

# Scientific Evidence

## ADESIONE DI OSTEOCLASTI UMANI A SOSTITUTI OSSEI DI ORIGINE ANIMALE RESI BIOCOMPATIBILI PER VIA TERMICA O ENZIMATICA



Lo studio *in vitro* dell'interazione tra cellule osteoclastiche e sostituti ossei di origine animale ottenuti con diversi processi di produzione può permettere di comprendere quale sarà il comportamento dell'innesto in ambito clinico.

Gli interventi di rigenerazione ossea richiedono una precisa analisi del contesto anatomico in cui è localizzato il difetto osseo e delle sue caratteristiche tridimensionali. La rigenerazione ossea, infatti, richiederà tempi più lunghi in difetti localizzati in zone atrofiche, o circondati da un numero ridotto di pareti ossee vitali, o semplicemente di grandi dimensioni. È fondamentale quindi che il chirurgo conosca la cinetica attesa di degradazione dei sostituti ossei a propria disposizione, per potere scegliere quello più adeguato alla condizione anatomica che si trova a fronteggiare ed al risultato clinico che desidera ottenere. Studiare *in vitro* l'interazione tra le cellule osteoclastiche, deputate al rimodellamento osseo, e diversi sostituti ossei può permettere di comprendere quale comportamento avranno i diversi biomateriali in ambito clinico.

### Gli studi

La scheda riassume i risultati di due lavori pubblicati nel 2009 sul *Journal of Biomedical Materials Research*<sup>1</sup> e sul *Clinical Oral Implant Research (COIR)*<sup>2</sup>, dai gruppi di ricerca congiunti del Prof. Piattelli dell'Università di Chieti e del Prof. Nicholls dello University College di Londra.

Nei due studi è stata applicata la stessa metodologia sperimentale per investigare quale sia il comportamento di osteoclasti umani coltivati su due differenti sostituti ossei di origine animale: il sostituto Osteoxenon (Osteoplast OX, Bioteck), prodotto a partire da osso equino reso biocompatibile attraverso il processo enzimatico a basse temperature (<60°C) Zymo-Teck, e il sostituto Bio-Oss (Bio-Oss, Geistlich), ottenuto trattando osso bovino ad alta temperatura (>600°C).

Per eseguire i due studi, cellule mononucleate prelevate da sangue periferico di volontari sani sono state fatte differenziare in osteoclasti, in presenza di opportuni fattori di crescita, e lasciati crescere per 21 giorni su sezioni di osso bovino non trattato (controllo) e,

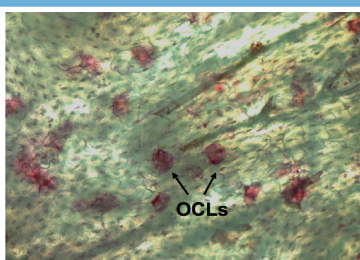
separatamente nei due studi, su campioni dei due diversi sostituti ossei.

Gli osteoclasti sono stati quindi fissati e analizzati attraverso tecniche di immunistochimica ottica e in fluorescenza. Più precisamente i preparati sono stati trattati con marcatori in grado di evidenziare gli osteoclasti in microscopia ottica (Figure 1, 2 e 3, cellule rosse) e con marcatori fluorescenti in grado di evidenziare il collagene e l'actina (Figure 5, 6, 7 e 8).

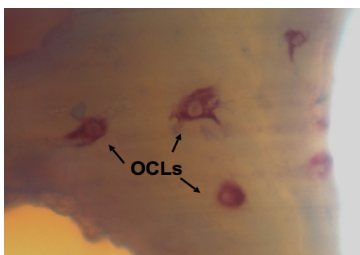
L'eventuale presenza di collagene (Figure 5, 6, 7 e 8, aree blu) dà evidenza che l'osteoclasta ha digerito almeno parzialmente la componente minerale del tessuto osseo, mentre il segnale relativo all'actina (Figure 5, 6, 7 e 8, aree rosse) permette di comprendere se la cellula ha aderito al materiale, evidenziandone le modificazioni citoscheletriche.

1. Perrotti, V et al. *J Biomed Mater Res A*. 90(1), 238-246 (2009).

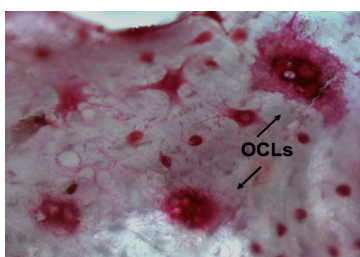
2. Perrotti, V et al. *Clin Oral Implants Res*. 20(1), 17-23 (2009).



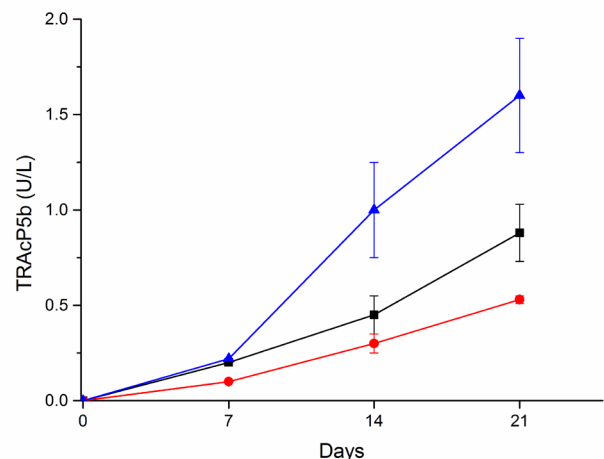
**Fig. 1** – Osteoclasti (OCLs) adesi su tessuto osseo bovino non trattato (controllo), ingrandimento 200 X.



**Fig. 2** – Osteoclasti adesi sul sostituto osseo bovino trattato ad alte temperature (200 X). Si noti, a parità di ingrandimento, il numero minore di cellule



**Fig. 3** – Osteoclasti adesi su tessuto osseo equino deantigenato per via enzimatica (200 X). Si noti come il numero di osteoclasti sia simile se non maggiore a quello osservabile sul controllo.



**Fig. 4** – Misura dell'attività osteoclastica sui diversi materiali attraverso la quantificazione dell'enzima Fosfatasi Acida Tartrato Resistente (TRAcP5b) mediante saggio ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Gli osteoclasti esibiscono una maggiore attività quando coltivati sul tessuto osseo equino (blu, triangoli) sia rispetto al controllo (nero, quadrati) che al sostituto bovino (rosso, cerchi) sul quale hanno, invece, attività inferiore anche rispetto al controllo.

# ADESIONE DI OSTEOCLASTI UMANI A SOSTITUTI OSSEI DI ORIGINE ANIMALE RESI BIOCOMPATIBILI PER VIA TERMICA O ENZIMATICA

## Messaggi chiave

1. A parità di condizioni sperimentali, il numero di osteoclasti che aderiscono sul sostituto osseo di origine equina trattato enzimaticamente (OX, Bioteck) è significativamente maggiore di quello che si osserva sul sostituto di origine bovina trattato per via termica (Bio-Oss, Geistlich).

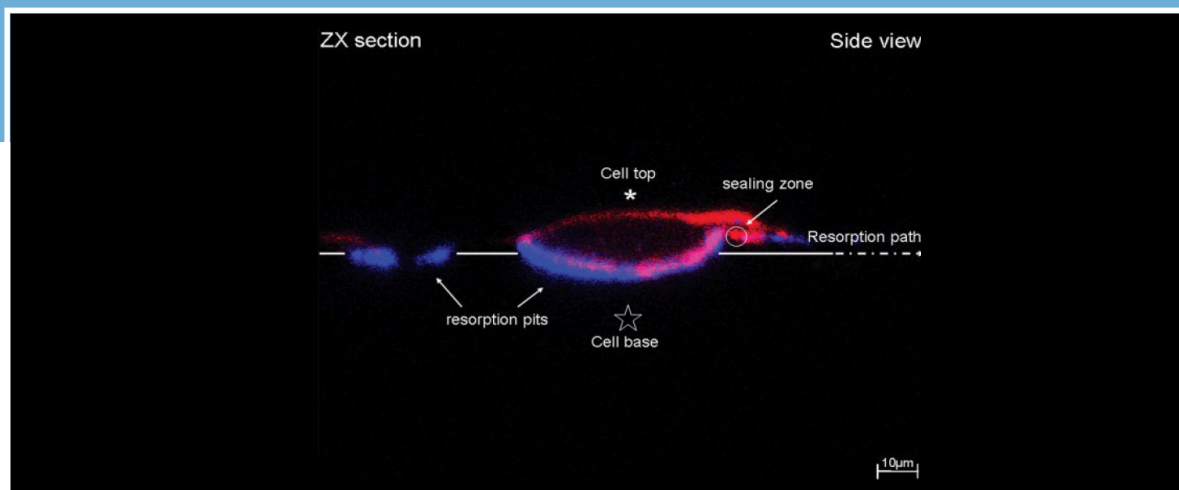
2. Gli osteoclasti presentano una maggiore attività sul sostituto osseo equino (OX, Bioteck) rispetto a quanto osservato sul sostituto osseo bovino (Bio-Oss, Geistlich).

3. Il sostituto osseo di origine equina appare quindi maggiormente soggetto all'attività osteoclastica di rimodellamento. Questo potrebbe riflettersi, in ambito

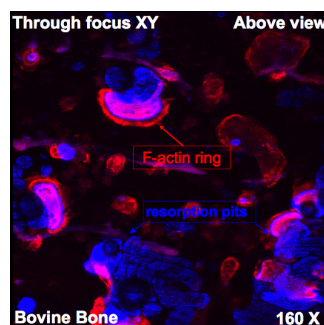
clinico, in una più veloce sostituzione con tessuto osseo di nuova formazione. Al contrario, la ridotta adesività ed attività cellulare degli osteoclasti sul sostituto bovino potrebbe risultare in una permanenza prolungata del biomateriale nel sito di innesto.

5. Questi risultati sono coerenti con quanto effettivamente osservato in ambito clinico: un trial clinico randomizzato<sup>3</sup> ha recentemente mostrato che a 6 mesi dall'innesto in seno mascellare il sostituto OX permette la formazione di una quantità di tessuto osseo di nuova formazione significativamente maggiore di quella osservata negli innesti col sostituto bovino, che risulta maggiormente indicato, di conseguenza, come mantenitore di spazio.

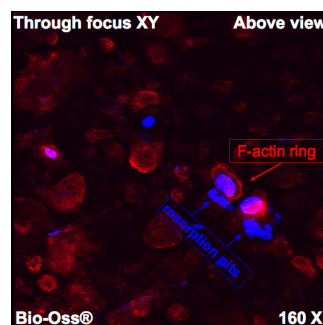
3. Di Stefano, DA. et al. *Int. J. oral Maxillofac. Implants* 30(5), 1161–1167 (2015).



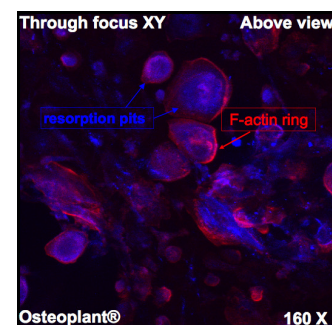
**Fig. 5** – La tecnica utilizzata permette di visualizzare la componente di actina del citoscheletro (rosso). La cellula aderisce e digerisce la matrice ossea minerale mettendo a nudo il collagene (blu). Nella figura la cellula si sta muovendo da sinistra verso destra: si osservi come il citoscheletro (rosso) si protende verso destra, mentre sotto e dietro di sé l'osteoclasta lascia esposto il collagene dopo avere digerito la matrice minerale.



**Fig. 6** – Sull'osso bovino non trattato (controllo) gli osteoclasti aderiscono modificando il loro citoscheletro (anelli di actina, rossi) e digeriscono la matrice minerale esponendo il collagene (blu).



**Fig. 7** – L'adesività sul sostituto osseo bovino è minore, così come l'attività di digestione, come si vede dal numero ridotto di anelli di actina (rosso) e dal poco collagene esposto (blu).



**Fig. 8** – Sul sostituto osseo equino gli osteoclasti aderiscono in modo simile al controllo, formando anelli di actina (rosso) evidenti, e digeriscono la matrice minerale esponendo abbondantemente il collagene (blu).