



# **Atti XI Congresso Nazionale IORS**

Società Italiana di Ricerche in  
Ortopedia e Traumatologia

Ancona, 12-13 giugno 2009

Presidente onorario:  
Prof. Francesco Greco

Presidente:  
Dr. Antonio Gigante

## Studio anatomico e valutazione meccanica del legamento crociato anteriore di capra

Ronga M.<sup>1,2</sup>, Tischer T.<sup>3</sup>, Muriuki M.<sup>1</sup>, Tsai A.<sup>1</sup>, Ekdahl M.<sup>1</sup>, Smolinski, P.<sup>1</sup>, Fu F.H.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Ortopediche e Traumatologiche "M. Boni", Università dell'Insubria, Varese

<sup>2</sup>Orthopaedic Research Laboratories. Department of Orthopaedic Surgery, University of Pittsburgh, PA

<sup>3</sup>Department of Orthopaedic Sport Surgery, Technical University of Munich, D

**Obiettivo:** Obiettivo dello studio è valutare qualitativamente e quantitativamente il legamento crociato anteriore (LCA) di capra, i suoi fasci, le sue inserzioni ossee e la funzione meccanica dei suoi fasci in modo da valutare il suo utilizzo come modello sperimentale per la ricostruzione a due fasci del LCA.

**Materiale e Metodo:** Dieci ginocchia di dieci diverse capre sono state incluse nello studio anatomico. Sono state misurate le aree di inserzione di ogni fascio, la distanza tra il centro di ogni area ed i più comuni reperi anatomici. È stato calcolato il rapporto tra l'inserzione femorale, tibiale e la sezione media del legamento. Per registrare i dati sono stati utilizzati i seguenti sistemi digitali: microscribe 3D e 3D-laser camera. Per la valutazione meccanica, sono state valutate 14 paia di ginocchia. Un robot CASPAR Stäubli RX90 è stato utilizzato per misurare la traslazione tibiale anteriore (TTA) [mm] e le forze *in situ* [N] a 30° (piena estensione), 60°, 90° di flessione così come la rotazione interna a 30° prima e dopo il taglio di ogni fascio.

**Risultati:** In tutte le ginocchia sono stati identificati chiaramente 3 fasci: anteromediale (AM), intermedio (IM) e posterolaterale (PL). Non sono state riscontrate due differenti inserzioni tibiali per i due fasci IM e PL a differenza della regione femorale. Sul femore le aree d'inserzione, rappresentate come percentuale dell'intero footprint, sono state rispettivamente di  $54.3 \pm 7.8\%$  per AM,  $9.9 \pm 3.8\%$  per IM e  $35.8 \pm 4.4\%$  per PL. Sulla tibia le aree d'inserzione sono state rispettivamente di  $68.6 \pm 4.7\%$  per AM e  $31.4 \pm 4.7\%$  per IM/PL. La differenza tra l'inserzione femorale ( $51.9 \pm 4.6 \text{ mm}^2$ ) e tibiale ( $81.1 \pm 11.9 \text{ mm}^2$ ) e tra ogni singolo fascio è risultata statisticamente significativa ( $p < 0.05$ ). Le inserzioni femorale e tibiale erano più larghe della sezione media del legamento ( $21.76 \pm 7.26 \text{ mm}^2$ ) ( $p < 0.05$ ). Quando il fascio AM è stato tagliato, si è osservato un incremento della TTA a 60° e 90° di flessione ( $p < 0.05$ ). Al contrario, solo a 30° di flessione si è registrato un incremento della TTA quando il fascio PL è stato tagliato. La maggior parte delle forze *in situ* si sono sviluppate attraverso il fascio AM a 60° e 90°, mentre il PL era sollecitato solo a 30° ( $p < 0.05$ ). Il fascio IM ha contribuito in minima parte al trasferimento delle forze.

**Conclusioni:** L'esatta conoscenza dell'anatomia del LCA di capra è fondamentale quando questo animale è utilizzato come modello sperimentale. Esso mostra delle peculiari differenze rispetto a quello umano anche se le principali funzioni meccaniche sono simili.

*Corrispondenza:*

Dott. Mario Ronga

Dipartimento di Scienze Ortopediche e Traumatologiche "M. Boni", Università dell'Insubria

Ospedale di Circolo, Viale L. Borri 57, 21100 Varese

e-mail: [mario.ronga@uninsubria.it](mailto:mario.ronga@uninsubria.it)

## **Espressione genica ed analisi proteica nelle lesioni del tendine d'Achille: studio comparativo tra area lesionata e area sana dello stesso tendine**

Ronga M.<sup>1,3</sup>, Karousou E.<sup>2</sup>, Vigetti D.<sup>2</sup>, Passi A.<sup>2</sup>, Maffulli N.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Ortopediche e Traumatologiche "M. Boni", Università dell'Insubria, Varese

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Biomediche e Cliniche (DSBSC), Università dell'Insubria, Varese

<sup>3</sup> Centre for Sports and Exercise Medicine, Barts, and The London School of Medicine and Dentistry, Mile End Hospital, London, UK

**Introduzione:** La matrice extracellulare (ECM) di 19 tendini di Achille umani lesionati è stata analizzata comparando la composizione di campioni prelevati dall'area prossima alla zona di rottura e campioni prelevati da un'area apparentemente sana dello stesso tendine. Obiettivo dello studio è stato analizzare l'espressione genica e le molecole della ECM, così come le metalloproteasi (MMPs) e gli inibitori tissutali delle metalloproteasi (TIMPs) implicati nel turnover dell'ECM, in modo da valutare l'attività cellulare e cosa potrebbe essere accaduto nelle lesioni del tendine d'Achille. L'ipotesi dello studio è che nello stesso tendine ci sono differenze nell'espressione genica delle molecole dell'ECM e nell'attività delle metalloproteasi tra aree lesionate ed aree apparentemente sane.

**Materiale e Metodo:** L'espressione genica e le principali molecole dell'ECM (collagene tipo I e IX, decorina e versicano (GAGs), inclusi gli enzimi implicati nel loro metabolismo come le MMP2 e 9 e TIMP1 e 2, sono state analizzate mediante metodiche di real time RT-PCR, di zimografia e di Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis.

**Risultati:** Non è stata osservata l'espressione del gene per il collagene tipo IX. L'espressione dei geni per il collagene tipo I, GAGs, MMPs e TIMPs è stata maggiormente rappresentata nell'area della lesione tendinea ( $p < 0.05$ ). L'espressione delle MMPs è stata confermata dalla zimografia che ha mostrato un marcato incremento dell'attività della MMP9 nell'area della lesione tendinea ( $p < 0.05$ ). La composizione chimica del tendine è risultata diversa nelle due aree analizzate: nella sana il contenuto in GAGs era significativamente più alto che nell'area lesionata ( $p < 0.05$ ).

**Conclusioni:** L'assenza dell'espressione del gene per il collagene tipo IX testimonia che non vi è metaplasma fibrocartilaginea nelle rotture tendinee come descritto per le tendinopatie. Nell'area lesionata, i tenociti cercano di ripristinare la normale composizione dell'ECM incrementando la sintesi proteica ma senza produzione effettiva di GAGs: la scarsa quantità di GAGs nell'area lesionata indica che i processi catabolici prevalgono su quelli sintetici. Tali dati supportano l'ipotesi che le zone di rottura di un tendine d'Achille sono sottoposte ad un marcato riarrangiamento a livello molecolare causato dall'attività delle MMPs e dei TIMPs e ne sottolinea il loro ruolo nella patologia tendinea.

*Corrispondenza:*

Dott. Mario Ronga

Dipartimento di Scienze Ortopediche e Traumatologiche "M. Boni", Università dell'Insubria

Ospedale di Circolo, Viale L. Borri 57, 21100 Varese

e-mail: [mario.ronga@uninsubria.it](mailto:mario.ronga@uninsubria.it)

## **Role of metalloproteinases in degenerative RC tears: an ethiopathogenetic molecular and immunohistochemical hypothesis**

Cesari E., Gigante A., Conti M., Garofalo R., Manzotti S., Castagna A.  
Clinica Ortopedica – Università Politecnica delle Marche - Ancona

**Purpose.** Rotator cuff tears are a cause of pain and disability in the shoulder. The molecular changes associated with rotator cuff tearing are unclear. A subset of matrix metalloproteinases and their inhibitors, which are involved in extracellular matrix remodeling and degradation, and light microscopy changes were evaluated in macroscopically intact tendon and in rotator cuff tear.

**Materials and Methods.** Tendon samples were harvested from 13 patients who had sustained a degenerative rotator cuff tear and underwent arthroscopic repair of the lesion. Supraspinatus biopsy specimen was harvested en bloc in the arthroscopically intact middle portion of the tendon (more than 1 cm from the edge) in the lateral edge of the tear and in the superior third of subscap tendon macroscopically intact and used as control. Slides stained with H&E and Van Giesons were interpreted twice by the same observer using a semiquantitative grading scale assessing fiber structure, arrangement, and degeneration. The collagenases (MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-13), the stromelysins (MMP-3, MMP-10, MMP-9), and the tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP-1, TIMP-2) arrays were analyzed by multiplex sandwich ELISA (Search-Light technology) in each specimen. Histology and immunofluorescence were assessed blindly.

**Results.** Histological evidence of inflammation and degeneration was present in all patients with RCT: dilaceration lesions of the connective tissue, fatty infiltrations, necrosis, scar lesions and microcalcifications were found in the edge and in the middle portion of supraspinatus tendon, but not in subscap. There was a significant increase in MMP-1, MMP-2, MMP-3, and in TIMP-1, TIMP-2 levels in all specimens examined, also in macroscopically intact part of supraspinatus tendon and in controls.

**Conclusions.** Seemingly intact parts of injured tendon can present some aspects of degeneration. The levels of specific matrix metalloproteinases and their inhibitors are altered in turn rotator cuff tendons also in macroscopically and histologically intact tendon as subscap. These changes may be the pathogenic precursor to a subsequent tear.

## **Platelet-rich plasma nella riparazione tendinea: studio sperimentale in modello animale**

Busilacchi A., del Torto M., Enea D., Manzotti S., Gigante A.  
Clinica Ortopedica – Università Politecnica delle Marche - Ancona

**Introduzione:** Il PRP (platelet-rich plasma), sospensione di fattori di crescita di derivazione piastrinica, ha ultimamente suscitato notevole interesse nella patologia muscolo-scheletrica. Come già noto per le lesioni ossee e per le ferite cutanee, i numerosi fattori di crescita liberati nel lisato piastrinico (IGF, EGF, MGF, bFGF, PDGF, VEGF, ...) sono implicati nel processo riparativo attraverso l'induzione delle cellule residenti alla proliferazione e sintesi di proteine strutturali. Scopo del presente studio è stato quello di verificare l'efficacia e la sicurezza del platelet-rich plasma nella riparazione di lesioni subtotali del tendine d'Achille su modello sperimentale animale.

**Materiali e Metodi:** Il PRP è stato ottenuto dal sangue di 2 ratti Wistar. In seguito ad opportune centrifugazioni si è raggiunta la concentrazione di circa  $1,5 \cdot 10^2$  piastrine/ $\mu$ l. I campioni di PRP, così ottenuti sono stati attivati con trombina a 20 U/ml e irradiati a 25 Gy, in accordo con gli standard della International Blood Banking, al fine di inattivare i leucociti impedendo ogni possibilità di graft versus host disease (GVHD). Per l'esperimento sono stati impiegati 30 ratti Wistar maschi di 500 gr di peso per un totale di 60 lesioni sperimentali (30 trattati e 30 controlli). **PROCEDURA CHIRURGICA.** Ratti in decubito prono sul tavolo operatorio. Accesso paracchileo mediale, incisione del paratenon fino a pervenire al tendine: sezione di 2 dei 3 fasci componenti il tendine al fine di lasciare una continuità meccanica. A seguito di randomizzazione i ratti sono stati trattati bilateralmente: in un tendine sezionato è stato posizionato il gel di PRP e nel tendine controlaterale (controllo) è stata iniettata una miscela di 1 parte CPD (citrate-phosphate-dextrose) più 9 di fisiologica salina (NaCl). Il sacrificio degli animali in camera di CO<sub>2</sub> è stato eseguito in maniera randomizzata a 40 e 60 giorni dall'atto chirurgico. I campioni sono stati analizzati in microscopia ottica seguita da analisi istomorfometrica. Sono attualmente in corso analisi di micro-TC presso il laboratorio SYRMEP (Sincrotrone ELETTRA-Basovizza-Trieste).

**Risultati:** Dall'analisi microscopica ed istomorfometrica dei campioni si è osservata una maggiore proliferazione e sintesi collagenica della linea fibroblast-like (tenociti) nei trattati a 40 giorni rispetto ai controlli. Tuttavia non è stato possibile osservare una restitutio ad integrum della lesione sperimentale, che è evoluta in una neoapposizione di connettivo fibroso lasso. E' stata osservata inoltre una maggiore proliferazione vascolare nei trattati rispetto ai controlli. A 60 giorni la differenza di proliferazioni cellulare tra trattati e controlli non differiva in modo significativo. Nel corso dello studio non sono stati osservati effetti avversi nell'uso del PRP su ratto, né sono state osservate alterazioni strutturali dei campioni quali calcificazioni od ossificazioni eterotopiche.

**Conclusioni:** Attraverso l'analisi dei risultati di tale studio integrati con le attuali conoscenze in questo campo, si può sostenere che il PRP stimola la proliferazione dei tenociti e la sintesi di collagene I nei primissimi periodi dopo la sua deposizione. Nel nostro caso si è riscontrato un maggiore effetto a 40 giorni che a 60 giorni. Ciò verosimilmente a causa dell'emivita dei fattori di crescita, che esprimono la massima capacità proliferativa e di sintesi proteica nei primi 15-20 giorni dopo la applicazione. Inoltre l'assenza di alterazioni della struttura tendinea, di calcificazioni od ossificazioni eterotopiche ci induce a ritenere la PRP un prodotto sicuro. Attualmente tuttavia non è nota la possibilità di reazioni avverse a lungo termine (ubiquitarie o locali) nell'organismo in cui è stato applicato il gel piastrinico.

## **Analisi morfologica dei fallimenti della ricostruzione a doppio fascio del legamento crociato anteriore**

Ronga M.<sup>1,2</sup>, Wang J.H.-C.<sup>3</sup>, Irrgang J.J.<sup>2</sup>, Fu F.H.<sup>2</sup>

1 Dipartimento di Scienze Ortopediche e Traumatologiche "M. Boni", Università dell'Insubria, Varese

2 Department of Orthopaedic Surgery, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA

3 MechanoBiology Laboratory, Department of Orthopaedic Surgery, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA

**Obiettivo:** Obiettivo dello studio è valutare il processo di rimodellamento degli innesti utilizzati per ricostruzione del legamento crociato anteriore (LCA), con tecnica a doppio fascio (anteromediale, AM; posterolaterale PL), in 4 fallimenti di tipo traumatico. L'ipotesi dello studio è che dopo ricostruzione del LCA si realizzi un differente processo di maturazione tra i due fasci. **Materiali e metodi:** 6 innesti utilizzati per ricostruzione del LCA con tecnica a doppio fascio sono stati prelevati da 4 diversi pazienti sottoposti ad intervento di revisione del LCA. In 2 pazienti entrambi i fasci erano lesionati, mentre nei rimanenti 2 solo il fascio AM. In tutti i casi la lesione è avvenuta durante attività sportiva ad un distanza media di 11 mesi (range, 9-14) dal primo intervento. Tre differenti LCA (controllo positivo) sono stati prelevati durante procedure di artroplastica di ginocchio. Tre differenti tibiali anteriori (allograft), lo stesso tipo di innesto utilizzato per le ricostruzioni del LCA, sono stati utilizzati come gruppo di controllo negativo. Ogni biopsia è stata analizzata mediante metodiche di microscopia luce ed elettronica a scansione per contare il numero di cellule e misurare il diametro, la densità e la percentuale dell'area delle fibrille collageniche.

**Risultati:** Per tutte le variabili considerate è stata registrata una differenza significativa tra i gruppi AM e quelli PL e tra AM ed allograft ( $p < 0.05$ ). Non è stata osservata nessuna differenza tra i gruppi AM ed LCA con l'eccezione della densità dell'area delle fibrille collageniche ( $p < 0.05$ ). Sono state riscontrate differenze tra la densità e l'area delle fibrille collageniche tra i gruppi PL ed allograft e diametro, densità ed area delle fibrille collageniche tra i gruppi PL e LCA.

**Conclusioni:** La presenza di cellule, la densità e la percentuale dell'area occupata dalle fibrille collageniche dei gruppi AM e PL quando confrontate con i gruppi di controllo dimostrano un'evoluzione degli innesti da tendine a legamento. Il diverso stadio maturativo dei due fasci è suggerito dalle differenze in tutte le variabili considerate. Il gruppo AM appare più maturo del PL. I dati ottenuti suggeriscono che gli innesti sono ancora immaturi ad una media di 11 mesi dall'intervento. Solo studi prospettici randomizzati a lungo termine tra ricostruzione del LCA con tecnica a singolo o doppio fascio potranno dimostrare se una ricostruzione anatomica riproduce una struttura ed una ultrastruttura normale del LCA.

*Corrispondenza:*

Dott. Mario Ronga

Dipartimento di Scienze Ortopediche e Traumatologiche "M. Boni", Università dell'Insubria

Ospedale di Circolo, Viale L. Borri 57, 21100 Varese

e-mail: [mario.ronga@uninsubria.it](mailto:mario.ronga@uninsubria.it)

# Caratterizzazione meccanica del tendine d’Achille con tecniche laser senza contatto

Tomasini E.P., Scalise L.

Dipartimento di Meccanica - Università Politecnica delle Marche  
Via Brezze Bianche – 60131 Ancona

The authors present a new non-invasive experimental procedure based on laser techniques for the measurement of mechanical properties of tendons. Such procedure is based on the measurement of the first resonance frequency of the tendon by laser Doppler vibrometry during in vitro tensile experiments; the final aim is establishing a measurement protocol to perform the mechanical characterization of tendons based on mechanical parameters such as the resonance frequency (which is also potentially achievable during in vivo investigation). The experimental procedure is described, taking into account the need to simulate the physiological conditions of the Achilles tendon, and the measurement technique used for the non-invasive determination of tendon cross-sectional area during tensile vibration tests at different load levels is reported. The test procedure is based on a tensile machine, which measures longitudinal tendons undergoing controlled load conditions. Cross-sectional area is measured using a new non-contact procedure for the measurement of tendon perimeter (repeatability of 99% and accuracy of 2%). For each loading condition, vibration resonance frequency and damping, cross-sectional area and tensile force are measured, allowing thus a mechanical characterization of the tendon. Stress–strain curves have been correlated to the first vibration resonance frequency and damping of the tendon. Results demonstrate the validity of the method for the comparison of different aged rabbit tendons and how the first resonance frequency as well as damping values are well related to stress levels. In particular first resonance appears to be a valid parameter for the in-vivo measurement of some physiological characteristics of tendons. It is also noted how the non-linear visco-elastic behaviour of the tendon has shown a reduced sensitivity to the variation of stress, respect to a lumped parameter model. This suggests the use of the proposed methodology mainly for significant stress variations.

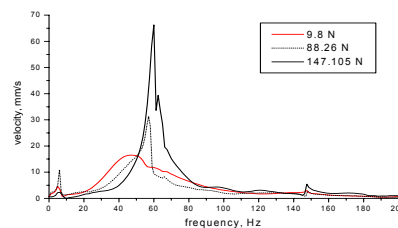


Figure 1: vibration velocity frequency spectra measured at different load conditions.

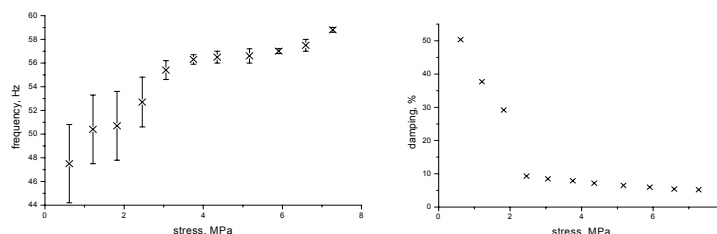


Figure 2: Tendon first natural frequency and damping at different stress levels (1st vibrational mode).

## **Vantaggi e indicazioni della tecnica transtibiale “all inside” nella ricostruzione del LCA**

Cervellin M., Thiebat G., Quaglia A., Volpi P.

IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi, Unità di Traumatologia dello Sport e Chirurgia Artroscopica, Milano

La tecnica transtibiale “all-inside”, grazie alla sua caratteristica di mini-invasività, permette di ricostruire il legamento crociato anteriore risparmiando le corticali, utilizzando anche solo un semitendine (duplicato, triplicato o quadruplicato). Inoltre un ulteriore vantaggio di questa metodica è rappresentato dalla possibilità di associarla ad altri interventi chirurgici, quali le osteotomie. La tecnica “all-inside” è quindi indicata negli adolescenti e nelle situazioni in cui è necessario eseguire altri trattamenti chirurgici.

Attualmente abbiamo eseguito 30 ricostruzioni LCA con tecnica “all-inside”, di cui 29 con trapianti autologhi (ST) e uno allogenico. In due casi la ricostruzione è stata associata ad un’osteotomia correttiva tibiale.

La tecnica da noi proposta prevede la fresatura dei due half tunnel (tibiale e femorale) direttamente dall’interno dell’articolazione mediante apposito strumentario e l’introduzione del neo-legamento nella gola intercondiloidea dal portale artroscopico antero-mediale. La fissazione prossimale femorale viene eseguita mediante l’utilizzo di RetroButton™ (Arthrex), mentre quella distale tibiale avviene con SutureButton™ (Fiberwire™).

Sebbene il follow-up sia ancora limitato, le prime osservazioni ci hanno permesso di apprezzare, in termini di soddisfazione del paziente, dei risultati comparabili alle altre tecniche di ricostruzione. L’andamento dei pazienti trattati sarà ulteriormente monitorato per valutare la validità di questa tecnica di ricostruzione nel tempo. Attualmente la letteratura è estremamente povera di lavori riguardanti l’utilizzo di questa tecnica e dunque sarebbe opportuna l’esecuzione di alcuni studi per validarne l’efficacia.

## **Phenotypic gradient from the avascular to the vascular zone of the meniscus. New insights in the use of the term “fibrochondrocytes” referred to meniscus cells**

Deponti D.<sup>^</sup>, De Palma C.\*, Pozzi A.\*\*, Ballis R.\*\*, Fraschini G.F.\*\*, Peretti G.M.<sup>^\*\*</sup>

<sup>^</sup> Faculty of Exercise Sciences, University of Milan

\* Stem Cell Research Institute, San Raffaele Scientific Institute, Milan

\*\* Division of Orthopaedics and Traumatology, San Raffaele Scientific Institute, Milan

The meniscus plays an important role in the biomechanics of the knee joint: it has a function in load bearing and transmission, shock absorption, joint stability and lubrication.

This tissue has a poor healing potential, partly due to the absence of vasculature: blood vessels are present only in the outer 10-30% of the meniscal body.

Normal meniscus is composed of extracellular matrix (ECM), water (72%) and cells; the ECM consists of collagen, mainly type I (90%), and glycoaminoglycan. Due to the large amount of collagen type I, the meniscus has properties of fibrous and cartilaginous tissue. The term fibrochondrocytes has been introduced to identify the typical characteristics of the meniscus cells, but a clear description of the phenotype of these cells is still missing.

This work was aimed to study the characteristics of the meniscus cells by focusing on three areas of the meniscus, the inner avascular zone, the intermediate, and the external vascular zone.

Meniscus cells proliferation and differentiation were compared in these three different areas by FACS analysis, moreover the expression of cartilage specific genes was confirmed by real time PCR; additionally, cell morphology was analyzed both in the native meniscus by histology and by microscopy analysis after enzymatic isolation from the tissue. Meniscus cells were compared to isolated articular chondrocytes and tendon fibroblasts.

The data show that the inner region of the meniscus is composed of cells that are similar to articular chondrocytes in terms of morphology (round shape) and proliferation rate, but they express lower amount of cartilage specific genes, such as collagen type II and aggrecan; the intermediate and external areas are composed of cells that showed a gradient in morphology and cartilage specific gene expression compared to the cells of the inner area; however, interestingly, they show a lower proliferation rate.

These results suggest the presence of an “intermediate phenotype” located in the middle and external meniscal areas having morphological and functional characteristics intermediate between the fibrochondrocytes of the inner region and the tendon fibroblasts; these evidences could lead to new options in the choice of the optimal cell source for meniscus tissue engineering.

## Meniscal repair with cellular fibrin glue: a nude mice study

Scotti C.\*\*\*, Mangiavini L.^, Pozzi A.\*, Vitari F.\*\*, Domeneghini C.\*\*, Frascini G.F.\*, Peretti G.M.^\*

\* Division of Orthopaedics and Traumatology, San Raffaele Scientific Institute, Milan

\*\* Dep. Veterinary Sciences for Animal Health and Food Safety, University of Milan

\*\*\* Residency Program in Orthopaedics and Traumatology I, University of Milan

^ Residency Program in Orthopaedics and Traumatology, University of Milano-Bicocca

^ Faculty of Exercise Sciences, University of Milan

**Background:** Menisci provide congruence between the femur condyles and the tibial plateau, stability, shock absorption, lubrication, proprioception, and distribute the load during normal activity. However, when a lesion occurs, meniscus cells are generally unable to synthesize a valid reparative tissue, which could withstand the physiological forces which the meniscus is subjected to. This leads to a progressive disruption of the meniscus structure, which could cause altered biomechanical function of the knee and ultimately the development of early osteoarthritis.

**Materials and methods:** Swine menisci and articular chondrocytes were harvested from young pigs. Radial slices of the menisci were obtained and regularized. Chondrocytes were suspended in fibrinogen and the resulting suspension was placed over a meniscal slice. Immediately after adding thrombin to the cellular suspension, a second slice was placed over the polymerizing cellular hydrogel to form a tri-layered sandwich. Samples were then embedded in acellular fibrin glue in order to provide mechanical protection and to avoid cellular penetration from the mouse, and then implanted in the subcutaneous tissue of nude mice for 4 weeks. As controls, tri-layered sandwiches were prepared with acellular fibrin glue between the meniscal samples. All samples were assessed grossly, histologically, and by scan electron microscopy (SEM).

**Results:** All experimental samples demonstrated a gross bonding at probing with a pair of forceps while none of the control samples showed signs of adhesion between the meniscal slices.

Histology analysis demonstrated a continuous hypercellular fibro-cartilaginous tissue at the interface between the two meniscal slices. Moreover, some penetration buds are evident from the cellular fibrin glue to the meniscal tissue. SEM confirmed the presence of cellular tissue at the interface of the two meniscal slices.

**Conclusions:** The results obtained suggest that cellular fibrin glue has a potential as biologic glue to improve repair of meniscal tears. Further orthotopic in vivo studies are needed to assess the potential for a clinical application of this method.

- 1) Peretti GM, Gill TJ, Xu JW, Randolph MA, Morse KR, Zaleske DJ. Cell-based therapy for meniscal repair: a large animal study. *Am J Sports Med* 2004 32:146-58.
- 2) Peretti GM, Xu JW, Bonassar LJ, Kirshhoff CH, Yaremchuk MJ, Randolph MA. Review of injectable cartilage engineering using fibrin gel in mice and swine models. *Tissue Eng* 2006 12:1151-68.
- 3) Peretti GM, Zaporozhan V, Spangenberg KM, Randolph MA, Fellers J, Bonassar LJ. Cell-based bonding of articular cartilage: An extended study. *J Biomed Mater Res A* 2003 1;64:517-24.

## **All-inside arthroscopic lateral collagen meniscus implant: preliminary results (20 month follow-up)**

Marcheggiani Muccioli G.M., Giordano G., Bruni D., Bonanzinga T., Zaffagnini S., Marcacci M.  
IX Divisione di Chirurgia Ortopedica-Traumatologia, Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna

**Introduction:** Meniscal suture or replacement is fundamental to prevent knee's osteoarthritis progression after partial or total meniscectomy (1). Even more loss of the lateral meniscus results in a rapidly increased rate of knee degeneration compared to similar medial injuries (2). Stone and colleagues (3) developed a bioresorbable collagen matrix (Collagen Meniscus Implant) that acts as a scaffold to restore the original meniscal structure. The purpose of this study was to evaluate preliminary results of a CMI developed for use in lateral meniscus partial deficiencies.

**Materials and methods:** Twelve patients (mean age 29.6) were prospectively enrolled in our Institute and evaluated 20 months (mean F.U.) after CMI lateral implantation between March 2006 and December 2008. Inclusion criteria were an irreparable meniscal tear or a previous partial meniscectomy involving the lateral meniscus. Exclusion criteria were knee laxity, untreated grade IV cartilage lesions (Outerbridge classification) and knee alignment deformities. Fixation of the implant to the host meniscus rim was performed with an all-inside arthroscopic suture technique. Patients gave informed consent and the study was carried out according to the Good Clinical Practice regulations. Patients were clinical evaluated performing Lysholm, Tegner and VAS (for pain): pre-operative, at 6 months, 1 year and 2 years F.U. Xray control was taken every year post-op and MRI control at 2 years F.U.

**Results:** There were no complications related to the device. All patients were able to return to activities of daily living without limitations 3 months after surgery. Follow-up included assessments of changes in Lysholm, Tegner, pain (VAS) and patient satisfaction. Mean values of all these parameters at last F.U. showed a great improvement compared to the preoperative data: Lysholm increased from 68.2 to 92.5; Tegner from 3.2 to 5.8 (only 1.5 less than pre-injury level); global pain (VAS) decrease from 88.1 to 25.2. All the patients were satisfied and declare that they will have repeat again the operation. In the 6 cases that reached e 2 years F.U. MRI showed: in 4 cases myxoid degeneration signal, in one a normal signal with reduced size, while the last patient had no recognisable implant. This 6 patients had preserved cartilage and articular space, with no changes since pre-op control.

**Discussion:** Our small series of 12 patients prospectively followed for 20 months has shown highly satisfactory results in pain, function, self-assessment and activity levels. Although the aspect of the implant was mostly abnormal, the implant was capable to reduce pain and deterioration of the knee joint. Despite that further investigation is needed as the long term follow-up results.

1. Fairbank T: Knee joint changes after meniscectomy. *J Bone Joint Surg Br*, 1948; 30:664.
2. Peña E, Calvo B, Martinez MA, Palanca D, Doblaré M: Why lateral meniscectomy is more dangerous than medial meniscectomy. A finite element study. *J Orthop Res*, 2006; 24:1001-10.
3. Stone KR, Rodkey WG, Webber R, McKinney L, Steadman JR: Meniscal regeneration with copolymeric collagen scaffolds. In vitro and in vivo studies evaluated clinically, histologically, and biochemically. *Am J Sports Med*, 1992; 20:104-11.

## **L'invecchiamento del disco intervertebrale: analisi longitudinali di RM, istologia ed espressione genica su modello animale**

Vadalà G., Sowa G.\* , Kang J.D.\* , Denaro V.

Area di Ortopedia e Traumatologia, Università Campus Bio-Medico, Roma

\*Department of Orthopaedic Surgery, University of Pittsburgh, PA

Benché vi sia una correlazione tra invecchiamento e comparsa di segni di degenerazione del disco intervertebrale, numerose evidenze suggeriscono differenze nei meccanismi coinvolti in questi processi. La degenerazione discale indotta da lesione dell'anello fibroso su modello animale è stata estesamente studiata. L'obiettivo di questo studio è stato quello di determinare i cambiamenti correlati con l'invecchiamento del disco intervertebrale rispetto a quelli correlati con la degenerazione del disco indotta da danno tissutale.

Un gruppo di conigli adulti sani è stato seguito longitudinalmente per 2 anni e 6 mesi con RM lombare seriale. In seguito i dischi intervertebrali lombari dei conigli anziani sono stati studiati mediante analisi istologica e dell'espressione genica, e confrontata con quella di gruppi di conigli giovani ed adulti.

L'indice di RM (rapporto tra area del nucleo polposo e intensità del segnale) è diminuito del 25% nel corso dei due anni e sei mesi di follow up. L'analisi istologica ha mostrato notevoli cambiamenti nella composizione cellulare. L'analisi real-time PCR ha mostrato che l'espressione del collagene tipo I e II diminuisce con l'invecchiamento mentre l'aggricano aumenta.

L'espressione BMP-2, TIMP-1 e SOX-9 aumenta con l'invecchiamento, mentre quella del TGF- $\beta$  diminuisce con andamento bimodale.

I notevoli cambiamenti della composizione cellulare osservati durante l'invecchiamento non si correlano con i modesti cambiamenti osservati all'RM. Inoltre, i cambiamenti dell'espressione genica osservati durante il normale invecchiamento risultano essere notevolmente diversi a quelli associati con la degenerazione. I risultati di questo studio hanno dimostrato una significativa differenza tra invecchiamento e degenerazione.

## Scaffold nanostrutturati “intelligenti” per la riparazione dell’anello fibroso

Denaro V.<sup>1</sup>, Vadalà G.<sup>1</sup>, Rainer A.<sup>2</sup>, Loppini M.<sup>1</sup>, Trombetta M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Ortopedia e Traumatologia, Università Campus Bio-Medico di Roma

<sup>2</sup>CIR – Laboratorio di Chimica & Biomateriali, Università Campus Bio-Medico di Roma

**Introduzione.** La recidiva di ernia del disco (EDD) successiva a discectomia è una evenienza frequente che si riscontra in circa il 12% dei pazienti operati. Il nucleo polposo (NP) residuo fuoriesce attraverso la breccia che si viene a creare nell’anello fibroso (AF) danneggiato. Attualmente per prevenire tale evenienza non è disponibile alcuna strategia terapeutica. L’ingegneria tissutale è una disciplina che studia la rigenerazione tissutale ottenuta attraverso l’associazione di cellule, scaffold e fattori di crescita. L’elettrospinning è una metodica che permette di produrre scaffold costituiti da nanofibre che riproducono l’aspetto microscopico della matrice extracellulare (ECM). I biomateriali, inoltre, possono essere funzionalizzati in modo da rilasciare stimoli biologici che modulano l’attività cellulare in modo da favorire i processi di riparazione/rigenerazione tissutale. In questo studio, il nostro gruppo propone l’impiego di una membrana nanostrutturata “intelligente” per la riparazione dell’AF nella prevenzione della recidiva di EDD. L’obiettivo dello studio è valutare l’adesione, la proliferazione cellulare e la produzione di ECM di cellule dell’AF seminate su membrane nanostrutturate di Acido Poli-L-Lattico (PLLA) funzionalizzate con Transforming Growth Factor (TGF)-beta-1, prodotte con metodica elettrospinning.

**Materiali e metodi.** Cellule dell’AF sono state isolate da dischi intervertebrali di code bovine, espanse, e seminate su membrane nanostrutturate di PLLA/TGF-beta-1. Membrane di solo PLLA sono state usate come controllo. Dopo 3 settimane di coltura le membrane ingegnerizzate sono state studiate per valutare la quantità totale di proteoglicani, la produzione di collagene e la proliferazione cellulare. Inoltre è stata eseguita una analisi istologica delle membrane stesse.

**Risultati.** Le cellule hanno presentato una buona adesione ed espansione sulla superficie delle nanofibre; le cellule dell’AF coltivate sulle membrane di PLLA/TGF-beta-1 hanno depositato una quantità significativamente maggiore di glicosaminoglicani e di collagene rispetto alle cellule coltivate sulle membrane di controllo. La proliferazione cellulare, tuttavia, si è rivelata essere della stessa entità nei due differenti gruppi. L’analisi istologica ha mostrato la presenza di uno strato di ECM, su entrambi i lati della membrana, di maggiore spessore nelle membrane contenenti PLLA/TGF-beta-1 rispetto alle membrane di controllo.

**Conclusioni.** La coltura di cellule di AF sulle membrane nanostrutturate di PLLA funzionalizzate con TGF-beta-1 favorisce la produzione di glicosaminoglicani e di collagene. Questi risultati evidenziano che le membrane “intelligenti” nanostrutturate, usate in questo studio, sono in grado di esercitare uno stimolo anabolico sulle cellule di AF in termini di produzione di ECM. Tali membrane potrebbero rappresentare un nuovo e promettente scaffold da impiegare nella riparazione dell’AF per la prevenzione di recidive di EDD.

## **Slipped capital femoral apiphysis: pathologic aspects improvement after chondro-synthesis**

Falciglia F., Aulisa A.G., Giordano M., Guzzanti V.\*

Children's Hospital Bambin Gesù –Orthopaedic Department, Rome - Orthopaedic Department of the University of Cassino

**Background:** Researchers and clinicians commonly consider the hystopathological aspects of idiopathic slipped-capital-femoral-epiphysis, the altered chondrocyte maturation and enchondral ossification, as permanent. In spite of this assumption, two biological published phenomena strike the attention: the epiphysis which “ grows away” from some type of synthesis after a time of application and the symmetric neck growth of involved and uninvolved side after particularly osteosynthesis. A light microscopic and ultrastructural study of physis of slipped-capital-femoral-epiphysis before and after stabilization was carried out to try to explain these divergent observations.

**Methods:** We obtained bioptic specimens of 18 patients before operation and in 3 of them after operation before the closure of the physis. The light microscope study was carried out on all the biopsies while the ultrastructural study was carried out on 6 of the 18 patients before operation and in the same 3 after operation.

**Results:** In all specimens obtained before operating on it was possible to observe a marked distorsion of the architecture of the plate, disorganization and disarray of chondrocyte columns and replacement of the columns by enlarged, irregular lobules of cells. The amount of collagen in the extracellular matrix was decreased and consisted of haphazardly oriented nonbanded fibrils. In two of the three specimens obtained removing the osteosynthesis before the epiphysiodesis the growth plate showed a better organization. In the extracellular matrix and in longitudinal septa the collagen consists of better oriented banded fibrils with a normal thickness enmeshed in a network of branching proteoglycans. In one case it was not observed any improvement.

**Conclusions:** The physis showed to restore the normal histological organization after a period of stabilization. The physis can be considered pathological only temporary, but up today we unknow when regains it's normal histological aspect avoiding new slips. The restored enchondral ossification after stabilization is quite different from the chaotic residual ossification process observed in natural evolution of the pathology. This leads us to reflect about the importance of mechanical factors on favoring reorganization processes.

**Clinical relevance:** Within the aims of surgical treatment of patients affected by slipped-capital-femoral-epiphysis we have to include the avoidance of premature closure of the growth plate.

## **Gene expression and biochemical study of an engineered cartilage tissue from in vitro to in vivo**

Peretti G.M.<sup>^\*</sup>, Mangiavini L.<sup>^^</sup>, Deponti D.<sup>^</sup>, Scotti C.<sup>\*\*</sup>, Pozzi A.<sup>\*</sup>, Sosio C.<sup>\*</sup>, Frascini G.F.<sup>\*</sup>

<sup>^</sup> Faculty of Exercise Sciences, University of Milan

<sup>\*</sup> Division of Orthopaedics and Traumatology, San Raffaele Scientific Institute, Milan

<sup>\*\*</sup> Residency Program in Orthopaedics and Traumatology I, University of Milan

<sup>^^</sup> Residency Program in Orthopaedics and Traumatology, University of Milano-Bicocca

**Purpose:** The purpose of this work was to evaluate the maturation in vitro and in vivo of an engineered cartilaginous tissue obtained by isolated swine articular chondrocytes embedded in fibrin glue at different experimental times.

**Materials and methods:** Isolated swine articular chondrocytes were embedded in fibrin glue. Sample groups were divided as follow: Some samples were left in standard culture conditions for 1, 5 and 9 weeks. Other samples were implanted in nude mice for the same time points. The remaining samples were previously cultured in vitro for 1 and 5 weeks and then implanted in subcutaneous pouches of nude mice for 4 additional weeks.

Gross evaluation, biochemical analysis (DNA and GAGs content) and gene expression (collagen type I and type II, aggrecan and Sox 9) were performed.

**Results:** Generally, samples retrieved from nude mice experienced shrinkage and mass reduction; they also resulted in a higher content of DNA and GAG. Moreover, the level of expression of collagen type II, Sox9 and aggrecan was very high after 1 week from implantation in nude mice; in contrast, the level of collagen type I was higher after 5 and 9 weeks in vivo. Collagen type II was higher in the samples left in vivo for 5 and 9 weeks with respect to those only cultured in vitro. Opposite finding was recorded for aggrecan expression, while Sox9 was not significantly different from in vitro and in vivo

**Discussion:** The results of this study demonstrate that in vivo implantation of engineered cartilage composite results in increasing the cell proliferation and matrix formation. Pre-culturing the samples before implantation does not seem to interfere with the capacity of cell proliferation and synthesis, but, on the other hand, does not appear to ameliorate the quality of the engineered samples in this model.

## Tecnica AMIC e Chondro-Gide

Schiavone Panni A., Tartarone M., Cerciello S., Mazzotta C., Santaiti D., Vasso M.  
Facoltà di Scienze del Benessere - Dipartimento di Scienze per la Salute  
Università degli Studi del Molise, Campobasso

Le lesioni condrali a tutto spessore rappresentano una problematica frequente nella pratica ortopedica ed interessano prevalentemente pazienti giovani e giovani-adulti con uno stile di vita attivo. Le cause dei difetti condrali possono essere di natura biologica e/o di natura meccanica e l'inquadramento patogenetico è di fondamentale importanza perché, per avere successo, il trattamento delle lesioni cartilaginee deve essere sempre associato a quello della causa primitiva. Le lesioni condrali vanno valutate sulla base dell'estensione geometrica e della gravità anatomo-patologica e diverse sono le opzioni terapeutiche. Lo "shaving" condrale, la condroabrasione e la condrostabilizzazione con radiofrequenze hanno un'azione esclusivamente sintomatica. Al contrario, le tecniche di stimolazione midollare, quali le microfratture e le perforazioni, mirano a colmare il difetto condrale con una fibro-cartilagine creata dalle cellule staminali presenti nel sangue proveniente dall'osso subcondrale. Ovviamente questo nuovo tessuto fibro-cartilagineo non ha le proprietà meccaniche della cartilagine ialina e con il tempo va incontro a fenomeni degenerativi. Le tecniche di riparazione biologica mirano al ripristino di una cartilagine ialina simile a quella originaria. Tra queste tecniche vanno ricordati gli innesti osteocondrali autologhi ed omologhi, il trapianto di condrociti autologhi con l'utilizzo dei fattori di crescita, la condrogenesi indotta da matrice autologa (acronimo AMIC) ed il Chondro-Gide. L'utilizzo degli innesti osteocondrali presenta la problematica della morbidità del sito-donatore per i difetti condrali più larghi. Al contrario il trapianto di condrociti autologhi consente la facile gestione anche di lesioni più grandi, e può essere impiegato anche in pazienti con più di 40 anni. La tecnica AMIC associata all'utilizzo del Chondro-Gide, rappresenta un'opzione di recente acquisizione. Il Chondro-Gide consiste di una matrice di collagene di tipo I e III, con uno strato compatto ed uno poroso. Lo strato compatto consta di una superficie liscia con funzione di barriera poiché impedisce che le cellule mesenchimali staminali si diffondano nel cavo articolare. Lo strato poroso, situato in profondità, favorisce la penetrazione e l'adesione cellulare. Tale membrana quindi protegge e stabilizza il coagulo di sangue, offre una matrice per la formazione di un nuovo tessuto cartilagineo e consente il trattamento dei difetti cartilaginei. Rispetto ad altre tecniche di riparazione biologica, l'impianto del Chondro-Gide ha il vantaggio di richiedere un singolo intervento chirurgico. La nostra esperienza attuale sull'utilizzo del Chondro-Gide si basa su una casistica di 10 casi (5 condilo femorale mediale, 3 troclea, 2 condilo femorale laterale, 1 rotula) con un follow-up massimo di 21 mesi. I primi risultati preliminari, confermati anche da una valutazione clinica ed alla RMN, sembrano essere incoraggianti verso questa nuova tecnica che richiede comunque ancora casistiche più ampie e follow-up maggiori per poter confermare la sua validità.

## **Trattamento di difetti condrali con tecnica AMIC® (Autologous Matrix Induced Chondrogenesis) classica e tecnica AMIC® associata all'utilizzo di midollo osseo concentrato**

De Girolamo L., Bait C., Galli M., Volpi P.

IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi, Unità di Traumatologia dello Sport e Chirurgia Artroscopica, Milano

E' noto che le lesioni cartilaginee di dimensioni fino ai 2 cm<sup>2</sup> possano essere trattate con successo mediante l'utilizzo di tecniche di stimolazione midollare tra cui le microfratture (MF).

La tecnica AMIC® (Autologous Matrix Induced Chondrogenesis) combina l'efficacia delle microfratture all'utilizzo di una membrana riassorbibile collagenica per il trattamento di difetti superiori ai 2 cm<sup>2</sup>. Dopo aver eseguito le microfratture, il difetto viene ricoperto con la membrana Chondro-Gide® composta da collagene porcino di tipo I/II, che permette di mantenere il clot sanguigno richiamato delle MF in sede di lesione, contenente elementi midollari, cellule staminali e fattori di crescita.

In questo studio presentiamo i dati preliminari di uno studio prospettico randomizzato che compara la tecnica AMIC® classica alla tecnica AMIC® combinata all'utilizzo di midollo osseo concentrato autologo nel trattamento di ampie lesioni cartilaginee del ginocchio (2-8 cm<sup>2</sup>), con un follow up minimo di 6 mesi. La valutazione clinica dei risultati è basata sui punteggi della scala Lysholm Knee, IKDC e VAS. Per ciascun paziente è stata eseguita una risonanza magnetica pre-operatoria, a 6 e 12 mesi dopo l'intervento.

In tutti i pazienti sono state riscontrate differenze significative tra i punteggi pre e post-operatori delle scale utilizzate ( $p < 0.05$ ), ma non sono state osservate differenze tra i due gruppi di pazienti. Le immagini MR mostrano un buon processo di guarigione dei difetti cartilaginei. Allo studio clinico è stato inoltre associato uno studio parallelo in vitro: una piccola frazione del sangue midollare concentrato prelevato dalla cresta iliaca e del sangue richiamato dalle MF è stata processata per isolare, caratterizzare e coltivare la popolazione mesenchimale. Lo studio ha permesso di osservare una differenza in termini di concentrazione di MSC, di espressione dei marcatori di superficie e di potenziale differenziativo tra i due campioni analizzati, con un arricchimento di queste caratteristiche nel campione proveniente dalla cresta iliaca.

## **Riparazione di lesioni condriali “one stage” con frammenti di cartilagine autologa in scaffold ibrido: studio in vitro e in vivo su modello animale**

Marmotti A., Castoldi F., Rossi R., Buzzone M., Maiello A., Rossi P., Tarella C.  
Dipartimento di Ortopedia-Traumatologia e Medicina del Lavoro e Divisione di Ematologia, Osp. Mauriziano “Umberto I”, Università di Torino

Le lesioni cartilaginee sono di frequente riscontro nella chirurgia ortopedica ed esistono differenti procedure per riparare le lesioni condriali, ottenendo l’attenuazione della sintomatologia algica e il miglioramento della funzionalità. Nuove soluzioni terapeutiche per la rigenerazione osteocartilaginea, inoltre, continuano ad essere prospettate dall’ingegneria tissutale, utilizzando colture di condrociti e cellule mesenchimali, scaffold di differente composizione e fattori di crescita. In questo orizzonte terapeutico l’approccio “one stage” è particolarmente promettente perché non prevede l’espansione in vitro della sorgente cellulare, ma il suo impianto, con scaffold idoneo, direttamente nel sito di lesione; l’induzione del processo riparativo, pertanto, è ottenuta senza l’esposizione del paziente a multipli interventi chirurgici e senza i costi relativi alle colture cellulari in laboratorio. Il nostro studio introduce un nuovo sistema “one stage” per la riparazione cartilaginea utilizzando frammenti cartilaginei autologhi come sorgente cellulare e stimolo pro-condrogenico, veicolati in uno scaffold ibrido riassorbibile composto da colla di fibrina diluita, acido ialuronico (derivato esterificato Hyaff-11), e plasma ricco di piastrine.

**Studio in vitro.** Espianti cartilaginei sono stati ottenuti da: regione trocleare durante; trocleoplastica in ricostruzione del legamento crociato anteriore; testa del femore durante impianto di protesi totale d’anca; troclea e condilo femorale di animale da esperimento (coniglio, capra). Dopo opportuna preparazione, i frammenti sono stati distribuiti alla superficie dello scaffold e posti in terreno di coltura standard per 1 e 2 mesi;

**Studio in vivo.** Nel modello sperimentale su coniglio, sono stati creati difetti osteocondrali (diam 4,5 mm, profondità 4 mm) in corrispondenza della regione centrale della troclea femorale a dx in 30 animali suddivisi in 3 gruppi: Gruppo caso: la lesione è stata trattata con il costrutto completo (frammenti di cartilagine autologa + scaffold). Gruppo controllo 1: la lesione è stata trattata solo con scaffold. Gruppo controllo 2: la lesione non è stata trattata. Gli animali sono stati soppressi a 1 mese, 3 mesi e 6 mesi e il processo riparativo è stato analizzato mediante colorazione istologica (ematoss/eosina; Alcian blue) e mediante immunostochimica (anti collagene tipo 2)

**Risultati.** In vitro, si è osservata la migrazione di cellule a partire dai frammenti di cartilagine (umani e di animale) verso lo scaffold e, nel modello animale, la produzione di abbondante neomatrice positiva per collagene tipo 2. In vivo, nel gruppo caso, si è osservata all’interno del difetto osteocondrale la presenza di tessuto simil-cartilagineo; l’origine di tale tessuto è ascrivibile alla combinazione della migrazione condrocitaria dai frammenti autologhi con l’apporto di precursori mesenchimali provenienti dal tessuto osseo circostante la lesione. Nel gruppo controllo 1, il tessuto rigenerato ha aspetto omogeneamente fibrocartilagineo; nel gruppo controllo 2 il tessuto ha seguito il processo riparativo naturale nell’animale da esperimento.

**Conclusione.** Nello studio in vitro e in vivo, frammenti di cartilagine autologhi, veicolati all’interno dello scaffold ibrido, hanno rappresentato una sorgente idonea di cellule e stimoli pro-condrogenici. Sebbene ulteriori trials su grosso animale siano necessari per confermare i risultati ottenuti, il nostro studio rappresenta una nuova premessa per la riparazione “one stage” di lesioni osteocondrali.

*Corrispondenze:*

Antonio Marmotti, [antonio.marmotti@inwind.it](mailto:antonio.marmotti@inwind.it)

## **Novel nano-composite biomaterial for osteochondral tissue engineering: pilot clinical study in 30 patients at 2-year follow up**

Delcogliano M.<sup>1</sup>, Kon E.<sup>1</sup>, Filardo G.<sup>1</sup>, Di Martino A.<sup>1</sup>, Zoffoli F.<sup>1</sup>, S. Zaffagnini<sup>1</sup>, E. Arcangeli<sup>2</sup>, Pressato D.<sup>2</sup>, Marcacci M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna, Italy

<sup>2</sup> Fin-Ceramica S.p.A. Faenza, Italy

## Scaffolds nanostrutturati associati a cellule staminali mesenchimali per la rigenerazione osteocondrale

Vadalà G.<sup>1</sup>, Rainer A.<sup>2</sup>, Spadaccio C.<sup>3</sup>, Denaro V.<sup>1</sup>, Trombetta M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Orthopaedic and Trauma Surgery, Campus Bio-Medico University of Rome

<sup>2</sup>CIR – Laboratory of Chemistry & Biomaterials, Campus Bio-Medico University of Rome

<sup>3</sup>Department of Cardiovascular Science, Campus Bio-Medico University of Rome

**Introduzione:** Le applicazioni di ingegneria tissutale per la rigenerazione di osso e cartilagine prevede l'uso di cellule staminali mesenchimali (MSC) accompagnate da *scaffold* intelligenti che hanno la proprietà di rilasciare stimoli che modulino l'attività cellulare.

L'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare se le MSC cambiano il loro fenotipo quando vengono coltivate su membrane di nanofibre di Acido Poli-L-Lattico caricato con nanoparticelle di idrossiapatite (PLLA/HAp).

**Materiale e metodo:** Il nanocomposto di PLLA/HAp è stato preparato attraverso la metodica di elettrospinning. La microstruttura delle membrane è stata valutata al microscopio elettronico (SEM). Le MSC sono state caricate sulle membrane attraverso metodica di semina statica e mantenute in coltura sia in terreno basale che condrogenico.

L'attecchimento e l'adesione cellulare è stata valutata 3 giorni dopo la semina, mentre la differenziazione è stata valutata a 2 settimane attraverso immunofluorescenza per il CD29 (marker delle MSC), Sox9 ed Aggrecano (markers di differenziazione condrocitaria) al microscopio confocale.

**Risultati:** La membrana di PLLA/HAp ottenuta era composta da fibre di diametro di 7 µm con nanoaggregati di idrossiapatite dispersi (diametro medio 0.3µm). Tre giorni dopo la semina, le MSC erano ben aderenti alla fibre di PLLA/HAp con un aspetto allungato. Dopo 14 giorni di coltura le MSC erano positive per il Sox9 sia nel gruppo coltivato in terreno basale che in quello condrogenico. L'aggrecano era visibile attorno alle cellule, mentre il CD29 era espresso solo da una parte delle MSC.

**Discussione:** Questo studio dimostra che il nostro nanocomposto di PLLA/HAp ha la capacità di indurre la differenziazione delle MSC in cellule condrocitarie.

Visto che l'idrossiapatite ha proprietà osteoinduttive, il fenotipo condrogenico acquisito dalle MSC potrebbe essere sia una fase di differenziazione terminale o uno stadio intermedio nel processo di ossificazione endondrale. La presenza di cellule doppio positive per Sox9 e CD29 indica una fase di differenziazione intermedia.

Questo nanocomposito potrebbe essere uno scaffold utilizzabile per la rigenerazione di osteocondrale associato a cellule staminali mesenchimali indifferenziate.

## **PRP intra-articular injection and viscosupplementation as therapeutic treatments for early osteoarthritis: multicentre retrospective cohort study in 150 patients at 6 month follow-up**

Kon E., Buda R., Mandelbaum B., Filardo G., Timoncini T., Delcogliano M., Cenacchi A., Fornasari P.M., Giannini S., Marcacci M.  
Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna

**Introduction:** The influence of the growth factors on cartilage repair is not yet widely studied and its application in clinics is still experimental. Platelet Rich Plasma (PRP), a blood derived rich in growth factors, is a promising method for treatment of cartilage defects. Aim of this study is to evaluate and compare the efficacy of PRP and Viscosupplementation (HA) i.a. injections for treatment of severe chondropathies of the knee.

**Materials and Methods:** The study involved 150 patients affected by chondropathy, early Osteoarthritis and severe Osteoarthritis. 50 symptomatic patients were treated with 3 autologous PRP intra-articular injections and evaluated prospectively. For PRP production 150 ml of venous blood were collected from each patient and underwent a double centrifugation, increasing platelet concentration. All patients were clinically evaluated at the enrolment, at the end of the treatment, at 6 months follow up. The results obtained were also compared with two homogeneous group of patients treated in two different centers with HA injections, one group was treated with injections of High Molecular Weight Hyaluronan and the other group was treated with Low Molecular Weight Hyaluronan. IKDC and EQ-VAS scores were used for clinicevaluation and patient satisfaction and functional status were alsorecorded.

**Results:** The comparison between the outcomes of the three groups was statistically significant ( $p < 0,0005$ ), reporting a superiority of PRP group at any times of F-up.

**Conclusions:** Autologous PRP injections demonstrated more and longer efficacy than HA injections in reducing pain, symptoms and recovering articular function in patients affected by severe chondropathies of the knee.

## **Amniotic fluid stem cells: a promising resource for cellular therapy in orthopaedics**

Pantalone A.<sup>1</sup>, Natale M.A.<sup>1</sup>, Guerra G.<sup>1</sup>, Antonucci I.<sup>2,3</sup>, Stoppia L.<sup>2,3</sup>, Salini V.<sup>1</sup>, Orso C.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Orthopedic and Traumatologic Division, “G. d’Annunzio” University, Chieti-Pescara; <sup>2</sup>Department of Biomedical Sciences, “G. d’Annunzio” University, Chieti-Pescara; <sup>3</sup>Aging Research Center, C.E.S.I., “G.d’Annunzio” University Foundation, Chieti-Pescara.

Amniotic fluid represents an important source of stem cells to be used for regenerative medicine, given their apparent advantages of accessibility and pluripotentiality as compared to embryonic stem cells and other kinds of adult stem cells, respectively. In the present study, we report a novel single step protocol for the osteoblastic differentiation of human amniotic fluid cells.

The described protocol is able to provide osteoblastic cells producing nodules of calcium mineralization within 18 days from withdrawal of amniotic fluid samples. These cells display a complete expression of osteogenic markers (COL1, ONC, OPN, OCN, OPG, BSP, Runx2) within 30 days from withdrawal.

In order to test the ability of these cells to proliferate on surfaces commonly used in orthopaedics, we carried out cultures onto titanium plate and screw. Electron microscopy analysis evidenced the good cell growth on these surfaces: adherent cells were found to cover the whole surface of titanium plate and screw.

This protocol shows the ability of producing osteoblastic cells from amniotic fluid samples in a very short time, being these cells fully differentiated within one month from withdrawal. Although osteoblastic progenitors can be successfully obtained from bone marrow stromal cells, the use of amniotic fluid as a source of these cells is of relevance since AFS can be easily obtained from routine clinical amniocentesis specimens that would otherwise be discarded. Thus, it is possible to suggest that banking of these stem cells will provide in the future a relevant source both for autologous therapy in the adulthood and for the transplant in HLA matched recipients.

## Effetto delle OU su PRP umano in sospensione addizionato a colture di osteoblasti di topo

Moretti B., Notarnicola A., Tamma R.\*, Zallone A.\*, Moretti L., Patella S., Citarella C.\*\*,  
Dimonte D.\*\*, Patella V.

II e III U.O. di Ortopedia e Traumatologia, \* Dipartimento di Istologia e Anatomia Normale, \*\* Serv.  
Immunoematologia e Centro Trasfusionale, Facoltà di Medicina e Chirurgia - Policlinico Universitario di Bari  
Piazza Giulio Cesare, 11 - 70124 Bari  
e-mail: [b.moretti@ortop2.uniba.it](mailto:b.moretti@ortop2.uniba.it)

**Introduzione:** Le onde d'urto (OU) sono una metodica terapeutica usata da ormai vent'anni con promettenti risultati. Essa sfrutta il fenomeno della cavitazione, provocato da onde acustiche ad elevata intensità e bassa frequenza, in grado di accelerare i processi biologici di riparazione dei tessuti, tramite produzione di ossido nitrico, neoangiogenesi, reclutamento di cellule staminali e successiva differenziazione e proliferazione cellulare. Questi effetti sono stati spiegati da numerosi studi sperimentali che ne hanno investigato gli effetti in vitro: è stato dimostrato che gli osteoblasti rispondono con un aumento della permeabilità di membrana e un aumento di produzione di IL-10 e CD-105 e successiva stimolazione della proliferazione e differenziazione, i condrociti riducono la produzione di IL-10 e TNF-alfa contrastando l'evoluzione dell'osteoartrosi, i tenociti incrementano la proliferazione mediante la produzione di TGF-beta-1, ossido nitrico e collagene. Ma durante l'erogazione di un trattamento di OU, nel target focale sono presenti linee cellulari diverse, le cui interazioni necessitano di essere approfondite. Abbiamo pertanto avviato uno studio sperimentale in cui le OU sono state somministrate su PRP (Plasma Arricchito di Piastrine) che, dopo trattamento, è stato addizionato a colture di osteoblasti. La valenza dello studio è doppia: valutare l'effetto di OU sulle piastrine, il cui rilascio di fattori di crescita è fondamentale nella modulazione della rigenerazione ossea e verificare la possibilità di associare le OU con l'emergente metodica di infiltrazione di fattori di crescita, attualmente proposta per il trattamento di varie patologie muscolo-scheletriche.

**Materiali e metodi:** Mediante aferesi di sangue venoso abbiamo ottenuto il PRP, che è stato successivamente aliquotato con medium DMEM in provette da 1.8 ml e sottoposto a trattamento con OU, utilizzando un generatore elettromagnetico STORZ- Minilith SL1 a densità di energia di 0,17 mJ/mm<sup>2</sup> e numero di 500 impulsi. Altre provette di PRP non hanno subito trattamento, per essere utilizzate come controllo. Successivamente abbiamo aggiunto il PRP a colture di osteoblasti estratti e purificati da ossa di teca cranica di topi neonati per confrontare l'attività cellulare tra osteoblasti con l'aggiunta di PRP e osteoblasti con PRP trattato con OU. Gli esperimenti di Real time PCR e Western blot ci hanno permesso di valutare l'espressione di IGF-1, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5, collagene I, osteocalcina e RUNX2 a 24, 48 e 72 ore dalla somministrazione di OU.

**Risultati:** Abbiamo osservato che, trattando con le OU il PRP, quando esso è stato addizionato agli osteoblasti, si è verificato prevalentemente un incremento di produzione delle IGFs e delle IGFBP-s dalla 48 alla 72 ora dal trattamento, con uno stimolo alla proliferazione e differenziazione osteoblastica. Anche la valutazione della secrezione delle proteine della matrice ossea, la cui produzione è modulata dal fattore di trascrizione RUNX2, ha presentato un incremento nella coltura di osteoblasti addizionata al PRP stimolato con OU.

**Discussione:** Il PRP è infatti una concentrazione di piastrine umane ottenuta tramite aferesi e contenente principalmente i sette fattori di crescita sintetizzati dalle piastrine: i tre isomeri dei fattori di crescita di derivazione piastrinica (PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB), le due forme del TGF beta (TGF-beta1 e TGF-beta2), il fattore di crescita endoteliale (VEGF) e il fattore di crescita epiteliale (EGF). Le prime applicazioni cliniche del PRP sono state in chirurgia maxillo-facciale, ottenendo soddisfacenti risultati di rigenerazione ossea nei difetti mandibolari. Satisfacenti risultati stanno emergendo anche dalle successive applicazioni in ortopedia e medicina dello sport. Abbiamo pertanto voluto valutare la possibilità di associare questa metodica terapeutica con le Onde d'Urto, la cui applicazione in ortopedia è validata da più di vent'anni di risultati soddisfacenti nell'ambito della rigenerazione tissutale sia ossea sia tendinea. Contestualmente questo lavoro ci ha dato la possibilità di valutare quali effetti le OU determinano sulle piastrine che vengono a ritrovarsi nel campo focale durante un trattamento di litotrixxia ortopedica. Abbiamo ritrovato che, trattando con le OU il PRP, quando esso è stato addizionato agli osteoblasti, si è verificato prevalentemente un incremento di produzione delle IGFs e delle IGFBP-s alla 48° e 72° ora dal trattamento, con uno stimolo alla proliferazione e differenziazione osteoblastica. Anche la valutazione della secrezione delle proteine della matrice ossea, quali il collagene di I tipo, la cui produzione è modulata dal fattore di trascrizione RUNX2 ha presentato un incremento nella coltura di osteoblasti addizionata al PRP stimolato con OU. Le OU hanno quindi determinato, in maniera indiretta mediante modulazione del PRP, uno stimolo in senso osteogenetico, convalidando la possibilità di associare le due metodiche di trattamento, litotrixxia e infiltrazione di fattori di crescita. Inoltre, le OU hanno dimostrato di produrre un effetto sinergico anche sulle piastrine presenti localmente nel campo focale, potenziando l'azione di osteogenesi indotta direttamente sugli osteoblasti durante i trattamenti in vivo.

## **Effect of platelet rich plasma on differentitaion and activation of osteoclasts obtained from human blood precursors**

Fotia C.<sup>1</sup>, Cenni E.<sup>1</sup>, Avnet S.<sup>1</sup>, Salerno M.<sup>1</sup>, Baldini N.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory for Pathophysiology of Orthopaedic Implants, Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna <sup>2</sup>Department of Human Anatomy and Musculoskeletal Pathophysiology, University of Bologna

Platelet rich plasma (PRP) is used in orthopaedic surgery in order to accelerate the repair process of bone, because of the release of osteogenic growth factors from activated platelets. Till now, the effects of PRP on osteoclasts have been only scarcely investigated, even if these cells are crucial for bone remodelling. The aim of this research was the evaluation of the effects of activated platelets on osteoclastogenesis. Therefore, the effects of supernatants released from thrombin-activated platelets (PRP) were examined on osteoclast differentiation from human blood precursors. We both evaluated the ability of PRP to induce osteoclast differentiation without the addition of the osteoclast specific differentiation factor, the Receptor activator of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) ligand (RANKL), and the ability of PRP to influence the RANKL-induced osteoclast differentiation process. In both assays, the incubation with PRP supernatant did not significantly affect the fusion of osteoclast precursors and the formation of tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP)-positive multinucleated cells that are able to form the F-actin ring. However, the release of collagen fragments derived from osteoclast-mediated bone collagen degradation was reduced, suggesting a possible inhibitory effect of the substances released by PRP on osteoclast activation. Similarly, after incubation with PRP supernatant, mRNA expression specific for cathepsin-K, RANK and vitronectin receptor were decreased in respect to untreated sample. In conclusion, this is the first in vitro report on the effect of PRP on human osteoclast precursors; we demonstrated that PRP does not affect osteoclast formation at early stage of differentiation but interferes with the complete differentiation process and osteoclast activation. To clarify and to improve the potential therapeutic approach of PRP, further clarification on the exact effect of PRP on osteoclasts in vivo is needed.

This research was supported by a grant from the “Fondazione Monte dei Paschi di Siena”.

## Uso del concentrato di cellule midollari arricchito con gel di fibrina ricco in piastrine per Artrodesi vertebrale posterolaterale

Denaro V., Vadalà G., Di Martino A., Papapietro N., Tirindelli M.C.  
Department of Orthopaedic and Trauma Surgery, Campus Bio-Medico University, Roma

Bone marrow cells (BMCs) from iliac crest aspiration can be concentrated in the operating room as source of osteoprogenitor cells and platelet-rich fibrin (PRF) can be obtained from peripheral blood cells as source of growth factors.

The objective of the study was to determine whether bone allograft combined with BMC concentrate and PRF can give rise to adequate spinal fusion.

A prospective radiographic study has been conducted on 10 patients with posterolateral-instrumented fusion for degenerative lumbar disease with at least 1-year follow-up. A fresh frozen bone allograft alone and a mixture of autologous BMC concentrate and PRF with fresh frozen bone allograft was apposed in the right and left posterolateral side, respectively. Single-level fusion was conducted in 4 patients while two or more levels in 6. An independent radiologist evaluated patients' 6 and 12 month CT scans and x-rays. Fusion mass was considered "good" when there was a continuous block of bone without radiolucent areas. No intersegmental bony bridging fusion was considered "poor".

**Results:** Plain radiography and computed tomography showed good right fusion masses (allograft alone) in 4 patients and poor in 6; good left masses (BMC concentrate and PRF plus allograft) in 9 patients and poor in 1.

**Conclusion:** The differences detected between right-side and left-side masses show an advantage in adding BMC concentrate and PRF to the bone allograft. This indicates that the osteoprogenitor cells of the bone marrow and the growth factors of the PRF are able to increase the potential of bone allograft to improve spinal fusion. However, a larger number of cases and longer follow-up are needed to generalize the indication.

## Effetti delle vitamine MK-7 e D sulla proliferazione e differenziamento delle MSC

Lecconi S., Manzotti S., Tiano L., Littarru G.P., Greco F.  
Clinica Ortopedica – Università Politecnica delle Marche, Ancona

**Introduzione:** Esiste già da tempo un grande interesse intorno alla ricerca di sostanze con proprietà osteoinduttive soprattutto per una loro possibile applicazione clinica nel potenziamento della riparazione dell'osso, includendo in questo concetto quello di accelerazione del processo di guarigione delle fratture. Fattori di crescita, cellule infiammatorie e cellule staminali mesenchimali risultano svolgere un importante ruolo tra i meccanismi coinvolti nel processo di osteogenesi riparativa. Un considerevole numero di dati indica come la vitamina D, attraverso la regolazione del profilo dell'espressione genetica degli osteoblasti ed osteoclasti e la vitamina K, attraverso la carbossilazione dei residui di acido glutammico dell'osteocalcina, siano essenziali per mantenere la corretta omeostasi del metabolismo osseo. Scopo del presente studio è quello di verificare gli effetti in senso differenziativo e proliferativo della vitamina K<sub>2</sub>, in particolare il menachinone 7 (MK-7), da sola ed in associazione con la vitamina D<sub>3</sub> su cellule staminali mesenchimali umane

**Materiale e metodo:** Cellule staminali mesenchimali umane (hMSCs), isolate da prelievo di sangue midollare e caratterizzate al citofluorimetro, sono state messe in coltura con vitamina MK-7 e vitamina D, da sole ed in associazione. Ciascun gruppo è stato ulteriormente suddiviso in due sottogruppi: uno a cui la somministrazione delle vitamine è stata effettuata una sola volta ed uno a cui le vitamine sono state somministrate a cambi alterni del medium di coltura. La proliferazione cellulare è stata valutata a 3, 10 e 20 giorni mediante metodica colorimetrica MTT. Il differenziamento cellulare, in senso osteoblastico, è stato valutato a 10 e 20 giorni mediante espressione di collagene tipo 1, osteocalcina ed osteonectina al citofluorimetro ed espressione di osteocalcina carbossilata con metodica ELISA. Per permettere una corretta analisi sia della proliferazione che del differenziamento cellulare è stato costituito un gruppo di controllo a cui non sono state somministrate le vitamine.

**Risultati:** Il test con MTT mostra un iniziale incremento della proliferazione cellulare a 3 giorni, successivo decremento a 10 giorni ed una ripresa ai 20 giorni. Tale andamento è più evidente nel gruppo di cellule trattate con somministrazione ripetuta delle vitamine MK-7 e D in associazione. Per quanto riguarda la valutazione del differenziamento cellulare a 10 giorni, non sono evidenti significative variazioni dell'espressione del collagene e dell'osteonectina in nessun gruppo di cellule, mentre si nota una maggiore espressione dell'osteocalcina sia nel gruppo con somministrazione ripetuta di vitamina D da sola che nel gruppo con somministrazione ripetuta delle due vitamine in associazione. A 20 giorni l'espressione di tali proteine segue l'andamento del precedente tempo. All'analisi ELISA si evidenzia che nel gruppo di cellule trattate con somministrazione ripetuta delle due vitamine in associazione c'è una maggiore espressione della componente carbossilata dell'osteocalcina.

**Discussione e conclusione:** Dall'analisi dei dati risulta soprattutto evidente che la somministrazione ripetuta dell'associazione della vitamina MK-7 con la vitamina D favorisca sia la proliferazione delle cellule hMSCs che il loro differenziamento verso la linea osteoblastica. Finora, in letteratura, è stata posta particolare attenzione sul ruolo preventivo di tali vitamine nei confronti di fratture patologiche secondarie ad osteoporosi, ma poco è stato detto circa un loro possibile impiego come fattori osteoinduttori nel processo di osteogenesi riparativa. Se ulteriori studi su modello animale e successivamente sull'uomo confermassero i dati ottenuti in vitro, si potrebbe pensare all'utilizzo di tali vitamine come possibile alternativa a basso costo per il trattamento di patologie come i ritardi di consolidazione o le pseudoartrosi.

## Caratterizzazione di cellule stromali mononucleate isolate a cellule giganti dell'osso

Salerno M.<sup>1</sup>, Avnet S.<sup>1</sup>, Alberghini M.<sup>2</sup>, Giunti A.<sup>1</sup>, Baldini N.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio di Fisiopatologia degli Impianti Ortopedici e <sup>2</sup>Servizio di Anatomia e Istologia Patologica, Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna

Il tumore a cellule giganti dell'osso (TCG) possiede una natura prevalentemente benigna, ma presenta a volte un decorso clinico imprevedibile. Il TCG può infatti andare incontro a recidive locali, e più raramente originare metastasi polmonari o degenerare in sarcoma.

Osservando l'istologia del tumore è possibile riconoscere una componente cellulare gigante multinucleata responsabile del processo osteolitico (GC), una componente monocitaria mononucleata CD68+ ed una componente mononucleata stromal-like (SC).

Nonostante i numerosi studi di cui il TCG è stato oggetto, la sua istogenesi non è ancora stata chiarita. Vi sono numerose indicazioni che le SC possano rappresentare la componente neoplastica della lesione.

L'obiettivo di questo studio è stato analizzare attraverso saggi funzionali e molecolari alcune caratteristiche biologiche della popolazione isolata dal TCG e propagabile *in vitro* (SC), come la velocità di proliferazione, la capacità clonogenica e tumorigenica, l'espressione di marcatori della linea osteogenetica e la capacità di induzione del differenziamento degli osteoclasti. Le SC sono state confrontate con una linea cellulare di osteosarcoma umano (Saos-2) e con cellule stromali mesenchimali da midollo osseo (MSC) indotte a differenziare in osteoblasti.

I risultati ottenuti hanno evidenziato che le SC possiedono una maggiore capacità clonogenica rispetto alle MSC, senza però assumere un comportamento neoplastico *in vitro*. È stato inoltre dimostrato che le SC esprimono, sebbene in modo variabile, alcuni dei tipici marcatori osteogenici, mancando però della capacità di differenziare completamente in osteoblasti maturi. È stata infine dimostrata la capacità di esercitare un'attività chemiotattica sui precursori degli osteoclasti.

I risultati ottenuti da questo studio suggeriscono che le SC isolate da TCG possano costituire una popolazione osteoblast-like, capace di indurre il differenziamento della popolazione osteoclastica allo stesso livello delle MSC, e priva di proprietà neoplastiche *in vitro*. La proliferazione delle cellule potrebbe essere indotta da un circuito paracrino in cui sono coinvolte le GC. La causa della presenza di un numero così elevato di GC nella lesione resta ancora da chiarire.

## **Straight tapered stem: 196 patients with a minimum 10 yr follow- up**

Gasparini G.

Orthopaedic Department, School of Medicine, Magna Græcia University, Catanzaro

**Background.** Poor results were observed at medium term follow-up (FU) after first and second generation cementless stems implantation in total hip arthroplasty (THA). Revision rate up to 24% is reported with anatomic stems; stress-shielding rate up to 50%, thigh pain rate up to 21%, loosening rate up to 20% and osteolysis rate up to 29% were reported with cylindrical stems. A third generation tapered stem, the Synergy stem, was introduced in 1996 to rise such weakness points.

**Material and methods.** A retrospective, cohort study was carried out in two academic centers (London, Toronto, Canada & Rome, Italy) on 232 primary THA in 215 patients with a 10 to 12 yrs FU. Mean age at surgery was 60 yrs (18-82), 95 patients were males and 120 females. Thirty-six patients were lost at FU (13 died before the 10 yrs mark, 22 changed residency, 1 not willing to be seen) with no problems related to the replaced hip. Remained at FU 196 THA. Patients selection: Dorr type A and B femurs suitable for receive a Synergy stem. Its characteristics are the following: Ti-6Al-4V, straight, tapered, 3D wedge cross-section, proximal antirotational fins, low-profile neck, neck angle 131°, metaphyseal part porous or HA coated, diaphyseal part grit blasted, polished tip, surgeon-friendly ancillary instruments. Clinical results of the 196 THA with more than 10 yrs of FU were assessed preoperatively and postoperatively at 5 and 10 or 11 or 12 yrs by means of standard evaluation tools: SF12, WOMAC and Harris Hip Score. Thigh pain frequency and intensity were also scored. Radiographic analysis was focused on stem alignment, bone ingrowth, radiolucent lines presence, width and progression, stress-shielding, heterotopic ossification (HTO). Student paired t-test and Kaplan-Meier survival analysis were used for statistical analysis.

**Results.** All clinical evaluation tools showed both at 5 years FU and at latest FU (10-12 years) a statistically significant ( $p=0,001$ ) improvement compared to the preoperative scores. We observed a not constant thigh pain in 7 patients (5,5%). Nineteen patients (10%) underwent revision due to polyethylene wear (6 cases), late periprosthetic fracture (5 cases), subsidence (2 cases), instability (3 cases), infection (3 cases). Cumulative survival rate was 97% at 2 and 5 years, 90% at 10 years. Stem related revisions were the 2 cases of subsidence, both related to occult intraoperative calcar crack and early revised (within 1 year); cumulative stem-related survival rate at 10 years was 99%. Alignment was varus in 9 cases and valgus in 3. Bone in-growth was observed in 194 patients (98%). Radiolucent lines were uncommon, non progressive, less than 2 mm, in Gruen zones 2 and 6. Stress-shielding was present as cortical reaction in 5 femurs in Gruen zones 3 and 5. Thirty-four cases of HTO (grade I and II in 27 case and grade III in 7 cases) were observed.

**Conclusions.** The Synergy stem demonstrates excellent clinical and radiographic results at 10-12 yerars FU in 196 patients. Survivorship (with stem revision as end point) is 99% at 10 years. Thigh pain is uncommon and the level of activity and autonomy is excellent. Radiographically bone ingrowth is evident in all stems and radiolucent lines are “benign” with no aseptic loosening. Attention must be paid at the moment of stem press fit insertion to avoid occult proximal femoral fractures that may require revision surgery.

## Changes in coagulation and fibrinolysis in osteonecrosis of the femoral head

Cenni E.<sup>1</sup>, Fotia C.<sup>1,2</sup>, Rustemi E.<sup>2</sup>, Yuasa Y.<sup>3</sup>, Caltavuturo G.<sup>4</sup>, Giunti A.<sup>1,2</sup>, Baldini N.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory for Pathophysiology of Orthopaedic Implants, Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna, <sup>2</sup>Department of Human Anatomy and Musculoskeletal Pathophysiology, University of Bologna, <sup>3</sup>Department of Orthopaedic Surgery, Mie University, Japan, <sup>4</sup>Servizio di Immunoematologia e Trasfusione, Ospedale Maggiore, Bologna

It is generally considered that osteonecrosis (ON) of the femoral head may result from blood vessel occlusion for thrombosis, leading to increased intraosseous venous pressure, reduced arterial flow, hypoxic bone death and trabecular collapse. Inherited or acquired thrombophilia and hypofibrinolysis are considered important risk factors for idiopathic ON of the femoral head, even though the aetiology has not been fully elucidated. Only seldom patients with ON refer a familiar or personal history of thromboembolism. Also secondary ON could be favoured by thrombophilia, which represents an additional risk factor. The aim of our research was to investigate the association of ON with coagulation abnormalities. We compared the activation of coagulation and fibrinolysis in idiopathic ON with corticosteroid-associated and with post-traumatic ON, as well as with normal subjects. Twelve patients with idiopathic ON, 12 with corticosteroid-associated ON, 7 with post-traumatic ON and 50 healthy controls, comparable to the patients for age and gender, were enrolled. Familiar and personal history of thrombotic events was investigated. Inherited (factor V Leiden mutation; prothrombin gene mutation; PAI-1 gene polymorphism) and acquired (antithrombin III, protein C, D-dimer) thrombophilia markers, and fibrinolytic proteins (plasminogen, PAI-1), were measured. Plasminogen and plasmatic PAI-1 were higher in idiopathic ON than in controls. Protein C was significantly decreased and D-dimer, which is a marker not only of fibrinolysis but also of thrombin generation, was significantly increased in corticosteroid-associated ON. Post-traumatic ON did not show any significant differences with controls for the coagulative and fibrinolytic results. However, a significant association with obesity, familiarity for thromboembolies and acquired diseases predisponent to hypercoagulability was demonstrated. Obesity is a known risk factor for vascular thrombotic complications. It could both predispose to more frequent and severe femur traumatism, and to the thrombotic occlusion of vessels of the femoral head, in association with other risk factors for thrombosis. The frequency of genetic mutations in ON patients was not significantly different from controls. Interestingly, cigarette smoking was recorded in about 80% of patients with idiopathic or secondary ON. We hypothesize that the pathogenesis of idiopathic ON mainly depends on hypofibrinolysis, as demonstrated by the plasmatic PAI-1 increase. The increase of plasminogen is probably a consequence of the inhibition of plasminogen activator, determined by PAI-1. On the contrary, the pathogenesis of corticosteroid-associated ON is mainly determined by hypercoagulability, as shown by protein C decrease and D-dimer increase. Hypercoagulability could be determined by corticosteroid treatment itself or even by the associated-disease. Smoking habit, which could induce hypofibrinolysis and vascular damage, is a risk factor for thrombophilia. Therefore, the evidence of hypofibrinolysis in idiopathic ON and hypercoagulability in corticosteroid-associated ON could suggest that the pathogenesis of ON of the femoral head depends on acquired thrombophilia, eventually favoured by nicotine.

The research was supported by a grant from the "Fondazione del Monte di Bologna e Ravenna".

## **Basi biomolecolari della morte cellulare indotta da corticosteroidi**

Rippo M.R., Tomassoni Ardori F., Villanova F., Graciotti L., Busilacchi A.\*, Manzotti S.\*, Procopio A.

Dipartimento di Biologia Molecolare e Terapie Innovative; Patologia Generale - \*Clinica Ortopedica, Università Politecnica delle Marche, Ancona

La perdita di osso indotta dai glucocorticoidi rappresenta la forma prevalente di osteoporosi secondaria. Tale fenomeno è dovuto, almeno in parte, all'alterazione della suscettibilità all'apoptosi sia degli osteoclasti che degli osteoblasti. Questo studio in vitro mostra gli effetti del desametasone sull'apoptosi dei pre-osteoblasti e degli osteoblasti maturi indotta da stimoli intrinseci, come la deprivazione di fattori nutritivi, e dal recettore di morte CD95 (Fas). Utilizzando i modelli cellulari hFOB1.19 (cellule osteoblastiche fetali umane) ed MG63 (linea di osteosarcoma), abbiamo osservato che dosi subletali di desametasone sensibilizzano i pre-osteoblasti, ma non gli osteoblasti maturi, alla morte cellulare programmata. Tale morte, avviene per apoptosi. Infatti sia la frammentazione del DNA che la dissipazione del potenziale transmembrana dei mitocondri dipendono dall'attivazione delle caspasi, gli enzimi principalmente coinvolti in tale processo. L'aumento della suscettibilità alla morte dei pre-osteoblasti pretrattati con il desametasone sembrerebbe dipendere dalla sua capacità di inibire l'espressione della proteina antiapoptotica survivina, che, al contrario aumenta negli osteoblasti maturi sottoposti allo stesso trattamento. Inoltre nelle cellule mature il desametasone sembrerebbe indurre, sebbene in misura minore, anche l'espressione di Bcl-2 e FLIP nelle cellule di osteosarcoma. Tutti questi effetti sono inibiti dall'antagonista dei glucocorticoidi RU486 ad indicare che l'azione del desametasone è specifica e che, inoltre, dipende dal recettore dei glucocorticoidi. Infine, gli esperimenti di silenziamento genico di survivina e Bcl-2 con vettori lentivirali, hanno mostrato che entrambe le proteine sono essenziali per la sopravvivenza sia dei pre-osteoblasti che degli osteoblasti. Nel complesso i dati ottenuti suggeriscono un nuovo meccanismo per chiarire gli effetti dei glucocorticoidi sulla perdita dell'osso che prevede principalmente la perdita per apoptosi dei pre-osteoblasti piuttosto che degli osteoblasti maturi. Inoltre essi suggeriscono come possibile causa della resistenza alla morte delle cellule di osteosarcoma indotta dai glucocorticoidi la iper-espressione delle proteine anti-apoptotiche survivina, Bcl-2 e FLIP.

## **Genistein aglycone exhibits anti-osteoporotic properties: new experimental and clinical findings**

Marini H.<sup>1\*</sup>, Adamo E.B.<sup>1</sup>, D'Anna R.<sup>2</sup>, Mauro S.<sup>3</sup>, Squadrito F.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemical, Physiological and Nutritional Sciences, Section of Physiology and Human Nutrition;

<sup>2</sup>Department of Obstetrical and Gynecological Sciences; <sup>3</sup>Department of Special Surgery, Section of Orthopaedics and Traumatology, <sup>4</sup>Department of Clinical and Experimental Medicine and Pharmacology, Section of Pharmacology; University of Messina

Osteoporosis is a systemic disease characterized by reduced bone mass and structural deterioration of bone tissue leading to enhanced bone fragility and a consequent increase in fracture risk. The rate of bone loss further increases in postmenopausal women when the ovaries stop making estrogens. Since clinical practice has found that women undergoing treatment for osteoporosis require long-term dosing therapeutic regimens that offer no symptomatic relief and may cause side effects many therapeutic alternatives have been proposed.

Epidemiological data support a robust relationship between soy isoflavones, fracture incidence and bone mineral density in osteopenic, postmenopausal women, suggesting that an high isoflavone intake restores the metabolic balance of bone formation and resorption.

Isoflavones are a subgroup of phytoestrogens mainly contained in soy and soy products that possess multiple effects on physiological systems, including discrete effects on estrogen receptors and a variety of other cell signalling pathways. Although it is difficult to identify the specific isoflavone most responsible for preventing or restoring bone loss, a review of current literature based on new encouraging preclinical and clinical data indicates that aglycone genistein appears to be the most effective isoflavone in preserving bone health. Genistein aglycone through a peculiar anti-osteoporotic dual mode of action can positively regulate bone cell metabolism rebalancing bone turnover towards bone formation. The positive results achieved by genistein aglycone intake in terms of efficacy and safety have stimulated the development of new specially formulated medical food products for the clinical management of postmenopausal bone loss.

\*Corresponding author

Department of Biochemical, Physiological and Nutritional Sciences, Section of Physiology and Human Nutrition, Torre Biologica 5th floor, Policlinico "G. Martino", Via C. Valeria, 98125 Messina. E-mail: hrmarini@unime.it

## **Fratture da stress nei tersicorei professionisti: inquadramento epidemiologico e nostro approccio diagnostico-terapeutico**

Albisetti W.<sup>1</sup>, De Bartolomeo O.<sup>2</sup>, Perdetti L.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Istituto di Scienze Ortopediche, Traumatologiche, Reumatologiche, e Riabilitative Università degli Studi di Milano. Servizio Medico del Teatro alla Scala di Milano

<sup>2</sup> Università degli Studi di Milano, Scuola di Ballo Teatro alla Scala.

<sup>3</sup> I Scuola di Specializzazione in Ortopedia e Traumatologia, Università degli Studi di Milano

Le fratture da stress si formano quando l'osso non è in grado di adattarsi adeguatamente agli stimoli meccanico durante lo svolgimento di un'attività lavorativa, atletica e/o artistica ripetitiva. Molti sono i fattori di rischio intrinseci ed estrinseci implicati nella genesi di questa condizione clinica e anatomo-patologica, sebbene non tutti gli Autori siano d'accordo sul meccanismo fisiopatogenetico che determina l'indebolimento della struttura ossea, la sua reazione come tentativo di riparazione e, in ultimo, il formarsi della frattura. Nella maggior parte dei casi, le lesioni da overuse si localizzano a livello della gamba (20%), della caviglia (20%) e del piede (15%). Le lesioni da overuse sono dovute a microtraumi ripetuti che conducono a danni tissutali locali, vale a dire a danno intra- ed extracellulare. Questo assume grande veridicità nel momento in cui l'atleta/artista modifica il suo modo di allenarsi (frequenza e/o intensità), i materiali usati, il terreno di gioco, la dieta. Nel corso della relazione verranno enunciati i fattori di rischio generici delle fratture da stress e si farà particolarmente richiamo alle caratteristiche anatomiche e tecniche dei ballerini.

Nel corso del periodo 2007-2008, su un campione di 210 ballerini appartenenti alla Scuola di Ballo e al Corpo di Ballo del Teatro alla Scala di Milano, sono state osservate 27 fratture da stress, localizzate a livello della cresta tibiale anteriore e a livello della base del II e III metatarsale. I meccanismi eziopatogenetici per cui si giunge alla formazione della frattura da stress alle tibie e ai metatarsali sono differenti, influenzati dal tipo di lavoro, dalle doti anatomiche/tecniche, dallo stato alimentare e ormonale, dal carico di lavoro.

Come verrà descritto, in caso sia ipotizzata la presenza di una frattura da stress per via dell'anamnesi (tipo e sede del dolore), della clinica e dell'eventuale valutazione di errori tecnici durante i fondamentali della danza classica, noi preferiamo eseguire una indagine rx grafica e RMN del segmento. In caso di positività di questi esami viene iniziato un trattamento con onde d'urto extracorporee con dosaggio energetico valutato in base al tipo di frattura da stress, la sede, la durata della sintomatologia. In alcuni casi abbiamo eseguito una TAC per meglio valutare l'estensione della frattura e i suoi rapporti con strutture nobili, come nel caso di alcuni allievi con epifisi ancora fertili.

Riteniamo utile controlli periodici con Rx e RMN, sebbene la decisione di riammissione alle lezioni, con carico ed intensità di lavoro variabile da individuo ad individuo, veniva valutato in base alla sintomatologia residua a distanza di 7-15 giorni dal termine dell'ultima applicazione di onde d'urto. Durante il trattamento non è stato necessario applicare immobilizzazioni gessata o impedire in modo assoluto il carico. I ballerini potevano svolgere sbarra a terra stretching, nuoto così da mantenere un buon tono trofismo muscolare e una buona elasticità articolare e muscolo-tendinea, caratteristica essenziale per i ballerini professionisti.

Riteniamo le onde d'urto un valido strumento per permettere il ristabilirsi dell'omeostasi ossea nei casi di frattura da stress.

## Platelet-rich plasma nella riparazione del tessuto muscolare in modello sperimentale su ratto

Gigante A., Del Torto M., Busilacchi A., Manzotti S., Procopio A.\*, Greco F.

Clinica Ortopedica e Traumatologica e \*Patologia Sperimentale – Dipartimento di Patologia Molecolare e Terapie Innovative – Università Politecnica delle Marche, Ancona

**Introduzione.** Il PRP (platelet-rich plasma), detta anche platelet gel o comunemente pappa piastrinica è una sospensione di piastrine concentrate ottenuto a partire da un prelievo di sangue di pochi ml. Il buffy coat, dopo una prima centrifugazione viene ulteriormente separato in PPP (platelet poor plasma) e PRP. Al termine di questa fase si ottiene un gel che, attivato con CaCl e trombina, libera dai granuli  $\alpha$  piastrinici un pool di fattori di crescita quali IGF, EGF, MGF, bFGF, PDGF, HGF, VEGF<sup>1,2</sup>, notoriamente coinvolti nell'accelerazione della riparazione tissutale. Scopo del presente studio è quello di verificare la possibilità di accelerare il processo di riparazione di difetti muscolari sperimentalmente realizzati su ratto Wistar e successivamente riempite con quantità standard di PRP. A tutt'oggi, secondo le nostre conoscenze, il nostro è il primo studio mai eseguito di sperimentazione della PRP su lesioni muscolari provocate in modello animale.

**Materiali e Metodi.** *Ottenimento PRP.* Il PRP è stata ottenuta dal sangue di 2 ratti attraverso una puntura intracardiaca. Il sangue prelevato è stato posto in CPD(citrato-fosfato destrosio) in rapporto 1 ml CPD ogni 5 ml di sangue. Il campione è stato sottoposto a due centrifugazioni secondo quanto previsto dal produttore (*Cascade- Tissuelab- Italy*). Il gel ottenuto è stato attivato per liberare i fattori di crescita con CaCl e Trombina. *Procedura chirurgica.* Sono state praticate su 20 ratti lesioni muscolari sul muscolo longissimum dorsi. Tale intervento è stato eseguito bilateralmente in ciascun ratto. Per ogni ratto una lesione è stata trattata con PRP; l'altra lesione non è stata trattata ed è stata praticata in qualità di controllo. La scelta della lesione da trattare e di quella da utilizzare come controllo è stata randomizzata. La PRP è stata iniettata in corso di intervento dopo la sezione muscolare murina. Per meglio identificare in profondità la sede lesionata, sul fondo della lesione è stato depositato un marcatore in PVC in cui nel soggetto trattato è stata caricata una dose standard di gel, mentre nel non trattato è stato posizionato con l'unico fine di agire come marcatore. Gli animali sono stati sacrificati in camera di CO<sub>2</sub> per gruppi a distanza di 40 e 60 giorni dall'intervento. E' stata effettuata sui campioni prelevati una colorazione ematossilina-eosina e una tricromica di Van Gieson.

**Risultati.** Dai dati in nostro possesso si evince che nel muscolo il PRP svolge un ruolo di acceleratore della riparazione tissutale. Al microscopio ottico si nota una marcata neoangiogenesi, una buona migrazione di cellule muscolari progenitrici. Sovrapponibile tra trattato e controllo è la presenza di tessuto fibroso cicatriziale. Non si notano reazioni infiammatorie, rigetto del prodotto né possibili complicanze quali calcificazioni o ossificazioni eterotopiche.

**Conclusioni.** Il presente studio ci porta a confermare che il PRP può ricoprire un ruolo di supporto nella riparazione muscolare ricordando che poco è stato fatto stando alle conoscenze attuali sulla rigenerazione muscolare utilizzando fattori di crescita di derivazione piastrinica.

## The muscle-tendinous junction involvement in skeletal muscle atrophy: an ultrastructural and immunohistochemical study

de Palma L., Marinelli M., Pavan M., Orazi A., \*Bertoni-Freddara C.

Department of Orthopaedics - Azienda Ospedaliero-Universitaria Ospedali Riuniti Umberto I°, Ancona;

\*Neurobiology of Aging Laboratory, INRCA Research Department, Ancona

**Background.** The muscle-tendinous junction (MTJ) is a physiologically vital tissue interface and is a highly specialized region in the muscle-tendon unit. Although, many data suggest that under loading the MTJ is the weakest point in the muscle-tendon unit making it susceptible to strain injuries, knowledge of the pathological alterations in this region and the response to the atrophic process is very limited. Moreover, in catabolic states where proteolysis is increased, two genes specific for muscle atrophy, MuRf1 and MAFbx are upregulated. These encode ubiquitin ligases, which bind to and mediate ubiquitination of myofibrillar proteins for subsequent degradation during muscle atrophy. The aim of the study was to examine the effect of different kind of immobilization that could affect the oldness on the ultrastructural morphology of the human MTJ in the effort to define a grading of the atrophy process and to perform an immunohistochemical analysis to detect anti-MuRf1 anti-MAFbx protein.

**Methods.** Fifteen patients undergoing amputation of the lower leg due to diverse chronic or acute conditions were divided into two groups. Specimens of gastrocnemius muscle were collected at the time of amputation after obtaining the patients' informed consent. Histochemistry, electron microscopic methods and morphometrical analysis were conducted. Moreover, gastrocnemius muscle biopsies were collected for immunohistochemical (anti-MuRf1, anti-MAFbx) analysis.

**Results.** TEM. Group A: In the atrophic muscle the cells became shallow and bulky. Group B: structurally, the myotendinous endings differed significantly from each other in control as well as amputated legs. In the atrophic muscle there is a reduction of the extension of the contact between the muscle and the tendon with a quantitative and qualitative changing of the myotendinous endings. The average ratio was 2.69 while in group B the control group show a wide folding of the terminal finger-like processes. The average ratio was 10.71. The results of the ratio between base and perimeter leads us to define three grade of myotendinous endings degeneration during atrophy: grade 0: more than a ratio of 10; grade 1: between 10 and 5; grade 2: less than 5.

Immunohistochemical analysis. Group A specimens showed decreased cross-sectional fiber area and length, with adipose tissue replacement, and stained for MuRf1 and MAFbx. Muscle cells showed MuRf1 and MAFbx subsarcolemmal immunoreactivity and weak extracellular matrix immunoreactivity. Group B samples exhibited mild muscle structural changes; they did not stain for anti-MuRf1 or anti-MAFbx nor did sections with muscle degeneration and adipose tissue replacement.

**Conclusions.** The grade 0 reflect a quite normal MTJ, grade 1 describe an intermediate process that, we could speculate, lead to theirreversible atrophy process or could recovery spontaneously or with pharmacological intervention, in grade 3 the process is irreversible with a complete structural alteration. Results support the concept that MuRf1 and MAFbx are regulatory peptides in different conditions that lead to muscle atrophy. The demonstration that the muscle-specific proteins MAFbx and MuRF1 are upregulated in several pathological conditions leading to muscle atrophy indicates that study of the cellular pathways can help to identify promising targets for developing effective new treatments for skeletal muscle disease.

## **A new approach for the in-vivo regeneration of nerves: the “NeuroBox”**

Merolli A., Rocchi L., De Vitits R., Catalano F.  
Clinica Ortopedica dell'Università Cattolica di Roma

**Introduction:** It is about 20 years that tubular nerve guides have been introduced into clinical practice as a reliable alternative to autograft, bringing the advantage of avoiding donor site sacrifice and morbidity. There are limitations in the application of tubular guides. First, tubular structure in itself makes surgical implantation difficult; second, stitch sutures required to secure the guide may represent a site of unfavourable fibroblastic reaction; third, maximum length and diameter of the guide correlate with the occurrence of a poorer central vascularisation of regenerated nerve.

**Methods:** We developed and tested a new concept of nerve-guide, named NeuroBox, which is double-halved, not-degradable, rigid, and does not require any stitch, employing acrylate glue instead (patent WO/2008/029373). Male Wistar rats had the new guide implanted in a 4 mm sciatic nerve defect; a sub-set of guides incorporated a surface constituted of microtrenches aligned longitudinally. Sham-operated rats had the gap left without repair. Contralateral intact nerves were used as controls.

**Results:** After 2 months nerve regeneration occurred in all animals treated by the NeuroBox; fine blood vessels were well represented. There was no regeneration in the un-treated animals.

**Conclusions:** An easy surgical technique was associated with the box-shaped guide and acrylate glue was easily applied; an adequate intraneural vascularisation was found concurrently with the regeneration of the nerve and no adverse fibroblastic proliferation was present.

## **Analisi del contributo del sovraspinato nell'External Rotation Lag Sign. Studio cinematico ed elettromiografico**

Castaldi F., Blonna D., Tellini A., Bonaria D.E., Macello A., Rossi R.  
Divisione Universitaria di Ortopedia e Traumatologia, Ospedale Mauriziano, Torino

**Background:** The external rotation lag sign (ERLS) is a physical sign designed to evaluate the incompetence of the shoulder's external rotators. It is unclear whether an isolated supraspinatus tear will produce a positive ERLS. The purpose of this study was to evaluate the amount of ERLS and the pattern of supraspinatus EMG activity in a competent muscle and after a simulated tear in vivo where the supraspinatus has been deactivated by botulinum toxin.

**Methods:** Ten healthy human subjects were evaluated using the ERLS at 0° and 20° of abduction in the scapular plane (control shoulders). Tests were repeated 30 days after a selective botulinum injection block of the supraspinatus. The measurement of the lag was evaluated using an infrared optoelectronic system. Intramuscular EMG activity of the supraspinatus and infraspinatus and superficial activity of the other shoulder girdle muscles was recorded during each test. The ERLS was considered positive when the ERLS significantly increased after the block.

**Results:** In the control shoulders the average ERLS was less than 5 degrees regardless the position of the arm. The deactivation of the supraspinatus produced a positive ERLS in all the shoulders when the test was performed at 20° of abduction (average ERLS: 8.5 degrees). At 0° of abduction the average ERLS was 5.8 degrees and only 3 shoulders shown a positive ERLS.

**Conclusion:** The ERLS became positive after selective deactivation of the supraspinatus muscle with botulinum toxin at 20 degrees of shoulder abduction. This ERLS likely has applicability to the clinical setting in detecting patients an isolated supraspinatus tear.

## Differenze della performance dei lanciatori di baseball con l'età

Paladini P., Pellegrini A., Campi F., Porcellini G.

U.O. Chirurgia Ortopedica della Spalla – Ospedale “D. Cervesi”, Cattolica

**Introduzione:** Il baseball è uno sport in crescita. Una delle caratteristiche di questo sport è lo stress asimmetrico e ripetitivo sull'arto superiore dominante. Il lanciatore è il soggetto più a rischio. Se paragonato agli altri ruoli, il lanciatore è soggetto a maggiori attenzioni sia nell'allenamento sia nella diversificazione del lancio. Tutto ciò conduce a diverse cambiamenti morfologici dell'arto interessato: ipertrofia muscolare, incremento della forza, aumento della densità ossea dell'omero e aumento della rotazione esterna dell'omero. Questa condizione biomeccanica, essenziale per un aumento delle prestazioni del lanciatore, può progredire in una patologia asintomatica.

**Obiettivo:** L'obiettivo dello studio è di analizzare come l'età influenzi la biomeccanica e le performance dell'arto dominante nei giocatori di baseball.

**Materiale e metodo:** Venti lanciatori sani sono stati reclutati: il gruppo A (12 ±2 anni) e il gruppo B (24±1 anni). I giocatori con anamnesi per lussazione di spalla, interventi precedenti o lesioni documentate della spalla, sono stati esclusi dallo studio. Test isocinetici (IT) sono stati effettuati per valutare la forza dei rotatori interni ed esterni dell'omero a differenti livelli ed è stato effettuato un test computerizzato per valutare la precisione della spalla (SMST)

**Risultati:** Il test isometrico ha evidenziato in entrambi i gruppi un aumento significativo della rotazione esterna tra i lanciatori mentre nell'arto controlaterale il bilanciamento tra rotatori interni ed esterni risulta conservato.

**Discussione e conclusioni:** Il nostro studio ha dimostrato un incremento della rotazione esterna nei giocatori esaminati sin dai primi anni di gioco del baseball. Questo lieve cambiamento può essere addebitato all'adattamento specifico per tale sport. La precisione della spalla è maggiormente evidente nei soggetti più anziani. Questo studio dimostra che un programma di allenamento dovrebbe includere una serie di esercizi volti a riequilibrare il bilanciamento tra rotatori interni ed esterni per evitare lesioni ed esercizi specifici per la precisione della spalla, soprattutto nei giovani, per migliorare l'abilità nel lancio.

## **A fibroblast-collagen membrane composite for tendon repair: an in vitro study**

Mangiavini L.<sup>^^</sup>, Sosio C.\*, Buragas M.\*, Scotti C.\*\*, Di Giancamillo A.\*\*\*, Domeneghini C.\*\*\*, Fraschini G.F.\*, Peretti G.M.<sup>^\*</sup>

<sup>^^</sup> Residency Program in Orthopaedics and Traumatology, University of Milano-Bicocca

\* Division of Orthopaedics and Traumatology, San Raffaele Scientific Institute, Milan

\*\* Residency Program in Orthopaedics and Traumatology I, University of Milan

\*\*\* Dep. Veterinary Sciences for Animal Health and Food Safety, University of Milan

<sup>^</sup> Faculty of Exercise Science, University of Milan

Tendon repair represents a current challenging clinical problem, as tendons have a poor intrinsic healing potential. Cell-based therapy could represent a valid therapeutic solution for this issue. The aim of this study was to identify an in vitro model of biological membrane seeded with fibroblasts, as a potential tool for improving the biological and biomechanical properties of the repair tissue. Achilles tendons' specimens were surgically harvested from young pigs. The specimens were cut in small pieces of approximately 1 mm of diameter, cultured in vitro, in order to allow the cells to leave the specimens and then to reach the confluence (approximately 1 month). The fibroblasts were then enzymatically isolated, resuspended and expanded since confluence was reached once more. The cells were seeded onto membranes of collagen type I and III of 6 mm of diameter at 3 different concentrations. The membranes were cultured in vitro at standard culture conditions for 2 and 5 additional weeks, then retrieved from culture for macroscopic, histological and SEM analysis.

Macroscopically, the seeded membranes showed shrinkage and reduced biomechanical integrity compared to the unseeded membranes. The histological examination demonstrated the presence of vital cells within the membranes with a certain amount of matrix production.

The results from this study demonstrate that the swine fibroblasts can be seeded onto a collagen scaffold. These cells remain vital during in vitro culture. The shrinkage of the experimental samples was probably due to an enzyme produced by the fibroblasts. Further studies will be schedule in order to demonstrate the survival of the cells and the reparative potential of fibroblast transplantation in an orthotopic in vivo model. We believe this model could be a valuable tool for the repair of tendon lesions, working either as a cell-carrier and a as patch augmentation.

## **Le lesioni dei tendini flessori della mano: nuovo dispositivo riassorbibile interno Studi biomeccanici e in vivo su modello suino**

Zura Puntaroni F., Vasario G., Ciardelli G., Battiston B.  
Chirurgia della Mano-CTO, Torino

**Introduzione:** La precoce mobilizzazione e il recupero completo della funzionalità articolare di un dito della mano dopo una lesione dei tendini flessori e successiva riparazione è a tutt'oggi un problema aperto nell'ambito della chirurgia della mano edella traumatologia ortopedica. Negli ultimi 10 anni la letteratura, supportata da numerosi studi sull'analisi delle caratteristiche biomeccaniche dei tendini e delle complicazioni derivanti dalla loro riparazione, propone un ampio ventaglio di differenti tecniche chirurgiche di sutura tendinea e dispositivi interni di tenosintesi, per arrivare a definire tipologie di riparazioni (sutura diretta o dispositivi interni) che permettano di raggiungere la guarigione biologica il più velocemente possibile e di garantire una riabilitazione sicura e precoce al fine di ridurre al minimo i rischi di aderenze e di nuove rotture. Gli autori presentano uno studio biomeccanico e applicazioni su modello suino, di un nuovo dispositivo interno riassorbibile (placca in acido poli-lattico) progettato in collaborazione con il dipartimento di Meccanica del Politecnico di Torino (Laboratorio di Bioingegneria Industriale), per la riparazione dei tendini, con particolare riferimento ai tendini flessori delle dita della mano, cercando di verificarne la riuscita e l'efficienza.

**Materiale e metodo:** Con la collaborazione del Prof. A. Georghescu (Università di Cluj-Napoca) e del Dr. Ioannis Ignatiadis (Università di Atene), gli autori hanno riparato 32 tendini flessori profondi di 8 maiali (di 3 mesi) con 16 tenosintesi mediante placche in PLA e 16 suture di controllo con tecnica Kessler (modificata Tajima). Le placche in PLA sono state progettate inizialmente e testate dagli stessi autori, mediante studio in vitro utilizzando 2 parametri biomeccanici: test di rottura da carico e il modulo di elasticità di Young. I tendini degli animali sacrificati sono stati sottoposti poi a tests da carico a rottura e i risultati in attesa di valutazione finale.

**Conclusioni:** Il dispositivo progettato e testato dagli autori in questo studio presenta il vantaggio di fornire una riparazione più solida delle comuni suture utilizzate quotidianamente, con il vantaggio che un materiale riassorbibile scompare all'avvenuta guarigione biologica del tendine. Il progetto, le analisi preliminari, i test eseguiti in vitro ed ex vivo, ci consentono di affermare che, pur con i limiti dati da uno studio iniziale e con un campione limitato, questo tipo di riparazione tendinea apre nuove ed interessanti prospettive di applicazione clinica

## **Utilizzo autologo di costrutti ASC-scaffold (Adipose-derived Stem Cells) nella rigenerazione di difetti ossei in modelli preclinici: studio in vitro**

Arrigoni Elena A.<sup>1</sup>, Lopa S.<sup>1</sup>, de Girolamo L.<sup>1,2</sup>, Stanco D.<sup>1</sup>, Brini A.T.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Farmacologia, Chemioterapia e Tossicologia Medica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Milano, <sup>2</sup>IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi, Milano

La perdita di sostanza ossea dovuta a traumi, infezioni o tumori si pone ancora oggi come una delle problematiche più rilevanti nell'ambito della chirurgia ortopedica.

Un approccio innovativo per risolvere questo problema è quello fornito dall'ingegneria tissutale, un nuovo campo interdisciplinare il cui obiettivo finale è la rigenerazione dei tessuti a partire dalla combinazione di cellule, scaffolds e fattori bioattivi.

Nel nostro laboratorio ci occupiamo da alcuni anni dello studio di cellule staminali mesenchimali umane isolate dal tessuto adiposo (hASC, Adipose-derived Stem Cells) per possibili applicazioni cliniche future. In particolare abbiamo verificato il potenziale differenziativo delle hASC verso la linea osteogenica e condrogenica, anche in associazione a specifici scaffolds.

Con la prospettiva futura di valutare l'efficacia delle hASC nella rigenerazione di difetti osteocondrali in modelli pre-clinici autologhi, ci siamo dedicati alla caratterizzazione e al differenziamento verso la linea osteogenica di ASC isolate da tessuto adiposo di coniglio (rbASC) e maiale (pASC), considerati dei buoni modelli pre-clinici in campo ortopedico.

Entrambe le popolazioni cellulari di ASC mostrano una capacità proliferativa elevata, generano un'alta percentuale di colonie fibroblastoidi e sono dotate di una buona capacità di automantenimento allo stato indifferenziato. Le ASC di coniglio e di maiale differenziano efficacemente, e più rapidamente delle hASC, verso la linea osteogenica, come dimostrato dall'incremento dei livelli di fosfatasi alcalina intracellulare, dalla deposizione di matrice calcificata extracellulare e dall'induzione dell'espressione di proteine specifiche del tessuto osseo.

Le cellule rbASC e pASC, differenziate e non, sono state anche mantenute su scaffold di idrossiapatite per diversi tempi e successivamente analizzate. Una percentuale elevata di cellule aderisce saldamente agli scaffold e, dopo alcune settimane di differenziamento in ambiente tridimensionale, entrambe le popolazioni cellulari esprimono marcatori specifici del tessuto osseo.

Questi dati in vitro suggeriscono che cellule ASC autologhe possano essere reimpiantate in modelli pre-clinici di difetti ossei critici in associazione, o meno, a supporti opportunamente progettati.

## Sostituti ossei biomimetici per applicazioni ortopediche

Mattioli Belmonte M.<sup>1</sup>, Vozzi G.<sup>2</sup>, Greco F.<sup>1</sup>, Manzotti S.<sup>1</sup>, Ferretti C.<sup>1</sup>, Ahluwalia A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Patologia Molecolare e Terapie Innovative - Università Politecnica delle Marche, Ancona

<sup>2</sup>Centro Interdipartimentale di Ricerca "E. Piaggio" - Università di Pisa

L'utilizzo di innesti che ripristinino la continuità ossea che garantisca le condizioni necessarie alla guarigione, stimolando lo sviluppo di osso dove questo sia deficitario, costituisce un importante target terapeutico in campo ortopedico. Gli innesti di più comune utilizzo sono costituiti da osso corticale o spongioso fresco autologo prelevate da altre sedi scheletriche[1,2], tuttavia il loro uso è scervo da complicanze [3,4]. L'impiego di scaffold tridimensionali (naturali o artificiali) in grado di fornire un adeguato supporto strutturale a livello del difetto osseo in modo da favorirne le proprietà rigenerative è ormai un attuale approccio di medicina rigenerativa del tessuto osseo [5,6]. Il successo di una tecnica di ingegneria tessutale dipende fundamentalmente dalla creazione di strutture appropriate nelle quali idonei segnali biochimici siano in grado di "guidare" la crescita del nuovo tessuto. Pertanto i materiali che deputati ad interfacciarsi con i tessuti debbono non solo favorire l'adesione cellulare ma possedere una geometria che consenta alle cellule di mantenere una polarità e una morfologia idonea al loro differenziamento attraverso i meccanismi di trasduzione del segnale [7].

Sulla base di nostri studi precedenti [in cui abbiamo dimostrato come cellule osteoblasto-simili (MG63) siano sensibili sia alla rigidità del substrato (*mechenosensing*) che alla geometria del materiale stesso [8], stiamo attualmente valutando il comportamento delle MG63 su diversi possibili sostituti ossei compositi, a struttura ripetitiva e non, che combinino la rigidità dell'idrossiapatite (HA) con la biocompatibilità degli idrogeli a base di collagene. La produzione di tali strutture è stata fatta reticolando il collagene con un agente non tossico naturale estratto dalla *Gardenia jasminoides*, la genepina.

1. Stevenson S. Clin Orthop 1998;355(Suppl):239-46.
2. Laurencin C, Khan Y, El Amin SF. Expert Rev Med Devices 2006;3:49-57.
3. Silber JS, Anderson DG, Daffner SD, et al.. Spine 2003;28:134-139.
4. Zimmermann CE, Borner BI, Hasse A, et al. Clin Oral Invest 2001;5:214-9.
5. Hing KA. Philos Trans A Math Phys Eng Sci 2004;362:2821-50.
6. Olivier V, Faucheux N, Hardouin P. Drug Discov Today 2004;9:803-11.
7. Ingber DE. Circ Res. 2002; 91: 877.
8. Mattioli-Belmonte M, Vozzi G, Kyriakidou K, et al J Biomed Mater Res A. 2008;85:466-76.

## Novel injectable CaP-based cements for bone regeneration

Perut F.<sup>1</sup>, Ciapetti G.<sup>1</sup>, Planell J.A.<sup>2</sup>, Santin M.<sup>3</sup>, Schacht E.<sup>4</sup>, Ambrosio L.<sup>5</sup>, Giunti<sup>1</sup>, Baldini N.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory for Pathophysiology of Orthopaedic Implants, Istituto Ortopedico Rizzoli, via di Barbiano 1/10, 40136 Bologna, francesca.perut@ior.it

<sup>2</sup>Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona, Spain

<sup>3</sup>School of Pharmacy & Biomolecular Sciences, University of Brighton, UK

<sup>4</sup>Ghent University, Belgium

<sup>5</sup>Institute of Composite and Biomedical Materials, Napoli

A new concept of biomaterial for bone tissue regeneration was used to develop a multifunctional, injectable, self-setting, macroporous, biodegradable, easy to apply and sterilizable material.

The aim of this study was to evaluate the biocompatibility and the capacity to allow the osteogenic cell adhesion and growth on new calcium phosphate based composites proposed for bone tissue regeneration. Alginate, gelatin and/or soybean added CaP composites were tested.

Indirect effect of the materials on cells was analyzed with human osteoblast-like Saos-2 cells. Saos-2 were seeded in 24-well plate ( $3.0 \times 10^4$  cells/well) and allowed to adhere for 5 hrs. Then, the experimental composites, injected in transwell (pore size  $0.45 \mu\text{m}$ ), and set for 12 days in Ringer's solution, were placed on the cells. Saos-2 were cultured in complete medium and cell viability was assessed at 24-72 h and 6 days. No toxic agents were released by the experimental composites and no modification was observed in Saos-2 viability.

Cells/composites direct interactions were further investigated with primary cells, as human bone marrow stromal cells (BMSC), and umbilical vein endothelial cells (HUVEC). The composites were prepared in sterile condition under ventilated hood, and following pre-wetting with medium, containing 10% fetal bovine serum, to allow protein adhesion from the serum to the surface of the scaffolds, the composites were seeded with primary cells. Cell attachment, growth, viability, and morphological features were assessed at selected time periods.

BMSC adhesion, quantified by image analysis, was favoured on gelatin based composites.

HUVEC adhesion was favoured on gelatin based composites too, and the observed expression of Ve-cadherin is a proof of the cell-to-cell contact on the surface.

In conclusion, no toxicity was shown by any composite, and cell adhesion and proliferation was observed. Among the tested composites, gelatine was found to induce a good adhesion of HUVEC and BMSC.

ACKNOWLEDGEMENTS: supported by SmartCaP 6 FP Project, contract No. NMP3-CT-2005-013912.

## **Advanced synchrotron radiation techniques for the characterization of scaffolds and tissue-engineered bones**

Rustichelli F., Fiori F., Giuliani A., Renghini C.

Università Politecnica delle Marche, Dipartimento SAIFET – Sez. Scienze Fisiche, 60131 Ancona

Extensive bone loss is still a major problem in orthopedics. A number of different therapeutic approaches have been proposed and developed. A very promising solution for large bone-defect repair is the tissue-engineering approach i.e. the use of an association of a suitable scaffold, e.g. made of hydroxyapatite (HA) and/or tricalcium phosphate (TCP) with osteogenic cells. A mineralized microenvironment is an essential feature for the start of osteogenesis by committed cells.

The condition and structure of bone and its remodeling are traditionally evaluated by X-ray radiography, due to its low cost, widespread availability and flexibility. However, due to the intrinsic limitations of the physical properties of this method and the number of involved variables (exposure setting, beam source-film distance, X-ray filtration, etc.), innovative analytical and diagnostic imaging techniques, such as X-ray microtomography (micro-CT), pseudo-holotomography and X-ray microdiffraction, are needed to evaluate the condition and structure of scaffolds and engineered bone.

This work will present a review of recent progress obtained by using these techniques in different investigations related at first on scaffolds and then, in a more or less direct way, to the research area of bone tissue engineering. Experimental beamlines are available to this end at European synchrotron radiation sources, such as ESRF-Grenoble (France), ELETTRA-Trieste (Italy) and BESSY-Berlin (Germany).

Some selected results obtained recently, using these techniques both to study bulk scaffolds and interfaces within *ex vivo* tissue-engineered bone, will be presented.

In particular, we will report the first application of pseudo-holotomography to the study of an angio- and microvasculogenesis process in a complex biological system to identify the microvasculature with no use of contrast agents.

## **Effetti genetici del coating di anatase (AC) in colture di osteoblasti umani (MG-63): studio in vitro**

Sollazzo V., Massari L., \*Pezzetti F., \*\*Palmieri A., \*Martinelli M, \*Scapoli L., \*\*Carinci F.

Clinica Ortopedica, Università di Ferrara

\*Istituto di Istologia ed Embriologia Generale, Università di Bologna

\*\*Clinica Maxillo-Facciale, Università di Ferrara

Il titanio è attualmente il materiale gold standard per la realizzazione di strumenti protesici in virtù delle sue buone proprietà chimiche e meccaniche. Esposto all'ossigeno, il titanio diventa un ossido biocompatibile capace di indurre osteointegrazione. Esistono tre forme allotropiche di ossido di titanio: il brookite, il rutilo e l'anatase. L'anatase può essere preparato come sospensione colloidale e poi utilizzato per ricoprire superfici protesiche per migliorarne la biocompatibilità. Il coating di anatase (AC) può avere specifici effetti biologici. In questo lavoro abbiamo testato gli effetti dell'AC su colture di osteoblasti (MG-63). Abbiamo coltivato linee di osteoblasti (MG63) in presenza di dischetti di titanio dotati di coating di anatase utilizzando come controllo dischetti del medesimo titanio privi di AC. La tecnica dei microarray ci ha permesso di identificare i geni differenzialmente regolati negli osteoblasti a contatto con l'AC. Nella fattispecie, attraverso l'utilizzo di microarray contenenti 20.000 geni, abbiamo identificato nelle linee di osteoblasti (MG63) coltivate in presenza di AC diversi geni la cui espressione è stata significativamente sovra o sotto regolata. Tali geni coprono un ampio ventaglio di attività funzionali: la trasduzione del segnale, l'immunità, la regolazione del ciclo cellulare, la composizione lisosomiale e il trasporto vescicolare, l'adesione cellulare, il citoscheletro, i componenti della matrice extracellulare, la proliferazione e l'apoptosi. I dati ottenuti rappresentano il primo quadro genetico degli effetti dell'AC e possono risultare rilevanti per comprendere meglio il meccanismo molecolare della osteointegrazione oltre che rappresentare un modello per comparare in vitro diversi materiali con simili effetti clinici.

## **Metal-metal bearing in hip arthroplasty**

Rizzi L., Barbieri F., Ferrari R., Castelli C.

Orthopaedic and Trauma Department, Ospedali Riuniti, Bergamo

The metal-on-metal bearing couple is having a significant revival in clinical applications concerning hip arthroplasty and hip resurfacing. Metal-metal bearings have a wear rates that are 20 to 100 times lower than metal-on-poliethylene.

However there is continued concern over the long-term effects of wear products. Little is known about the systemic distribution of metal particles and ions. The significance of systemic distribution also is not known. Further concerns exist regarding the generation of metal ions seen in blood and urine of the patients with metal-on-metal implants. These elevated metal ions have theoretical, but not proven risks related to carcinogenic and biologic effects and also to hypersensitivity.

We report our study on metal ion levels in patients in whom was placed a cementless hip arthroplasty with metal-metal bearing. In this series, with a 24 months of follow-up, the metal ions levels reported are low and there where no device related complications, no radiografic changes and no systemic reactions.

Only early and mid-term results are available for the metal-metal bearing in hip arthroplasty, with no long-term series yet published. Metal-metal bearing is a good alternative to either polyethylene or ceramic implants but unresolved issues continue to exist and it will take decades of close clinical observation to determine benefits.

## Can an elastomer increase the ductility and compliance of UHMWPE?

Boffano M.<sup>1,2</sup>, Bistolfi A.<sup>1,2</sup>, Carpentieri I.<sup>3</sup>, Bracco P.<sup>3</sup>, Bellare A.<sup>1</sup>, Costa L.<sup>3</sup>, Brach del Prever E.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Orthopedic Surgery, Brigham & Women's Hospital Harvard Medical School, Boston, MA

<sup>2</sup>Department of Orthopaedics and Traumatology and HM, CTO/M. Adelaide Hospital, University of Torino

<sup>3</sup>IFM Chemistry Department, University of Torino

**Introduction and aim of the study:** For over four decades, ultra-high molecular weight polyethylene (UHMWPE) has been used as a bearing material in total joint replacement prostheses due to its superior resistance to wear and high fracture toughness compared to other polymers. Historically, catastrophic failures have occurred, such as rim cracking of misaligned acetabular cups due to impingement with metallic stem, fatigue related damage in tibial components of knees and fracture of metal-backed patellar components. Conformal implant designs employed in knee prostheses have led to a decrease in contact stresses, but it is preferable utilize a materials design approach to prevent fracture since conformity is often achieved by sacrificing range of motion. In this study, we blended UHMWPE with a polyethylene-like thermoplastic elastomer which possesses rubber-like characteristics. We hypothesized that blending the ethylene-octene copolymer with UHMWPE would make the blend substantially more ductile (large maximum strain) and with high compliance (or low modulus) so that it would not fracture easily, compared to pure UHMWPE.

**Materials and methods:** GUR 1050 UHMWPE powder (Ticona, Oberhausen, Germany) and ENGAGE™ 8200 ethylene-octene elastomer pellets (Dow Chemical Company, Midland, MI) were blended at a temperature of 160°C using a Thermo Haake Minilab (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe Germany) Compounder. The blends were extruded into 2mm diameter rods, which were then chopped, placed in a mold and compressed at a temperature of 180 °C into 2mm thick discs using a Carver hydraulic press. Blends with three different weight fractions of UHMWPE were prepared: 5%, 10% and 25%. Compression molded discs of 100% UHMWPE and 100% elastomer samples were used as control materials. Type V ASTM D638 tensile specimens were cut out from all the discs and tensile tests were conducted on each group (n=3) using a Adamel Lhomargy DY22 dynamometer operating at a crosshead speed of 10mm/min and controlled with Labview 7.0 Express software (National Instruments). A Perkin Elmer Pyris differential scanning calorimeter (DSC) was used to measure melting temperature and crystallinity (n = 3) using a heat of fusion,  $dh_f$ , of 293 J/g [6]. Lamellar thickness (L) was calculated using the Gibb's Thomson equation [7]:  $L = 2s_e T_m^0 / [dh_f(T_m^0 - T_m)]$  where  $s_e$  ( $=9 \times 10^{-6}$  J/cm) is the lamellar surface free energy [8],  $T_m^0$  is the equilibrium melting temperature for polyethylene ( $=145.1^\circ\text{C}$ ) [9] and  $T_m$  is the observed melting temperature.

**Results:** Tensile tests revealed that the modulus of the 100% UHMWPE was substantially higher than the modulus of the blends as well as the pure elastomer ( $p < 0.05$ , ANOVA, Fisher's PLSD test). No statistically significant difference ( $p > 0.05$ , ANOVA) was observed in the modulus between the blends and the elastomer. No statistically significant difference in the maximum stress was observed when comparing the following pairs: 0% and 5% UHMWPE blend, 5% and 10% UHMWPE blends, and 10% and 25% UHMWPE blends. The maximum stress was significantly higher for pure UHMWPE compared to any of the blends and pure elastomer. Except for the maximum strain between the 0% and 5% UHMWPE blends, all other maximum strains were significantly different from each other ( $p < 0.05$ , ANOVA). In general, the blends and pure elastomer had substantially higher maximum strain compared to the pure UHMWPE. The overall crystallinity, melting temperature and lamellar thickness monotonically decreased with decreasing weight fraction of UHMWPE. There were statistically significant differences in each of these parameters for all groups of samples.

**Discussion:** This study shows that the ductility (maximum strain) and compliance (inverse of modulus) can be substantially increased by blending UHMWPE with a polyethylene-like elastomeric copolymer. The lack of statistically significant difference in the modulus of the elastomer and blends up to 25 weight percentage UHMWPE indicates that the initial strain was dominated by stretching of the elastomeric region, which implies that the blends of UHMWPE and elastomer were immiscible. The modulus did not increase with weight fraction of UHMWPE up to 25 weight percent, indicating that there must be regions in the blend that are UHMWPE rich and the majority of the region was elastomer-rich, which is desirable because the elastic region of elastomers extends to a large strain. A drawback of this blend was that the maximum stress decreased with increasing UHMWPE weight fraction probably because the UHMWPE was segregated in the blend, acting as flaws in the elastomeric matrix, thereby leading to fracture at a low stress. The fracture at low stress may be overcome by radiation crosslinking of the UHMWPE-elastomer blend so that even if UHMWPE is segregated, it would be chemically bonded to the elastomeric macromolecules.

**Conclusion:** Blending of UHMWPE with a polyethylene-like elastomer may be an attractive alternative to induce rubber-like properties into UHMWPE components to decrease or even prevent catastrophic failure. The results demonstrated that blends up to 25 weight percent UHMWPE had rubber-like properties with much higher ductility and compliance.

## **Microloy®: ruolo della finitura della superficie metallica nell'usura di UHMWPE in protesi di ginocchio**

Mattioli-Belmonte M., Cigna V., Orlando N., Manzotti S., Gigante A.

Dip. di Patologia Molecolare e Terapie Innovative - Università Politecnica delle Marche - Ancona

L'usura del polietilene è l'evento che incide maggiormente sulla durata di una protesi di ginocchio [1,2]. Le componenti protesiche (sia metalliche che in polietilene) sono ricavate dal pieno tramite macchine a controllo numerico. Per quanto riguarda le componenti metalliche, il metodo di produzione tradizionale prevede, dopo questa fase, direttamente la lucidatura. Il Microloy® è una nuova metodica di processazione del pezzo in cui durante la finitura viene aggiunta una fase di rettifica a controllo numerico che permette alla successiva fase di lucidatura di poter eliminare meno materiale e rispettare quindi maggiormente le geometrie di progetto, diminuendo così lo stress di superficie delle componenti. Scopo della presente ricerca è stata la verifica dell'efficacia del metodo Microloy® nel ridurre l'usura delle componenti protesiche.

Il metodo di finitura Microloy® è stato comparato con la finitura tradizionale. Dopo aver effettuato prove di usura pin on disk (500000 cicli) e su simulatore (1500000 cicli, 4 gradi di libertà, in siero bovino a 37°C e passo simulato con frequenza 1Hz) con metodica gravimetrica si è proceduto all'osservazione al microscopio elettronico a scansioni (SEM) e all'analisi morfometrica delle superfici metalliche e dei detriti di polietilene isolati dal siero utilizzato nel simulatore mediante digestione con proteinasi K e filtrazione in serie attraverso filtri di policarbonato da 10µm, 1µm e 0,4µm [2,3].

Alla prova pin on disk l'usura dei pin di polietilene è risultata inferiore dell'8% per la finitura Microloy® rispetto alla finitura tradizionale. La prova su simulatore ha dato come risultato la riduzione dell'usura della componente in polietilene di oltre il 40% con la finitura Microloy® rispetto alla finitura tradizionale e un rateo di usura di due terzi inferiore (Microloy® 0,47mg/10<sup>6</sup>cicli vs tradizionale 1,32mg/10<sup>6</sup>cicli).

Le indagini relative alle superfici metalliche hanno evidenziato una significativa riduzione della rugosità superficiale a 10<sup>6</sup> cicli per la finitura Microloy® rispetto alla finitura tradizionale.

Si è osservata inoltre una notevole riduzione dei detriti di polietilene nel siero appartenente al test della protesi con finitura Microloy® (Fig 1a) rispetto a quello del test effettuato sulla protesi tradizionale, soprattutto per i frammenti con dimensioni comprese tra 10µm e 0,4µm (Fig. 1b), con una diminuzione di oltre l'80% rispetto al metodo di finitura tradizionale.

Alla luce dei dati ottenuti è possibile affermare che la finitura Microloy® diminuisce in maniera significativa l'usura delle componenti protesiche e la produzione di detriti di polietilene nelle protesi di ginocchio.

[1] T.P. Schmalzried, J. J. Callaghan. J Bone Joint Surg Am. (1999) 81, 115-36.

[2] S. Niedzwiecki, C. Klapperich, J. Short, et al. J Biomed Mater Res (2001) 56, 245-249,

[3] J. L. Tipper, E. Ingham, J.L. Hailey et al. J Mat Sci: Mat in Med (2000) 11, 117-124

## **Metal sensitivity and clinical features in patients with stable total knee arthroplasty: preliminary results**

Granchi D., Cenni E., Nitri M., Bondi A., Neri M.P., Baldini N., Marcacci M., Giunti A.  
Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna

Materials used for total arthroplasties are well known for their good biocompatibility, but the metal ion release from the implant may elicit an immune response whose role has not been fully elucidated. In our previous work we demonstrated that in patients who had not yet undergone total knee arthroplasty (TKA) the frequency of sensitization to the metals was similar to that of general population, but significantly increased after TKA. In our analysis, the only risk factor for implant loosening was a history of metal hypersensitivity before implantation, which negatively influenced the implant lifespan, and increased fourfold the likelihood to have a TKA failure. Moreover, we found that stable TKA patients who complained of moderate pain showed a higher frequency of sensitization to metals, even if the low number of cases did not allow to reach any significant conclusion.

The aim of the present study was to verify the correlation between Knee Score and sensitization to implant materials in patients with stable TKA. Sensitization was detected by using patch testing which includes haptens representative of cobalt-based alloys (CoCrMo), titanium-based alloys (TiAlV), and bone cements. We designed a blinded clinical study, where sensitization and clinical status were simultaneously evaluated from different investigators. The number of cases was calculated on the basis of our previous results which showed the frequency of sensitization in patients with stable TKA to be about 38%, and the Knee Score in patients with positive and negative patch testing to be  $78 \pm 10$  and  $85 \pm 10$ , respectively. We planned to recruit 70 patients with stable TKA from two years and without symptoms of metal allergy prior to implant to obtain a power analysis  $> 80\%$  (81.5%) with  $\alpha = 0.05$ .

At present, 46 patients have been enrolled in the study. The frequency of skin positive reaction was not influenced by age or presence of other implants, but females showed a higher percentage of positive patch testing (70% vs. 30%). The percentage of positive patch testing to at least one hapten was 32.7% (only metals: 26%; only cements: 4.4%; both metals and cements: 4.4%). After considering sensitization to each hapten, we found that the highest frequency of positive reactions was against vanadium (15.2%). The evaluation of the objective score (pain, range of motion) and functional score (walking, stairs) did not show any differences between patients with positive and negative patch testing.

These preliminary results confirm that metal ion release from the implant may induce an immune response in patients who did not exhibit metal allergy before TKA. Nevertheless the sensitization does not seem to influence the performance of the implant.

## Fili per osteosintesi percutanea: forma, dimensioni e solidarizzazione dei fili ne aumentano la tenuta? Risultati di uno studio biomeccanico

Dettoni F.<sup>1</sup>, Blonna D.<sup>1</sup>, Assom M.<sup>1</sup>, Rossi R.<sup>1</sup>, Bonasia DE.<sup>1</sup>, Bignardi C.<sup>2</sup>, Castoldi F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>SCDU Ortopedia e Traumatologia, Ospedale Mauriziano Umberto I - Torino, <sup>2</sup>Dipartimento di Meccanica, Politecnico di Torino

**Introduzione.** Recentemente abbiamo introdotto un sistema di solidarizzazione dei fili di Kirschner (K) nel trattamento delle fratture del terzo prossimale dell'omero e sulla scorta dei dati clinici abbiamo rilevato una maggior tenuta del sistema che si avvale di fili da 2,5 e 3 mm di diametro, con 70 mm di filettatura dell'estremità, e solidarizzazione dei fili con un apparato simile ai mini-fissatori esterni. Abbiamo avviato una sperimentazione biomeccanica presso il Politecnico di Torino per valutare l'efficacia di questo sistema rispetto ai sistemi tradizionali.

**Materiale e Metodo.** Abbiamo eseguito delle misurazioni di resistenza al pull-out di diversi disegni di fili di K in modelli sintetici epossidici di osso. Successivamente abbiamo creato diverse configurazioni di coppie di fili (parallele, o incrociate a diversi gradi di angolazione), li abbiamo solidarizzati tra loro e abbiamo proceduto alle prove di pull-out della coppia di fili. I fili di K erano fili da 2,5 mm di diametro, con estremità: A- liscia; B- filettata 25 mm; C- filettata 70 mm. I modelli epossidici di osso erano Sawbones Biomechanical Test Short-Fiber-Filled Epoxy Cylinders #3403-19, di diametro 40 mm, con corticali da 2 mm (con caratteristiche biomeccaniche della corticale e della spongiosa simili a quelle dell'omero umano). Le prove sono state eseguite con una pressa MTS Q-test 10 Elite, misurando la resistenza alla estrazione del filo (in Newton), ad una velocità di estrazione di 1 mm al secondo. I dati sono stati riportati numericamente e in forma di grafico; ai fini della nostra ricerca è stato preso in considerazione il picco massimo di resistenza alla trazione registrato nel corso della prova. Per ogni modello il test è stato ripetuto 3 volte, calcolando la media tra le 3 prove.

### Risultati

Tabella 1: prove di resistenza di singolo filo

	picco di massima resistenza alla trazione (N)			
	fili singoli			
presa	2 corticali	1 corticale	2 cort. + osteolisi	1 corticale con osteolisi
fili lisci	86	37	115	36
fili filettati 25 mm	663	225	757	152
fili filettati 70 mm	938	440	605	95

Tabella 2: prove di resistenza con 2 fili, solidarizzati

configurazione	picco di massima resistenza alla trazione (N)			
	2 fili solidarizzati, presa bicorticale			
	parallela	20°	30°	40°
fili filettati 25 mm	1391	895	1099	1222
fili filettati 70 mm	2145	1660	1832	1836

configurazione	2 fili solidarizzati, presa monocorticale			
	parallela	20°	30°	40°
fili filettati 25 mm		351	693	862
fili filettati 70 mm		1186	1518	1248

**Discussione e Conclusione.** Il nuovo disegno di fili di K, caratterizzato da un filettatura di 70 mm all'estremità, permette una resistenza al pull-out notevolmente superiore rispetto ai fili attualmente in commercio, lisci o con filettatura più corta, permettendo una tenuta addirittura 10 volte superiore a quella dei fili lisci e doppia di quella dei fili a filettatura corta. Solidarizzando i fili di K in coppia, con un sistema simile alla fissazione esterna, la resistenza al pull-out aumenta ulteriormente, con una tenuta da 2 a tre volte superiore a quella dei fili singoli. L'applicazione clinica di questo nuovo disegno di filo di K e di questa configurazione con solidarizzazione dei fili può costituire un notevole miglioramento, permettendo di ampliare l'indicazione all'osteosintesi con fili di K per fratture la cui sintesi in passato non era considerata sufficientemente stabile.

## Modelli preclinici per la ricerca in ortopedia

Fini M.<sup>1,2</sup>, Giardino R.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro di Riferimento Specialistico "Studi Preclinici Innovazioni Tecnologiche e Terapeutiche", <sup>2</sup>Laboratorio Studi Preclinici Chirurgici - Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna

La ricerca preclinica è definita come l'insieme degli studi *in vitro* ed *in vivo* che valutano la sicurezza e l'efficacia di un farmaco o di una qualunque strategia terapeutica innovativa. Ciò che è importante sottolineare è che questi studi sono necessari prima della eventuale applicazione clinica di ogni trattamento medico o chirurgico.

Grazie all'impegno dei ricercatori, sono stati raggiunti numerosi ed importanti traguardi sulle metodiche *in vitro* ma, attualmente, per la maggioranza delle strategie terapeutiche innovative, gli studi *in vitro* ed *in vivo* sono complementari per il trasferimento clinico dei risultati. Ad esempio, anche seguendo le norme ISO 10993 sulla valutazione della biocompatibilità dei biomateriali da impianto, numerosi sono ancora i test *in vivo* richiesti. L'attività *in vivo* deve essere svolta solo dopo averne valutato la effettiva importanza per la cura delle malattie degli uomini e degli animali (avvalendosi delle competenze di comitati tecnici, scientifici ed etici), seguendo scrupolosamente le attuali normative e da ricercatori con conoscenze adeguate ed estremamente sensibilizzati da un punto di vista etico alla ottimizzazione delle metodiche di studio e dell'analisi dei risultati.

La ricerca ortopedica utilizza modelli sperimentali preclinici in numerosi settori medici e chirurgici fra cui ad esempio:

- 1) biocompatibilità dei biomateriali da impianto
- 2) proprietà osteoinduttive, osteoconduttive ed osteogeniche di biomateriali (biologici e di sintesi) per il trattamento dei difetti ossei in tessuto trabecolare e corticale
- 3) osteointegrazione degli impianti ossei e delle protesi
- 4) tecniche di ingegneria tissutale per il trattamento di lesioni di osso, cartilagine, tendini, legamenti (scaffold, cellule staminali mesenchimali, fattori di crescita)
- 5) patologie infettive dell'osso
- 6) patologie metaboliche e degenerative quali osteoporosi ed osteoartrosi,
- 7) patologie neoplastiche
- 8) tecniche di stimolazione biofisica

Per ottenere risultati affidabili, di estrema importanza è rendere la modellistica sperimentale preclinica *in vitro* ed *in vivo* il più possibile in grado di riprodurre la situazione clinica e, pertanto, devono essere attentamente valutati fattori legati al paziente che influenzano negativamente il successo clinico di ogni strategia terapeutica.

Si sottolinea, infatti, come una fase importante della ricerca preclinica ortopedica debba prevedere l'allestimento di modelli sperimentali di una certa complessità. Ad esempio, modelli sperimentali di alterato rimodellamento osseo permettono di simulare sempre meglio la situazione clinica perchè molti pazienti sottoposti ad interventi di chirurgia ortopedica ricostruttiva o di impianto presentano osteoporosi da età avanzata, da menopausa o secondaria ad altre patologie o stili di vita. Infine, per garantire al massimo la affidabilità dei risultati la modellistica sperimentale preclinica deve avvalersi di numerose indagini fra cui la radiologia, l'istologia, l'istomorfometria, la microscopia elettronica e la biomeccanica giocano un ruolo molto importante. Le analisi quantitative con anche lo sviluppo di idonei "score" di valutazione specifici permettono analisi accurate anche da un punto di vista statistico.

## Valutazioni biomeccaniche a scopi preventivi e riabilitativi

Cerulli G.<sup>1,2,3</sup>, Bassett D.N.<sup>2,3,4</sup>, Archilietti A.<sup>2</sup>, De Canonico E.<sup>2</sup>, Amanti A.<sup>1</sup>, Pelosi F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Scuola di Specializzazione: Medicina Fisica e Riabilitativa, Università di Perugia

<sup>2</sup>Let People Move Biomechanical Laboratory, Perugia

<sup>3</sup>Nicola's Foundation Onlus

<sup>4</sup>Center Biomedical Engineering Research, University of Delaware, Newark, USA

Nell'ambito della pratica clinica le valutazioni funzionali biomeccaniche hanno acquisito un ruolo di grande rilievo nella prevenzione e riabilitazione dei pazienti. Il nostro gruppo Let People Move in collaborazione con l'Università di Perugia ed a volte con l'Università di Ottawa, Ioanninna, Pittsburgh e il Karolinska Institute di Stoccolma vanta un'esperienza ventennale in questo settore. Tantissimi sono stati gli studi fatti a fini conoscitivi, preventivi, diagnostici, di impostazione terapeutica, riabilitativi e negli out come. Alcuni esempi: nell'ambito delle lesioni legamentose del ginocchio abbiamo valutato *in vivo* l'elongazione del legamento crociato anteriore durante le gestualità più stressanti e la contemporanea attivazione muscolare evidenziando il ruolo protettivo degli hamstring sul LCA con evidenti ricadute applicative. Abbiamo inoltre condotto studi sulla gait analysis nel pre- e nel post-operatorio in soggetti con gonartrosi da protesizzare ottenendo informazioni utili sul miglioramento dello schema motorio e sui protocolli riabilitativi. Abbiamo sviluppato modelli biomeccanici che possono valutare l'attivazione e la latenza muscolare. Sono stati eseguiti studi volti a valutare il recupero propriocettivo e funzionale in pazienti operati per ricostruzione legamentosa del ginocchio acquisendo nozioni utili nella formulazione di protocolli riabilitativi più efficaci ed efficienti. Inoltre si è visto che nella instabilità multi direzionale di spalla i test biomeccanici funzionali sono essenziali per programmare l'iter terapeutico e riabilitativo. Le importantissime informazioni forniteci da questi studi ci spingono a proseguire nello studio della biomeccanica applicata alla prevenzione e riabilitazione dei nostri pazienti.

## **La posturografia statica e dinamica: tecniche di misura**

Scalise L., Tomasini E.P.

Dipartimento di Meccanica - Università Politecnica delle Marche  
Via Brezze Bianche – 60131 Ancona

Il mantenimento dell'equilibrio dipende da informazioni fornite da tre sistemi sensoriali: Vestibolare, visivo e somato-sensoriale. E' attraverso la loro integrazione in tempo reale che il centro di gravità corporeo viene mantenuto, sia nella stazione eretta che nella deambulazione all'interno del poligono di sostegno. L'esame posturografico, attraverso la misura della posizione del centro di pressione (COP), è in grado di valutare l'efficienza di questi tre sottosistemi e quantificare la performance posturale. Ad oggi, la posturografia statica è uno strumento di largo impiego nella riabilitazione ed è considerata una procedura accreditata e di largo impiego clinico. Rispetto ad essa la posturografia dinamica, di più recente introduzione, mira a monitorare i medesimi parametri impiegando però sollecitazioni della piattaforma stessa note e controllate (oscillazioni lungo i tre assi cartesiani). Nel presente lavoro, gli autori descriveranno gli elementi principali che compongono un sistema di misura posturografico, i parametri normalmente misurati e le strumentazioni impiegate nell'analisi posturografica statica e dinamica, con particolare rilievo alle principali caratteristiche metrologiche dei sistemi di normale utilizzo, evidenziandone caratteristiche e principali limiti.