

Storia ed evoluzione della banca dell'osso

History and evolution of bone banking

MONTELEONE M., MAZZUCA M., MONTELEONE G., OLIVA F., VENANZI R.

Università degli Studi di Roma "Tor Vergata" - Dipartimento di Chirurgia - I Sezione di Ortopedia.

Direttore: Prof. MAURIZIO MONTELEONE.

DOI: 10.12920/riv.patol.appar.locomot.2002.01

Questo tema è stato oggetto di relazione al "Bone Banking Forum" tenuto in data 06/05/2000 a Castelgandolfo (Roma).

Riassunto

Dopo una breve rivisitazione storica delle metodiche di conservazione e sterilizzazione dell'osso, gli Autori focalizzano l'attenzione su alcuni aspetti legati all'efficacia biologica e alla sicurezza degli omo ed eteroinnesti in relazione ad alcuni procedimenti già diffusamente adottati o in via di sperimentazione.

Parole chiave: banca dell'osso – innesto – storia.

Summary

After a short historical review of bone preserving and sterilizing methods, The Authors describe some biological effectiveness issues. Besides they relate about allograft and xenograft bone safety with regard to some already diffusely adopted or experimental bone processing methods.

Key words: bone banking – graft – history.

Sempre più di frequente in chirurgia ortopedica si avverte la necessità di disponibilità di tessuto osseo per colmare cavità, rimpiazzare lacune che seguono la rimozione di un impianto protesico, favorire la riparazione biologica di lesioni fratturative e sostituire porzioni di segmenti scheletrici resecate. Si è assistito ad un fiorire di proposte per sopperire a quest'esigenza delle quali sicuramente, là dove non sia possibile effettuare innesti autologhi, la banca dell'osso omoplastico rappresenta la soluzione più adottata in campo internazionale (Boyce et al., 1999).

Al fine di un'adeguata comprensione delle problematiche connesse con la realizzazione di una banca dell'osso, è utile darne una definizione che tra quelle presenti in letteratura sia la più adatta: si può definire banca dell'osso un metodo per conservare qualsiasi materiale osseo con sostanze o mezzi diversi per un periodo di tempo variabile (Mastragostino, 1958).

Poiché la parola "banca", in gran parte, è estrapolata dal concetto già esistente, della banca del sangue si deve considerare un'organizzazione che consente la raccolta e la distribuzione di

materiale con l'instaurarsi di rapporti di credito e debito.

Nel nostro caso in realtà non è proprio così: infatti, come già affermato da altri autori che hanno affrontato il problema in precedenza (Pais et al., 1952; Mastragostino, 1958) più che banca dell'osso, sarebbe corretto, soprattutto da un punto di vista linguistico, l'appellativo di osteoteca in quanto si deve considerare un modo di conservare dell'osso.

La finalità delle osteoteche è appunto quella di conservare e distribuire tessuto osseo che mantenga le caratteristiche biologiche idonee per la realizzazione di un innesto: tale osservazione è avvalorata dalla necessità di perseguire anche un risultato biologico in quanto l'innesto deve attecchire con sicurezza senza indurre fenomeni patologici.

Nella storia i primi esperimenti per mettere a punto un metodo di conservazione sono compiuti da Ollier nel 1867: egli utilizza la refrigerazione a $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ per osso auto-, omo- ed eterologo.

I suoi risultati sono positivi per gli innesti autologhi ed insoddisfacenti per gli omo ed eterologhi. Le sue conclusioni sperimentali vengono riassunte nel postulato che gli innesti autologhi sopravvivono grazie al periostio mentre gli innesti omo ed eterologhi vengono prima incapsulati dal connettivo circostante infine riassorbiti o sostituiti dall'osso ospite.

Sebbene già agli inizi del '900 Tuffier e Magitot effettuano le prime applicazioni cliniche con osso congelato umano, la realizzazione della prima vera banca dell'osso, istituita secondo concezioni moderne, in grado di fornire innesti autoplastici ed omoplastici, si deve attribuire a Inclan nel 1942 (Mastragostino, 1958): l'osso viene conservato refrigerandolo a $2/-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in recipienti sterili contenenti sangue citratato o liquido di Ringer. L'esigenza

della disponibilità di un mezzo idoneo ad assolvere le funzioni complesse del tessuto osseo si manifesta con urgenza in questo periodo per il notevole sviluppo della chirurgia ortopedica promosso dalla diffusione delle terapie antibiotiche.

Infatti, nel 1947 Bush e Wilson mettono a punto la conservazione mediante refrigerazione a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ed adottando gli stessi principi, Judet nel 1949 realizza la prima banca dell'osso in Europa (Boni, Motta 1958); tre anni dopo replicano l'iniziativa in Italia Pais a Genova e Marino-Zuco presso la Clinica Ortopedica di Roma. Quest'ultimo, uno dei primi in Europa ad aggredire chirurgicamente le scoliosi, inizia ad utilizzare le costole provenienti dalla demolizione del gibbo per via sottoperiosteale sia come innesti autoplastici per effettuare l'artrodesi della colonna del donatore che come innesti omoplastici per reintegrare perdite di sostanza ossea.

La conservazione si avvale in quel periodo di particolari "frigidaires" ed avviene rispettando cautele e criteri di asepsi quali sembrano precedere gran parte delle normative proposte oggi da alcune organizzazioni europee competenti nel campo dei trapianti: in condizioni sterili, infatti, si introduce la costola prelevata dal donatore in un provettone e questo successivamente in un secondo provettone che viene conservato nell'osteoteca a temperature comprese tra -55 e $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Boni et al., 1958).

Già allora Marino-Zuco impiega oltre a osso omoplastico, anche materiale eteroplastico prelevato con la massima sterilità da feti di cavallo o di vitello accuratamente privato delle parti molli circostanti. Prove di sterilità si eseguono al momento e poi periodicamente, su una serie campione dall'osteoteca debitamente scelta al momento dell'espianto.

In quell'epoca si nota empiricamente come la refrigerazione faciliti l'attecchimento dell'innesto; ciò può essere spiegato, in accordo con le osservazioni di vari autori (Curtiss P.H. et al. 1959; Friedlaender, 1983) dalla dimostrazione che la refrigerazione riduce la risposta immune.

Nel tentativo di prolungare la permanenza del materiale nelle osteoteche e di ridurre la contaminazione da agenti patogeni, si sono sperimentate varie metodiche di conservazione alternative alla semplice refrigerazione: la macerazione fisica e chimica; la liofilizzazione, la conservazione mediante resine.

La macerazione consente l'eliminazione delle componenti organiche con metodi chimici o fisici: tra i metodi fisici, la calcinazione, un'antica tecnica di macerazione si attua attraverso la "cottura" dell'osso in forni a temperature di 500 / 700 °C per circa venti minuti.

Sistemi concettualmente molto vicini alla calcinazione sono applicati anche di recente per il trattamento dell'osso eterologo per eliminare con la componente organica anche le proprietà antigeniche del tessuto. Il materiale così ottenuto avrà una consistenza simile al gesso, quindi con scarse qualità meccaniche.

Tra i metodi chimici di macerazione per rigore storico si annoverano: il metodo di Orell (1934) in parte ripreso da Foà (1954) detto anche dell'"os purum" cioè un osso depurato dal grasso e proteine con vari agenti chimici (acetone e tricloroetilene) e miscele enzimatiche così da facilitare, la pervietà della fitta rete di canalicoli ai fluidi destinati alla sterilità ed alla conservazione.

La liofilizzazione è un processo noto fin dai primi dell'800: le prime applicazioni scientifiche sono da ascrivere ad Altmann nel 1890, consiste nella disi-

dratazione rapida in condizioni di vuoto assoluto e consente di conservare il materiale per tempi lunghissimi, ancora oggi in uso in alcuni centri associata a procedimenti di sterilizzazione.

Tra i conservanti chimici utilizzati ampiamente anche in Italia il Cialit, sostanza con proprietà antisettiche, consente il mantenimento del potere osteoinduttivo ma non garantisce la completa eliminazione degli agenti virali (Mora et al., 1992).

La conservazione con resine epossidiche, molto diffusa in Russia, consente di tenere i blocchi a temperatura ambiente e di trasportarli con estrema facilità.

Tra le resine la più nota è il palavit, resina sintetica simile al plexiglass introdotto nel 1955 da Idelberg-Hoffmann (Vigliani, 1958).

Parte di questi procedimenti sono stati abbandonati per motivazioni riconducibili alla tossicità delle sostanze utilizzate, alla scarsa sterilità del materiale o alla perdita irreversibile delle qualità biomeccaniche del materiale processato.

Il metodo di conservazione, ossia il procedimento impiegato per prolungare il tempo di permanenza del materiale nell'osteoteca, incide sulle possibilità di riuscita dell'innesto: la refrigerazione rappresenta oggi come in passato un sistema concettualmente semplice ma efficace per garantire la disponibilità di innesti idonei.

Dai primi esperimenti di Ollier a -2 °C nei quali la durata dell'osso depositato era di pochi giorni, passando per la refrigerazione a -20 °C, si è arrivati a -70 °C allungando notevolmente i tempi di conservazione. Attualmente una delle metodiche di refrigerazione maggiormente utilizzate è il congelamento a secco graduato fino al raggiungimento di -70 / -80 °C, previa introduzione in due sacchetti plastificati avvol-

ti in un involucro a sacco con successivo irradiazione con raggi gamma (Delloye 1992). Questa tecnica permette di conservare sia la resistenza meccanica dell'innesto sia alcune caratteristiche biologiche; infatti, la BMP (Bone Morphogenetic Protein), glicoproteina diffusibile con una funzione osteoinduttiva, rimane inalterata.

Obiettivo imprescindibile da focalizzare, al fine di ottenere il pieno successo di un programma di conservazione e utilizzo terapeutico di materiale osseo conservato è la sterilizzazione intesa come il procedimento che garantisce l'eliminazione totale di microrganismi (virus, batteri, funghi) senza alterare le proprietà biologiche, biomeccaniche e biochimiche dell'innesto (von Versen, 1999). Seppure numerosi metodi di sterilizzazione siano stati sperimentati nel corso degli anni (ebollizione in autoclave, raggi catodici, cobalto radioattivo, beta propiolactone, raggi gamma, raggi ultravioletti, soluzione antibiotica, agenti alchilanti, agenti ammoniacali) a tutt'oggi non esiste ancora un metodo che possa soddisfare completamente il precedente postulato.

L'osso umano, presentando il vantaggio di una ridotta immunogenicità (che può ridursi ulteriormente dopo il trattamento impiegato per la sterilizzazione/conservazione ma non annullarsi completamente), può essere trattato con metodi fisici e chimici meno drastici che preservando le strutture proteiche non alterano sensibilmente le proprietà meccaniche ed osteoinduttive del tessuto.

Questa soluzione rimane comunque un compromesso, comporta un'accurata selezione del donatore e la pedissequa applicazione di rigidi protocolli di controllo da aggiornare costantemente parallelamente all'innovazione delle metodiche d'indagine disponibili: l'in-

serimento nei protocolli di screening del donatore di test virali più sensibili (polymerase chain reaction, genome amplification test), anche incidendo negativamente sulla spesa resta comunque un auspicio di molti autori (Kalter et al., 1997; Tomford et al., 1999). La ricerca della sicurezza biologica del materiale, deve spingersi ben oltre a quella richiesta per il sangue e per il trapianto d'organi vitali in quanto difficilmente l'innesto osseo assume un ruolo salvavita. Sebbene lo screening sia agevolato dalla scelta di sfruttare l'asportazione di materiale osseo che si associa ad un intervento di protesizzazione di anca o di ginocchio (per altro non idoneo nel caso di innesti massivi), in quanto resta possibile effettuare test sul donatore (che ha rilasciato formalmente il suo consenso all'utilizzazione come innesto del segmento osseo asportato) anche dopo il prelievo, restano alcune perplessità. Per esempio, un recentissimo studio (Sugihra et al., 1999) evidenzia come un approfondito esame istologico eseguito su preparati di tessuto osseo umano proveniente da teste femorali, prelevato rispettando i dettami dell'American Association of Tissue Banks e dell'European Association of Musculo-Skeletal Transplantation, possa dimostrare la presenza di cellule linfomatose in un numero considerevole di campioni.

Per di più Tomford et al. (1999) sottolineano come la riduzione della trasmissione di infezioni possa ottenersi con sicurezza solo attraverso l'asportazione del sangue e dei suoi derivati, quindi con la rimozione del midollo osseo: ciò è reso difficoltoso negli innesti ricchi di osso trabecolare (teste femorali). Per risolvere questo problema sono in sperimentazione innovativi metodi di impregnazione, e nuovi agenti chimici.

Un procedimento che ambisce all'eliminazione del midollo osseo e di tutti i tessuti molli contenuti nella struttura ossea sfrutta l'azione combinata della CO₂ e del perossido d'idrogeno. La prima con appropriate temperatura e pressione rimuove la componente lipidica, il secondo elimina parzialmente la frazione proteica. Questo metodo che lascia inalterata la porzione proteica del collagene I, è stato applicato con successo al tessuto osseo eteroplastico e sembra produrre materiale deantigenato con qualità meccaniche paragonabili agli omoinnesti (Frayssinet et al., 1995).

Proprio l'osso di provenienza animale, l'eteroinnesto che già nel '58, attraverso l'analisi di alcune casistiche dell'epoca (Boni et al., 1958; Mastragostino, 1958) dimostra un risultato favorevole inferiore del 5% rispetto all'omoinnesto, trova larga applicazione sia nella chirurgia vertebrale (Löfgren et al., 2000) che in odontoiatria (Richardson et al., 1999). Certamente si tratta di integrazioni di dimensioni ridotte, in genere coadiuvate, per quanto riguarda la chirurgia del rachide, da mezzi di fissazione interna per l'assorbimento delle sollecitazioni meccaniche; ciononostante di recente è stata messa appunto una tecnica in grado di fornire materiale

deantigenato mediante numerosi passaggi in autoclave ad alta pressione a 130 °C dotato di proprietà meccaniche soddisfacenti. Il prodotto finale di questo procedimento, che sembra garantire l'assenza di agenti patogeni, è stato impiegato con successo anche nelle ricostruzioni acetabolari durante intervento di revisione protesica.

Non avendo i materiali alternativi sperimentati risposto in maniera soddisfacente e completa alle aspettative del chirurgo dello scheletro, il tessuto osseo di origine naturale rimane una risorsa irrinunciabile. Oggi ancor più che in passato l'osteoteca è uno strumento indispensabile per la risoluzione di carenze di tessuto osseo che si presentano sempre più di frequente per l'allungamento della vita e il corrispondente aumento degli interventi di revisione protesica.

Tenendo conto della sempre maggiore consapevolezza popolare delle responsabilità medico legali dell'operatore e della crescente e confusa attenzione che l'argomento "banca di tessuti" suscita nelle istituzioni, riteniamo debba essere data la preferenza al materiale più sicuramente e dimostrativamente sterilizzato indipendentemente dalla sua origine.

BIBLIOGRAFIA

- BONI M., MOTTA C.: *Possibilità e limiti nell'impiego dei trapianti eteroplastici*. O.T.A.M., 26, 355-474, 1958.
- BOYCE T., EDWARDS J., SCARBOROUGH N.: *Allograft Bone. The influence of processing on safety and performance*. Orthop. Clin. North America, 30, 571-581, 1999.
- CURTISS P.H., POWELL A.E., HERNDON C.H.: *Immunological factors in homogenous-bone transplantation. III. The inability of homogenous rabbit bone to induce circulating antibodies in rabbits*. J. Bone Joint Surg. Am., 41, 1482-1488, 1959.
- DELLOYE C.: *Il prelievo, la conservazione, le tecniche di sterilizzazione e le problematiche inerenti la conservazione della cartilagine*. GIOT, 18 (Suppl.), 2, 53-61, 1992.
- FRAYSSINET P., ASIMUS E., AUTEFAGE A., FAGES J.: *Histological evaluation of xenogeneic bone treated by supercritical CO₂ implanted into sheep*. J. Mat. Sci. Mat. Med., 6, 473-478, 1995.

- FRIEDLAENDER G.E.: *Immune responses to osteochondral allografts. Current knowledge and future directions.* Clin. Orthop., 174, 58-68, 1983.
- KALTER E.S.J., DE BY T.M.M.H.: *Tissue banking programmes in Europe.* British Medical Bulletin, 53, 798-816, 1997.
- LOFGREN H., JOHANSSON V., OLSSON T., RYD L., LEVANDER B.: *Rigid fusion after Cloward operation for cervical disc disease using autograft, allograft, or xenograft.* Spine, 25, 1908-1916, 2000.
- MASTRAGOSTINO S.: *Trapianti ossei omoplastici nell'uomo.* Relazione al XLIII Congresso della Società Italiana di Ortopedia e Traumatologia, 3, 20-26, 1958.
- MONTELEONE M., TARANTINO U., MAIOTTI M.: *Trapianto osseo omoplastico: Analisi dell'esperienza clinica degli anni '50. Conferma della validità biologica.* GIOT, 18 (Suppl.), 2, 65-68, 1992.
- MORA R., MONTELEONE V., BERTOLOTTI P., FINARDI E., CAPRILE A., NOVARA G.: *Conservazione in vitalità dell'osso.* GIOT, 18 (Suppl.), 2, 39-43, 1992.
- PAIS C., GOIDANICH I.F.: *Osservazioni biologiche e cliniche sui trapianti ossei congelati.* Chir. Organi Mov., 37, 312-333, 1952.
- RICHARDSON C.R., MELLONIG J.T., BRUNSVOLD M.A., McDONNELL H.T., COCHRAN D.L.: *Clinical evaluation of Bio-Oss: a bovine-derived xenograft for the treatment of periodontal osseous defects in humans.* J Clin. Periodontol., 26, 421-428, 1999.
- SUGIHARA S., VAN GINKEL A.D., JIYA T.U., VAN ROYEN B.J., VAN DIEST P.J., WUISMAN P.I.J.M.: *Histopathology of retrieved allografts of the femoral head.* J. Bone Joint Surg. Br., 81-B, 336-341, 1999.
- TOMFORD W.W., MANKIN H.J.: *Bone Banking. Update on methods and materials.* Orthop. Clin. North Am., 30, 565-570, 1999.
- VIGLIANI F.: *Trapianti ossei generalità e biologia.* Relazione al XLIII Congresso della Società Italiana di Ortopedia e Traumatologia, 1, 1958.
- VON VERSEN R.: *Musculoskeletal tissue banking in Europe – regulations and quality assurance.* Annales Chirurgiae et Gynaecologiae, 88, 215-220, 1999.