

# *L' Impiego delle C. S. nella Terapia del danno Tissutale Osseo*

S.Russo, C. Cacciapuoti (\*), E. Astarita, E. D'Agostino(\*),  
N. Scarpato(\*), D. Marinò

Dipartimento di Chirurgia, Ortopedia, Traumatologia e  
Riabilitazione

(\* ) Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare  
L. Califano

Università Federico II Napoli



# Terapia o Chirurgia cellulare

- E' basata sull'impianto chirurgico di popolazioni cellulari, appositamente allestite e sviluppate, al fine di stimolare la riparazione di un danno tissutale o di organo
- Qualora si utilizzino più linee cellulari, realizzando quindi trapianti "complessi", è più corretto parlare di : **Ingegneria Tissutale**



Essa rappresenta quindi una nuova branca della medicina che si basa sulle più attuali conoscenze dei **processi embriogenici** per ricreare, in un'area di lesione, una condizione locale simile a quella presente durante **la fase dello sviluppo embrionale.**



... per sfruttare  
a tal fine le  
capacità  
riparative delle  
cellule  
indifferenziate o  
precorritrici ivi  
impiantate



# Chirurgia Cellulare

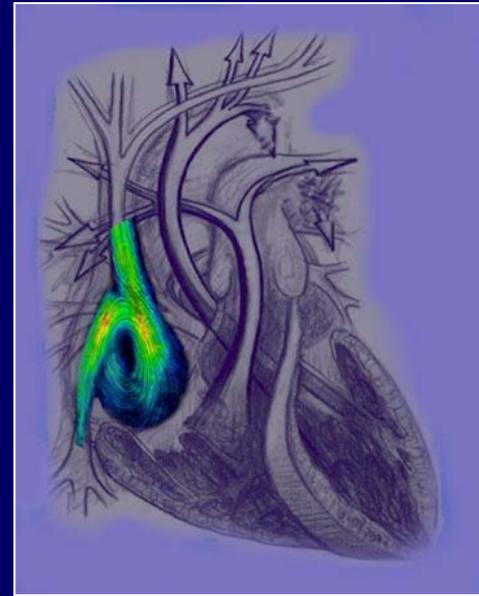
Cellule  
staminali

*Rappresentano la  
grande promessa  
della  
medicina  
contemporanea*



# Cellule staminali

- Consentono di **"riattivare"** un organo funzionalmente spento
- Di **riparare** o **ricostruire** tessuti anche complessi distrutti dalla noxa lesiva
- Di **ripristinare** un efficace circolo vascolare in aree francamente necrotiche



# Sottotipi di c.s.

- Totipotenti  
(zigote)
- Pluripotenti  
(blastocisti)
- **Multipotenti**  
(somatrica)
- Unipotenti  
(somatrica)
- Progenitrici  
(somatrica)

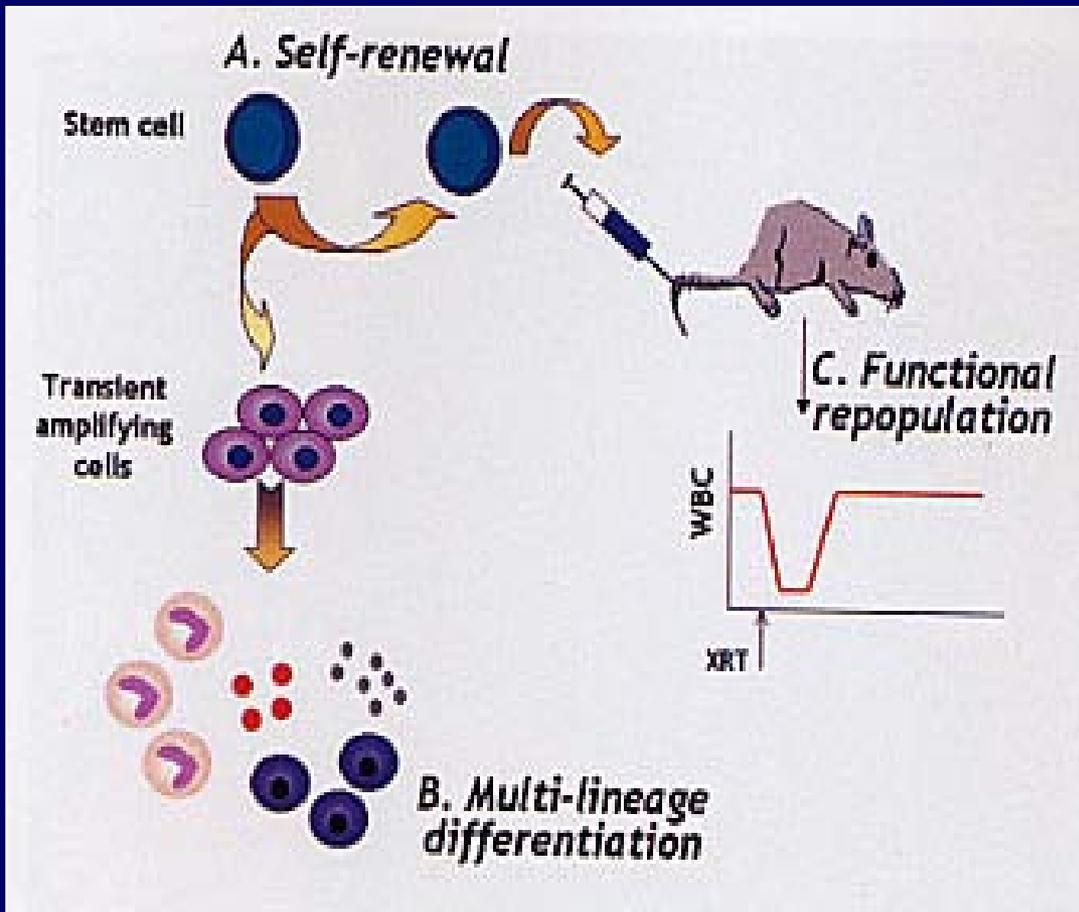


# Peculiarità delle c.s.

- **Autorinnovamento**  
(replicazione indefinita nel tempo)
- **Divisione asimmetrica**  
(la mitosi genera nuova c.s. e cell. figlia)
- **Plasticità**  
(diff. lungo diverse vie)
- **Non ciclanti**  
(sono in fase G0 del ciclo vitale: vitali senza dispendio energetico, senza supp. di fattori di crescita, non bersaglio di chemioterapici)



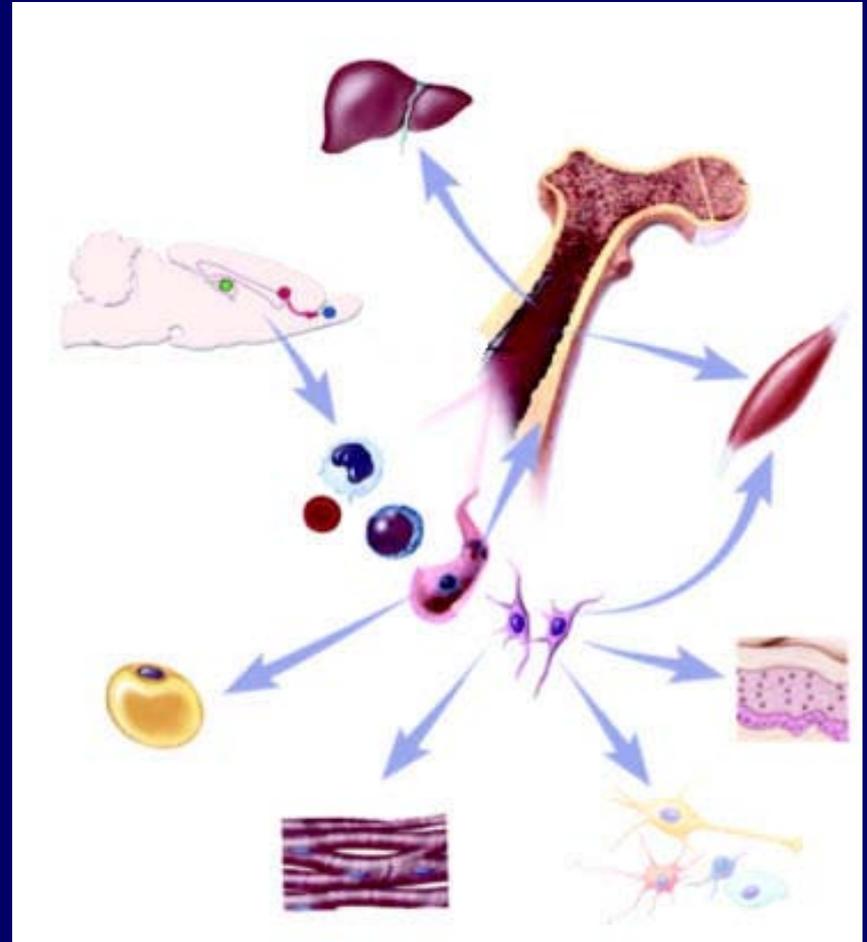
# DEFINIZIONE di C.S.



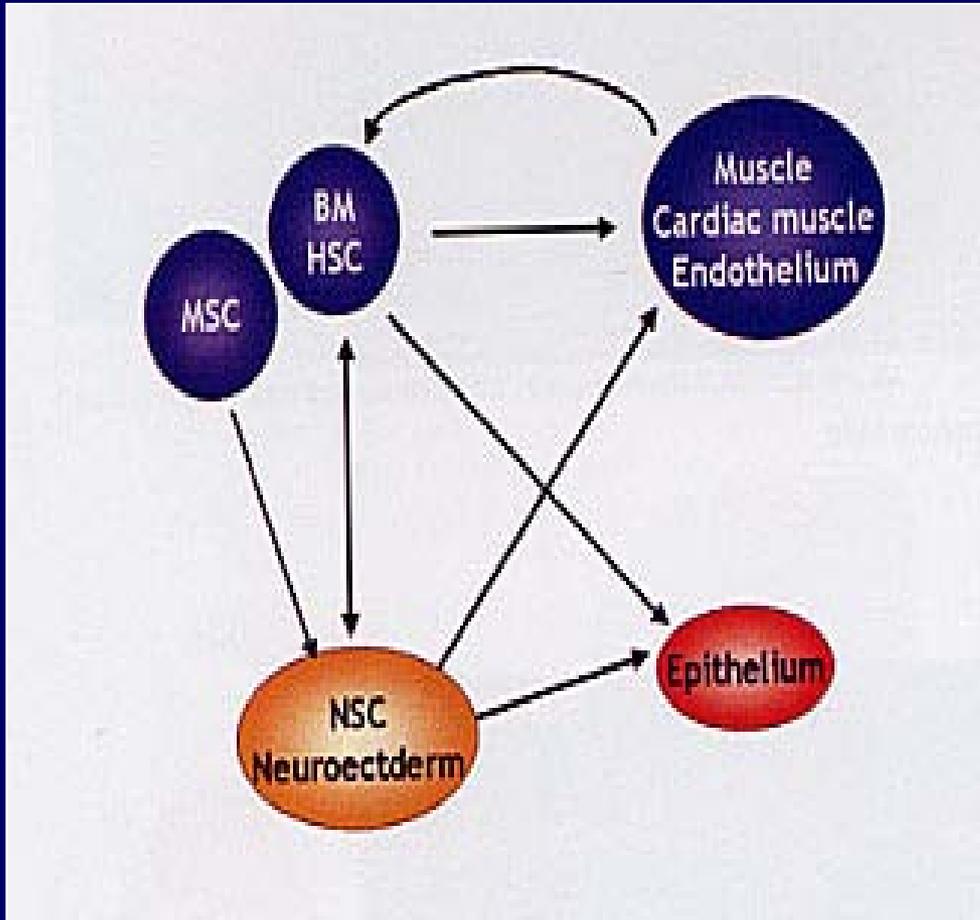
Sono cellule (A) in grado di **auto rinnovarsi**, (B) di seguire **multiple linee differenziative** e (C) capaci, in vivo, di "**soccorrere**" un tessuto danneggiato per tutto l'arco della vita dell'ospite



# Teoria della plasticità



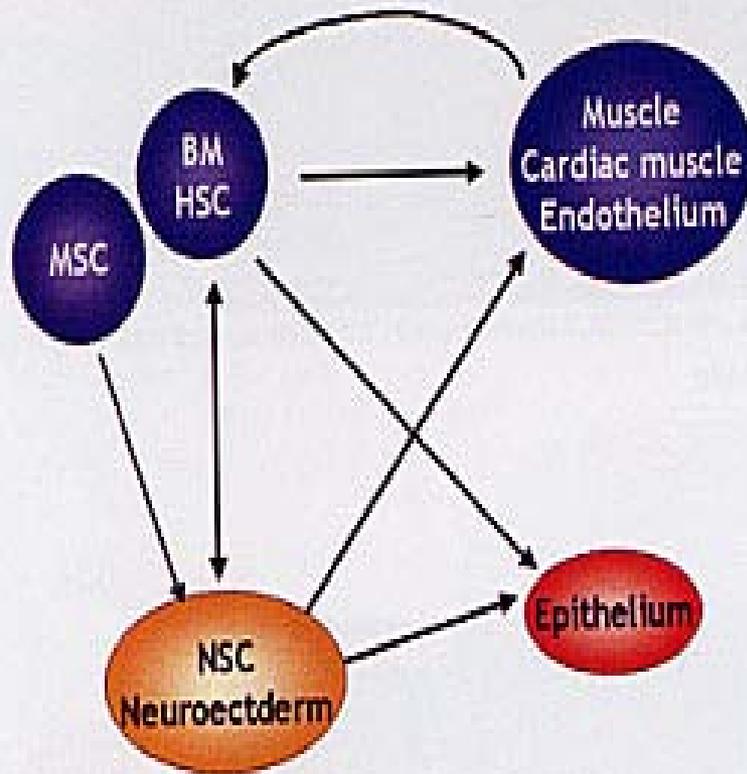
# STEM CELL PLASTICITY



Negli ultimi 5 anni sono stati pubblicati oltre 50 articoli che dimostrano come le C.S. di un tessuto possano dare origine a cellule con **fenotipo**, **morfologia** e, talvolta, **caratteristiche funzionali** di cellule adulte di un tessuto diverso da quello d'origine.

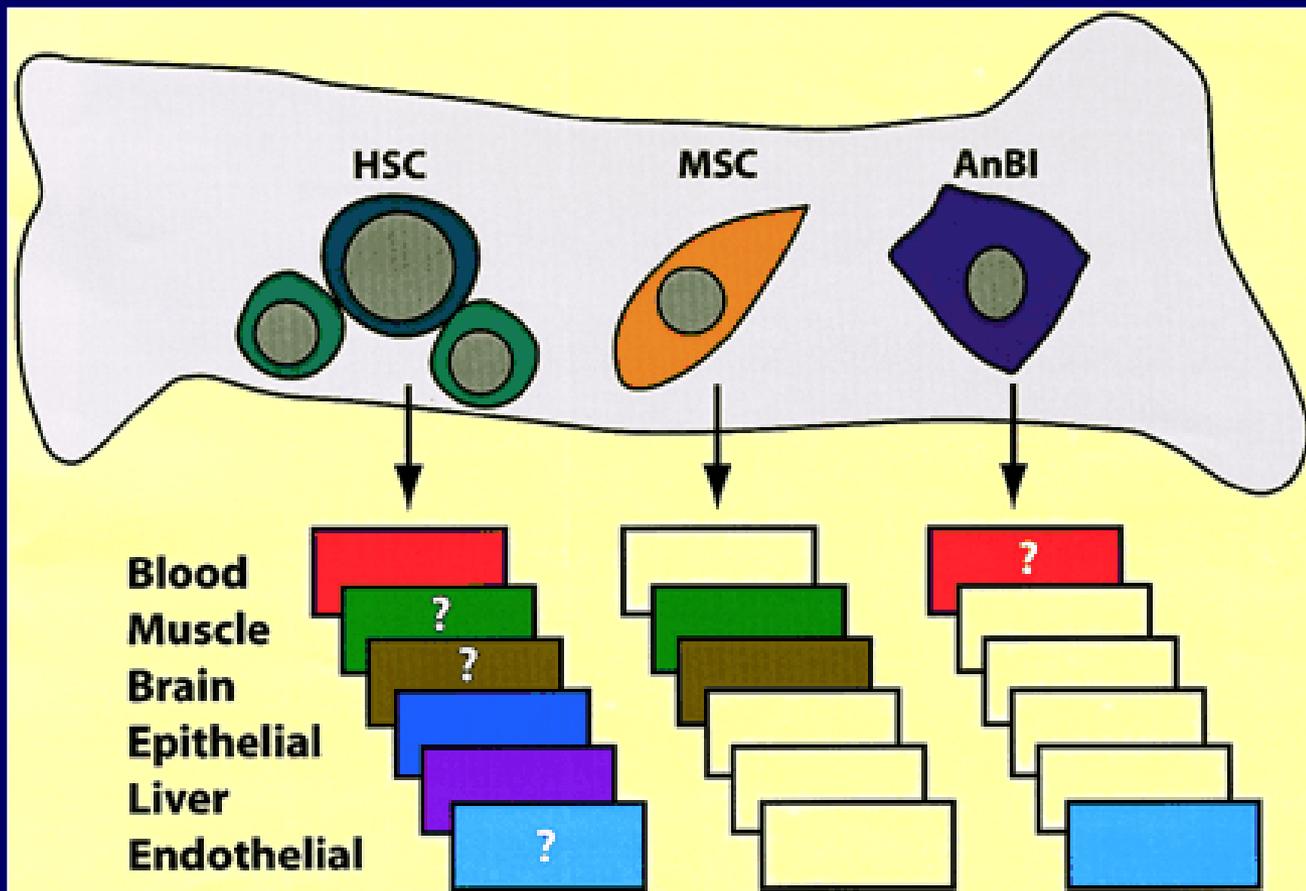


# STEM CELL PLASTICITY



Alcune di queste  
"deviazioni"  
di linea  
differenziativa si  
manifestano **tra**  
**tessuti con diversa**  
**origine embrionale**  
(endodermica,  
ectodermica e  
mesodermica)





La cavità interna dell'osso contiene differenti tipi di progenitori sia ematopoietici che non. Le sigle HSC , MSC e AnBI indicano rispettivamente: hematopoietic stem cells, mesenchymal stem cells; angioblasts. I rettangoli rappresentano potenziali linee differenziative. I differenti colori conversioni differenziative già descritte o solo postulate (?). La presenza di angioblasti nel midollo osseo è attualmente un'ipotesi speculativa; è, peraltro, possibile che esistano in questa sede ulteriori tipi di precursori .



# Midollo osseo

Sorta di banca delle c.s.

- Si trovano nelle cosiddette "NICCHIE"
- Legate ad altre cell. ed alla matrice attraverso molecole supef. di adesione.



# Cellule staminali

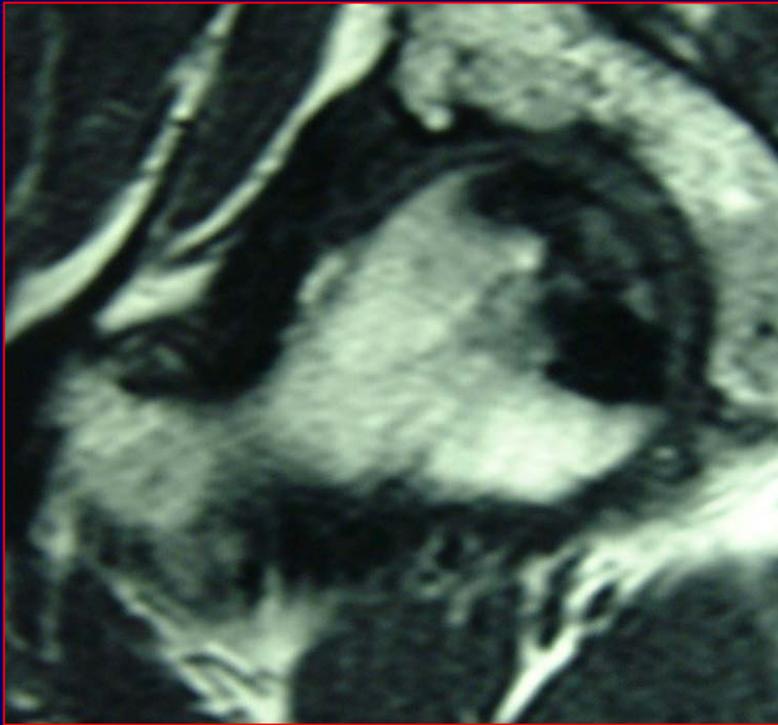
**Autorizzazione**  
**del Comitato Etico**  
**Protocollo n.ro**  
**173/03**

- Ampie perdite di sostanza a seguito di eventi traumatici
- Pseudoartrosi refrattarie ad altre terapie
- Necrosi ossee
- Osteocondriti

*ità di*  
*in*  
*dia*



# Esperienze Cliniche



Necrosi della  
testa del femore

# SORGENTI

- EMBRIONALI
- SOMATICHE ADULTE

Da midollo

Da sangue  
periferico

Da espansione  
colturale



# Da midollo

- Doppio tempo chirurgico/anestesiologico
- Bassa % di recupero cellulare
- Necessità di predeposito per autotrasfusione



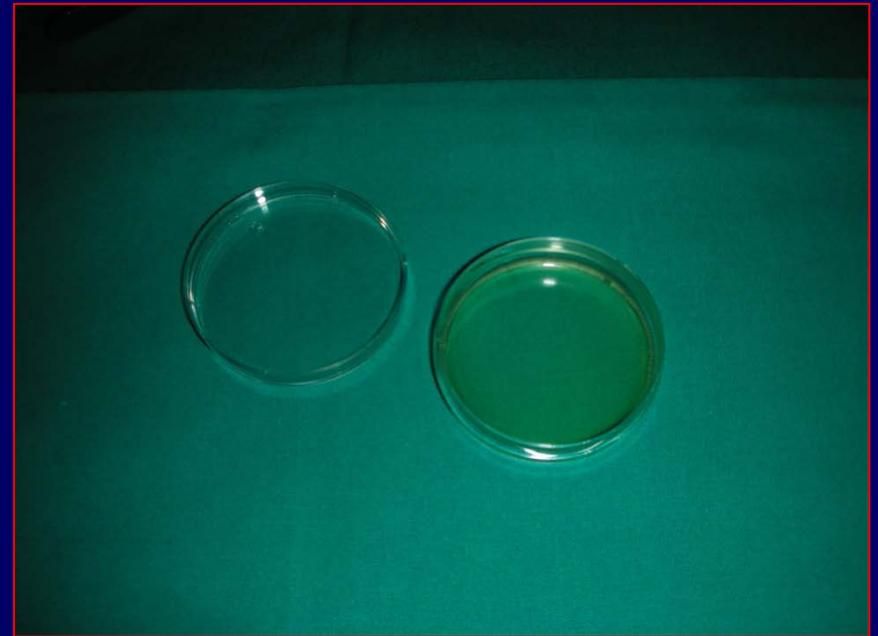
# Da sangue periferico

- Necessità di stimolazione midollare con farmaci pot. tossici
- Lunga seduta di aferesi
- Unico tempo chir/anest
- Elevata % di recupero



# Espansione cellulare

- Popolazione cellulare "on demand"
- Elevatissima [cells]
- Nessun prob. Etico
- Autorizzazione Ministeriale
- Costi???



# Chirurgia Cellulare

Fattori determinanti ??

1. Grado di differenziazione
2. Purezza
3. Concentrazione cellulare
4. *Opportuno Vettore*



# Casistica complessiva (HSC e MSC) 2003/2007

16 p (11m e 1f) età 32/56 anni

Necrosi da cortisone o terapie  
immunosoppressive

Stadio II e III di Steimberg

Follow up: Max 8a e Min 4a



# Procedura

Stimolazione, raccolta e selezione con metodo immunomagnetico per **HSC CD133+** da sangue periferico  
(6 pazienti)

Raccolta e selezione per le **MSC** da midollo  
(10 pazienti)



# Ottima conservazione della sfericità della testa del femore

Età non avanzata

Buone condizioni generali

Attento check-up preoperatorio



# Caso Clinico

Maschio, 47a., presenza di artroprotesi all'anca sx

Rifiuta intervento di protesi a dx malgrado l'ingravescente compromissione articolare e la limitazione funzionale anche antalgica.

Accetta di aderire al protocollo sperimentale relativo all'autotrapianto staminale di cui all'autorizzazione C.E. n.173/03.



# Caso Clinico

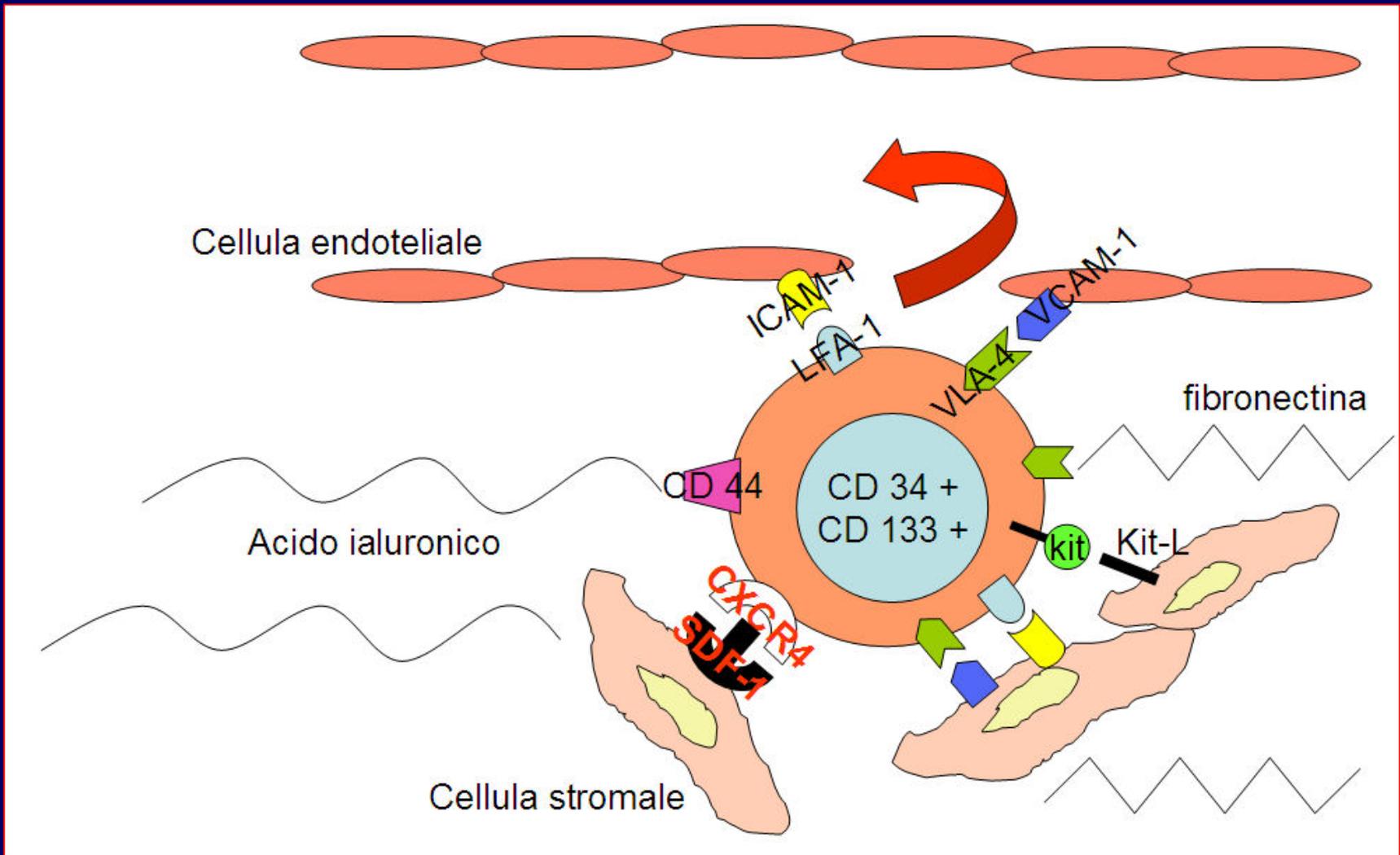
Rilascia a tal proposito uno specifico e selettivo consenso informato relativo sia alla fase di stimolazione e raccolta che all'atto chirurgico e che impone, inoltre, la distruzione in soluzione acida di eventuali cellule staminali residue all'intervento .



# S.C. da periferico

- HSC autologhe ricavate dal sangue periferico del paziente previa stimolazione mediante Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) ( $12\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{die}$ )





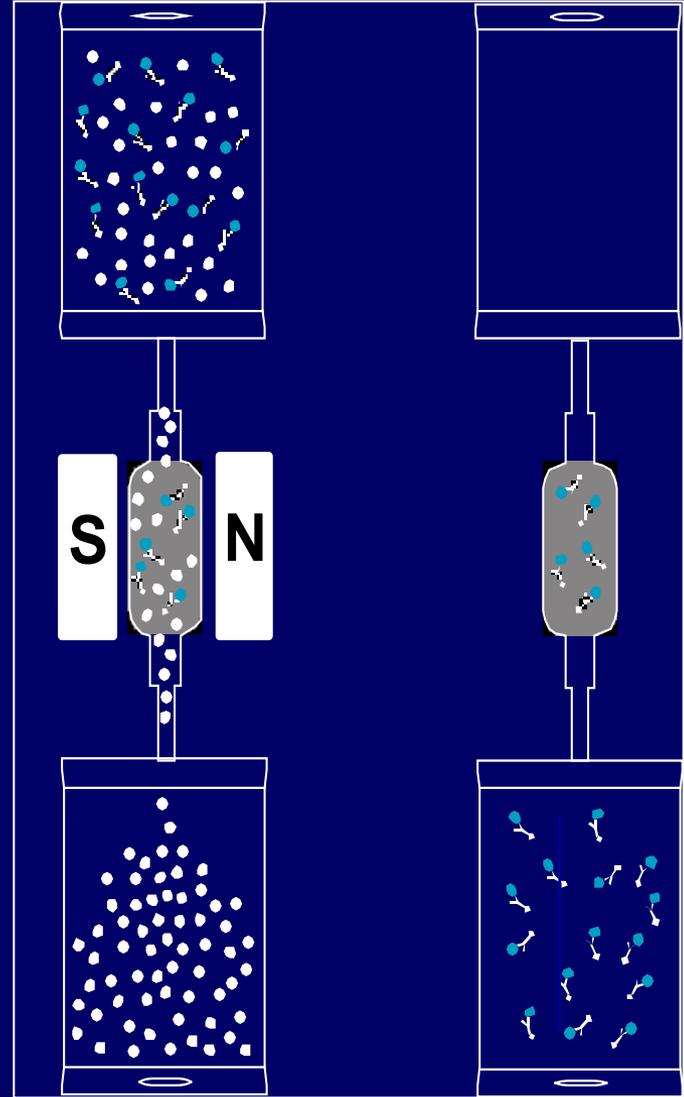
Il fattore di crescita G-CSF favorisce il passaggio delle cellule staminali in circolo.



# S.C. da periferico

- Raccolta mediante separatore cellulare Cobe-Spectra a flusso discontinuo in 2-3 sedute di leucaferesi.
- Selezione con sistema immunomagnetico (Milteny)
- Ab monoclonali anti Ag CD 34+ CD133+





# CliniMACS Process: CD34<sup>+</sup>CELLS

## BEFORE SELECTION\*

CD34<sup>+</sup>: 0.6%

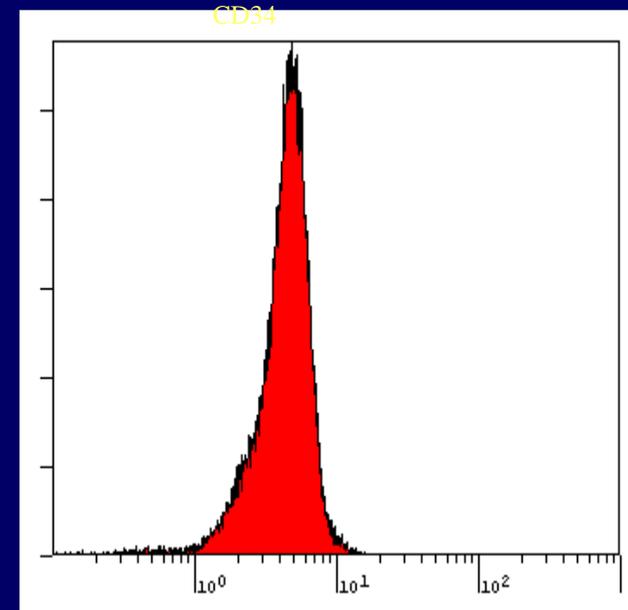
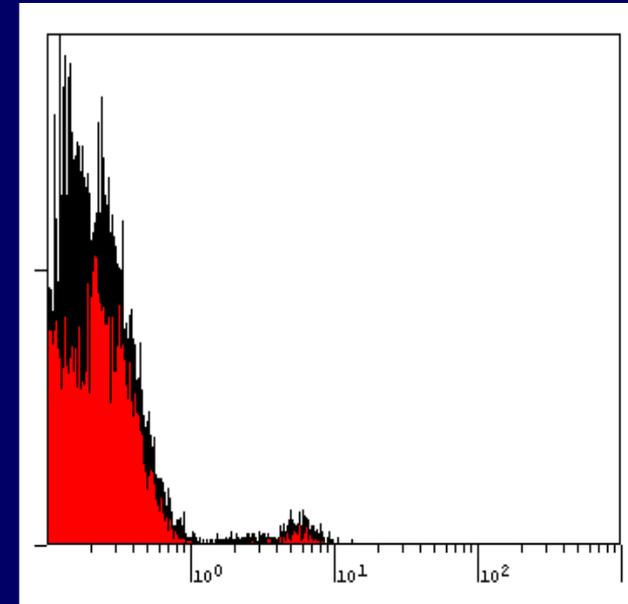
CD34<sup>+</sup>: 276 x10<sup>6</sup>

## AFTER SELECTION

CD34<sup>+</sup>: 90.5%

CD34<sup>+</sup>: 222.6 x10<sup>6</sup>

RECOVERY : 81 %



\*Data obtained from the first apheresis product.



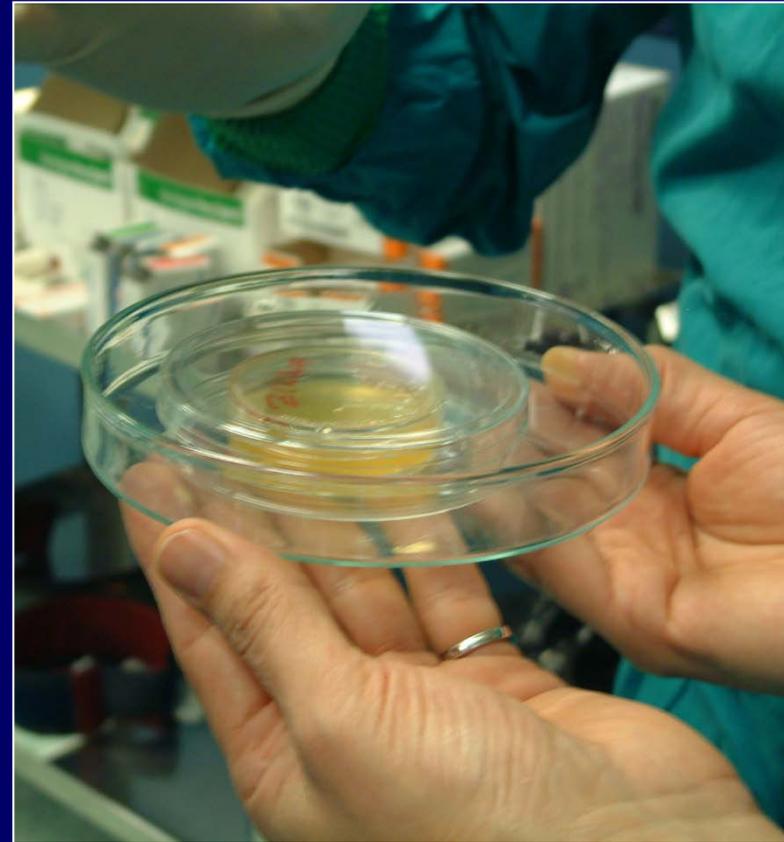
# Fase pre operatoria

- Criopreservazione delle HSC selezionate in aliquote di 2, 4, 8,  $16 \times 10^6$ /Kg in azoto liquido.
- Scongelamento all'atto dell'intervento chirurgico e mescolamento con la matrice di supporto



# Vettore o Matrice di supporto ideale

- Capacità di assumere una determinata forma a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C}$ )
- Convertirsi in forma pre-programmata quando introdotta nell'organismo ( $37^{\circ}\text{C}$ )



- Supportare la proliferazione e la differenziazione delle staminali verso linee sia emopoietiche che non emopoietiche
- Possibilità di attivazione della matrice con specifiche citochine per orientare la maturazione delle CSE verso la via osteogenica

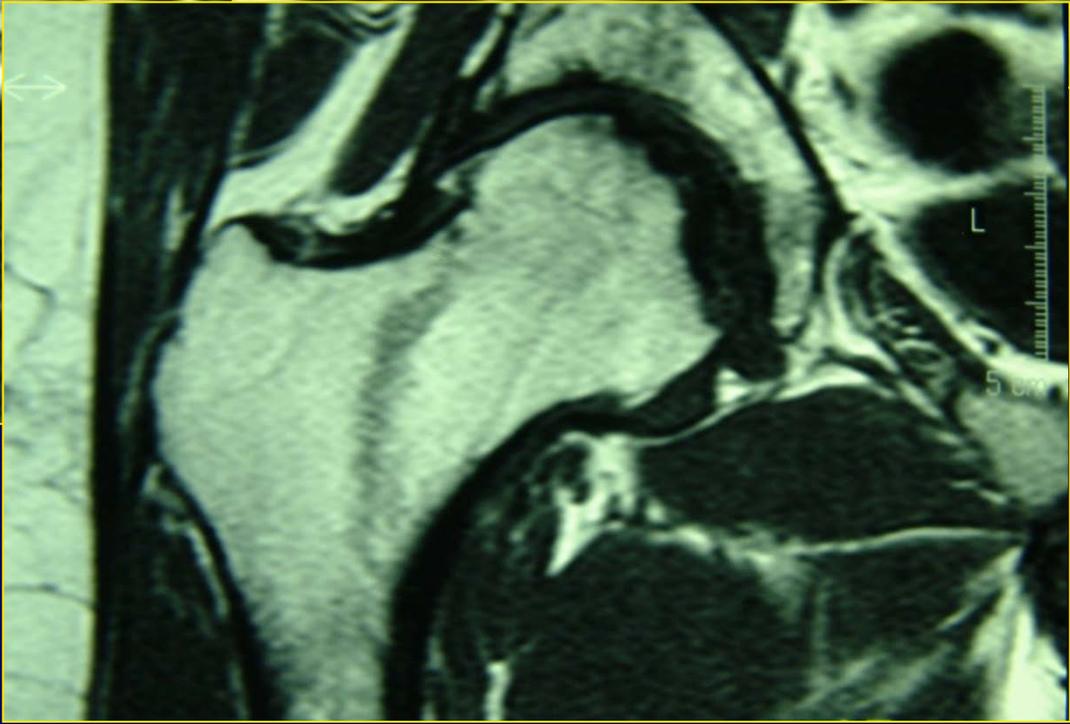
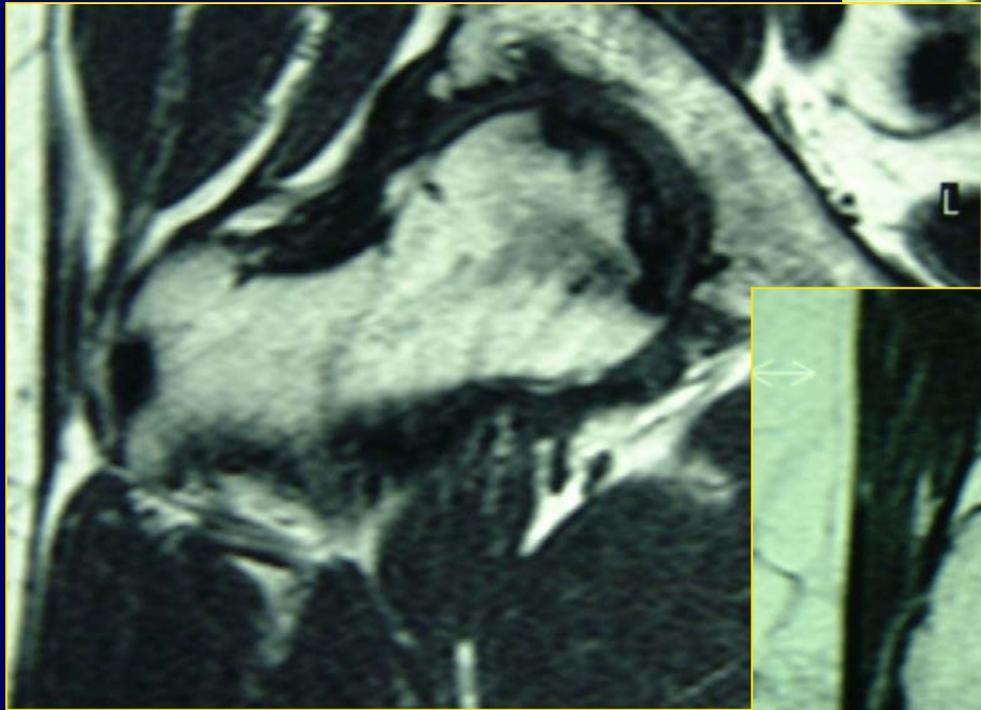
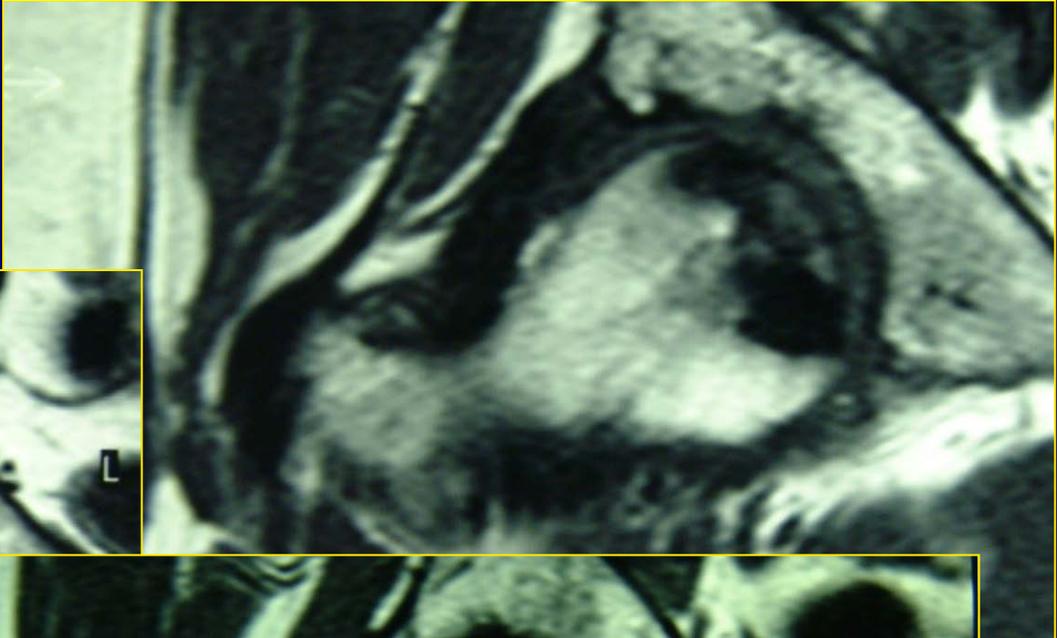


Matrice di supporto impiegata:

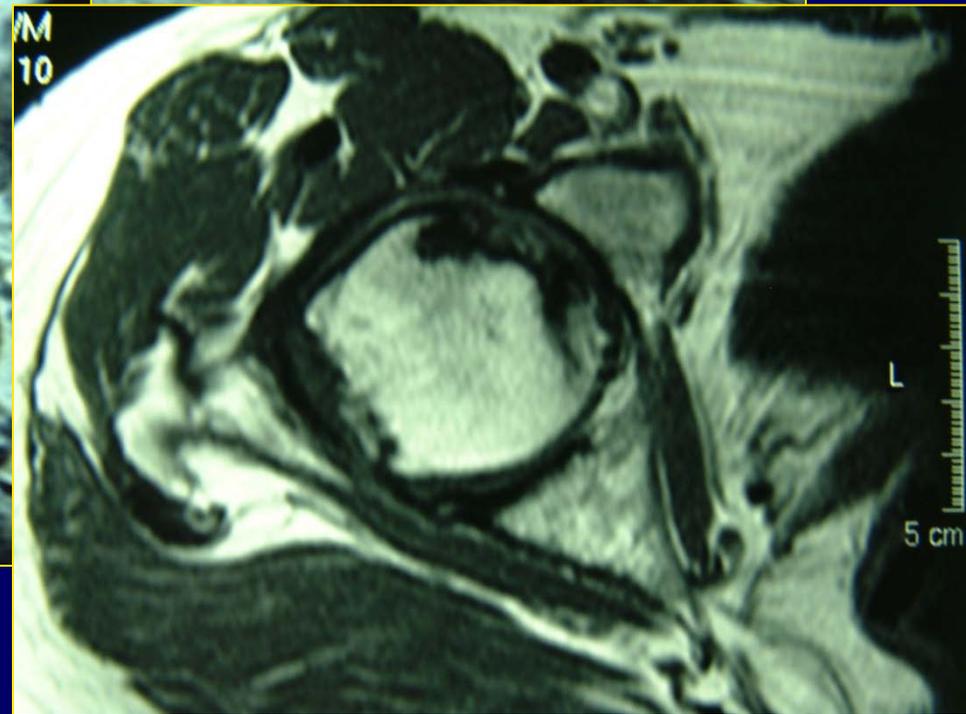
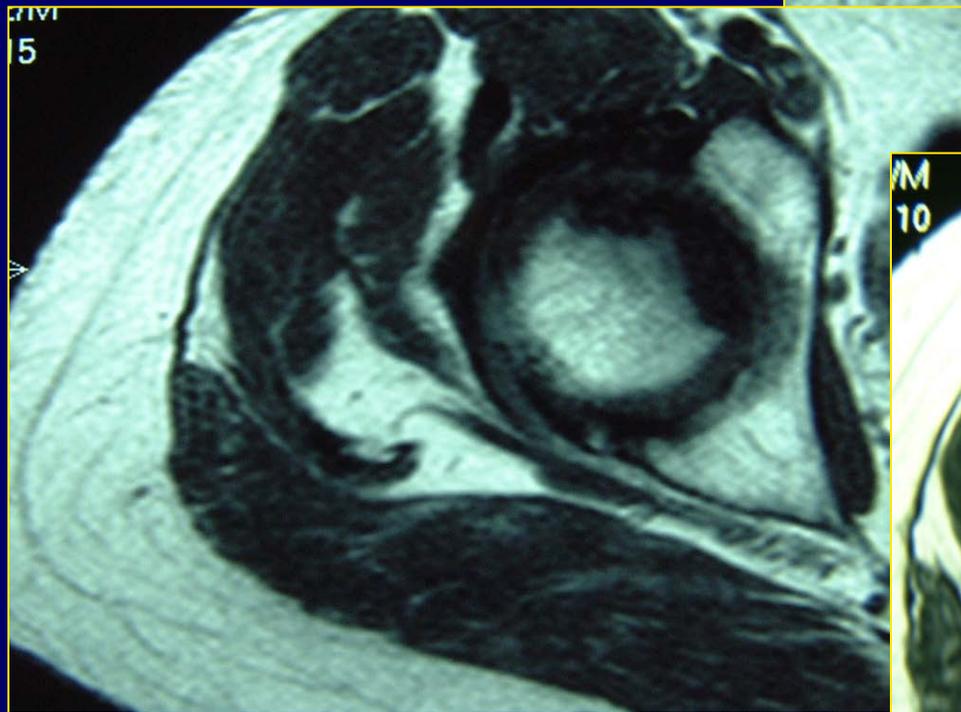
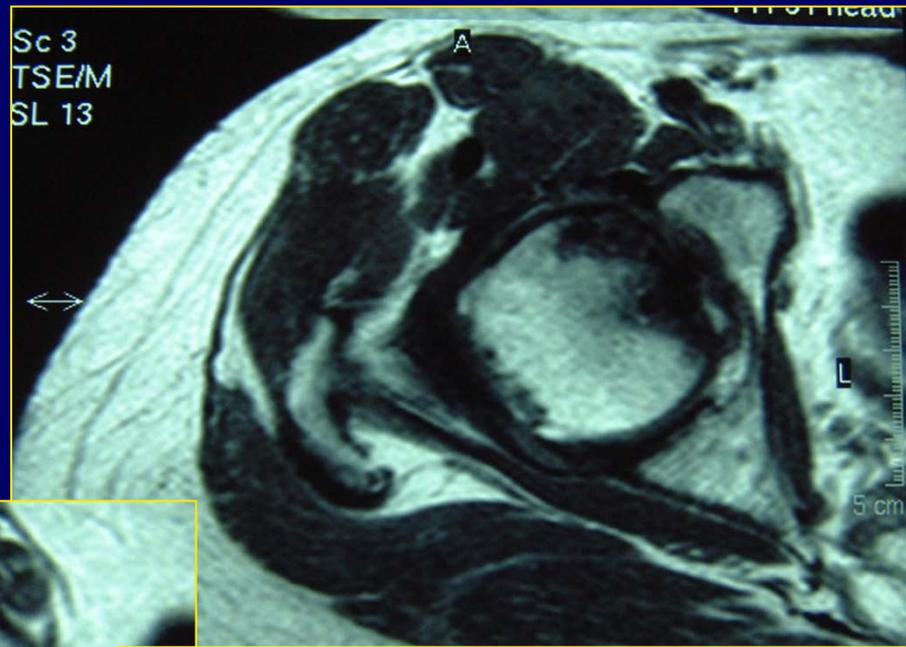
**Coagulo plasmatico**



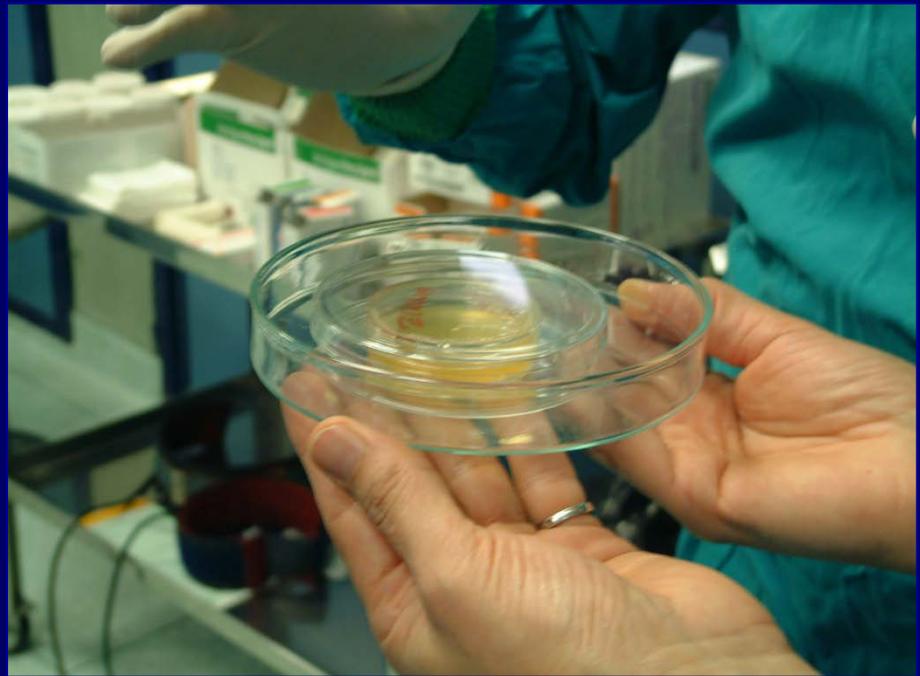
# Esame RMN pre

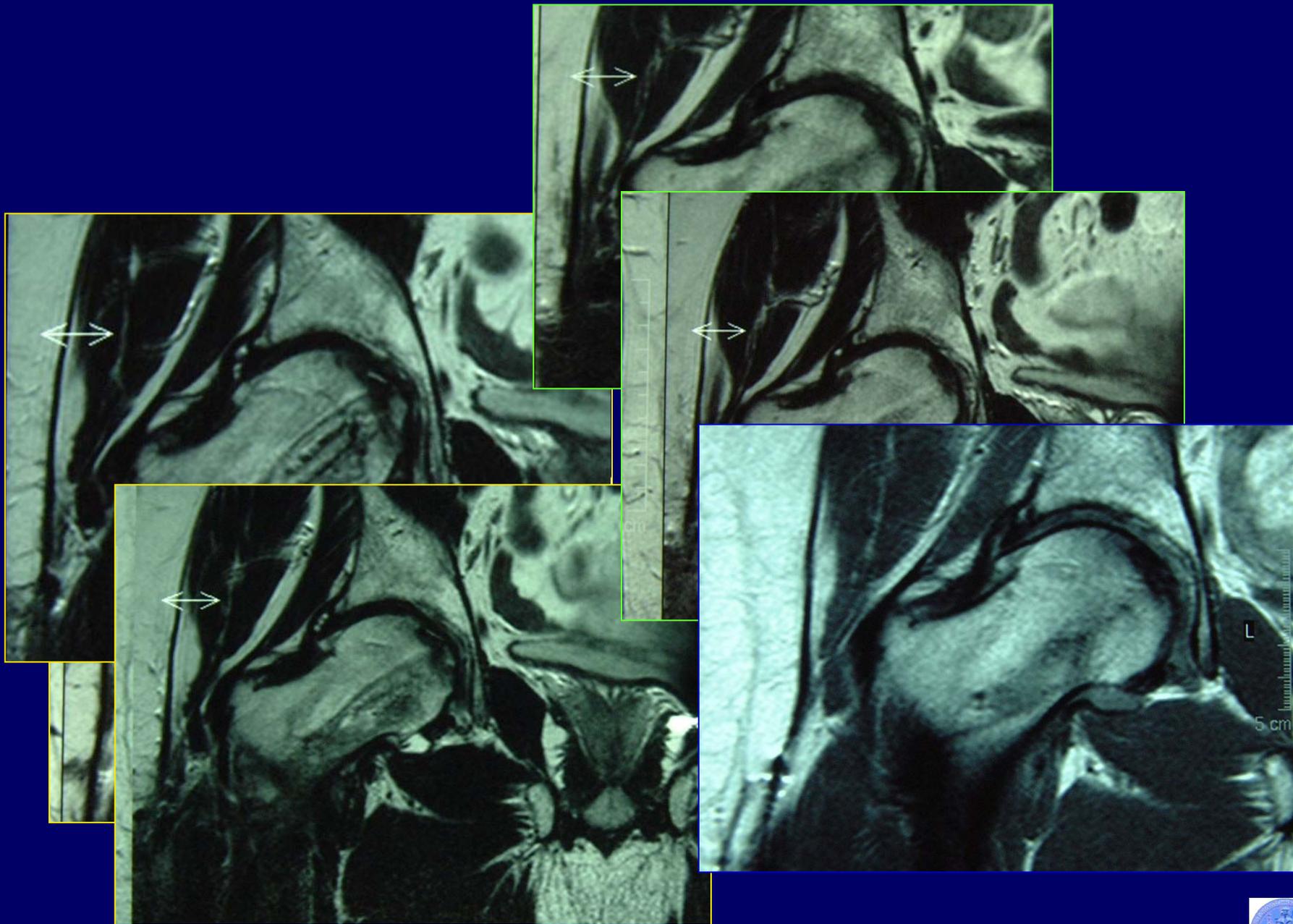


# Esame RMN pre



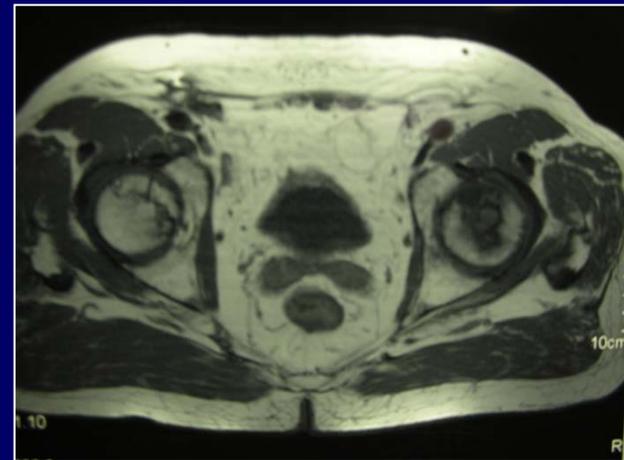






# NECROSI TESTA FEMORE

- MASCHIO 54A
- NECROSI BILATERALE SECONDARIA A TERAPIA CORTISONICA E CITOSTATICA (M. DI HODGKING)



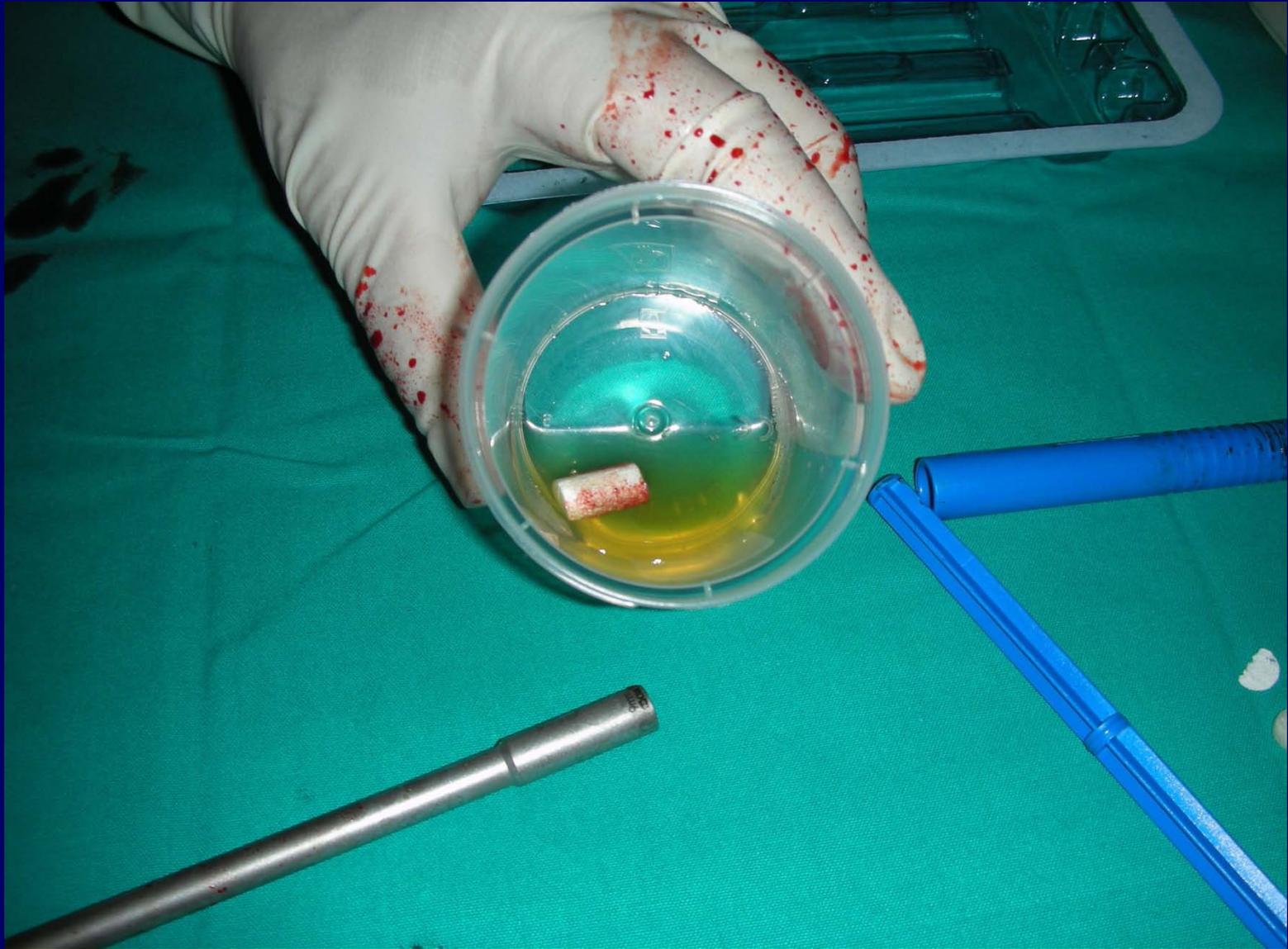
# VARIANTI

- RACCOLTA DA MIDOLLO)  
(pre-deposito)
- CD133+  
[50.000.000]
- IMPIEGO DI VETTORE SOLIDO + COAGULO PLASMATICO



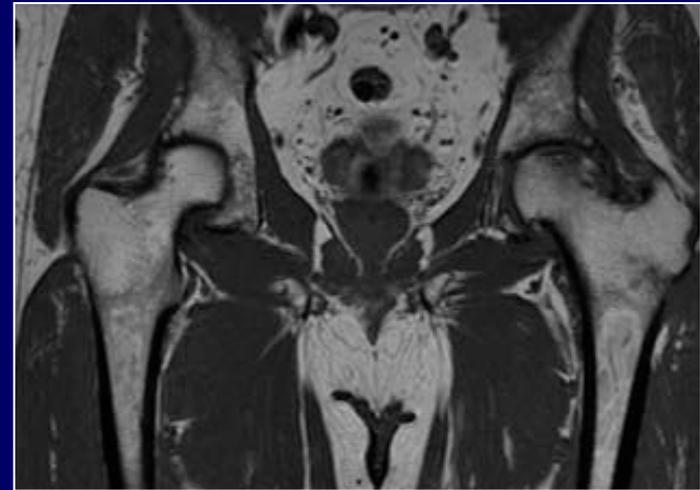
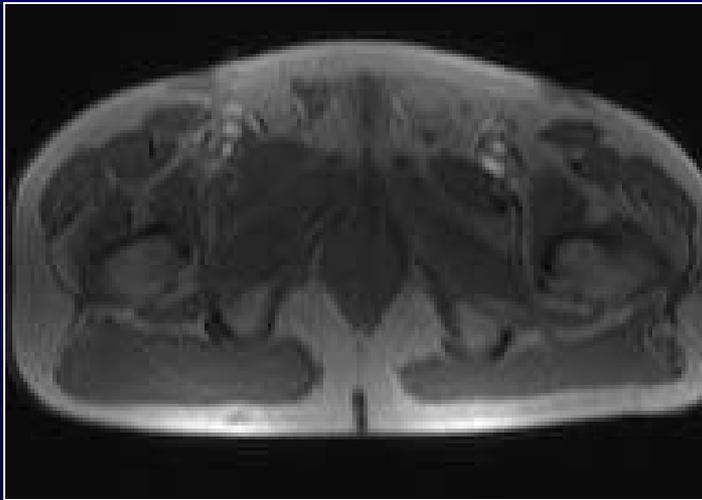
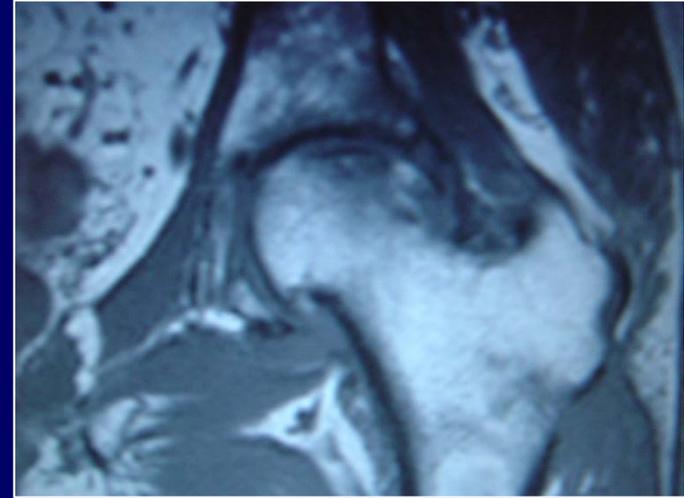
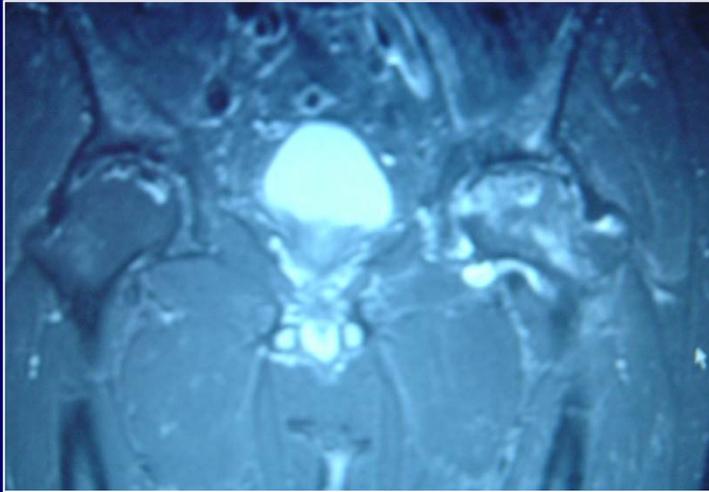
- Poroso e riassorbibile (9/12m)
- Composto da copolimeri di PLG (polylactide-co-glycolide), calcio fosfato e fibre di PGA (polyglycolide)
- Offre una buona struttura 3D per la ricrescita sia dell'osso che della cartilagine
- Aggiunta di surfattante



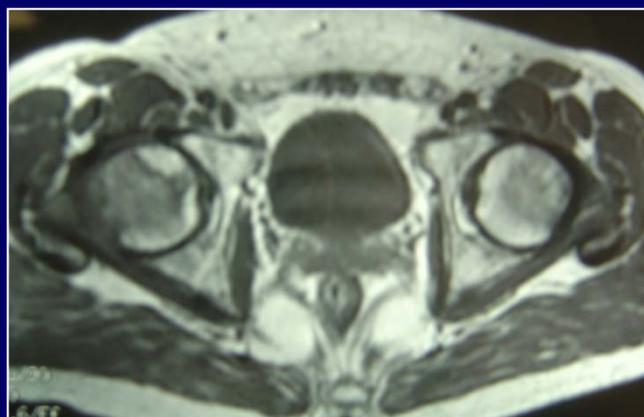
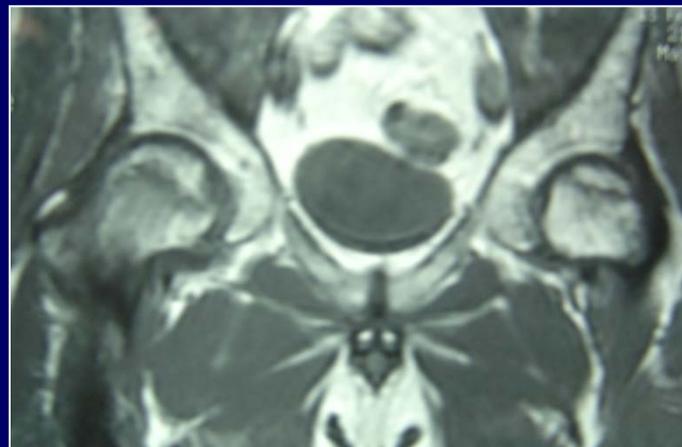


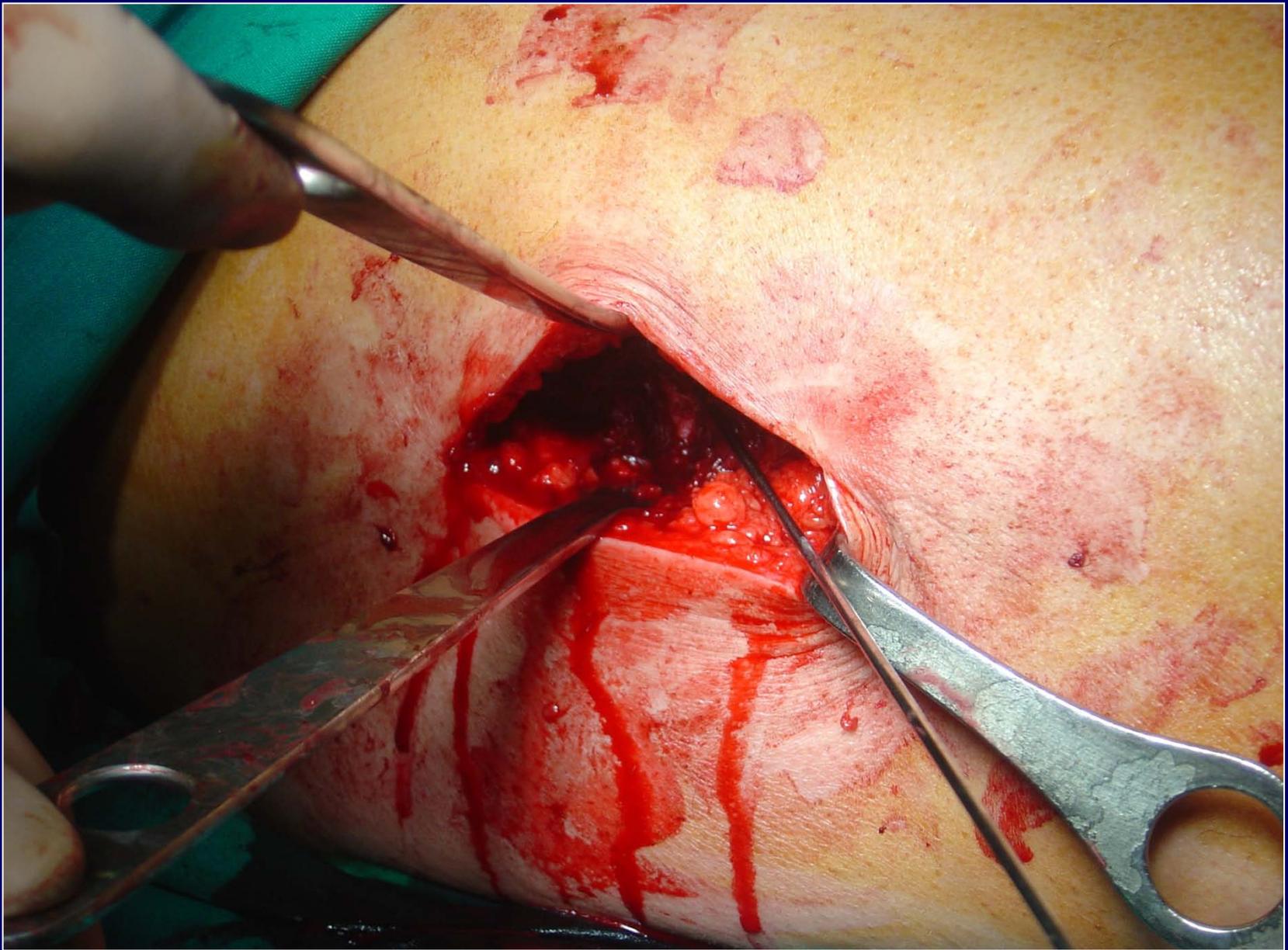


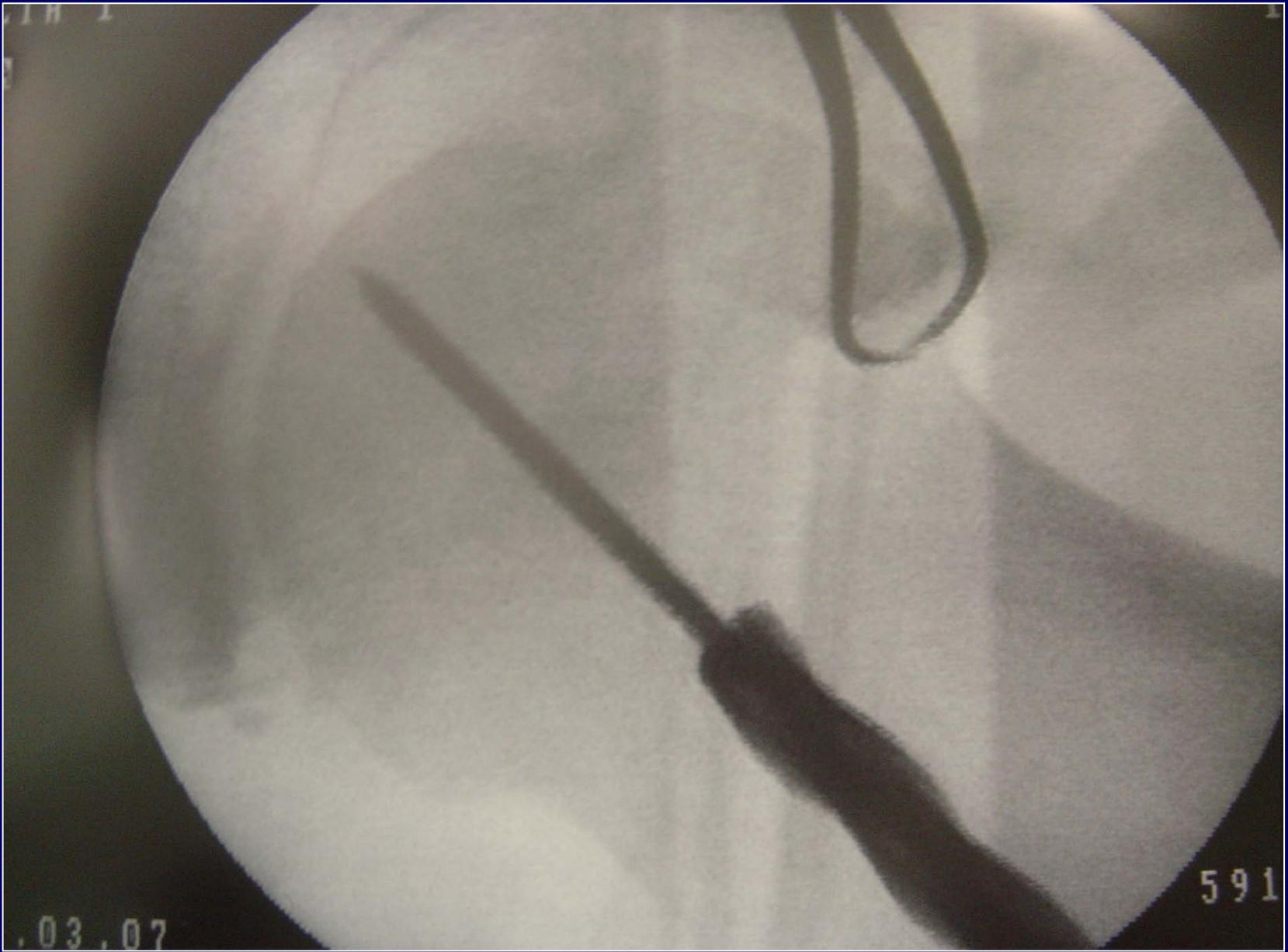
# FOLLOW UP 18 m



# II Variante







Standard  
LIH 1



15.03.07  
12.23  
/2

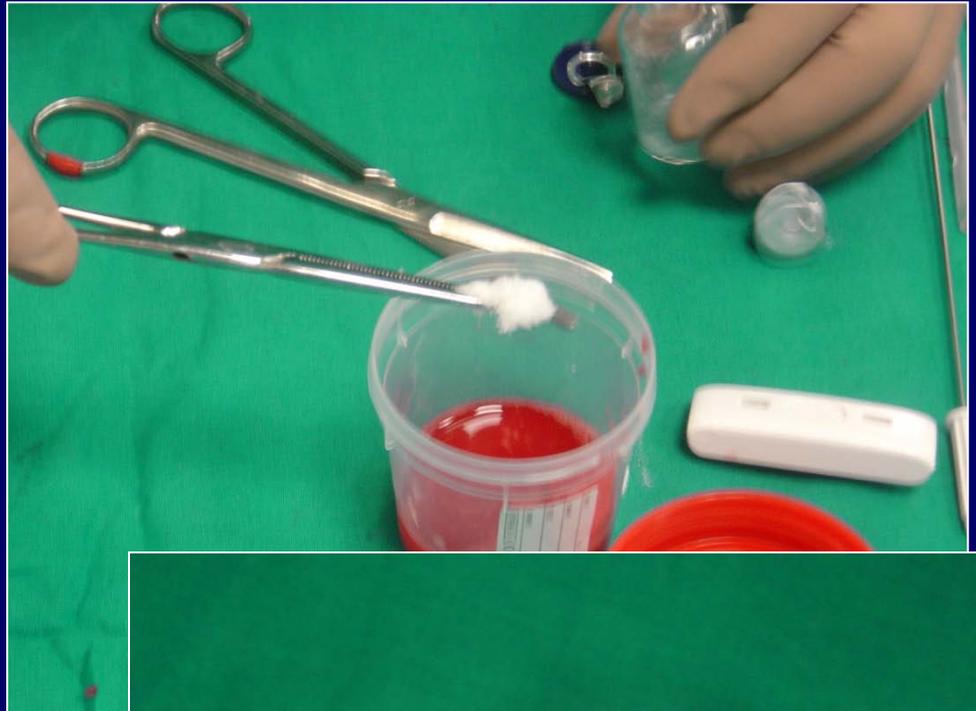
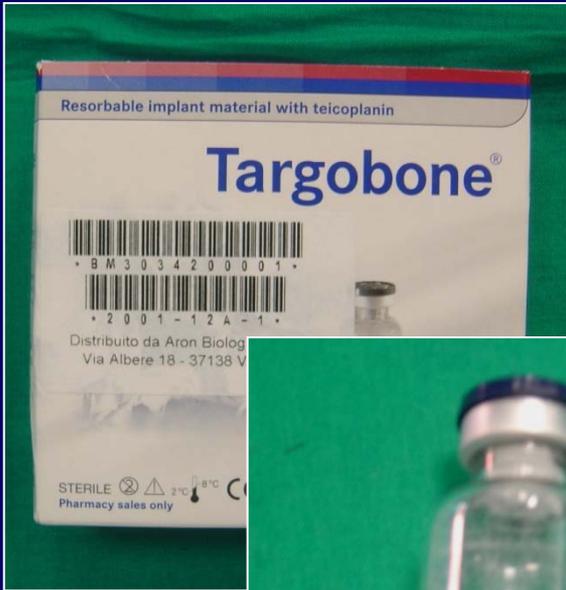


15.03.07  
ID: 20070315113554

1139eGy cm

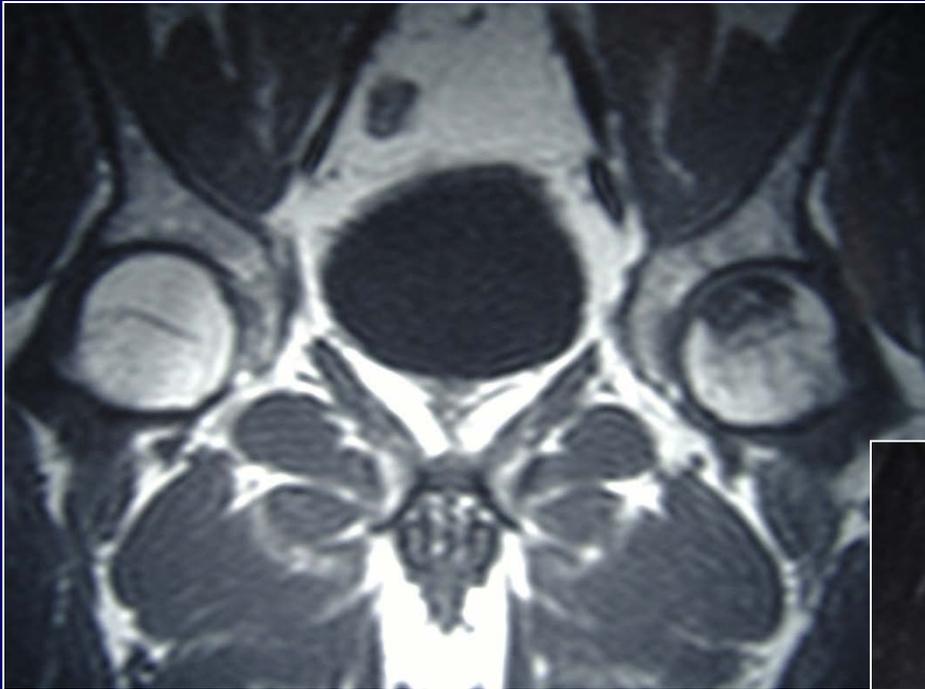
Siemens



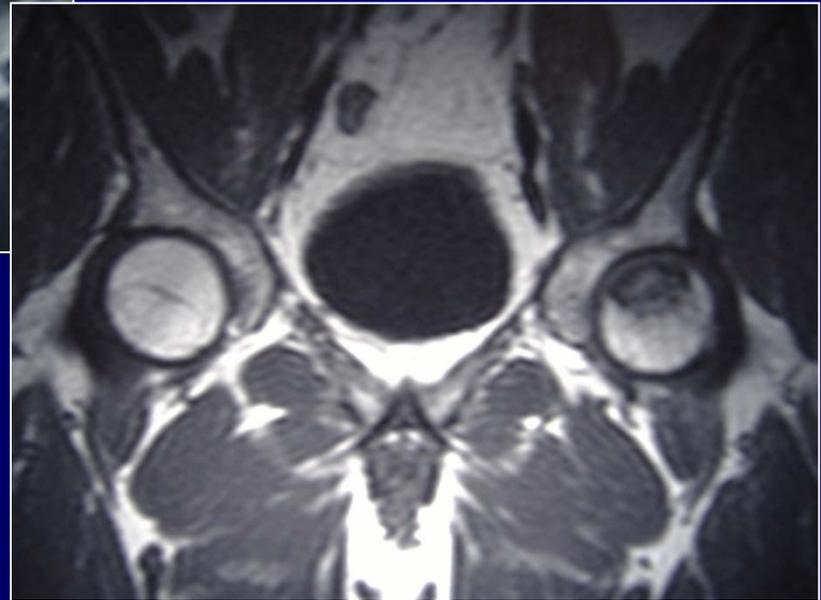


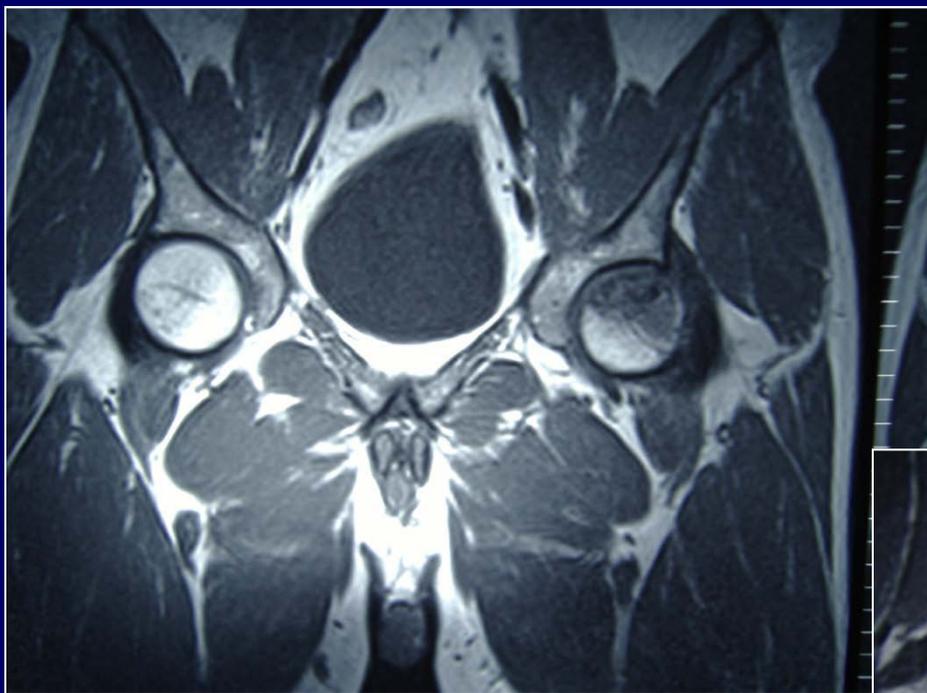




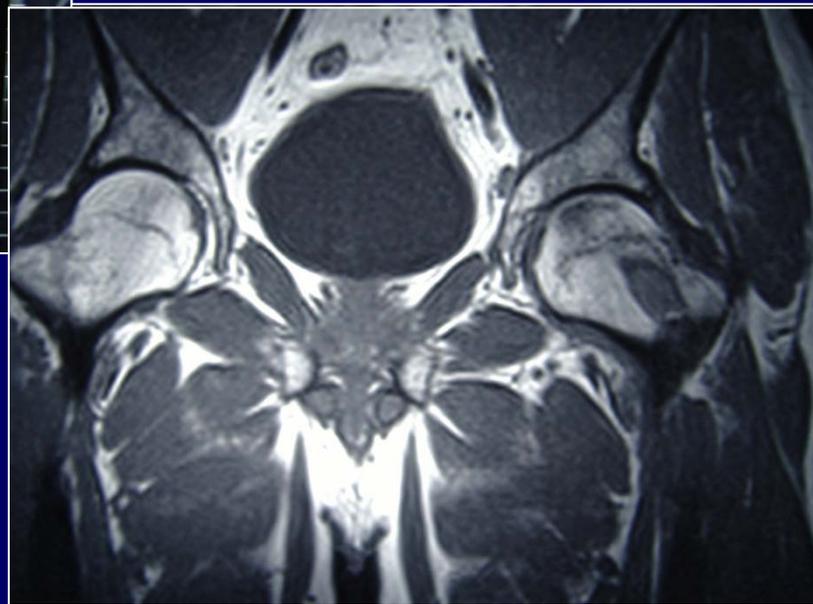


RMN Preoperatoria





**Controllo a 45 giorni**



# RISULTATI

Valore medio post-operatorio Harris Hip Score:  
83 rispetto a quello pre-impianto di 56

Valore medio post-operatorio VAS:  
1.5 rispetto a quello pre-impianto di 6

- Carico parziale a 3 settimane dall'intervento chirurgico e un carico totale a 5 settimane



- Core decompression associata ad impianto di cellule staminali CD133+ autologhe ha dato risultati molto incoraggianti seppure in una casistica ancora esigua
- Risposta più rapida con l'impiego di cellule staminali da sangue midollare
- I risultati vanno ascritti, secondo le N.S. conclusioni, alla presenza nel pool di cellule staminali CD133+ di cellule mesenchimali adulte ad alto potere proliferativo (Tatiana Tondreau 2005 Stem Cell)



La nostra sperimentazione clinica ci ha confermato che le CS, in risposta al danno, forniscono il pool di cellule "committed" che portano al ripristino della continuità anatomica e funzionale.

Incrementando la quota di CS è dunque possibile sovrastimolare il processo di guarigione.

I tempi di rigenerazione tissutale non sembrerebbero connessi alla carica cellulare quanto piuttosto ad un opportuno "indirizzo differenziativo". Probabilmente non è tanto il n.ro delle cellule importante quanto la "qualità" delle stesse.



# Prossimi steps ?

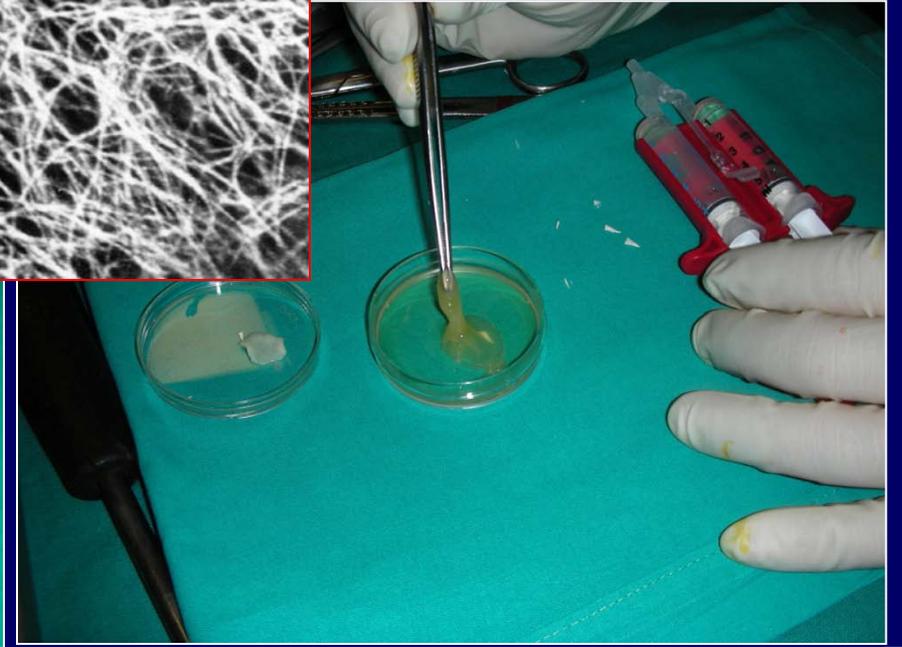
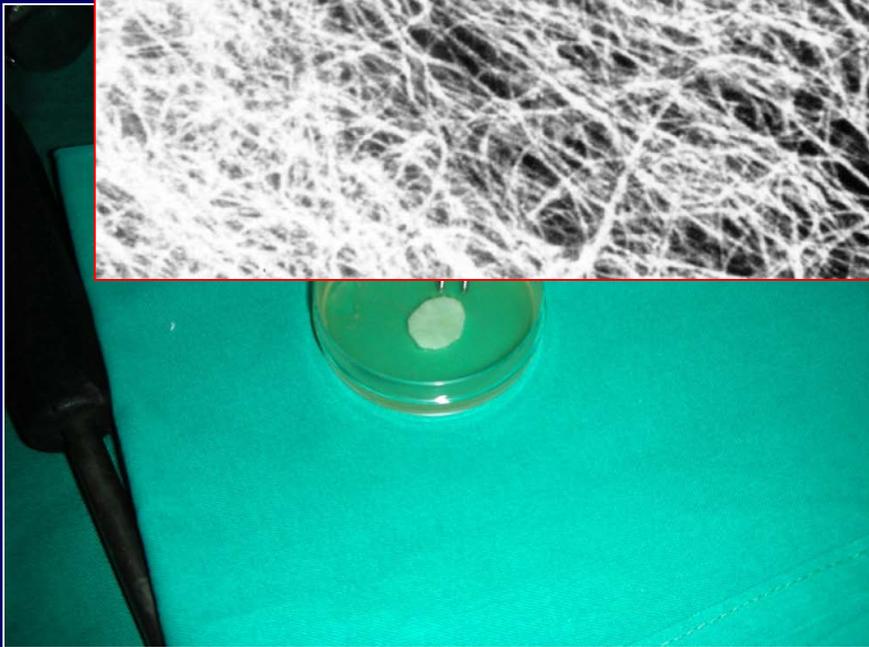
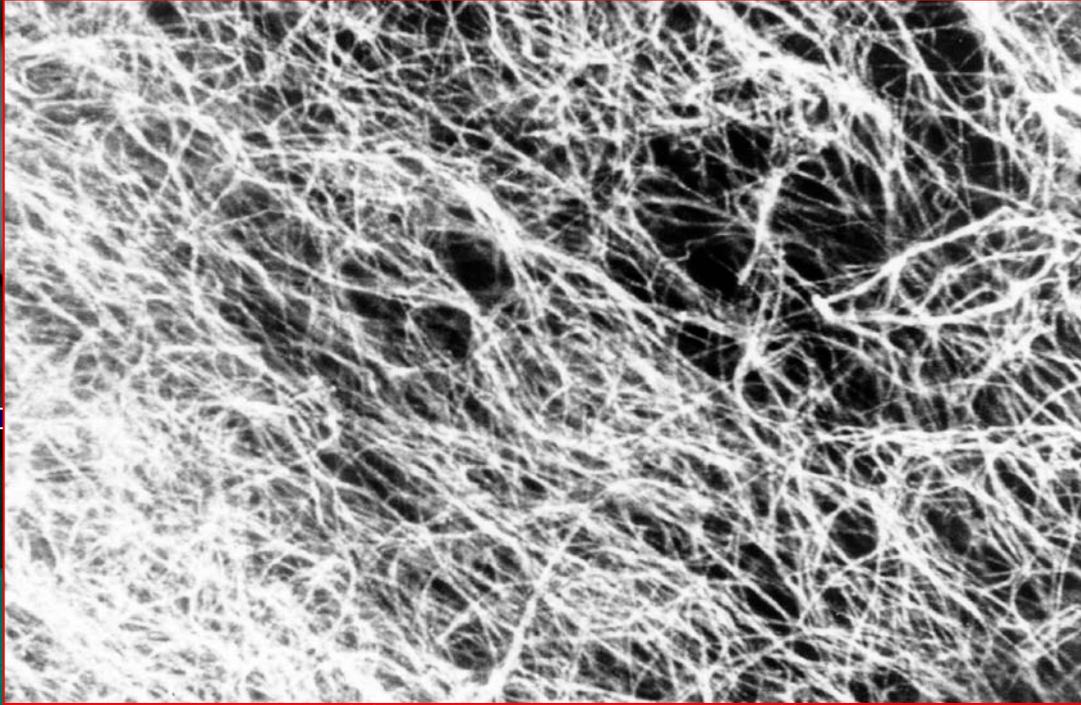
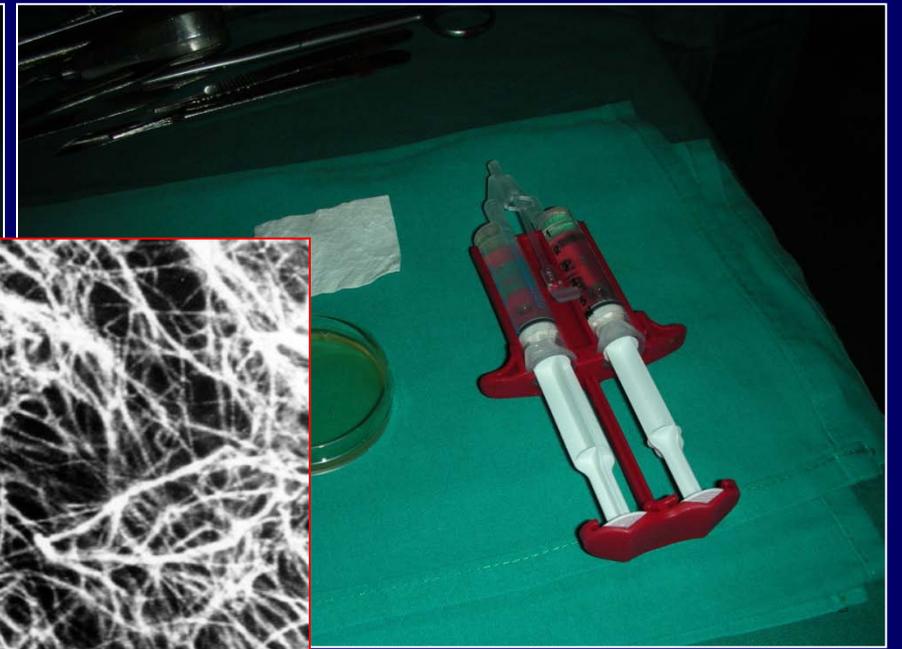
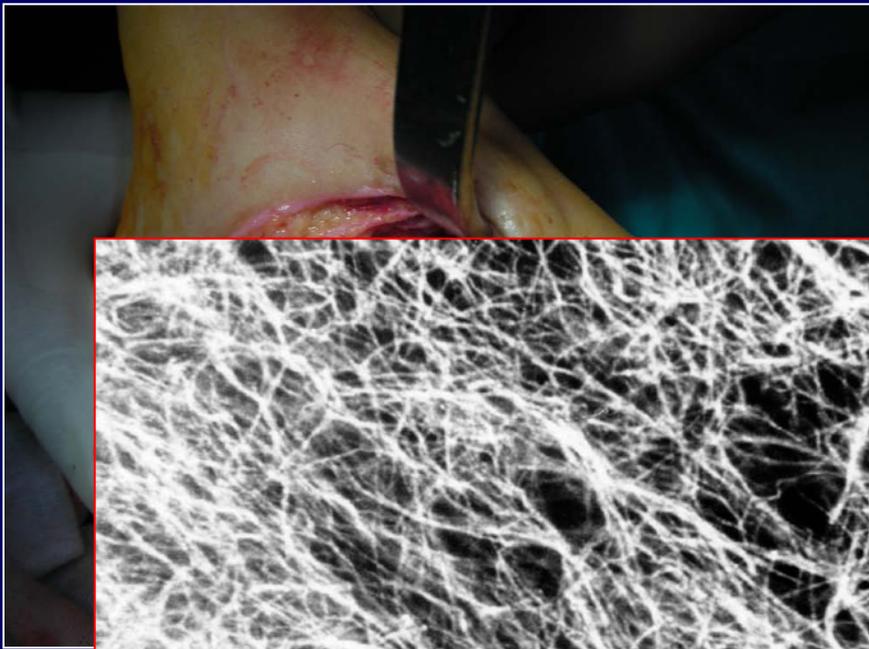
Danno Osteocondrale  
Pseudo artrosi con grossi gaps  
Ulcere cutanee profonde



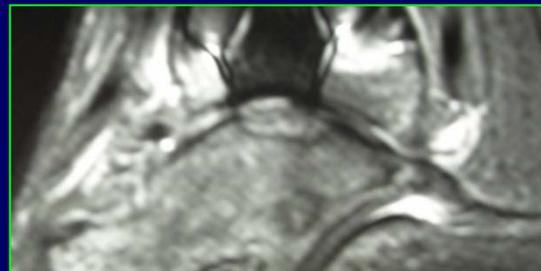
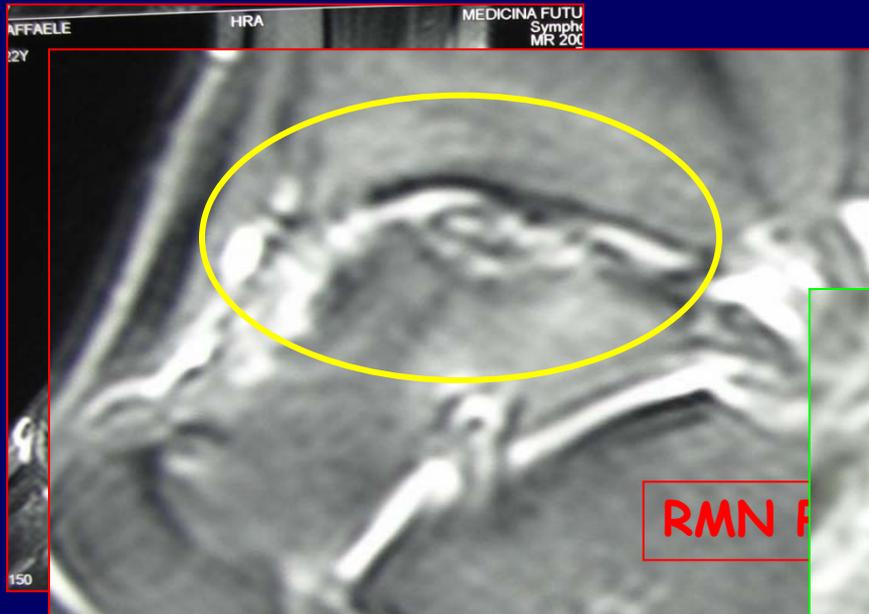
# DANNO OSTEOCONDRALE

- Maschio, 23 a.
- Insorgenza 8 a -  
2 artroscopie +  
condroplastica con  
perforazioni
- Stadiazione pre  
impianto: 2 cm<sup>2</sup> IV  
grado secondo  
Outerbridge



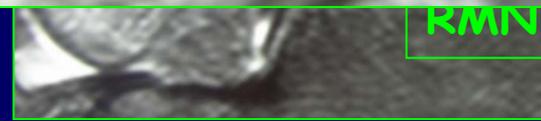
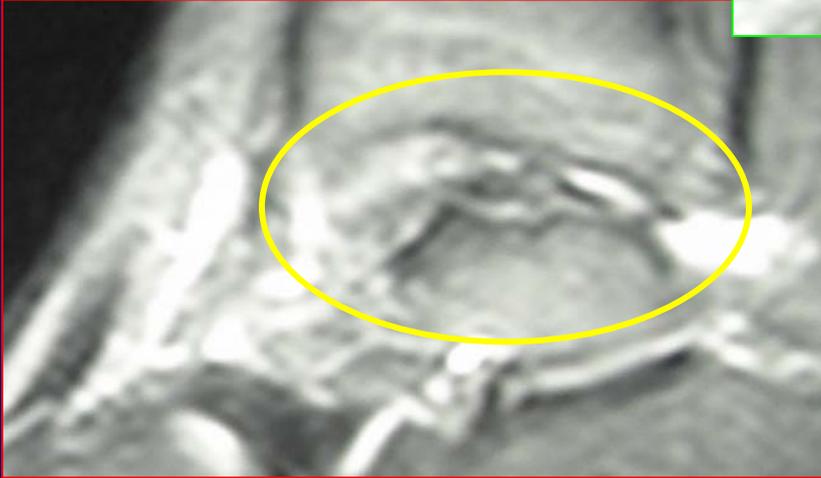




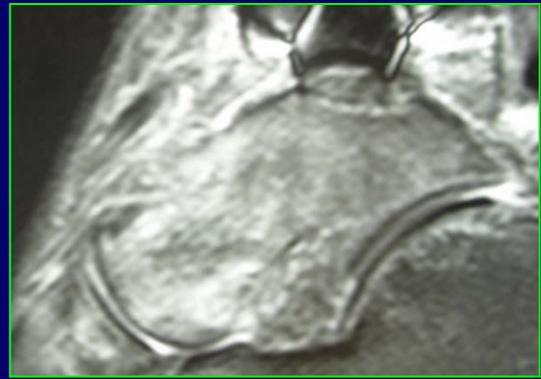


ENNELLO RAFFAELE  
RL M.  
2-Jul-83, M, 22Y  
TUDY 1  
4-Apr-06  
7:53:40  
1.22.31.12

RMN F



RMN 45 D



# Pseudoartrosi

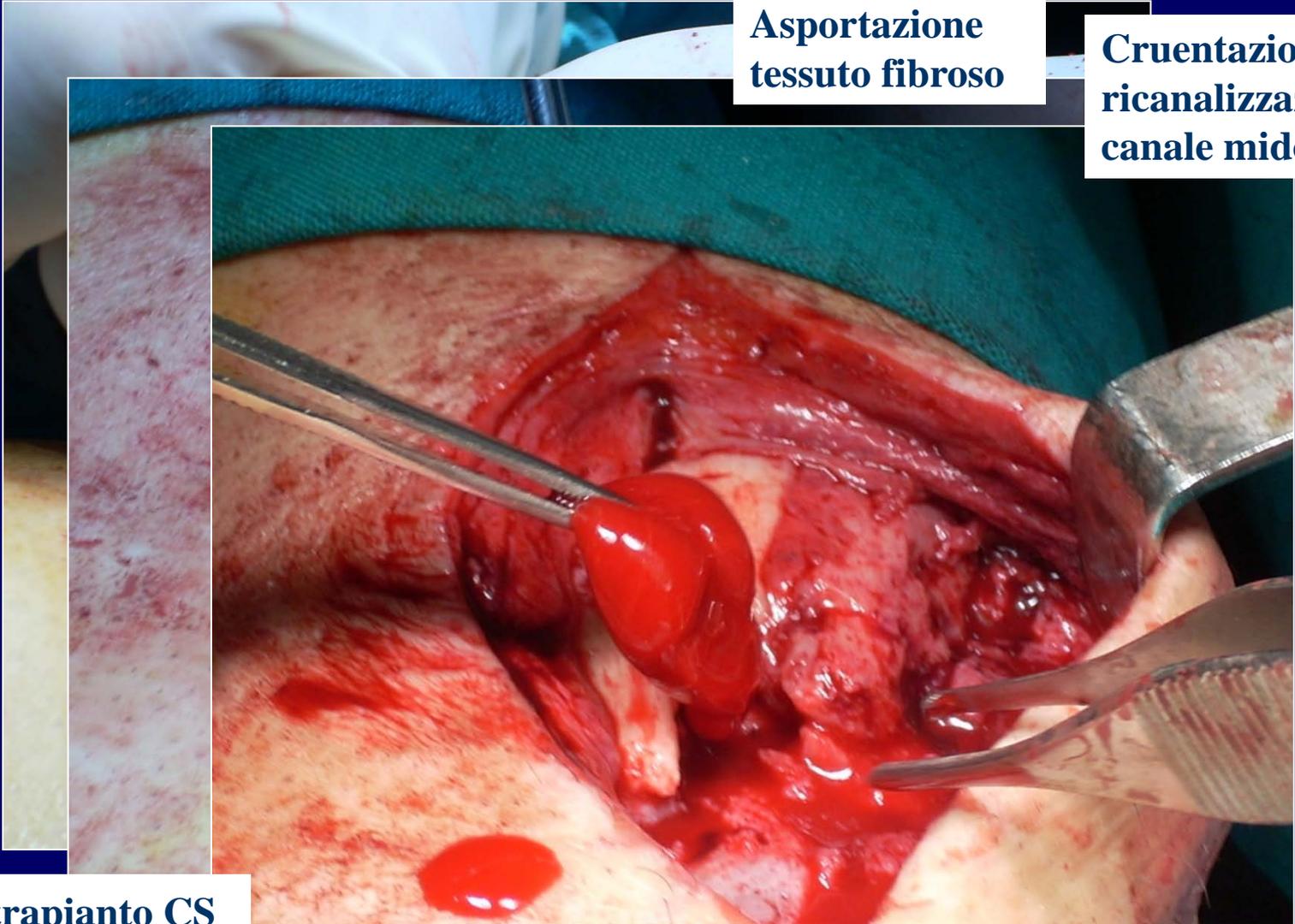


**Anni 36. In seguito a incidente stradale riportava frattura scomposta e pluriframmentaria di tibia. Trattato per un anno con fissatore esterno, chiodo endomidollare e onde d'urto. Nel marzo 2008 viene sottoposto a trapianto autologo di CS.**



**Asportazione  
tessuto fibroso**

**Cruentazione e  
ricanalizzazione  
canale midollare**



**trapianto CS**



**Rx preoperatoria**



**Risultato a 45 giorni**



# Ulcera Cronica



**A.S. di anni 26. Affetta da “malattia da briglie amniotiche”. Ulcera trofica secondaria a microtraumi con successiva osteomielite. A guarigione del processo settico l’ulcera, resistente ai trattamenti tradizionali, viene curata con CS.**



**Toilette chirurgica**

**Cruentazione  
margini**

**Iniezione CS  
nei margini**

**Applicazione CS  
sul fondo**





2 mesi



- E' sicuramente presto per trarre una qualsiasi conclusione
- I dati esposti fanno ritenere utile un maggiore approfondimento della metodica
- Le attuali normative di legge non agevolano il lavoro del Clinico e, soprattutto, non consentono l'impiego di staminali, sicuramente fornite di maggiori potenzialità evolutive.
- Il futuro di utilizzo di cell. coltivate rappresenterà un notevole passo avanti nello sviluppo e nel perfezionamento della metodica



Conclusioni :  
??



*Prof. A. Tabilio*

*Dott. F. Falzetti*

*Prof. N. Scarpato*

*Dott. C. Cacciapuoti*

*Dott. E. d' Agostino*

*Dott. G. de Rosa*

*Dott. C. Becchimanzi*

*Prof. S. Montagnani*

*Dott. L. Vallefucio.....*

.....

**zie!!**

