

GUARIGIONE DEGLI INNESTI OSSEI LIBERI

Il processo di guarigione degli innesti ossei liberi presenta similitudini ai processi riparativi e di guarigione delle fratture ossee, mentre si differenzia da queste per la presenza da un lato di un sito ricevente e dall'altro di tessuto osseo trapiantato avascolare. I meccanismi biologici della riparazione sono comunque indipendenti dai segmenti ossei coinvolti, e la sequenza cronologica degli eventi appare comune e controllata da meccanismi a cascata, fattori locali e sistemici e bioumorali.

Il processo di guarigione degli innesti di osso è diviso in due fasi: una fase precoce ed una fase tardiva.

La fase precoce, la quale avviene nelle prime 4 settimane, è caratterizzata da:

- Emostasi e danno anossico
- Infiammazione ed induzione cellulare
- Rimozione dei tessuti necrotici
- Proliferazione cellulare (blastema fibrocellulare)
- Osteogenesi e rimodellamento

La fase tardiva, rappresenta il proseguo del processo di guarigione, dove il processo di rimodellamento e di riassorbimento continua con la crescita di nuovi vasi. La fine di tale fase è rappresentata dalla completa sostituzione dell'innesto con osso neo-formato, che avviene in circa 6 mesi dall'innesto.¹⁴⁸

EMOSTASI E DANNO ANOSSICO (PRIME ORE)

Il posizionamento chirurgico dell'innesto, a seguito di uno scollamento di un lembo muco-periostale, porta ad uno stravasamento emorragico che vengono obliterati dalla formazione di un ematoma. L'interruzione della circolazione e il ristagno ematico, portano ad una diminuzione locale della pO_2 , accompagnata da un aumento della pCO_2 ed un abbassamento del pH, producendo un danno anossico nei tessuti circostanti.¹⁴⁸⁻¹⁴⁹

INFIAMMAZIONE ED INDUZIONE CELLULARE (DALLE PRIME ORE PER I SUCCESSIVI 2-4 GIORNI)

Inseguito alla formazione dell'ematoma si innesca la reazione flogistica (prima fase della riparazione). La vasodilatazione che ne consegue, consente l'ingresso nel focolaio infiammatorio di elementi cellulari maturi e di differente derivazione. Questi

ultimi, sotto l'azione di stimoli umorali e biomeccanici, si differenziano in popolazioni di diverso significato funzionale, responsabili delle fasi successive dei processi riparativi.

La reazione infiammatoria conduce, quindi, all'invasione cellulare dell'ematoma e dei tessuti circostanti; a questo punto numerose biomolecole regolatrici e morfologiche vengono prodotte e liberate durante questa fase, stimolando così l'induzione cellulare (Fig 53).^{148,149}

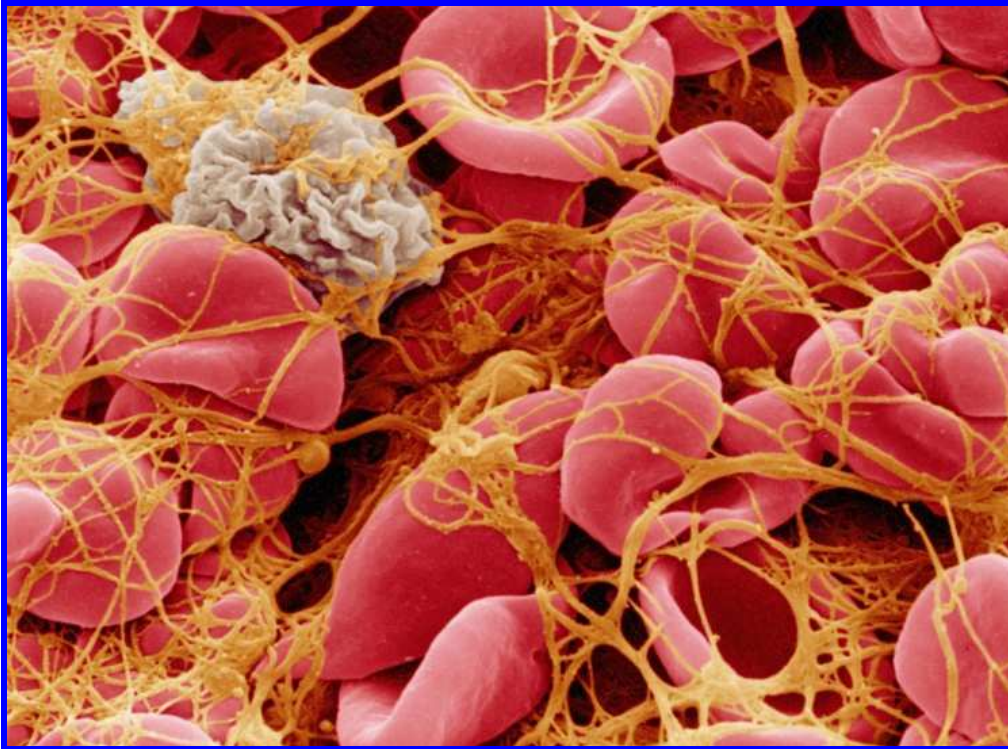


Fig. 53: Immagine di coagulo ematico che mostra un ammasso cellulare composto da globuli rossi imbrigliato dalla fibrina

RIMOZIONE DELL'EMATOMA E DEI TESSUTI NECROTICI

Una volta arrestata l'emorragia, il coagulo stabilizzato viene progressivamente dissolto grazie all'azione fibrinolitica. Alla fibrinolisi si accompagna anche la degradazione dei tessuti necrotici, con la mobilitazione di numerosi elementi cellulari della serie bianca. In particolare tra queste cellule i linfociti giocano un ruolo molto importante per l'attivazione delle altre cellule che popolano la regione dell'ematoma. Granulociti ad attività macrofagica, sotto lo stimolo di linfocine e di interleuchine presidiano la rimozione dei detriti cellulari e del coagulo. Linfocine specifiche, quali il fattore di fusione dei macrofagi e quello attivante gli osteoclasti inducono a dei precursori degli osteoclasti a costituire degli aggregati sinciziali che agendo su

frammenti lesionati producono il riassorbimento delle porzioni ossee necrotiche (Fig 54).^{148,149}

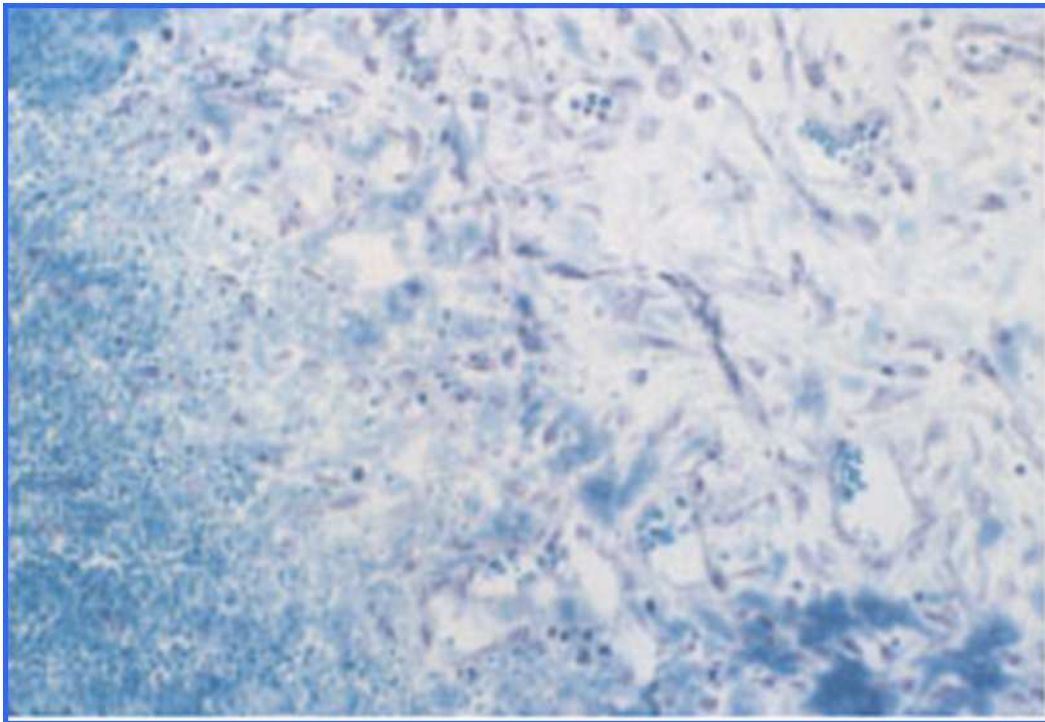


Fig. 54: Porzione di ematoma in una frattura sperimentale al microscopio ottico; rimozione di cellule e materiale interstiziale per opera dei macrofagi¹⁴⁹.

BLASTEMA FIBROCELLULARE

Gettoni cordonali endoteliali, in origine dai vasi che circondano l'area della lesione, proliferano in modo continuo durante la rimozione del coagulo. Infatti, si viene a formare una rete vascolare altamente anastomizzata, che in breve termine tempo ristabilisce la circolazione ematica all'interno della regione lesionata. La neoangiogenesi e il conseguente ripristino dei valori locali normali di pO_2 , di pOC_2 e di pH costituiscono la premessa fondamentale per l'inizio dei processi rigenerativi. Attorno alle anse dei capillari neoformati comincia a svilupparsi una nuova popolazione cellulare, formata da elementi mesenchimali di tipo fibroblastico. Queste cellule sono circondate da sostanza intercellulare nella quale sono presenti fibre collagene che costituiscono una delicata trama di sostegno. In breve si costituisce un tessuto connettivo lasso avente molteplici possibilità rigenerative, che viene propriamente definito blastema fibrocellulare. Durante la fase di invasione e di induzione, oltre a i numerosi elementi emopoietici, nell'area della lesione vengono riversate anche cellule mesenchimali di tipo fibroblastico; queste potenzialmente, possono seguire linee differenziative diverse nell'ambito dei tessuti di origine mesenchimale come fibroblasti,

condroblasti o osteoblasti. L'orientamento fenotipico di tali elementi è diretto dall'azione di fattori morfogenetici e delle condizioni meccaniche locali, alcuni dei quali hanno una azione specifica sulla proliferazione del substrato mesenchimale, altri invece sembrano indirizzare il destino degli elementi mesenchimali verso il fenotipo osteoblastico (Fig 55).^{148,149}

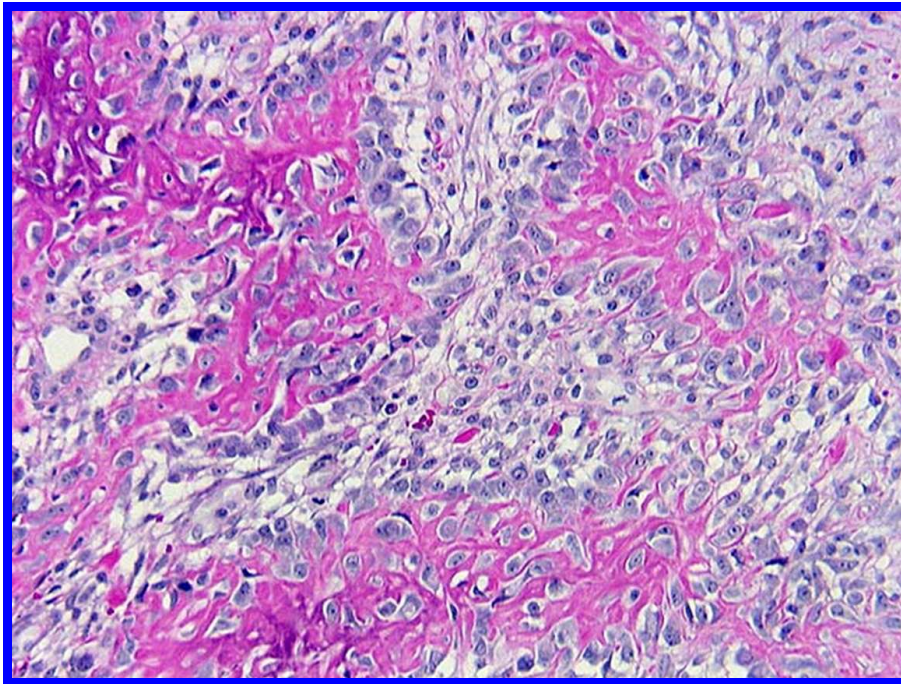


Fig. 55: Blastema fibrocellulare in una frattura sperimentale al microscopio ottico; elementi cellulari di tipo fibroblastico uniti a formare un connettivo di tipo lasso e iniziale deposizione di materiale osteoide.

OSTEOGENESI E RIMODELLAMENTO

L'osso neodeposto ha una struttura piuttosto primitiva, ma i processi neoangiogenesi, rigenerazione e consolidamento hanno ricostituito nel segmento lesionato le condizioni metaboliche e strutturali sufficienti a far fronte alle sollecitazioni meccaniche a cui il segmento è sottoposto. Questo adattamento permette l'organizzazione traiettoriale dell'attività di modellamento e rimodellamento che si verificano successivamente. Alla quarta settimana dall'evento traumatico (Fig. 56), l'osteogenesi rigenerativa ha raggiunto l'acme della sua attività cominciando a perdere inerzia; al contrario l'attività cellulare viceversa è aumentata in correlazione all'adattamento della struttura. I fattori meccanici assumono una grande importanza, condizionando sia la fase di orientamento del segmento lesionato, sia la fase successiva strutturale di modellamento e rimodellamento.^{150,151}

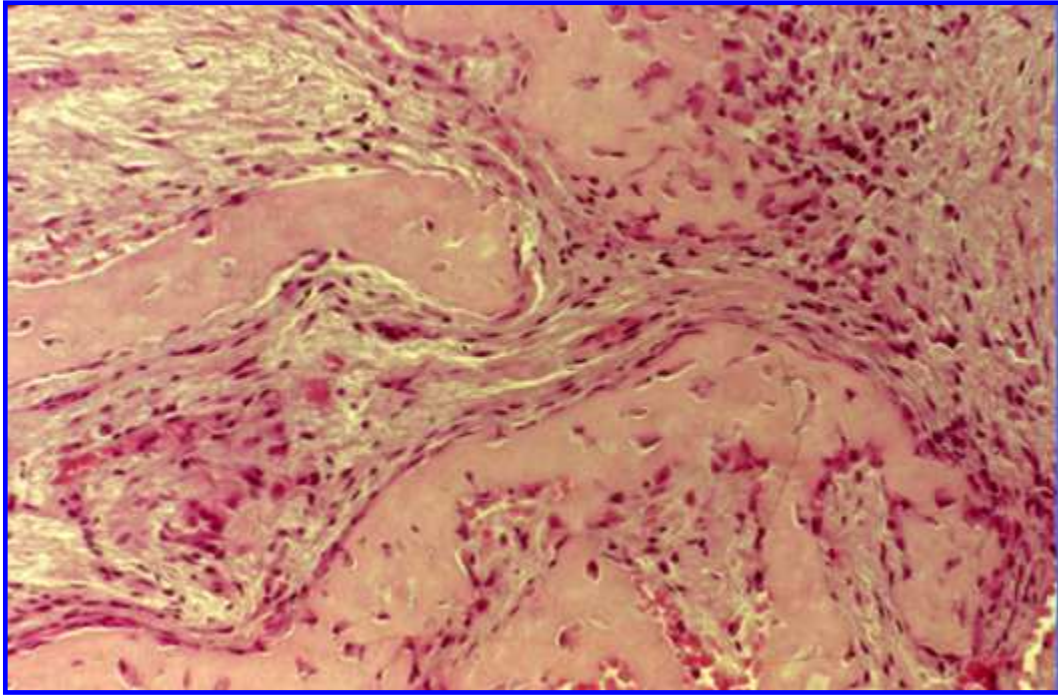


Fig. 56: Osteogenesi e rimodellamento osseo (ematossilina -eosina). (Acocella –Colafranceschi, Università degli Studi di Firenze)

ASPETTI MOLECOLARI DELLA GUARIGIONE DELLE FRATTURE

Le molecole coinvolte nel processo di guarigione delle fratture, possono essere classificati in tre gruppi¹⁵²:

- *le citochine pro-infiammatorie,*
- *il fattore di crescita trasformante-beta (TGF- β) e fattori di crescita appartenete a tale superfamiglia,*
- *fattori angiogenici*

Le citochine pro-infiammatorie, come l'interleuchina-1 (IL-1) e l'interleuchina-6 (IL-6), nonché il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- α) svolgono un ruolo importante nel promuovere la riparazione per mezzo di attivazione a cascata¹⁵³.

Essi sono secreti non solo dai macrofagi e dalle cellule infiammatorie, ma anche da cellule di origine mesenchimali presenti nel periostio, svolgendo funzioni importanti nell'induzione di risposte a valle della lesione. Infatti, avendo un'azione di tipo chemiotattica su altre cellule infiammatorie, migliorando la sintesi della matrice extracellulare, stimolando l'angiogenesi, e il reclutamento di cellule endogene fibrogeniche nel sito coinvolto nella frattura. (Tab. III, IV, V)¹⁵¹⁻¹⁵⁴

Il picco di concentrazione massima di tali molecole (IL-1, IL-6, TNF- α) è entro le prime 24 ore dopo la frattura aumentando di nuovo durante il rimodellamento osseo. Le

citochine regolano anche la formazione delle ossa e il rimodellamento endocondrale. Il TNF- α promuove il reclutamento di cellule staminali mesenchimali, induce l'apoptosi di condrociti ipertrofici durante ossificazione endocondrale e stimolando la funzione osteoclastica.

Assenza di TNF- α determina un ritardo nel riassorbimento della cartilagine mineralizzata impedendo così la neoformazione ossea.¹⁵³⁻¹⁵⁵

FATTORI DI CRESCITA E DIFFERENZIAZIONE

I fattori di crescita e di differenziamenti più importanti, nei processi riparativi delle fratture, sono rappresentati dalla superfamiglia dei fattori di crescita trasformante-beta (TGF- β) Tabella 3. La superfamiglia TGF- β è una grande famiglia di fattori di crescita e di differenziazione a cui appartengono anche le proteine morfogenetiche ossee (BMP). Almeno 34 membri sono stati identificati nel genoma umano. Provengono da precursori alto peso molecolare e sono attivati da enzimi proteolitici. Essi agiscono su i recettori di membrana serina / treonina chinasi delle cellule bersaglio¹⁵⁶⁻¹⁵⁸.

Componenti specifiche di questa superfamiglia compresa proteine morfogenetiche ossee (BMP 1-8), i fattori di crescita (GDF-1, 5, 8, 10) e il fattore trasformante beta (TGF- β 1, β 2, β 3), promuovono varie fasi dell'ossificazione intramembranosa e del processo di guarigione ossa durante la frattura¹⁵⁹.

Essential molecules during fracture healing

Cytokines (IL-1, IL-6, TNF- α)

Source: macrophages and other inflammatory cells, cells of mesenchymal origin

Chemotactic effect on other inflammatory cells, stimulation of extracellular matrix synthesis, angiogenesis, recruitment of endogenous fibrogenic cells to the injury site, and at later stages bone resorption

Increased levels from days 1 to 3 and during bone remodelling

TGF- β

Source: degranulating platelets, inflammatory cells, endothelium, extracellular matrix, chondrocytes, osteoblasts

Targeted cells: MSCs, osteoprogenitors cells, osteoblasts, chondrocytes

Potent mitogenic and chemotactic for bone forming cells, chemotactic for macrophages

Expressed from very early stages throughout fracture healing

PDGF

Source: degranulating platelets, macrophages, monocytes (during the granulation stage) and endothelial cells, osteoblasts (at later stages)

Targeted cells: mesenchymal and inflammatory cells, osteoblasts

Mitogenic for mesenchymal cells and osteoblasts, chemotactic for inflammatory and mesenchymal cells

Released at very early stages of fracture healing

BMPs

Source: osteoprogenitors and mesenchymal cells, osteoblasts, bone extracellular matrix and chondrocytes

Targeted cells: mesenchymal and osteoprogenitor cells, osteoblasts

Differentiation of undifferentiated mesenchymal cells into chondrocytes and osteoblasts and osteoprogenitors into osteoblasts

Various temporal expression patterns

FGFs

Source: monocytes, macrophages, mesenchymal cells, osteoblasts, chondrocytes

Targeted cells: mesenchymal and epithelial cells, osteoblasts and chondrocytes

Angiogenic and mitogenic for mesenchymal and epithelial cells, osteoblasts, chondrocytes

a-FGF mainly effects chondrocyte proliferation, b-FGF (more potent) involved in chondrocytes maturation and bone resorption

Expressed from the early stages until osteoblasts formation

IGFs

Source: bone matrix, endothelial and mesenchymal cells (in granulation stage) and osteoblasts and non-hyperthrophic chondrocytes (in bone and cartilage formation)

Targeted cells: MSCs, endothelial cells, osteoblasts, chondrocytes

IGF-I: mesenchymal and osteoprogenitor cells recruitment and proliferation, expressed throughout fracture healing

IGF-II: cell proliferation and protein synthesis during endochondral ossification

Metalloproteinases

Source: the extracellular matrix

Degradation of the cartilage and bone allowing the invasion of blood vessels during the final stages of endochondral ossification and bone remodelling

VEGFs

Potent stimulators of endothelial cell proliferation

Expressed during endochondral formation and bone formation

Angiopoietin (1 and 2)

Formation of larger vessel structures, development of co-lateral branches from existing vessels

Expressed from the early stages throughout fracture healing

Tabella III: Fattori di crescita e loro funzione durante la guarigione ossea

Time	Event	Molecular signal
Day 1	Haematoma formation, inflammation Recruitment of mesenchymal cells Osteogenic differentiation of MSCs from bone marrow	Cytokines: IL-1, IL-6, TNF- α released by inflammatory cells PDGF, TGF- β released from degranulating platelets BMP-2 expression and restricted to day 1 expression of GDF-8
Day 3	MSCs proliferation begins Proliferation and differentiation of preosteoblasts and osteoblasts in regions of intramembranous ossification Angiogenesis begins	Decline of cytokines levels Expression of TGF- β 2, - β 3, GDF-10, BMP-5, -6 Angiopoietin-1 is induced
Day 7	Peak of cell proliferation in intramembranous ossification between days 7 and 10, Chondrogenesis and endochondral ossification begins (days 9–14 maturation of chondrocytes)	Peak of TGF- β 2 and - β 3 expression Expression of GDF-5 and probably GDF-1
Day 14	Cessation of cell proliferation in intramembranous ossification, but osteoblastic activity continues Mineralization of the soft callus, cartilage resorption, and woven bone formation Phase of most active osteogenesis until day 21	Decreased levels of expression for TGF- β 2, GDF-5, and probably GDF-1 Expression of BMP-3, -4, -7, and -8 VEGFs expression Second increase of IL-1 and TNF- α which continues during bone remodelling
Day 21	Woven bone remodelled and subsequently replaced by lamellar bone	Decreased expression of TGF- β 1 and TGF- β 3, GDF-10, and BMPs (2–8)

Tabella IV: Distribuzione temporale della produzione dei fattori di crescita e loro funzioni.

PROTEINE MORFOGENETICHE OSSEE

I membri della famiglia BMP sono divisi in almeno quattro sottogruppi distinti a seconda della loro sequenza aminoacidica primaria.

Il primo gruppo è costituito dalle proteine morfogenetiche BMP-2 BMP-4, e il secondo gruppo comprende le proteine morfogenetiche BMP-5, -6 e -7. Il terzo gruppo comprende GDF-5 (o BMP-14), GDF-6 (o BMP-13) e GDF-7 (o BMP-12); e infine, il quarto gruppo include BMP-3 (o osteogenina) e GDF-10 (o BMP-3b)¹⁶⁰.

La proteina morfogenetica BMP-1 non è un membro della superfamiglia TGF- β , ma ha un ruolo importante nel modulare le azioni delle altre BMP dalla proteolisi degli antagonisti BMP.⁶³ Le BMP si legano al recettore tipo II della serina / treonina chinasi che successivamente attiva la cascata di segnali intracellulari Smad, regolando la trascrizione dei geni bersaglio nel nucleo¹⁵⁶.

Le BMP svolgono un ruolo critico nella regolazione della crescita e differenziazione nonché l'apoptosi di vari tipi di cellule, tra cui osteoblasti, condroblasti, le cellule neuronali, e cellule epiteliali. Inoltre, è stato dimostrato che eterodimeri BMP, come BMP-4/-7 e BMP-2/-7 hanno una maggiore attività osteoinduttiva che regolano in modo più efficiente differenziazione e la proliferazione delle cellule mesenchimali in osteoblasti in vitro e in vivo^{160,161}.

Studi sul ruolo delle BMP nella guarigione della frattura nel ratto hanno mostrato una varietà di effetti osteogenici, espressioni temporali, e capacità mitogena¹⁵⁹⁻¹⁶². In una analisi generale delle attività osteogenico di 14 tipi di BMPS, Cheng et al.¹⁶³ hanno suggerito un modello gerarchico osteogenico di BMPS. Le BMP-2, -6 e -9 possono essere il più potente fattore di differenziamento che induce le cellule progenitrici mesenchimali a differenziarsi in osteoblasti. Inoltre le BMP possono anche stimolare la sintesi e la secrezione di altre ossa e fattori di crescita angiogenetici come il fattore di crescita insulino-simile (IGF) e rispettivamente anche il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF). Esse possono anche stimolare la formazione di osso da azionare direttamente le cellule endoteliali a stimolare angiogenesis^{163,164}.

IL FATTORE DI CRESCITA DERIVATO DALLE PIASTRINE (PDGF)

Il PDGF è un polipeptide omo- o eterodimerico composto da due catene A e B. L'effetto PDGF viene esercitata attraverso i recettori che hanno l'attività tirosin-chinasi. Le IL-1, TNF-alfa, TGF- β 1 e influenzare il legame del PDGF. Il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF) è sintetizzato da piastrine, monociti, macrofagi, cellule

endoteliali e osteoblasti, ed ha una potente azione mitogena per le cellule di origine mesenchimale. Il PDGF viene rilasciato dalle piastrine durante le prime fasi della guarigione della frattura, ed è ha una potente azione chemiotattica per le cellule infiammatorie oltre ad avere uno stimolo proliferativo per le cellule staminali mesenchimali e per gli osteoblasti. Tuttavia, attualmente, il suo potenziale terapeutico rimane poco chiaro^{165,166}.

FATTORE DI CRESCITA FIBROBLASTICO (FGF)

La famiglia di FGFs si compone di nove polipeptidi strutturalmente simili. La loro azione è mediata dal legame sui recettori della tirosin-chinasi. Durante la guarigione ossea, FGFs sono sintetizzati dai monociti, macrofagi, cellule mesenchimali, osteoblasti e condrociti. La loro azione è quella di promuovere la crescita e la differenziazione di diverse cellule come fibroblasti, miociti, osteoblasti, e condrociti.

Il fattore di crescita fibroblastico ha un ruolo fondamentale durante le fasi iniziali della guarigione della frattura promuovendo la neoangiogenesi e la mitogenesi delle cellule mesenchimali da i siti coinvolti nel processo di guarigione¹⁶⁷⁻¹⁶⁹.

INSULINO SIMILE FATTORI DI CRESCITA (IGF)

Le fonti di IGF-I (o somatomedina-C) e IGF-II (o fattore di crescita scheletrica), sono rappresentate dalla matrice ossea, dalle cellule endoteliali, dagli osteoblasti e dai condrociti. La concentrazione sierica di IGF-I è principalmente regolata dalla ormone della crescita. Le azioni biologiche dell'IGF sono modulati in modo cellulo-specifico. L'IGF-I promuove la formazione ossea matrice (collagene di tipo I e le proteine della matrice non collageniche) e del completamente dei processi di differenziazione degli osteoblasti^{167,168}.

METALLOPROTEINASI E FATTORI ANGIOGENICI

Una rigenerazione ossea ottimale richiede un adeguato flusso di sangue e durante le fasi finali di ossificazione endocondrale così come durante il rimodellamento, specifiche matrici metalloproteinasi degradano le cartilagine e l'osso, permettendo l'invasione dei vasi sanguigni. Si ritiene che due percorsi distinti regolano l'angiogenesi: un vascolare endoteliale fattore dipendente e uno angiopoietina-dipendente¹⁵²⁻¹⁷⁰. Si è ipotizzato che entrambe le vie sono funzionali durante la riparazione della frattura. VEGF sono mediatori essenziali della neo-angiogenesi e delle

cellule endoteliali specific mitogens. Considerando che, angiopoietin 1 e 2 sono molecole correlate alla formazione di grandi vasi e allo sviluppo di rami co-laterale da parte di vasi esistenti. Tuttavia, il loro contributo in riparazione ossea non è ben compreso. Street et al. ha dimostrato che la riparazione della frattura è stata rafforzata dalla somministrazione esogena di VEGF. Recenti studi hanno inoltre dimostrato che le BMP stimolano l'espressione del VEGF da parte degli osteoblasti¹⁷¹.

Member of the TGF- β Superfamily	Time of expression	Specific responses in vivo and in vitro
GDF-8	Restricted to day 1	Potential function as a negative regulator of skeletal muscle growth
BMP-2	Days 1-21 (the earliest gene to be induced and second elevation during osteogenesis)	Recruitment of mesenchymal cells during osteogenesis may initiate the fracture healing cascade and regulate the expression of other BMPs. BMP-2, -6, -9 may be the most potent to induce osteoblast lineage-specific differentiation of MSCs
BMP-3, -8	Days 14-21 (restricted expression during osteogenesis)	Temporal data suggest a role in the regulation of osteogenesis
BMP-4	Transient increased expression in the surrounding soft tissues 6 h to day 5 Days 14–21 Throughout fracture healing	Involvement in the formation of callus at a very early stage in the healing process. In vitro: BMP-3 and -4 stimulate the migration of human blood monocytes
BMP-7	Days 14-21 From the early stages of fracture healing	Regulatory role in both types of ossification in vitro: stimulation of relative mature osteoblasts
GDF-10, BMP-5, -6	Days 3 - 21	Regulatory role in both

		types of ossification BMP-6 may initiate chondrocyte saturation ²⁰
GDF-5, -1	Day 7 (maximal) to day 14 (restricted expression during chondrogenic phase) GDF-1 at extremely low levels	GDF-5 an exclusive involvement in hondrogenesis is suggested stimulation of mesenchymal aggregation and induction of angiogenesis through chemotaxis of endothelial cells and degradation of matrix proteins
GDF-3, GDF-6, -9	No detectable levels within the fracture callus	GDF-6 may be expressed only in articular cartilage and with GDF-5, 7 more efficiently induce cartilage and endon-like structures in vivo
TGF- β 1, - β 2, - β 3	Days 1-21 Days 3-14 Days 3—21	Potent chemotactic for bone forming cells and macrophages proliferation of undifferentiated mesenchymal and osteoprogenitor cells, osteoblasts, chondrocytes

Tabella V: Fattori di crescita e di differenziamenti più importanti

DIFFERENZE DEI MECCANISMI DI GUARIGIONE DI DIVERSI INNESTI OSSEI

Al di là della cascata degli eventi sopradescritti esistono differenze sostanziali nel meccanismo di attecchimento delle varie tipologie di innesto in chirurgia ricostruttiva pre-implantare. Le capacità di integrazione, rivascolarizzazione, stabilità volumetrica dell'innesto, qualità istologica, tempi di guarigione dipendono strettamente dal tipo di innesto utilizzato (particolato, blocco, microarchitettura corticale o midollare, sostituti ossei), dal sito ricevente, dalle stimolazioni meccaniche che avvengono in cavità orale durante la guarigione. Da un lato evento fondamentale è costituito dal processo di rivascolarizzazione poiché la formazione di neo-vasi nel contesto del sito di innesto è necessario per l'apporto di ossigeno, nutrienti cellulari, fattori di crescita e cellule in

grado di differenziarsi in senso osteoblastico e partecipare direttamente alla formazione di nuovo tessuto osseo, nonché cellule osteoclastiche per la rimozione del tessuto innestato e sostituzione di questo con un nuovo tessuto osseo (Fig.57). Per questo esistono differenze tra un sito ricevente mascellare in cui la presenza di osso midollare e vasi è maggiore rispetto ad un sito di innesto mandibolare in cui la presenza di vasi e di midollare è più scarsamente rappresentata. Dall'altro lato esistono le capacità intrinseche dell'innesto che sottendono alla rigenerazione ossea mediante tre meccanismi ormai codificati: Osteogenesi, Osteoinduzione e Osteoconduzione.

Per Osteogenesi si intende la capacità intrinseca dell'innesto di neogenesi ossea da parte delle cellule osteoprogenitrici (cellule mesenchimali indifferenziate, pre-osteoblasti, osteoblasti), che sopravvivono al danno anossico derivato dal prelievo e che sono in grado di produrre direttamente tessuto osseo nel sito di innesto.

Per Osteoinduzione si intende la capacità intrinseca dell'innesto di partecipare attivamente al rilascio di fattori di crescita ossei che stimolano il differenziamento e la proliferazione di cellule osteoblastiche. Per osteoconduzione si intende la capacità dell'innesto di creare un supporto strutturale tridimensionale (scaffold) alla crescita delle e alla formazione di neovasi nel contesto dell'innesto.

E' chiaro quindi che questa triade di proprietà sono racchiuse soltanto nel tessuto osseo autologo che rappresenta il "gold standard" e il materiale di riferimento per tutti i sostituti ossei ed è chiaro che questa triade sia alla base dell'attuale e futuro sviluppo dell'ingegneria tissutale per ottenere rigenerazioni ossee evitando prelievi ossei autologhi. Queste capacità sono state descritte maggiormente per i vari materiali da innesto comunque ciò che differenzia sostanzialmente gli innesti utilizzabili a scopo pre-implantare è la macro-morfologia dell'innesto (particolato o blocco) e la micro-architettura (corticale, midollare).

Nel processo di guarigione di un innesto particolato tutti i processi di neo-angiogenesi e di sviluppo delle fasi sopradescritte di formazione del coagulo, sostituzione con tessuto di granulazione e formazione di nuovo osso, si sviluppano nello spazio tra le particelle dell'innesto (Fig. 58). Si evince come la rivascularizzazione di questo tipo di innesto, in realtà del sito di innesto più che dell'innesto in sé, sia più pronta e rapida (circa due settimane) rispetto agli innesti sotto forma di blocchi. Inoltre giocano fattore essenziale la dimensione delle particelle e lo "zeppamento" più o meno consistente di queste particelle.

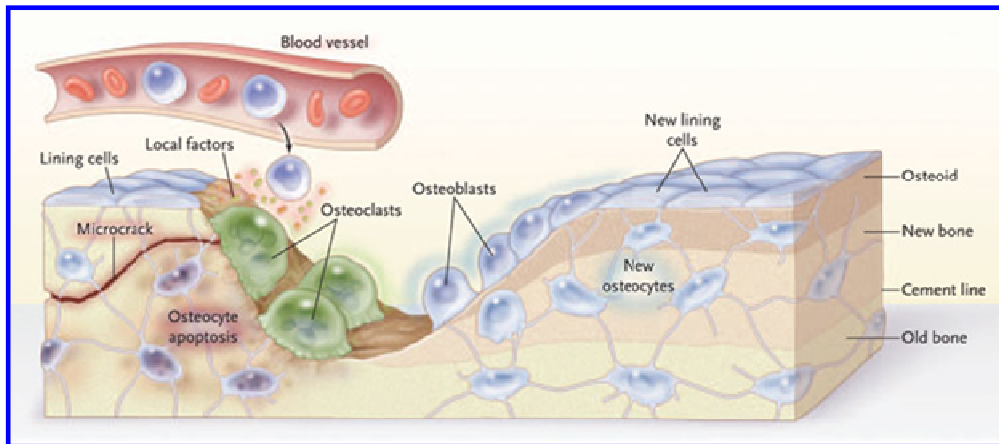


Fig. 57: Schema della guarigione ossea: in seguito alla formazione di neo-vasi le cellule osteoclastiche rimuovono il tessuto osseo innestato. Questo processo porta alla liberazione di fattori di crescita che stimolano la differenziazione di cellule osteoblastiche che producono nuovo tessuto osseo a ridosso dell'innesto.

Se l'innesto particolato è molto condensato, esiste poco spazio per la rigenerazione ossea. Il nuovo tessuto osseo si forma a diretto contatto delle particelle innestate che fungono da impalcatura alle cellule osteogenetiche (osteoconduzione). In caso di chips osse autologhe, queste vengono progressivamente riassorbite da cellule osteoclastiche o per le porzioni corticali mediante progressiva sostituzione con nuovo tessuto osseo (creeping substitution) fino alla totale scomparsa in pochi mesi delle particelle innestate (Fig. 59).

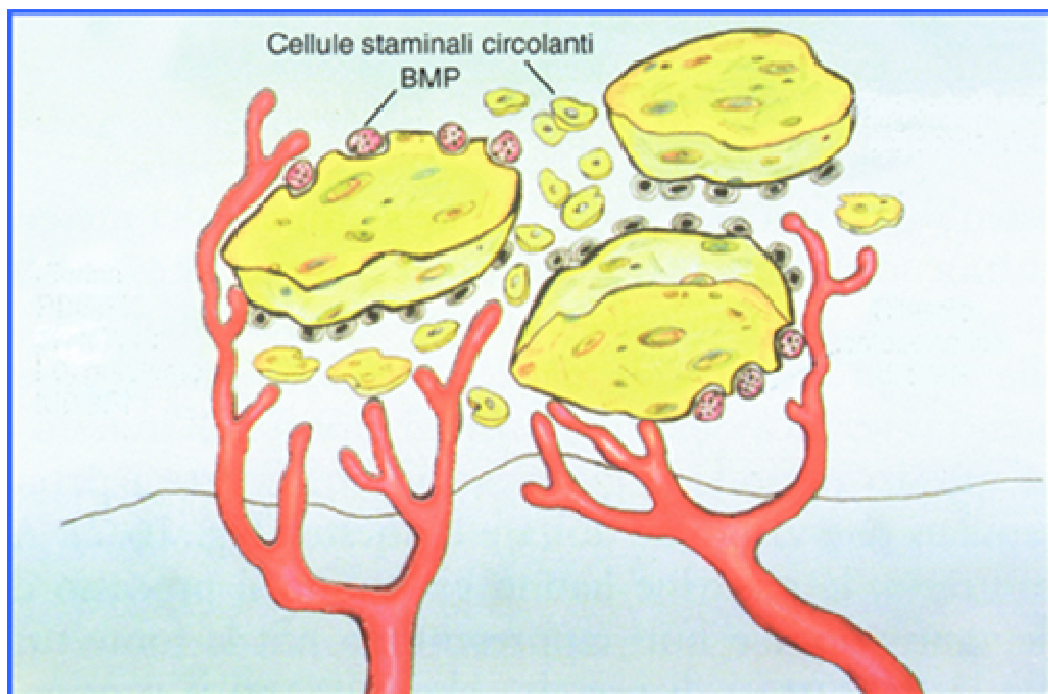


Fig. 58: Schema di attacco di innesto osseo particolato: i neovasi si formano dal sito ricevente all'innesto inserendosi nello spazio tra le particelle dell'innesto apportando cellule staminali che si differenziano in osteoblasti che depongono osso a diretto contatto con le particelle innestate e osteoclasti che riassorbono le particelle stesse liberando fattori di crescita che stimolano il processo di sostituzione delle particelle con nuovo tessuto osseo.

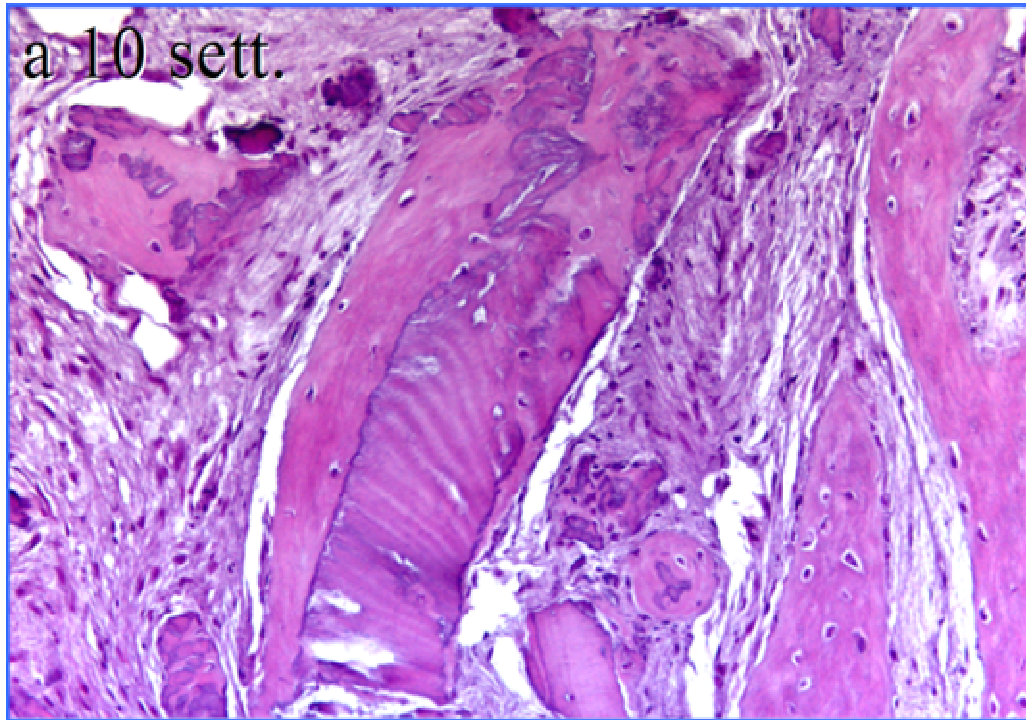


Fig. 59: Immagine istologica di riassorbimento e sostituzione tramite “creeping substitution” di chips corticale di osso autologo (privo di osteociti vitali) da parte di osso vitale neoformato (ricco di osteociti). (Acocella – Colafranceschi, Università degli Studi di Firenze)

Questo processo è più o meno lento in base alla dimensione delle porzioni corticali dell’innesto poiché la componente midollare di questi viene rimaneggiata più velocemente. Durante questa fase di riassorbimento le chips ossee liberano in situ fattori di crescita come le BMPs che stimolano la rigenerazione ossea (osteoinduzione) velocizzando la guarigione dell’innesto particolato osseo autologo che è in media di sei mesi. Per quanto riguarda la capacità osteogenetica dipende dalla presenza di cellule all’interno delle chips ossee che nel caso di chips corticali sono molto basse e dalla capacità comunque scarsa di sopravvivenza delle cellule al prelievo, soprattutto dopo il processo di triturazione ossea che si effettua per ricavarle (Fig. 60).

Nel caso dell’utilizzo di particolato ad opera di biomateriali sostitutivi dell’osso il processo di guarigione è sostanzialmente il medesimo le particelle di biomateriale fungono da impalcatura (osteoconduzione) e l’osso si forma tra una particella e l’altra del biomateriale o nel contesto delle particelle se queste sono dotate di micropori. Nel caso di materiali riassorbibili alla fine del processo di rimodellamento tutto il materiale innestato viene sostituito da nuovo osso in tempi variabili a seconda del materiale, mentre nel caso di materiali non riassorbibili le particelle dell’innesto permangono nel contesto del sito e il risultato istologico è costituito da un amalgama di tessuto osseo e materiale da innesto (Fig. 61).

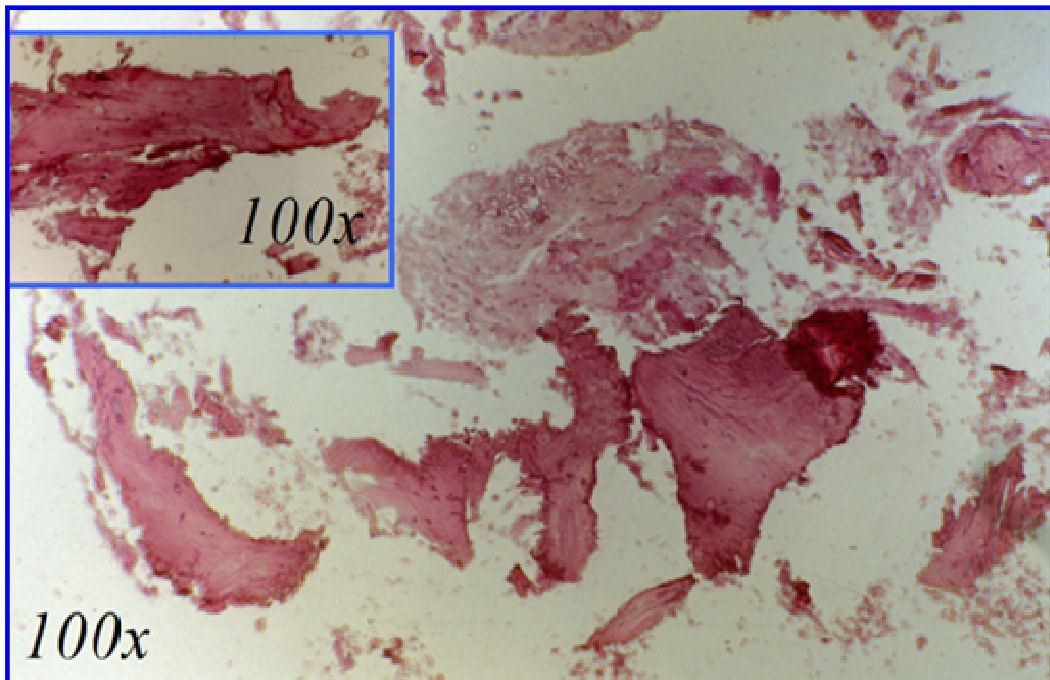


Fig. 60: Immagine istologica di chips cortico-midollari appena prelevate e triturate con un trita-osso: l'osso ha risentito del processo di triturazione, la componente midollare appare schiacciata ed è evidente la ipocellularità presente. (Acocella –Colafranceschi, Università degli Studi di Firenze).

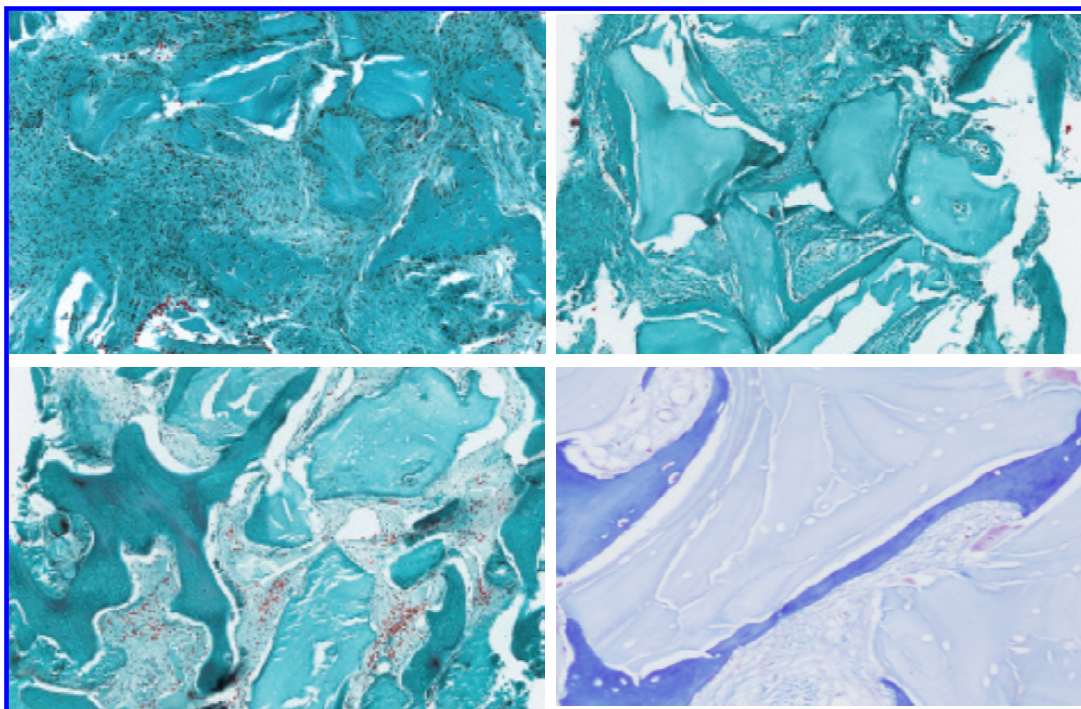


Fig. 61: Processo di guarigione di sito innestato con osso bovino deproteinizzato: La formazione del coagulo e il progressivo differenziamento in tessuto osseo avviene tra una particella e l'altra di innesto le quali alla fine rimangono nel contesto del tessuto osseo maturo.

Per l'innesto a blocco il meccanismo di attecchimento e guarigione è sostanzialmente diverso. Non esistendo spazio fisico per la neo-vascularizzazione, i

nuovi vasi si devono formare dal sito ricevente nel contesto del blocco e il tessuto osseo si deve formare prima a “ponte” per ricostruire una continuità tra sito ricevente e blocco osseo con un meccanismo simile alla formazione del callo osseo dopo una frattura (Fig. 62). Solo successivamente col progredire della vascolarizzazione si instaurano processi di riassorbimento e rimodellamento osseo nel contesto del blocco che funge di per sé come grosso scaffold per la rigenerazione ossea. A seconda dell’architettura dell’innesto questo processo può essere più o meno veloce. I blocchi ossei cortico-midollari presentano una capacità di rivascolarizzazione molto veloce (Fig. 63) anche se più lenta

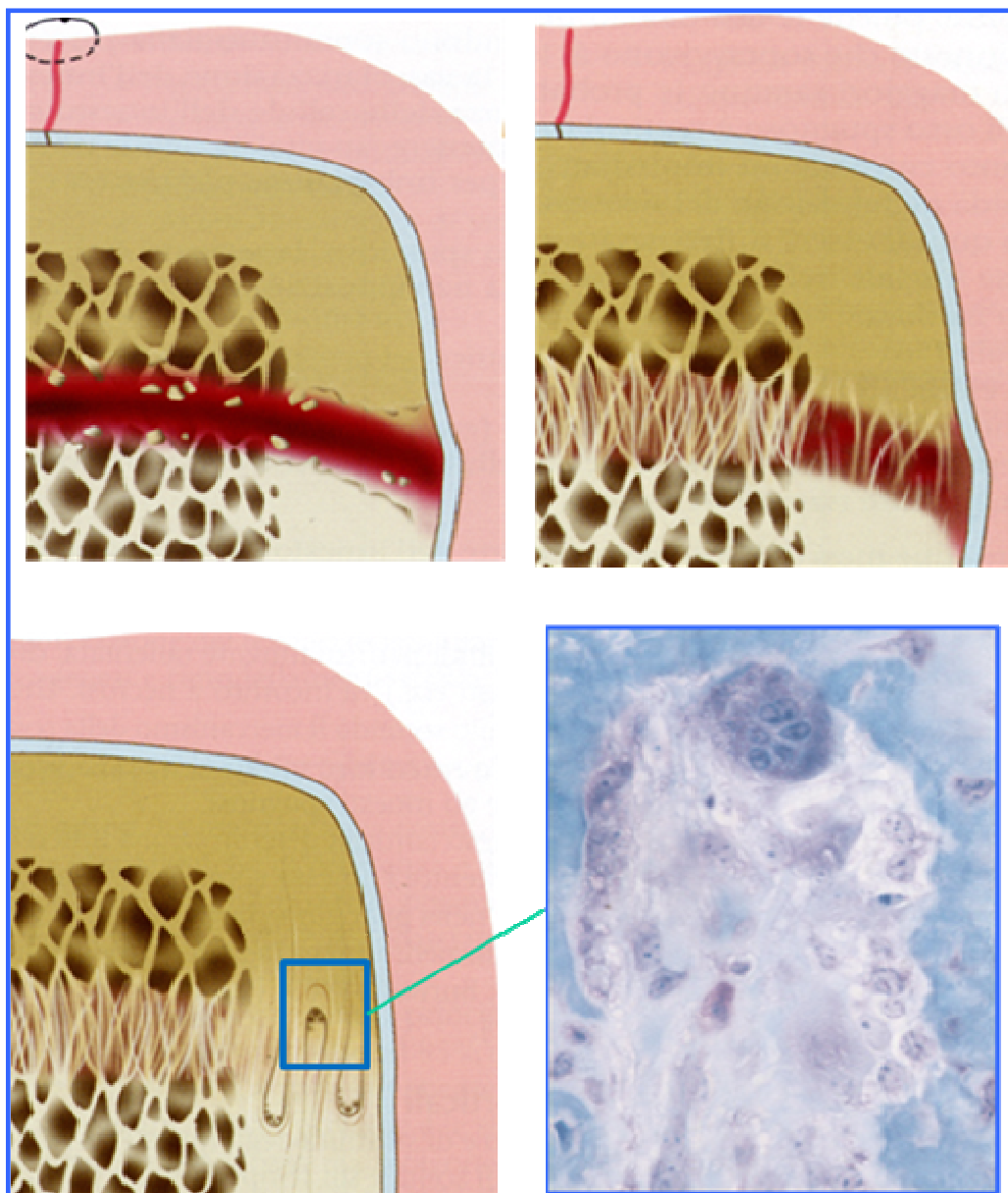


Fig. 62: Schema di attecchimento di un innesto a blocco cortico-midollare: formazione di coagulo all’interfaccia, formazione del callo osseo, rimodellamento dell’innesto con particolare istologico delle unità multicellulari di base (si nota un osteoclasta con alle spalle un vaso e linee osteoblastiche)¹⁴⁹.

del particolato, per la presenza di lacune al suo interno, inoltre posseggono capacità osteogenetiche superiori per la presenza di un elevato contenuto cellulare che se sopravvive al trapianto può contribuire efficacemente alla neoformazione ossea. Di conseguenza se l'innesto viene prelevato correttamente, e trapiantato velocemente soprattutto in un sito ricevente molto vascolarizzato la probabilità di mantenere vitali le cellule nel suo contesto è elevata.

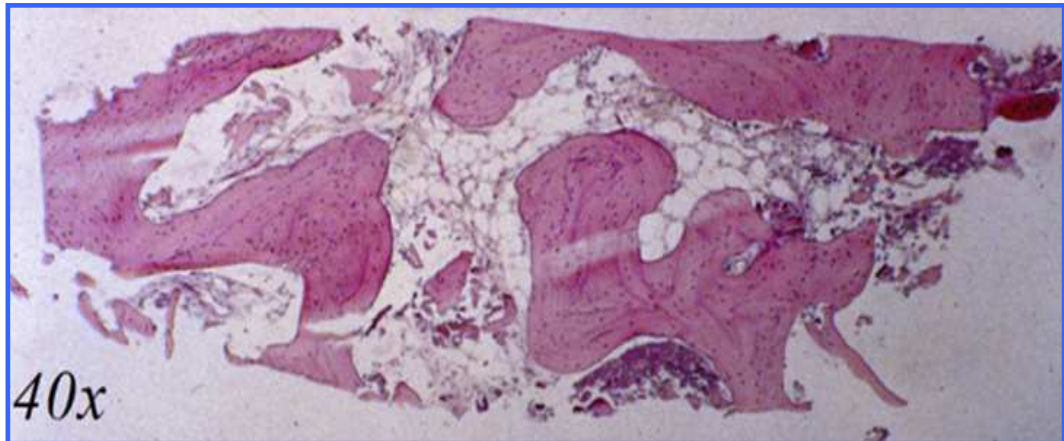


Fig. 63: Frammento di prelievo cortico-midollare da sinfisi mentoniera: la presenza di una midollare ricca di midollo emopoietico tra trabecole di osso lamellare denso consente se innestata una rivascularizzazione più rapida. (Acocella –Colafranceschi, Università degli Studi di Firenze)

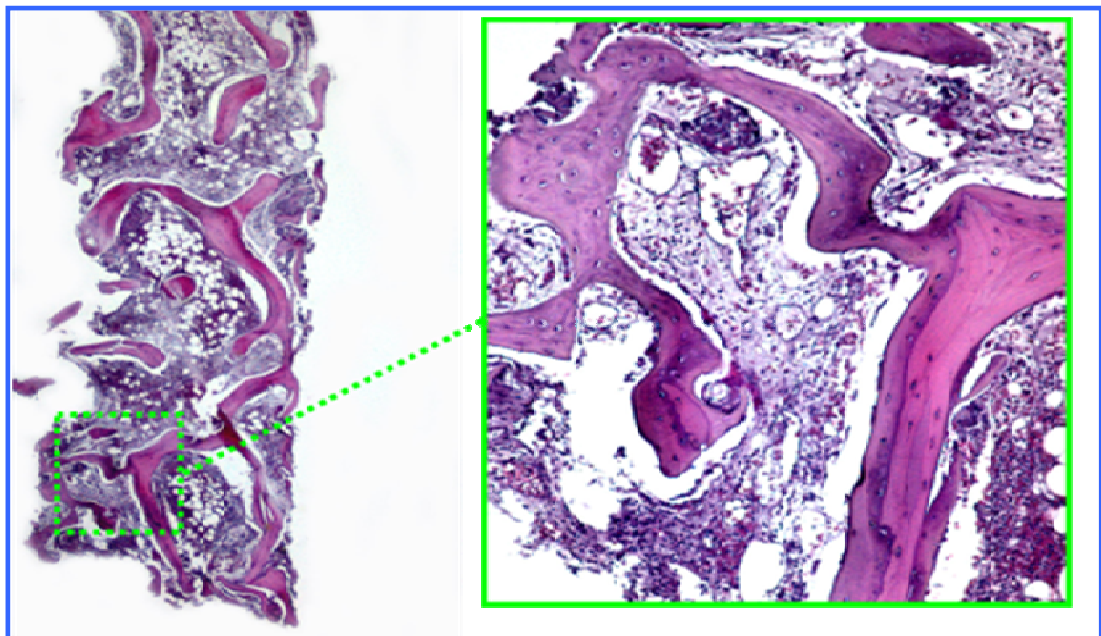


Fig. 64: Immagine istologica di innesto a blocco da cresta iliaca a distanza di 20 gg dall'innesto con particolare dell'interfaccia col sito ricevente (osso mascellare): si nota una intensa presenza di neovasi e osso vitale (pieno di osteociti) di saldatura a ponte. (Acocella e coll)

Studi da noi effettuati hanno mostrato come già a distanza di tre mesi dall'innesto i blocchi cortico-midollari siano già caratterizzati da una intensa vascolarizzazione, presenza di osseo neo-formato vitale a ponte tra le trabecole ossee del sito ricevente e quelle dell'innesto e dalla presenza di cellule vitali nel contesto dell'innesto (Fig. 64). Queste cellule osteoblastiche vitali sono costituite da cellule sopravvissute alla procedura di innesto e da cellule osteoblastiche derivate dalla differenziazione di cellule mesenchimali indifferenziate derivate dal comparto vascolare. L'attecchimento e la guarigione delle stecche corticali sono fortemente condizionate dalla compatta struttura di osso lamellare denso che le caratterizza (Fig. 65).

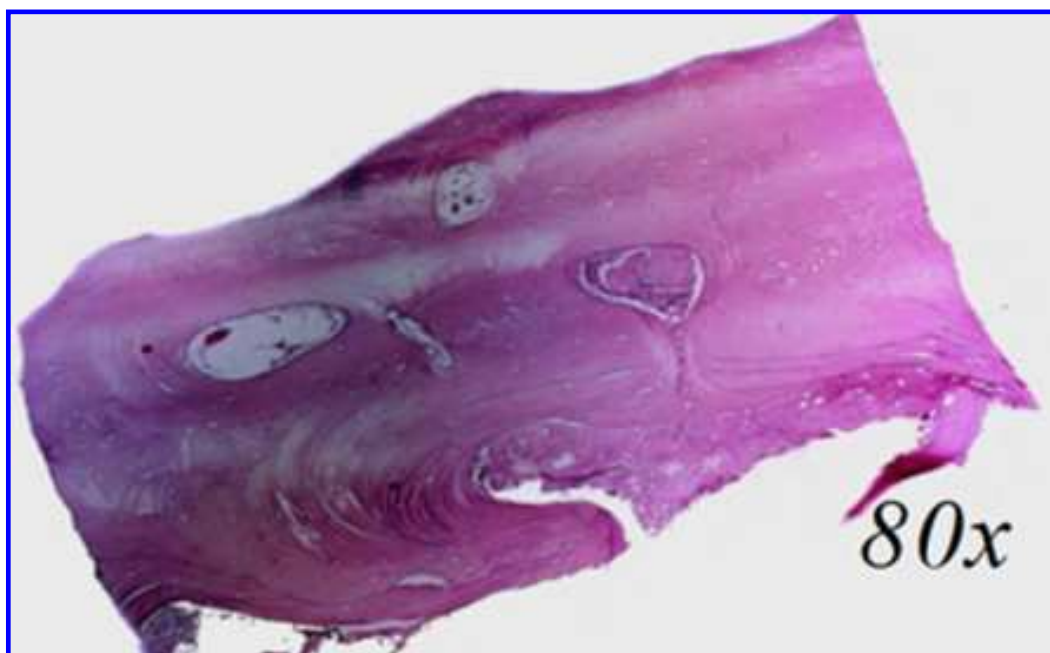


Fig. 65: Frammento di innesto prelevato dal ramo mandibolare: è evidente la struttura estremamente compatta con poche lacune vascolari. (Acocella–Colafranceschi, Università degli Studi di Firenze)

Affinchè la rivascolarizzazione avvenga, è infatti necessario dapprima un processo di riassorbimento osteoclastico mediante unità multicellulari di base al fine di permettere alle strutture vascolari di invadere o produrre ex-novo i canali di Havers o di Volkmann. Una volta completata l'angiogenesi può iniziare il processo di rimaneggiamento secondo la cosiddetta "sostituzione strisciante" con un fronte progressivo di riassorbimento e neo-apposizione ossea a partire dall'interfaccia tra osso ed innesto. Studi da noi effettuati, i cui dati non sono stati ancora pubblicati, hanno utilizzato l'individuazione immuno-istochimica del VEGF (vascular endothelial growth factor) come marcatore di rivascolarizzazione degli innesti a blocco confermando come la struttura midollare degli innesti a blocco sia più rivascolarizzata e ricca di cellule

osteoblastiche vitali, rispetto ai blocchi essenzialmente corticali (Fig. 60). E' quindi ragionevole pensare che i processi di sostituzione e rimodellamento degli innesti a blocco autologhi richiedano un periodo superiore ai sei mesi e questo aspetto farà parte integrante dello studio di questa tesi.

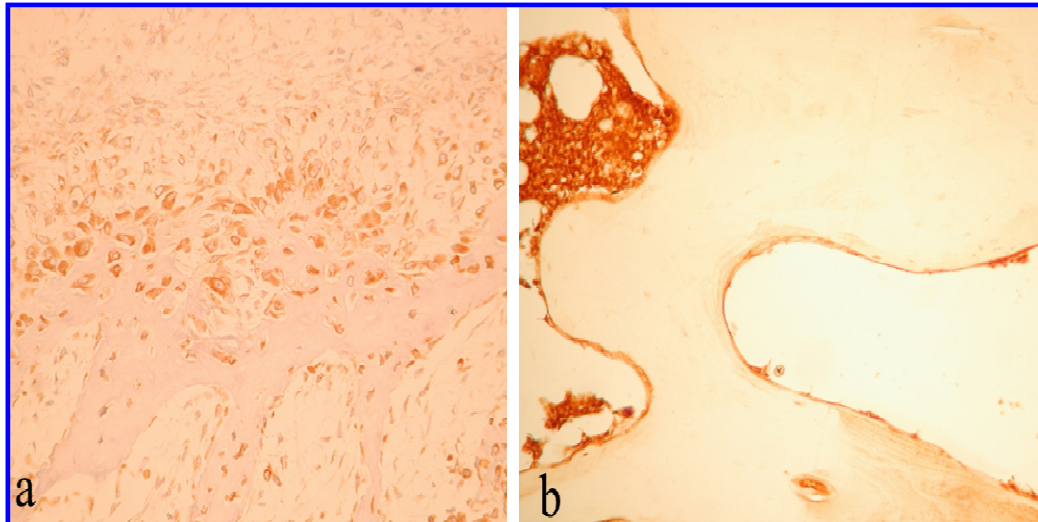


Fig. 66: Positività al VEGF all'interfaccia e nel contesto di un innesto corticomidollare a ridosso di trabecole ossee neoformate (a) e scarsa positività nel contesto di innesto coticale (b) a 20 giorni dopo l'innesto. (Acocella – Vannelli, Università degli Studi di Firenze)