

Ruolo dei fattori di crescita autologhi nella chirurgia ossea ricostruttiva

Autologous growth factors utility in reconstructive bone surgery

R. Aldegheri
P. Dupplicato
S. Agostini
I. Ferro¹
M. De Gironcoli¹
M. Franchini¹

RIASSUNTO

Introduzione. Il trattamento ricostruttivo della perdita di sostanza ossea e quello della mancata consolidazione delle fratture richiedono quasi sempre un apporto biologico mediante trapianto osseo, autologo od omologo. L'indicazione è diventata molto frequente e la quantità d'osso necessaria è sempre maggiore. Una possibilità sostitutiva potrebbe essere, secondo gli Autori, l'innesto locale di fattori di crescita autologhi (AGF) che abbiano attività osteoinduttiva.

Materiali e metodi. Nel periodo compreso fra ottobre 2001 e maggio 2002 sono stati utilizzati 14 volte gli AGF in associazione con idrossiapatite granulare d'origine corallina (ProOsteon 500 R) per indicazioni e sedi ossee differenti. Sono state trattate 8 perdite di sostanza (5 tibie, 1 omero, 1 acetabolo, 1 femore), 4 difetti iliaci periprotetici, un difetto femorale periprotetico, un ritardo di consolidazione tibiale. Sono stati operati 11 pazienti, otto femmine e tre maschi, che avevano l'età media di 36 anni (minimo 15, massimo 69). Gli AGF sono stati ricavati mediante degranulazione del concentrato piastrinico preparato 24 ore prima dell'intervento. Il gel piastrinico è stato innestato assieme ai granuli d'idrossiapatite. Sono stati valutati parametri clinici e radiografici.

Risultati. L'integrazione è stata totale in tutti i casi; non si sono verificati fenomeni generali e locali di intolleranza biologica e clinica; nessun paziente ha necessitato di emotrasfusioni; non ci sono state complicazioni intraoperatorie o perioperatorie o post-operatorie. In tutte le sedi d'innesto il controllo radiologico ha mostrato il progressivo incremento della reazione ossea riparativa ed il ripristino della architettura scheletrica fra i tre ed i sei mesi postoperatori.

Conclusioni. Lo studio ha dimostrato che il composto utilizzato, autologo e chimico, associando l'attività osteoinduttiva degli AGF e quella osteoconduttiva del Pro-Osteon 500 R, può avere un ruolo sostitutivo al trapianto osseo, in particolare nelle sedi scheletriche a prevalente contenuto spugnoso.

Parole chiave: fattori di crescita, ricostruzione ossea, idrossiapatite

SUMMARY

Background. The reconstructive treatment of bone loss and post-traumatic problems of bone consolidation almost always needs autologous or homologous bone graft as a biological enhancement. The evenience is becoming always more frequent and the quantity of bone loss always larger. An alternative possibility could be the local use of osteoinductive autologous factors.

Clinica Ortopedica, Università di Verona

¹ Servizio di Immunoematologia e Trasfusione, Azienda Ospedaliera di Verona

Indirizzo per la corrispondenza:

Prof. R. Aldegheri
Clinica Ortopedica
Policlinico Borgo Roma, 37120 Verona
Tel.: 045-8074471

Ricevuto il 20 settembre 2002
Accettato il 10 ottobre 2002

Materials and methods. In the period between October 2001 and May 2002 autologous growth factors (AGF) in association with granular coralline hydroxyapatite (ProOsteon 500 R) was used 14 times in different anatomical sites and with different indications. Eight bone loss (5 tibia, one humerus, one acetabulum, one femur), 4 periprosthetic iliac bone loss, one periprosthetic femoral bone loss, one pseudoarthrosis in tibia were treated. Eleven patients were treated: 8 women and 3 men, average age 36 years-old (range 15-69).

Methods. AGF are obtained by degranulation of patient's platelets, blood is drawn 24 hours before surgical treatment. Platelet gel was used in association with hydroxyapatite. The evaluation was based on clinical and x-ray parameters.

Results. The integration of the graft was complete in every case; we didn't have general or local problems due to biological intolerance; none of the patient needed blood transfusion; we didn't have intraoperative, perioperative or postoperative complications. In every anatomical site the x-ray check with a follow up between 3 and 9 months shown a progressive improvement of the osteoblastic reaction and a restore of skeletal architecture.

Conclusions. The study demonstrated that the compound used, autologous and chemical at the same time, associating the osteoinductive activity of AGF and osteoconductive activity of ProOsteon 500 R, can substitute bone graft mostly in skeletal site with prevalence of cancellous bone.

Key-words: *growth factors, bone reconstruction, hydroxyapatite*

INTRODUZIONE

La chirurgia osteoarticolare ricostruttiva necessita spesso d'un tempo operatorio per ottenere il riempimento di cavità ossee o di tratti diafisari, e per raggiungere l'unione dei monconi di fratture complesse o dei loro postumi. Questo avviene in tutti i casi di perdita di sostanza ossea, negli allungamenti ossei quando l'osteogenesi distrazionale non è adeguata, in certe fratture che non riescono a consolidare spontaneamente, nelle revisioni delle protesi; può succedere anche nelle artrodesi vertebrali per favorire la fusione ossea ed abbreviarne il tempo di guarigione. Le possibilità terapeutiche attualmente utilizzate, condivise da tutti i chirurghi, sono il trapianto autologo di osso

cortico-spongioso ed il trapianto omologo di osso conservato. Sono metodiche standardizzate che assicurano risultati prevedibili e conosciuti; ma sono complesse e non sono prive di morbidità, legata all'atto del prelievo autologo e alle problematiche connesse all'uso di tessuto omologo. Pur conservando inalterate validità ed indicazioni del trapianto osseo, alcuni Autori hanno però enfatizzato i risultati ottenuti con l'uso di preparati chimici innestati localmente da soli o associati a tessuto osseo autologo^{1,2}. Altri Autori hanno pubblicato i risultati delle loro esperienze evidenziando l'utilità dei fattori autologhi di crescita (AGF) innestati nella colonna vertebrale in associazione al trapianto autologo cortico-spongioso³. Recentemente studi di altri ricercatori e di chirurghi sono rivolti all'uso dei sostituti ossei, integrati da cellule staminali⁴⁻⁸.

L'interesse della ricerca ortopedica nel campo dell'ingegneria tessutale deriva dalla necessità che noi chirurghi abbiamo di trattare lesioni complicate dalla difficoltà di consolidazione e dalla perdita di sostanza ossea. La ricostruzione delle ossa lunghe che oggi si ottiene con relativa facilità per mezzo della tecnica del trasporto osseo⁹, la diffusione dell'allungamento chirurgico degli arti e della ri-protesi dell'anca, l'estensione della chirurgia conservativa nell'oncologia scheletrica, sono tutte tecniche chirurgiche nelle quali il risultato è in relazione alla possibilità di ricostituire la massa ossea mancante. Constatando la frequenza di queste patologie e la limitata disponibilità d'osso autologo e la difficoltà di disporre osso di banca, da tempo cerchiamo possibilità alternative al trapianto autologo ed omologo. Specificatamente vorremmo disporre di tecniche chirurgiche semplici, facili da eseguire e fattibili in qualsiasi sede ospedaliera, con le quali ottenere il risultato desiderato senza dover aggiungere ulteriori fattori di rischio a patologie, in molti casi già molto complesse.

È sulla base di questi presupposti che abbiamo utilizzato i fattori di crescita autologhi¹⁰ in associazione ad idrossiapatite, in una serie di pazienti adulti affetti da quadri anatomo-patologici riferibili a quelli in oggetto. La ricerca bibliografica che abbiamo condotto ha evidenziato delle esperienze fatte nella fusione vertebrale sempre in associazione a frammenti di osso autologo cortico-spongioso. Non sono riportate invece pubblicazioni relative all'azione dei fattori autologhi di crescita innestati da soli senza l'aggiunta di tessuto osseo. L'obiettivo del nostro studio è stato quello di testare la loro capacità osteo-genetica associandoli alla idrossiapatite per verificare se pos-

sono avere un ruolo sostitutivo al trapianto osseo nella chirurgia ricostruttiva osteoarticolare.

MATERIALI E METODI

Nel periodo compreso fra ottobre 2001 ed aprile 2002 abbiamo applicato 14 volte i fattori di crescita autologhi (AGF) insieme ad idrossiapatite (HA). Le sedi ossee innestate, le cause del difetto osseo, la quantità di HA impiegata ed il follow-up sono riportati nella Tabella I. I pazienti operati sono stati undici; tre di essi sono stati trattati in due sedi; 8 erano femmine e 3 maschi, con età media al momento dell'intervento di 37 anni (minimo 15 e massimo 69). In tutti i casi è stato eseguito controllo clinico e radiografico perioperatorio e postoperatorio trimestrale. Sono stati esclusi da questo studio altri pazienti che avevano lo stesso difetto osseo ma avevano caratteristiche non previste dal protocollo: età inferiore ai 14 anni, peso corporeo inferiore a 40 kg, condizioni generali precarie, piastrinemia inferiore a 200.000/ μ l.

Tecnica chirurgica

L'intervento si è svolto in due tempi: 1) preparazione del concentrato piastrinico contenente i fattori di crescita ¹¹ estratti dal sangue del paziente eseguita presso gli ambulatori del Servizio Trasfusionale del Policlinico di Verona; 2) applicazione del gel piastrinico in associazione all'idrossiapatite effettuata nelle sale operatorie della Clinica Ortopedia del Policlinico di Verona.

Preparazione dei fattori. Il paziente selezionato è stato sottoposto a salasso ematico di 450 ml raccolto in sacca quadrupla, 24 ore prima dell'intervento. Mediante una prima centrifugazione (2400 r.p.m. per 5') venivano separati i globuli rossi subito reinfusi dal sopranatante plasma. Per mezzo della centrifugazione del plasma (3900 r.p.m. per 7') venivano separati 10 ml di concentrato piastrinico, poi conservato a +22°C, da 8 ml di crioprecipitato proteico ottenuto per sifonamento (congelamento -80°C e scongelamento +4°), poi conservato a -32°C.

Idrossiapatite. In tutti i casi è stata utilizzata idrossiapatite in granuli, di derivazione corallina, con porosità di 500 millimicron (Pro-Osteon 500 R), conservata in flaconi da 15 cc o da 30 cc, sterilizzati a raggi gamma.

Estrazione dei fattori. Il processo di gelificazione è stato realizzato sempre in sala operatoria con asepsi rigorosa, al momento dell'innesto. Avevamo due sacche non sterilizzate, una contenente il concentrato piastrinico liquido e

l'altra il crioprecipitato proteico, scongelato 60' prima presso il Servizio Trasfusionale. In una siringa venivano aspirati 5 ml di concentrato piastrinico e 2 cl di crioprecipitato. Per catalizzatori della reazione mancante abbiamo usato 0,5 ml di calcio cloruro ed 1ml di enzima simil-trombinico ad attività pro-coagulante (botropase), ambedue aspirati nella medesima siringa assieme ad 1-2 ml di aria. Il contenuto veniva agitato 6-8 volte e lasciato riposare in capsula sterile per circa 15', al termine dei quali diventava sostanza gelatinosa di colore giallastro, del volume di circa 8 cc (gel piastrinico).

Applicazione. I granuli di idrossiapatite venivano posti dentro una capsula sterile insieme al concentrato piastrinico ed al crioprecipitato proteico ancora in fase liquida e si attendeva che la gelificazione la incorporasse formando una massa unica. Generalmente dopo 15' il gel piastrinico era completamente assorbito dai granuli diventando così facilmente modellabile, pronto per essere impiantato nella sede del difetto osseo.

Descrizione dei casi

Caso n. 1. P. sottoposto a trasporto osseo disto-prossimale della tibia dopo resezione di 6 cm per osteomielite da inchiodamento. Poiché il punto di contatto fra i monconi non dimostrava segni di consolidazione, sono stati applicati AGF e HA in maniera circolare.

Caso n. 2. P. operata di correzione deformità con resezione di 5cm e trasporto alla tibia sinistra per osteodisplasia fibrosa. A causa dell'insufficiente osteogenesi del tratto allungato sono stati innestati AGF e HA.

Caso n. 3. P. operata di sintesi con fissatore esterno per frattura chiusa traversa della tibia destra. Per la mancanza di consolidazione sono stati applicati AGF e HA in maniera circolare.

Caso n. 4. P. operata di protesi totale non cementata per coxartrosi con displasia importante dell'acetabolo. Per non diminuire lo spessore del fondo e per applicare un cotile grande con inserto in ceramica sono stati innestati AGF e HA sul bordo iliaco (Fig. 1).

Caso n. 5. P. operato in urgenza di sintesi con fissatore esterno per frattura bifocale chiusa della tibia sinistra e successivamente operato di inchiodamento. Per il persistere della perdita di sostanza circolare nel focolaio distale della tibia sono stati innestati AGF e HA attraverso la via postero-laterale della gamba (Fig. 2).

Caso n. 6, Caso n. 7. P. operato di allungamento simultaneo del 18% delle due tibie. Poiché l'osteogenesi distrale non era sufficiente, sono stati inseriti AGF con



Fig. 1. Applicazione di AGF con HA per ampliare il tetto cotiloideo durante l'impianto della protesi in displasia congenita. Il controllo post-operatorio effettuato tre mesi dopo l'intervento mostra l'integrazione dell'innesto con l'osso ospite e l'allargamento del tetto (caso n. 4).

HA contemporaneamente nelle due tibie, senza rimuovere i fissatori esterni (Fig. 3).

Caso n. 8. P. acondroplasica sottoposta ad allungamento simultaneo del 48% degli omeri. Mentre quello sinistro è guarito spontaneamente in un tempo adeguato, quello destro non ha mostrato capacità di ossificazione durante la distrazione e nemmeno nei tre mesi successivi. Per questo motivo è stato rimosso il fissatore esterno, è stata applicata la placca e sono stati innestati AGF con HA (Fig. 4).

Caso n. 9, caso n. 12. P. affetta da artrite reumatoide, in trattamento da anni con cortisone. In ambedue le anche è stata applicata una protesi totale rivestita di Idrossiapatite

con intervallo di tre mesi. La protrusione acetabolare è stata corretta aumentando lo spessore del fondo per mezzo di AGF e HA.

Caso n. 10. P. operata all'anca sinistra per mobilizzazione asettica della protesi applicata dieci anni prima. Nella zona iliaca del difetto sono stati innestati AGF e HA, prima di applicare il cotile non cementato e fissato alla pelvi con tre viti (Fig. 5).

Caso n. 11. P. operata all'anca destra per la mobilizzazione asettica della protesi applicata cinque anni prima e già rioperata un anno prima. Nella zona metafisaria del femore sono stati innestati AGF e HA prima di inserire lo stelo

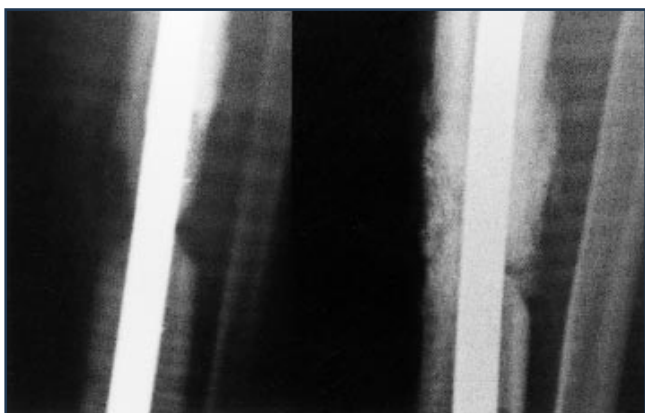


Fig. 3. Applicazione di AGF e HA nella tibia per insufficiente osteogenesi durante allungamento fatto con fissatore esterno. Il fissatore è stato rimosso dopo tre mesi. Nel controllo dei sei mesi si vede il tratto allungato completamente ricostruito ed il grado di radio-opacità dell'idrossiapatite è sovrapponibile a quello dell'osso ospite (caso n. 6).

Fig. 2. Applicazione circonferenziale di AGF e HA nella tibia. Il follow up a sei mesi evidenzia il riempimento della perdita di sostanza senza zone di riassorbimento (caso n. 5).





Fig. 5. Riempimento del difetto iliaco con AGF e HA durante il reimpianto della protesi effettuato per la mobilizzazione asettica. Il follow-up a sei mesi mostra la ricostruzione completa della zona peri-acetabolare (caso n. 10).

protesico lungo rivestito di idrossiapatite (Fig. 6).

Caso n. 12. P. del caso n. 9.

Caso n. 13. P. operata di protesi totale all'anca sinistra per malformazione congenita del femore. Dopo 12 mesi è stata ri-operata per mobilizzazione asettica del cotile. L'applicazione del nuovo cotile, rivestito di idrossiapatite e sintetizzato alla pelvi con tre viti, è stata associata all'innesto nel fondo di AGF con HA (Fig. 7).



Fig. 7. Applicazione di AGF e HA per aumentare lo spessore del fondo dell'acetabolo durante il reimpianto del cotile. La paziente era stata operata per deformità severa dell'anca associata ad accorciamento congenito del femore. Nei controlli dei sei e nove mesi si vede l'ottima osteointegrazione ottenuta (caso n. 13).

Fig. 4. Applicazione di AGF e HA nell'omero per mancata osteogenesi durante l'allungamento. È stato rimosso il fissatore esterno, applicata una placca e innestati i fattori di crescita. Nel controllo clinico dei sei mesi la placca mantiene perfettamente la stabilità. La ricostruzione dell'omero è soddisfacente ma incompleta nella zona centrale. Se il quadro radiologico non migliora ripeteremo il trattamento con 15 cc di Idrossiapatite applicandola con anestesia locale (caso n. 8).



Caso n. 14. P. sottoposto a resezione di 15 cm nella regione diafiso-metafisaria distale del femore sinistro a causa di osteomielite insorta dopo frattura esposta trattata con fissatore esterno. Il trapianto autologo di osso cortico-spongioso, effettuato tre mesi prima non era stato sufficiente alla ricostruzione completa. È stata effettuata sintesi con placca ed innesto di AGF con HA.

Fig. 6. Applicazione di AGF e HA nella metafisi femorale durante il reimpianto della protesi in una paziente affetta da malattia esostotica. Dopo sei mesi l'integrazione è totale (caso n. 11).



Parametri di valutazione

Per dedurre un giudizio obiettivo sull'effetto dell'uso locale degli AGF associati alla HA nei casi operati, ci siamo basati sulla valutazione clinica dei pazienti e sulla valutazione radiografica delle ossa innestate.

Valutazione clinica

Tutte le applicazioni fatte sono state controllate più volte: durante l'intervento, per valutarne il grado di complessità, il tempo necessario per l'esecuzione, le difficoltà tecniche e le possibili complicazioni; nel periodo post-operatorio (3 settimane), per valutare la cicatrizzazione della ferita e le condizioni generali del paziente correlabili all'innesto di idrossiapatite. Ht, Hb, GB con formula ed indici di flogosi sono stati eseguiti nell'immediato postoperatorio ed in corrispondenza del primo controllo radiografico.

Valutazione radiografica

Sono state eseguite radiografie standard in doppia proiezione nell'immediato post-operatorio e dopo tre mesi in tutti i casi, dopo sei mesi in altri sette casi e dopo nove mesi nei rimanenti tre casi (Tab. I).

RISULTATI*Risultati clinici*

La preparazione del gel piastrinico è un procedimento semplice, veloce, non doloroso, privo di complicazioni, ben tollerato da tutti i pazienti. L'attivazione dei fattori e la loro unione ai granuli di idrossiapatite ha richiesto l'impegno di un'unità dell'equipe chirurgica per un periodo di tempo medio di 15 minuti. La quantità di gel è stata la stessa in tutti i casi; quella dell'idrossiapatite è stata di 15 cc o di 30 cc in relazione alla superficie del difetto osseo. L'applicazione chirurgica è sempre stata agevole. Durante il periodo post-operatorio nessun paziente ha avuto episodi febbrili, manifestazioni flogistiche locali, processi settici locali, sintomi attribuibili all'introduzione nel corpo dei fattori autologhi di crescita e dell'idrossiapatite. La cicatrizzazione della ferita operatoria è avvenuta in tempi normali senza complicazioni dei margini. I pazienti operati all'arto inferiore non hanno mai rimandato l'inizio del carico. Al controllo dei tre mesi tutti gli operati deambulavano autonomi dando carico completo sull'arto operato; tutti erano in condizioni generali buone ed avevano normalità dei parametri emato-chimici studiati. Nessun paziente ha lamentato dolore e presentato segni di flogosi in atto.

Tab. I. Sono riportate le iniziali del cognome e del nome, l'età in anni, la sede anatomica dell'innesto, la causa del difetto, la quantità di ProOsteon R500 utilizzata, il follow up in mesi al momento della revisione dei 14 casi operati.

N.	Iniz.	Età	Sede innesto	Causa difetto	HA cc	Controllo
1	CGi	36	tibia/diafisi	trasporto osseo	15	3 mesi
2	LEa	15	tibia/diafisi	resezione	30	3 mesi
3	PSa	30	tibia/diafisi	frattura non consolidata	15	3 mesi
4	BLa	50	acetabolo	protesi con displasia del cotile	30	3 mesi
5	BGi	49	tibia/diafisi	perdita di sostanza	15	6 mesi
6	BMo	25	tibia/diafisi	allungamento	30	6 mesi
7	BMo	25	tibia/diafisi	allungamento	30	6 mesi
8	GEa	25	omero/diafisi	allungamento	30	6 mesi
9	GPa	21	acetabolo	protesi per artrite reumatoide	15	6 mesi
10	GGa	69	acetabolo	difetto periprotetico	30	6 mesi
11	CAa	60	femore/metafisi	difetto periprotetico	30	6 mesi
12	GPa	21	acetabolo	protesi per artrite reumatoide	15	9 mesi
13	NGa	28	acetabolo	difetto periprotetico	15	9 mesi
14	BGi	49	femore/diafisi	perdita di sostanza	45	9 mesi

Risultati radiografici

Il controllo radiografico post-operatorio ha dimostrato in tutti i casi che l'innesto era posizionato correttamente nella sede del difetto osseo, che aveva perduto quasi completamente l'aspetto granulare, che aveva una radio-opacità superiore a quella dell'osso ospite.

Al controllo effettuato dopo tre mesi, era evidente in tutte le sedi uno stadio avanzato di integrazione dell'idrossiapatite, una parziale dissoluzione della trama granulare e la diminuzione dell'opacità radiologica.

Al controllo dei sei mesi, nei casi n. 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 si è notata l'assenza di riassorbimento dell'innesto, la scomparsa completa dell'aspetto granulare, la persistenza di una lievissima differenza di radio-opacità rispetto all'osso ospite e la ricostruzione della normale struttura scheletrica. Particolarmente rilevante è stata la ricostruzione della normale anatomia loco-regionale raggiunta nei difetti periprotetici. Nei tre pazienti controllati a nove mesi (casi n. 12, 13, 14) era manifesta la corticalizzazione quasi completa dell'innesto.

DISCUSSIONE

Il ruolo svolto localmente dai fattori di crescita nella complessa serie di eventi che portano alla consolidazione ossea ed all'integrazione dei trapianti è conosciuto da almeno trent'anni per merito degli studi di Marshall Urist¹¹. È stata infatti proprio la sua scoperta della BMP (*Bone Morphogenetic Protein*)¹¹ a dare avvio agli studi sulla identificazione e sull'isolamento dei fattori di crescita che agiscono sull'osteogenesi mediante le loro proprietà chemiotattiche, mitogeniche, angiogenetiche e quelle favorevoli la differenziazione cellulare^{12,13}. Sono polipeptidi ad azione autocrina e paracrina, funzionano da trasmettitori cellulari in grado di influenzare la crescita e la differenziazione di molte linee cellulari. Quelli più attivi nell'osteogenesi sono PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*), TGF- β (*Transforming Growth Factor*), FGF (*Fibroblast Growth Factor*), IGF (*Insulin Like Growth Factor*) I e II, VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), EGF (*Epidermic Growth Factor*). Il fattore PDGF stimola la mitosi delle cellule staminali ed ha un importante effetto angiogenetico^{14,15}. Il TGF- β e FGF stimolano la proliferazione di fibroblasti e pro-osteoblasti e la loro differenziazione successiva in osteoblasti maturi¹⁶. Il fattore IGF I e II interviene in una fase più tardiva e stimola gli osteoblasti alla formazione delle trabecole

ossee. Il fattore VEGF stimola la proliferazione di cellule endoteliali favorendo in tal modo l'angiogenesi. Il fattore EGF stimola la proliferazione e differenziazione delle cellule costituenti l'epidermide. Tutti questi fattori di crescita hanno azione osteo-induttiva: stimolano la crescita e la maturazione delle cellule progenitrici di vasi e di tessuto osseo, ne incrementano la proliferazione e le attraggono verso l'osso ospite.

I fattori di crescita sono contenuti per la maggior parte nei granuli citoplasmatici delle piastrine e per il resto nei leucociti del sangue, come è stato dimostrato in vari modelli sperimentali sia *in vitro* che *in vivo*^{16,17}. Quando le piastrine giungono nella lesione ossea mediante la circolazione ematica, fisiologicamente degranulano e liberano i fattori la cui efficacia dovrebbe essere proporzionata alla loro concentrazione. Pertanto le piastrine sono la fonte degli AGF; maggiore è la loro concentrazione che si ottiene in laboratorio, maggiore è la quantità di fattori attivi disponibili. Il metodo della "doppia concentrazione" che abbiamo impiegato per la preparazione del gel piastrinico ha consentito di ottenere una concentrazione finale di piastrine di circa 1.000.000/ μ l, un incremento quindi della piastrinemia fisiologica del 500%.

Il crioprecipitato proteico contiene essenzialmente una quantità non definibile di Fattore VIII e Fattore XIII della coagulazione, di Fibrinogeno e di Fibronectina, una glicoproteina presente nella matrice extracellulare importante perché capace di mediare l'aggregazione con le cellule¹⁸. Mescolandolo al gel piastrinico si ottengono due obiettivi importanti: dare al composto la consistenza necessaria per poterlo modellare con le mani e fornire concentrazioni elevate di fibronectina.

Il gel piastrinico ed il crioprecipitato necessitano di un supporto per essere innestati e rimanere adesi all'osso ospite. Per questa funzione abbiamo preferito l'idrossiapatite granulare d'origine corallina, denominata Pro-Osteon 500 R; esiste esperienza pubblicata da Autori¹⁹, è usata fin dal 1982²⁰, è stata approvata dalla FDA. L'idrossiapatite corallina è un carbonato di calcio $10\text{CaCO}_3 + 6(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 + \text{H}_2\text{O}$ che diventa Idrossiapatite $10\text{Ca}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6 + 6(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3 + 4\text{H}_2\text{CO}_3$ per reazione idrotermica di ricambio. L'HA è il principale costituente minerale dell'osso e costituisce la struttura rigida portante immersa nella matrice. L'idrossiapatite Pro-Osteon è composta per il 15% da fosfato pentacalcico che fa da rivestimento esterno e per l'85% da carbonato di calcio; libera il fosfato pentacalcico in maniera graduale, così il riassorbimento completo

del carbonato di calcio avviene in sei mesi. L'HA costituisce il supporto solido per gli AGF e per i componenti del crioprecipitato, quindi l'impalcatura per la crescita di nuovo osso maturo. Per la sua struttura trabecolare e per la sua porosità di 500 millimicron, simile a quella dell'osso spugnoso umano, è predisposta ad essere riabilitata dagli osteoblasti che crescono sulla interfaccia idrossiapatite-osso ospite. Il Pro Osteon è quindi un materiale sostitutivo dell'osso con funzione osteo-conduttiva; associato ai fattori di crescita che hanno funzione osteo-induttiva forma localmente i presupposti più adatti per l'integrazione ed il rimodellamento nella formazione di nuovo osso maturo. Inoltre l'idrossiapatite è un prodotto di sintesi chimica e quindi ha il vantaggio di essere biologicamente inerte.

Il metodo che abbiamo impiegato utilizza non solo materiale inerte ma anche fattori di crescita liberati e attivati con procedimento autologo. Queste caratteristiche eliminano qualsiasi fattore di rischio inerente la trasmissione di malattie e reazioni immunogeniche che invece possono esserci quando si usa tessuto osseo omologo o si adottano preparazioni allogeniche o xenogeniche. Il trapianto omologo inoltre richiede una complessa procedura preparatoria.

L'applicazione chirurgica è stata semplice in tutti i casi, breve, non ha causato complicazioni nel periodo perioperatorio e nemmeno nel decorso clinico successivo. Non è così quando si effettua il trapianto d'osso autologo; l'intervento diventa più lungo per l'aggiunta del tempo necessario per il prelievo, il sanguinamento è sempre maggiore, il rischio d'infezione è aumentato, il dolore postoperatorio è più intenso, la quantità d'osso disponibile può essere insufficiente.

Se definiamo tempo di guarigione il periodo entro il quale l'immagine radiografica evidenzia la completa osteointegrazione dell'innesto e la ricostruzione della normale architettura scheletrica, possiamo affermare che il suo valore è compreso fra tre e sei mesi secondo la quantità del difetto, senza evidente relazione con la causa e con l'età del paziente.

In definitiva abbiamo conseguito il risultato in tutte le nostre applicazioni, con un tempo di guarigione non superiore a quello caratteristico del trapianto omologo di testa femorale e del trapianto autologo cortico-spugnoso, con un costo vantaggioso per il DRG, senza aver riscontrato difficoltà tecniche, inconvenienti, complicazioni.

CONCLUSIONI

L'analisi dei pochi casi operati ha dimostrato che i fattori autologhi di crescita addizionati all'idrossiapatite sono in grado di produrre osteo-formazione nelle perdite di sostanza, nei difetti ossei periprotetici dell'anca e nelle fratture diafisarie che non consolidano. L'idrossiapatite granulare d'origine corallina, denominata ProOsteon R 500 può considerarsi un materiale sostitutivo dell'osso con funzione osteo-conduttiva; associato ai fattori di crescita che hanno funzione osteo-induttiva forma localmente i presupposti più adatti per l'integrazione ed il rimodellamento nella formazione di nuovo osso maturo. La metodica di preparazione del gel piastrinico e l'applicazione del composto sono d'esecuzione facile e sono prive di rischi.

Il tempo necessario per l'osteointegrazione con l'osso ospite valutato nei controlli radiografici varia da tre a sei mesi ed è in relazione solamente alla superficie del difetto osseo.

I risultati ottenuti seguendo il nostro protocollo sono molto soddisfacenti, sulla base della valutazione clinica e di quella radiografica.

Seppur testata in un numero esiguo di pazienti e con follow-up inferiore ai 12 mesi, secondo noi questa metodica potrebbe diventare una valida alternativa al trapianto osseo autologo ed omologo nei difetti ossei; soprattutto se la struttura portante potesse avere capacità osteo-induttiva intrinseca.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Cohen M.S., Whitman K. *Calcium phosphate bone cement. The Norian skeletal repair system in orthopaedic surgery*. AORN J 1997;65:958-62.
- ² Lobenhoffer P, Gerich T, Witte F, Tscheme H. *Use of an injectable calcium phosphate bone cement in the treatment of tibial plateau fractures: a prospective study*. J Orthop Trauma Mar 2002;16:143-9.
- ³ Lowery GL, Kulkarni S, Pennisi AE. *Use of autologous growth factors in lumbar spine fusion*. Bone 1999;25:475-505.
- ⁴ DeFranco M, Mangano C, Fornara R, Piattelli A. *Fattori di crescita e biomateriali*. Milano: Masson 2000.
- ⁵ Schwartz C. *The use of synthetic bone substitutes: current status and future prospects*. Europ J Orthop Trauma 1999;9:157-60.
- ⁶ Heymann D, Passuti N. *Bone substitute: new concepts*. Europ J Orthop Trauma 1999;9:179-84.
- ⁷ Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutevov SM,

- Mukhachev V, Lavronkov A, et al. *Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells*. New Engl J Med 2001;344:385-6.
- ⁸ Kon E, Muraglia A, Corsi A, Bianco P, Marcacci M, Martin I, et al. *Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical size defects of sheep long bone*. J Biomed Mater Res 2000;49:328-37.
 - ⁹ Ilizarov GA, Ledyev VI. *The replacement of long tubular bone by lengthening distraction osteotomy for one of the fragments*. Clin Orthop 1992;280:7-10.
 - ¹⁰ Mohan S, Baylink DJ. *Bone growth factors*. Clin Orthop 1991;263:30-43.
 - ¹¹ Zimmermann R, Jakubietz R, Jakubietz M, Strasser E, Schlegel A, Wiltfang J, et al. *Different preparation methods to obtain platelet component as a source of growth factors for local application*. Transfusion 2001;41: 1217-24.
 - ¹² Marshall U. *The search for and discovery of bone morphogenetic protein*. Bone Grafts 1972;315-362.
 - ¹³ Caplan AI, Elyaderani M, Mochizuki Y, Wakitani S, Goldberg VM. *Principles of cartilage repair and regeneration*. Clin Orthop 1997;342:254-69.
 - ¹⁴ Caplan AI, Pechak DG. *The cellular and molecular embryology of bone formation*. Bone Miner Res 1987;5:117-84.
 - ¹⁵ Slater M, Patava J, Kingham K, Mason RS. *Involvement of platelets in stimulating osteogenic activity*. J Orthop Res 1995;13:655-663.
 - ¹⁶ Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. *Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1998;85:638-46.
 - ¹⁷ Canalis E, McCarthy TL, Centrella M. *Effect of PDGF on bone formation in vitro*. J Cell Phys 1989;140:530-7.
 - ¹⁸ Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, Miller DM, Sporn MB. *TGF β in human platelets*. J Biol Chem 1983;258:7155.
 - ¹⁹ Holmes R, Bucholz RW. *Coralline hydroxyapatite bone graft substitute: preliminary report of radiographic evolution*. Radiology 1986; 159:133-7.
 - ²⁰ Holmes R, Bucholz RW. *Porous hydroxyapatite as a bone graft substitute in metaphyseal defect*. Bone J 1982;6:904-11.

