

LA NOSTRA ESPERIENZA NELL'USO DI MATERIALI BIO-INGEGNERIZZATI

F. DA RIN

Istituti Codivilla-Putti, Cortina

Our experience with the bio-engineering tissue

SUMMARY

The Authors take cue from their experience to bring the descriptive aspects of the various bio-engineering products in the reconstruction of the bone, in the losses of substance, in the results of infections and in the reconstruction of the cutaneous mantle. In the case of the bone we realized the combination of BMP associated to gel of autologous plaques and to autologous bone, withdrawn usually from the iliac wing. In some cases, then, we dress the part again with a membrane of jaluronic acid that has periosteum-similar properties. In the case of the skin, we use a sample of autologous skin that has been elaborated in the laboratory, building the derma (Hyalograft 3D) and the epidermis (Laserskin). The results have been satisfactory for the reconstruction of the bone both as its bio-compatible structures and for the biomechanical aspect. The epidermis has given us so much problems, in the reconstruction of the cutaneous mantle, that we recently have replaced the part with the Hyalomatrix (jaluronic component) that induces the formation of granulation tissue that is valid for autologous skin graft. The authors bring some clinical cases. Riv Chir Mano 2006; 3: 393-399

KEY WORDS

Bone, skin, bio-engineering tissues

RIASSUNTO

Gli Autori riportano la loro esperienza dei vari prodotti bio-ingegnerizzati utilizzati nella ricostruzione dell'osso, nella perdita di sostanza, nel risultato di infezioni e nella ricostruzione del mantello cutaneo. Nel caso dell'osso è stata realizzata la combinazione di BMP associato a gel piastrinico e osso autologo, di solito prelevato dalla cresta iliaca. In alcuni casi, poi, la parte è stata rivestita con una membrana di acido ialuronico che ha proprietà periostio-simili. Nel caso della cute è stato utilizzato un campione di cute autologo, elaborato in laboratorio, costruito da derma (Hyalograft 3D) e epidermide (Laserskin). Per la ricostruzione dell'osso i risultati sono stati soddisfacenti sia per quanto riguarda la sua struttura biocompatibile sia per l'aspetto biomeccanico. Le epidermidi hanno dato così tanti problemi, nella ricostruzione del mantello cutaneo, che recentemente la parte è stata rimpiazzata con Hyalomatrix (componente jaluronic) che favorisce la formazione di tessuto di granulazione, valido per l'innesto autologo di cute. L'Autore riporta alcuni casi clinici.

PAROLE CHIAVE

Osso, cute, materiali bio-ingegnerizzati

Alla fine degli anni 90 ci fu un grosso incremento nella ricerca di prodotti che aiutassero la formazione tissutale, senza dover ricorrere ai tessuti au-

tologhi, che per il momento restano ancora da preferirsi nel trattamento delle perdite di sostanza. Anche in campo ortopedico, l'interesse si è rivolto

verso l'acquisizione di informazioni atte all'applicazione di strategie nuove nella prevenzione, diagnosi e terapia delle perdite di sostanza tessutale. Questo nuovo approccio si è evoluto nell'applicazione dei principi dell'ingegneria tessutale, termine che definisce un campo interdisciplinare di ricerca in cui i principi dell'ingegneria e delle scienze di base sono utilizzati al fine di sviluppare sostituti biologici in grado di riparare, rigenerare o migliorare la funzione di un tessuto. Tessuti che negli ultimi tempi, stanno dando affidabilità, sicurezza e ottimi risultati soprattutto per quel che riguarda la tollerabilità.

La formazione di **tessuto osseo**, resta ancora un problema aperto, le pseudoartrosi, non sono ancora state debellate e le perdite di sostanza hanno portato all'utilizzo, all'inizio di tessuto autologo, poi a tessuto di banca, infine a sostanze osteoproliferative.

Per il trattamento delle patologie settiche fu di grandissimo aiuto l'introduzione, negli anni 80, della metodica di Ilizarov, che ci ha permesso ricostruzioni di ossa lunghe fino a 35 cm.

Di recente abbiamo iniziato la colmatatura ossea con questi prodotti che associati ad altri inducono la formazione di osso.

La struttura ossea normale si compone di una parte inorganica (55%) ed una componente organica (27%) (sostanza fondamentale, componente solubile).

La prima è data da:

- fosfato tricalcico 75% presente sotto forma di cristalli di idrossiapatite (HA)
- carbonato di calcio 10%
- fosfato disodico 2,5%
- citrato di calcio 2%
- altri

La componente organica è data da:

- fibre di collagene
- substrato cellulare

Quindi nella rigenerazione ossea si è cercato di ridare oltre alla funzione biomeccanica, anche una ristrutturazione, soprattutto iniziale biologica consistente nella osteoinduzione, osteoconduzione, osteogenesi e integrità strutturale, per giungere ad un osso valido.

L'osteoiduzione indica il fenomeno in cui si osserva una mitogenesi da parte di cellule mesenchi-

mali indifferenziate perivascolari che porta alla formazione di cellule osteoprogenitrici con la capacità di formare osso nuovo, da considerare che la matrice ossea demineralizzata è osteoinduttiva.

Agenti osteoinduttivi sono:

- Bone morphogenic proteins (BMP)
- Growth factors (GFs) che inquadriamo meglio quando parleremo del gel piastrinico)

Ma queste sostanze non riescono a formare osso se usate da sole, hanno cioè bisogno di un substrato che veicoli l'attività biomolecolare e il substrato inorganico del tessuto osseo ha queste caratteristiche.

L'osteconduzione è il processo di crescita neoangiogenica e osteoprogenica dal letto recipiente fino alla formazione di osso. Un processo dove la parte introdotta funge come uno "scaffold" per l'integrazione e formazione del nuovo osso.

L'osteogenesi è invece, l'insieme di tutti quei fenomeni che danno al nuovo tessuto la capacità di indurre una crescita ossea.

La bio-ingegneria ha suddiviso i vari componenti dell'osso ed analizzato i meccanismi e le parti preponderanti atte alla formazione del tessuto che presenta tutte le caratteristiche di un osso normale, per funzione e per sede.

Quindi si è creato un substrato o "scaffold", sul quale dovranno agire le varie componenti, come i fattori di crescita e le cellule proposte alla formazione del tessuto.

Gli scaffolds sono matrici di varia natura fisica e/o biochimica, atti a sostituire temporaneamente segmenti ossei mancanti, le cui caratteristiche sono:

- Essere bio-compatibili.
- Non alterare i fenomeni bio-chimici ambientali sia localmente che sistemico.
- Indurre una corretta crescita del tessuto.
- Avere una porosità tale da essere invasi dalle cellule e dai vasi.
- Favorire una differenziazione delle cellule totipotenti.
- Avere una certa maneggevolezza.
- Avere una certa proprietà biomeccanica.
- Biodegradabilità venire cioè sostituiti ed integrati dal tessuto neoformato.
- Esistono scaffolds cellulari e acellulari, nella

nostra esperienza abbiamo usato solo scaffold acellulari come l'osso demineralizzato (DBM) e l'acido ialuronico.

DBM è la matrice ossea demineralizzata, liofilizzata e priva di cellule con potere osteoconduttivo. Scoperto da Marshall Urist a metà degli anni 60, si ottiene per demineralizzazione, in ambiente acido, della matrice extra-cellulare dell'osso corticale delle ossa lunghe e contiene oltre 16 BMP+collagene.

Questo componente d'osso liofilizzato è composto da DBM, fissato su un carrier biologico termoplastico, non idrosolubile e confezionato in siringhe da 1cc e 5cc. La DBM, essendo così più permeabile, lascia migrare le BMP e le cellule mesenchimali indifferenziate attratte dall'innesto (chemiotassi), che vengono stimolate a proliferare e a differenziarsi in cellule ossee.

Le BMP (*Bone Morphogenic Proteins*), importanti fattori di crescita, sono contenute all'interno del DBM e ve ne sono state riconosciute circa 16, tra le quali sono state molto ben documentate la BMP-7 (OP-1) prodotta isolatamente dalla Stryker Biotech con metodica del DNA ricombinante umano (rhOP-1) e la BMP-2. L'importanza di avere un "pool" di proteine morfogenetiche invece di una sola (OP1; rhBMP7; In-Fuse; rhBMP2), sta proprio nella loro interazione durante il processo a cascata della riparazione ossea, infatti si è visto che le BMP2 e 7 sono fattori differenzianti, ma scarsamente mitogeni. La DBM, che contiene tutte le proteine morfogenetiche in proporzioni fisiologiche, ha un duplice e differenziato effetto di induzione e di divisione cellulare.

La DBM viene, da noi, associato al *gel piastrinico (PG)* con i suoi granuli piastrinici alfa che contengono oltre a proteine plasmatiche e fattori della coagulazione, tutti i GFs (growth factors) che si ritengono mediatori della riparazione e rigenerazione ossea, associato, talvolta a osso autologo prelevato dalla cresta iliaca che è stato frammentato e che si presenta ricco di cellule staminali precursori delle cellule dell'osso per combinare sia i fattori di crescita (attivatori) che le cellule e le strutture ossee (recettori).

I fattori di crescita GPS-system vengono ricavati dai granuli alfa delle piastrine ed i componenti che

maggiormente interferiscono con la riparazione ossea sono i seguenti:

- PDGF- $\beta\beta$ / $\alpha\alpha$ / $\alpha\beta$ *Platelet Derived Growth Factor*: che agiscono sugli osteoblasti con un'azione di replicazione cellulare inoltre stimolano la formazione di nuovi vasi sanguigni, interazioni-regolazione di altri fattori di crescita facilitandone il loro influsso sulle cellule bersaglio
- TGF- β 1 e β 2 *Transforming Growth Factor Beta*: che agiscono sugli osteoblasti con azioni di stimolazione e/o di inibizione e attrazione sulle cellule ossee, connettivo ecc.
- VEGF *Vascular Endothelial Growth Factor*: stimolano la neo-angiogenesi.
- EGF *Epithelial Growth Factor*: stimolazione delle cellule mesenchimali ed epiteliali.
- IGF I e II *Insuline Growth Factor*: incremento degli osteoblasti (cellule rigeneratrici dell'osso), stimolazione della deposizione di osso, attività sui precursori degli osteoblasti.

Questi fattori, da soli non riescono a rigenerare l'osso, ma associate a citochine e altri mediatori biologici inducono la mitogenesi di cellule staminali e osteoprogenitrici, non solo nella formazione di tessuto osseo ma anche endoteliale determinando la formazione di una rete capillare (angiogenesi).

Il TGF regola la proliferazione e la moltiplicazione di numerosi tipi di cellule (mesenchimali, fibroblasti, endoteliali, condrali, e cellule osteoprogenitrici) è attivo nel processo di formazione della matrice ossea influenzando gli osteoblasti a produrre matrice durante il processo di osteogenesi.

Tutti questi elementi vengono mescolati tra loro e applicati direttamente sul focolaio.

La produzione del PG viene effettuata presso il nostro Servizio Trasfusionale dell'Ospedale

S. Martino di Belluno, utilizzando emocomponenti autologhi raccolti con diverse metodologie. Il PG è un nuovo emocomponente che risulta dalla attivazione del mix di due emocomponenti tradizionali: 1) *concentrato piastrinico*, 2) *crioprecipitato*. Il concentrato piastrinico è fonte di fattori di crescita e il crioprecipitato di fibrinogeno, fibronectina e altri fattori procoagulanti base per la formazione della colla di fibrina[40c]. L'attivazione del mix

mediante la batroxobina (enzima simil-trombinico ad attività procoagulante) in presenza di calcio cloruro (o gluconato) determina la formazione di un gel costituito da colla di fibrina (CDF) e aggregato piastrinico. La presenza di CDF, oltre che apportare proteine della matrice come la fibronectina aumenta la plasticità e malleabilità del PG che risulta così facilmente manipolabile in funzione alle esigenze pratiche di applicazione (ulcere, tessuto osseo). Il mix può essere aliquotato sterilmente e conservato a -40° in forma di lisato di piastrine, sospese in crioprecipitato e utilizzato in differita per applicazioni successive.

La raccolta degli emocomponenti necessari per produrre il PG viene effettuata sostanzialmente con due modalità:

- 1) classico prelievo in sacca quadrupla di 450 mL di sangue intero con successiva separazione di plasma povero e concentrato piastrinico;
- 2) mediante prelievo multicomponente (piastrine concentrate e plasma povero) con separatore cellulare. Il plasma ottenuto segue l'iter per la produzione del crioprecipitato che verrà il giorno successivo miscelato a pari volume con il concentrato piastrinico ottenuto. Per motivi clinici e pratici (tempi e modalità operative, standardizzazione del metodo, restituzione degli eritrociti post separazione e vincoli per il paziente) ultimamente viene preferito il prelievo mediante separatore cellulare. Il separatore cellulare utilizzato (Hemonetics MCS+) permette in seduta unica di ottenere emocomponenti di partenza che soddisfano qualitativamente e quantitativamente il target per la produzione del PG. La possibilità di preim-

postare alcuni parametri permette di governare la seduta di prelievo in modo da ottenere le caratteristiche ricercate degli emocomponenti.

Quindi il separatore cellulare permette di ottenere in 30 minuti circa, concentrati piastrinici a elevata resa tale che, anche dopo miscelazione con crioprecipitato conservano una concentrazione di PLT sopra il livello di efficacia, nel range 1-1,5 milioni di elementi piastrinici per microlitro. L'elevata concentrazione di PLT rende possibile calibrare i volumi in funzione delle aree da trattare ed alle eventuali aliquote da stoccare per applicazioni successive (con riduzioni dei costi). La raccolta con separatore cellulare inoltre riduce ad un tempo unico il prelievo, con minor disagio per il paziente/donatore e minore perdita di tempo tecnico ed infermieristico. La formazione del PG (attivato con le modalità descritte) avviene nello spazio di 4-5 minuti (Fig. 1).

L'acido ialuronico (*Hyalonect*[®]) si è visto che non ha solo la funzione di scaffold ma ha proprietà periostio-simili (Fig. 2).

Venne isolato per la prima volta nel 1934 da Karl Meyer e da John Palmer, dal corpo vitreo dell'occhio di un bovino, trovarono due frazioni saccaridiche, una delle quali era acido ironico e pertanto proposero il nome di acido ialuronico da ialoide (vitreo) + acido ironico (HyA).

L'HyA influenza direttamente le funzioni cellulari mediante il legame a specifiche proteine dette ialalderine. È stato ampiamente dimostrato, inoltre che l'HyA favorisce la formazione di nuove anse capillari (neo-angiogenesi), non solo, ma induce la formazione di un tessuto condrogenico che innesca un processo di sostituzione endocondrale con formazione di tessuto osseo.



Figura 1. Preparazione del gel piastrinico in sala operatoria utilizzando le sacche prelevate dal paziente (autologhe) e agghiungendo il calcio cloruro portando alla formazione del gel.

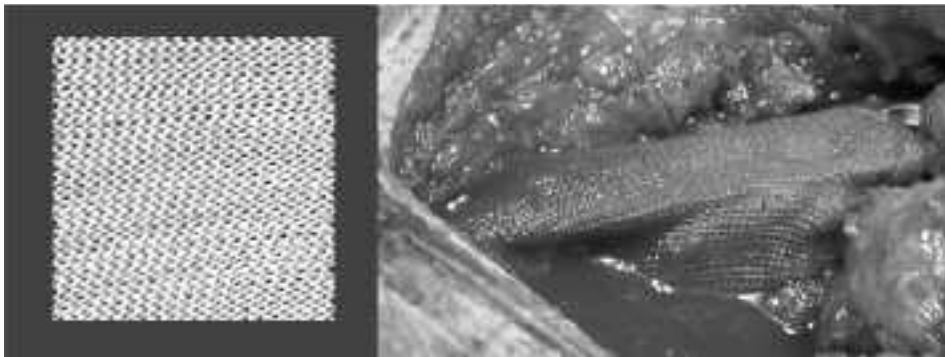


Figura 2. A sinistra la membrana di acido ialuronico e a destra la sua applicazione.



Figura 3. La formazione del composto dato dal gel piastrinico, osso autologo e DBM



Ma in natura l'HyA viene rapidamente degradato, non è, quindi, stabile; presenta ridotte proprietà visco-elastiche e non è malleabile, pertanto hanno realizzato, con opportune modifiche chimico-fisiche, un biomateriale più utile all'applicazione chirurgica, senza, per altro, alterarne le proprietà biologiche della molecola originale.

Infatti è stato creato un simil-tessuto per la copertura della zona di pseudoartrosi, si può suturare (Hyalonect®) ed è stato usato come scaffold (supporto 3D) per l'ingegneria dei tessuti (Laserskin e Hyalograft®). In questo ultimo caso si tratta di realizzare un prodotto bio-ingegneristico che vada a creare la pelle.

La nostra esperienza si è quindi portata ad utilizzare questi prodotti a seconda delle nostre esigenze, nel trattamento delle forme settiche.

Nel caso di una perdita di sostanza ossea, settica,

il nostro primo pensiero è rivolto alla bonifica del focolaio, cosa che eseguiamo da molti anni, ormai, facendo una pulizia chirurgica approfondita e applicando uno spaziatore antibiotato. Solo dopo essere sicuri che abbiamo risolto l'infezione, trasformandola in una pseudoartrosi asettica applichiamo il rigenerante osseo così composto, dopo aver rimosso lo spacer, in media dopo 45-60 giorni:

- Pappa d'osso associato a gel piastrinico e ad un prelievo osteo-cellulare dalla cresta iliaca, questo composto viene posizionato all'interno del gap osseo il tutto, una volta stabilizzato il focolaio viene rivestito da una membrana di acido ialuronico (Figg. 3, 4).

La nostra esperienza si fonda su 18 casi sia di arto superiore che inferiore trattati dal 2003 al 2005 con un follow up medio di circa 1 anno e che hanno portato ad una risoluzione del focolaio settico con la sua stabilizzazione in media dopo 6 mesi dall'applicazione del composto osteorigenerante.

Un altro problema con il quale ci troviamo di fronte quando affrontiamo le patologie settiche è la perdita di sostanza cutanea che si attua generalmente utilizzando lembi locali di rotazione, peduncolati, o microchirurgici, ma nei casi in cui sia presente una buona condizione di vascolarizzazione locale o dove l'area non è molto vasta abbiamo utilizzato la struttura bio-ingegnerizzata di cute.

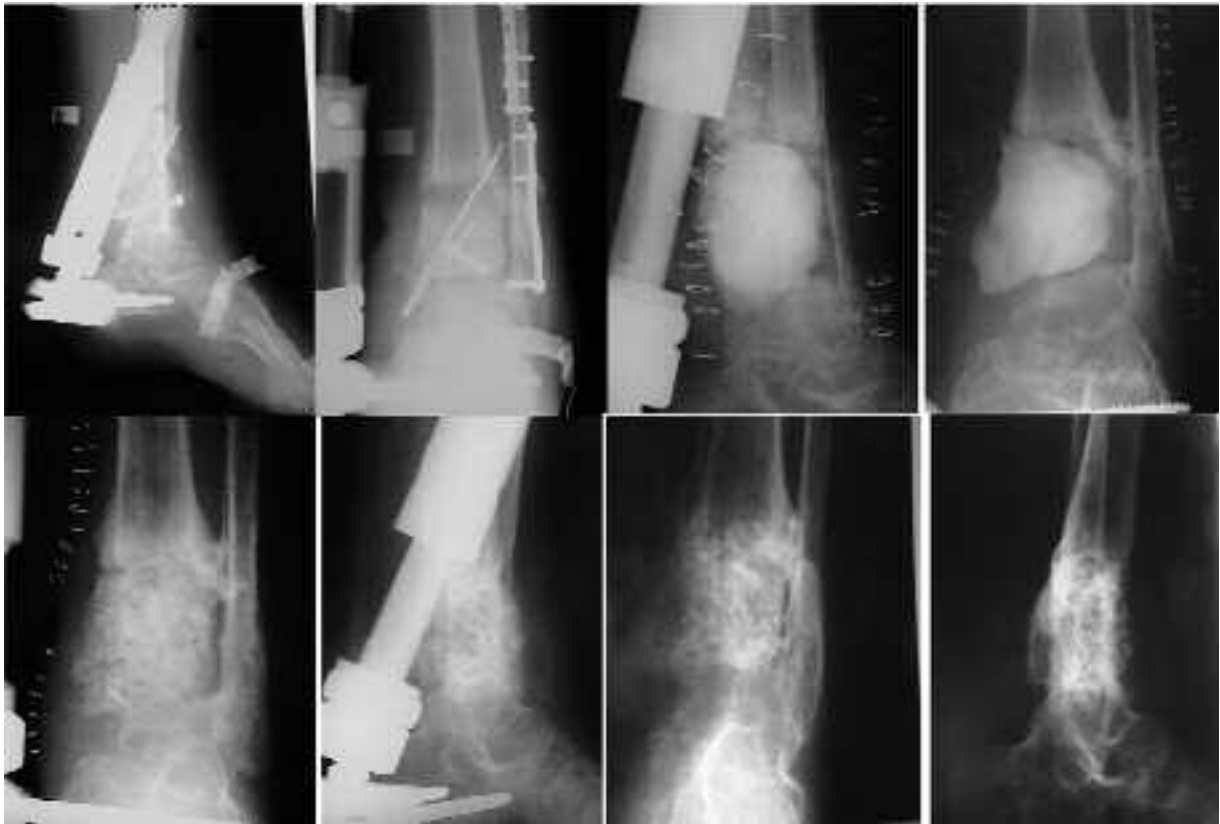


Figura 4. *Aspetto radiografico che evidenzia il trattamento completo di una forma settica a partire dalla bonifica del focolaio, applicazione di uno spaziatore antibiotato e sua fissazione, quindi la rimozione dello spacer e sostituzione con composto di gel piastrinico, osso autologo morcellizzato e pappa d'osso.*

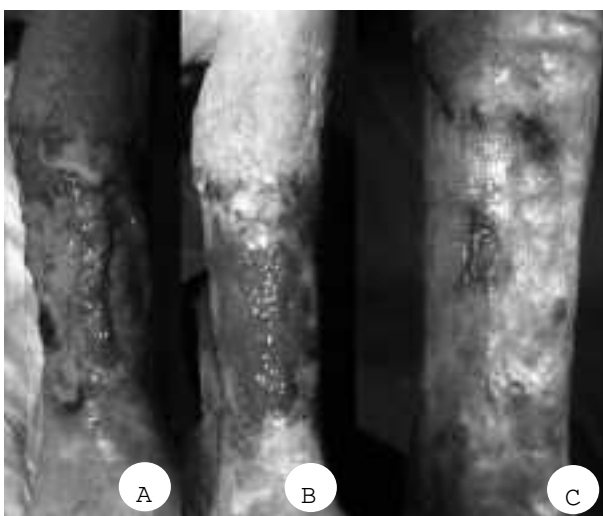


Figura 5. *Trattamento con derma e epidermide bio-ingegnerizzata. A) all'inizio del trattamento; B) con Hyalograft 3D®, risultato dopo 8 giorni; C) il risultato dopo 40 giorni dall'applicazione di Laserskin®.*

Si esegue infatti un prelievo di cute autologo, che viene inviato ad un laboratorio specializzato, il quale come primo atto separa il derma dall'epidermide. Usando come scaffold l'HyA si prepara uno strato di cheratinociti che porta alla realizzazione dell'epidermide (laserskin) mentre per creare il derma si utilizzano i fibroblasti (hyalograft 3D). I risultati sono stati più lunghi, come tempi, ma soddisfacenti come risultato (Fig. 5).

Un dato osservato fin da subito all'inizio del trattamento è stata la scomparsa del dolore e la possibilità di applicare in un'area piccola la pellicola di derma direttamente sull'osso favorendone la sua granulazione.

Concludendo si può affermare con tutta certezza che la bio-ingegneria sta facendo passi da gigante, la strada è stata aperta per il realizzo di scaffolds su misura, in rapporto alla perdita di sostanza, soprattutto ossea, che viene rivestito di cellule staminali,

ricreando perfettamente la parte mancante, vi è già l'esperienza di una ricostruzione completa di mandibola usando questo metodo, inoltre per quanto riguarda il trattamento delle infezioni dell'osso, la realizzazione di scaffold antibiotati. Ciò porterà a non prelevare tessuti dal paziente nel ricostruire le ampie perdite di sostanza e chissà che non si arrivi a ricostruire degli organi perfettamente funzionanti e compatibili.

BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

1. Patrj L. Fibrin glue-antibiotic mixture in the treatment of anal fistulae: experience with 69 cases. *Dig Surg* 2000; 17 (1): 77-80.
2. Marx RE. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral and Maxillofac surgery* 1998; 5 (6).
3. Featherstone C. Fibrin sealants for haemostasis and drug delivery. *Lancet* 1997; 349 (9048): 334-8.
4. Zimmermann R. Different preparation methods to obtain platelet component as a source of growth factors for local application. *Transfusion* 2001; 41: 1217-24.
5. Wozney JM. Different type of BMP. *Cellular and Molecular Biology of Bone* 1993.
6. Bertagnoli R. Osteoinductive bone regeneration substance Colloss in spinal fusion. *Eur Spine J* 2002; 11: 189-90.