Seconda Università degli Studi di Napoli

U.O.C. di Chirurgia Plastica, Ricostruttiva ed Estetica.

Dir.: Prof. F. D'Andrea

I FATTORI DI CRESCITA e la riparazione tessutale

Prof. G.A. Ferraro,

Dr.F.De Francesco, Dr.ssa C.Cataldo, Dr. F.Rossano

Napoli – 4 Marzo 2010

Ferite difficili

difficult-to-heal wounds/ chronic wounds/ non-healing wounds/ chronic ulcers

nei casi in cui, indipendentemente dall'etiologia della lesione, si verifica un evento tale da pregiudicare un corretto e fisiologico ripristino dell'integrità dei tessuti con un **allungamento più o meno marcato dei tempi di guarigione**

L'ULCERA… definizione

Per ulcera s'intende una ***perdita di sostanza legata a modificazioni emodinamiche, emoreologiche e coagulative***: nella sua genesi è fondamentale l'impegno del microcircolo e conseguente compromissione del trofismo tissutale.

Essa rappresenta ***l'epifenomeno di varie patologie*** che hanno alla base un insufficiente apporto trofico con conseguente **ipossia** ed **infezione**

FERITE: definizione e cause

"a defect or breach in the continuity of the skin" (Alexander 2000p 738)

Diverse cause.

- Intenzionale come in chirurgia
- Traumatica come un taglio, un abrasione, da agenti chimici, da freddo/caldo
- Pressione da attrito o da forza di pressione
- Ischemia in seguito a malattia come le ulcere di gamba o di carcinomi

Eziologia delle ferite difficili

Ischemia
(diretta o riflessa)

Proteasi batteriche

Riduzione dei
GROWTH FACTORS

FERITA DIFFICILE

Cause di ritardo della guarigione

Fattori locali: tipo di ferita, infezione, ostacoli meccanici alla chiusura (tessuto necrotico e di granulazione esuberante), eccesso di essudato, fattori iatrogeni, turbe della vascolarizzazione e innervazione, ecc.

✓**Fattori sistemici**: malnutrizione, deficit vitaminici, endocrinopatie, diabete, età, assunzione di farmaci.

RIDUZIONE DEI GROWTH FACTORS

CLASSIFICAZIONE ETIOPATOGENETICA DELLE ULCERE

VASCOLARI MACROCIRCOLATORIE:

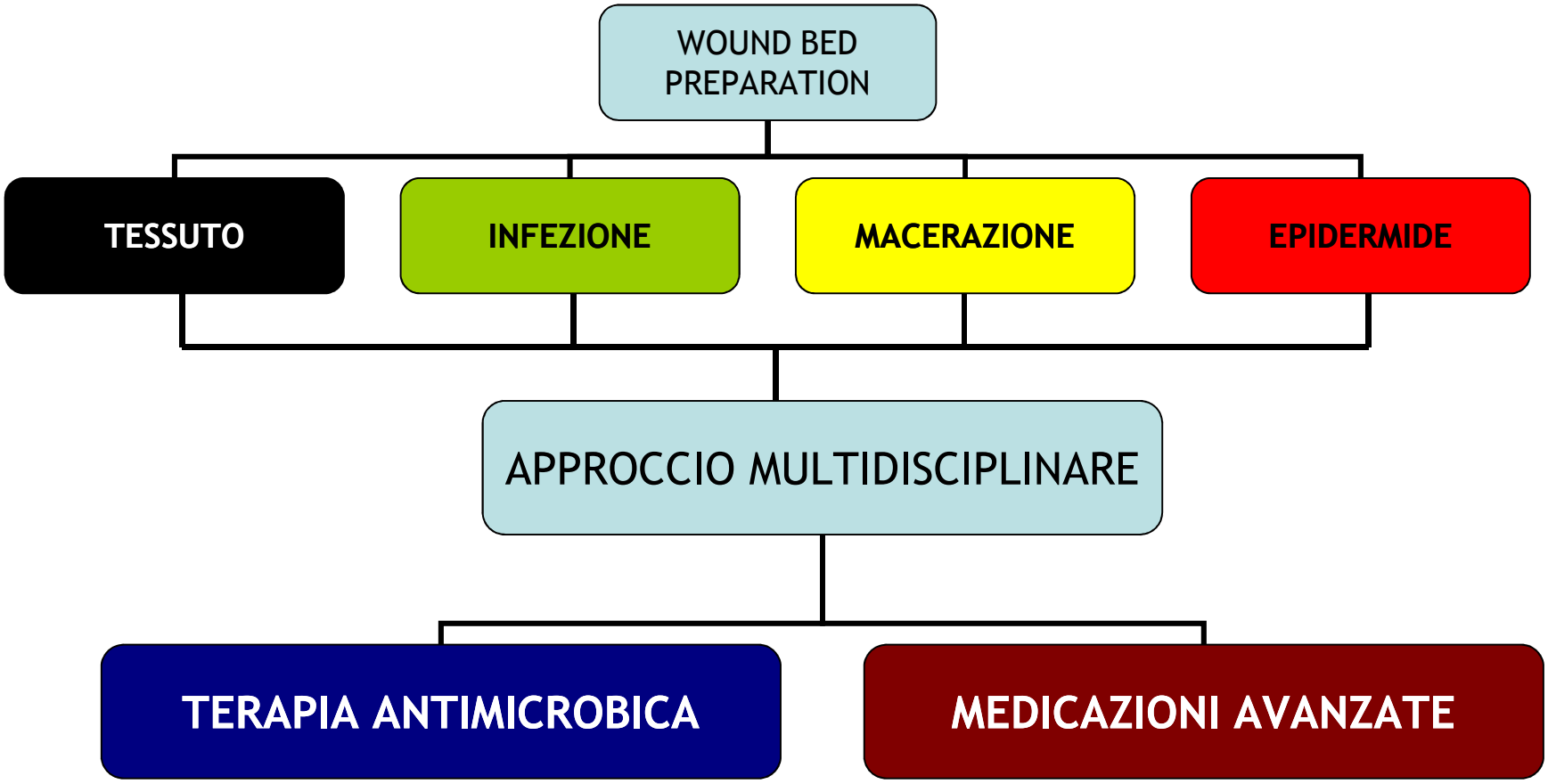
-arteriose
-venose da IVC
-post-tromboflebitiche
-miste

VASCOLARI MICROCIRCOLATORIE:

-vasculitiche
-microangiopatiche
-diabetiche
-Ipertensive
-ulcere da decubito

NON VASCOLARI: neoplastiche, neuropatiche, settiche, traumatiche, granulomatose, da emopatie, autoimmuni, ecc.

T.I.M.E.
I principi della Wound Bed Preparation



Ulcere Difficili

Definizione: lesioni non tendenti alla guarigione nonostante l'applicazione di uno Standard Care validato

Applicazione di linee guida validate

Meccanismo eziopatogenetico

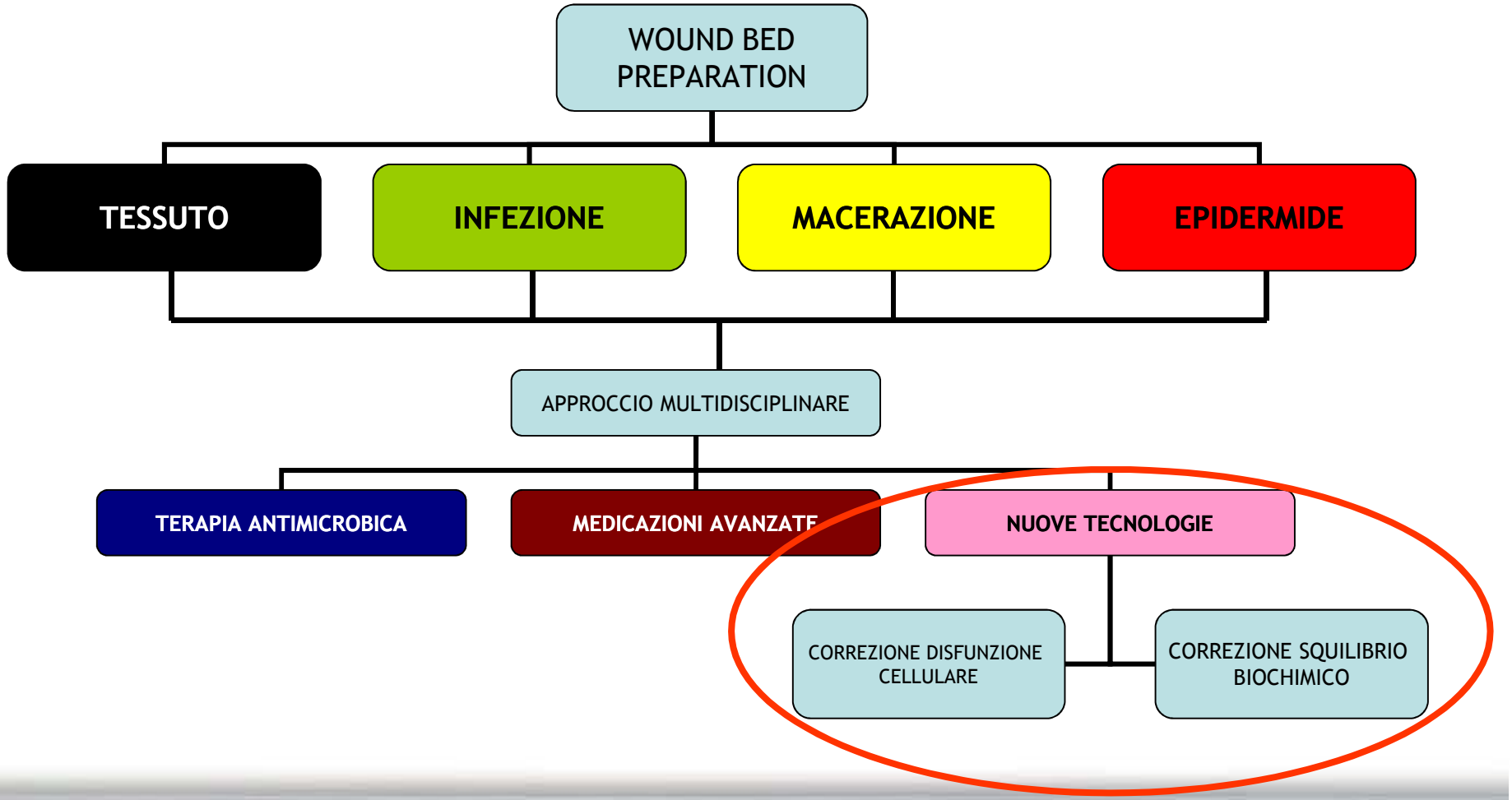
Centri di riferimento

FERITE DIFFICILI

ULCERE CRONICHE
- diminuita mitosi
- Aumento citochine infiammatorie
- Alti livelli proteasi
- DEFICIT DI FATTORI DI CRESCITA E CELLULE SENESCENTI NON RESPONSIVE AD ESSI

FERITE IN VIA DI GUARIGIONE
-Elevato potenziale mitogeno
-Rapida migrazione cellulare
-Equilibrio delle citochine infiammatorie
-Bassi livelli di proteasi
-FATTORI DI CRESCITA ADEGUATI E CELLULE RESPONSIVE AD ESSI.

T.I.M.E.
I principi della Wound Bed Preparation



GROWTH FACTORS

- ✓ **Attività multifunzionale**: inibente/stimolante
- ✓ **Attività mitogena** → proliferazione → PDGF, EGF, FGF
- ✓ **Attività angiogenetica**
- ✓ **Attività chemioattica** → migrazione → PDGF
- ✓ **Differenziamento cellulare**

ATTRAVERSO PATHWAYS AUTOCRINI E PARACRINI

Fattore di crescita	Cellula produttrice	Attività funzionale
TGF-alfa (trasforming growth factor)	Piastrine – Macrofagi Cheratinociti	Attivazione neutrofili Angiogenesi
TGFbeta (trasforming growth factor)	Piastrine – Macrofagi Linfociti	Angiogenesi - PDGF Proliferazione cellulare Formazione fibronectina
PDGF (Platelet derived growth factor))	Piastrine – Macrofagi Cheratinociti - C. Endoteliali	Migrazione dei fibroblasti e dei neutrofili
FGF (fibroblast growth factor)	Macrofagi Tesssuto neurale	Fattore mitogeno cheratinociti c.endoteliali e fibroblasti
VEGF (vascular endothelial growth factor)	C. Endoteliali	Angiogenesi
EGF (epidermal growth factor)	Piastrine Cheratinociti	Fattore mitogeno cheratinociti c.endoteliali e fibroblasti

Le ulcere croniche sono “bloccate” in una particolare fase del processo riparativo

Ulcere vasculitiche e diabetiche

Blocco fase infiammatoria

⇩

Blocco fase proliferativa

Sovraespressione di fibronectina, trombospondina,altre molecole della matrice

(Falanga, 2000)

Ulcera post-trombotica

Prolungato processo Infiammatorio

⇩

Deficit di rimodellamento della matrice

⇩

Ritardo di riepitelizzazione

(Hasan 1997, Angren 1999, Cook 2000)

Wound Management

- Obiettivi
  - Preservare il tessuto vitale
  - Ripristinare la continuità e la funzione del tessuto
  - Evitare infezioni
  - Minimizzare la formazione della cicatrice

APPROCCIO TERAPEUTICO

CHI BEN COMINCIA E' ALLA META' DELL'OPERA

TERAPIA FARMACOLOGICA

Antiipertensivi, ipoglicemizzanti, antiaggreganti, corticosteroidi, diosmina, ereologici

TERAPIA ADIUVANTE

Ossigenoterapia iperbarica, VAC, CO2, Laser, Luce polarizzata, ecc

ELASTOCOMPRESSIONE

APPROCCIO TERAPEUTICO

CHI BEN COMINCIA E' ALLA META' DELL'OPERA

TERAPIA LOCALE

Detersione, disinfezione, medicazione (classica- avanzata)

TERAPIA ANTALGICA

Paracetamolo, anestetici locali, FANS, narcotici, peridurale continua, ESM

TERAPIA CHIRURGICA

Trattamento delle varici, rivascolarizzazione, tecniche ricostruttive: lembi ed innesti

GEL PIATRINICO – FATTORI DI CRESCITA

TRATTAMENTO CONSERVATIVO

Gel piastrinico

Il Razionale dell'impiego del gel piastrinico risiede nella presenza di almeno 30 diversi fattori di crescita tissutale, i cui i più importanti nel processo riparativo sono:

- **P.D.G.F.** ***(Platelet Derived Growth Factor)***
- **T.G.F. b.** ***(Trasforming Growth Factor)***
- **E.G.F.** ***(Epidermal Growth Factor)***
- **I.G.F. I e II** ***(Insulin Growth Factor I e II)***

Presenta le seguenti proprietà cliniche:

Angiogenetiche

Stimolanti la formazione del tessuto connettivo ed epiteliale

Stimolanti l'osteogenesi

✓ **Non è tossico per i tessuti**

PROCEDURE DI RACCOLTA DEL PRP

- PROVETTA (in lesioni di piccole dimensioni)
- PIASTRINOFERESI (per estese lesioni o terapie ripetute e prolungate)
- UNITA' DI SANGUE INTERO (per grosse lesioni o quando il paziente necessita di emotrasfusione per grosso intervento)

Ottimizzazione del PRP

Per ottenere un gel con massa omogenea, volume adeguato e buona maneggevolezza è necessaria una concentrazione di piastrine almeno pari a 1.000.000 PLT/ml

Procedura di ATTIVAZIONE

- Il concentrato piastrinico viene trasferito nella piastra di Petri
- Si aggiungono gli attivatori progressivamente
- Il prodotto viene incubato a temperatura ambiente fino ad avvenuta gelificazione, oppure a 37°C per 5’
- Controlli di sterilità e qualità sul preparato

APPLICAZIONE PER ULCERE O FERITE:

Il nostro protocollo

Diametro della lesione	Volume del PRP autologo	Volume Trombina autologa	Volume Calcio gluconato
3 cm	2-4 mL	0.3 mL	0.3 mL
6 cm	6-8 mL	0.8 mL	0.8 mL
10 cm	12-15 mL	1.3 mL	1.3 mL

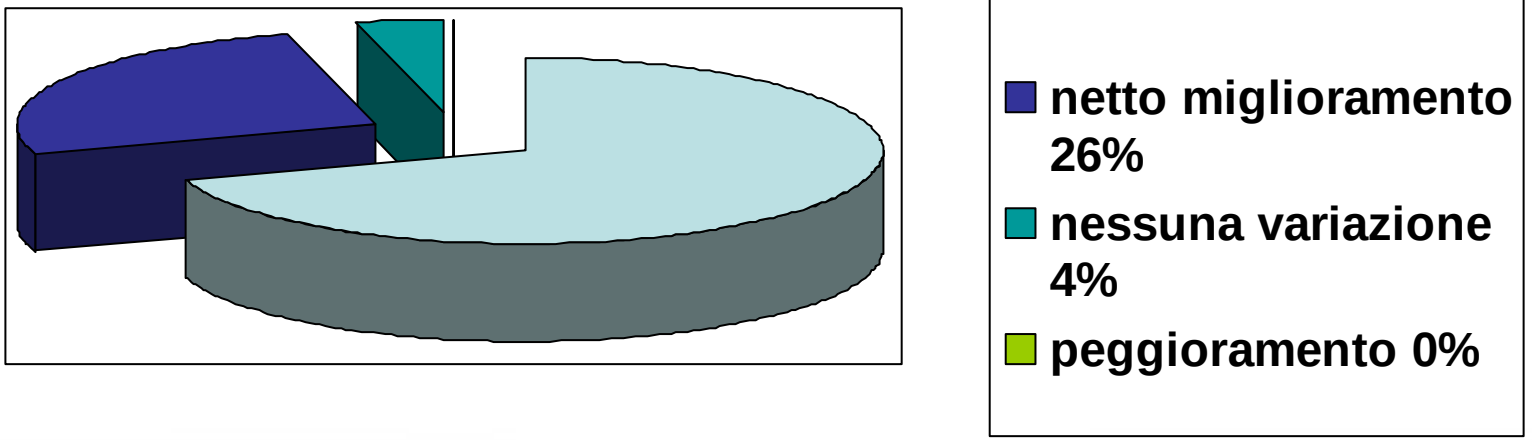
Protocollo terapeutico

- Due applicazioni a settimana (efficacia dei G.W.= 6/7gg.)

- Lavaggio della ferita con clorexidina 0,2% e soluzione fisiologica

Valutazione dei risultati

- Precoce: già alla seconda settimana
- A distanza: ad almeno sei settimane dall'inizio del trattamento



PROPRIETA'cliniche DEL GEL PIASTRINICO

Stimola la formazione del tessuto epiteliale

Stimola la formazione del tessuto connettivo

Induce angiogenesi

Induce osteogenesi

E' assolutamente biocompatibile

E' atossico per i tessuti non ulcerati

PROPRIETA' pratiche DEL GEL PIASTRINICO

Possibilità di essere autologo

È estremamente poco dispendioso

È di rapida e facile preparazione

E' legale (L. 107/90 DM 25-26/1/2001)

PUNTO DI PARTENZA…

…?

- ✓**Perché il gel piastrinico funziona?**
- ✓**Quali tra i Fattori di Crescita presenti giocano realmente un ruolo chiave nel far ripartire il processo di guarigione di un'ulcera?**
- ✓**E' possibile razionalizzare l'utilizzo dei fattori di crescita per una terapia mirata e personalizzata al singolo paziente?**

Dipartimento universitario di scienze ortopediche, traumatologiche, riabilitative e plastico ricostruttive
Scuola di Specializzazione in Chirurgia Plastica Ricostruttiva ed Estetica
Direttore: Prof. F. D'Andrea

STUDIO PRE-CLINICO

Dosaggio dei fattori di crescita mediante RT-PCR sul fondo dell'ulcera, cercando di dimostrare una correlazione tra eziologia e fattori di crescita carenti

MATERIALI E METODI

Pazienti

14 casi trattati:

- ✓ **Patologia diabetica (4)**
- ✓ **Ulcere venose (10)**

- ✓ **È stato praticato courettage del fondo della lesione ed il materiale prelevato è stato successivamente analizzato.**

Materiali e Metodi

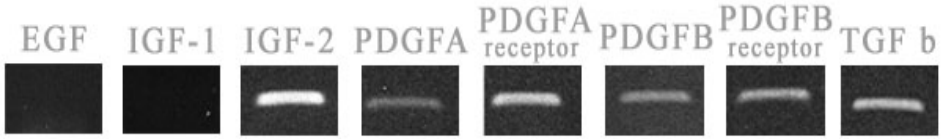
- E’ stata dosata la concentrazione del trascritto (m-RNA) relativo ai singoli fattori di crescita mediante una analisi semi-quantitativa quale la RT-PCR
- Le concentrazioni sono stabilite sullo spessore della banda.
- Quanto più la banda è spessa tanto più il trascritto per quel fattore di crescita è presente, quanto meno la banda è spessa e visibile tanto meno il trascritto è presente.

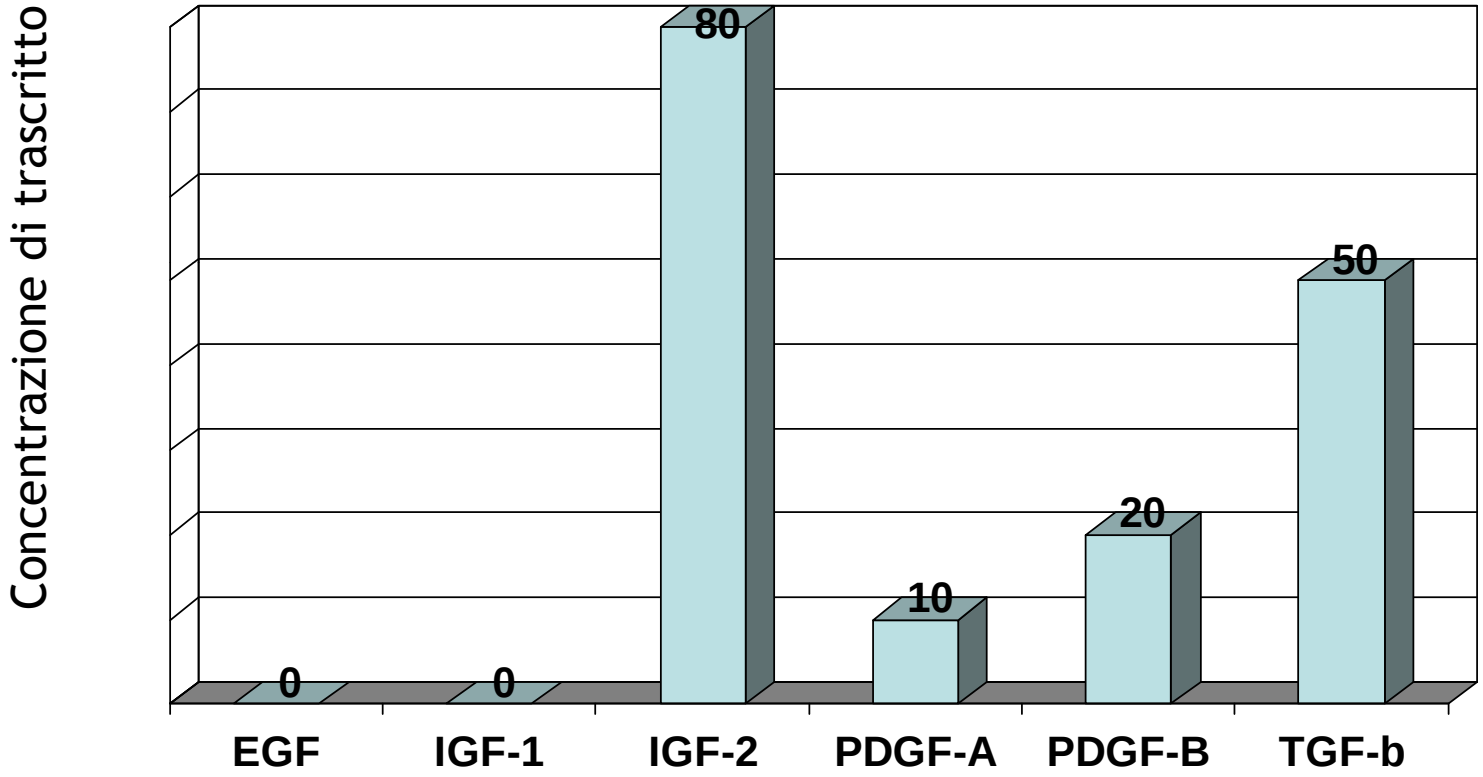
FATTORI DI CRESCITA VALUTATI

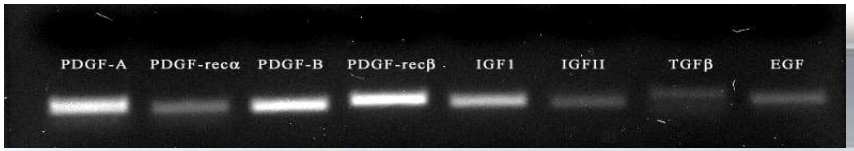
Fattore di crescita	Cellula produttrice	Attività funzionale
TGFbeta (trasforming growth factor)	Piastrine – Macrofagi Linfociti - Fibroblasti	Angiogenesi - PDGF Proliferazione cellulare Formazione fibronectina
PDGF-A e B (Platelet derived growth factor))	Piastrine – Macrofagi Cheratinociti - Fibroblasti	Migrazione dei fibroblasti e dei neutrofili
EGF (epidermal growth factor)	Piastrine Cheratinociti	Fattore mitogeno cheratinociti c.endoteliali e fibroblasti
IGF-1 e 2 (insulin growth factor)	fibroblasti	Proliferazione dei fibroblasti e cheratinociti

RISULTATI

Ulcere diabetiche



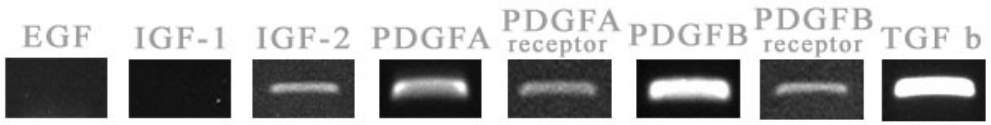


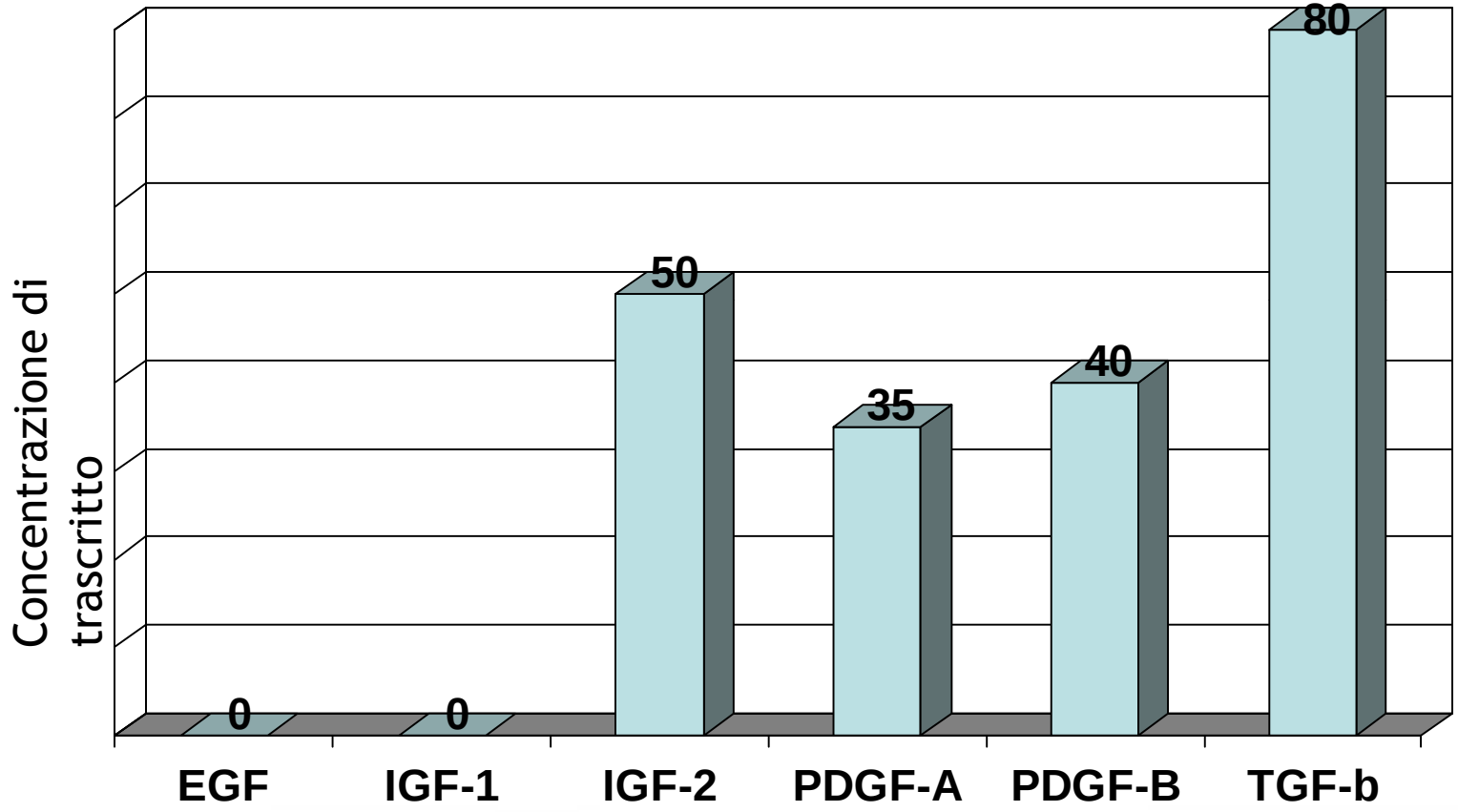


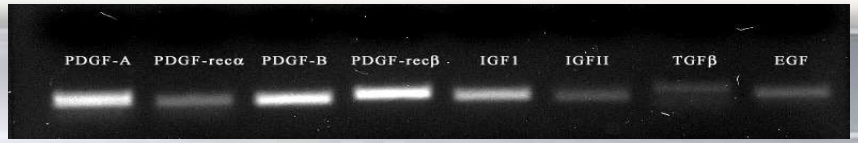
Cute sana

RISULTATI

Ulcere Venose







Cute sana

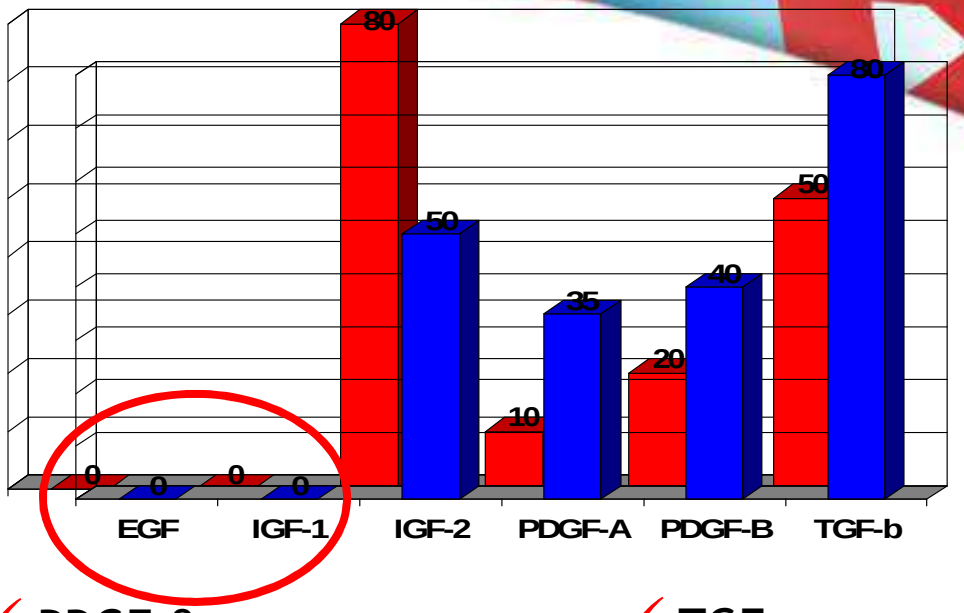
ANALISI DEI DATI

- ✓ IGF-1
- ✓ EGF

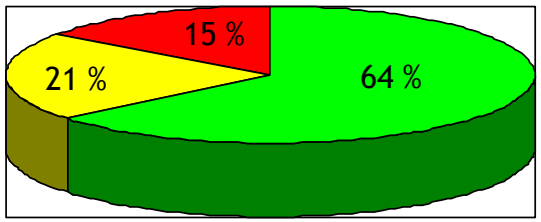
TOTALMENTE ASSENTI

- ✓ PDGF-α

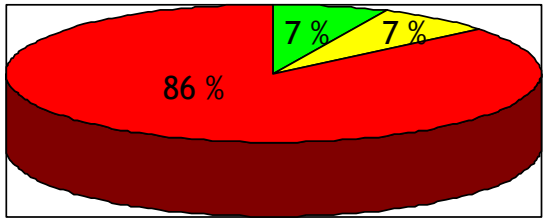
SCARSAMENTE RAPPR



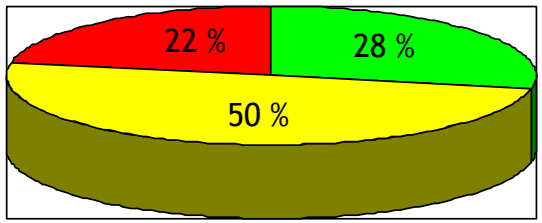
- ✓ IGF 2



- ✓ PDGF-β



- ✓ TGF



Ben Rappresentato

Moderatamente Rappresentato

Scarso o Nullo

CONCLUSIONI

La quantità di trascritto è variabile in base all'eziologia dell'ulcera.

Assenza di EGF e IGF-1 in tutti i pazienti: ad indicare una possibile carenza di fibroblasti nel sito della lesione

Deficit di IGF-2 solo nei pazienti con ulcere venose, nei soggetti con ulcere diabetiche è aumentato con effetti deleteri alterando l'attivazione del TGF-β

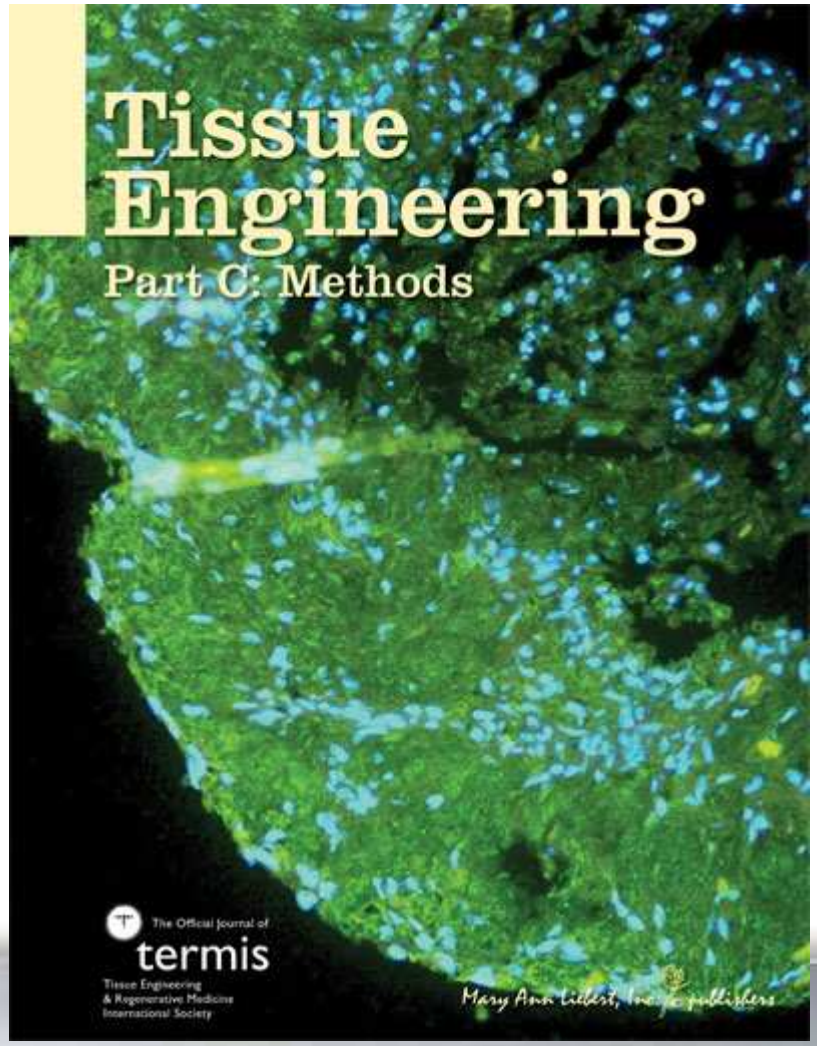
Deficit marcato di PDGF-A e PDGF-B, in entrambi i gruppi, associato ad una carenza anche del recettore PDGFR ad indicare un' ***alterazione strutturale dei fibroblasti.***

Deficit parziale di TGF-β1 più marcato nei pazienti diabetici, mentre TGF-β2 e TGF-β3 sono notevolmente aumentati

Obiettivi futuri

- ✓ Valutazione delle carenze dei singoli GF del paziente
- ✓ Titolazione e creazione di gel piastrinico “ad hoc”.
- ✓ Identificazione di “medicazioni/veicoli” a rilascio locale dei fattori di crescita deficitari.
- ✓ Standardizzazione della terapia (Correlazione tra eziologia e specifico fattore di crescita)
- ✓ CELLULE STAMINALI

Tissue Engineering



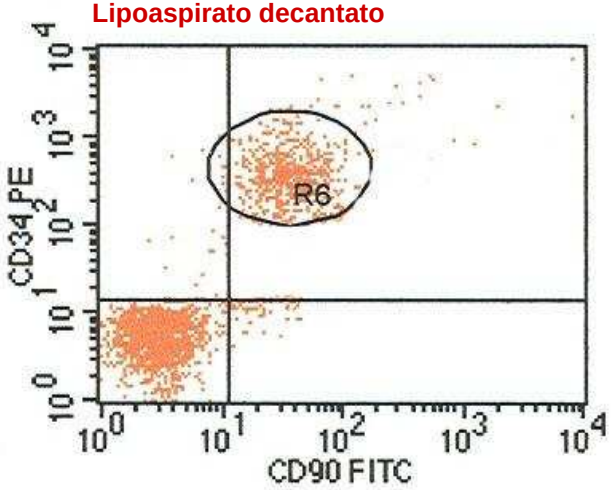
Ferraro G.A., De Francesco F, D'Andrea F., Desiderio V, Tirino V, De Rosa A, Papaccio G.
Large-scale production of human adipose tissue from stem cells: a new tool for regenerative medicine and tissue banking.
Tissue Eng Part C Methods. 2008 Sep;14(3):233-42.

Studi sperimentali sulla sopravvivenza delle cellule adipose

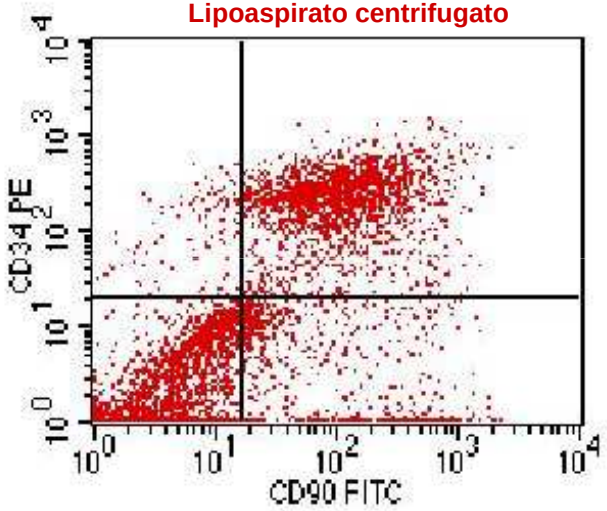
- 2008 Ferraro, D'Andrea et al.: *Metodiche di concentrazione e selezione del grasso in corso di lipofilling*

→ **La centrifugazione a 1300rpm concentra le cellule staminali adiposo-derivate**

Lipoaspirato decantato



Lipoaspirato centrifugato



Lipoaspirato decantato	Lipoaspirato centrifugato a 1300g x 5 min
Cellule CD34+/CD90+ 35%	**Cellule CD34+/CD90+ 41%**

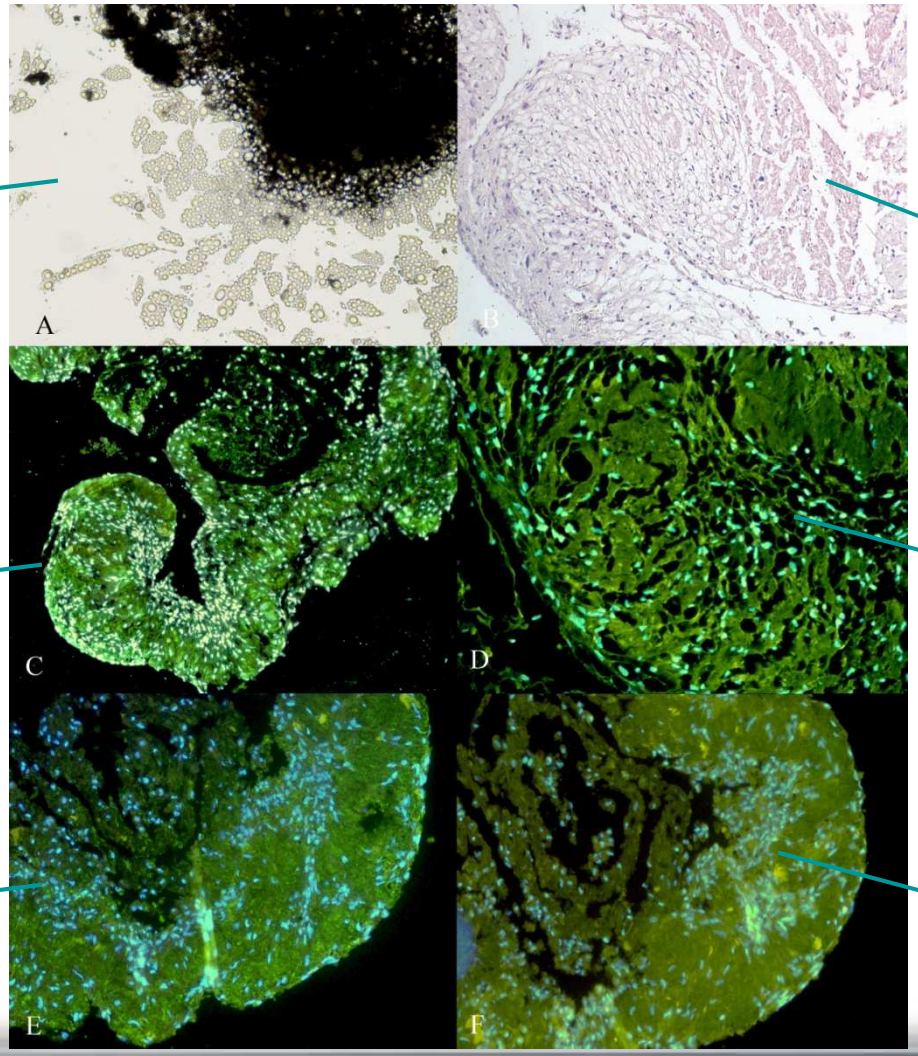
CD34

Riconosce **L-Selectine** presenti su:
PRECURSORI CELLULE ENDOTELIALI
PRECURSORI CELLULE EMATOPOIETICHE
CELLULE STAMINALI STROMALI

CD90

Riconosce **glicoproteine** di membrana presenti:
CELLULE NEURONALI
CELLULE CONNETTIVALI
CELLULE STAMINALI STROMALI
(in associazione con altri Ag di staminalità)

Adipose Tissue Neoformation



Tessuto in coltura

Sezione in paraffina

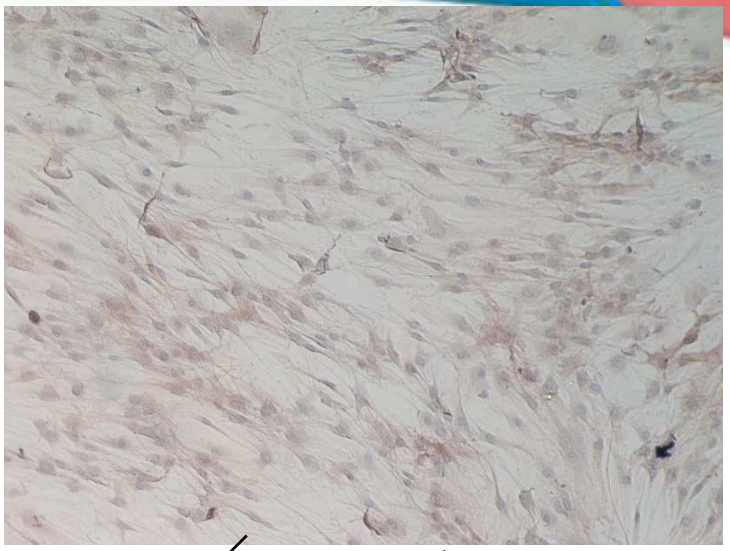
IF per collageno di tipo I

IF per fibronectina

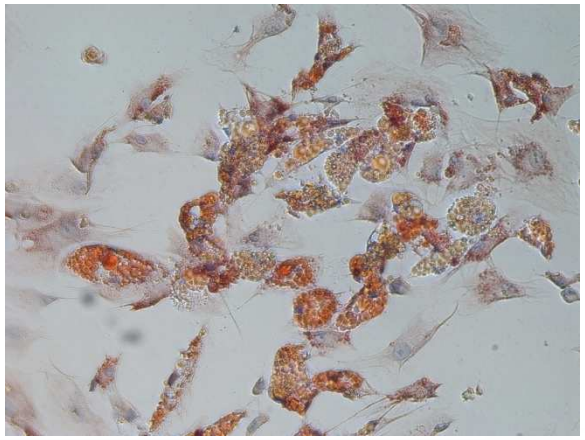
IF per VEGF

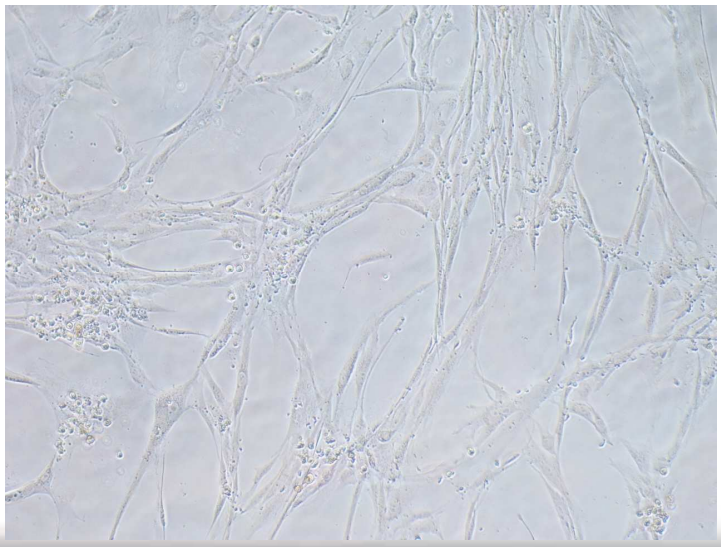
IF per CD31

D'Andrea et al. – **LARGE-SCALE PRODUCTION OF HUMAN ADIPOSE TISSUE FROM STEM CELLS: A NEW TOOL FOR REGENERATIVE MEDICINE AND TISSUE BANKING – Tissue Eng Part C Methods. 2008 Sep;14(3):233-42.**



$34^{+}/90^{+}$ cells in DMEM





Plos One – Agosto 2009

OPEN ACCESS Freely available online

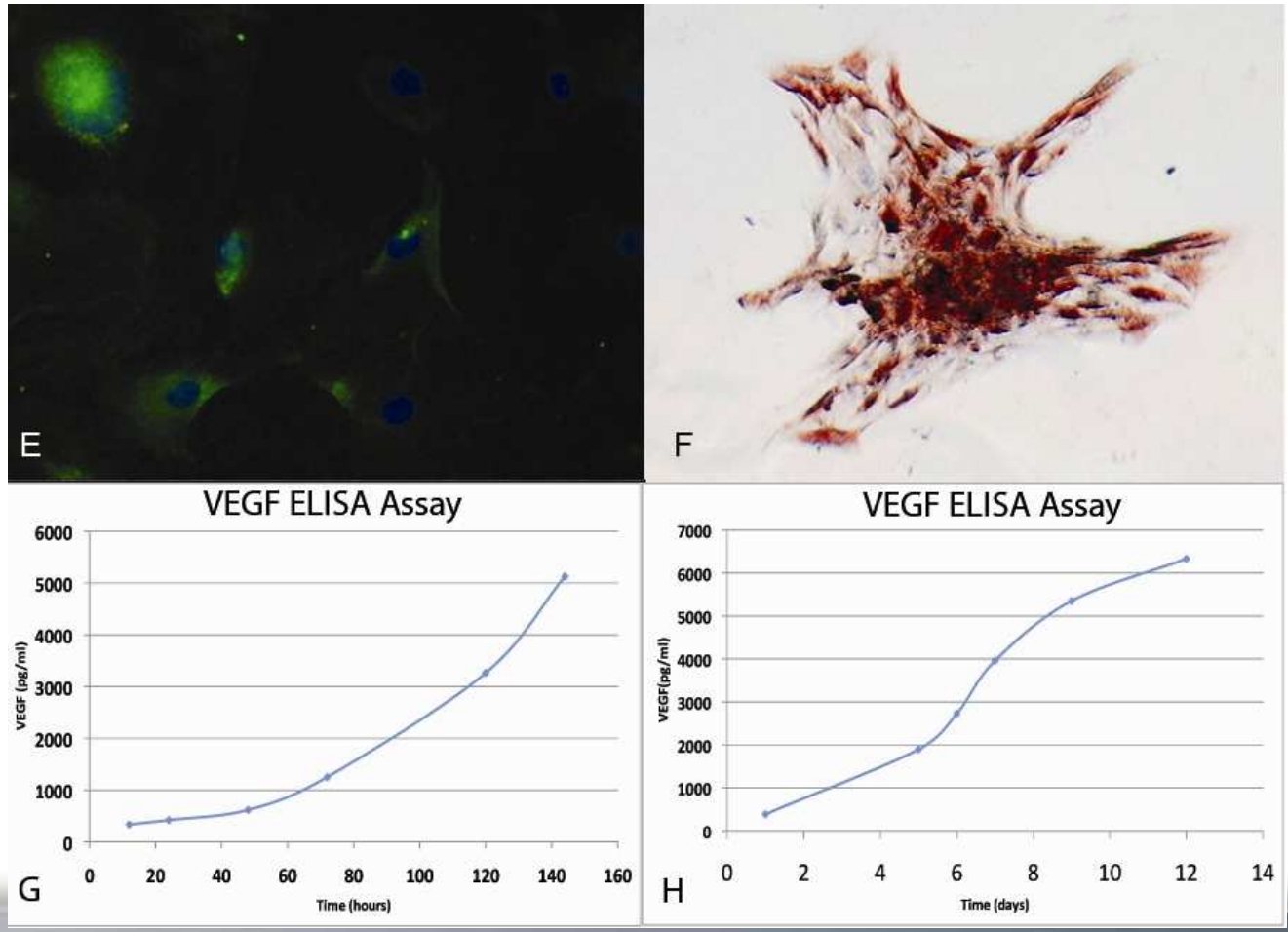
PLoS one

Human CD34+/CD90+ ASCs Are Capable of Growing as Sphere Clusters, Producing High Levels of VEGF and Forming Capillaries

Francesco De Francesco[1,2☯], Virginia Tirino[1☯], Vincenzo Desiderio[1], Giuseppe Ferraro[2], Francesco D'Andrea[2], Mariateresa Giuliano[3], Guido Libondi[1,2], Giuseppe Pirozzi[4], Alfredo De Rosa[5], Gianpaolo Papaccio[1]*

1 Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di Istologia ed Embriologia, Tissue Engineering and Regenerative Medicine (TERM) Laboratory, Seconda Università di Napoli, Napoli, Italy, 2 Dipartimento di Scienze Ortopediche, Traumatologiche, Riabilitative e Plastico-Ricostruttive, Seconda Università di Napoli, Napoli, Italy, 3 Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di Biotecnologie, Seconda Università di Napoli, Napoli, Italy, 4 UOC Biologia cellulare e Bioterapia, Istituto Nazionale Tumori "G. Pascale", Napoli, Italy, 5 Dipartimento di Scienze Odontostomatologiche, Ortodontiche e Chirurgiche, Seconda Università di Napoli, Napoli, Italy

LAB VESSEL


E
F
VEGF ELISA Assay
VEGF (pg/ml)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
20
40
60
80
100
120
140
160
Time (hours)
G
VEGF ELISA Assay
VEGF(pg/ml)
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
2
4
6
8
10
12
14
Time (days)
H

CONCLUSIONI

Lo studio dimostra che nelle ulcere croniche è presente un deficit di specifici ***Fattori di Crescita***, presenti in concentrazioni differenti a seconda dell'eziologia della lesione.
Abbiamo dimostrato come le ***Cellule Staminali*** possono giocare un ruolo chiave nella rigenerazione tissutale

… parlare oscuratamente lo fa ognuno …
chiaro, pochissimi.

Galileo Galilei (1564-1642)