

L'ingegneria tissutale: utilizzo di fattori di crescita e cellule staminali in traumatologia dello sport

Tissue engineering: use of growth factors and stem cells in sports traumatology

E. Castellacci
P. Lunati
E. Orsoni

RIASSUNTO

I progressi dell'ingegneria tissutale dell'ultimo decennio hanno consentito lo sviluppo di nuovi tipi di trattamento anche nell'ambito della traumatologia dello sport. Questi nuovi trattamenti comprendono l'utilizzo di fattori di crescita e di cellule staminali.

È stato ormai ampiamente dimostrato come i fattori di crescita contenuti nel PRP (*platelet rich plasma*) ottenuto mediante centrifugazione di sangue autologo, applicati nel sito di lesione tissutale determinano l'attivazione e l'accelerazione dei processi fisiologici di guarigione tissutale.

Attualmente nel nostro Dipartimento di Medicina e Traumatologia dello Sport stiamo impiegando il PRP in forma liquida mediante infiltrazione eco-guidata nel sito di lesione per il trattamento di lesioni muscolari di 3°-4° grado, tendinopatie e nella sindrome retto-adduttoria. Con un ulteriore procedimento è possibile ottenere il PRP in forma di membrana, che può essere comodamente suturato in corrispondenza della zona lesionata.

Stiamo utilizzando questa tecnica nel trattamento delle lesioni della cuffia dei rotatori della spalla, nelle rotture sottocutanee del tendine di Achille e stiamo anche sperimentando l'utilizzo di questa membrana nella ricostruzione del legamento crociato anteriore con legamento artificiale.

Per quanto concerne le cellule staminali, il loro utilizzo è riservato quasi esclusivamente al trattamento di lesioni cartilaginee. Le cellule staminali mesenchimali adulte vengono ottenute mediante un aspirato di midollo osseo che viene eseguito durante la stessa seduta operatoria.

Le sedi da cui il midollo osseo può essere prelevato sono varie, ma solitamente viene scelta la cresta iliaca, attraverso l'aspirazione con apposito strumento.

Dopo il prelievo, le cellule staminali vengono applicate su scaffold di acido ialuronico e quindi applicate nel sito di lesione cartilaginea.

Le cellule ricavate dal midollo osseo possono quindi rappresentare una valida alternativa nel trattamento di lesioni condrali inferiori ai 2 cm.

In conclusione, il fascino dell'ingegneria tissutale e della terapia genica è in generale enorme nel mondo scientifico attuale e sicuramente rappresenterà il futuro.

Per la nostra esperienza siamo fortemente motivati a continuare la ricerca e la sperimentazione in questo seducente campo, tenendo ben presente i potenziali rischi che potrebbero verificarsi con questo tipo di manipolazioni.

Parole chiave: cellule staminali, fattori di crescita, PRP, PRFM

Azienda USL 2 Lucca,
 Dipartimento Ortopedia-
 Traumatologia e Medicina
 dello Sport, Centro Studi
 e Sperimentazioni Ingegneria
 Tissutale; Centro di Riferimento
 Regionale per la Medicina
 e Traumatologia dello Sport

Indirizzo per la corrispondenza:
 E. Orsoni
 Azienda USL 2 Lucca
 Dipartimento di Medicina
 e Traumatologia dello Sport
 Tel. 0583 970301
 E-mail: enrico.orsoni@libero.it

Ricevuto il 3 ottobre 2009
Accettato il 13 ottobre 2009

SUMMARY

Progress in the field of tissue engineering in the past decade has allowed the development of new types of treatment also in the Sports Traumatology sector.

These new treatments include the use of growth factors and stem cells. It has now been widely shown that the growth factors contained in the PRP (platelet rich plasma) obtained through centrifugation of autologous blood, applied onto the site of tissue damage, give rise to the activation and acceleration of the tissue healing physiological processes.

At present, in our Department of Medicine and Sports Traumatology, we are using liquid PRP (platelet rich plasma) by echo-guided infiltration at the site of damage for the treatment of muscle lesions of the 3rd-4th degree, tendinopathies and in the rectum-adductor syndrome. By a further procedure it is possible to obtain the PRP in the form of a membrane, which can be easily sutured at the zone of damage.

We are using this technique in the treatment of lesions of the shoulder rotator cuff, in subcutaneous lesions of the Achilles tendon and we are also experimenting the use of this membrane in the reconstruction of the anterior cruciate ligament with artificial ligament.

As far as stem cells are concerned, their use is limited almost exclusively to the treatment of cartilaginous lesions. Adult mesenchymal stem cells are obtained by aspiration of bone marrow during surgery. There are numerous sites from which it is appropriate to remove

the bone marrow, but usually the iliac crest is chosen, by aspiration with a suitable device.

Following removal, the stem cells are placed on a hyaluronic acid scaffold and applied onto the site of cartilaginous lesion.

The cells obtained from the bone marrow can thus constitute a valid alternative in the treatment of chondral lesions smaller than 2 centimeters.

To conclude, tissue engineering and gene therapy currently enjoy a considerable appeal in the scientific community and will certainly represent the future.

In our experience, we are highly motivated to pursue research and experimentation in this fascinating field, while bearing in mind the potential risks associated with this type of engineering.

Key words: stem cells, growth factors, PRP, PRFM

L'ingegneria tissutale viene definita dallo *Scientific Committee on Medical Products and Medical Devices* della Commissione Europea, come la rigenerazione dei tessuti biologici ottenuta mediante impiego di cellule con l'aiuto di strutture di supporto e/o biologiche.

L'ingegneria tissutale prevede l'attuazione di procedure di rigenerazione dei tessuti del corpo umano mediante l'introduzione di cellule, su scaffolds (supporti su cui vengono inserite le cellule) di vario genere con l'ausilio dei fattori di crescita.

Tab. I. Principali fattori di crescita.

Fattore	Bersaglio cellula/tessuto	Funzione
PD-EGF (epidermal growth factor)	Cellule dei vasi sanguigni, cellule dell'epidermide Fibroblasti e altri tipi di cellule	Crescita cellulare, arruolamento Differenziamento, riparazione pelle Secrezione di citochine
PDGF, A + B (platelet-derived growth factor)	Fibroblasti, cellule della muscolatura liscia, condrociti, osteoblasti, cellule staminali mesenchimali	Crescita cellulare, arruolamento Crescita vasi sanguigni, granulazione Secrezione fattori di crescita; formazione matrice + BMPs (collagene e osso)
TGF-β1 (transforming growth factor beta 1)	Tessuto vasi sanguigni, cellule epidermide Fibroblasti, monociti Osteoblasti	Vasi sanguigni (+/-), sintesi collagene Inibizione crescita, apoptosi (morte cellulare) Differenziamento, attivazione
IGF-1,2 (insulin-like growth factor 1,2)	Osso, vasi sanguigni, pelle, altri tessuti Fibroblasti	Crescita cellulare, differenziamento, arruolamento Sintesi di collagene + PDGF
VEGF/ECGF (vascular endothelial GF)	Cellule dei vasi sanguigni	Crescita cellulare, migrazione, crescita di nuovi vasi sanguigni Anti-apoptosi (anti-morte cellulare)
bFGF (basic fibroblast growth factor)	Vasi sanguigni, muscolatura liscia, pelle Fibroblasti, altri tipi cellulari	Crescita cellulare Migrazione cellulare, crescita dei vasi sanguigni

Quindi il termine GF (*growth factor*) si riferisce a proteine capaci di stimolare la proliferazione ed il differenziamento cellulare¹.

La fonte da cui, attualmente, sono ottenuti i fattori di crescita è il PRP (*platelet rich plasma*), porzione di plasma ricco di piastrine, ottenuto mediante centrifugazione di una o più provette di sangue del paziente.

Il sangue contiene plasma, globuli rossi, globuli bianchi e piastrine. Il plasma è la parte liquida del sangue, costituito prevalentemente da acqua, e funge da trasportatore per le cellule. Il plasma inoltre contiene fibrinogeno, una proteina che viene trasformata in fibrina (dalla trombina) e che promuove l'aggregazione piastrinica. Il rapporto tra le cellule presenti nel sangue normalmente è così rappresentato: 93% globuli rossi, 6% piastrine e 1% globuli bianchi. Nel PRP questo rapporto è invertito in quanto abbiano un decremento della percentuale di globuli rossi

al 5% ed un incremento fino al 94% delle piastrine che sono maggiormente coinvolte nei processi di guarigione e rigenerazione tissutale².

Il PRP tipicamente contiene un milione e più di piastrine per microlitro, mentre normalmente nel sangue sono presenti nella misura di 180000/400000 unità per microlitro^{3,4}.

Le piastrine sono cellule anucleate di forma discoidale presenti nel tessuto sanguigno. Al microscopio elettronico si possono evidenziare al loro interno numerosi granuli di secrezione classificabili in tre tipi: alfa granuli; granuli densi e lisosomi^{3,4}.

Gli alfa granuli contengono numerosi fattori di crescita tra cui il PDGF (*platelet derived growth factor*) che promuove l'angiogenesi, epitelizzazione, la formazione di tessuto di granulazione e stimola la replicazione cellulare; il TGF (*transforming growth factor*) che promuove la for-



Fig. 1. Immagine RMN lesione muscolare 3° grado.



Fig. 3. Trattamento con infiltrazione di PRP di un caso di epicondilita cronica.



Fig. 2. Trattamento con infiltrazione ecoguiadata di PRP di una lesione muscolare di 3° grado.



Fig. 4. Trattamento con PRP nella pubalgia.

mazione della matrice extracellulare, e regola il metabolismo delle cellule del tessuto osseo; il VEGF (*vascular endothelial growth factor*) che promuove l'angiogenesi; l'EGF (*epidermal growth factor*) che promuove la differenziazione cellulare e stimola la riepitelizzazione, l'angiogenesi, l'attività delle collagenasi; FGF (*fibroblast growth factor*) che promuove la proliferazione delle cellule endoteliali e dei fibroblasti e stimola l'angiogenesi⁵⁻⁷ (Tab. I).

I granuli densi invece contengono: adenosina, serotonina, istamina e calcio.

L'adenosina è un nucleotide che gioca un ruolo importante in molti processi biochimici e in particolare nel trasporto di energia, inoltre è un agente citoprotettivo che previene il danneggiamento tissutale.

La serotonina è un neurotrasmettitore monoaminico che localmente può aumentare la permeabilità capillare anche più dell'istamina. Inoltre ha un effetto chemiotattico sui macrofagi e fibroblasti stimolando anche la proliferazione di questi ultimi.

L'istamina è un'ammina responsabile della reazione immunitaria locale, è un vasodilatatore che aumenta la permeabilità dei capillari e delle venule, favorendo l'accesso delle cellule del sistema immunitario e delle cellule coinvolte nella risposta infiammatoria locale nel tessuto danneggiato.

L'istamina inoltre è un potente attivatore dei macrofagi. Il calcio è l'ultimo componenti dei granuli densi ed è coinvolto nei processi di proliferazione e differenziazione dei cheratinociti e della migrazione e rigenerazione delle cellule dell'epidermide.

Il meccanismo di azione del PRP è stato ed è attualmente studiato. È ormai chiaro che il PRP induce la proliferazione di diversi tipi di cellule. In studi in vitro è stato dimostrato che il PRP inibisce il rilascio di IL-1 da parte dei macrofagi e riduce la proliferazione dei macrofagi stessi limitando il processo infiammatorio iniziale. Si ritiene, inoltre, che i fattori di crescita, rilasciati dopo l'attivazione del PRP da parte del collagene del tessuto connettivo, possano stimolare cellule staminali quiescenti a differenziarsi nel tipo di tessuto danneggiato portando quindi ad una rigenerazione del tessuto stesso⁴⁻⁷.

Comunque ulteriori studi dovranno

essere condotti per verificare ulteriormente il meccanismo di azione del PRP.

Utilizzo dei fattori di crescita in medicina dello sport

Nel campo della medicina e traumatologia dello sport i tessuti di interesse per la rigenerazione cellulare sono: 1) la cartilagine; 2) il tendine; 3) i legamenti; 4) il muscolo; 5) l'osso.

Da oltre un decennio è iniziato l'utilizzo dei fattori di crescita quali adiuvanti dei processi di riparazione ossea ed i campi in cui sono stati usati, oltre alla chirurgia ortopedica, comprendono anche la chirurgia plastica, quella maxillo facciale e la cardiocirurgia⁸⁻¹³.

Nel nostro Dipartimento di Ortopedia e Medicina e Traumatologia dello Sport abbiamo iniziato ad usare i fattori di crescita da oltre 5 anni sia nelle pseudoartrosi, sia nella chirurgia protesica maggiore quale gel piastrinico adiuvante nel ridurre il sanguinamento post-operatorio.

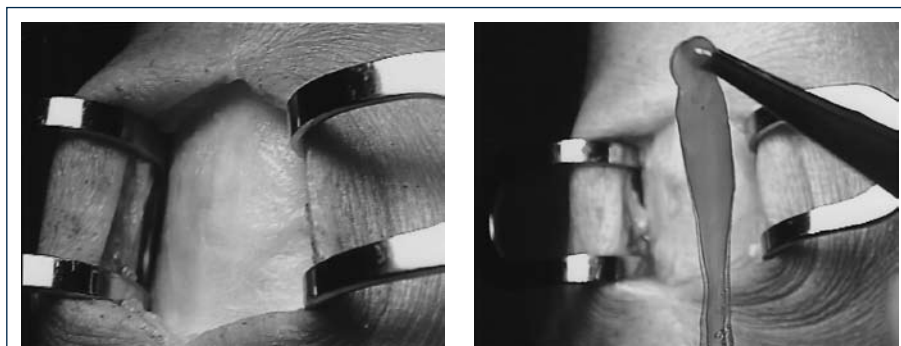
Le tecniche correntemente utilizzate determinano minime manipolazioni da parte del chirurgo ortopedico e sono applicabili, in base alla legislatura vigente, direttamente in sala operatoria.

Nel nostro Dipartimento utilizziamo il Sistema Regen PRP e PRFM per ottenere i concentrati piastrinici.

Con questo sistema riusciamo ad ottenere un concentrato sia di piastrine che di fibrina senza l'impiego di trombina esogena; in questo modo le piastrine restano intatte e si evita quindi la attivazione e la degranolazione precoce.

Il sistema Regen Lab Prp, con formazione di PRP liquido iniettabile, consiste in un prelievo di 8-9 cc di sangue per provetta Regen Lab, successivamente le provette vengono centrifugate per 8-10 minuti in questo modo si ottiene in ogni provetta un surnatante, separato dagli eritrociti, costituito da plasma ricco di piastrine.

Nel nostro Dipartimento abbiamo utilizzato il Sistema



Figg. 5-6. Applicazione fattori di crescita sotto forma di membrane (Regen Membrane PRFM).



Fig. 7. Prelievo midollo osseo dalla cresta iliaca.

Regen Prp nel trattamento delle lesioni muscolari di 2-3° grado, nelle tendinopatie inserzionali e nella sindrome retto adduttorica (pubalgia), applicando direttamente il PRP nella zona di lesione attraverso infiltrazioni sotto guida ecografica.

Una volta ottenuto il PRP in forma liquida, si può procedere ad una ulteriore centrifugazione delle provette utilizzando il Sistema Regen Membrane PFRM, in questo modo possiamo ottenere il concentrato piastrinico sotto forma di membrana che può essere comodamente suturata in corrispondenza della zona lesionata.

Abbiamo utilizzato questo sistema nel trattamento delle lesioni della cuffia dei rotatori della spalla, nel tratta-



Fig. 8. Lesione osteocondrale di 4° grado dell'astragalo.

mento delle rotture sottocutanee del tendine d'Achille secondo la nostra tecnica (Mac-Griffith modificato Castellacci) di tenoraffia percutanea, nel trattamento delle tendinopatie rotulee sia quando usiamo il Microdebridement con radiofrequenze (Figg. 5, 6), sia utilizzando la tecnica chirurgica di Fritschy modificata Castellacci spesso in associazione alla fascia lata liofilizzata da cadavere.

Nel nostro Dipartimento attualmente stiamo utilizzando nella ricostruzione del LCA con legamento artificiale "LARS" i fattori di crescita sotto forma di membrana e stiamo conducendo uno studio clinico confrontando 10 casi di legamentoplastica del LCA con solo LARS con altri 10 casi in cui al legamento artificiale abbiamo applicato i fattori di crescita in forma di membrana nella porzione del legamento che è situata nei fori ossei femorale e tibiale per valutare se ci sia una maggiore neoformazione fibroblastica sul legamento artificiale tale da permettere una anticipazione della osteointegrazione.

Particolare attenzione, abbiamo anche dedicato alla tecnica Maio-Regen. Si tratta di una metodica, che stiamo ancora verificando e che sembrerebbe apportare buoni risultati nelle gravi lesioni osteocartilaginee, in quanto dovrebbe promuovere la rigenerazione guidata del tessuto osteocartilagineo.

Trattamento con cellule staminali

Per quanto concerne invece le cellule staminali, il loro utilizzo è riservato, quasi esclusivamente al trattamento delle lesioni cartilaginee.



Fig. 9. Applicazione cellule staminali su scaffold di acido ialuronico in una lesione condrale di 4° della astragalo.

Le cellule staminali sono cellule indifferenziate il cui destino non è ancora “deciso” e pertanto possono originare vari tipi di cellule diverse, attraverso un processo denominato “differenziamento”.

Le cellule staminali si possono suddividere, grossolanamente, in due categorie:

- 1) cellule staminali embrionali;
- 2) cellule staminali da tessuti adulti.

Abbiamo diverse tipologie di cellule staminali:

- 1) totipotenti: sono in grado di dare origine ad ogni tipologia di cellule comprese quelle degli annessi embrionali.
- 2) pluripotenti: possono specializzarsi in tutti i tipi di cellule che troviamo in un individuo adulto ma non nelle cellule dei tessuti extracellulari.
- 3) multipotenti: quando possono dare origine a più tipi di cellule (ad es. cellule midollari che possono dare origine sia ai globuli rossi che ai globuli bianchi);
- 4) unipotenti: quando possono dare origine ad un solo tipo di cellule (ad es. nel midollo osseo possono dare origine solo ai globuli rossi).

La “teoria della plasticità” suggerisce che le cellule staminali mesenchimali adulte (MSCs) possono differenziarsi in molteplici tipi di cellule diverse per morfologia e funzione.

Normalmente le cellule staminali sono in fase di quiescenza (fase G0 del ciclo cellulare) ed attraverso i fattori di crescita (*growth factor*) entrano in fase di crescita G1. Le cellule staminali mesenchimali adulte vengono ottenute mediante un aspirato di midollo osseo che viene eseguito durante la stessa seduta operatoria (generalmente senza una procedura anestesiológica aggiuntiva).

Le sedi in cui il midollo osseo può essere prelevato sono varie ma comunque viene scelta la cresta iliaca attraverso l'aspirazione con apposito strumento (Fig. 4).

Si può quindi ottenere un sufficiente quantitativo di aspirato (in genere 20 cc) che, trattato con anticoagulanti ed opportunamente centrifugato, permette di ottenere, in pochi minuti, una soluzione concentrata di pochi centiletri con un elevato numero di cellule nucleate (cellule staminali).

Queste cellule staminali vengono quindi concentrate in uno scaffold di fibrina autologa ottenendo una struttura tridimensionale malleabile, deformabile e suturabile che viene adoperata per colmare particolari difetti cartilaginei; attualmente stiamo usando anche scaffolds di acido ialuronico come supporto alle cellule staminali.

Le lesioni cartilaginee rappresentano una delle patologie più frequenti e di difficile trattamento in Traumatologia dello Sport.

Secondo un nostro studio su 100 casi di legamentoplastica artroscopica del LCA, abbiamo riscontrato circa l'80% di lesioni condrali. Si tratta di una percentuale simile ad un recente lavoro di Curl et al. che su oltre 31000 artroscopie di ginocchio hanno riportato un'incidenza del 73% di lesioni condrali e di queste circa il 20% erano lesioni di 4° sec. Outherbridge¹⁴.

Poiché le lesioni condrali presentano anche una scarsa capacità di riparazione intrinseca dovuta alla scarsa innervazione ed irrorazione, molteplici sono gli approcci di trattamento impiegati per la stimolazione midollare come le perforazioni, la condroabrasione e le microfratture con risultati spesso altalenanti.

Maggior soddisfazione, nei risultati, l'abbiamo ottenuta con l'innesto autologo di condrociti di 2ª generazione (su biomateriali quali MACI, Cares, Hyalograft, ecc.)

Attualmente il nostro protocollo di trattamento delle condropatie di 4° sec. Outherbridge prevede l'impiego del trapianto autologo condrocitario con Hyalograft per lesioni condrali con dimensione maggiore di 2 cm.

Al di sotto dei 2 cm. Stiamo sperimentando l'applicazione one step di cellule staminali.

Il trattamento prevede un'artroscopia per valutare l'ampiezza della lesione condrale, seguita dal prelievo di midollo osseo dalla cresta iliaca (generalmente dallo stesso lato della lesione e nella stessa seduta operatoria).

I 20 cc di midollo osseo prelevato vengono poi opportunamente centrifugati e quindi vengono aggiunti i fattori di crescita (PRP) che erano stati precedentemente preparati da 8 cc di sangue autologo.

Il tutto viene ulteriormente centrifugato ed applicato su scaffold di acido ialuronico (Hyalograft).

A questo punto lo scaffold viene applicato nella perdita di sostanza cartilaginea con l'ausilio di colla di fibrina applicata sui bordi della lesione condrale per permettere una corretta adesione dello scaffold.

Le cellule ricavate dal midollo osseo possono quindi rappresentare una valida alternativa nel trattamento delle lesioni condrali inferiori a 2 cm. In quanto numerosi studi hanno dimostrato la loro capacità di formare cellule altamente differenziate.

CONCLUSIONI

Secondo la nostra esperienza l'applicazione dei fattori di crescita sia in forma liquida che in forma di membrana accelera i fisiologici processi di guarigione tissutale riducendo il dolore ed inducendo un effetto anti-infiammatorio ed inoltre non presenta alcuna controindicazione o insorgenza di complicanze. Queste caratteristiche ci inducono a pensare che i GF potrebbero essere utilizzati come trattamento Gold Standard di patologie ortopediche-traumatologiche prese in esame nel nostro studio (tendinopatie, lesioni muscolari, condropatie, ecc.) sia in atleti di alto livello che in sportivi amatoriali.

Il poter utilizzare i GF sia in forma liquida che in forma solida in patologie ortopediche-traumatologiche di interesse quotidiano con buoni/ottimi risultati rappresenta quindi un viatico per ricercare nuovi utilizzi e continuare nella ricerca.

Per quanto riguarda il trattamento con le cellule staminali, in simbiosi con i fattori di crescita, finora ci hanno dato dei risultati soddisfacenti e talvolta esaltanti che però non possono non far tenere in considerazione quali possono essere i potenziali rischi che potrebbero verificarsi con questo tipo di manipolazioni.

In conclusione, il fascino dell'ingegneria tissutale e della terapia genica in generale è enorme nel mondo scientifico attuale e sicuramente rappresenta il futuro.

BILIOGRAFIA

- ¹ Everts P, Knape J, Weirich G, Schoneberger J, Hoffmann J, Overdeest E, et al. *Platelet-rich plasma and platelet gel: a review*. JECT 2006;38:174-87.
- ² Marx R, Garg A. *Dental and craniofacial applications of platelet-rich-plasma*. Carol Stream: Quintessence Publishing Co 2005.
- ³ Pietrzak W, Eppley B. *Scientific foundations platelet rich plasma: biology and new technology*. J Craniofac Surg 2005;16:1053-4.
- ⁴ Marx RE. *Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP?* Implants Dent 2001;10:225-8.
- ⁵ Costa MA, Wu C, Pham BV, Chong AK, Pham HM, Chang J. *Tissue engineering of flexor tendons: optimization of tenocyte proliferation using growth factor supplementation*. Tissue Eng 2006;12:1937-43.
- ⁶ Molloy T, Wang Y, Murrell G. *The roles of growth factors in tendon and ligament healing*. Sports Med 2003;33:381-94.
- ⁷ Ranly D, Lohmann C, Andreacchio D, Boyan B, Shwartz Z. *Platelet-rich plasma inhibits demineralized bone matrix-induced bone formation in nude mice*. J Bone Joint Surg 2007;89:139-47.
- ⁸ Ferrari M, Zia S, Valbonesi M. *A new technique for hemodilution, preparation of autologous platelet-rich plasma and intraoperative blood salvage in cardiac surgery*. Int J Artif Organs. 1987;10:47-50
- ⁹ Fenwick SA, Hazlelman BL, Riley GP. *The vasculature and its role in the damaged and healing tendon*. Arthritis Res 2002;4:252-60.
- ¹⁰ Kader D, Sakena A, Movin T, Magulli N. *Achilles tendinopathy: some aspects of basic science and clinical management*. Br J Sports Med 2002;36:239-49.
- ¹¹ Berghoff W, Pietrzak W, Rhodes R. *Platelet-rich plasma application during closure following total knee arthroplasty*. Orthopedics 2006;29:590-8.
- ¹² Edwards SG, Calandruccio JH. *Autologous blood injections for refractory lateral epicondylitis*. AM J Hand Surg 2003;28:272-8.
- ¹³ Jobe F, Ciccotti M. *Lateral and medial epicondylitis of the elbow*. J Am Acad Orthop Surg 1994;2:1-8.
- ¹⁴ Curl WW, Krome J, Gordon ES, Rushing J, Smith BP, Poehling GG. *Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies*. Arthroscopy 1997;13:456-60.