

# INDICE

---

<b>PREMESSA</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUZIONE</b>	<b>3</b>
<b>EMBRIOLOGIA E SVILUPPO DEL SISTEMA MUSCOLO-SCHELETRICO</b>	<b>3</b>
FORMAZIONE DEL COMPLESSO DI ACCRESCIMENTO EPIFISO-METAFISARIO	5
<b>COMPLESSO DI ACCRESCIMENTO EPIFISO-METAFISARIO</b>	<b>6</b>
COMPONENTE CARTILAGINEA	6
COMPONENTE OSSEA	11
COMPONENTE FIBROSA	12
	<b>23</b>
<b>CRESCITA E SVILUPPO</b>	<b>24</b>
ACCRESCIMENTO OSSEO	24
<b>AUXOLOGIA</b>	<b>30</b>
AUXOLOGIA DELL'UOMO	30
AUXOLOGIA DEL RATTO	35
<b>BIOMECCANICA DEL COMPLESSO DI ACCRESCIMENTO</b>	<b>36</b>
<b>TRATTAMENTO DELLE DEVIAZIONI E DELLE DISMETRIE DEGLI ARTI INFERIORI</b>	<b>39</b>
<b>STATO DELL'ARTE</b>	<b>46</b>
<b>OBIETTIVO DELLO STUDIO</b>	<b>51</b>
<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>52</b>
STUDIO IN VITRO	53
STUDIO IN VIVO	57

<b><u>RISULTATI</u></b>	<b>60</b>
<b>STUDIO IN VITRO</b>	<b>60</b>
<b>STUDIO IN VIVO</b>	<b>67</b>
<b><u>DISCUSSIONE</u></b>	<b>70</b>
<b><u>CONCLUSIONI</u></b>	<b>73</b>
<b><u>REFERENZE</u></b>	<b>75</b>

## PREMESSA

---

Le fibre collagene rappresentano uno degli elementi strutturali di base per il tessuto connettivo dell'organismo umano con una distribuzione ubiquitaria all'interno di esso. Tali fibre regolano le risposte degli individui quando sottoposti a carichi e stress meccanici in termini di flessibilità, resistenza e, collaborando con le altre strutture fibrose, forniscono sostegno e contenzione ai tessuti ad esse adiacenti.

Il loro ruolo come modulatrici degli stimoli biomeccanici sembra esercitarsi durante l'accrescimento contribuendo alla composizione del complesso epifiso-metafisario e creando un'impalcatura che circonda le strutture cartilaginee e ossee permettendone lo sviluppo controllato.

Tuttavia, la comprensione delle funzioni delle fibre collagene e il loro impatto sulla crescita ossea rimangono ancora da approfondire. I dati in letteratura sull'interazione tra collagene e accrescimento sono limitati, ma variazioni patologiche della crescita potrebbero essere influenzate da un'alterata interazione di questo sistema di accrescimento con gli altri fattori promuoventi la crescita, come la genetica e l'ambiente.

Partendo da questa ipotesi, sarebbe possibile sfruttare il ruolo contenitivo delle fibre collagene per modulare la crescita selettiva di determinati distretti, infatti sembrerebbe che, andando a rimuovere in modo controllato questo sistema di fibre l'accrescimento venga favorito.

Nella pratica clinica questo meccanismo troverebbe impiego per il trattamento miniminvasivo di deviazioni assiali e dismetrie pediatriche, dove è richiesta non solo una selettività, ma anche un'alternativa farmacologica alle soluzioni chirurgiche attualmente utilizzate.

Questa tesi, quindi, si propone di analizzare la possibile interazione tra fibre collagene e accrescimento scheletrico, osservando le conseguenze della loro scomparsa sul sistema

di contenzione periostale, servendosi di una collagenasi, enzima specifico per la digestione di queste strutture.

Attraverso uno studio in vitro ed uno in vivo si andrà a verificare se trattando dei campioni con questo enzima si manifestino delle modifiche nella crescita e se possa essere considerato sufficientemente selettivo da non creare danni ai tessuti circostanti. Lo studio per la prima volta in questo campo di ricerca utilizza come modello animale un mammifero.



# INTRODUZIONE

---

## EMBRIOLOGIA E SVILUPPO DEL SISTEMA MUSCOLO-SCHELETRICO

Lo sviluppo dell'organismo è un processo che segue tappe ben precise durante il primo trimestre di gestazione. Il prodotto del concepimento, infatti, attraverserà fasi di crescita che lo porteranno alla maturazione nel corso di nove mesi. Gli stadi iniziali dello sviluppo si susseguono rapidamente fino alla formazione della gastrula durante la terza settimana di gravidanza. La gastrulazione determina la formazione di tre foglietti embrionali: ectoderma, endoderma e mesoderma, quest'ultimo darà origine all'apparato muscolo-scheletrico. (Khan & Ackerman, 2023)

Il mesoderma si differenzia in senso longitudinale lungo la corda dorsale organizzandosi in segmenti, i somiti. Da questi, la porzione dorso-laterale, denominata dermomiotomo, formerà il derma e i muscoli, dalla porzione ventro-mediale, definita sclerotomo, origineranno le cellule mesenchimali che prenderanno la linea differenziativa di: fibroblasti, condroblasti e osteoblasti. (O'Rahilly et al., 1956)

Le cellule mesenchimali sono responsabili della formazione di un abbozzo di cartilagine ialina che andrà incontro ad un processo di ossificazione endocondrale o indiretta, ciò avviene nella maggioranza delle ossa. Sono presenti, tuttavia, alcune eccezioni in cui l'ossificazione è membranosa o diretta. Essa è determinata dal mesenchima che si differenzia in tessuto osseo senza tappe intermedie, un esempio di questa maturazione sono le ossa craniche e le clavicole. (O'Rahilly et al., 1956)

Dalla quinta settimana di gestazione diventano riconoscibili gli abbozzi cartilaginei dello scheletro appendicolare e il decorso dell'ossificazione è asimmetrica in senso cranio-caudale; quindi, ossificheranno prima gli arti superiori ed in seguito quelli inferiori.

Il mesenchima si accresce e si differenzia sotto l'influenza della cresta apicale ectodermica, costituita da un ispessimento dell'ectoderma all'apice degli abbozzi degli arti, andando a promuovere il modellamento esterno degli abbozzi distali.

Dalla sesta settimana, in concomitanza con l'accrescimento cranio-caudale, le cellule mesenchimali all'interno degli abbozzi proseguono lungo la linea differenziativa

diventando condroblasti, i quali proliferano e si differenziano in condrociti, questi ultimi andranno a comporre l'intero abbozzo cartilagineo dello scheletro. (Streeter, 1949)

Terminata la formazione dello scheletro cartilagineo, nella parte centrale delle ossa lunghe inizierà un processo di calcificazione della ECM (extracellular matrix) attuata da alcuni condrociti ipertrofici. Nella porzione periferica, invece, durante la settima settimana si formerà per ossificazione intramembranosa un manicotto periostale osseo che avvolgerà gli abbozzi cartilaginei.

Alla conclusione dell'ottava settimana, che segna l'ingresso nella fase fetale dello sviluppo intrauterino, dove era presente una iniziale calcificazione centrale ci sarà la comparsa di gemme vascolari (Gardner, 1956) che, infiltrandosi nello scheletro cartilagineo, promuovono l'attaccamento di nuove cellule mesenchimali, le quali si differenzieranno in osteoblasti ed osteoclasti.

Osteoblasti ed osteoclasti, una volta in sede, agiscono in sinergia deponendo matrice e riassorbendo le trabecole ossee neoformate, andando a formare il centro di ossificazione primario.

Questa costante deposizione e riassorbimento di tessuto determina l'accrescimento osseo longitudinale, inoltre, il riassorbimento nelle ossa lunghe promuove la formazione di una cavità cilindrica che costituirà il canale midollare. La crescita ossea è promossa dall'apposizione di cellule mesenchimali dal polo metafisario, evento che permarrà fino alla nascita.

### ***Formazione del complesso di accrescimento epifiso-metafisario***

Al termine della gestazione la diafisi ha completato l'ossificazione, mentre le due estremità, epifisi, permangono ancora cartilaginee.

L'ossificazione delle epifisi si attua con lo stesso meccanismo della vita intrauterina con la formazione di un nucleo secondario. Questo attraverserà uno stadio iniziale di condro-epifisi, uno intermedio di condro-osteo-epifisi e quello terminale di osteo-epifisi, in questa fase non è ancora avvenuta una congiunzione tra epifisi e metafisi. A separare le due parti dell'osso è uno strato di cartilagine, definita di coniugazione o di accrescimento, che permarrà fino al termine della pubertà, con la conclusione dello sviluppo. L'osso spugnoso che compone le epifisi si espanderà verso la metafisi finchè non scompariranno i dischi epifisari che corrisponde all'ultimo evento dell'accrescimento scheletrico.

## **COMPLESSO DI ACCRESCIMENTO EPIFISO-METAFISARIO**

Un ruolo fondamentale nell'accrescimento osseo viene svolto dal complesso epifiso-metafisario durante l'epoca di sviluppo dell'individuo.

Questo complesso è organizzato in nucleo di ossificazione secondario dell'epifisi, cartilagine epifisaria, cartilagine di coniugazione, osso metafisario e strutture periferiche: pericondrio epifisario, gola di Ranvier, anello fibroso e osseo di Lacroix e periostio.

I vari distretti sono principalmente formati da tessuto: cartilagineo, osseo e fibroso

### ***Componente cartilaginea***

Il nucleo di ossificazione secondario compare durante la vita extrauterina e va a collocarsi al centro di ciò che sarà l'epifisi ossificata e viene ripartito in due sezioni [immagine 1]. La porzione superiore, in continuazione con la futura articolazione, composta da cartilagine articolare propriamente detta e da cartilagine epifisaria, la sezione inferiore è, invece, composta da cartilagine di coniugazione e deputata all'accrescimento del complesso epifiso-metafisario.

I tipi di cartilagine coinvolti in questo distretto sono: cartilagine articolare, epifisaria e di coniugazione. facilitare i movimenti biomeccanici delle articolazioni, permanendo anche nell'adulto non venendo coinvolta nel processo di ossificazione. Questa va, quindi, a rivestire superficialmente le strutture articolari che possono scorrere senza attrito le une sulle altre.

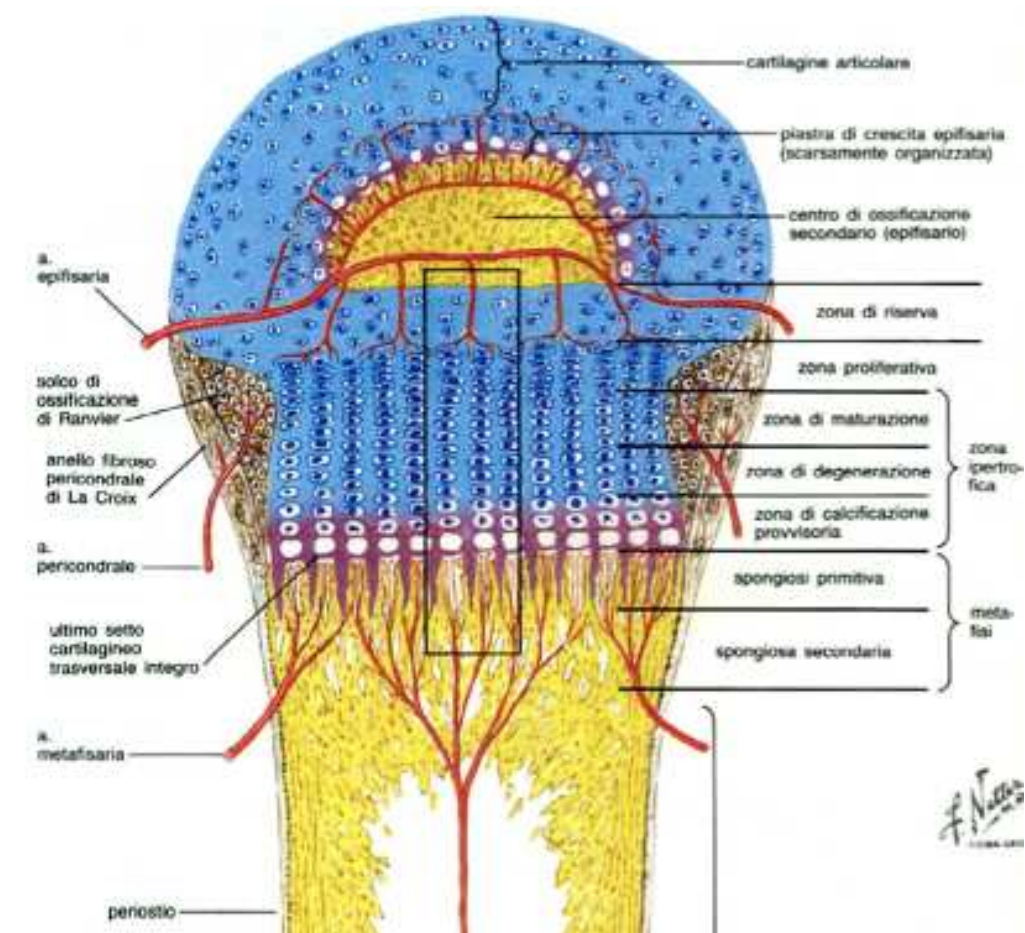


Figura 1: Struttura e apporto di sangue della piastra di crescita. In questa immagine si osserva la disposizione di cellule e fibre nel centro di ossificazione secondario sopra descritto.  
 Immagine tratta da: Larry R Cochard, PhD. (n.d.). *Netter's Atlas of human Embryology*. 18 Jun 2012 (Larry R Cochard, PhD, n.d.)

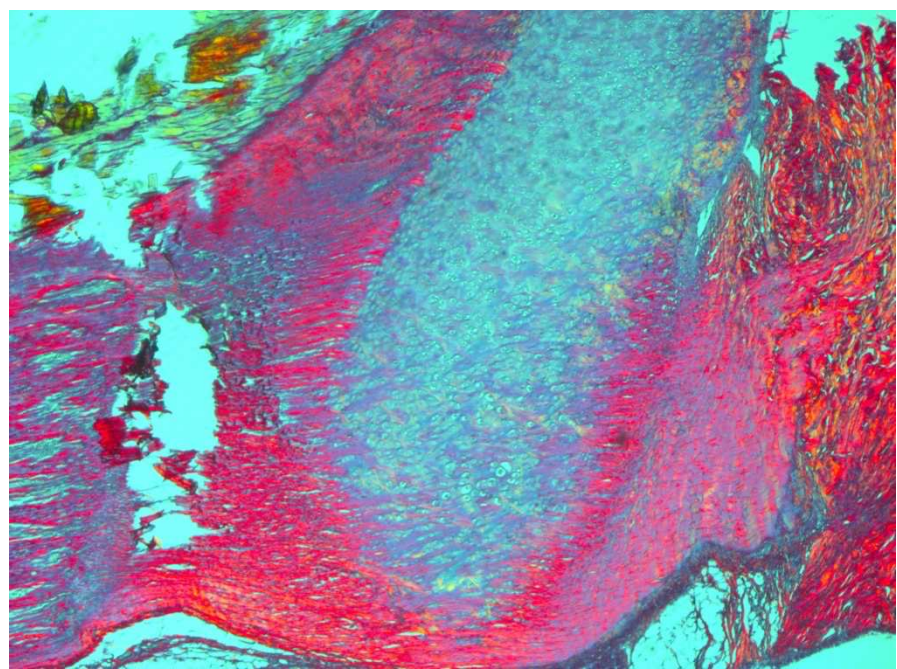


Figura 2: Nucleo secondario di ossificazione epifisario. Colorazione Sirius Red ingrandimento 20X

**Cartilagine epifisaria.** La cartilagine epifisaria, componente profonda del nucleo epifisario, sarà sostituita completamente da osso mediante il processo di ossificazione encondrale.

In prossimità del nucleo di ossificazione si organizza in nidi, composti da circa 10-15 condrociti, che vanno incontro a processi di maturazione, ipertrofia e degenerazione. Queste strutture sono separate da setti di matrice che verranno mineralizzati e costituiranno l'impalcatura sulla quale gli osteoblasti depositeranno nuova matrice.

Le trabecole ossee che si formano in questa cartilagine seguono un andamento parallelo e obliquo al fronte di ossificazione. L'ossificazione del complesso di accrescimento sembra essere diversa, l'osso viene a formarsi direttamente dalla cartilagine e i condrociti coinvolti non vanno incontro ad ipertrofia e maturazione e non si ha la degradazione della matrice cartilaginea.

Tramite colorazioni istochimiche Alcian blu e PAS, specifiche per evidenziare i mucopolisaccaridi acidi e non, si riesce a distinguere la cartilagine articolare da quella più profonda epifisaria, basandosi sulla diversa affinità tintoriale della matrice che le circonda. I condrociti di superficie, propri della cartilagine articolare, presentano una forma allungata, inoltre, sono orientati longitudinalmente e parallelamente rispetto alla superficie. Diversamente, quelli epifisari hanno una forma rotondeggiante e disposti più regolarmente.

L'istochimica permette di evidenziare non solo la disposizione dei condrociti, ma anche la loro graduale transizione da una cartilagine all'altra, fino ad organizzarsi in profondità in nidi compatti con caratteristiche intermedie tra cartilagine epifisaria e di coniugazione. Differentemente, in sezioni del complesso di accrescimento, colorate con Alcian blu e PAS a questo livello si denota, in prossimità dell'osso di nuova formazione, una perdita dell'alcianofilia della matrice, dovuta alla riduzione di proteoglicani, con un mantenimento dell'intensità della PAS positività, indice di permanenza delle glicoproteine. È comune, quindi, osservare cellule intermedie tra condrociti ed osteociti dovuta alla transizione da cartilagine ad osso.

**Cartilagine di coniugazione.** La cartilagine di coniugazione si dispone tra epifisi e diafisi e nel corso della vita fetale si rimodella delineando solchi e avvallamenti, i quali consentono un aumento dell'area totale e una maggiore resistenza alle sollecitazioni meccaniche. (Brighton, 1978; Cohen et al., 1992)

La cartilagine di accrescimento si organizza in tre distretti sulla base di caratteristiche istologiche e biocimiche:

*Zona di riserva*, il cui ruolo non è ancora stato chiarito, è stato ipotizzato abbia una funzione di riserva cellulare. È disposta al di sotto del nucleo epifisario e, dal punto di vista istologico, è caratterizzata da cellule rotondeggianti immerse casualmente in abbondante matrice cartilaginea. Le cellule risiedono in questa zona sono ricche di lipidi e glicogeno, con scarsa attività metabolica e proliferativa. La matrice è ricca di fibre collagene di tipo II con orientamento aleatorio, ma risulta povera di lipidi e glicogeno. Dal punto di vista metabolico si evidenzia un basso contenuto di pO<sub>2</sub> ed una scarsa incorporazione di zolfo radioattivo, andando quindi a rappresentare una zona relativamente inattiva. (Brighton, 1978)

*Zona proliferativa*, la cui funzione principale è l'accrescimento longitudinale del segmento osseo tramite deposizione di matrice e proliferazione cellulare. L'organizzazione di questa zona è in cordoni longitudinali di cellule con citoplasma ricco di glicogeno e attività proteica intensa, inoltre è presente una grande quantità di esosamine, fosfati, Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, K<sup>+</sup>. In ogni colonna le cellule progenitrici sono disposte all'apice e la crescita dell'osso è dipendente dalla cinetica di divisione e alle cellule reclutate da fattori ormonali, meccanici e geneticamente determinati che ne influenzano l'attività. (Greco et al., 1989; van Kampen et al., 1985)

La matrice cellulare è ricca di fibre collagene di tipo II disposte in senso longitudinale. Metabolicamente si registra un'alta quantità di pO<sub>2</sub> e glicogeno, a dimostrare l'intensa attività di questa zona. (Brighton, 1978; Brighton et al., 1973)

*Zona ipertrofica*, in cui avvengono i processi di induzione e regolazione della calcificazione della matrice, presenta una cellularità elevata con un ridotto accumulo di glicogeno. (Brighton et al., 1973) Le cellule che la compongono hanno un'elevata attività

anaerobia e conseguente produzione di lattato. Sembra che l'abbassamento del pH dovuto alla produzione di acido lattico contribuisca alla riduzione della produzione di ATP progredendo verso gli strati più profondi. La ridotta disponibilità energetica potrebbe essere alla base dell'accumulo di calcio, il quale induce la calcificazione della matrice. La matrice è ricca di collagene di tipo X, contenuto nelle vescicole, e di proteoglicani disaggregati che sembrano avere un ruolo nella mineralizzazione della matrice inibendo la formazione di cristalli di calcio.

Sono state, però, ipotizzate due teorie sulla calcificazione della matrice.

La prima teoria ipotizza che il rilascio del calcio da parte mitocondri dello strato inferiore della zona ipertrofica porta il legame dello ione ai proteoglicani che si organizzano in rosette e vengono descritte come vescicole di matrice. Queste vescicole contengono fosfatasi alcalina che idrolizza il pirofosfato di calcio che, al contrario, ha il compito di inibire la calcificazione. Quindi, nei due terzi inferiore la matrice è ricca di vescicole contenenti calcio e nel terzo inferiore viene liberato a formare cristalli di idrossiapatite che occupano gli spazi tra le fibre collagene e invadono progressivamente la struttura. (Ali, 1976; Fleish & Neuman, 1961)

La seconda teoria propone che i cristalli di calcio vengano prodotti tramite un processo omogeneamente distribuito all'interno dell'interstizio tra le fibre collagene e matrice provvisoria. Il processo si conserva finché non sono stati riempiti tutti gli spazi interfibrillari. (Glimcher, 1987)

Anche se il processo di mineralizzazione rimane sconosciuto, questo comporta una riduzione della diffusione di ossigeno nella zona di ipertrofica, favorendo un metabolismo anaerobico che sostiene la calcificazione.

Nello strato inferiore si riscontra degenerazione cellulare e la matrice neoformata viene invasa da vasi metafisari che portano con sé cellule che occupano gli spazi liberi intercellulari. (Robertson, 1990)



### *Componente ossea*

La componente ossea delimitata dall'ultimo setto trasverso dello strato ipertrofico della cartilagine di coniugazione è definita osso metafisario.

L'ultimo setto trasverso che non viene degradato sarà poi degradato da enzimi lisosomiali e sostituito da cellule endoteliali e perivascolari.

In questa regione si viene a formare un fronte di calcificazione iniziale, la spongiosa primaria, dove viene deposta in senso longitudinale la cartilagine calcifica e sono osservabili cellule polimorfe osteoprogenitrici intercalate tra i capillari vasali e gli osteoblasti.

La spongiosa primaria sarà gradualmente sostituita per azione degli osteoblasti che sostituiscono l'impalcatura cartilaginea con tessuto osseo, seguendo il meccanismo di ossificazione encondrale. (Brighton et al., 1973)

Successivamente il tessuto osseo sarà riassorbito dagli osteoclasti che operano in sincrono con gli osteoblasti che continuano a formarlo. Questo rimodellamento coinvolge le regioni periferiche e sub-periostali della metafisi, in tal modo si riduce il diametro trasverso e permette la fusione tra osso diafisario e metafisario.

L'angiogenesi della metafisi ha attualmente una genesi ancora poco definita, ma si pensa che una condizione necessaria sia la mineralizzazione della matrice cartilaginea, inoltre si pensa che la cartilagine stessa rilasci dei fattori di crescita endoteliale che favorirebbe fenomeni di invasione vascolare. (Klagsbrun & Smith, 1980)

Da un punto di vista metabolico l'osso metafisario presenta stasi vascolare, bassa pO<sub>2</sub> e metabolismo anaerobio. (Brighton et al., 1973)

### ***Componente fibrosa***

Nella regione periferica dell'osso in accrescimento si individuano varie strutture che insieme configurano la componente fibrosa.

In essa fanno parte: Gola di Ranvier, anello fibroso periostale e pericondrale di Lacroix e fibre ad esse associate.

### **Gola di Ranvier**

La gola di Ranvier [Figura2] è una regione cuneiforme che segna il confine tra epifisi e metafisi. La struttura va a circondare il complesso cartilagineo di accrescimento epifiso-metafisario delle ossa che vanno in contro ad ossificazione endocrale, la sua profondità varia in base all'osso osservato, risultando ben sviluppato nelle ossa superficiali e appena accennato in altre regioni, come la glenoide della scapola o il labbro acetabolare. La variabilità è anche attribuibile alla maturità scheletrica dell'individuo, infatti si riduce con l'età.

La gola venne descritta da Ranvier come una struttura formata da più componenti che di dispongono in strati. (Ranvier, 1873) La gola viene circoscritta tra l'anello fibroso esterno, il quale è in continuità con il pericondrio-periostio, e l'anello osseo interno di Lacroix, che contrae rapporto con condrociti e zona di ossificazione.

Si riconoscono, al suo interno, tre diverse zone:

Zona interna: è distinta da cellule fittamente stipate, densely packed cells. (Shapiro et al., 1977) Si pensa che le cellule al loro interno siano i precursori degli osteoblasti, i quali formeranno l'anello osseo pericondrale di Lacroix.

Zona intermedia: caratterizzata da una ridotta concentrazione di cellule, less density packed cells. (Shapiro et al., 1977) Questa è rappresentata da cellule di natura mesenchimale relativamente indifferenziate, si ipotizza siano progenitrici dei condroblasti, che, tramite un meccanismo di apposizione condrogenetica siano responsabili dell'accrescimento il larghezza dell'epifisi.

Zona esterna: fibroblasti e fibrociti nella zona superficiale si trovano intercalati all'interno della matrice di fasci di collagene. Queste fibre si orientano e si organizzano ordinatamente per formare un manicotto fibroso in successione con il periostio e con il pericondrio. (Shapiro et al., 1977)

Da questo involucro si dipartono le fibre che arrivano all'epifisi e si ancorano al periostio durante l'accrescimento.

La gola di Ranvier sembrerebbe avere anche una funzione staminale, infatti è stata rinvenuta all'interno del solco pericondrale una nicchia di cellule progenitrici che rispondono a marcatori specifici di cellule staminali, come Stro-1, Jagged1 e BMP1a. (Karlsson et al., 2009)

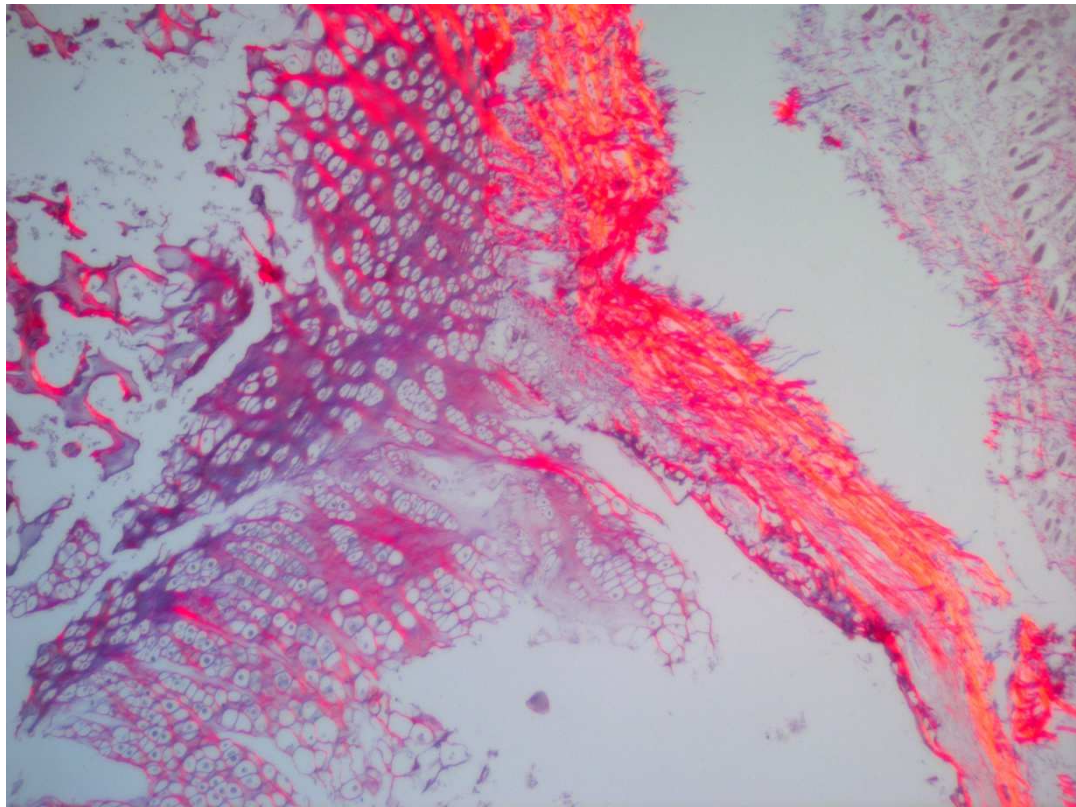


Figura 3: Complesso epifiso-metafisario. Colorazione Sirius Red ingrandimento 10X.

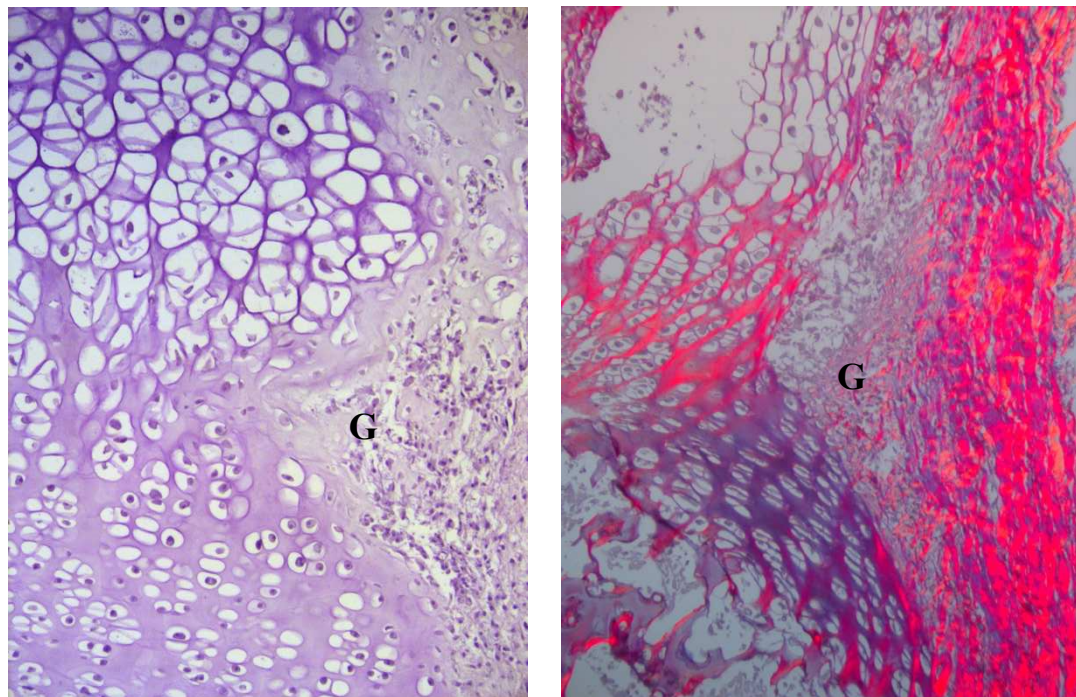


Figura 4: Immagine a sinistra. Dettaglio della gola di Ranvier (G). Immunoistochimica ingrandimento 20X.  
Immagine a destra. Dettaglio della gola di Ranvier. Sirius Red ingrandimento 20X.

### **Anello osseo e fibroso pericondrale di Lacroix**

Lacroix nel 1951 e, successivamente, Shapiro nel 1977 descrissero la ghiera o manicotto pericondrale, come anello osteo-pericondrale. (Lacroix, 1951; Shapiro et al., 1977)

Questo involucro, si trova internamente alla gola di Ranvier, a contatto con la cartilagine ipertrofica e con l'osso metafisario neoformato. L'anello ha la funzione di impalcatura per la zona metafisaria, andando a circondare la cartilagine ipertrofica, per poi continuarsi con l'osso sottostante. Quindi questa zona non ha solo funzione di sostegno esterno, ma partecipa anche al processo di rimodellamento della porzione metafisaria, tramite un meccanismo di riassorbimento osteoclastico.

L'anello fibroso, invece, va a delimitare la gola di Ranvier esternamente ed è posto in continuità con il complesso di fibre periostali.

## **Fibre elastiche**

Rappresentano la componente fibrosa più antica filogeneticamente. (ROSS, 1973) Sono costituite da elastina e microfibrille, si ritiene che l'elastina conferisca le proprietà elastomeriche del tessuto e le microfibrille, le quali non sono dotate di proprietà elongative, determinino la resistenza agli stimoli meccanici a cui le fibre sono sottoposte. (Cotta-Pereira & Iruela-Arispe, 1989)

Le due componenti vanno a combinarsi tra loro a formare tre tipi di fibre diverse:

Fibre oxytalan (dal greco οξύσ acido e ταλαν resistente)

Fibre di elaunina

Fibre elastiche propriamente dette o fibre mature

Si è osservato come queste fibre siano una il passaggio evolutivo dell'altra. Infatti, inizialmente vengono prodotte le fibrille e poi l'elastina si deposita al loro interno, passando dalle fibre oxytalan a quelle di elaunina ed infine alle fibre elastiche mature. (Pasquali-Ronchetti et al., 1995)

I differenti stadi maturativi possono essere distinti da colorazioni istochimiche che permettono di evidenziare i diversi tipi di fibre. Tuttavia, per una migliore distinzione si deve usufruire dell'analisi ultrastrutturale.

Le fibre oxytalan reagiscono alla colorazione di Fullmer e Lillie (Fullmer & Lillie, 1958) dopo ossidazione, al microscopio elettronico sono composte solamente da fasci di microfibrille, rappresentando la prima tappa del processo di maturazione. (Ghadially & More, 1989)

Le fibre di elaunina, tappa intermedia, si colorano con fucsina resorcinolo di Weigert e con l'aldeide fucsica di Gomori, ma non con l'ematossilina ferrica di Verhoeff. (Ghadially & More, 1989) Al microscopio elettronico si osservano fasci di fibrille che attraversano discontinui aggregati di elastina. (Ghadially & More, 1989)

Le fibre mature, invece, vengono evidenziate dalla colorazione fucsina resorcinolo di Weigert e l'aldeide fucsica di Gomori. Al TEM (transmission electron microscope), queste fibre, appaiono costituite da un core amorfo di elastina circondato da una componente fibrillare di 10-12 nm di diametro. (Ghadially & More, 1989)

Questo sistema di fibre viene individuato anche a livello del complesso epifiso-metafisario [Figura 5], maggiormente rappresentate nel pericondrio epifisario, nella zona esterna delle fibre pericondrio-periostali e nella zona intermedia della gola di Ranvier. (Gigante et al., 1996)

Le fibre seguono un orientamento definito in base alla sede osservata: vanno a disporsi sia in senso longitudinale [Figure 6 e 7] che circonferenziale e rispettando il gradiente maturativo di esse, le oxytalan si ritrovano nelle zone più interne e nelle prime fasi dello sviluppo, l'elaunina nella zona intermedia della Gola e quelle mature prevalgono nelle zone più esterne e nei soggetti in fase di sviluppo più avanzate.

Durante la gestazione medio-tardiva è stato ipotizzato che vengano deposte le microfibrille, con lo scopo di formare le fondamenta per le fibre elastiche mature, queste ultime, però, verranno assemblate solo durante lo sviluppo postnatale. Indipendentemente dall'elastogenesi si è osservata una riduzione delle fibre oxytalan e di elaunina, più numerose nel periostio dei giovani e più rade in quello degli adulti, mentre le fibre elastiche mature non vanno incontro a modificazioni con l'avanzare dell'età, in nessuno dei due casi, però, si osservano nuove deposizioni di strutture. (Gigante et al., 1996)

Una volta deposte le fibre collagene, inizierà un sistema di regolazione omeostatico tramite proteine come, ad esempio, la lisil-ossidasi-1 che regolano il turn over ed, in base alla sede, questo meccanismo può essere più o meno rappresentato.

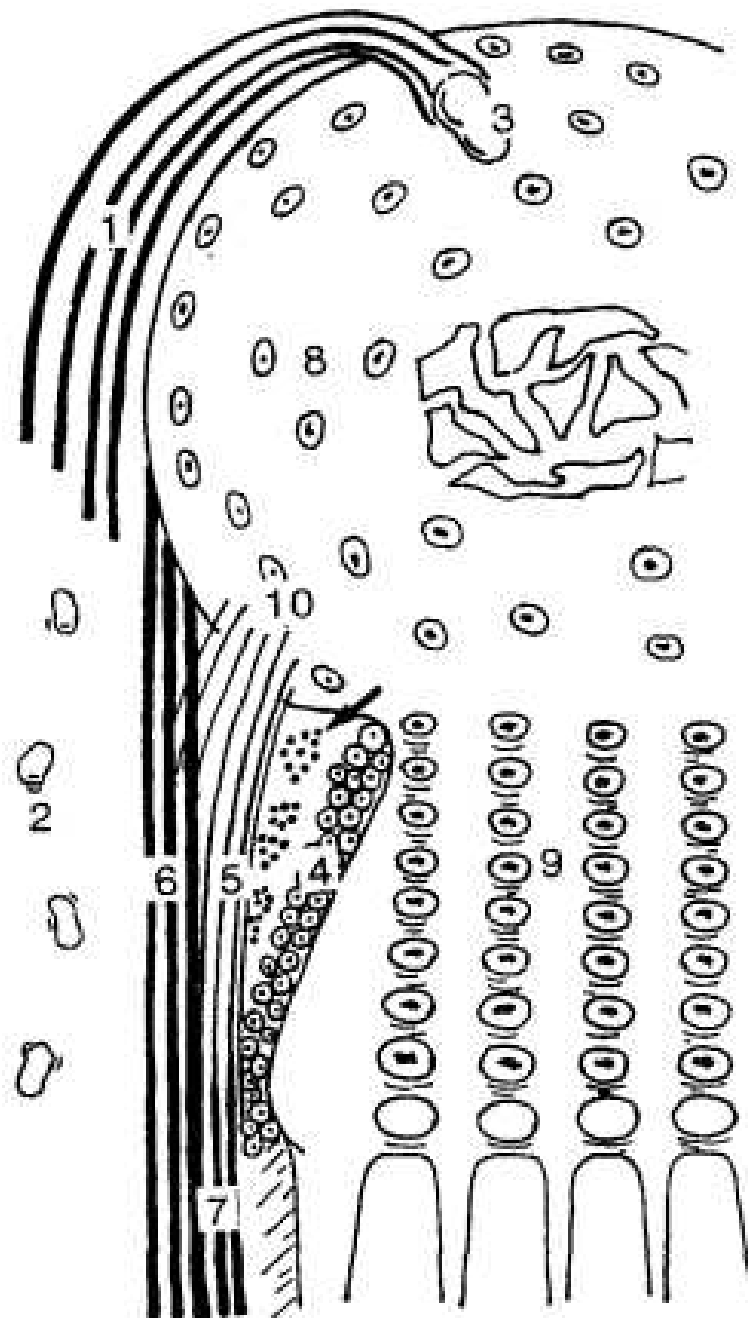


Figura 5: Illustrazione della localizzazione delle fibre elastiche nella regione epifiso-metafisaria in sezione longitudinale. Le fibre elastiche si ritrovano nel (1) pericondrio (prevalentemente mature e longitudinali), (2) arteriole pericondrali, (3) piccoli vasi epifisari, (4) zona interna della Gola di Ranvier (fibre assenti), (5) zona intermedia della gola (fibre oxytalan ed elaunina con orientamento longitudinale e circonferenziale [freccia]), (6) zona esterna della Gola (fibre elastiche mature e longitudinali), (7) strato esterno dell'anello pericondrale (prevalentemente fibre mature e longitudinali), (8) cartilagine epifisaria (fibre assenti), e (9) disco di crescita (fibre assenti). Alcune fibre longitudinali di elaunina e oxytalan dalla zona intermedia della Gola (5) penetrano nella cartilagine epifisaria per un breve tratto (10).

*Immagine tratta da Gigante A, Specchia N, Nori S, Greco F. Distribution of elastic fiber types in the epiphyseal region. J Orthop Res. 1996 Sep;14(5):810-7. doi: 10.1002/jor.1100140519. PMID: 8893776.*



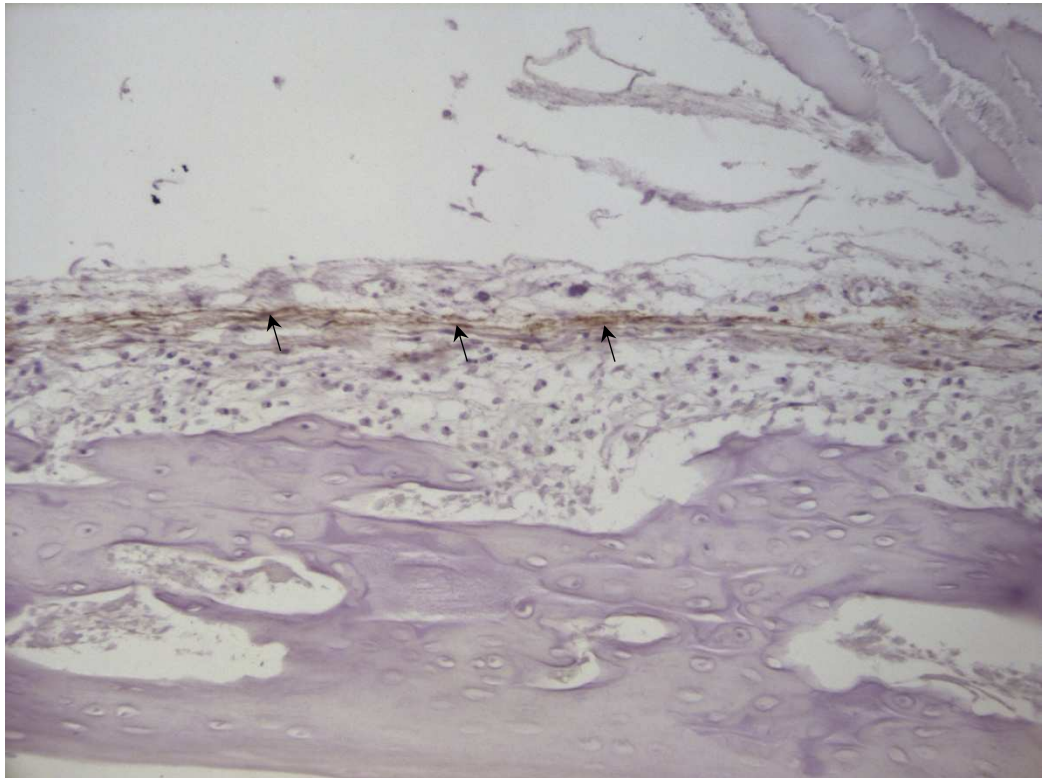


Figura 6: Dettaglio fibre elastiche periostali che decorrono longitudinalmente lungo le strutture ossee. Immunoistochimica con anticorpo anti-elastina (freccie) ingrandimento 20X.

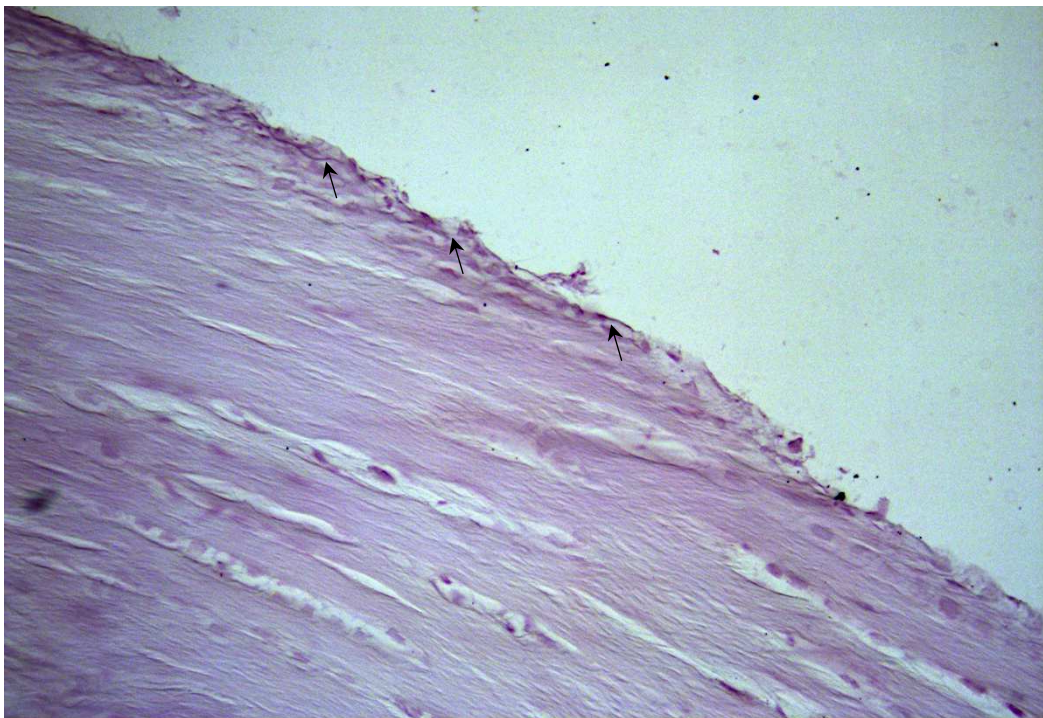


Figura 7: Dettaglio fibre elastiche pericondro-periostali. Colorazione Orceina ingrandimento 40 X.

## **Fibre collagene**

La struttura del collagene è stata studiata da vari autori. (Astbury & Bell, 1940; Cowan et al., 1955; Pauling & Corey, 1951; Ramachandran & Kartha, 1954, 1955; Rich & Crick, 1955, 1961, 2018) Le varie teorie concordano sulla configurazione dell'unità strutturale, il tropocollagene.

Il tropocollagene è costituito da una tripla elica polipeptidica, ognuna di esse ha un avvolgimento sinistrorso e si organizzano l'una con l'altra a formare una superelica destrorsa, per impedire che le eliche perdano l'architettura.

Ciascuna catena di tropocollagene conta circa mille residui amminoacidici, formando una struttura primaria con sequenza  $(\text{Gly-X-Y})_n$  dove, in genere, X corrisponde alla Prolina e Y all'idrossiprolina.

Le molecole poi si intercalano tra loro a  $\frac{1}{4}$  della propria lunghezza, andando a comporre la fibre collagene.

Il collagene ha una distribuzione ubiquitaria nell'organismo, si va ad organizzare in molti modi e i differenti residui amminoacidici che vanno a comporre l'elica permette la suddivisione in tipi.

Il collagene che principalmente contribuisce alla composizione dell'osso è il tipo I, anche se sono stati descritti al suo interno anche il collagene di tipo III e Vi, soprattutto durante il periodo di sviluppo. (Keene et al., 1991)

Il collagene I non si dispone in modo uniforme all'interno delle vari distretti ossei, si ritrova principalmente all'interno del complesso epifiso-metafisario.

Alcuni autori (Shapiro et al., 1977; Speer, 1982) hanno utilizzato la luce polarizzata combinata allo studio al microscopio elettronico a trasmissione per individuare i sette principali gruppi di fibre all'interno del complesso di accrescimento [Figura 8]:

Fibre pericondrio-periostali (longitudinali), comprendenti anche la zona esterna della gola di Ranvier

Fibre transfisiali (longitudinali) dello strato proliferativo

Fibre epifisarie (radiali o trasverse)

Fibre transfisiali (longitudinali) dello strato ipertrofico

Fibre dell'osso metafisario (circonferenziali e oblique)

Fibre della gola di Ranvier (longitudinali e circonferenziali)

Fibre della ghiera ossea pericondrale di Lacroix (circonferenziali)

Le fibre collagene ad andamento longitudinale predominano nel pericondrio-periostio.  
[Figure 9 e 10]

Di queste, le fibre transfisiali dello strato proliferativo sono in continuità con quelle dello strato ipertrofico e decorrono lungo i margini della cartilagine calcifica terminando a livello del centro di ossificazione secondario della cartilagine epifisaria. Le fibre vanno ad embricarsi in questa sede con le fibre epifisarie hanno una direzione radiale dal centro di ossificazione secondario alla zona di riserva.

L'orientamento del collagene è, invece, diverso nella spongiosa primaria, dove sono dirette in senso obliquo e circonferenziale in rapporto ai setti di cartilagine calcificata.

L'orientamento circonferenziale si ritrova abbondantemente anche in corrispondenza della gola di Ranvier e nel pericondrio-periostio che la circonda.

Si pensa che queste fibre esercitino un ruolo importante nel normale sviluppo del complesso di accrescimento e, quando alterato, svolgano anche un ruolo nell'accrescimento patologico dell'individuo.

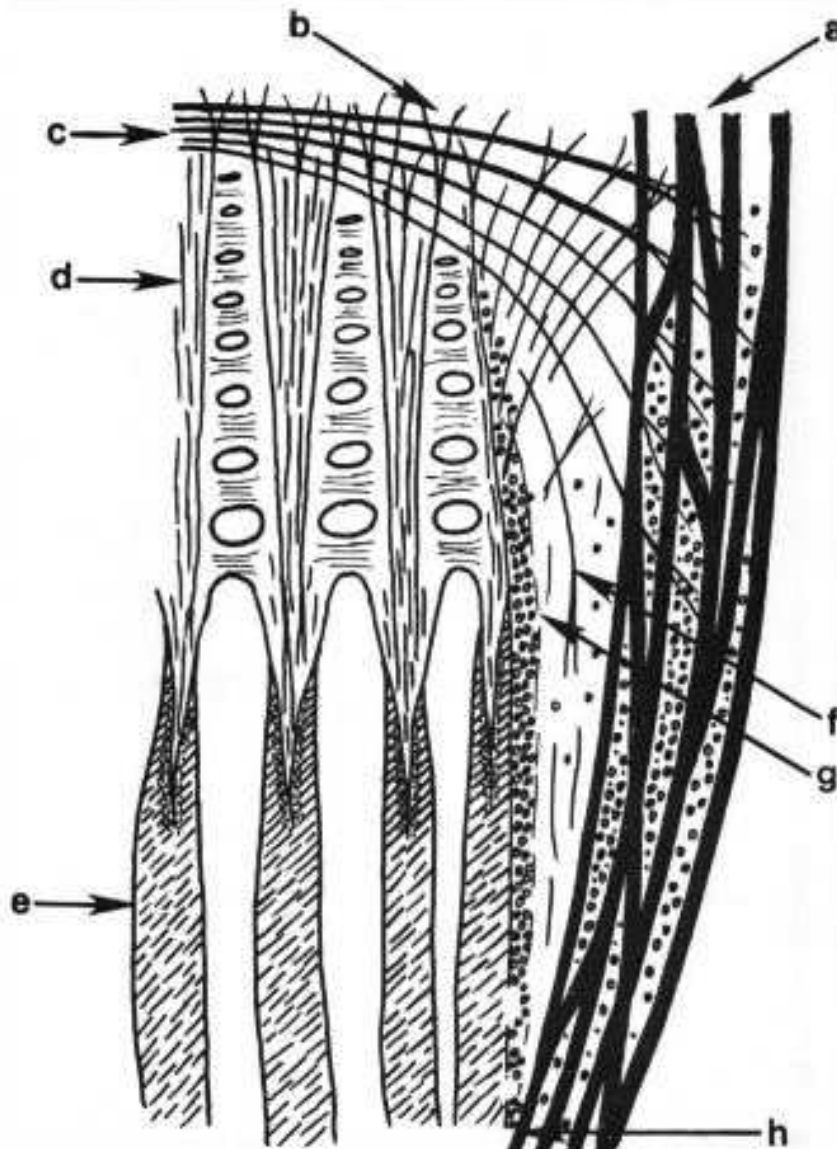


Figura 8: Illustrazione di una sezione longitudinale dell'estremità epifisaria di un osso in crescita. I gruppi di fibre collagene e le loro relazioni sono designati come segue.

- a**, Gruppo di fibre pericondriali e periostali (longitudinale).
- b**, Fibre transverse (longitudinali) al centro di ossificazione secondario dopo aver attraversato la regione delle fibre epifisarie radiali e il complesso di crescita.
- c**, Gruppo di fibre epifisarie (radiali o trasversali) tra il complesso di accrescimento e il centro di ossificazione secondario.
- d**, gruppo di fibre transverse (longitudinali) che si estende dall'epifisi alla metafisi nei setti cartilaginei longitudinali tra le colonne di condrociti del complesso di accrescimento.
- e**, gruppo di fibre ossee metafisarie (circonfenziali o oblique) formate sui setti cartilaginei longitudinali residui.
- f**, area cellulare del solco di ossificazione pericondriale, con poche fibre longitudinali e circonfenziali.
- g**, gruppo di fibre dell'anello osseo pericondriale (circonfenziale).
- h**, intersezione del pericondrio-periostio e dell'anello osseo pericondriale, che termina il solco pericondriale.

*Immagine tratta da: Speer, D. P. (1982). Collagenous architecture of the growth plate and perichondrial ossification groove. The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume, 64(3), 399-407.*



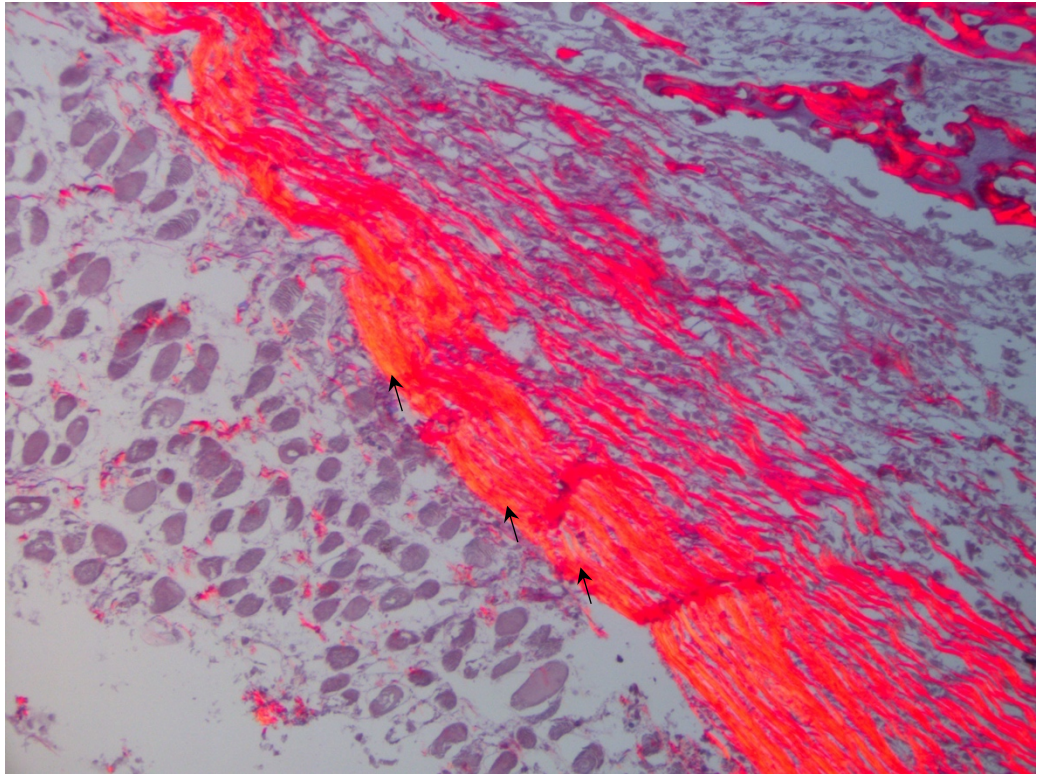


Figura 9: Fibre collagene del complesso pericondro-periostale (freccie). Colorazione Sirius Red ingrandimento 40X

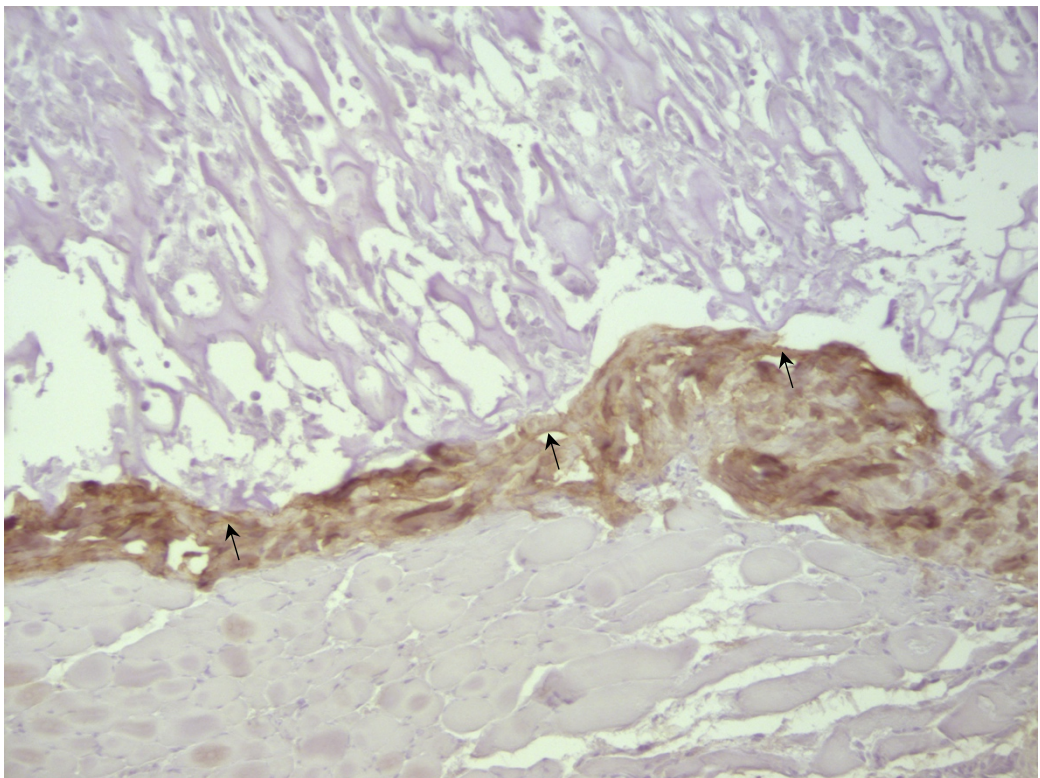


Figura 10: Fibre collagene pericondro-periostali. Immunoistochimica per collagene di tipo I ingrandimento 40X.

## CRESCITA E SVILUPPO

### *Accrescimento osseo*

I fattori concomitanti all'accrescimento longitudinale osseo sono suddivisibili in sistemici e locali. Il complesso di accrescimento epifiso-metafisario è quindi stimolato dalla presenza o meno di essi e una loro alterazione contribuisce patologicamente allo sviluppo dell'apparato muscolo-scheletrico.

Tra i fattori locali rientrano le forze meccaniche, ovvero la pressione che viene esercitata dalla tensione muscolare sui tessuti, la vascolarizzazione e le strutture fibrose pericondrio-periostali, in quelli sistemici si collocano quelli genetici e ormonali. (Carvell, 1983; Cohen et al., 1992; Houghton & Dekel, 1979; Jenkins et al., 1975; Lutfi, 1974; Lynch & Taylor, 1987; McLain & Vig, 1983; Speer, 1982; Trueta & Morgan, 1960; Warrell & Taylor, 1979)

L'accrescimento in larghezza ha una genesi da definire, alcune ipotesi affermano che la crescita sia promossa dall'apposizione dal pericondrio-periostio e riassorbimento endostale della corteccia ossea sul lato opposto, (Schollmeier et al., 1999; Takeuchi, 2000) oltre che l'ispessimento avvenga tramite un meccanismo interstiziale e che riguardi principalmente l'ipertrofia delle cellule della cartilagine epifisaria, l'alta attività proliferativa dello strato cellulare profondo e della zona marginale della cartilagine epifisaria e il graduale aumento della produzione di matrice.

## **Fattori locali**

*Sollecitazioni meccaniche.* Lo stimolo meccanico è uno degli stimoli principali per la regolazione omeostatica della cartilagine di coniugazione, questa è in grado di distinguere i vari stimoli e adattare la propria cinetica metabolica in funzione di essi, per questo vanno somministrati in modo adeguato. (J. C. Copray et al., 1983; J. C. V. M. Copray et al., 1985; Greco et al., 1989)

Infatti, il carico a cui è sottoposto l'osso in accrescimento stimola la proliferazione cellulare e sintesi proteica del complesso epifiso-metafisario.

È stato osservato che i condrociti in coltura, quando vengono sottoposti ad una compressione intermittente, presentano un incremento della proliferazione cellulare tramite l'attivazione delle somatomedine e del GH, produzione di ECM ed aumento della deposizione di fosfati di calcio nella matrice. (Greco et al., 1989; Klein-Nulend et al., 1986; van Kampen et al., 1985)

*PTHrP- Hedgehog proteine.* È stata evidenziata la presenza di Ihh (Indian Hedgehog Protein) nei condrociti maturi ed ipertrofici della cartilagine embrionale e neonatale e della cartilagine di accrescimento di topo e pulcino. (Iwasaki et al., 1997, 1999; Vortkamp et al., 1996) La concentrazione della proteina si riduce gradualmente fino a scomparire, ma in risposta ad uno stimolo traumatico i suoi livelli tornano ad aumentare. (Iwasaki et al., 1999)

L'Ihh, prodotta dai condrociti che entrano nella fase ipertrofica, si lega ai recettori espressi dal pericondrio adiacente con la funzione di regolare la differenziazione dei condrociti nella cartilagine di accrescimento. Infatti, il legame dell'Ihh e recettori Ptc inducono la produzione di PTHrP (Proteina correlata al PTH). (Lanske et al., 1996; Vortkamp et al., 1996) Questa proteina agisce bloccando la maturazione di una quota di condrociti ipertrofici, esercitando un feedback negativo sull'espressione di Ihh.

L'assenza dei geni per la codifica di PTHrP o dei suoi recettori determina un'ossificazione precoce nel modello murino (Lanske et al., 1996; Vortkamp et al., 1996), anche se è più difficile da determinare nei tessuti post-embryonali e quindi si pensa che ci siano vari

meccanismi coinvolti. (Farquharson et al., 2001; Grimsrud et al., 1999; Reppe et al., 2000; van der Eerden et al., 2000)

L'Ihh agisce anche tramite un meccanismo PTHrP indipendente, infatti sopprimendo l'espressione di Ihh si è visto che il PTHrP riusciva a prevenire l'ossificazione precoce, ma il modello sperimentale era comunque caratterizzato dalla brevità degli arti, per questo sembra che la presenza di Ihh si indispensabile per la proliferazione condrocitaria. (Karp et al., 2000)

*Pericondrio-periostio.* Anche le fibre pericondrio-periostali sembrano avere un ruolo nella regolazione ed accrescimento. (Kuijpers-Jagtman et al., 1988) Secondo un'ipotesi biomeccanica avrebbero un ruolo di modulatrici dell'accrescimento longitudinale dell'osso lungo, andando ad esercitare un meccanismo di feedback negativo sulla proliferazione condrocitaria tramite la messa in tensione delle fibre stesse. (Houghton & Dekel, 1979; Jenkins et al., 1975; Lutfi, 1974; Speer, 1982)



## **Fattori sistemici**

*Ormone della crescita – Somatomedine.* Il GH è un ormone di natura polipeptidica prodotto dall'ipofisi ed è fondamentale per l'accrescimento armonico dell'organismo durante il periodo post-natale fino al termine della pubertà.

Questo ormone agisce stimolando la produzione di Somatomedine, tra cui si evidenzia l'IGF-I.

I recettori per le Somatomedine e per il GH sono presenti sui condrociti del complesso di accrescimento. (Trippel, 1995) La loro espressione è stata dimostrata tramite studi su condrociti isolati dalla cartilagine di accrescimento. (Nilsson et al., 1989)

L'interazione del recettore e della molecola influirebbe positivamente sulla deposizione di ECM e sulla proliferazione condrocitaria, è stato ipotizzato che le due proteine agiscano su popolazioni diverse, il GH, in particolare, influenzerebbe maggiormente le cellule più mature. (Lindahl et al., 1987; Trippel et al., 1986; Van Wyk et al., 1984)

*TGF $\beta$  - Transforming growth factor  $\beta$ .* Il TGF $\beta$  agisce durante l'embriogenesi di osso e cartilagine (Seyedin et al., 1986) inibendo alcune fasi dell'ossificazione encondrale e la sua azione può essere diretta o tramite la stimolazione di PTHrP. (Serra et al., 1999; Terkeltaub et al., 1998)

L'effetto del TGF $\beta$  sulla sintesi dei proteoglicani e proliferazione cellulare varia in modo dose dipendente (H et al., 1989; Hiraki et al., 1988; O'Keefe et al., 1988; Rosier et al., 1989) ed in funzione dello stato differenziativo dei condrociti, ottenendo una stimolazione maggiore nelle cellule meno differenziate. (Galéra et al., 1992; van Beuningen et al., 1993; van der Kraan et al., 1992)

Riserve di TGF $\beta$  si ritrovano complessate con la molecola LTBPII (Latent Transforming Growth Factor Beta Binding Protein 1) all'interno dei condrociti del complesso di accrescimento. La molecola legante il TGF $\beta$  lo mantiene in uno stato latente e probabilmente ne regola l'attivazione. (Pedrozo et al., 1998)

Si ritrova in grandi quantità anche nell'osso adulto con livelli aumentati nel callo di guarigione delle fratture. (Sporn & Roberts, 1989)

*BMP - Bone Morphogenetic Protein.* Ha la funzione di indurre lo sviluppo di tessuto cartilagineo ed osseo in sede ectopica (Urist et al., 1984), soprattutto durante le prime sette settimane di gestazione sono basilari per lo sviluppo di cartilagine ed osso promuovendo l'accrescimento radiale e contrastando la formazione delle articolazioni svolgendo una funzione anche nella morfogenesi degli arti. (Chang et al., 1994)

Le molecole identificate sono sette (da BMP-1 a BMP-7) e rientrano all'interno della famiglia del TGF $\beta$ , tranne BMP-1.

Il mesenchima riceve segnali per la differenziazione lungo la linea condro-osteogenetica dalle BMP. Infatti, sotto la spinta di questi fattori si ottiene la formazione durante la vita embriologica di cartilagine ed osso a partire dalle cellule del manicotto perivascolare mesenchimale. (Urist et al., 1984; Wozney et al., 1988)

Le BMP risultano attive anche durante la vita extrauterina in situazioni patologiche come nel caso di fratture, dove aumenta l'espressione di BMP-2 e BMP-4. (Bostrom et al., 1995)

*bFGF - Basic Fibroblast Growth Factor.* L'osso viene stimolato a deporre tessuto da questo ormone tramite un processo dose dipendente, la concentrazione di esso va a stimolare od inibire la sintesi e degradazione dei proteoglicani a diverse dosi. (Aspenberg et al., 1991; Aspenberg & Lohmander, 1989; Trippel et al., 1986)

Viene sintetizzato da condrociti ed osteociti e viene immagazzinato nella matrice extracellulare. (Bolander, 1992)

È stata dimostrata la sua presenza anche nel complesso di accrescimento epifisario (Twal et al., 1994) e nel callo di frattura durante le fasi di riparazione (Bolander, 1992), è stato evidenziato anche la capacità di neoangiogenesi sia in vivo che in vitro. (Eppley et al., 1988)

*Paratormone e Calcitonina.* Il PTH è fondamentale nello sviluppo fisiologico del sistema scheletrico del feto (Miao et al., 2002) e nello stimolarne la crescita successivamente. (Ogawa et al., 2002)

La somministrazione esogena provoca un aumento dell'attività catalitica dei condrociti della zona ipertrofica che una maggiore sintesi di proteoglicani, inducendo, un aumento di volume del complesso di accrescimento. (Havelka et al., 1979)

Non si hanno certezze sul reale meccanismo d'azione della calcitonina, ma gli effetti sembrano essere sovrapponibili a quelli del PTH.

Estrogeni. Sesso ed età dell'individuo influenzano il funzionamento degli ormoni. Essi svolgono un'azione sistemica inibitoria sull'accrescimento delle ossa lunghe. Il loro ruolo sul meccanismo d'azione sulle cellule del complesso di accrescimento non è noto, ma somministrando estrogeni esogeni in dosi superiori agli estrogeni si è determinata una precoce chiusura delle fisi epifisarie. (M. S. Silberberg & Silberberg, 1971)

Testosterone. Determina la maturazione dei condrociti e l'ossificazione delle metafisi, nel caso in cui si registri un eccesso di testosterone si realizza un'ossificazione precoce con un'azione ancora non del tutto nota. (M. Silberberg & Silberberg, 1956)

Glucocorticoidi. I glucocorticoidi hanno un'azione di rallentamento della crescita scheletrica (Friedman & Strang, 1966), andando ad inibire l'azione delle somatomedine sul complesso di accrescimento.

Tirosina. Agisce in sinergia con il GH, tuttavia un suo eccesso determina un difetto di crescita dovuto al suo effetto sul catabolismo proteico.

Vitamina D e Metaboliti. La cartilagine del complesso di accrescimento presenta entrambi i recettori intracellulari per i metaboliti della vitamina D, 24-25 diidrossicolecalciferolo e 1-25 diidrossicolecalciferolo, questi si localizzano nella zona proliferativa e nello strato superiore della zona ipertrofica, la reazione tra ligando e recettore ha l'effetto di stimolazione della matrice tramite un meccanismo non ancora definito.

Il tessuto cartilagineo ha, inoltre, la capacità di convertire il 25 idrossiD3 in 24-25 diidrossiD3. (Garabedian et al., 1978)

## **Auxologia**

L'auxologia è un settore della biologia e della medicina che studia i fenomeni, i fattori e le leggi dell'accrescimento.

Con il termine di accrescimento si definisce il complesso di eventi che inizia dal concepimento al raggiungimento dell'età adulta che concorrono alla formazione dell'individuo, il ritmo dell'accrescimento alterna momenti di maggiore e minore crescita.

### ***Auxologia dell'uomo***

All'interno del processo di accrescimento si distinguono varie fasi:

*Fase prenatale.* Durante questo periodo si ha un rapido accrescimento fino alla dodicesima settimana che segua una decelerazione graduale, questa proseguirà anche nella vita postnatale. (Matthiass HH., 1987) Eventuali danni a questo livello di sviluppo vanno a determinare gravi alterazioni nel periodo embrionario. Nel periodo fetale, invece, i fattori potenzialmente lesivi determinano un danno inferiore, anche per la ridotta velocità di crescita.

La crescita intrauterina viene valutata tramite grafici di riferimento sia per la fase embrionale che fetale, utilizzando parametri di circonferenza craniale, lunghezza e peso.

[Figura 11] (Hensinger, 1986)

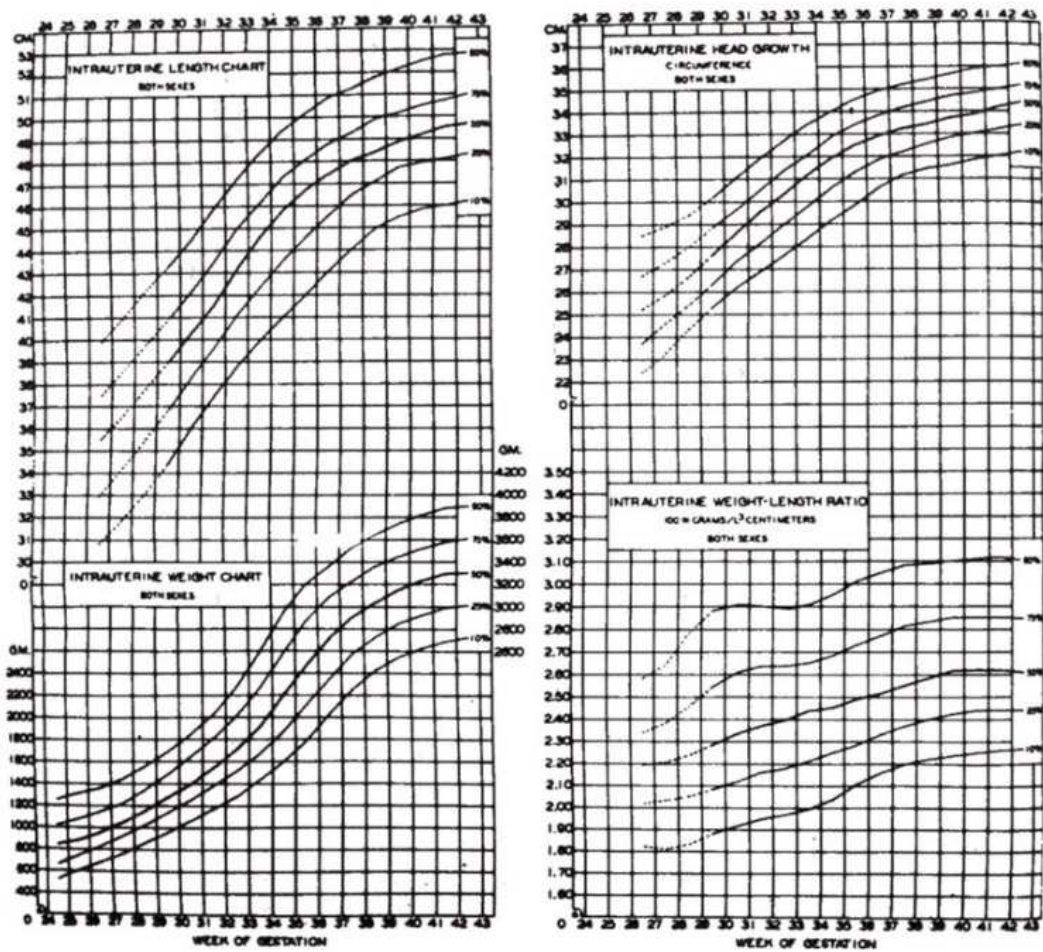


Figura 11: percentili di crescita intrauterina per peso, lunghezza, circonferenza cranica, e rapporto peso/altezza

Immagine tratta da Hensinger RN. (1986). *Standards in Pediatric Orthopedics. Tables, Charts, Graphs illustrating growth.* Raven Press.

*Fase postnatale.* In questa fase dello sviluppo influiscono i fattori ambientali che vanno a combinarsi tra loro su vari livelli. (Matthiass HH., 1987)

L'andamento della crescita viene valutato utilizzando delle curve standard che collocano gli individui in categorie divise per età e sesso [Figure 12 e 13].

La crescita tra maschio e femmina è eterogeneo sin dalla nascita, le femmine sono scheletricamente più mature dei maschi e la crescita termina in media due anni prima. Anche i fenomeni esterni influenzano diversamente i due sessi, risultando più nociva l'esposizione nei maschi rispetto alle femmine. (Tanner JM, Whitehouse RH, Cameron N, 1990)

La fase postnatale è a sua volta suddivisibile in tre periodi:

*Prima infanzia.* Caratterizzata dal corpo che si modifica e si adatta sotto l'influenza della forza che la gravità esercita inizialmente sulla stazione eretta e successivamente all'inizio della deambulazione.

Gli arti inferiori vanno incontro a un maggiore incremento nei primi tre anni di vita, successivamente l'accrescimento proseguirà con una riduzione della velocità di crescita. (Matthiass HH., 1987)

*Prepuberale.* Si ha un rallentamento dello sviluppo somatico e le proporzioni somatiche non subiscono variazioni significative.

*Pubertà.* Corrisponde all'ultima fase dello sviluppo somatico ed è caratterizzato da uno stimolo generale alla crescita che continuerà in senso disarmonico tra crescita scheletrica e muscolare.

La spinta puberale comincia dagli arti inferiori continuandosi prossimalmente, si interrompe prima nello scheletro appendicolare, a partire dai 13 anni nelle femmine e 15 nel maschio, rispetto a quello assile. (Dimeglio A, 1994)

Il periodo di accrescimento e di completamento della maturazione ossea segue tappe cronologiche lineari. Alla nascita le meta-epifisi delle ossa lunghe e brevi non sono ancora

chiuse, permanendo in uno stato cartilagineo. Le fisi andranno in contro a processi con tempi e tappe differenti in base ai distretti coinvolti. (Matthiass HH., 1987)

Infatti, alcuni centri di ossificazione hanno un valore predittivo maggiore rispetto ad altri nella definizione dello stato di crescita dell'individuo. I centri di ossificazione delle mani, utilizzata soprattutto per la valutazione della maturità ossea, piedi e ginocchia vengono maggiormente presi in considerazione per questa valutazione.

La maturazione ossea viene influenzata da eventi esterni ed interni, tra questi, hanno un ruolo di spicco patologie sistemiche e alterazioni ormonali che possono alterare la crescita dell'individuo. (Tanner JM, 1981; Tanner JM, Whitehouse RH, Cameron N, 1990)

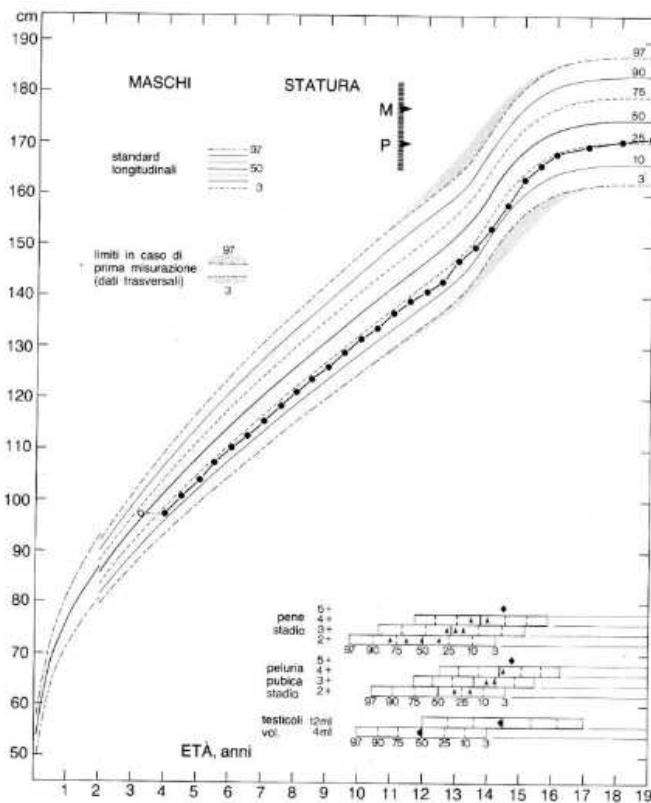


Figura 12: Curva di crescita staturale di un maschio con accrescimento normale (cerchi scuri). I cerchi chiari rappresentano l'età ossea. P e M sono i percentili staturali di padre e madre. stadi puberali come indicati.

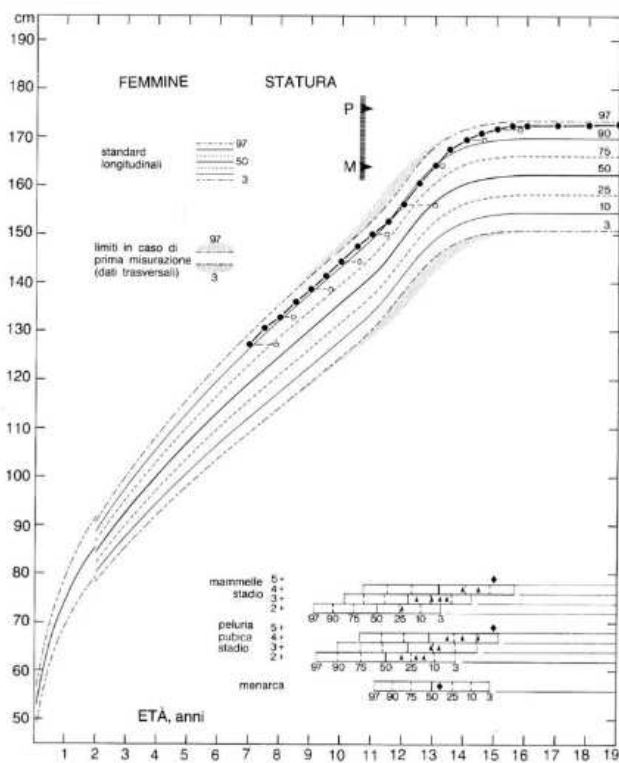


Figura 13: Curva di crescita staturale di una femmina con accrescimento normale (cerchi scuri). I cerchi chiari rappresentano l'età ossea. P e M sono i percentili staturali di padre e madre. stadi puberali come indicati.



### *Auxologia del ratto*

Il modello sperimentale impiegato in questi studi appartiene al ceppo Wistar.

Il tasso di crescita nei ratti è rapido tra la prima e la quinta settimana, quindi diminuisce progressivamente fino alla maturità scheletrica, che si raggiunge mediamente entro le 11,5-13 settimane. (Hunziker & Schenk, 1989; Kember, 1973) Le ossa continuano comunque la loro crescita, con un ritmo ridotto, fino a 26 settimane, che corrisponde alla fine della crescita. (Walker & Kember, 1972) Nonostante l'interruzione della crescita le fisi permangono aperte, anche se non è ancora stato chiarito il razionale di questo fenomeno.

Dopo lo scatto di crescita, la zona ipertrofica inferiore gradualmente scompare, mentre l'altezza della zona proliferativa e il tasso di proliferazione rimangono relativamente costanti, almeno fino a 12 settimane.

Quindi, nei ratti maturi le cellule ipertrofiche sono assenti, a dimostrazione del fatto che la capacità di aumentare il volume osseo si perde con l'età, infatti la crescita dei ratti cessa dopo le 28-30 settimane. Permangono, però, dei cambiamenti della struttura della cartilagine di accrescimento: perdita di cellularità accoppiata ad un'elevata cellularità delle regioni adiacenti, rimodellamento della zona centrale della cartilagine, ossificazione endondrale e chiusura della fisi sul bordo metafisario con matrice ossea. (Db, 1991; Kalu et al., 1984)

Più recentemente sono stati valutati i parametri dell'osso trabecolare nelle tibie di ratto Wistar a varie settimane di vita. (Nenda et al., 2016)

Da tale studio è emersa una diminuzione del volume osseo correlato all'età BV/TV (%), del numero di trabecole (Tb.N), mentre non risultano significative differenze nella larghezza delle trabecole. È, invece, aumentato il numero di osteoclasti in concordanza con la riduzione del volume osseo rilevato. (Nenda et al., 2016)

## **BIOMECCANICA DEL COMPLESSO DI ACCRESCIMENTO**

La crescita dell'individuo è determinata da elementi diversi che interagiscono tra loro in un processo complesso e non ancora del tutto chiarito. È noto che i fattori sistemici e ambientali come nutrizione, ormoni, genetica e età esercitano un'azione sinergica sull'accrescimento, ma anche l'azione meccanica del carico e dello stress applicati alle strutture ossee promuovono la crescita della cartilagine di accrescimento epifisaria.

Le alterazioni di questi fattori durante il periodo di sviluppo possono influenzare negativamente la crescita fisiologica e causare deformità muscolo-scheletriche come ginocchio varo, scoliosi, spondilolistesi o epifisiolisi femorale (Alonso et al., 2022; Villemure & Stokes, 2009)

È stato visto che la risposta al carico può essere utilizzata per andare a correggere tali deformità che si formano durante lo sviluppo. Infatti, tramite tecniche di modulazione meccanica si possono correggere dismetrie in epoca giovanile. (Bonnel et al., 1984)

È quindi importante valutare il comportamento del complesso di accrescimento e come esso risponde alle sollecitazioni statiche e dinamiche durante il periodo di accrescimento, dove l'individuo è più influenzabile da questi fattori.

Tale argomento non è ancora stato chiarito, ma sembra che il sistema osseo segua due leggi di riferimento.

La legge di Wolff afferma che l'osso si adatta allo stress meccanico applicato in modo intermittente con l'apposizione ossea quando è presente lo stimolo e con il riassorbimento quando l'impulso viene sospeso. (Villemure & Stokes, 2009)

La legge di Hueter-Volkmann secondo cui la crescita ossea longitudinale è stimolata dalla tensione e inibita dalla compressione. (D'Andrea et al., 2021; Mehlman et al., 1997; Villemure & Stokes, 2009)

Studi condotti su diversi modelli animali, in cui sono stati applicati carichi statici di trazione o compressione a tibie o vertebre durante lo scatto di crescita, hanno confermato questa legge, dimostrando una correlazione apparentemente lineare tra lo stress applicato e la crescita percentuale, con la trazione che accelera la crescita, e la compressione che invece la rallenta. (Lerner et al., 1998a; Stokes et al., 2006)

Quindi, se l'organismo viene sottoposto a stimoli meccanici anomali prima della maturità scheletrica, si modificano le condizioni fisiologiche e questo può provocare malformazioni scheletriche come il piede torto, l'epifisiolisi femorale, la tibia vara, la spondilolistesi e la scoliosi. (Villemure & Stokes, 2009)

Il carico va ad influenzare anche la fisi, che è sottoposta agli stessi stimoli meccanici dell'osso. La cartilagine di coniugazione che compone la fisi ha un comportamento viscoelastico, ma gli effetti sono diversi sia in base alla direzione della compressione sia per il distretto di cartilagine considerata. (Guevara et al., 2015; Villemure & Stokes, 2009) La crescita sembra dipendere anche dalla quantità di condrociti all'interno di essa e dalla loro disposizione nelle varie zone che determina una risposta differente quando sono sottoposti a stimoli meccanici.

Infatti, la cartilagine di accrescimento risulta circa dieci volte più cedevole nella direzione assiale, quindi di crescita longitudinale, che nella sua direzione trasversale. Inoltre, la zona meno rigida, e quindi maggiormente sottoposta a deviazioni compressive, risulta essere quella della zona ipertrofica, seguita dalla zona di riserva, mentre le deviazioni sono di gran lunga inferiori nella zona proliferativa. (Hunziker, 1994; Sergerie et al., 2009; Villemure & Stokes, 2009)

Quindi, la compressione della piastra di crescita va a ridurre lo spessore della zona ipertrofica, diminuendo il volume dei condrociti ipertrofici, oltre a produrre una perdita della disposizione colonnare ipertrofica e una riduzione dell'espressione delle principali proteine collagene della matrice extracellulare, come collagene di tipo II e X (D'Andrea et al., 2021; Sergerie et al., 2009; Villemure & Stokes, 2009)

Questi effetti sono stati studiati principalmente come risposta alla somministrazione di carichi statici, mentre risultano ancora controversi gli effetti di carichi somministrati in modo dinamico. (Alonso et al., 2022) Infatti, alcuni studi hanno dimostrato che la frequenza e l'ampiezza del carico possono influenzare la proliferazione dei condrociti e la mineralizzazione ossea, (Ueki et al., 2008) ma ci sono ancora risultati contrastanti in termini degli effetti specifici della dinamica del carico sulla crescita ossea. (Lerner et al., 1998b; Robling et al., 2001; Sergerie et al., 2009; Valteau et al., 2011; Wang et al., 2002)

Nella cartilagine di accrescimento è presente un sistema di fibre collagene che va ad orientarsi diversamente in base alla zona osservata. Tali fibre sembrerebbero avere il ruolo di impedire l'eccessiva espansione dell'interstizio quando la fisi viene sottoposta a stimoli meccanici nei vari distretti.

Il collagene nella zona di riserva ha una disposizione orizzontale ed durante una compressione impedisce un'eccessiva espansione laterale, impedendo anche l'alterazione del compartimento interstiziale. (Amini et al., 2013; Sergerie et al., 2009) Quindi, la zona di riserva, con la sua maggiore componente di fibre ha un ruolo sulle proprietà meccaniche intrinseche dell'intero apparato di crescita. (Sergerie et al., 2009)

Nella zona proliferativa la rete di collagene è prevalentemente verticale e questo non determina una contenzione sufficiente quando il distretto è sottoposto a forze compressive, aumentando le probabilità di deformazioni assiali in questa zona di circa tre volte. (Amini et al., 2013; Sergerie et al., 2009)

La stessa rete di collagene va a disporsi nella cartilagine ipertrofica; tuttavia, la collocazione più profonda di questa non la sottopone agli stessi stimoli meccanici e quindi non è sottoposta ad alterazioni assiali come la zona proliferativa. (Amini et al., 2013; Sergerie et al., 2009)

Le fibre collagene che formano il periostio si inseriscono alle estremità epifisarie, durante l'accrescimento, vengono messe in tensione dai condrociti in proliferazione e rispondendo a questo stress esercitando un feedback negativo sulla crescita del complesso di accrescimento regolando, in questo modo, l'espansione dei condrociti.

## **TRATTAMENTO DELLE DEVIAZIONI E DELLE DISMETRIE DEGLI ARTI INFERIORI**

La distorsione meccanica dell'asse dell'arto inferiore e le dismetrie significative possono produrre disturbi dell'andatura, dolore, problemi di movimento rotuleo e degenerazione articolare precoce. (Wiemann et al., 2009)

Il trattamento di tali deformità trova differenti indicazioni in letteratura e nella pratica clinica con ricorso ad un approccio chirurgico in caso di significative alterazioni dell'asse meccanico e/o in presenza di sintomatologia.

La terapia chirurgica si avvale di varie tecniche operatorie a seconda dell'entità della tipologia e della severità della problematica clinica e dell'età del paziente:

- Osteotomia
- Epifisiodesi

### **Osteotomia**

L'osteotomia è la tecnica più antica per il trattamento delle dismetrie degli arti inferiori, il suo campo di applicazione si è ridotto nel tempo con l'avvento di nuove tecniche chirurgiche meno invasive e associate ad un minor morbidità.

Questa tecnica permette di ottenere una correzione immediata e definitiva della deformità, anche quelle più gravi. (Davis et al., 1998)

La sezione viene eseguita normalmente sul segmento scheletrico da cui origina la deformità e deve terminare in prossimità della fisi senza danneggiarla.

L'osteotomia può essere a cuneo di sottrazione, se è prevista la rimozione dell'osso a contatto tra le due superfici osteotomiche, o a cuneo di addizione se è in apertura con o senza innesto osseo.

Il riallineamento degli assi può essere immediato in sede operatoria oppure progressivo mediante il principio della condrodiatasi, che riduce i potenziali danni neuro-vascolari, una delle complicanze dell'intervento di allungamento/correzione. (Stanitski, 1997)

Altre possibili complicanze sono la rigidità articolare, le infezioni post-chirurgiche, la mancata consolidazione dell'osteotomia, la tromboembolia venosa, le perdite emorragiche, la persistenza del dolore.

## **Epifisiodesi**

L'epifisiodesi prevede la chiusura prematura della fisi con la formazione di tessuto osseo. La metodica chirurgica descritta originariamente da Bowen e Johnson (Bowen & Johnson, 1984) consisteva nella rimozione del terzo periferico della fisi usando una curette attraverso piccole incisioni. (Weinmayer et al., 2022)

L'epifisiodesi può essere permanente o temporanea.

La prima si effettua con tecniche a cielo aperto o percutanee, ma il buon esito dell'intervento dipende da calcoli precisi sulla crescita residua e su un tempismo chirurgico perfetto. (Blount & Clarke, 1949; Métaizeau et al., 1998; WHITE & STUBBINS, 1944)

Le tecniche chirurgiche proposte nel tempo sono numerose e differiscono per accesso chirurgico, strumentario utilizzato e reversibilità/irreversibilità dell'intervento:

- Tecnica Phemister a cielo aperto (Phemister, 1950),
- Tecnica White e Stubbins, (WHITE & STUBBINS, 1944)
- Pinzatura epifisaria,(Blount & Clarke, 1949)
- Epifisiodesi con viti percutanee.(Métaizeau et al., 1998)
- Epifisiodesi con placca a 8

L'intervento Phemister consisteva in una epifisiodesi permanente mediante utilizzo di innesti ossei autologhi a livello fisario. Questo era un intervento selettivo per le dismetrie

e riservato agli adolescenti vicini alla maturità scheletrica perché poteva causare un'ipercorrezione nei bambini con un ampio margine di crescita scheletrica.

Bout e Clarke crearono una cambra con forma ad U, questa era fissata a ponte sulla fisi con un braccio nell'epifisi e l'altro nella metafisi, determinando una compressione meccanica della stessa senza determinarne alterazioni anatomiche irreversibili.

Per ciascun distretto coinvolto era prevista l'applicazione di due-tre cambre, prestando attenzione che fossero allineate sul piano sagittale per evitare deformità. (Ilharreborde et al., 2012; Khoury et al., 2007; Métaizeau et al., 1998; Nouth & Kuo, 2004)

Uno studio recente ha dimostrato che sul piano istologico l'effetto compressivo della cambra sia molto più spiccato sullo strato proliferativo dei condrociti, provocando un arresto temporaneo della crescita, anche se sembra che lo strato ipertrofico venga rallentato nei processi metabolici.

Tuttavia, le cambre hanno visto delle complicanze posto-operatorie tra cui il fallimento dell'impianto, la rottura o la mobilizzazione delle cambre e il danno con conseguente chiusura permanente della fisi. (Weinmayer et al., 2022) Nella rivalutazione si è riscontrato un alto tasso di deformità angolari secondarie a non corretta previsione della crescita residua (Sinha et al., 2018; Weinmayer et al., 2022)

Per ovviare a questa complicanza è stata proposta una revisione dell'intervento per includere l'ablazione delle parti centrali della cartilagine di crescita, (Weinmayer et al., 2022) anche se, ad oggi, si preferisce utilizzare tecniche meno invasive e che permettano un migliore controllo sull'accrescimento della fisi.

L'epifisiodesi temporanea ha preso sempre più campo e ha dato risultati favorevoli sia per l'outcome che per i bassi tassi di complicanze, il paziente, dopo l'intervento, non ha necessità ridurre il carico a differenza delle operazioni precedenti, permettendo da subito una migliore mobilità e una ripresa più rapida nel postoperatorio. (Weinmayer et al., 2022)

La tecnica temporanea fornisce una graduale correzione della deformità che permette la ripresa della crescita se le cambre vengono rimosse nella corretta finestra temporale. (Canale & Christian, 1990; Inan et al., 2008)

Il trattamento chirurgico è riservato a bambini e adolescenti, dove la crescita è ancora in evoluzione. L'obiettivo principale è la limitazione della crescita di un osso, per permettere all'altro di equilibrarsi.

Inizialmente era effettuata tramite cambre, ma sono state sostituite da un nuovo strumento descritto da Burghardt et al (Paley, 2002) che, a differenza della compressione sulle fisi si basa su un meccanismo di tensione. (cit Stevens)

Tale impianto consiste in una placca non bloccabile a due fori con due viti per realizzare l'emiepifisiodesi temporanea. (Wiemann et al., 2009)

La placca a 8 ha determinato una riduzione delle complicanze e sembra essere l'approccio migliore al trattamento di queste patologie.

È stata confermata l'efficacia e l'affidabilità della tecnica per correggere le deformità intorno al ginocchio. (William Walter Greulich, S. Idell Pyle, 1959)

Ballal, Bruce e Nayagam hanno evidenziato la natura reversibile dell'inibizione della crescita sulla fisi e quindi una migliore tollerabilità dell'intervento rispetto a quelli precedenti.

Le placche ad 8 vengono posizionate sull'epifisi e il corretto posizionamento è verificato dai fili guida di Kirschner e tramite guida radioscopica intraoperatoria [Figura 14]. (Zajonz et al., 2017)

L'inserimento del dispositivo limita la riserva di nutrimenti della zona e ne impedisce la crescita in eccesso.

Al termine dell'intervento il paziente deve essere monitorato negli anni successivi per valutare l'efficacia del trattamento e quando è più opportuno la rimozione della placca, una volta raggiunto l'obiettivo [Figure 15, 16, 17 e 18]. (Demirel et al., 2022; Zajonz et al., 2017)



Il vantaggio di questo intervento è che si può isolare la zona che necessita del trattamento, bloccando con le placche solo la parte mediale o laterale dell'articolazione o solo una delle due epifisi che partecipano ad essa.



Figura 14: Controllo radiografico intraoperatorio del corretto posizionamento di placche e viti durante emiepifisiodesi temporanea.

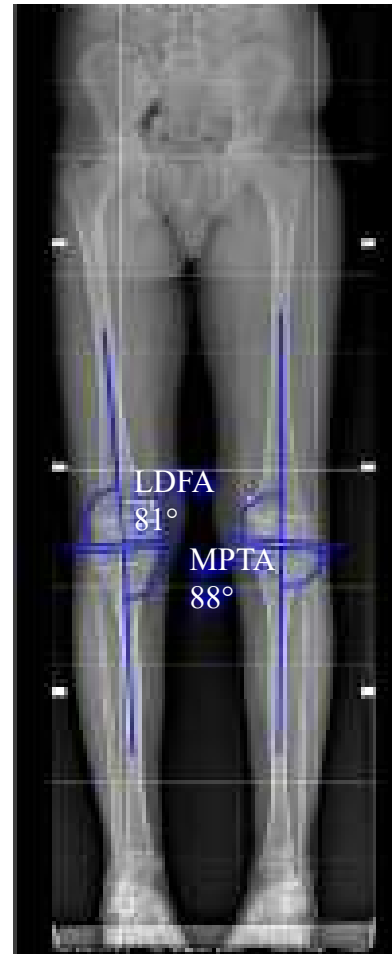
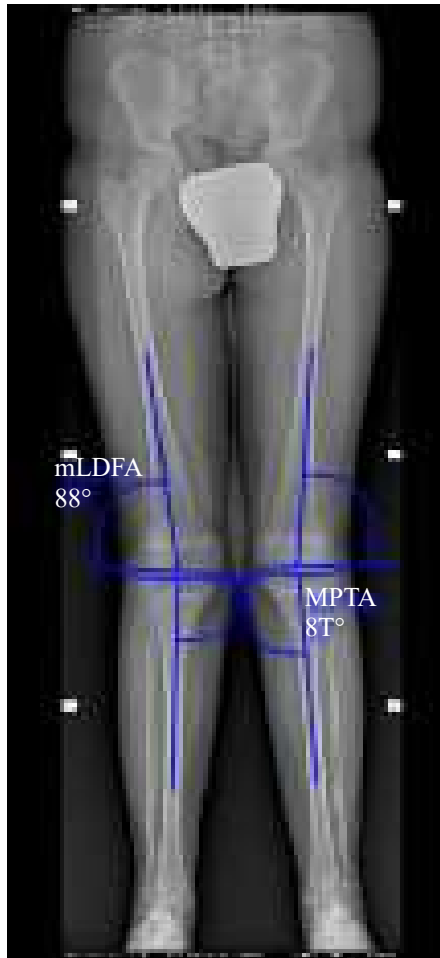


Figura 15: A sinistra. Immagine radiografica di un individuo affetto da valgismo. Le linee rappresentano l'angolo alterato delle articolazioni. L'angolo femoro-distale-laterale (mLDFA) ha un valore medio tra gli  $87^{\circ} \pm 2$ , mentre l'angolo anatomico ha un valore medio di  $81^{\circ}$  (come nell'immagine a lato), determinando, nel ginocchio valgo, un'apertura laterale maggiore rispetto ad un ginocchio normale.

Sul versante tibiale i due angoli mediale (MPTA) e laterale hanno una costante indipendente dall'asse, il mediale è circa  $87^{\circ} \pm 2$  e il laterale, per la legge di complementarità, di circa  $93^{\circ}$ .

Figura 16: A destra. Immagine radiografica dello stesso paziente a seguito di correzione con emiepifisiodesi temporanea con placca a 8 dove è presente un ripristino degli assi meccanici fisiologici.



Figura17: Valgismo. Foto di un paziente in cui è evidenziabile come la DIM (distanza intermalleolare) sia superiore alla distanza inter articolare (DIA) delle ginocchia.

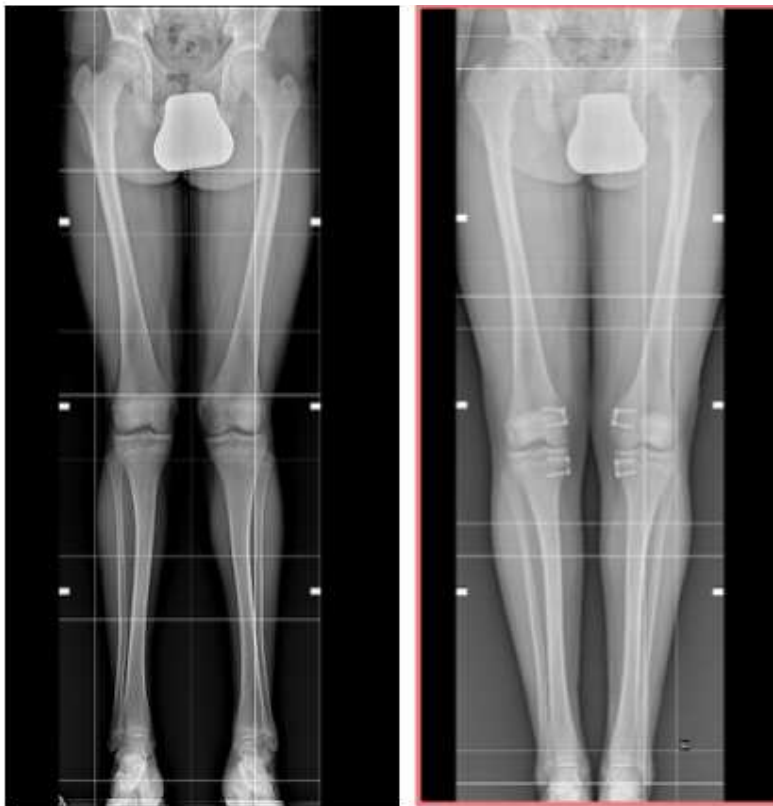


Figura 18: Immagini radiografiche del caso precedente, prima (a sinistra) e dopo (a destra) l'intervento di correzione con emiepifisiodesi con placca a 8. Nell'immagine a sinistra si evidenzia il posizionamento delle placche solo nella parte mediale dell'articolazione, per permette alla zona controlaterale di crescere e compensare la dismetria.

## STATO DELL'ARTE

---

Il periostio è uno spesso strato di fibre che riveste le ossa degli individui e possiede un'elasticità intrinseca che sembrerebbe esercitare una contenzione meccanica sulla cartilagine di accrescimento dell'osso su cui si inserisce. (Gigante et al., 2001)

Questa ipotesi è stata inizialmente formulata da alcuni autori che avevano studiato le conseguenze delle amputazioni dei segmenti scheletrici nei pazienti pediatrici, in cui si riscontrava una crescita eccessiva del moncone, che spesso causava complicanze e numerosi interventi di revisione. (Jahmani et al., 2019; Michels & De, 2001; Tenholder et al., 2004; Vocke & Schmid, 2000)

La complicanza più grave era il moncone osseo che cresceva più rapidamente dei tessuti molli limitrofi e provoca perforazioni e conseguenti infezioni. (Beekman, 1938; Frantz & Aitken, 1959; Kurtz & Hand, 1939)

Pellicore et al. ipotizzarono che alla base della crescita eccessiva dopo l'amputazione ci fosse una espansione della fisi non regolata e non compensata dalla corrispettiva crescita dei tessuti circostanti (Pellicore et al., 1974). Tuttavia, i tentativi di trattamento basati sull'epifisiodesi non ottennero risultati favorevoli. (Aitken GT, 1968; Drvaric & Kruger, 2001; Pfeil et al., 1991; Saal, 1939)

Il fatto che le amputazioni di origine traumatica (Michels & De, 2001; O'Neal et al., 1996; Tenholder et al., 2004; Vocke & Schmid, 2000) andassero più frequentemente in contro a tali fenomeni rispetto a casi di agenesie o amputazioni per disarticolazione, fece attribuire l'ipercrescita ad un meccanismo di riparazione locale. (Aitken, 1963; Firth et al., 2011)

Aitken ha impiantato un marcatore radiografico nel moncone osseo dimostrando che la crescita incontrollata si verifica distalmente al marcatore e quindi dipende da un meccanismo locale di guarigione ossea (Aitken, 1963; Aitken GT, 1962), rendendolo un fenomeno indipendente dalla crescita epifisaria. Per questo sembra non verificarsi nei casi di disarticolazione in cui è presente cartilagine articolare intatta, ma si verifica nell'osso sezionato.

Speer ha ipotizzato che il moncone cresca per deposizione ossea intramembranosa, possibile grazie alle caratteristiche elastiche del periostio in età pediatrica. (Speer, 1981)

Nella pratica clinica il possibile ruolo del periostio nell'accrescimento è stato sfruttato per interventi di correzione per eterometrie.

Lo stripping periostale in bambini poliomielitici ha ottenuto risultati favorevoli nella compensazione della differenza di crescita dei due arti. (D'Souza & Shah, 1999; Jenkins et al., 1975; Limpaphayom & Prasongchin, 2011)

Sono stati condotti studi anche sul periostio e sulle fibre elastiche che lo compongono, andando ad analizzare il loro possibile coinvolgimento nel controllo meccanico della fisi. È stato ipotizzato che la proliferazione dei condrociti del complesso di accrescimento provochi una tensione sul pericondrio-periostio e che tale tensione agisca da feedback negativo sull'ulteriore crescita condrocitaria. Pertanto, sezioni trasversali del periostio determinerebbero una perdita di tale contenzione favorendo l'accrescimento più rapido delle ossa.

La riduzione di tale meccanismo di controllo negativo da parte delle fibre periostali è realizzabile anche con altre metodiche in particolare si è ipotizzato l'utilizzo di enzimi per la digestione delle fibre elastiche e collagene. (Chillemi et al., 1999; Gigante et al., 2001)

Tuttavia, non vi sono attualmente studi che definiscano con precisione il ruolo delle fibre collagene in questo sistema di contenzione e gli eventuali effetti di una loro alterazione. L'applicazione delle collagenasi come modulatori dell'accrescimento osseo è, quindi, un nuovo possibile percorso d'azione.

## **Collagenasi e applicazioni cliniche**

La collagenasi appartiene a una famiglia di metalloproteasi zinco-dipendenti che degradano substrati di collagene costituiti da una struttura proteica caratterizzata da una configurazione rigida a tripla elica sinistra (Ramachandran & Kartha, 1955) ricca di prolina, idrossiprolina e glicina. (Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, 2009; Watanabe, 2004)

Vengono prodotte da microrganismi che messi in coltura portano alla formazione di questi enzimi e altre proteasi.

La collagenasi più utilizzata finora è quella ottenuta dalla coltura di *Clostridium histolyticum* (CHC), da cui sono state isolate sette tipi di collagenasi (Mookhtiar & Van Wart, 1992) divisibili in due classi: classe I e II, classificate in base al gene di origine e al punto di attacco idrolitico sulla molecola di collagene. (Thomas & Bayat, 2010)

Queste collagenasi sono prodotte tramite fermentazione batterica, dopodiché possono essere separate cromatograficamente: la maggior parte dei CHC disponibili in commercio viene prodotta in questo modo. Tuttavia, uno svantaggio di questo metodo è che il rapporto e l'attività dei CHC di classe I e II prodotti non sono affidabili, quindi ogni lotto di CHC può avere effetti biologici diversi. (Sabatino et al., 2007)

Le CHC sono state studiate per un possibile ruolo nel trattamento di diverse condizioni, quali: erniazione del disco intervertebrale (Bromley et al., 1984; Sussman, 1971; Sussman & Mann, 1969), placenta ritenuta (Fecteau et al., 1998), capsulite adesiva o Frozen shoulder, D Dupuytren, Peronye D, guarigione delle ferite, debridement ustioni (Klasen, 2000; Yavuzer et al., 1997), preparazione delle cellule pancreatiche per il trapianto. (Johnson et al., 1996; Kang et al., 2006)

Più recentemente è stata studiata una collagenasi di origine diversa, questa viene estratta da colture di *Vibrio alginolyticus*.

I batteri del genere *Vibrio* sono normali abitanti degli ambienti acquatici e svolgono un ruolo importante nel mantenimento dell'ecosistema acquatico. (Chakraborty et al., 1997; Janda et al., 1988) Questo genere di batteri caratteristicamente produce molti tipi di enzimi proteolitici, tra cui le collagenasi.

È stato dimostrato che in base alle disponibilità nutritive del terreno di coltura è possibile ottenere enzimi diversi. Infatti, i terreni di coltura arricchiti con gelatina o estratti di carne promuovono una sintesi maggiore di collagenasi rispetto alle altre proteasi. In condizioni, invece, di scarso nutrimento, la quantità di collagenasi si riduce in favore delle altre proteasi.

Grazie a questa diversa capacità del battere di produrre più o meno selettivamente collagenasi in base al terreno di coltura, è stato possibile sviluppare un processo di induzione selettiva basato sulla fermentazione aerobia, ottenendo così un prodotto puro costituito da sole collagenasi, senza la contaminazione di altri enzimi proteolitici.

In particolare, la collagenasi prodotta da *V. alginolyticus* ha un peso di 82 KDa, è sintetizzata come un precursore inattivo, e la sua composizione peptidica non è annoverabile alle classi di collagenasi precedenti. (Di Pasquale et al., 2019)

Le collagenasi da *V. alginolyticus* e da *C. histolyticum* sono state messe a confronto, al fine di valutare la loro efficacia nel trattamento delle ulcere. (Di Pasquale et al., 2019)

È stata presa in considerazione sia la risposta dell'ulcera al trattamento che lo stato dei tessuti sani circostanti. Da ciò è emerso che entrambe le collagenasi avevano lo stesso outcome favorevole per il trattamento della patologia, ma la collagenasi da *V. alginolyticus* si è dimostrata avere una risposta migliore sulla cute perilesionale.

Infatti, entrambe le collagenasi hanno mostrato una simile efficacia nella scissione delle fibre collagene, come mostrato dall'analisi elettroforetica; ma sostanziali differenze si sono mostrate nell'analisi della digestione di costituenti fondamentali dell'ECM dermica, come la fibronectina e la decorina, digerite solo parzialmente dalla collagenasi da *V.*

alginolyticus e completamente scomparse dopo azione della collagenasi da *C. histolyticum*.

La diversa specificità del substrato può essere spiegata tenendo conto che *Vibrio* collagenasi scinde il legame Y-Gly della sequenza del collagene –Pro-Y-Gly-Pro– ((Keil, 1992) mentre la CHC scinde il filamento di collagene in corrispondenza dei legami Y-Gly nella sequenza ripetuta del collagene Yaa-Gly-Xaa-Yaa. Inoltre, i preparati di collagenasi di *C. histolyticum* risultano in realtà costituiti da sei enzimi con attività sia collagenolitica che proteolitica (Van Wart & Steinbrink, 1985), capaci quindi di scindere qualsiasi proteina presente nel preparato, comprese le costituenti dell'ECM.

Ulteriore specificità è data dall'azione pH-correlata della *Vibrio* collagenasi: la normale pelle sana è caratterizzata da valori di pH nell'intervallo leggermente acido 5,0-5,6 (Percival et al., 2014), mentre ferite croniche che non guariscono sono caratterizzate da valori di pH più elevati nell'intervallo basico lieve 8,0-9,5. La collagenasi di *V. alginolyticus* perde il 90% di attività a pH 5,6, rispetto al 100% di attività a pH 7. Al contrario, la preparazione della collagenasi di *C. histolyticum* conserva ancora il 60% e il 30% di attività a valori di pH di 5,6 e 5,0, rispettivamente, il che implica che questo pool enzimatico è ancora in grado di degradare la matrice ECM nella pelle sana. (Di Pasquale et al., 2019)

Queste evidenze potrebbero suggerire quindi l'utilizzo di questa collagenasi altamente selettiva anche sulle fibre collagene del pericondrio-periostio, al fine di indagare il loro ruolo nell'accrescimento osseo. Tuttavia, ad oggi questa collagenasi non è ancora disponibile per essere utilizzata in campi differenti dalla chirurgia plastica e della mano per il trattamento di patologie selezionate.



## **OBIETTIVO DELLO STUDIO**

---

Il disegno utilizzato è uno studio sperimentale preclinico con lo scopo di:

- Verificare il possibile ruolo delle fibre collagene nell'accrescimento osseo.
- Determinare l'efficacia dell'utilizzo della collagenasi nell'alterare le fibre collagene pericondrio-periostali, valutando la miglior dose efficace ed eventuali effetti negativi sulle strutture circostanti.
- Suggestire una nuova possibile direzione di ricerca nell'ambito del trattamento delle deviazioni assiali e delle eterometrie.

## **MATERIALI E METODI**

---

Lo studio è stato realizzato utilizzando come modello animale il ratto, ceppo Wistar. I campioni appartenevano alla stessa nidiata in modo tale da rendere omogenei i risultati ottenuti.

Sono stati realizzati due studi sperimentali:

- Studio in vitro: valutazione dell'accrescimento longitudinale di tibie di ratto in coltura d'organo in condizioni basali e dopo trattamento enzimatico
- Studio in vivo: valutazione degli effetti della somministrazione percutanea di collagenasi sull'accrescimento delle tibie di ratto

Lo studio è stato realizzato previa autorizzazione ministeriale.

## **Studio in vitro**

### ***Colture d'organo***

Per le colture d'organo sono state prelevate in asepsi entrambe le tibie di 20 ratti. Successivamente, è stata assegnata in modo randomizzato una tibia di ciascuna coppia al gruppo di trattamento e l'altra al gruppo di controllo, al fine di rendere i risultati confrontabili sia all'interno dello stesso modello sia per garantire l'omogeneità tra i gruppi dei trattati e dei controlli.

Lo studio è stato effettuato in due tempi, su ratti a diverse fasi di crescita, in particolare sono state prelevate tibie da 12 animali neonati e da 8 ratti 5 settimane di vita.

Sono stati realizzati i seguenti gruppi:

- Gruppo Controlli: posti immediatamente dopo l'espianto in terreno di coltura con DMEM, 10% FBS (Siero bovino fetale), 1% Penicillina-Streptomicina (Sigma), 1% Fungizone (Thermofisher) e incubati a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> e 95% di umidità
  
- Gruppo Trattati: incubati prima della coltura con Collagenasi (Nordmark Biochemicals) a due diverse concentrazioni:
  - 0,4 UI/ml (come da scheda tecnica dell'enzima) per 1h
  
  - 0,04 UI/ml (1/10 della dose consigliata) per 1h

in terreno di coltura DMEM con 1% FBS, 1% Penicillina-Streptomicina, 1% Fungizone a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> e 95% di umidità. Al termine del trattamento enzimatico i campioni sono stati lavati con PBS (Tampone fosfato salino), posti in multiwell con terreno di coltura contenente DMEM, 10% FBS, 1% Penicillina-Streptomicina, 1% Fungizone e incubati a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> e 95% di umidità.

I campioni sono stati mantenuti in incubazione per un totale di 14 giorni; il cambio del terreno di coltura è stato effettuato ogni 72h, le misurazioni sono state effettuate al momento dell'espianto (T0), a 7 giorni di coltura (T7) e a 14 giorni (T14).

Al termine della coltura, le tibie sono state fissate in 4% para-formaldeide in 0.1 M tampone fosfato, pH 7.4 e processate per le analisi istochimiche, immuno-istochimiche, morfometriche e ultrastrutturali.

Ad ogni intervallo di riferimento (T0 e T7) da ogni gruppo è stata prelevata una coppia di tibie per lo studio morfologico, istochimico, immuno-istochimico e ultrastrutturale.

### ***Analisi morfometrica***

In una prima fase si è proceduto con l'acquisizione delle immagini tramite un microscopio standard (Leica Leitz DMRBE, Leyca Microsistem) collegato ad una video camera a colori e ad un computer, equipaggiato con il Leica Image Server (Leica LAS 4.0).

Le tibie sono state fotografate sia in posizione anteroposteriore che in laterolaterale, e i dati ottenuti sono stati opportunamente registrati sul PC.

Successivamente si è passati alla misurazione delle tibie in posizione laterolaterale tramite il software ImageJ. I dati sono stati registrati ed analizzati, calcolando le differenze di crescita sia nel totale del periodo di incubazione che nei sottoperiodi considerati, sia nei trattati che nei controlli. Sono state anche calcolate le rispettive percentuali di crescita.

Infine, le differenze di crescita e le percentuali ottenute sono state sottoposte ad analisi statistica tramite Test t di Student per dati appaiati.

### *Analisi istochimica*

Per la microscopia ottica i campioni sono stati sottoposti a trattamento decalcificante con Osteodec e processati per l'inclusione in paraffina. Sono state poi ottenute sezioni longitudinali (spessore compreso tra 3 – 5  $\mu\text{m}$ ), e colorate con ematossilina-eosina per la valutazione della qualità del tessuto, con colorazione di Verhoeff ed orceina acida per le fibre elastiche, e colorazione Sirius Red per le fibre collagene.

### *Analisi immunoistochimica*

Dal campione di tessuto incluso in paraffina sono state ottenute sezioni consecutive di spessore compreso tra 3-5  $\mu\text{m}$ . L'attività della perossidasi endogena è stata bloccata mediante immersione in acqua distillata contenente 3% di perossido di idrogeno per 6 min.

Sono stati adoperati: anticorpo anti-elastina, anti-collagene di tipo I, anti-collagene di tipo IV (tutti Abcam) e anti-collagene di tipo II (Oncogene).

Per il collagene di tipo I e per l'elastina i preparati sono stati sottoposti a smascheramento al calore con tampone rispettivamente a pH 6 e pH 9.

Per il collagene di tipo II e IV i preparati sono stati sottoposti a trattamento proteolitico rispettivamente con tripsina (0,1%) e con pepsina (4mg/ml) (entrambe Dako), per 30 min a 37° C, e successivamente lavati in acqua e 0.05M Tris/HCl.

Gli anticorpi sono stati preparati in Dako diluent with background reducing components, alle diluizioni di: collagene I 1:800, collagene II 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , collagene IV 1:500, elastina 1:2000.

Tutte le sezioni sono state incubate per 1h a temperatura ambiente. Il complesso antigene-anticorpo è stato evidenziato usando il kit Dako EnVision™ + Dual Link System, HRP/DAB, seguendo le indicazioni fornite dalla casa produttrice.

Le sezioni sono state contrastate con ematossilina di Mayer (Bio-Optica SpA).

Per controllo negativo sono state utilizzate sezioni non trattate con anticorpo primario.

Le sezioni sono state esaminate con microscopio Leica Leitz DMRBE (Leica Microsystem), equipaggiato con analizzatore digitale (Leica LAS 4.0).

### *Analisi ultrastrutturale*

I campioni sono stati sottoposti a fissazione in tampone cacodilato 0.1 M in soluzione con glutaraldeide al 2.5% a pH 7,4.

Sono stati ottenuti blocchetti di tessuto di 1 mm<sup>3</sup> post-fissati in tetrossido di osmio (Merk), e disidratati nella serie ascendente degli alcool ed inclusi in resina epossidica. Un ultratomo MT-X (RMC) è stato utilizzato per ottenere sezioni ultrasottili (~ 70 nm) che sono state contrastate con acetato di uranile e citrato di piombo, ed esaminate al microscopio elettronico a trasmissione (Philips CM10).

## **Studio in vivo**

### ***Modello sperimentale***

Per lo studio in vivo sono stati reclutati 12 ratti di 6 settimane di vita. È stato iniettato 0,1 mg di collagenasi (0,014 UI) in prossimità del terzo medio diafisario della tibia mediale destra di ciascun animale. La tibia controlaterale, non trattata, è stata utilizzata come controllo. Gli animali sono stati stabulati e tenuti in osservazione, poi a 35 giorni dal trattamento, sono stati sacrificati in modo da prelevare entrambe le tibie, poste in formalina neutra tamponata al 4%.

Tutti i campioni sono stati sottoposti a esame morfologico-macroscopico, radiografico e istologico, in quest'ultimo sono state analizzate sezioni della porzione medio prossimale di ciascuna tibia.

### ***Analisi radiologica***

Le tibie sono state radiografate in posizione antero-posteriore e laterolaterale con lo scopo di valutare eventuali deviazioni assiali, differenze di crescita e per evidenziare eventuali alterazioni dell'ossificazione.

Le immagini sono state analizzate con ImageJ.

### ***Analisi morfometrica***

Le tibie, in una prima fase, sono state osservate macroscopicamente e fotografate.

Sono stati misurati in lunghezza tutti i campioni e gli assi in proiezione antero-posteriore, per constatare la crescita longitudinale ed una eventuale deformazione degli assi in favore della porzione mediale trattata rispetto alla laterale.

Successivamente si è proceduto con l'acquisizione delle immagini tramite un microscopio standard (Leica Leitz DMRBE, Leyca Microsistem) collegato ad una video camera a colori e ad un computer, equipaggiato con il Leica Image Server (Leica LAS 4.0).

Le immagini sono state acquisite sia in posizione anteroposteriore che in laterolaterale, e i dati ottenuti sono stati opportunamente registrati sul PC.

Successivamente si è passati alla misurazione delle tibie in posizione laterolaterale tramite il software ImageJ.

Le misure ottenute sono state registrate e sono state ricavate le differenze di crescita delle tibie trattate rispetto ai controlli controlaterali.

### ***Analisi istochimica***

Per la microscopia ottica i campioni sono stati sottoposti a trattamento decalcificante con Osteodec e processati per l'inclusione in paraffina. Sono state poi ottenute sezioni longitudinali (spessore compreso tra 3 – 5  $\mu\text{m}$ ), e colorate con ematossilina-eosina per la valutazione della qualità del tessuto, con colorazione di Verhoeff ed orceina acida per le fibre elastiche, e colorazione Sirius Red per le fibre collagene.

### ***Analisi immunoistochimica***

Dal campione di tessuto incluso in paraffina sono state ottenute sezioni consecutive di spessore compreso tra 3-5  $\mu\text{m}$ . L'attività della perossidasi endogena è stata bloccata mediante immersione in acqua distillata contenente 3% di perossido di idrogeno per 6 min.

Sono stati adoperati: anticorpo anti-elastina, anti-collagene di tipo I, anti-collagene di tipo IV (tutti Abcam) e anti-collagene di tipo II (Oncogene).

Per il collagene di tipo I e per l'elastina i preparati sono stati sottoposti a smascheramento al calore con tampone rispettivamente a pH 6 e pH 9.

Per il collagene di tipo II e IV i preparati sono stati sottoposti a trattamento proteolitico rispettivamente con tripsina (0,1%) e con pepsina (4mg/ml) (entrambe Dako), per 30 min a 37° C, e successivamente lavati in acqua e 0.05M Tris/HCl.

Gli anticorpi sono stati preparati in Dako diluent with background reducing components, alle diluizioni di: collagene I 1:800, collagene II 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , collagene IV 1:500, elastina 1:2000.



Tutte le sezioni sono state incubate per 1h a temperatura ambiente. Il complesso antigene-anticorpo è stato evidenziato usando il kit Dako EnVision™ + Dual Link System, HRP/DAB, seguendo le indicazioni fornite dalla casa produttrice.

Le sezioni sono state contrastate con ematossilina di Mayer (Bio-Optica SpA).

Per controllo negativo sono state utilizzate sezioni non trattate con anticorpo primario.

Le sezioni sono state esaminate con microscopio Leica Leitz DMRBE (Leica Microsystem), equipaggiato con analizzatore digitale (Leica LAS 4.0).

L'anticorpo contro il collagene è stato impiegato anche per la quantizzazione delle fibre collagene nel gruppo dei controlli e dei trattati.

Ci si è serviti del software Leica Image Server per individuare 5 campi microscopici ad ingrandimento 20x, da essi sono stati ricavati valori espressi come frazione percentuale di area occupata dalle suddette fibre, da questi è stata poi calcolata la media e messa a confronto con la media della tibia controlaterale.

# RISULTATI

---

## Studio in vitro

### *Culture d'organo*

Le colture sono state mantenute sotto osservazione tramite il microscopio e si sono mantenute vitali per tutta la durata dello studio, inoltre il medium è rimasto pulito e senza crescita di funghi e batteri.

### *Analisi morfometrica*

I risultati riportati sono riferibili solo alle colture d'organo dei modelli a 3 giorni di vita poiché non è stato possibile valutare i modelli a 5 settimane per la mancanza di diversità nella crescita dei campioni che mostravano apparenti segni di sofferenza tissutale.

[Figure 19 e 20]

Le misure delle tibie ottenute nei tre intervalli di tempo a T0, T7 e T14 sono state utilizzate per ricavare la differenza di crescita dei campioni nell'arco di tempo dello studio. I dati dei  $\Delta L$  sono stati convertiti in percentuali di crescita delle tibie e poi disposte in un grafico per confrontare l'accrescimento dei trattati rispetto ai controlli.

Le percentuali di crescita ottenute nei vari intervalli sono risultate maggiori nei trattati rispetto ai controlli, con un valore nell'intervallo tra T0 e T7 del 13,2 % nei trattati e di 11,28% nei controlli, nel secondo intervallo (T7-T14) la media di crescita è stata di 5,14% nei trattati 4,82% nei controlli, infine la media di crescita totale (T0-T14) di 18,6% nei trattati e 16,10% nei controlli.

Sulla base di questi dati è stato eseguito il T.TEST accoppiato casi e controlli dove è stata assunta una  $p < 0,05$  come riferimento per la significatività dei risultati.

In tutti i campioni della coltura d'organo si è osservata una crescita longitudinale nel tempo, tale allungamento è risultato maggiore nel primo intervallo analizzato (T0-T7) rispetto all'intervallo finale (T7-T14). Nelle tibie trattate con collagenasi l'accrescimento

è risultato maggiore rispetto ai controlli, in particolare, come illustrato nel grafico [Tabelle 1 e 2] tra T0 e T7 con  $p = 0,0125$ , T7 e T14  $p = 0,053$  e T0 E T14  $p = 0,013$  . Di questi dati sono risultati statisticamente significative la crescita tra T0 e T7 e la crescita in totale nell'intervallo T0-T14, non è risultato significativa la crescita nel secondo intervallo T7-T14, anche se è comunque risultata maggiore nei trattati rispetto ai controlli.

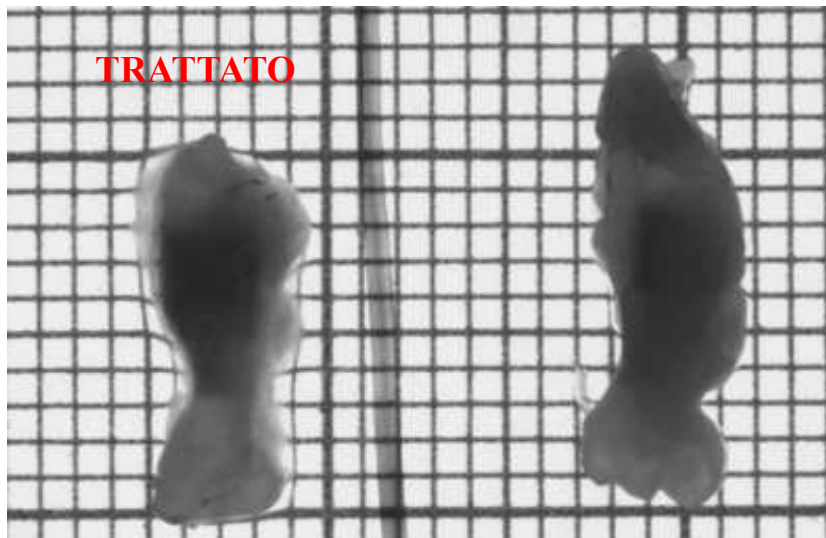


Figura 19: Immagine di Tibie di ratto al T0. A sinistra il trattato con collagenasi. A destra il controllo.

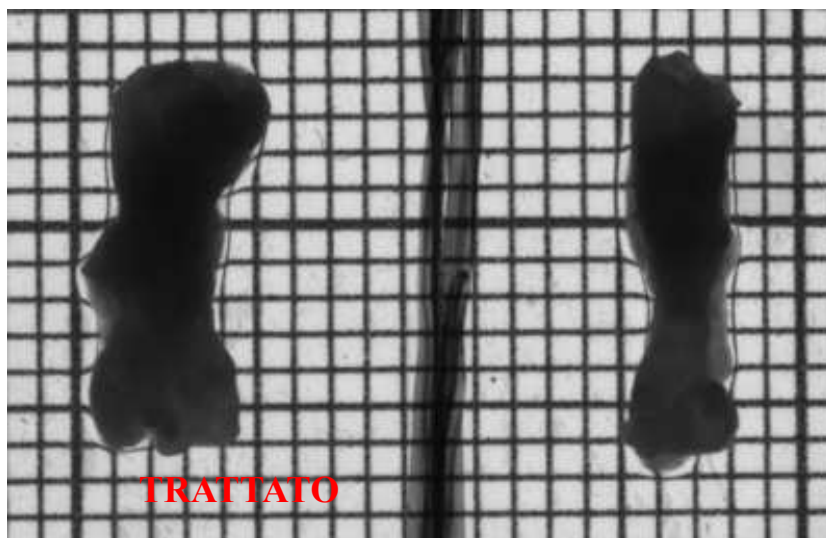


Figura 20: Immagine di Tibie di ratto al T0. A sinistra il trattato con collagenasi. A destra il controllo.

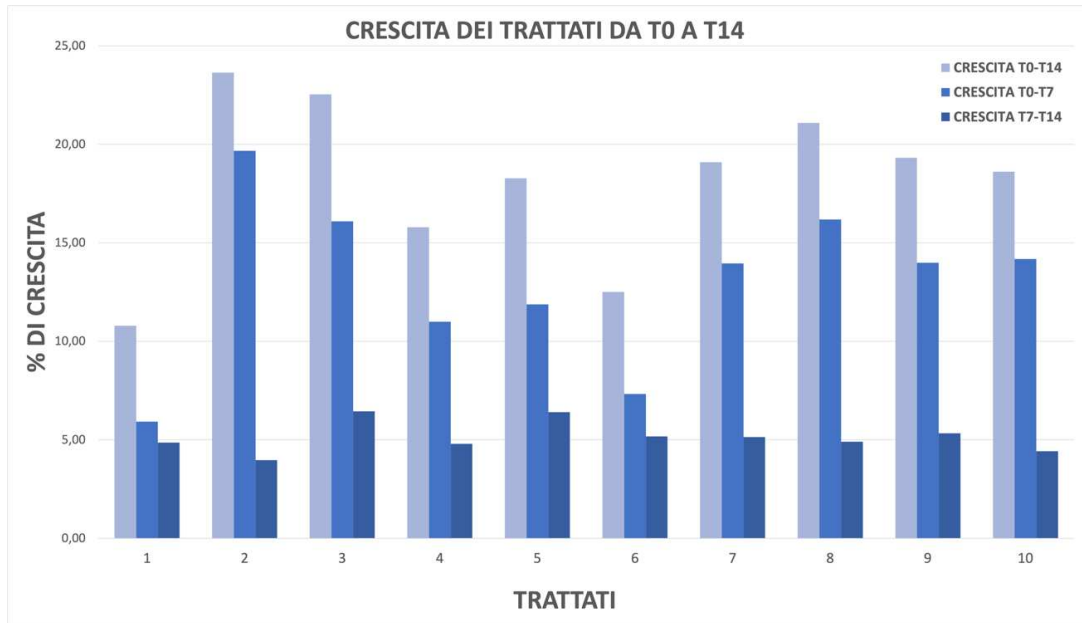


Tabella 1: crescita dei trattati nell'intervallo di tempo dello studio, da T0 a T14.

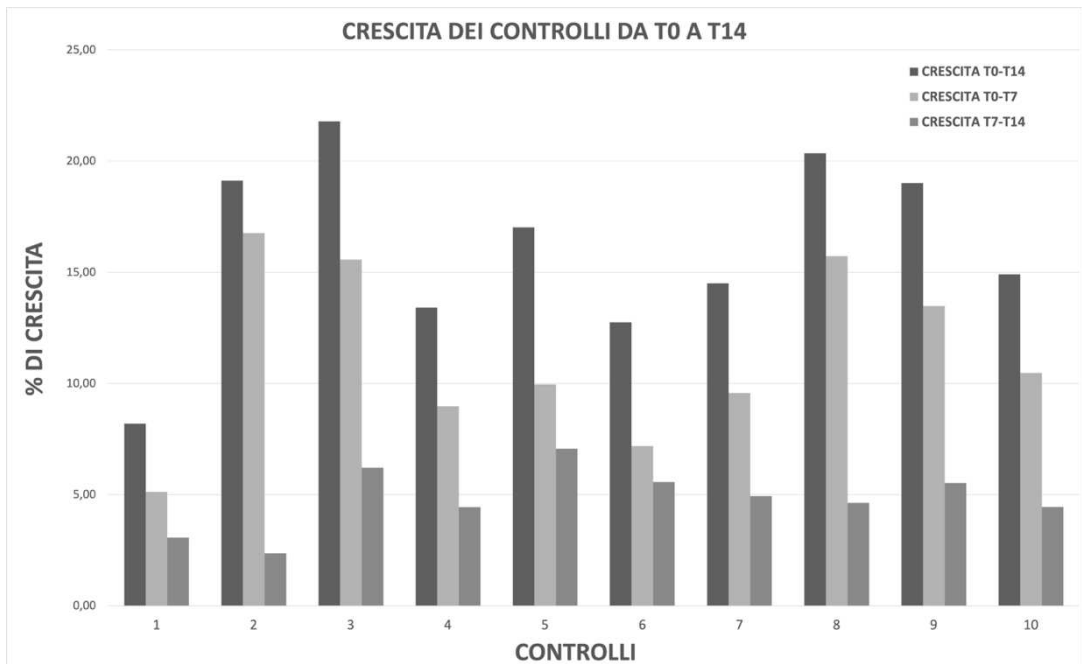


Tabella 2: crescita dei controlli nell'intervallo di tempo dello studio, da T0 a T14

### *Analisi istochimica*

Nei campioni trattati con collagenasi si è osservata una totale scomparsa delle fibre elastiche ed una riduzione di quelle collagene nel periostio rispetto ai controlli. [Figure 21 e 22]

Nel modello animale trattato con la collagenasi ad una concentrazione superiore si è vista la distruzione di tutte le strutture circostanti all'osso, che sono state invece mantenute nel controllo.

Nel modello animale trattato con la collagenasi a concentrazione ridotta, invece, si può osservare gli stessi effetti sulle fibre elastiche e collagene senza che i tessuti limitrofi venissero danneggiati. [Figure 23 e 24]

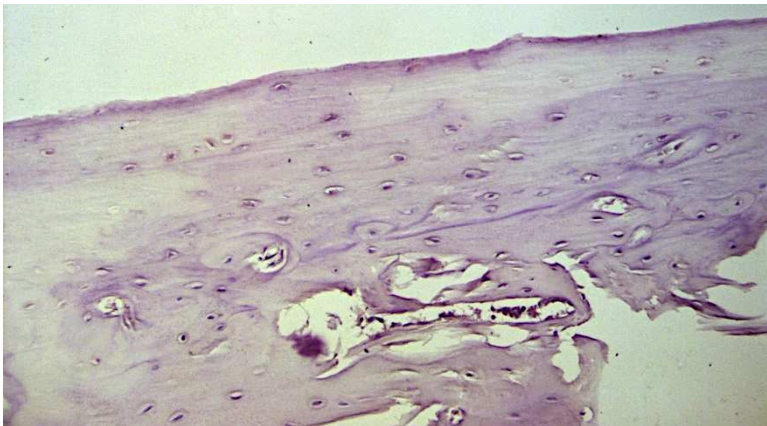


Figura 21: Immagine istologica di tibia di ratto trattata con collagenasi con colorazione tessuto-specifica per l'elastina, si noti la scomparsa delle fibre elastiche nel periostio. Colorazione Orceina ingrandimento 20X.

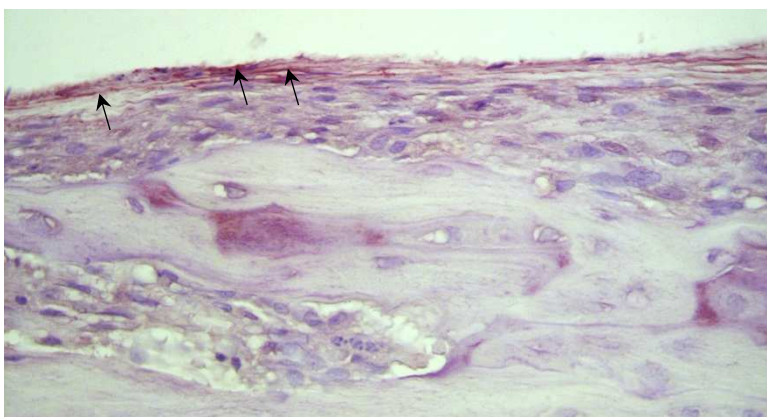


Figura 22: Immagine istologica di Tibia di ratto non trattata con l'enzima (controllo) con colorazione tessuto-specifica per l'elastina, si noti la presenza delle fibre elastiche periostali (freccie). Colorazione con Orceina ingrandimento 20 X

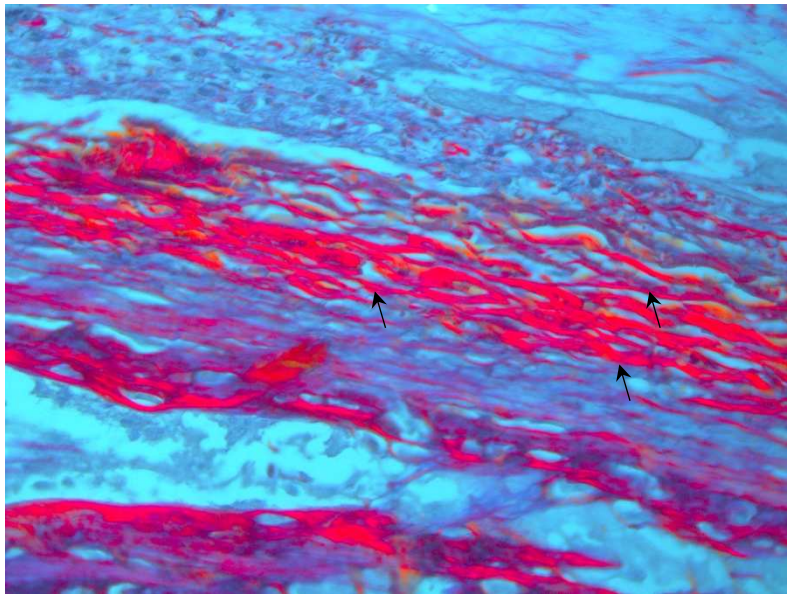


Figura 23: Immagine istologica di Tibia di ratto trattata con collagenasi con colorazione tessuto specifica per il collagene. Si noti una riduzione delle fibre collagene (frece) in confronto al controllo (immagine sotto). Colorazione Sirius Red ingrandimento 40X.

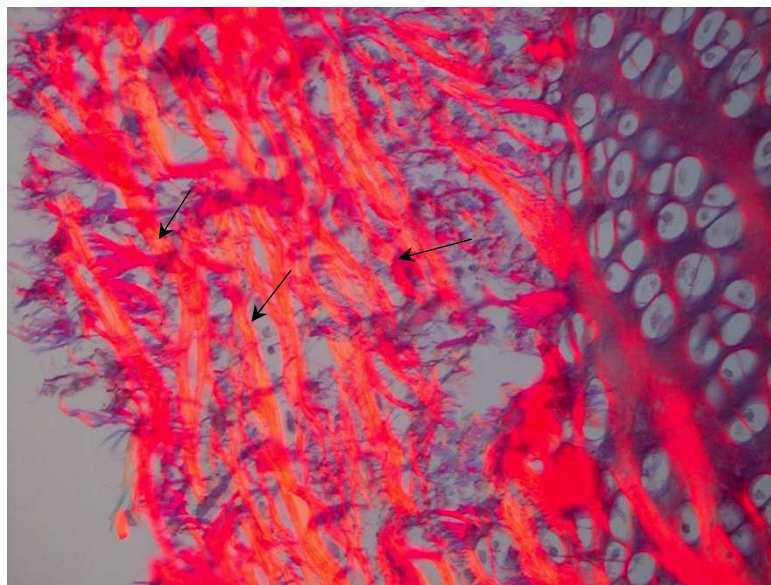


Figura 24: Immagine istologica di Tibia di ratto non trattato (controllo) con colorazione tessuto specifica per il collagene. Si noti una maggiore quantità delle fibre collagene (frece) in confronto al trattato (immagine sopra). Colorazione Sirius Red ingrandimento 40X.

### *Analisi immunoistochimica*

Dall'analisi immunoistochimica è stata riscontrata la presenza di fibre collagene di tipo I, II e IV sia nei trattati che nei controlli, come è stato visto anche all'istochimica. [Figura 25]

È stata effettuata la quantizzazione delle fibre collagene di tipo I al fine di confrontarne la percentuale presente nei trattati e nei controlli. Sono stati presi in considerazione per entrambi i gruppi 5 campi ad ingrandimento 20x dove è stata effettuata l'analisi.

I valori sono stati espressi come frazione percentuale di area occupata dalle suddette fibre, da questi è stata poi calcolata la media e messa a confronto con la media della tibia controlaterale.

Alla quantizzazione per il collagene di tipo I è stato osservato che la media percentuale di fibre collagene nei campioni trattati è di 0,704% e quella dei controlli di 3,215%.

Si può osservare, quindi una riduzione della quota di collagene a seguito del trattamento con l'enzima.

Nei trattati, inoltre, si è registrata la scomparsa totale delle fibre elastiche, a differenza dei controlli dove il campo è rimasto invariato. [Figura 26]

### *Analisi ultrastrutturale*

Anche nell'analisi ultrastrutturale si conferma la riduzione delle fibre collagene nei trattati rispetto ai controlli, senza particolari alterazioni.



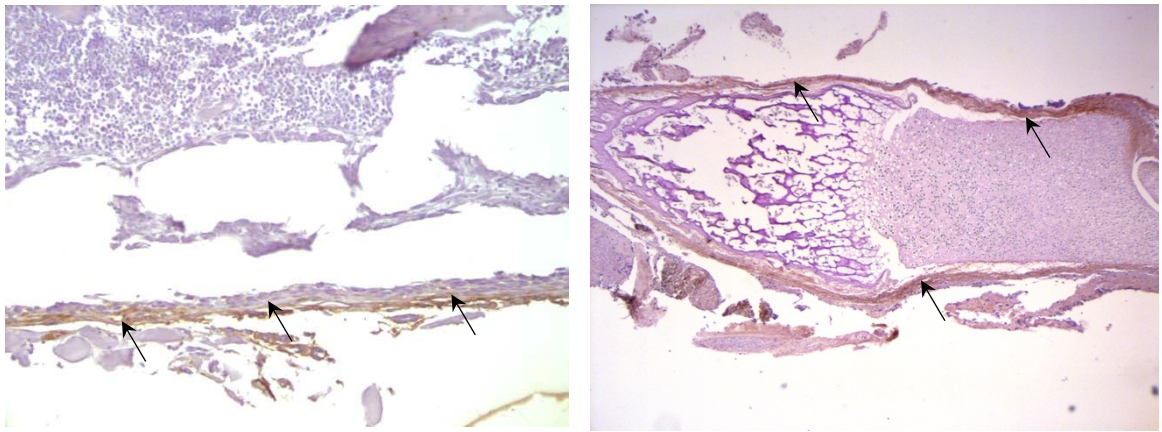


Figura 25: Immagine istologica di Tibia di ratto con colorazione per anticorpo anti-collagene I. A sinistra il trattato, con evidente riduzione della quantità di fibre. A destra il controllo con le fibre evidenti ed integre che avvolgono interamente la struttura ossea (freccie). Immunoistochimica ingrandimento 20X.

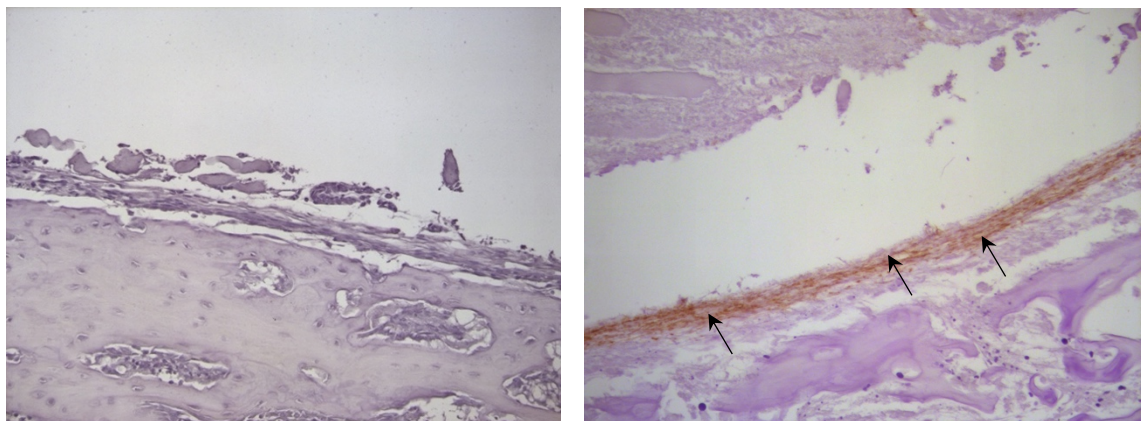


Figura 26: Immagine istologica di Tibia di ratto con colorazione per anticorpo anti-elastina. A sinistra il trattato, privo di tale struttura. A destra il controllo con le fibre evidenti ed integre (freccie). Immunoistochimica ingrandimento 20X.



## **Studio in vivo**

### ***Modello sperimentale***

Durante i 35 giorni di stabulario tutti gli animali sono cresciuti normalmente e non hanno accusato zoppie. Non sono state riscontrate alterazioni dei tessuti molli e cutanei.

### ***Analisi radiologica***

All'esame radiografico i campioni risultano tra loro paragonabili, non sono evidenti deviazioni assiali né alterazioni della qualità dell'osso tra trattati e controlli. Alla misurazione dei radiogrammi è confermata la differenza di lunghezza riscontrata all'analisi morfometrica. [Figura 27]

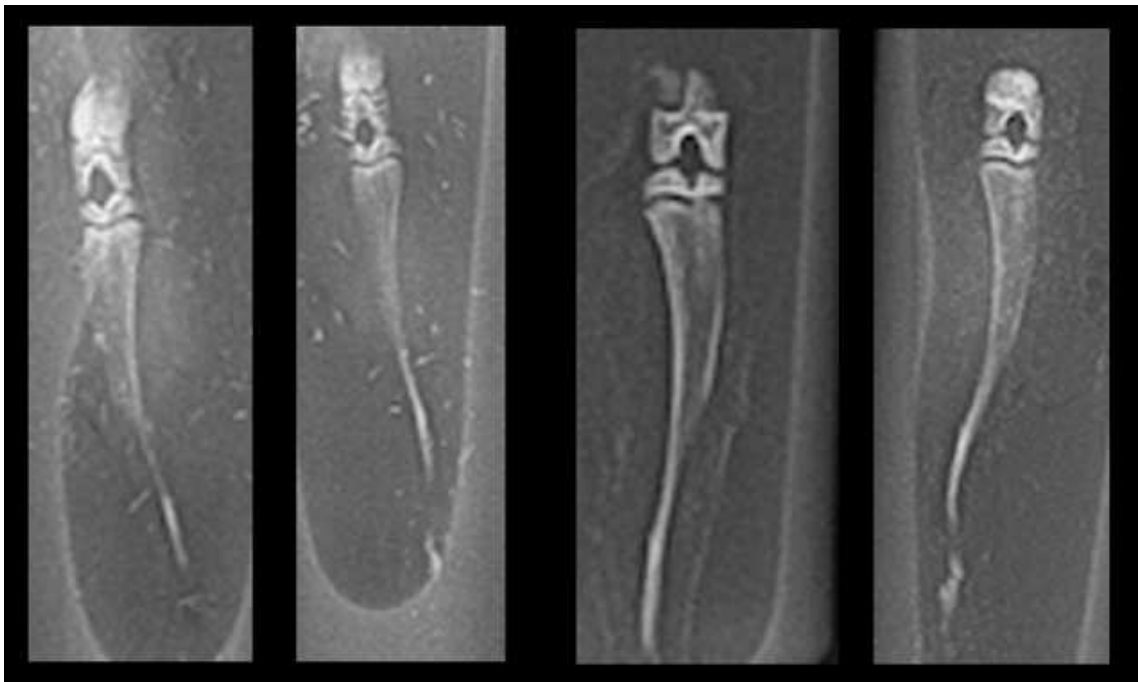


Figura 27: Immagini radiografiche delle tibie a seguito del trattamento con collagenasi in vivo. A destra di ciascuna coppia i trattati e a sinistra i controlli

### *Analisi morfometrica*

I risultati dello studio in vivo sono stati valutati con le misurazioni della lunghezza delle tibie trattate e dei controlli.

Dai dati è emerso che la lunghezza media dei trattati è di 36,71 mm e quella dei controlli di 32,66 mm quindi, la differenza di crescita dei due arti controlaterali è di 4,054 mm.

Anche in questo caso è stato fatto il T.TEST assumendo che le differenze siano statisticamente significative per un valore di  $p < 0.05$ . [Tabella 3]

La crescita dei trattati è risultata statisticamente significativa ai controlli con una  $p < 0,001$ .

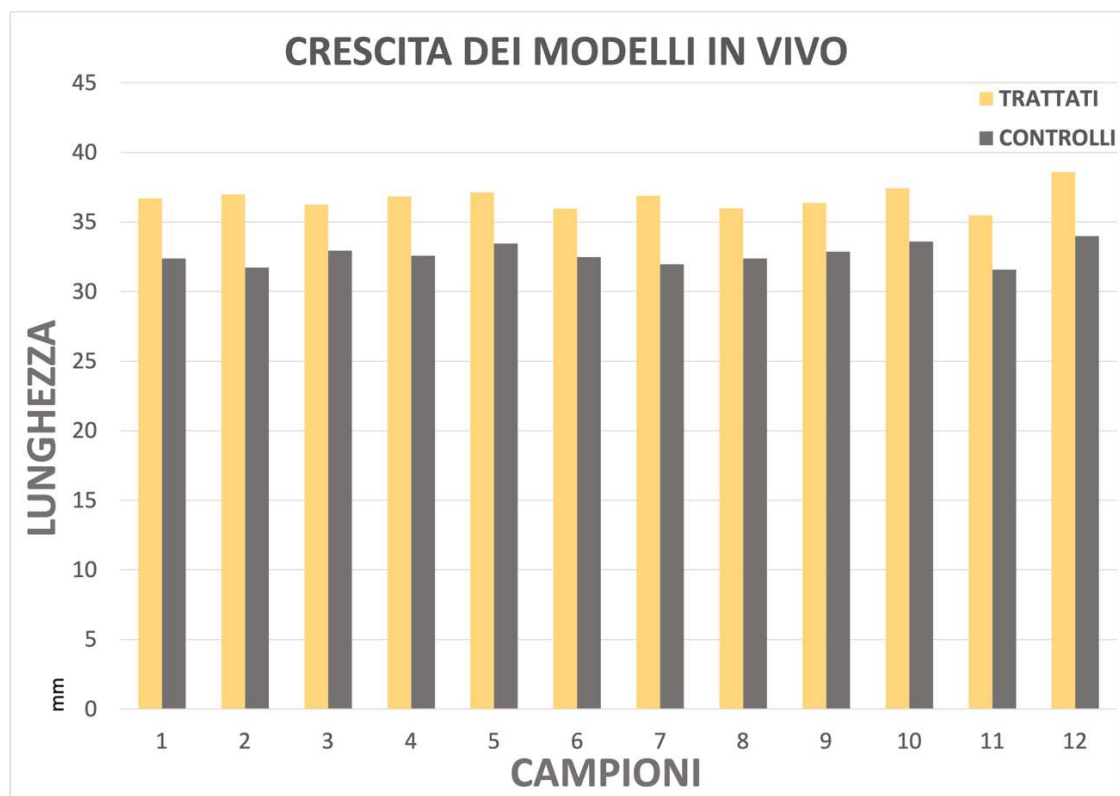


Tabella 1: crescita dei modelli animale in vivo, confronto tra casi e controlli.

### *Analisi istochimica e immunoistochimica*

Nei campioni trattati con collagenasi si è osservata una quasi totale scomparsa delle fibre elastiche del periostio rispetto ai controlli.

Le fibre collagene invece sono rimaste intatte, ma ridotte nei casi rispetto ai controlli.  
[Figura 28]

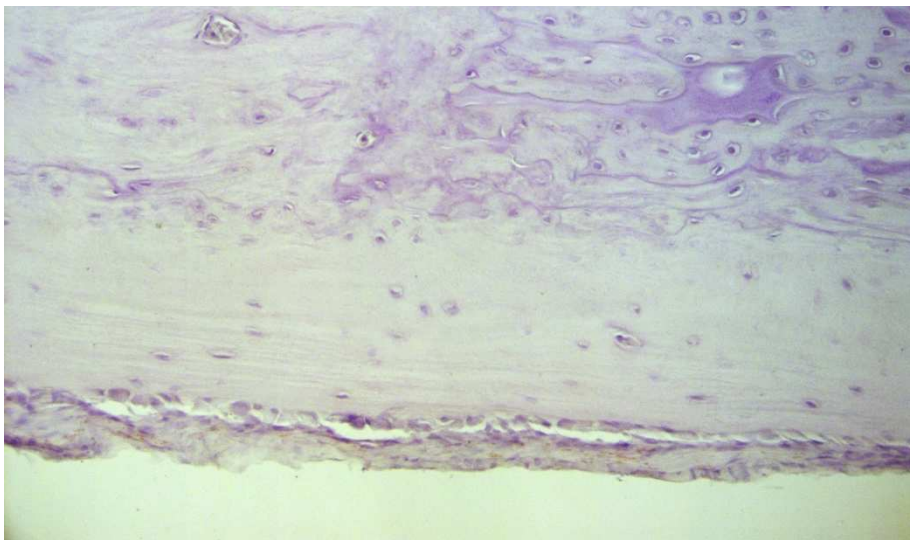


Figura 28: Immagine di Tibia di ratto, trattata in vivo, con colorazione immunoistochimica. Si noti la quasi totale scomparsa delle fibre elastiche. Immunoistochimica ingrandimento 20X.

## DISCUSSIONE

---

I risultati ottenuti dai due studi in vitro ed in vivo evidenziano un modello sperimentale che risponde in modo significativo al trattamento con collagenasi.

Nello studio in vitro i risultati più significativi sono stati quelli ottenuti dai campioni a tre giorni di vita e sono quelli tenuti in considerazione in questa tesi.

Durante la preparazione delle colture d'organo i campioni a cinque settimane si sono rivelati più facili da gestire, sia per l'impianto che per il trattamento, grazie alle maggiori dimensioni e alla maggior quantità di tessuto osseo presente. Tuttavia, la crescita in coltura si è rivelata difficoltosa, con una minore sopravvivenza della coltura d'organo e i risultati ottenuti dalle misurazioni non hanno permesso di rilevare una crescita longitudinale nel tempo in nessuno dei due gruppi.

Per quanto riguarda, invece, il modello di ratto a tre giorni di vita, i campioni erano di dimensioni inferiori e prevalentemente cartilaginei, si sono pertanto riscontrate più difficoltà nell'espanto, che ha richiesto il ricorso a sistemi di ingrandimento, e nella manipolazione al momento delle misurazioni, data la scarsa consistenza ossea delle tibie. In tutti questi campioni d'altra parte è stato riscontrato un accrescimento longitudinale quantificabile e statisticamente significativo nei trattati rispetto ai controlli. Si è visto che la percentuale di crescita si riduce durante la seconda settimana (T7-T14) probabilmente dovuta anche ad una riduzione della vitalità dei tessuti in coltura.

Si è registrata una crescita longitudinale al termine di T14 del 19% e la percentuale di crescita parziale della prima settimana del 14%, i controlli hanno avuto un accrescimento del 16% e durante la prima settimana del 12%.

Nello studio in vitro, data l'assenza in letteratura di dati di riferimento, sono state testate due dosi diverse di collagenasi al fine di valutare il miglior rapporto dose/effetto.

Dai risultati è emerso che la dose maggiore di enzima ha causato la digestione dei tessuti circostanti a differenza della dose ridotta che ha preservato il territorio limitrofo e senza danni all'osso.

Nello studio in vivo il modello animale è stato tenuto sotto osservazione per 35 giorni prima di essere sacrificato e durante questo periodo non sono state osservate zoppie e modifiche nelle abitudini di vita, non sono state riscontrate lesioni cutanee in corrispondenza della somministrazione dell'enzima.

Dai risultati dello studio in vivo è emerso, tuttavia, che le tibie trattate hanno avuto una differenza di crescita longitudinale di 4,054 mm rispetto ai controlli, in linea con i risultati in vitro.

Sono state anche effettuate analisi radiologiche al fine di verificare eventuali deviazioni assiali nella sede dell'infiltrazione, ma non sono state riscontrate particolari differenze all'interno della stessa tibia e a confronto con la controlaterale.

Tuttavia, dagli esami istochimici ed immunoistochimici è emerso che la collagenasi utilizzata non è selettiva per il collagene, portando alla distruzione anche delle fibre elastiche.

La non selettività dell'enzima non ci permette di affermare con certezza che le fibre collagene abbiano un ruolo nell'accrescimento osseo, anche se i risultati in vivo ed in vitro risultano statisticamente significativi.

La digestione delle fibre elastiche e la riduzione di quelle collagene potrebbe, però, aver causato un'azione sinergica sulla crescita dei tessuti in coltura, annullando l'azione di feedback negativo delle fibre periostali nei confronti dell'accrescimento osseo.

Per una certezza sul ruolo del collagene nell'accrescimento osseo si potrebbe valutare l'utilizzo di collagenasi selettive per il collagene di tipo I e III, già utilizzate nell'ambito della chirurgia della mano. Queste collagenasi hanno un'azione specifica che ci

permetterebbe osservare come il collagene interferisca nella crescita ossea indipendentemente dalle fibre elastiche.

La prosecuzione di questi studi potrebbe portare in un futuro all'impiego delle collagenasi per il trattamento di dismetrie ed eterometrie in sostituzione alla pratica chirurgica.

In conclusione, questo è uno studio pilota che aveva come obiettivo di verificare l'azione del collagene sull'accrescimento osseo una volta che si va a perdere la sua azione di contenzione, questa tesi è stata parzialmente verificata e offre una base per studi futuri per l'utilizzo di enzimi più selettivi al fine di valutare solo l'azione delle fibre collagene.

## CONCLUSIONI

---

Quindi, sulla base delle considerazioni fatte, da questi studi si può evincere che:

- Il modello sperimentale di ratto Wistar è valido, in termini di risposta all'enzima, alla crescita in coltura e alle colorazioni istochimiche ed immunoistochimiche.  
Per lo studio è da preferire un modello più giovane per la rapida crescita e una maggiore sopravvivenza in coltura.
- Delle due dosi di collagenasi testate nello studio, quella inferiore si è rivelata efficace e non lesiva per i tessuti limitrofi.
- La collagenasi utilizzata è poco selettiva e non permette una distruzione mirata delle fibre collagene; quindi, per eventuali studi futuri sarebbe preferibile impiegare un enzima più selettivo.
- La crescita dei campioni è risultata statisticamente significativa sia in vitro che in vivo nei modelli animali trattati con l'enzima e dalle analisi istologiche si è vista l'integrità dei tessuti limitrofi
- Le fibre collagene esercitano apparentemente un ruolo nell'accrescimento osseo, ipotesi non smentita nonostante la scarsa selettività dell'enzima.
- Lo studio offre una valida base di partenza per lo sviluppo di ulteriori progetti di studio sul ruolo delle fibre collagene nell'accrescimento osseo, alla ricerca di possibili e innovativi approcci terapeutici, meno invasivi di quelli attualmente in uso per il trattamento delle eterometrie e delle deviazioni assiali degli arti.





## REFERENZE

---

- Aitken, G. T. (1963). Surgical amputation in children. *JBJS*, 45(8), 1735–1741.
- Aitken GT. (1962). *Overgrowth of the amputation stump*.
- Aitken GT. (1968). *The child with an acquired amputation*.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2009). *Biologia molecolare della cellula*. Zanichelli.
- Ali, S. Y. (1976). Analysis of matrix vesicles and their role in the calcification of epiphyseal cartilage. *Federation Proceedings*, 35(2), 135–142.
- Alonso, G., Yawny, A., & Bertolino, G. (2022). How do bones grow? A mathematical description of the mechanobiological behavior of the epiphyseal plate. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 21(5), 1585–1601. <https://doi.org/10.1007/s10237-022-01608-y>
- Amini, S., Mortazavi, F., Sun, J., Levesque, M., Hoemann, C. D., & Villemure, I. (2013). Stress relaxation of swine growth plate in semi-confined compression: Depth dependent tissue deformational behavior versus extracellular matrix composition and collagen fiber organization. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 12(1), 67–78. <https://doi.org/10.1007/s10237-012-0382-y>
- Aspenberg, P., & Lohmander, L. S. (1989). Fibroblast growth factor stimulates bone formation. Bone induction studied in rats. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 60(4), 473–476. <https://doi.org/10.3109/17453678909149323>
- Aspenberg, P., Thorngren, K.-G., & Lohmander, L. S. (1991). Dose-dependent stimulation of bone induction by basic fibroblast growth factor in rats. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 62(5), 481–484. <https://doi.org/10.3109/17453679108996650>
- Astbury, W. T., & Bell, F. O. (1940). Molecular Structure of the Collagen Fibres. *Nature*, 145(3672), Article 3672. <https://doi.org/10.1038/145421a0>
- Beekman, F. (1938). Amputations during childhood. *The Surgical Clinics of North America*, 18, 425.
- Blount, W. P., & Clarke, G. R. (1949). CONTROL OF BONE GROWTH BY EPIPHYSEAL STAPLING: A Preliminary Report. *JBJS*, 31(3), 464.
- Bolander, M. E. (1992). Regulation of Fracture Repair by Growth Factors. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 200(2), 165–170.

<https://doi.org/10.3181/00379727-200-43410A>

Bonnel, F., Dimeglio, A., Baldet, P., & Rabischong, P. (1984). Biomechanical activity of the growth plate. Clinical incidences. *Anatomia Clinica*, 6(1), 53–61. <https://doi.org/10.1007/BF01811214>

Bostrom, M. P., Lane, J. M., Berberian, W. S., Missri, A. A., Tomin, E., Weiland, A., Doty, S. B., Glaser, D., & Rosen, V. M. (1995). Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 13(3), 357–367. <https://doi.org/10.1002/jor.1100130309>

Bowen, J. R., & Johnson, W. J. (1984). Percutaneous Epiphysiodesis. *Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007)*, 190, 170.

Brighton, C. T. (1978). Structure and function of the growth plate. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 136, 22–32.

Brighton, C. T., Sugioka, Y., & Hunt, R. M. (1973). Cytoplasmic structures of epiphyseal plate chondrocytes. Quantitative evaluation using electron micrographs of rat costochondral junctions with special reference to the fate of hypertrophic cells. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 55(4), 771–784.

Bromley, J. W., Varma, A. O., Santoro, A. J., Cohen, P., Jacobs, R., & Berger, L. (1984). Double-blind evaluation of collagenase injections for herniated lumbar discs. *Spine*, 9(5), 486–488. <https://doi.org/10.1097/00007632-198407000-00012>

Canale, S. T., & Christian, C. A. (1990). Techniques for Epiphysiodesis About the Knee. *Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007)*, 255, 81.

Carvell, J. E. (1983). The relationship of the periosteum to angular deformities of long bones. Experimental operations in rabbits. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 173, 262–274.

Chakraborty, S., Nair, G. B., & Shinoda, S. (1997). Pathogenic vibrios in the natural aquatic environment. *Reviews on Environmental Health*, 12(2), 63–80. <https://doi.org/10.1515/reveh.1997.12.2.63>

Chang, S. C., Hoang, B., Thomas, J. T., Vukicevic, S., Luyten, F. P., Ryba, N. J., Kozak, C. A., Reddi, A. H., & Moos, M. (1994). Cartilage-derived morphogenetic proteins. New members of the transforming growth factor-beta superfamily predominantly expressed in long bones during human embryonic development. *The Journal of Biological Chemistry*,

269(45), 28227–28234.

Chillemi, C., Bevilacqua, C., & Gigante, A. (1999). In vitro effects of elastase on periosteum of long bones: An histochemical, immunohistochemical and morphometric study. *European Journal of Histochemistry: EJH*, 43(3), 227–233.

Cohen, B., Chorney, G. S., Phillips, D. P., Dick, H. M., Buckwalter, J. A., Ratcliffe, A., & Mow, V. C. (1992). The microstructural tensile properties and biochemical composition of the bovine distal femoral growth plate. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 10(2), 263–275. <https://doi.org/10.1002/jor.1100100214>

Copray, J. C., Jansen, H. W., & Duterloo, H. S. (1983). Growth of the mandibular condylar cartilage of the rat in serum-free organ culture. *Archives of Oral Biology*, 28(10), 967–974. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(83\)90095-x](https://doi.org/10.1016/0003-9969(83)90095-x)

Copray, J. C. V. M., Jansen, H. W. B., & Duterloo, H. S. (1985). An in-vitro system for studying the effect of variable compressive forces on the mandibular condylar cartilage of the rat. *Archives of Oral Biology*, 30(4), 305–311. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(85\)90002-0](https://doi.org/10.1016/0003-9969(85)90002-0)

Cotta-Pereira, G., & Iruela-Arispe, M. L. (1989). Extracellular matrix: Functional significance of oxytalan, elaunin and elastic fibers. *Progress in Clinical and Biological Research*, 295, 101–107.

Cowan, P. M., McGAVIN, S., & North, A. C. T. (1955). The Polypeptide Chain Configuration of Collagen. *Nature*, 176(4492), Article 4492. <https://doi.org/10.1038/1761062a0>

D'Andrea, C. R., Alfraihat, A., Singh, A., Anari, J. B., Cahill, P. J., Schaer, T., Snyder, B. D., Elliott, D., & Balasubramanian, S. (2021). Part 1. Review and meta-analysis of studies on modulation of longitudinal bone growth and growth plate activity: A macro-scale perspective. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 39(5), 907–918. <https://doi.org/10.1002/jor.24976>

Davis, C. A., Maranji, K., Frederick, N., Dorey, F., & Moseley, C. F. (1998). Comparison of crossed pins and external fixation for correction of angular deformities about the knee in children. *Journal of Pediatric Orthopedics*, 18(4), 502–507.

Db, K. (1991). Quantitative histological changes in the proximal tibial growth cartilage of aged female rats. *Cells Materials*, 1, 11–18.

- Demirel, M., Sağlam, Y., Yıldırım, A. M., Bilgili, F., Şeker, A., & Şen, C. (2022). Temporary Epiphysiodesis Using the Eight-Plate in the Management of Children with Leg Length Discrepancy: A Retrospective Case Series. *Indian Journal of Orthopaedics*, *56*(5), 874–882. <https://doi.org/10.1007/s43465-021-00599-9>
- Di Pasquale, R., Vaccaro, S., Caputo, M., Cuppari, C., Caruso, S., Catania, A., & Messina, L. (2019). Collagenase-assisted wound bed preparation: An in vitro comparison between *Vibrio alginolyticus* and *Clostridium histolyticum* collagenases on substrate specificity. *International Wound Journal*, *16*(4), 1013–1023. <https://doi.org/10.1111/iwj.13148>
- Dimeglio A. (1994). *L'accrescimento in Ortopedia* (Seconda edizione). ESC.
- Drvaric, D. M., & Kruger, L. M. (2001). Modified Ertl Osteomyoplasty for Terminal Overgrowth in Childhood Limb Deficiencies. *Journal of Pediatric Orthopaedics*, *21*(3), 392.
- D'Souza, H., & Shah, N. M. (1999). Circumferential periosteal sleeve resection: Results in limb-length discrepancy secondary to poliomyelitis. *Journal of Pediatric Orthopaedics*, *19*(2), 215–221. <https://doi.org/10.1097/00004694-199903000-00016>
- Eppley, B. L., Doucet, M., Connolly, D. T., & Feder, J. (1988). Enhancement of angiogenesis by bFGF in mandibular bone graft healing in the rabbit. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery: Official Journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, *46*(5), 391–398. [https://doi.org/10.1016/0278-2391\(88\)90223-6](https://doi.org/10.1016/0278-2391(88)90223-6)
- Farquharson, C., Jefferies, D., Seawright, E., & Houston, B. (2001). Regulation of chondrocyte terminal differentiation in the postembryonic growth plate: The role of the PTHrP-Indian hedgehog axis. *Endocrinology*, *142*(9), 4131–4140. <https://doi.org/10.1210/endo.142.9.8396>
- Fecteau, K. A., Haffner, J. C., & Eiler, H. (1998). The potential of collagenase as a new therapy for separation of human retained placenta: Hydrolytic potency on human, equine and bovine placentae. *Placenta*, *19*(5–6), 379–383. [https://doi.org/10.1016/s0143-4004\(98\)90077-7](https://doi.org/10.1016/s0143-4004(98)90077-7)
- Firth, G. B., Masquijo, J. J., & Kontio, K. (2011). Transtibial Ertl amputation for children and adolescents: A case series and literature review. *Journal of Children's Orthopaedics*, *5*(5), 357–362. <https://doi.org/10.1007/s11832-011-0364-0>
- Fleish, H., & Neuman, W. F. (1961). Mechanisms of calcification: Role of collagen,

- polyphosphates, and phosphatase. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 200(6), 1296–1300. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1961.200.6.1296>
- Frantz, C. H., & Aitken, G. T. (1959). Management of the Juvenile Amputee. *Clinical Orthopaedics and Related Research*®, 14, 30.
- Friedman, M., & Strang, L. B. (1966). Effect of long-term corticosteroids and corticotrophin on the growth of children. *Lancet (London, England)*, 2(7463), 569–572.
- Fullmer, H. M., & Lillie, R. D. (1958). The oxytalan fiber: A previously undescribed connective tissue fiber. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 6(6), 425–430. <https://doi.org/10.1177/6.6.425>
- Galéra, P., Vivien, D., Pronost, S., Bonaventure, J., Rédini, F., Loyau, G., & Pujol, J. P. (1992). Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) up-regulation of collagen type II in primary cultures of rabbit articular chondrocytes (RAC) involves increased mRNA levels without affecting mRNA stability and procollagen processing. *Journal of Cellular Physiology*, 153(3), 596–606. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041530322>
- Garabedian, M., Du Bois, M. B., Corvol, M. T., Pezant, E., & Balsan, S. (1978). Vitamin D and cartilage. I. In vitro metabolism of 25-hydroxycholecalciferol by cartilage. *Endocrinology*, 102(4), 1262–1268. <https://doi.org/10.1210/endo-102-4-1262>
- Gardner, E. (1956). CHAPTER XIII - OSTEOGENESIS IN THE HUMAN EMBRYO AND FETUS. In G. H. Bourne (Ed.), *The Biochemistry and Physiology of Bone* (pp. 359–399). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4832-3286-7.50017-8>
- Ghadially, F. N., & More, I. a. R. (1989). Ultrastructural Pathology of the Cell and Matrix 3rd edition. *Histopathology*, 15(1), 102–102. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1989.tb03049.x>
- Gigante, A., Chillemi, C., Quaglino, D., Miselli, M., & Pasquali-Ronchetti, I. (2001). DL-penicillamine induced alteration of elastic fibers of periosteum-perichondrium and associated growth inhibition: An experimental study. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 19(3), 398–404. [https://doi.org/10.1016/S0736-0266\(00\)90033-0](https://doi.org/10.1016/S0736-0266(00)90033-0)
- Gigante, A., Specchia, N., Nori, S., & Greco, F. (1996). Distribution of elastic fiber types in the epiphyseal region. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 14(5), 810–817. <https://doi.org/10.1002/jor.1100140519>
- Glimcher, M. J. (1987). The nature of the mineral component of bone and the mechanism

of calcification. *Instructional Course Lectures*, 36, 49–69.

Greco, F., de Palma, L., Specchia, N., & Mannarini, M. (1989). Growth-plate cartilage metabolic response to mechanical stress. *Journal of Pediatric Orthopedics*, 9(5), 520–524. <https://doi.org/10.1097/01241398-198909010-00004>

Grimsrud, C. D., Romano, P. R., D'Souza, M., Puzas, J. E., Reynolds, P. R., Rosier, R. N., & O'Keefe, R. J. (1999). BMP-6 is an autocrine stimulator of chondrocyte differentiation. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 14(4), 475–482. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1999.14.4.475>

Guevara, J. M., Moncayo, M. A., Vaca-González, J. J., Gutiérrez, M. L., Barrera, L. A., & Garzón-Alvarado, D. A. (2015). Growth plate stress distribution implications during bone development: A simple framework computational approach. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 118(1), 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2014.10.007>

H, I., Y, K., M, I., Y, H., M, S., & F, S. (1989). Stimulation of cartilage-matrix proteoglycan synthesis by morphologically transformed chondrocytes grown in the presence of fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta. *Journal of Cellular Physiology*, 138(2). <https://doi.org/10.1002/jcp.1041380216>

Havelka, S., Babický, A., Musilová, J., Rohožková, D., & Tesárek, B. (1979). Effect of Osteotropic Hormones on Cartilage Metabolism. *Hormone and Metabolic Research*, 11(1), 83–84. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1095761>

Hensinger, R. N. (1986). *Standards in pediatric orthopedics: Tables, charts, and graphs illustrating growth*. Raven Press.

Hiraki, Y., Inoue, H., Hirai, R., Kato, Y., & Suzuki, F. (1988). Effect of transforming growth factor beta on cell proliferation and glycosaminoglycan synthesis by rabbit growth-plate chondrocytes in culture. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 969(1), 91–99. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(88\)90092-4](https://doi.org/10.1016/0167-4889(88)90092-4)

Houghton, G. R., & Dekel, S. (1979). The periosteal control of long bone growth. An experimental study in the rat. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 50(6 Pt 1), 635–637. <https://doi.org/10.3109/17453677908991285>

Hunziker, E. B. (1994). Mechanism of longitudinal bone growth and its regulation by growth plate chondrocytes. *Microscopy Research and Technique*, 28(6), 505–519.

<https://doi.org/10.1002/jemt.1070280606>

Hunziker, E. B., & Schenk, R. K. (1989). Physiological mechanisms adopted by chondrocytes in regulating longitudinal bone growth in rats. *The Journal of Physiology*, *414*, 55–71. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1989.sp017676>

Ilharreborde, B., Gaumetou, E., Souchet, P., Fitoussi, F., Presedo, A., Penneçot, G. F., & Mazda, K. (2012). Efficacy and late complications of percutaneous epiphysiodesis with transphyseal screws. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, *94*(2), 270–275. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.94B2.27470>

Inan, M., Chan, G., Littleton, A. G., Kubiak, P., & Bowen, J. R. (2008). Efficacy and Safety of Percutaneous Epiphysiodesis. *Journal of Pediatric Orthopaedics*, *28*(6), 648. <https://doi.org/10.1097/BPO.0b013e3181832475>

Iwasaki, M., Jikko, A., & Le, A. X. (1999). Age-dependent effects of hedgehog protein on chondrocytes. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, *81*(6), 1076–1082. <https://doi.org/10.1302/0301-620x.81b6.8851>

Iwasaki, M., Le, A. X., & Helms, J. A. (1997). Expression of indian hedgehog, bone morphogenetic protein 6 and gli during skeletal morphogenesis. *Mechanisms of Development*, *69*(1–2), 197–202. [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(97\)00145-7](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(97)00145-7)

Jahmani, R., Paley, D., Jahmani, R., & Paley, D. (2019). Stump Overgrowth after Limb Amputation in Children. In *Limb Amputation*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.90532>

Janda, J. M., Powers, C., Bryant, R. G., & Abbott, S. L. (1988). Current perspectives on the epidemiology and pathogenesis of clinically significant *Vibrio* spp. *Clinical Microbiology Reviews*, *1*(3), 245–267. <https://doi.org/10.1128/CMR.1.3.245>

Jenkins, D. H., Cheng, D. H., & Hodgson, A. R. (1975). Stimulation of bone growth by periosteal stripping. A clinical study. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, *57*(4), 482–484.

Johnson, P. R., White, S. A., & London, N. J. (1996). Collagenase and human islet isolation. *Cell Transplantation*, *5*(4), 437–452. <https://doi.org/10.1177/096368979600500403>

Kalu, D. N., Hardin, R. H., Cockerham, R., & Yu, B. P. (1984). Aging and dietary modulation of rat skeleton and parathyroid hormone. *Endocrinology*, *115*(4), 1239–1247. <https://doi.org/10.1210/endo-115-4-1239>

- Kang, N., Sivakumar, B., Sanders, R., Nduka, C., & Gault, D. (2006). Intra-lesional injections of collagenase are ineffective in the treatment of keloid and hypertrophic scars. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery: JPRAS*, 59(7), 693–699. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2005.11.022>
- Karlsson, C., Thornemo, M., Henriksson, H. B., & Lindahl, A. (2009). Identification of a stem cell niche in the zone of Ranvier within the knee joint. *Journal of Anatomy*, 215(3), 355–363. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2009.01115.x>
- Karp, S. J., Schipani, E., St-Jacques, B., Hunzelman, J., Kronenberg, H., & McMahon, A. P. (2000). Indian hedgehog coordinates endochondral bone growth and morphogenesis via parathyroid hormone related-protein-dependent and -independent pathways. *Development (Cambridge, England)*, 127(3), 543–548. <https://doi.org/10.1242/dev.127.3.543>
- Keene, D. R., Sakai, L. Y., & Burgeson, R. E. (1991). Human bone contains type III collagen, type VI collagen, and fibrillin: Type III collagen is present on specific fibers that may mediate attachment of tendons, ligaments, and periosteum to calcified bone cortex. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 39(1), 59–69. <https://doi.org/10.1177/39.1.1983874>
- Keil, B. (1992). *Vibrio alginolyticus* (“Achromobacter”) collagenase: Biosynthesis, function and application. *Matrix (Stuttgart, Germany). Supplement, 1*, 127–133.
- Kember, N. F. (1973). Aspects of the Maturation Process in Growth Cartilage in the Rat Tibia. *Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007)*, 95, 288.
- Khan, Y. S., & Ackerman, K. M. (2023). Embryology, Week 1. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554562/>
- Khoury, J. G., Tavares, J. O., McConnell, S., Zeiders, G., & Sanders, J. O. (2007). Results of Screw Epiphysiodesis for the Treatment of Limb Length Discrepancy and Angular Deformity. *Journal of Pediatric Orthopaedics*, 27(6), 623. <https://doi.org/10.1097/BPO.0b013e318093f4f4>
- Klagsbrun, M., & Smith, S. (1980). Purification of a cartilage-derived growth factor. *Journal of Biological Chemistry*, 255(22), 10859–10866. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)70386-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)70386-X)
- Klasen, H. J. (2000). A review on the nonoperative removal of necrotic tissue from burn wounds. *Burns: Journal of the International Society for Burn Injuries*, 26(3), 207–222.



[https://doi.org/10.1016/s0305-4179\(99\)00117-5](https://doi.org/10.1016/s0305-4179(99)00117-5)

Klein-Nulend, J., Veldhuijzen, J. P., & Burger, E. H. (1986). Increased calcification of growth plate cartilage as a result of compressive force in vitro. *Arthritis and Rheumatism*, 29(8), 1002–1009. <https://doi.org/10.1002/art.1780290809>

Kuijpers-Jagtman, A. M., Bex, J. H., Maltha, J. C., & Daggars, J. G. (1988). Longitudinal growth of the rabbit femur after vascular and periosteal interference. *Anatomischer Anzeiger*, 167(5), 349–358.

Kurtz, A. D., & Hand, R. C. (1939). Bone growth following amputation in childhood. *The American Journal of Surgery*, 43(3), 773–775. [https://doi.org/10.1016/S0002-9610\(39\)90639-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9610(39)90639-2)

Lacroix, P. (1951). The Organization of Bones. *Academic Medicine*, 26(6), 493.

Lanske, B., Karaplis, A. C., Lee, K., Luz, A., Vortkamp, A., Pirro, A., Karperien, M., Defize, L. H., Ho, C., Mulligan, R. C., Abou-Samra, A. B., Jüppner, H., Segre, G. V., & Kronenberg, H. M. (1996). PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science (New York, N.Y.)*, 273(5275), 663–666. <https://doi.org/10.1126/science.273.5275.663>

Lerner, A. L., Kuhn, J. L., & Hollister, S. J. (1998a). Are regional variations in bone growth related to mechanical stress and strain parameters? *Journal of Biomechanics*, 31(4), 327–335. [https://doi.org/10.1016/S0021-9290\(98\)00015-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9290(98)00015-3)

Lerner, A. L., Kuhn, J. L., & Hollister, S. J. (1998b). Are regional variations in bone growth related to mechanical stress and strain parameters? *Journal of Biomechanics*, 31(4), 327–335. [https://doi.org/10.1016/s0021-9290\(98\)00015-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9290(98)00015-3)

Limpaphayom, N., & Prasongchin, P. (2011). Surgical Technique: Lower Limb-length Equalization by Periosteal Stripping and Periosteal Division. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, 469(11), 3181. <https://doi.org/10.1007/s11999-011-2013-9>

Lindahl, A., Isgaard, J., Carlsson, L., & Isaksson, O. G. (1987). Differential effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on colony formation of epiphyseal chondrocytes in suspension culture in rats of different ages. *Endocrinology*, 121(3), 1061–1069. <https://doi.org/10.1210/endo-121-3-1061>

Lutfi, A. M. (1974). The role of cartilage in long bone growth: A reappraisal. *Journal of Anatomy*, 117(Pt 2), 413–417.

Lynch, M. C., & Taylor, J. F. (1987). Periosteal division and longitudinal growth in the

- tibia of the rat. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, 69(5), 812–816. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.69B5.3680349>
- Matthiass HH. (1987). Sviluppo, crescita e maturazione dell'apparato di sostegno e di movimento. In *Trattato di Ortopedia* (Seconda edizione, Vol. 1). Piccin.
- McLain, J. B., & Vig, P. S. (1983). Transverse periosteal sectioning and femur growth in the rat. *The Anatomical Record*, 207(2), 339–348. <https://doi.org/10.1002/ar.1092070213>
- Mehlman, C. T., Araghi, A., & Roy, D. R. (1997). Hyphenated history: The Hueter-Volkman law. *American Journal of Orthopedics (Belle Mead, N.J.)*, 26(11), 798–800.
- Métaizeau, J.-P., Wong-Chung, J., Bertrand, H., & Pasquier, P. (1998). Percutaneous Epiphysiodesis Using Transphyseal Screws (PETS). *Journal of Pediatric Orthopaedics*, 18(3), 363.
- Miao, D., He, B., Karaplis, A. C., & Goltzman, D. (2002). Parathyroid hormone is essential for normal fetal bone formation. *The Journal of Clinical Investigation*, 109(9), 1173–1182. <https://doi.org/10.1172/JCI14817>
- Michels, F., & De, S. L. (2001). Osseous overgrowth in congenital amputations of the upper limb: Report of 3 cases treated with autologous stump plasty. *Acta Orthopaedica Belgica*, 67(5), 452–455.
- Mookhtiar, K. A., & Van Wart, H. E. (1992). Clostridium histolyticum collagenases: A new look at some old enzymes. *Matrix (Stuttgart, Germany). Supplement, 1*, 116–126.
- Nenda, M. M., Lewicki, M., & Mandalunis, P. M. (2016). Histomorphometry of the tibia and mandible of healthy female Wistar rats at different stages of growth. *Experimental Animals*, 65(2), 109–116. <https://doi.org/10.1538/expanim.15-0069>
- Nilsson, A., Lindahl, A., Edén, S., & Isaksson, O. G. (1989). Demonstration of growth hormone receptors in cultured rat epiphyseal chondrocytes by specific binding of growth hormone and immunohistochemistry. *The Journal of Endocrinology*, 122(1), 69–77. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1220069>
- Nouth, F., & Kuo, L. A. (2004). Percutaneous Epiphysiodesis Using Transphyseal Screws (PETS): Prospective Case Study and Review. *Journal of Pediatric Orthopaedics*, 24(6), 721.
- Ogawa, T., Yamagiwa, H., Hayami, T., Liu, Z., Huang, K.-Y., Tokunaga, K., Murai, T., & Endo, N. (2002). Human PTH (1-34) induces longitudinal bone growth in rats. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 20(2), 83–90. <https://doi.org/10.1007/s007740200011>

- O’Keefe, R. J., Puzas, J. E., Brand, J. S., & Rosier, R. N. (1988). Effects of transforming growth factor-beta on matrix synthesis by chick growth plate chondrocytes. *Endocrinology*, *122*(6), 2953–2961. <https://doi.org/10.1210/endo-122-6-2953>
- O’Neal, M. L., Bahner, R., Ganey, T. M., & Ogden, J. A. (1996). Osseous overgrowth after amputation in adolescents and children. *Journal of Pediatric Orthopedics*, *16*(1), 78–84. <https://doi.org/10.1097/00004694-199601000-00016>
- O’Rahilly, R., Gardner, E., & Gray, D. J. (1956). The Ectodermal Thickening and Ridge in the Limbs of Staged Human Embryos<sup>1</sup>. *Development*, *4*(3), 254–264. <https://doi.org/10.1242/dev.4.3.254>
- Paley, D. (2002). *Principles of Deformity Correction*. Springer Science & Business Media.
- Pasquali-Ronchetti, I., Fornieri, C., Baccarani-Contri, M., & Quaglino, D. (1995). Ultrastructure of elastin. *Ciba Foundation Symposium*, *192*, 31–42; discussion 42-50.
- Pauling, L., & Corey, R. B. (1951). The Structure of Fibrous Proteins of the Collagen-Gelatin Group. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *37*(5), 272–281.
- Pedrozo, H. A., Schwartz, Z., Gomez, R., Ornoy, A., Xin-Sheng, W., Dallas, S. L., Bonewald, L. F., Dean, D. D., & Boyan, B. D. (1998). Growth plate chondrocytes store latent transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1 in their matrix through latent TGF- $\beta$ 1 binding protein-1. *Journal of Cellular Physiology*, *177*(2), 343–354. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(199811\)177:2<343::AID-JCP16>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199811)177:2<343::AID-JCP16>3.0.CO;2-A)
- Pellicore, R. J., Sciora, J., Lambert, C. N., & Hamilton, R. C. (1974). Incidence of bone overgrowth in the juvenile amputee population. *Interclin Inform Bull*, *13*, 1–8.
- Percival, S. L., McCarty, S., Hunt, J. A., & Woods, E. J. (2014). The effects of pH on wound healing, biofilms, and antimicrobial efficacy. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, *22*(2), 174–186. <https://doi.org/10.1111/wrr.12125>
- Pfeil, J., Marquardt, E., Holtz, T., Niethard, F. U., Schneider, E., & Carstens, C. (1991). The stump capping procedure to prevent or treat terminal osseous overgrowth. *Prosthetics and Orthotics International*, *15*(2), 96–99. <https://doi.org/10.3109/03093649109164641>
- Phemister, D. B. (1950). [Epiphysiodesis for equalizing the length of the lower

- extremities and for correcting other deformities of the skeleton]. *Memoires. Academie De Chirurgie (France)*, 76(26–27), 758–763.
- Ramachandran, G. N., & Kartha, G. (1954). Structure of collagen. *Nature*, 174(4423), 269–270. <https://doi.org/10.1038/174269c0>
- Ramachandran, G. N., & Kartha, G. (1955). Structure of collagen. *Nature*, 176(4482), 593–595. <https://doi.org/10.1038/176593a0>
- Ranvier, L. (1873). Quelques faits relatifs au developpement du tissu osseux. *Comptes Rend Acad Sci*, 77, 1105–1109. Scopus.
- Reppe, S., Rian, E., Jemtland, R., Olstad, O. K., Gautvik, V. T., & Gautvik, K. M. (2000). Sox-4 messenger RNA is expressed in the embryonic growth plate and regulated via the parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor in osteoblast-like cells. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 15(12), 2402–2412. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2000.15.12.2402>
- Rich, A., & Crick, F. H. (1955). The structure of collagen. *Nature*, 176(4489), 915–916. <https://doi.org/10.1038/176915a0>
- Rich, A., & Crick, F. H. (1961). The molecular structure of collagen. *Journal of Molecular Biology*, 3, 483–506. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(61\)80016-8](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(61)80016-8)
- Rich, A., & Crick, F. H. C. (2018). The structure of collagen. In *The Excitement of Discovery: Selected Papers of Alexander Rich: Vol. Volume 11* (pp. 103–104). WORLD SCIENTIFIC. [https://doi.org/10.1142/9789813272682\\_0010](https://doi.org/10.1142/9789813272682_0010)
- Robertson, W. W. (1990). Newest knowledge of the growth plate. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 253, 270–278.
- Robling, A. G., Duijvelaar, K. M., Gevers, J. V., Ohashi, N., & Turner, C. H. (2001). Modulation of appositional and longitudinal bone growth in the rat ulna by applied static and dynamic force. *Bone*, 29(2), 105–113. [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(01\)00488-4](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(01)00488-4)
- Rosier, R. N., O’Keefe, R. J., Crabb, I. D., & Puzas, J. E. (1989). Transforming growth factor beta: An autocrine regulator of chondrocytes. *Connective Tissue Research*, 20(1–4), 295–301. <https://doi.org/10.3109/03008208909023900>
- ROSS, R. (1973). THE ELASTIC FIBER A REVIEW. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 21(3), 199–208. <https://doi.org/10.1177/21.3.199>

- Saal, F. V. (1939). EPIPHYSIODESIS COMBINED WITH AMPUTATION. *JBJS*, 21(2), 442.
- Sabatino, G., Tito, B. D., Bassett, P., Tharia, H., & Hitchcock, A. (2007). *Compositions and methods for treating collagen-mediated diseases* (United States Patent No. US20070224183A1). <https://patents.google.com/patent/US20070224183A1/en>
- Schollmeier, G., Uhthoff, H. K., Lewandrowski, K. U., & Fukuhara, K. (1999). Role of bone bark during growth in width of tubular bones. A study in human fetuses. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 367, 291–299.
- Sergerie, K., Lacoursière, M.-O., Lévesque, M., & Villemure, I. (2009). Mechanical properties of the porcine growth plate and its three zones from unconfined compression tests. *Journal of Biomechanics*, 42(4), 510–516. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2008.11.026>
- Serra, R., Karaplis, A., & Sohn, P. (1999). Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP)-dependent and -independent effects of transforming growth factor beta (TGF-beta) on endochondral bone formation. *The Journal of Cell Biology*, 145(4), 783–794. <https://doi.org/10.1083/jcb.145.4.783>
- Seyedin, S. M., Thompson, A. Y., Bentz, H., Rosen, D. M., McPherson, J. M., Conti, A., Siegel, N. R., Galluppi, G. R., & Piez, K. A. (1986). Cartilage-inducing factor-A. Apparent identity to transforming growth factor-beta. *Journal of Biological Chemistry*, 261(13), 5693–5695. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)38436-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)38436-3)
- Shapiro, F., Holtrop, M. E., & Glimcher, M. J. (1977). Organization and cellular biology of the perichondrial ossification groove of ranvier: A morphological study in rabbits. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 59(6), 703–723.
- Silberberg, M. S., & Silberberg, R. (1971). *Skeletal growth and ageing*. Ciba-Geigy.
- Silberberg, M., & Silberberg, R. (1956). CHAPTER XX - STEROID HORMONES AND BONE  
 From the Department of Pathology, Washington University, School of Medicine, St. Louis, and the Snodgras Laboratory, Hospital Division, City of St. Louis, Missouri, U.S.A.  
 The preparation of this chapter was aided by Research Grant PHS A-22 from the National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases of the National Institutes of Health, Public Health Service. In G. H. Bourne (Ed.), *The Biochemistry and Physiology of Bone* (pp. 623–670). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4832-3286-7.50024-5>

- Sinha, R., Weigl, D., Mercado, E., Becker, T., Kedem, P., & Bar-On, E. (2018). Eight-plate epiphysiodesis: Are we creating an intra-articular deformity? *The Bone & Joint Journal*, *100-B*(8), 1112–1116. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.100B8.BJJ-2017-1206.R3>
- Speer, D. P. (1981). The pathogenesis of amputation stump overgrowth. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, *159*, 294–307.
- Speer, D. P. (1982). Collagenous architecture of the growth plate and perichondrial ossification groove. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, *64*(3), 399–407.
- Sporn, M. B., & Roberts, A. B. (1989). Transforming Growth Factor— $\beta$ : Multiple Actions and Potential Clinical Applications. *JAMA*, *262*(7), 938–941. <https://doi.org/10.1001/jama.1989.03430070086036>
- Stanitski, C. L. (1997). Pediatric and adolescent sports injuries. *Clinics in Sports Medicine*, *16*(4), 613–633. [https://doi.org/10.1016/s0278-5919\(05\)70045-4](https://doi.org/10.1016/s0278-5919(05)70045-4)
- Stokes, I. A., Burwell, R. G., & Dangerfield, P. H. (2006). Biomechanical spinal growth modulation and progressive adolescent scoliosis – a test of the “vicious cycle” pathogenetic hypothesis: Summary of an electronic focus group debate of the IBSE. *Scoliosis*, *1*, 16. <https://doi.org/10.1186/1748-7161-1-16>
- Streeter, G. L. (1949). Developmental horizons in human embryos; a review of the histogenesis of cartilage and bone. *Contributions to Embryology*, *33*(213–221), 149–168.
- Sussman, B. J. (1971). Experimental intervertebral discolysis. A critique of collagenase and chymopapain applications. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, *80*, 181–190.
- Sussman, B. J., & Mann, M. (1969). Experimental intervertebral discolysis with collagenase. *Journal of Neurosurgery*, *31*(6), 628–635. <https://doi.org/10.3171/jns.1969.31.6.0628>
- Takeuchi, S. (2000). [Morphological transformation of limb bones with growth]. *Kaibogaku Zasshi. Journal of Anatomy*, *75*(2), 207–214.
- Tanner JM. (1981). *Auxologia. Dal feto all'uomo: La crescita fisica dal concepimento alla maturità*. Tipografica Torinese.
- Tanner JM, Whitehouse RH, Cameron N. (1990). *Valutazione della maturazione scheletrica e predizione dell'età adulta*. Martinucci Pubblicazioni Mediche.

- Tenholder, M., Davids, J. R., Gruber, H. E., & Blackhurst, D. W. (2004). Surgical management of juvenile amputation overgrowth with a synthetic cap. *Journal of Pediatric Orthopedics*, *24*(2), 218–226. <https://doi.org/10.1097/00004694-200403000-00016>
- Terkeltaub, R., Lotz, M., Johnson, K., Deng, D., Hashimoto, S., Goldring, M. B., Burton, D., & Deftos, L. J. (1998). Parathyroid hormone-related proteins is abundant in osteoarthritic cartilage, and the parathyroid hormone-related protein 1-173 isoform is selectively induced by transforming growth factor beta in articular chondrocytes and suppresses generation of extracellular inorganic pyrophosphate. *Arthritis and Rheumatism*, *41*(12), 2152–2164. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(199812\)41:12<2152::AID-ART10>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1529-0131(199812)41:12<2152::AID-ART10>3.0.CO;2-X)
- Thomas, A., & Bayat, A. (2010). The emerging role of *Clostridium histolyticum* collagenase in the treatment of Dupuytren disease. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, *6*, 557. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S8591>
- Trippel, S. B. (1995). Growth factor actions on articular cartilage. *The Journal of Rheumatology. Supplement*, *43*, 129–132.
- Trippel, S. B., Van Wyk, J. J., & Mankin, H. J. (1986). Localization of somatomedin-C binding to bovine growth-plate chondrocytes in situ. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, *68*(6), 897–903.
- Trueta, J., & Morgan, J. D. (1960). The vascular contribution to osteogenesis. I. Studies by the injection method. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, *42-B*, 97–109. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.42B1.97>
- Twal, W. O., Vasilatos-Younken, R., Gay, C. V., & Leach, R. M. (1994). Isolation and localization of basic fibroblast growth factor-immunoreactive substance in the epiphyseal growth plate. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, *9*(11), 1737–1744. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650091110>
- Ueki, M., Tanaka, N., Tanimoto, K., Nishio, C., Honda, K., Lin, Y.-Y., Tanne, Y., Ohkuma, S., Kamiya, T., Tanaka, E., & Tanne, K. (2008). The effect of mechanical loading on the metabolism of growth plate chondrocytes. *Annals of Biomedical Engineering*, *36*(5), 793–800. <https://doi.org/10.1007/s10439-008-9462-7>
- Urist, M. R., Huo, Y. K., Brownell, A. G., Hohl, W. M., Buyske, J., Lietze, A., Tempst,

- P., Hunkapiller, M., & DeLange, R. J. (1984). Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *81*(2), 371–375. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.2.371>
- Valteau, B., Grimard, G., Londono, I., Moldovan, F., & Villemure, I. (2011). In vivo dynamic bone growth modulation is less detrimental but as effective as static growth modulation. *Bone*, *49*(5), 996–1004. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.07.008>
- van Beuningen, H. M., van der Kraan, P. M., Arntz, O. J., & van den Berg, W. B. (1993). Protection from interleukin 1 induced destruction of articular cartilage by transforming growth factor beta: Studies in anatomically intact cartilage in vitro and in vivo. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *52*(3), 185–191. <https://doi.org/10.1136/ard.52.3.185>
- van der Eerden, B. C., Karperien, M., Gevers, E. F., Löwik, C. W., & Wit, J. M. (2000). Expression of Indian hedgehog, parathyroid hormone-related protein, and their receptors in the postnatal growth plate of the rat: Evidence for a locally acting growth restraining feedback loop after birth. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, *15*(6), 1045–1055. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2000.15.6.1045>
- van der Kraan, P. M., Vitters, E. L., & van den Berg, W. B. (1992). Inhibition of proteoglycan synthesis by transforming growth factor beta in anatomically intact articular cartilage of murine patellae. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *51*(5), 643–647. <https://doi.org/10.1136/ard.51.5.643>
- van Kampen, G. P., Veldhuijzen, J. P., Kuijjer, R., van de Stadt, R. J., & Schipper, C. A. (1985). Cartilage response to mechanical force in high-density chondrocyte cultures. *Arthritis and Rheumatism*, *28*(4), 419–424. <https://doi.org/10.1002/art.1780280410>
- Van Wart, H. E., & Steinbrink, D. R. (1985). Complementary substrate specificities of class I and class II collagenases from *Clostridium histolyticum*. *Biochemistry*, *24*(23), 6520–6526. <https://doi.org/10.1021/bi00344a032>
- Van Wyk, J. J., Russell, W. E., & Li, C. H. (1984). Synthetic somatomedin C: Comparison with natural hormone isolated from human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *81*(3), 740–742.
- Villemure, I., & Stokes, I. A. F. (2009). Growth plate mechanics and mechanobiology. A survey of present understanding. *Journal of Biomechanics*, *42*(12), 1793–1803.



<https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2009.05.021>

Vocke, A. K., & Schmid, A. (2000). Osseous overgrowth after post-traumatic amputation of the lower extremity in childhood. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, *120*(7–8), 452–454. <https://doi.org/10.1007/s004029900128>

Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Segre, G. V., Kronenberg, H. M., & Tabin, C. J. (1996). Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science (New York, N.Y.)*, *273*(5275), 613–622. <https://doi.org/10.1126/science.273.5275.613>

Walker, K. V., & Kember, N. F. (1972). Cell kinetics of growth cartilage in the rat tibia. II. Measurements during ageing. *Cell and Tissue Kinetics*, *5*(5), 409–419. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1972.tb00379.x>

Wang, X., Ma, J., Wang, Y., & He, B. (2002). Bone repair in radii and tibias of rabbits with phosphorylated chitosan reinforced calcium phosphate cements. *Biomaterials*, *23*(21), 4167–4176. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(02\)00153-9](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(02)00153-9)

Warrell, E., & Taylor, J. F. (1979). The role of periosteal tension in the growth of long bones. *Journal of Anatomy*, *128*(Pt 1), 179–184.

Watanabe, K. (2004). Collagenolytic proteases from bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *63*(5), 520–526. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1442-0>

Weinmayer, H., Breen, A. B., Steen, H., & Horn, J. (2022). Angular deformities after percutaneous epiphysiodesis for leg length discrepancy. *Journal of Children's Orthopaedics*, *16*(5), 401–408. <https://doi.org/10.1177/18632521221115059>

WHITE, J. W., & STUBBINS, S. G., Jr. (1944). GROWTH ARREST FOR EQUALIZING LEG LENGTHS. *Journal of the American Medical Association*, *126*(18), 1146–1149. <https://doi.org/10.1001/jama.1944.02850530024006>

Wiemann, J. M. I., Tryon, C., & Szalay, E. A. (2009). Physeal Stapling Versus 8-plate Hemiepiphysiodesis for Guided Correction of Angular Deformity about the Knee. *Journal of Pediatric Orthopaedics*, *29*(5), 481. <https://doi.org/10.1097/BPO.0b013e3181aa24a8>

William Walter Greulich, S. Idell Pyle. (1959). *Radiographic Atlas of Skeletal Development of the Hand and Wrist*. Stanford Univ Pr.

Wozney, J. M., Rosen, V., Celeste, A. J., Mitsock, L. M., Whitters, M. J., Kriz, R. W., Hewick, R. M., & Wang, E. A. (1988). Novel regulators of bone formation: Molecular

clones and activities. *Science (New York, N.Y.)*, 242(4885), 1528–1534.  
<https://doi.org/10.1126/science.3201241>

Yavuzer, R., Latifoglu, O., Ayhan, M., Edali, N., Çelik, B., & Atabay, K. (1997). Enhanced wound healing using collagenase in guinea pig. *Gazi Medical Journal*, 8(3).  
<https://avesis.gazi.edu.tr/yayin/7311b41f-480a-4cda-b2e9-3f548f70da98/enhanced-wound-healing-using-collagenase-in-guinea-pig>

Zajonz, D., Schumann, E., Wojan, M., Kübler, F. B., Josten, C., Bühligen, U., & Heyde, C. E. (2017). Treatment of genu valgum in children by means of temporary hemiepiphysiodesis using eight-plates: Short-term findings. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 18, 456. <https://doi.org/10.1186/s12891-017-1823-7>