Prefabbricazione su misura di un innesto osseo neovascolarizzato con camera cilindrica in idrossiapatite: studio sperimentale

Prefabrication of tailor-made neovascularized bone graft with hydroxiapatite chamber: an experimental study

L. Tarallo R. Adani I. Marcoccio A. Celli D. Zaffe¹

Dipartimento Misto delle Emergenze-urgenze, Clinica Ortopedica, Università di Modena e Reggio Emilia; ¹ Dipartimento di Scienze Morfologiche e Medico-legali, Sezione di Anatomia Umana, Università di Modena e Reggio Emilia

Indirizzo per la corrispondenza: Dott. R. Adani Clinica Ortopedica, Policlinico di Modena, via del Pozzo 71, Modena E-mail: adani.roberto@unimo.it

Ricevuto il 22 maggio 2003 Accettato il 25 marzo 2004

RIASSUNTO

Il concetto di prefabbricazione dei tessuti è divenuto in questi ultimi anni una realtà della chirurgia ricostruttiva. In un lavoro precedentemente svolto si è valutata la possibilità di creare un innesto osseo neovascolarizzato; il nuovo studio rappresenta l'evoluzione del precedente. Lo scopo è stato quello di creare un innesto osseo prefabbricato neovascolarizzato avvalendosi però, in questo caso di biomateriali come l'idrossiapatite per definirne forma e dimensioni prestabilite. Lo studio è stato condotto su conigli New Zealand suddivisi in tre gruppi. Nel gruppo A (5 animali) si è eseguito un prelievo di tessuto spongioso dalla cresta iliaca poi inserito in una camera di idrossiapatite di 15 mm di diametro richiudibile con due dischi, uno dei quali con un foro di 8 mm di diametro per consentire il passaggio del peduncolo vascolare. La spongiosa è stata miscelata con microparticelle di forma sferica di idrossiapatite. Il tutto è stato "neovascolarizzato" con l'arteria e la vena femorale superficiale del coniglio. Nel gruppo B (5 animali) sono state utilizzate, a differenza del precedente, solamente le microparticelle di idrossiapatite all'interno della camera. Infine nel gruppo C, di controllo, (3 animali) si è impiegata l'associazione di spongiosa e microparticelle di idrossiapatite senza però ricorrere all'impianto del peduncolo vascolare. Le camere di idrossiapatite, avvolte da un foglietto di silicone sono state posizionate in una "tasca" tra i muscoli della faccia mediale della coscia di ciascun animale. Gli animali sono stati sacrificati a distanza di 3 mesi dall'intervento chirurgico e i frammenti ossei sono stati fissati in paraformaldeide e poi in poli-metil-metacrilato a 4°C. Sezioni spesse e sottili di segmenti ossei sono state utilizzate per lo studio su microradiografie ed istologico al microscopio ottico, a luce ordinaria, polarizzata e fluorescente. Sono stati inoltre eseguiti studi e valutazioni al microscopio elettronico a scansione. Nel primo gruppo l'analisi delle sezioni istologiche ha evidenziato la neoformazione di un tessuto fibroso avvolgente sia l'idrossiapatite che l'osso, la presenza di osteociti vivi e di numerosi vasi neoformati. Nel secondo gruppo l'idrossiapatite è risultata avvolta da un tessuto connettivo con presenza di vasi neoformati nei pressi del peduncolo vascolare. Il terzo gruppo è stato caratterizzato da una completa assenza di tessuti neoformati. In conclusione l'involucro utilizzato permette di conferire all'impianto una forma prestabilita; i risultati dimostrano una volta di più la capacità dell'impianto vascolare di indurre la neovascolarizzazione e confermano le caratteristiche di osteoconduzione dell'idrossiapatite. Le camere di idrossiapatite si dimostrano un valido supporto nel tentativo di conferire all'impianto una forma "su misura".

Parole chiave: prefabbricazione-innesto osseo- camera di idrossiapatite

SUMMARY

In the recent years the principle of tissue prefabrication has become a reality in reconstructive surgery. The possibility of using a neovascularized bone graft was assessed in previous investigations and the present study is the evolution of the same research project. The aim was always to create a prefabricated neovascularized bone graft, but biomaterials, such as hidroxyapatite, were employed in order to obtain pre-defined shape and dimensions. Thirteen adult New Zealand white rabbits were used and divided into 3 groups: A (5 animals), B (5 animals) and C (3 controls). Cancellous bone graft was harvested from the iliac crest of Group A animals and inserted in a 15 mm diameter hydroxyapatite chamber to be closed with two disc: one of them had an 8 mm diameter hole to allow the insertion of the vascular pedicle. The cancellous bone graft was mixed with spherical hydroxyiapatite microparticles and vascular implantation of the superficial femoral artery and vein was then performed in the composite of the rabbit. The only different between Groups A and B was the use of hydroxyapatite microparticles alone inside the chamber implanted in Group B animals. Finally, the cancellous bone graft was mixed with hydroxyapatite microparticles in Group C animals (controls), but the vascular pedicle was not inserted. The hydroxyapatite chambers were wrapped in silicone envelope and always positioned in a "pocket" between the medial thigh muscle of each animal. The animals were sacrificed 3 months after surgery. Bone fragments were fixed first in paraformaldehyde and then in polymethylmethacrylate at 4 °C. Thick and thin section of bone segments were evaluated by microradiography and hystologically assessed with standard, polarized light and fluorescence optic microscopy. Additional studies were conducted using scanning electron microscopy. The analysis of Group A histologic section revealed the presence of newly-formed fibrous tissue surrounding both the hydroxyapatite chamber and bone, live osteocytes and several newly-formed vessels. In Group B, hydroxyapatite appeared to be surrounded by connective tissue, and newly-formed vessels were visible near the vascular pedicle. No newly-formed tissue was observed in controls. In conclusion, the type of wrapping selected makes it possible to pre-establish the implant shape. The current findings further confirm that the vascular implantation procedure can induce neovascularization and demonstrate the osteoconductive properties of hydroxyapatite. Hydroxyapatite chambers have been shown to be effective when trying to create a "tailor-made" implant.

Key words: prefabrication, bone graft, hydroxyapatite chamber

INTRODUZIONE

Il concetto di "prefabbricazione" dei tessuti a scopo ricostruttivo, è divenuto negli ultimi anni una realtà consolidata ¹⁻³. Lo scopo della prefabbricazione è quello di ottenere un lembo trasferibile (cutaneo, muscolare, osseo, composito) costruito con caratteristiche il più possibile vicine al difetto da colmare, diminuendo la morbidità al sito donatore e migliorando, in questo modo, l'efficacia ricostruttiva ⁴⁻⁸.

La neovascolarizzazione dell'osso ottenibile mediante l'impianto di un peduncolo vascolare risulta essere nota e ampiamente diffusa nella pratica clinica soprattutto nella rivascolarizzazione del semilunare nella malattia di Kienbock 9-11. Abbiamo precedentemente elaborato 12 13, come altri autori 14-17 un modello sperimentale per lo studio della neovascolarizzazione ossea inducibile mediante la procedura di impianto vascolare. Gli incoraggianti risultati ottenuti ci hanno indotto a proseguire in questa direzione: il nuovo studio rappresenta infatti l'evoluzione del precedente. Si è infatti valutato la possibilità di creare un innesto osseo prefabbricato di forma e dimensioni predeterminate utilizzando in parte il modello sperimentale precedente, avvalendosi però in questo caso di biomateriali come l'idrossiapatite per definirne forma e dimensione dell'innesto.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto su 13 conigli albini maschi adulti di ceppo New Zealand di 12 mesi di età e di peso compreso tra 4,5 e 5,5 kg. Sono state osservate tutte le normative riguardanti la sperimentazione su animali. Sono state utilizzate camere di idrossiapatite di 15 mm di diametro esterno e 12 di diametro interno e 15 mm di lunghezza richiudibili con 2 dischi di 500 µm di spessore ottenuti da tubi di idrossiapatite compatta e di cui uno con un foro centrale di 8 mm di diametro (Fig. 1A e B) per consentire il passaggio del peduncolo vascolare. Il disco forato era preoperatoriamente incollato alla camera di idrossiapatite utilizzando una colla apposita (Metacrilato Cyanocrilic). La procedura chirurgica è sempre stata eseguita in anestesia generale mediante "Ketamina/xilazina" e in condizioni di sterilità. I vasi femorali superficiali sono stati isolati a livello della coscia per circa 7 cm mantenendo un sottile strato connettivale areolare perivasale (Fig. 2A). La parte distale del peduncolo vascolare, una volta legata con Nylon 6/0, è stata inserita all'interno della camera di idrossiapatite attraverso il disco forato e successivamente avvolta da un foglietto di silicone al fine di isolare completamente il sistema (Fig. 2B). Un omogenea quantità di innesto osseo precedentemente prelevata dall'ala iliaca (circa 3 cm³) è stata utilizzata per riempire la camera; con cura si è frammentato il prelievo per per-



mettere un'adeguata distribuzione all'interno della camera privilegiando il tessuto spongioso rispetto a quello corticale (Fig. 2C). Il disco di copertura veniva incollato preoperatoriamente ad un disco di silicone delle medesime dimensioni; questo veniva infine fissato alla lamina di silicone avvolgente la camera di idrossiapatite (Fig. 2D). Tutto il sistema veniva poi fissato tra i muscoli mediali della coscia destra. Un trattamento antibiotico ad ampio spettro è stato utilizzato nei 3 giorni successivi all'intervento. I conigli sono stati divisi in tre gruppi secondo differenti modi di riempimento delle camere cilindriche e la presenza del peduncolo vascolare.

Gruppo A (OI): Osso spongioso + sferule di idrossiapatite + arteria e vena femorale superficiale (5 conigli);

Gruppo B (I): Sferule di idrossiapatite + arteria e vena femorale superficiale (5 conigli);

Gruppo C: Osso spongioso + sferule di idrossiapatite (3 conigli).

L'osso autologo è stato prelevato dall'ala iliaca, senza impiego di strumenti motorizzati per evitare possibili danni da calore. L'osso è stato poi mescolato (50:50) con un eguale volume di sferule di idrossiapatite (diametro 600-900 µm, Fin-ceramica s.r.l. Faenza RA, Italia). I conigli sono stati sacrificati a distanza di 3 mesi dall'intervento chirurgico. In tutti gli animali abbiamo effettuato intraoperatoriamente il test di pervietà dell'asse vascolare prima di prelevare le camere di idrossiapatite. Le camere contenenti il vaso e i sostituti ossei sono state fissate in paraformaldeide 4% in tampone fosfato 0.1 M PH 7.2 per 4 ore a temperatura ambiente. Successivamente le camere venivano immerse in Poli-Metil-Metacrilato (PMMA) a 4°C, senza alcun trattamento decalcificante. Sezioni spesse (200 µm, ottenute col microtomo a lama diamantata, poi portate per abrasione e lucidatura a 100 μm) e sottili (5 μm, ottenuto con microtomo a lama di tungsteno) dei segmenti ossei, sono state utilizzate per lo studio su microradiografie. Queste sezioni sono state microradiografate (microradiografia ad alto contrasto ed alta risoluzione) e analizzate al microscopio elettronico a scansione. Le sezioni sottili sono state colorate con Blu di Toluidina, Tricromia di Gomori e Rosso Congo.

RISULTATI

Tutti i conigli sono stati controllati a distanza di 3 mesi dall'intervento chirurgico. Al controllo clinico si rivelò pressoché costantemente una dislocazione delle camere rispet-



Fig. 2. Tecnica chirurgica: A) isolamento dell'arteria e vena femorale superficiale legate all'estremità distale; B) camera di idrossiapatite rivestita da un foglietto di silicone; C) camera di idrossiapatite avvolta dal foglietto di silicone con all'interno il peduncolo vascolare femorale superficiale (arteria e vena) e granuli di idrossiapatite; D) camera di idrossiapatite con il peduncolo vascolare rivestita dal foglietto in silicone e pronta per essere posizionata all'interno di una tasca muscolare.

to alla posizione originaria, probabilmente imputabile alle dimensioni della stessa. Dei 13 conigli sottoposti ad intervento chirurgico, 3 sono stati esclusi dallo studio istologico per problematiche legate al decorso post-operatorio. In un caso, appartenente al gruppo B, si è verificato un grave processo infettivo con conseguente esposizione della protesi e in altri due conigli (appartenenti al gruppo A e al C) non è stato possibile ritrovare la protesi. Questo ha determinato una riduzione del numero di camere di idrossiapatite disponibili per lo studio da 13 a 10, così suddivise 4 per il gruppo A, 4 per il gruppo B e 2 per il gruppo C. Quando a tre mesi di distanza le protesi sono state prelevate dagli animali, il silicone che le avvolgeva ha mostrato un sottile strato di tessuto fibroso connesso con il tessuto connettivo perivasale. Al controllo radiografico le camere di idrossiapatite appartenenti al gruppo C (osso spongioso + granuli di idrossiapatite) evidenziavano uno "scattering" cioè una disordinata distribuzione dell'osso autologo e dell'idrossiapatite, con ancora visibili le trabecole ossee a livello dell'osso autologo (Fig. 3A). Il gruppo B (granuli di idrossiapatite + peduncolo vascolare) mostrava invece un caratteristico assembramento di materiali attorno al peduncolo vascolare (Fig. 3B). Il gruppo A infine in cui era presente osso autologo, granuli di idrossiapatite + peduncolo vascolare, mostrava un equivalente ammassamento di materiali con evidente riassorbimento dell'osso spongioso autologo, non vi erano infatti a questo livello tracce delle trabecole ossee (Fig. 3C).



Fig. 3. Microradiografie: A) microradiografia della camera in idrossiapatite appartenente al gruppo di controllo: si nota lo "scattering" dei materiali e la presenza di trabecole ossee all'interno dell'osso autologo; B) microradiografia della camera in idrossiapatite appartenente al gruppo B: particolare della conglomerazione dei granuli di idrossiapatite attorno al peduncolo vascolare; C) microradiografia della camera di idrossiapatite appartenente al gruppo A: evidente l'assembramento dei materiali tra di loro, con una rilevante attività osteoclastica al livello dell'osso autologo. L'analisi delle sezioni istologiche relative al gruppo C con Tricromica di Gomori ha evidenziato una buona colorazione in blu dell'osso autologo, in bianco degli adipociti, (in quanto non trattengono il colorante), in verde delle fibre collagene ma nessuna colorazione delle cellule del midollo osseo, a dimostrazione di una completa morte cellulare all'interno di questo sistema biologico (Fig. 4A). Nel gruppo B dopo colorazione con Tricromica di Gomori, si è evidenziata una marcata impregnazione del connettivo perivasale attorno al peduncolo e alle sferule di idrossiapatite con presenza di una neoangiogenesi circonferenziale all'asse vascolare. Nel gruppo A, utilizzando la medesima metodica colorativa, si è rilevato una colorazione in blu dell'osso autologo ed in violetto dei nuclei di osteociti, a dimostrazione della loro vitalità (Fig. 4B). A livello del midollo osseo è risultata costantemente presente una grande quantità di cellule viventi e di vasi sanguigni neoformati contenenti cellule ematiche (Fig. 4C). Al fine di analizzare l'apposizione e il riassorbimento osseo sono state impiegate delle sezioni sottili al microtomo, analizzate poi con microradiografia a scansione; nel gruppo A erano presenti marcate attività erosive sia a carico dell'osso autologo che dei granuli di idrossiapatite (Fig. 5A). L'indagine istologica è stata completata mediante la colorazione denominata solocromo cianina + Rosso Congo; questa tecnica ha evidenziato osteoclasti in piena attività erosiva, colorati in violetto su un osso autologo e sulla parete esterna dei granuli di idrossiapatite (Fig. 4D). In alcune sezioni è risultato possibile isolare una minima ma significativa attività osteoblastica interessante sia l'osso autologo che l'idrossiapatite. Infine sempre grazie a studi di sezioni istologiche trattate con Blu di Toluidina si è individuato la presenza di osteoblasti "a colata" sulla parete dei granuli di idrossiapatite con lingue di osso neoformato tra i granuli di idrossiapatite stessa, protesi a formare una sorta di concatenazione del sistema biologico (Fig. 4E) (Fig. 5B).

DISCUSSIONE

I risultati hanno messo in evidenza diversi punti. L'importante dislocazione delle protesi in tutti i conigli è probabilmente da imputarsi alle dimensioni del sistema, soprattutto quando questa è riempita solamente con idrossiapatite. Sono tuttavia emersi alcuni punti di notevole interesse:

a) un mantenimento della vitalità cellulare solo in presenza del peduncolo vascolare;



b) un alto riassorbimento di osso autologo;

- c) una piccola ma valutabile, formazione ossea su osso autologo;
- d) l'erosione dell'idrossiapatite;
- e) la formazione di nuova sostanza ossea nelle sferule di idrossiapatite quando l'osso interviene agglomerando

le sferule di H.A. nelle protesi vascolarizzate.

L'uso di protesi con caratteristiche simili a quelle del minerale di cui è costituito l'osso, e il concomitante isolamento prodotto dall'involucro di silicone determinano una debole risposta biologica nell'animale da esperimento, che ha un metabolismo osseo molto elevato e un alta



capacità di assorbire biomateriali. L'involucro di idrossiapatite permette di conferire all'impianto una forma prestabilita, di "prefabbricare" innesti ossei vascolarizzati di forma preordinata¹⁴. Il foglietto di silicone avvolgente la camera di idrossiapatite è indispensabile al fine di escludere ogni apporto ematico dai tessuti circostanti e per permettere inoltre un più facile prelievo al momento dell'utilizzo clinico 12-13. I risultati hanno evidenziato una buona neoformazione di vasi a partire dall'asse centrale impiantato, neoformazione che appare limitata più dalla presenza di strutture ingombranti (sferule di idrossiapatite) che dalla impossibilità assoluta di un loro sviluppo. La presenza dei vasi neoformati significa ritrovare cellule capaci di rimaneggiare il tessuto osseo e di riformarne di nuovo, a differenza di un tessuto osseo non vascolarizzato che mantiene a lungo inalterata la sua struttura trabecolare essendo privo di cellule osteoblastiche e osteoclastiche.

L'attività osteoclastica di riassorbimento, sia sull'osso autologo che sulle sferule di idrossiapatite, è stata sicuramente maggiore rispetto a quella osteoblastica, probabilmente tutto ciò è attribuibile a due concetti di base: all'interno della protesi i biomateriali, cioè i granuli di idrossiapatite non sono fissi, soggetti pertanto ai movimenti dell'animale stesso. Questo determina che all'interno della protesi si vengono a creare delle condizioni di continuo rimaneggiamento dei granuli di idrossiapatite, che se da un lato facilita il riassorbimento osseo dall'altro ne ostacola parzialmente la neoformazione. Inoltre il diverso orientamento delle trabecole ossee, identificato all'esame istologico a luce polarizzata, è testimone di un alterato carico all'interno della protesi. All'interno di quest'ultima infatti non vi è il carico, di conseguenza anche le nuove linee di forza cui l'osso neoformato sempre si attiene, sono nettamente differenti, spiegando così come in loco di un osso a struttura trabecolare intrecciata si ritrovi osso neoformato con struttura lamellare lineare. Una riduzione della misura delle protesi di HA, ridurreb-

be il rischio di un'eventuale dislocazione; questo in associazione con l'uso di una colla biologica che riduce i movimenti dei biomateriali dentro la protesi, determinerebbe un miglioramento dei risultati fino ad ora ottenuti. In conclusione questo studio descrive un modello sperimentale in grado di combinare l'osso neovascolarizzato prefabbricato con l'uso dei biomateriali, al fine di ottenere innesti ossei di forma e dimensioni prestabilite. Riteniamo che la metodica chirurgica sperimentale studiata possa trovare, in futuro applicazioni in condizioni cliniche caratterizzate dalla necessità di ricostruire difetti ossei "particolari" come può talvolta avvenire nell'ambito della chirurgia dell'arto superiore. Un'ulteriore evoluzione dello studio potrà essere l'integrazione della tecnica chirurgica con quella bio-ingegneristica tramite l'utilizzo di linee cellulari in coltura come gli osteoblasti, i condrociti fino alle cellule staminali multipotenti abbinate ad impalcature costituite da polimeri sintetici biodegradabili e biocompatibili.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Upton J, Ferraro N, Healy G, Khouri R, Merrel C. *The use of prefabbricated fascial flaps for lining of the oral and nasal cavities.* Plast Reconstr Surg 1994;94:573-9.
- ² Cao Y, Vacanti JP, Paige KT, Upton J, Vacanti CA. Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to procedure tissue-engineered cartilage in the shape of

human ear. Plast Reconstr Surg 1997;100:297-304.

- ³ Isogai N, Landis W, Kim T, Gerstenfeld L, Upton J. Formation of phalanges and small joint by tissue-engineering. J Bone Joint Surg 1999;81A:306-16.
- ⁴ Hirasè Y, Valauri FA, Buncke HJ. Customized prefabbricated neovascularized free flaps. Microsurg 1987;8:218-24.
- ⁵ Hirasè Y, Valauri FA, Buncke HJ. Neovascularized free fat flaps: an experimental model. J Reconstr Microsurg 1988;4:197-201.
- ⁶ Hirasè Y, Valauri FA, Buncke HJ. Prefabbricated sensate myocutaneous and osteomyocutaneous free flaps:an experimental model. Preliminary report. Plast Reconstr Surg 1988;82:440-6.
- ⁷ Hirasè Y, Valauri FA, Buncke HJ. Neovascularized bone, muscle and myo-osseous free flaps: an experimental model. J Reconstr Microsurg 1988;4:209-15.
- ⁸ Hirasè Y, Valauri FA, Buncke HJ. Neovascularized free cutaneous cartilage flap transfer with microsurgical anastomosis: an experimental model in the rabbit. Ann Plast Surg 1988;81:342-7.
- ⁹ Hory Y, Tamai S, Okuda H, Sakamoto H, Takita T, Masuhara K. *Blood vessel transplantation to bone*. J Hand Surg 1979;4:23-33.

- ¹⁰ Guo JH. Vascular implantation into bone for aseptic necrosis of the lunate. Ann Plast Surg 1996;36:133-8.
- ¹¹ Gartsman GM, Weiland AJ, Moore JR, Randolph MA. *Blood* vessel implantation into ischemic bone. J Reconstr Microsurg 1985;1:215-22.
- ¹² Busa R, Adani R, Castagnetti C, Zaffe D, Mingione A. Innesti ossei neovascolarizzati. Studio sperimentale preliminare. Giornale Italiano di Ortopedia e Traumatologia 1998;25:525-35.
- ¹³ Busa R, Adani R, Castagnetti C, Zaffe D, Mingione A. *Neovascularized bone grafts:experimental investigation*. Microsurgery 1999;19: 289-95.
- ¹⁴ Mizumoto S, Inada Y, Weiland AJ. Fabbrication of vascularized bone grafts using ceramic chambers. J Reconstr Microsurg 1993;9:441-9.
- ¹⁵ Gill DR, Ireland DC, Hurley JV, Morrison WA. *The prefabbrication of a bone graft in a rat model*. J Hand Surg 1998;23A:312-21.
- ¹⁶ Kasashima T, Minami A, Kato H, Kaneda K. *Experimental study of vascularized bone grafts: hypertrophy of the grafted bone.* J Reconstr Microsurg 2000;16:121-8.
- ¹⁷ Celik M, Tuncer S, Emekli U, Kesim SN. *Histologic analysis of prefabbricated, vascularized bone grafts: an experimental study in rabbits.* J Oral Maxillofac Surg 2000;58:292-5.