**Uso di cellule mononucleate midollari in severe patologie ortopediche**

**BONE MARROW NUCLEATED CELLS IN SEVERE ORTHOPEDIC DISEASES**

**AUTORI:
 Messina G.\*; Topa G.\*\*; Africa L.\*\*\***

* ***Responsabile Unità Operativa Semplice Centro Trapianti Midollo Osseo “A. Neri”, Azienda Ospedaliera “Bianchi-Melacrino-Morelli”, Reggio Calabria.***

***\* \* Direttore Unità Operativa Complessa di Ortopedia Azienda Ospedaliera “Bianchi-Melacrino-Morelli” Reggio Calabria.***

***\*\*\* Unità Operativa Complessa di Anatomia Patologia Azienda Ospedaliera “Bianchi-Melacrino-Morelli” Reggio Calabria*.**

Indirizzo e-mail: gspmessina@virgilio.it

**Parole chiavi:** cellule mesenchimali, cellule monucleate midollari, patologie ortopediche.

**Key words:** mesenchymal cells, bone marrow nucleated cells, orthopedic diseases.

**Riassunto:**

Il midollo osseo contiene oltre che le emopoietiche anche cellule mesenchimali in grado di differenziarsi e generare tessuti di tipo mesenchimale come i precursori delle cellule ossee.

Sulla base di questa osservazione abbiamo sottoposto 15 pazienti con severe patologie ortopediche e che hanno fallito i convenzionali trattamenti ortopedici all’impianto di cellule mononucleate midollari autologhe nella sede della lesione.

Di questi nove entro sei mesi hanno recuperato la piena funzionalità dell’arto.

Questi dati pur rappresentando una piccola coorte di pazienti dimostrano che è una procedura fattibile e con rischi trascurabili per il paziente.

**Abstract:**

The bone marrow contains hematopoietic cells as well as the mesenchymal cells that can differentiate and generate tissue-type mesenchymal cells as the precursors of bone cells.

Based on this observation we treated 15 patients with severe orthopedic disease and who have failed conventional treatments orthopedic.

We implanted autologous bone marrow mononuclear cells into the lesion site.

Of these, 9 recovered within six months the full functionality of the limb.

These data while representing a small cohort of patients show that a procedure is feasible and with negligible risk for the patient.

**Introduzione:**

Tutte le cellule del tessuto connettivo lasso, gli elementi del sangue, della cartilagine e del tessuto osseo, le fibrocellule muscolari lisce e le cellule endoteliali derivano direttamente o indirettamente durante lo sviluppo embrionale da cellule midollari che possiedono le corrispondenti potenzialità differenziative.

Nell'organismo adulto persistono cellule che conservano tali potenzialità evolutive.

In modo particolare il midollo osseo contiene, oltre alle cellule emopoietiche in grado di generare i progenitori delle cellule ematiche, cellule non emopoietiche chiamate *"cellule mesenchimali"* (MC), in quanto capaci di rigenerare tessuti di tipo mesenchimale (1).

Le MC, infatti, sono dotate di potenzialità di auto-mantenimento e di differenziazione multilineare in senso osteoblastico, condrocitario, adipocitario, mioblastico, fibroblastico e in cellule tendinee (2,3,4).

A ciò va aggiunto che parte di tale progenie cellulare contribuisce a costituire il microambiente del midollo osseo, ovvero il supporto strutturale sul quale è impiantato il processo emopoietico.

Il microambiente midollare gioca un ruolo fondamentale nella regolazione e differenziazione emopoietica essenzialmente attraverso due meccanismi:

1. La sintesi di fattori di crescita e citochine regolatrici;
2. L'espressione di molecole adesive e la produzione di proteine della matrice extracellulare che compartimentalizzano le molecole regolatrici.

In assenza di un sistema di coltura in grado di valutare quantitativamente e qualitativamente la MC, l'unica classe di progenitori stromali attualmente saggiabili in vitro è rappresentata dalle CFU-F (fibroblastic colony-forming cells) (5).

Le CFU-F generano in vitro colonie di fibroblasti in grado di differenziare in senso adipocitario (6) in presenza di cortisone e di generare uno spettro completo di cellule mesenchimali se trapiantate sotto la capsula renale di un ricevente singenico.

Il ruolo dello stroma midollare nella regolazione emopoietica e le peculiari caratteristiche funzionali delle cellule stromali consentono di ipotizzare l'impiego clinico di progenitori mesenchimali non manipolati o generati *ex vivo* (3).

Le MC potrebbero essere utilizzate in associazione o meno a cellule staminali emopoietiche allo scopo di *"rigenerare"* il microambiente midollare danneggiato dalla chemio-radioterapia per migliorare la ricostituzione mieloide e linfoide dopo trapianto di cellule staminali (9,10).

Il razionale per l'utilizzo delle MC come nuovo approccio terapeutico nel trattamento di disordini di tipo osteopenico (1,5,6,7,8) deriva dalla constatazione delle potenzialità evolutive di questo gruppo di cellule e, in modo particolare, da studi condotti in animali da esperimento con difetti ossei clinici significativi nei quali le MC si sono mostrate capaci di rigenerare tessuto osseo se iniettate a livello locale.

Nell'uomo è ipotizzabile che l'uso clinico di cellule mesenchimali da reinfondere *in vivo* possa essere preceduto dall'isolamento di progenitori mesenchimali dal sangue midollare e dalla loro espansione *ex vivo* in condizioni di coltura standardizzate.

Le patologie di interesse ortopedico che potrebbero trarre un vantaggio da questo tipo di trattamento includono condizioni estremamente invalidanti in cui il trattamento ortopedico convenzionale non è risultato risolutivo e/o richiede molti mesi per una completa risoluzione.

**Pazienti** **e metodi**

Tutti i casi inseriti in questo programma di lavoro sono stati autorizzati dal Comitato Etico dell’Azienda Ospedaliera *“Bianchi-Melacrino-Morelli”*.

Sono stati trattati 15 pazienti, 9 maschi e 6 femmine con una età mediana di 38 anni (r.3-67).

Le patologie ortopediche sono elencate nella tabella 1.

Le fasi che caratterizzano la procedura comprendono la collezione autologa di piastrine, la collezione di cellule mononucleate midollari (BMNC), la manipolazione in laboratorio delle stesse cellule, la preparazione ortopedica del paziente, l’impianto delle cellule midollari nella sede della lesione (tabella 2).

Brevemente, il paziente si sottopone a collezione di piastrine autologhe presso il Centro di immunoematologia trasfusionale.

Queste cellule sono indispensabili perché ricche di fattori di crescita capaci di indurre la trasformazione delle cellule mononucleate midollari in cellule ossee.

Il prelievo di BMNC è effettuato in sala operatoria, in anestesia locale, dalle creste iliache posteriori mediante prelievi multipli con apposito ago fenestrato.

Vengono aspirate e conservate in siringa quantità di sangue midollare in funzione delle dimensioni della lesione.

Le siringhe contenenti le BMNC vengono poi trasferite in laboratorio e svuotate in apposito contenitore sterile per iniziare la manipolazione.

Il contenuto è distribuito (eventualmente dopo essere stato filtrato per rimuovere aggregati) in provette da centrifuga da 50 mL e centrifugato a 2.000 rpm per 10 min. senza freno.

Si aspira il sovranatante; si raccoglie il buffy e si riunisce in un'unica provetta.

Si prelevano 500 µL, che vengono diluiti 1:10 in HBSS, per effettuare:

1. Conta di cellule totali midollari;
2. Percentuale di cellule CD45+/14+ e CD34+/45+ (esame effettuato sullo stesso campione della conta);
3. Tests clonogenici (CFU-GEMM/BFU-E/CFU-GM, CFU-F);
4. Piastratura in fiasca da 75 cm2 per verifica espansione: si piastrano 12x106 TNC in Iscove+FBS 10% + Ultroser-G 2%. Dopo 14 gg le fiasche vengono tripsinizzate, contate le cellule e valutate per la presenza di CD14 ed eventualmente ripiastrate per test differenziativi.

Il controllo di sterilità viene effettuato utilizzando il pellet eritrocitario, per evitare un'ulteriore perdita cellulare.

Dal Servizio di Immunoematologia Trasfusionale si preleva la sacca di piastrine autologhe e se ne misura il volume.

Nel caso di reimpianti di piccole dimensioni (es. pseudoatrosi) o di elevato volume del concentrato piastrinico questo può essere trasferito in sacca transfer da 300 ml e centrifugato a 2500 rpm; il plasma viene estratto in un'altra sacca transfer e conservato per fornire i necessari fattori della coagulazione.

Le BMNC vengono immesse in beker sterile di vetro; vengono aggiunte le piastrine, il plasma (ad un volume che viene valutato sulla base di quello della lesione), quindi la matrice ossea da banca o autologa ed aggiunti 25μl di CaCl2 1M/ml della sospensione così ottenuta con siringa da 2,5ml.

Il beker viene ruotato delicatamente fino alla completa coagulazione del preparato (circa 5 min); man mano che, per effetto della spremitura del coagulo, si forma del siero, questo viene aspirato in siringa e trasferito in contenitori da emocultura per il controllo di sterilità.

La provetta contenente le BMNC viene infine portata in sala operatoria di Ortopedia dove nel frattempo il paziente è stato preparato dal punto di vista ortopedico, ovvero messo nelle condizioni di poter immettere proficuamente le cellule nella sede della lesione.

Una volta collocate le cellule, il paziente viene risvegliato e trasferito in reparto.

Le valutazioni del recupero sono di tipo funzionale soprattutto radiologico.

In tal senso il paziente verrà sottoposo a radiografie seriate.

In particolare, la valutazione sarà basata su immagini radiografiche tradizionali sulle due proiezioni, sia prima del trattamento, sia con controlli successivi ogni 15 giorni per i primi due mesi e, quindi, ogni 30 giorni, proseguendo i controlli strumentali e clinici per almeno tre mesi dalla consolidazione.

La consolidazione è intesa come rimozione completa del sistema di fissazione esterna per gli allungamenti e la concessione del carico libero da appoggi per le pseudoartrosi e la riabilitazione di cavità ossee.

Nelle pseudoartrosi e nei casi neoplastici, a completamento diagnostico, verranno anche eseguiti controlli T.C. prima del trattamento, dopo un mese e dopo tre mesi.

**Risultati**

Nessun paziente ha presentato complicanze infettive post-operatorie.

Tre pazienti nei controlli post-intervento non si sono presentati per cui non è possibile valutare la risposta.

Tre pazienti dopo un beneficio di breve durata sono ritornati con la lesione preesistente all’intervento.

Nove pazienti hanno manifestato un graduale miglioramentofino al completo recupero della funzionalità dell’arto (vedi figura 1 come modello esemplificativo).

Il completo recupero è stato documentato non prima dei sei mesi.

**Case report**

Una donna di 51 anni affetta da una malattia ematologica, Mieloma Multiplo micromolecolare e lesioni litiche in sede femorale è stata dapprima sottoposta a trapianto di midollo osseo autologo e poi a trapianto da donatore familiare HLA compatibile.

Dopo 6 mesi, avendo manifestato una completa ricostituzione ematologica e immunologica del donatore e persistendo le lesioni litiche femorali, la signora è stata sottoposta ad intervento chirurgico ortopedico di stabilizzazione con applicazione di BMNC.

In pochi mesi è stata documentata la riparazione del danno osseo.

Purtroppo, però, a causa della ripresa della malattia ematologica di base, dopo due anni la signora manifesta una nuova limitazione funzionale dell’arto.

**Commenti**

Questi dati preliminari, nonostante il piccolo numero di casi riportati, dimostra che l’uso delle BMNC nelle patologie ortopediche è fattibile con bassissimo rischio per il paziente in termini di tossicità immediata e tardiva.

Ricordando la severità delle diagnosi ed i fallimenti delle terapie convenzionali, la procedura ha dimostrato una tangibile efficacia avendo assicurato ad un esteso gruppo di pazienti il recupero dell’arto interessato.

Tutto ciò porta ad intuibili favorevoli implicazioni sociali e a riduzione dei costi sanitari derivanti da lunghi e spesso inutili programmi riabilitativi.

**References :**

1. *Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C.: Multilineage Potential of adult Human Mesenchymal Stem Cells.Science 1999 Apr 2;284(5411):143-147.*
2. *Darwin J. Prockop: Marrow Stromal Cells as Stem Cells for Nonhematopoietic Tissues. Science 1997 Apr 4;276(5309):71-4.*
3. *Majumdar M.K., Thiede M.A., Mosca J.D., Moorman M., Gerson S.L.: Phenotypic and Functional Comparison of Culteres of Marrow-Derived mesenchymal Stem Cells (MSCs) and Stromal cells.J Cell Physiol 1998 Jul;176(1):57-66.*
4. *Ph. Hernigou, F. Beaujean: Pseudarthroses traitees par greffe percutanee de moelle osseuse autolugue.Revue de chirurgie orthopedique, 1997,83, 495-504.*
5. *Bruder S.P., Jaiswal N., Haynesworth S.E.: Growth Kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcoltivation and following cryopreservation. J Cell Biochem 1997 Feb;64(2):278-94.*
6. *Nuttal M.E., Patton A.J., Olivera D.P.: Human trabecular bone cells are able to express both osteiblastic and adipocytic phenotype: implications for osteopenic disorders. J Bone Miner Res 1998 Mar;13(3):371-82.*
7. *Jaiswal N., Haynesworth S.E., Caplan A.I.: Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. J Cell Biochem 1997 Feb;6 4(2):295-312.*
8. *Koller M.R., Manchel I., Palsson B.O.: Importance of parenchymal:stromal cell ratio for the ex vivo reconstitution of human hematopoiesis. Stem Cells 1997;15(4):305.*
9. *Bruder S.P., Kurth A.A., Shea M.: Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. J Orthop Res 1998 Mar;16(2):155-62.*
10. *Alwattar B J, Schwarzkopf R, Kirsch T: Stem cells in Orthopaedics and fracture healing. Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases 2011; 69 (1): 6-10.*

**Tabella 1: Malattie ortopediche sottoposte a trattamento**

|  |  |
| --- | --- |
| Perdita traumatica di matrice ossea | 7 |
| Pseudoartrosi | 5 |
| Cisti ossee | 2 |
| Tumore osseo | 1 |
| Totale | 15 |

**Tabella 2 Caratteristiche del midollo osseo prelevato**

|  |  |
| --- | --- |
| Volume mediano collezionato (ml) | 125 (r.62-180) |
| N. mediano BMNC (x10E9) | 0,90 (r.0,5-1,5) |
| N. mediano BMNC (x10E9) impiantato | 0,73 (r.0,32-1,3) |
| CD34% (cellule staminali) collezionate | 0,8 (r.0,03-1,3) |
| CFU-F | 1 (r.0-3) |



**Figura 1:** Lesione post-traumatica sottoposta ad impianto di cellule midollari mononucleate valutate radiologicamente dopo un mese dall’intervento. La cavità è completamente sostituita da tessuto osseo rigenerato.