.

Le cellule di rivestimento possiedono quindi un ruolo strategico fondamentale nella mediazione del trasporto di ioni minerali e di altre sostanze che devono essere veicolate verso la matrice o che provengono da essa ¹⁵.

Per quanto riguarda l'origine, allo stato delle conoscenze attuali, sono presenti ancora diverse interpretazioni. Sebbene la linea cellulare di appartenenza sia mesenchimale, circa la linea di discendenza esistono ancora alcuni lati non completamente conosciuti ^{15,16}. Le teorie più accreditate sostengono che le cellule di rivestimento originano da osteoblasti della lamina osteogenica che, durante la deposizione, non sono stati incorporati come osteociti e che a termine del processo depositivo subiscono modificazioni strutturali appiattendosi e trasformandosi in elementi di rivestimento ¹⁶. Le cellule di rivestimento presentano forma laminare; il nucleo, anch'esso appiattito, si dispone al centro della cellula e risulta essere ben evidente. A livello ultrastrutturale si osserva come l'intero apparato organulare appare estremamente ridotto. Diversi sistemi giunzionali garantiscono l'unione tra gli elementi contigui dello strato di rivestimento. La funzione svolta dalle cellule di rivestimento sono strettamente legate alla loro posizione strategica: tessuto osseo da una parte e compartimento vascolare dall'altra. Grazie ad una estesa rete di contatti intercellulari con gli osteociti in profondità e con le cellule stromali del connettivo peri-vascolare, contribuiscono alla costituzione di un imponente sincizio funzionale, partecipando alla gestione dei rapporti tra i due compartimenti, controllando i processi diffusivi e mediando gli scambi tra il liquido extracellulare del connettivo della cavità vascolari e il compartimento fluido osseo ¹⁷.

OSTEOCLASTI

Gli osteoclasti sono le cellule preposte al riassorbimento osseo. Come già accennato, essi non sono cellule autoctone del tessuto osseo, in quanto non appartengono alla linea che deriva dalle cellule osteoprogenitrici. I precursori degli osteoclasti, detti preosteoclasti, originano nel midollo osseo ematopoietico e sono apparentati con la linea differenziativa di una categoria di globuli bianchi, i monociti. I preosteoclasti vengono trasportati dal torrente circolatorio fino alle sedi in cui debbono avvenire processi di riassorbimento osseo; qui giunti, essi migrano nel tessuto osseo e si fondono insieme originando gli osteoclasti attivi, elementi sinciziali capaci di dissolvere la componente minerale e di digerire enzimaticamente le componenti organiche del tessuto osseo. Gli osteoclasti maturi sono cellule giganti (100-200 μm), plurinucleate in quanto originate dalla fusione dei singoli precursori mononucleati: in un singolo osteoclasto possono infatti essere presenti fino a 50 nuclei, con cromatina lassa e nucleolo ben evidente¹⁸. Il citoplasma è acidofilo. L'osteoclasto attivato è aderente alla matrice mineralizzata in via di riassorbimento ed è solitamente accolto in una cavità, detta lacuna di Howship, che si forma a seguito dell'azione erosiva della cellula sull'osso. Sul versante della cellula che si appone all'osso è visibile il cosiddetto orletto increspato, che appare come un'ispessimento della superficie cellulare con una sottile striatura disposta perpendicolarmente alla superficie stessa¹⁹. Con metodi istochimici, a livello dell'orletto increspato si può rivelare la presenza dell'enzima anidrasi carbonica e di pompe a protoni. Ai margini dell'orletto increspato vi è una porzione di citoplasma di aspetto astrutturato, detta zona chiara. Al microscopio elettronico, la zona dell'orletto increspato si rivela composta da un gran numero di sottili lamine citoplasmatiche, diverse tra loro per calibro e lunghezza, che ampliano grandemente l'estensione del plasmalemma. La zona chiara appare invece a superficie liscia ed è occupata da abbondanti strutture citoscheletriche, in particolare microfilamenti contrattili: immaginandola nelle tre dimensioni, la zona chiara costituisce una sorta di cercine periferico all'orletto increspato tramite la quale l'osteoclasto aderisce strettamente alla superficie dell'osso da riassorbire, delimitando l'ambiente extracellulare compreso tra la superficie dell'osso e l'orletto increspato, la cosiddetta zona sigillata; qui le sostanze liberate dall'osteoclasto possono agire sulla matrice ossea senza diffondersi all'intorno^{19,20}. Il citoplasma più prossimo all'orletto increspato prende il nome di zona delle vescicole chiare, a causa della presenza di numerose formazioni rotondeggianti apparentemente vuote delimitate da membrana, interpretabili come le porzioni più profonde degli spazi tra le lamine dell'orletto increspato. Prossimi alle vescicole chiare, sono presenti numerosi granuli elettrondensi interpretabili come lisosomi. Nel citoplasma dal lato opposto

all'osso sono presenti i nuclei, diplosomi multipli, apparati di Golgi e un buon numero di mitocondri e di cisterne di reticolo endoplasmico granulare. Il riassorbimento della matrice ossea inizia con la dissoluzione della componente minerale dovuta all'acidificazione del microambiente della zona sigillata. A questo livello l'anidrasi carbonica, sita sul versante ialoplasmatico del plasmalemma dell'orletto increspato, genera acido carbonico a partire da CO_2 e H_2O ; le pompe di membrana localizzate sul plasmalemma dell'orletto increspato trasportano attivamente protoni, derivati dalla dissociazione dell'acido carbonico e di altri acidi organici di origine metabolica (es. acido citrico, acido lattico), nell'ambiente extracellulare. L'abbassamento del pH che ne consegue porta alla dissoluzione dei cristalli di apatite. Nel contempo l'osteoclasto esocita il contenuto degli enzimi lisosomiali all'esterno: a basso pH le idrolasi lisosomiali si attivano e digeriscono i componenti organici della matrice ossea. L'azione erosiva dell'osteoclasto si manifesta con la formazione della lacuna di Howship. Una volta formata una prima lacuna, l'osteoclasto si distacca dalla matrice ossea, si muove per moto ameboide su una porzione di osso adiacente a quella appena riassorbita, aderisce nuovamente e forma una nuova lacuna (Fig 5)^{20,21}.

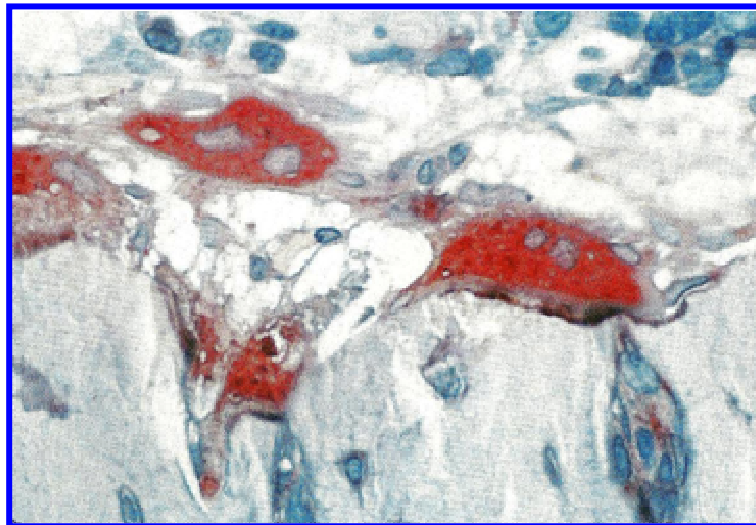


Fig. 5: Osteoclasta al microscopio ottico, si evidenziano i granuli positivi alla reazione istochimica della fosfatasi acida, intensamente colorati in rosso.

La funzione osteoclastica è finemente regolata da fattori ormonali e locali. In particolare, gli osteoclasti sono le uniche cellule dell'osso che possiedono i recettori per l'ormone calcitonina, prodotto dalle cellule parafollicolari (o cellule C) della tiroide, con azione antagonista al paratormone. La calcitonina è un inibitore del riassorbimento dell'osso, essendo capace di indurre il distacco degli osteoclasti dall'osso, la scomparsa dell'orletto increspato e la riduzione del metabolismo cellulare. Il recettore per la calcitonina è già espresso dai precursori circolanti degli osteoclasti, e la sua evidenziazione può essere un

valido metodo per la identificazione di queste cellule. Per contro, gli osteoclasti non esprimono il recettore per il paratormone, che non ha alcun effetto diretto su di essi. L'azione osteolitica del paratormone sembra esplicarsi per il tramite degli osteoblasti: questi, sotto stimolo dell'ormone, libererebbero fattori solubili detti OAF (Osteoclast Activating Factors), che agirebbero sugli osteoclasti attivandoli e promuovendo così il riassorbimento osseo. La natura chimica degli OAF non è nota: probabilmente alcuni di questi fanno parte della categoria delle BMP (Fig 6) (as es. la BMP-2 è un potente stimolatore del differenziamento osteoclastico in vitro)^{22,23}.

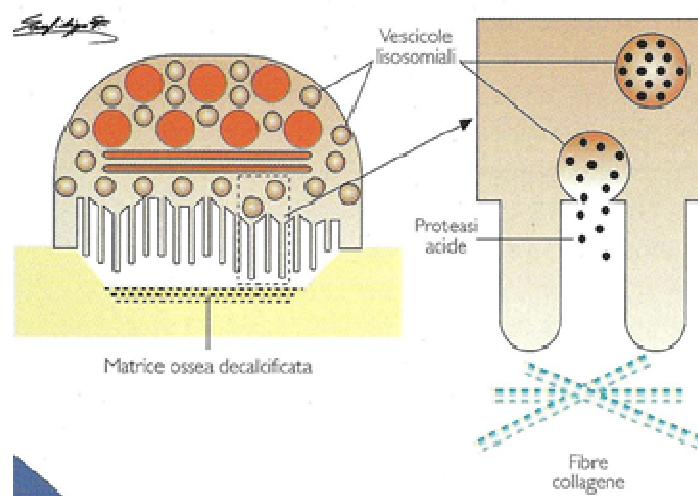


Fig. 6: Schema raffigurante la modalità di dissoluzione della componente organica dell'osso.

TIPI DI OSSIFICAZIONE

Il tessuto osseo, che è sempre l'espressione più evoluta dei tessuti connettivi, si forma per sostituzione di un tessuto di sostegno già preesistente²⁴. Si riconoscono due differenti processi ostogenetici: l'ossificazione intramembranosa e ossificazione endocondrale (Fig 7).

OSSIFICAZIONE INTRAMEMBRANOSA

Alcune ossa del cranio (frontale, parietale, parte della mandibola, etc) si formano per ossificazione membranosa e vengono perciò dette ossa membranose. Cellule mesenchimali differenziate, osteoprogenitrici, si addensano circondando i vasi sanguigni. Dopo la trasformazione ipertrofica delle cellule osteoprogenitrici compare una formazione sottile costituita da una matrice eosinofila più densa avente forma di tralci, equidistanti da i vasi sanguigni.

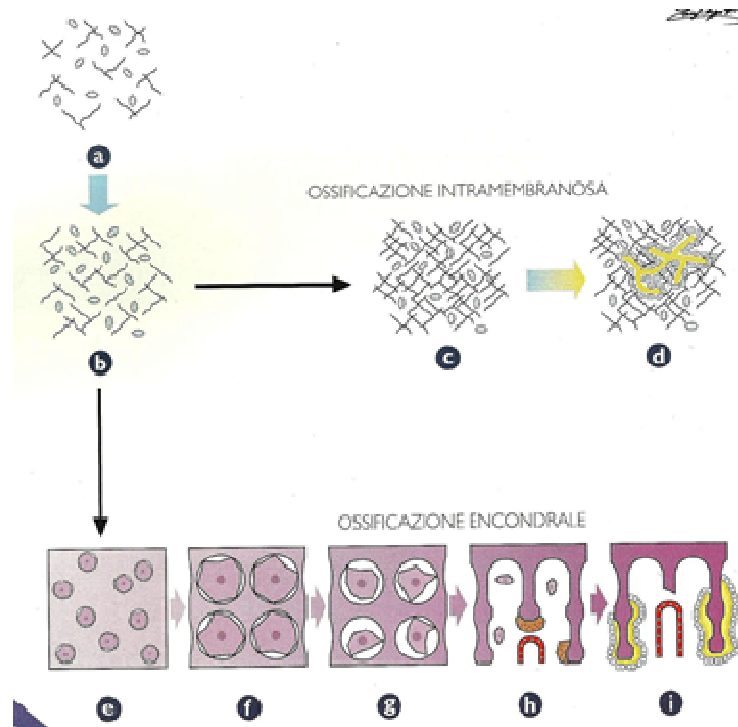


Fig. 7: Schema raffigurante le due tipologie di ossificazione; a) mesenchima, b) mesenchima addensato, c) abbozzo di tessuto fibroso, d) osteogenesi, e) abbozzo di cartilagine ialina, f) cartilagine ipertrofica, g) cartilagine calcificata, h) condrolisi, i) osteogenesi.

Nel frattempo, le cellule osteogeniche aumentano il loro volume, disponendosi sulla superficie di questa formazione; per divenire intensamente basofile assumendo una polarizzazione del nucleo, identificandosi come osteoblasti. Questi, iniziano a secernere del tropo collagene, che aggregandosi iniziano a formare la componente fibrillare della matrice. Nella neo formata matrice preossea, detta osteoide, compaiono i primi cristalli di sali di calcio, associati a vescicole denominate “matrix vesicles”, che promuovono la mineralizzazione dell’osso. Il seguente accrescimento porta alla formazione di trabecole ossee calcificate disposte a formare una rete intrecciata di maglie tra i vasi sanguigni. Tali trabecole sono progressivamente ispessite a spese del connettivo e dei vasi sanguigni circostanti (a seconda della sede anatomica). A questo punto il connettivo che circonda esternamente il segmento osseo in accrescimento, si condensa per formare il periostio (Fig 8) ^{24,25}.

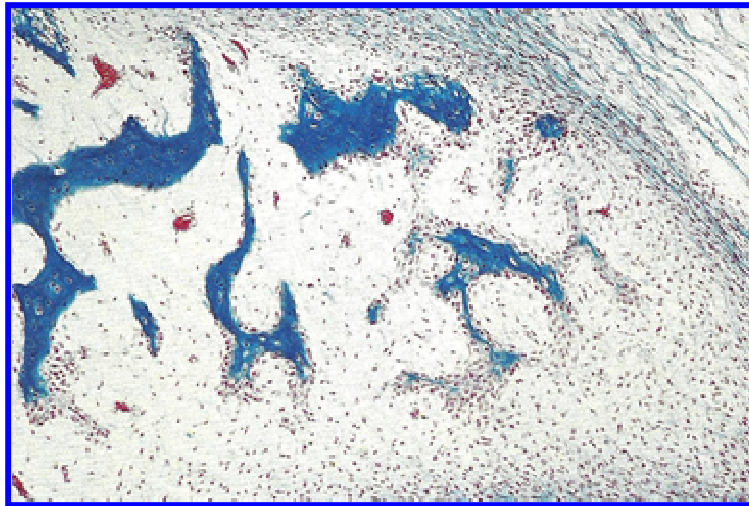


Fig. 8: Ossificazione intramembranosa, fase iniziale di deposizione trasecolare (mascellare di feto)

OSSIFICAZIONE ENDOCONDRALE

Le ossa della base cranica, delle vertebre, del bacino e degli arti sono denominate ossa di sostituzione, perché in un primo tempo sono costituite da cartilagine ialina, che viene successivamente sostituita da tessuto osseo. I segmenti scheletrici dove meglio apprezzare questo processo di ossificazione sono le ossa lunghe degli arti. Nell'abbozzo cartilagineo, che ricalca la forma e le dimensioni delle ossa lunghe in formazione, i condrociti subiscono dei cambiamenti cellulari importanti che porta, in fasi successive, alla formazione del centro di ossificazione primario. I condrociti, situati nell'abbozzo centrale cartilagineo, diventano ipertrofici, arricchendosi di glicogeno. Le lacune in cui sono contenuti i condrociti si ingrandiscono a spese della circostante matrice cartilaginea, la quale si riduce a sottili setti e/o a specole irregolari. La matrice ialina della cartilagine, che circonda i condrociti ipertrofici, si calcifica per mezzo di una deposizione di cristalli di fosfato di calcio proveniente sotto forma di ioni, dal plasma sanguigno e dal liquido interstiziale del tessuto cartilagineo stesso. I condrociti ipertrofici, a questo punto, vanno incontro a modificazioni regressive (ingrossamento del nucleo e perdita della cromatina) morendo, mentre la matrice extracellulare si mineralizza. Contemporaneamente alla degenerazione dei condrociti, si attivano le cellule con potenzialità osteogenica del connettivo pericondrale, trasformandosi in osteoblasti, i quali depositano un primo strato di tessuto osseo denominato manicotto o collare periostale. Al tempo stesso dal connettivo periostale che circonda tale collare, grazie ad attività macrofagica, vengono prodotte delle aperture del manicotto che consentono un accrescimento vascolare all'interno dell'osso. L'attività macrofagica si estende all'interno della matrice cartilaginea calcificata, sino a trasformare l'abbozzo scheletrico in una cavità. All'interno di tale cavità, i vasi sanguigni si dirigono verso le epifisi delle ossa lunghe, formando delle anse vascolari che raggiungono le pareti della cavità stessa; quest'ultime

delimitate internamente da cartilagine calcificata che si continua con cartilagine ialina ed esternamente è rivestita di osso. Successivamente nelle due epifisi delle ossa lunghe compaiono successivamente uno o più centri di ossificazioni secondari. Le cellule mesenchimali indifferenziate all'interno del tessuto connettivo periva scolare che si accompagnano a i vasi sanguigni si possono differenziare o in elementi emopoietici del midollo o, giunte a contatto della cartilagine calcificata, in osteoblasti. Questi ultimi si radunano a formare uno strato simil-epiteliale, a ridosso della superficie della matrice cartilaginea, depositando su di essa matrice ossea. Le prime trabecole che si formano nei centri di ossificazione endocondrale sono costituite da una parte centrale di cartilagine calcificata rivestita da osso²⁴⁻²⁷ (Fig 9).

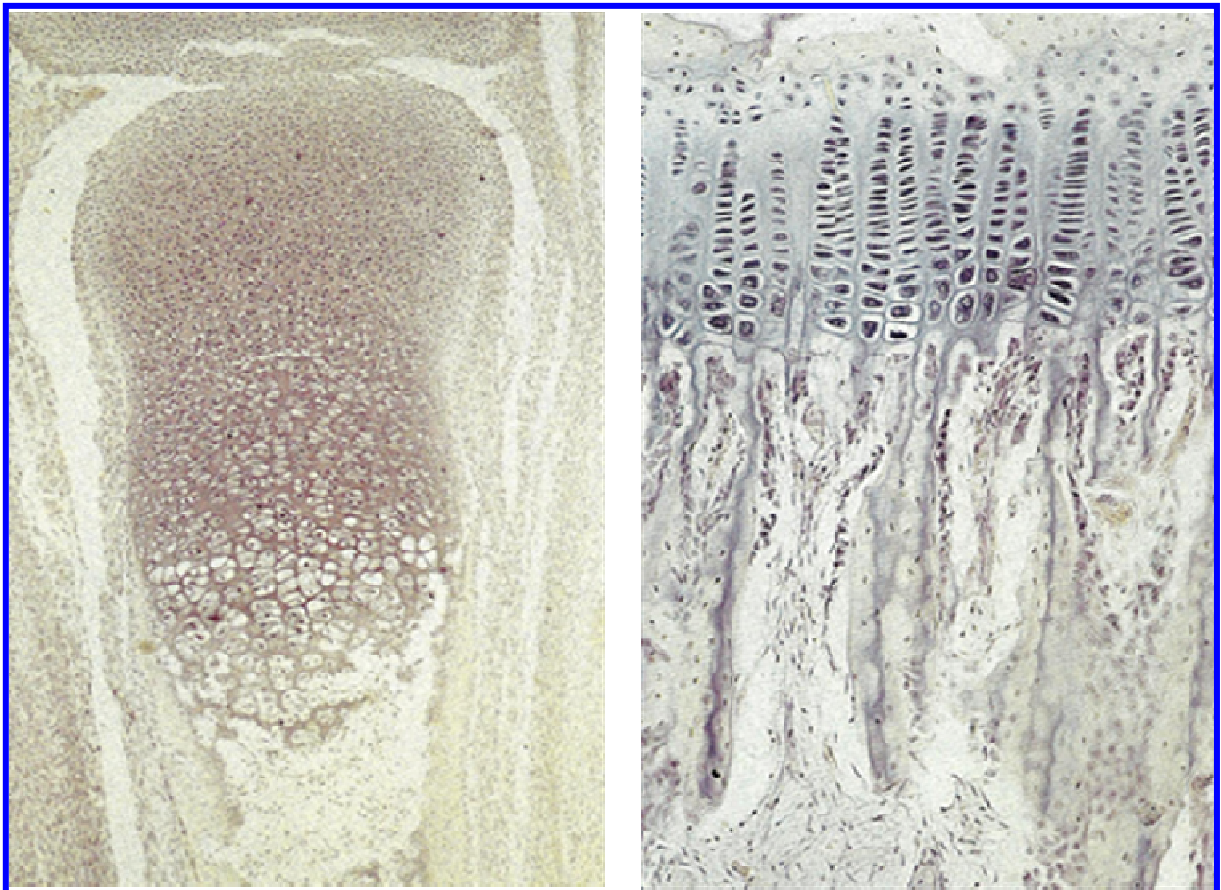


Fig. 9: Ossificazione endocondrale, l'immagine evidenzia l'ipertrofia dei condrociti che si dispongono in maniera ordinata in colonne.

ARCHITETTURA DELL'OSSO

Il tessuto osseo si organizza, nei vari segmenti scheletrici, in architetture più o meno diverse, e capaci di far fronte a esigenze di ordine meccanico diverse.

Si può classificare da un punto di vista macroscopico il tessuto osseo in due categorie: ad architettura compatta ed ad architettura spongiosa.

La prima architettura a formarsi durante l'organogenesi delle ossa è quella spongiosa ¹³. Durante la formazione dei segmenti scheletrici, trabecole ossee vengono formate attorno alle strutture vascolari nell'ossificazione intramembranosa, o deposta su frammenti cartilagine calcificata nell'ossificazione endocondrale. Solo in un secondo tempo si ha la formazione dell'architettura compatta, per successiva osteodeposizione e conseguente riduzione degli spazi vascolari.

Nell'uomo adulto le ossa dello scheletro sono complessivamente costituite per l'80% da architettura compatta e per il 20% da architettura spongiosa ⁹.

ARCHITETTURA SPONGIOSA

L'architettura spongiosa risulta formata da strutture laminari o tubolari, dette trabecole ossee. Queste organizzazioni strutturali si trovano nelle estremità o epifisi delle ossa lunghe; tra due tavolati di osso compatto nelle ossa piatte e nelle ossa brevi. Le trabecole ossee, in genere, sono disposte lungo le traiettorie di sollecitazioni dovute al peso del carico corporeo e all'azione muscolare ²⁸. Le trabecole ossee assumono una disposizione che spesso può ricordare un insieme di archi gotici, in grado di resistere a grandi sollecitazioni (Fig 10).

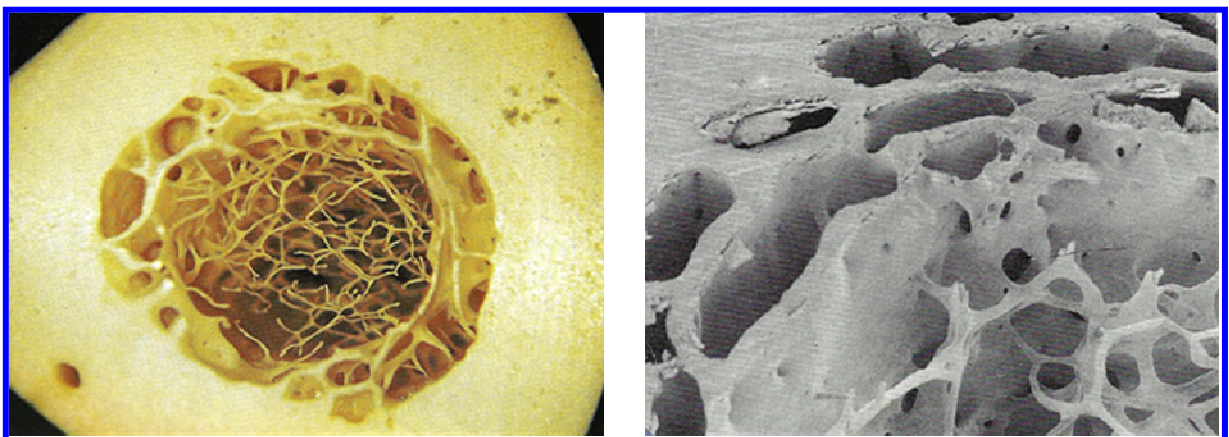


Fig. 10: L'immagine microscopica a basso ingrandimento evidenzia il centro della diafisi di femore con presenza di compatta ben rappresentata e struttura trabecolare all'interno. L'immagine al SEM evidenzia struttura trabecolare a ridosso della corticale.

Le trabecole, possono assumere due tipi di forme asseconda di dove sono posizionate, e sono distinte in due ordini bene precisi: trabecole di primo ordine o tubolari e trabecole di secondo ordine o laminari ²⁹.

Gli autori hanno osservato che le trabecole di primo ordine sono presenti in prossimità delle ossa compatte ed hanno andamento circolare e delimitano spazi midollari di forma cilindroide; mentre le trabecole di secondo ordine sono formazioni esigue, site in profondità, e delimitano spazi midollari più ampi in continuità con il canale midollare centrale. Questa tipica organizzazione dell'architettura delle ossa spongiose, consente una struttura resistente e nel contempo suscettibile a modifiche, agevolate da tessuto midollare ricco di vasi.

ARCHITETTURA COMPATTA

L'architettura compatta si presenta formata da un tessuto osseo di aspetto addensato e apparentemente privo di cavità. Nei segmenti scheletrici dell'adulto questa architettura costituisce, con osso lamellare secondario, la struttura portante o corpo diafisario delle ossa lunghe, i due tavolati ossei che racchiudono l'osso spongioso delle ossa piatte e lo strato superficiale delle ossa brevi e dell'epifisi. Nell'architettura compatta l'osso lamellare è costituito dalla presenza di lamelle aggregate a formare particolari sistemi lamellari ^{17,18}.

- Sistemi circonfenziali esterni o sistemi periostali
- Sistemi haversiani od osteoni
- Sistemi circonfenziali interni o sistemi endostali

I sistemi circoferenziali sono costituiti da un certo numero di lamelle ordinate in più strati paralleli concentrici rispettivamente alla superficie esterna, subito al di sotto del periosteo a formare la parte periferica dell'osso (Fig. 11), e in strati paralleli concentrici attorno al canale midollare, a delimitare i sistemi haversiani.

La disposizione dei sistemi lamellari segue l'andamento delle sollecitazioni, in particolar modo nelle ossa lunghe disposte verticalmente secondo l'asse gravitazionale.

L'osso compatto è percorso da canali contenenti vasi sanguigni che hanno un decorso longitudinale nei canali di Havers, o decorso trasversale nei canali di Volkmann; questi ultimi di provenienza periostale o endostale, si anastomizzano con quelli longitudinali (Fig 12,13 e 14).

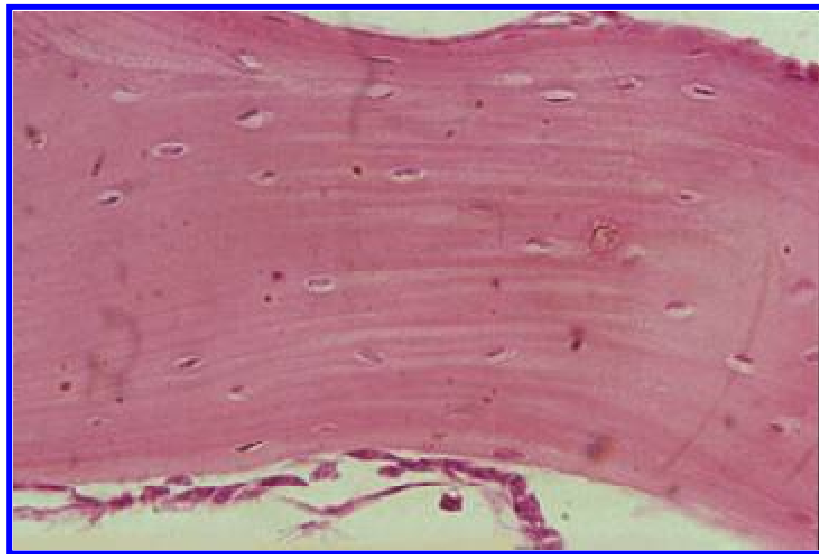


Fig 11: Tessuto osseo lamellare semplice, caratterizzato da lamelle ossee sovrapposte a decorso parallelo

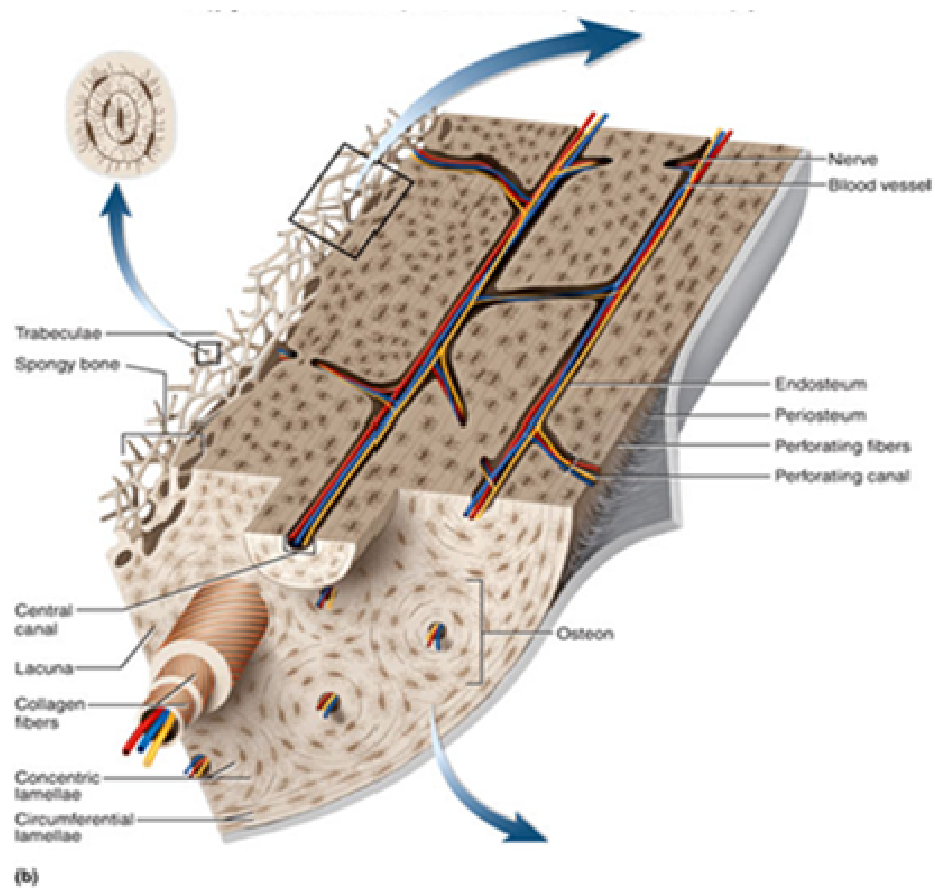


Fig.12: Rappresentazione schematica dello sviluppo tridimensionale della struttura degli osteoni

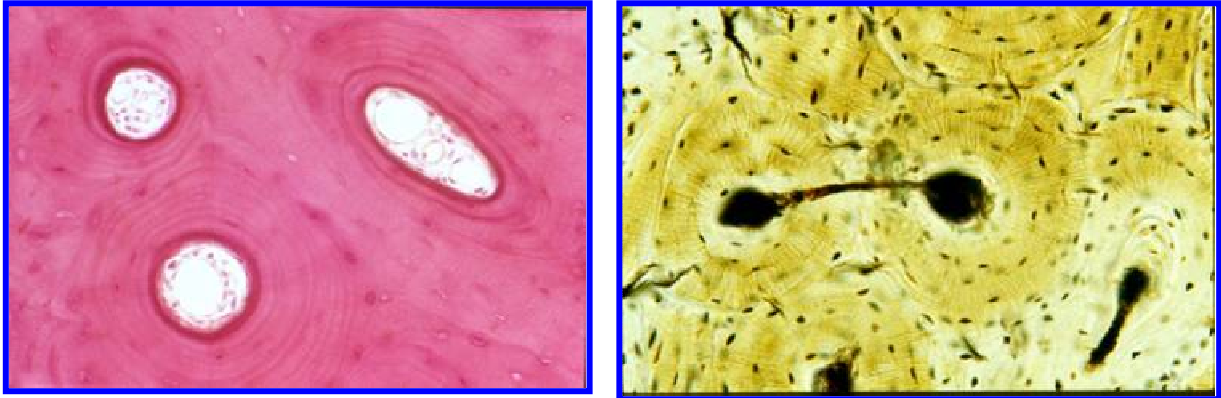


Fig.13 (dx): Tessuto osseo lamellare osteonico: le lamelle ossee sono disposte concentricamente ad un canale vascolare centrale (canale di Havers) a formare gli osteoni. Tra osteoni contigui sono evidenti le lamelle della breccia ossea

Fig.14 (sx): Tessuto osseo preparato per usura. Si apprezzano le microcavità scavate nel contesto del tessuto - canali vascolari di Havers e di Volkmann, lacune ossee e canalicoli ossei - che appaiono nere sullo sfondo chiaro della matrice ossea mineralizzata

SUPPORTO VASCOLARE

La rete vascolare delle ossa è organizzata in modo tale da fornire un adeguato apporto trofico a tutti gli elementi cellulari del tessuto osseo. Le differenze sostanziali nella modalità di vascolarizzazione non risiedono nei diversi tipi morfologici dei segmenti scheletrici, bensì nella specifica tipologia architettonica.

In un segmento di osso compatto e di osso spongioso, si possono riconoscere schematicamente tre reti capillari localizzati:

- Nel periostio
- Nelle cavità vascolari della compatta
- Nel midollo osseo

La rete di capillari periostali è alimentata dalle arterie periostali che drena nelle vene periostali. Si ritiene che questa rete capillare serve solo a provvedere alla vascolarizzazione del terzo più esterno dell'osso. La parte più consistente della vascolarizzazione dell'osso compatto, cioè più dei due terzi, viene garantita dall'arterie perforanti.

Questi grossi vasi dopo aver transitato nella porzione più esterna del periosteo, piegano ortogonalmente perforando sia il periosteo sia la corticale, attraverso dei canali.

I rami midollari mettono capo ad una fitta rete di capillari sinusoidali, che a sua volta provvede al sostentamento trofico sia del midollo osseo sia degli osteociti contenuti nella compagine ossea. La maggior parte della vascolarizzazione dell'osso avviene quindi, con un andamento centrifugo, dall'endostio verso il periosteo, e il drenaggio venoso avviene mediante vasi venosi periostali³⁰.