



**Caratteristiche biologiche degli
emocomponenti ad uso non trasfusionale**

Marina Buzzi

Regenerative potential of *Ambystoma mexicanum* (Axolotl)



adult newt can regenerate:

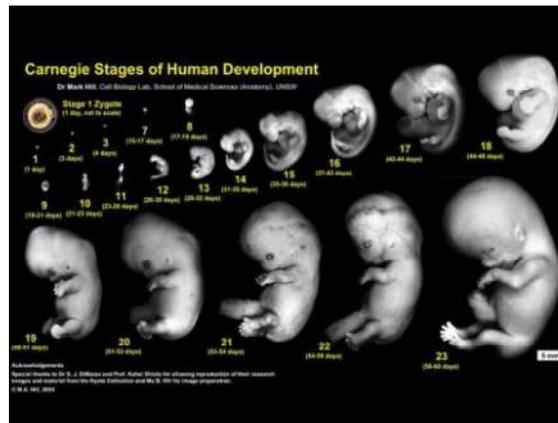
- **Jaws**
- **Lens**
- **Retina**
- **Large sections of the heart**
- **Limbs**
- **Tail**

Regeneration might be a primordial attribute of metazoan that has been lost subsequently for reasons that are not yet understood

Basse forme di vita possono rigenerare i loro tessuti interamente

Gli organismi superiori, tra cui anche l'uomo, hanno perso questa capacità rigenerante e possono sostituire/riparare solo una quantità limitata di tessuto danneggiato con un processo di guarigione delle ferite e formazione di cicatrici

Un'eccezione è rappresentata dalla fase fetale, durante la quale la riparazione delle lesioni avviene senza la formazione di cicatrici la neoformazione di tessuto



Questo dipende da una diversa espressione dei fattori di crescita nella riparazione dei tessuti

MEDICINA RIGENERATIVA

BY STANDER EFFECT : FARMACI O SOSTANZE BIOLOGICHE O CELLULE CHE INIETTATE IN UN TESSUTO O ORGANO STIMOLANO IL MICROAMBIENTE E LE CELLULE RESIDENTI A RIPARARE UN DANNO

RIGENERAZIONE DEI TESSUTI : REALE RIGENERAZIONE DI UN TESSUTO DANNEGGIATO O MANCANTE MEDIANTE LE CELLULE STAMINALI

IDENTIFICAZIONE CELLULE STAMINALI



ISOLAMENTO ED ESPANSIONE

(tessuto ematopoietico e tessuto epiteliale: cute e cornea)

Utilizzo di emocomponenti ad uso non trasfusionale: Terapia Biologica

La medicina rigenerativa sfrutta le potenzialità biologiche delle cellule come terapia per la riparazione dei tessuti.

Il ripristino della funzionalità di un tessuto danneggiato non è però limitato alla compensazione della sua componente cellulare danneggiata , ma dipende anche dalla **ristabilizzazione dell'omeostasi e del microambiente cellulare.**

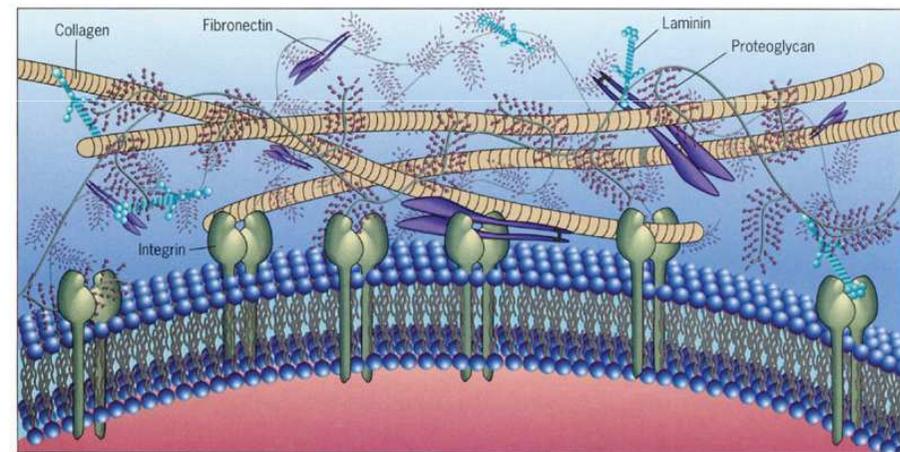
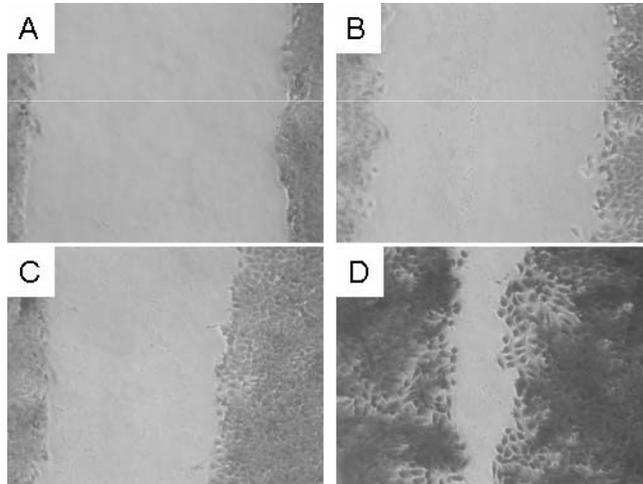
DUPLICE AZIONE RIGENERANTE

CELLULE

MATRICE EXTRACELLULARE

6 ore

24 ore



.....questo concetto ricorre già dal 1975

Use of a platelet-fibrinogen-thrombin mixture as a corneal adhesive: experiments with sutureless lamellar keratoplasty in the rabbit.* A. RALPH ROSENTHAL, CHRISTINA HARBURY, PETER R. EGBERT, AND EDWARD RUBENSTEIN.

A platelet-fibrinogen-thrombin mixture utilizing autologous platelets was studied for its potential as a corneal adhesive. In the rabbit it demonstrated sufficient adhesive properties to allow 50 per cent of lamellar keratoplasties (autotransplants) to remain in place without the use of sutures. The mixture retains significant adhesive properties for four to six days. It is simple to prepare and apply. It also appears nonantigenic and nontoxic to the cornea; it does not incite inflammation, nor interfere with corneal clarity or the regrowth of corneal epithelium.

[Arch Ophthalmol](#). 1975 Oct;93(10):1039-43.

Clinical experience with a mobile ocular perfusion pump.

[Ralph RA](#), [Doane MG](#), [Dohlman CH](#).

Abstract

The continuous delivery in fluids to the ocular surfaces of 12 patients, for a collective total of 1,500 days, was achieved by means of a mobile perfusion pump. One patient used this device intermittently for a total of 21/2 years. Severe dry-eye symptoms were ameliorated in each patient by the constant perfusion. In various situations, the following perfusion fluids have been tried: commercial balanced salt solution, commercial artificial tear solutions, acetylcysteine, and autologous and homologous serum and plasma. In spite of disadvantages related to its size and weight, the pump seems to be of considerable value, especially following severe chemical burns and after keratoplasty or reconstruction of the lids and fornices in the severely dry eye.

PMID: 1180750

[PubMed - indexed for MEDLINE]

Questo concetto di «**riportare alla normalità**» il microambiente della zona danneggiata di un tessuto è il *Target* che si vuole raggiungere con le terapie biologiche con emocomponenti ad uso non trasfusionale in vari ambiti clinici.

Emocomponenti per uso topico

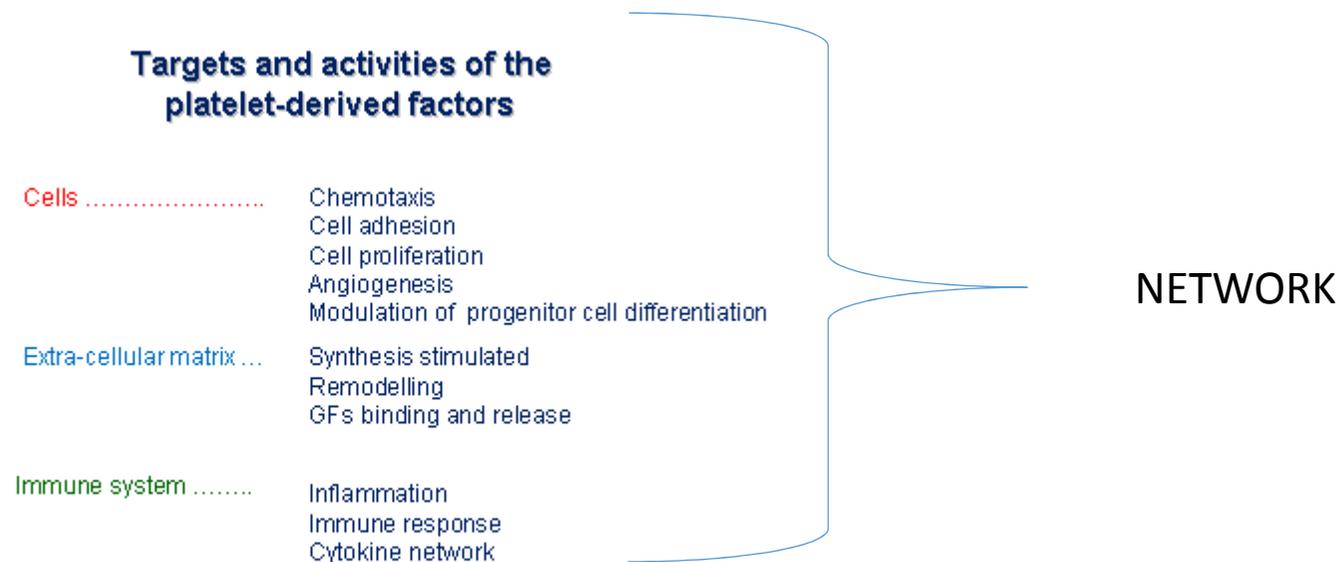
Siero: parte non corpuscolata del sangue che si separa dopo coagulazione

Plasma: matrice fluida che si separa dalla parte corpuscolata del sangue

Plasma ricco di piastrine (PRP): frazione di plasma che contiene un numero di piastrine superiore almeno di 4 volte il valore basale

Plasma ricco di fibrina (PRF)

La caratteristica più importante di questi preparati derivati dal sangue adulto o cordonale è il rilascio nel sito di applicazione di un insieme di biomolecole che agiscono contemporaneamente attivando fenomeni autocrini e paracrini e creando un network di azioni che inducono poi l'effetto biologico della riparazione/rigenerazione/guarigione

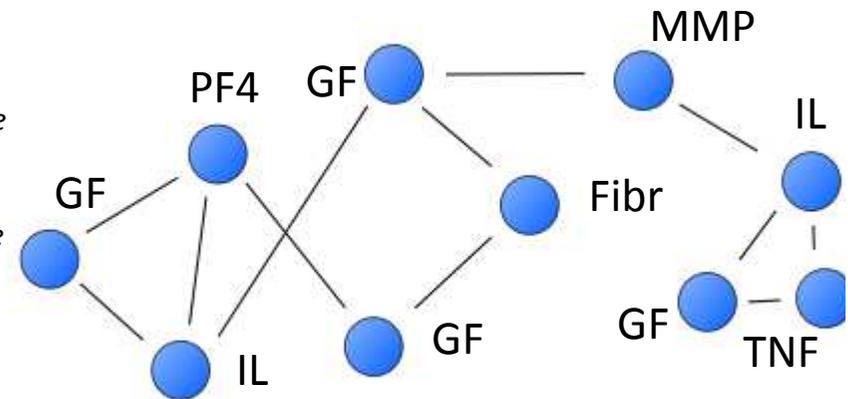


GLI EMOCOMPONENTI AD USO NON TRASFUSIONALE NON SONO SOSTANZE INERTI

SICUREZZA : dubbi sulla capacità di questo trattamento nel promuovere la possibile crescita di cellule neoplastiche

Eur J Dent. 2007 October; 1(4): 192–194. Platelet Rich Plasma: Myth or Reality? Hom-Lay Wang and Gustavo Avila *Safety of PRP remains to be an issue since increases GF in a local area may be a cancer promoting effects. Other concern is the use of bovine thrombin in activating the PRP release to cause immunogenic reaction. So far most of published data showed it is safe to use the product, however, future study in this area is certainly needed*

non esistono casi in letteratura che evidenzino la comparsa di una neoplasia dopo terapia con PRP.



Proteine morfogenetiche dell'osso (**BMP**) (BMP-1, BMP-2, e BMP-3);

Fattore di crescita derivato dalle piastrine (**PDGF**);

Fattore di crescita insulino-simile (**IGF**) (IGF-I ed IGF-II);

Fattore di crescita trasformante (**TGF**, TGF- β);

Fattori di crescita dei fibroblasti (**FGF**) (b-FGF);

Fattori stimolanti le cellule nervose (**NGF**);

Fattore di crescita epidermico (**EGF**);

Fattore di crescita dell'endotelio vascolare (**VEGF**).

Tumor necrosis factor alfa e beta (**TNF alfa e beta**)

Un ruolo importante nei processi di riparazione, in particolare nelle fasi di infiammazione, è interpretato anche dalle citochine prodotte dai globuli bianchi, comprese le interleuchine sia antiinfiammatorie che proinfiammatorie: **IL-1, IL-3, IL-6, IL-8, IL10, IL13**.

PIASTRINE



Le piastrine contengono sostanze biologicamente attive, almeno 60 differenti , che sono coinvolte nei meccanismi di riparazione dei tessuti tra cui:

Fattori della coagulazione

Fattori vasoattivi

Fattori di crescita

Famiglie di Interleukine

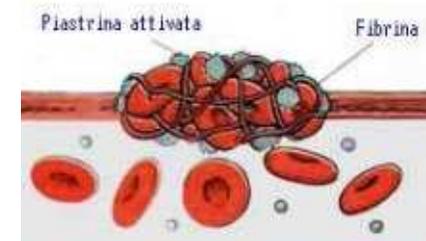
TNF alfa

Una volta attivate, forniscono quindi un pool di fattori di crescita che vengono liberati in modo sinergico e contemporaneo provocando un effetto biologico significativamente maggiore rispetto all'azione di un singolo fattore



Il processo di guarigione comporta **tre fasi** che si sovrappongono in modo consecutivo e ridondante :

- 1) **Infiammazione**
- 2) **proliferazione**
- 3) **rimodellamento**

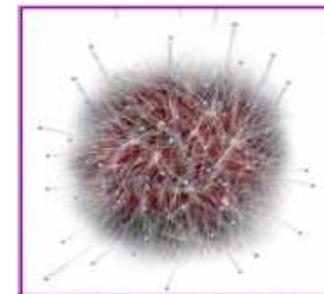


Fuoriuscita del sangue nel sito di lesione, le plt + elementi cellulari vengono a contatto con il collagene e gli altri componenti della matrice extracellulare.

Le piastrine degranulano e secernono mediatori che vengono rilasciati nella zona danneggiata e vengono rilasciati inoltre glicoproteine adesive come la **fibronectina** e **trombospondina** che sono ingredienti importanti per la formazione di una transitoria matrice extracellulare.

Il coagulo risultante dall' emostasi e fornisce una matrice per l'afflusso di cellule infiammatorie.

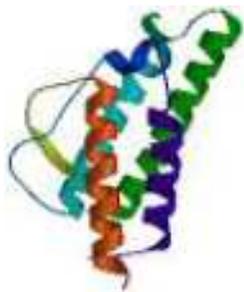
Dopo l'arrivo delle piastrine dal letto vascolare, migrano verso la ferita **neutrofili** e **monociti** in risposta ad agenti chemiotattici. I **macrofagi** sono coinvolti in questa fase, per degradare e rimuovere i componenti danneggiati del tessuto connettivo, come il collagene, elastina e proteoglicani (RIMODELLAMENTO)



FATTORI SOLUBILI

CITOCHINE

Sono molecole proteiche che mediante il legame a recettori di membrana o citoplasmatici modulano : crescita, differenziamento e morte delle cellule bersaglio



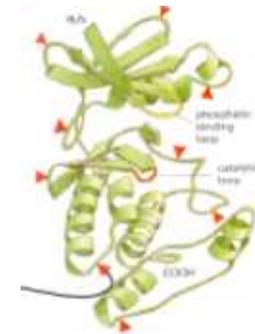
CHEMOCHINE

Sono una sottoclasse di citochine con azione chemotattica. La loro funzione caratteristica è stimolare la migrazione cellulare

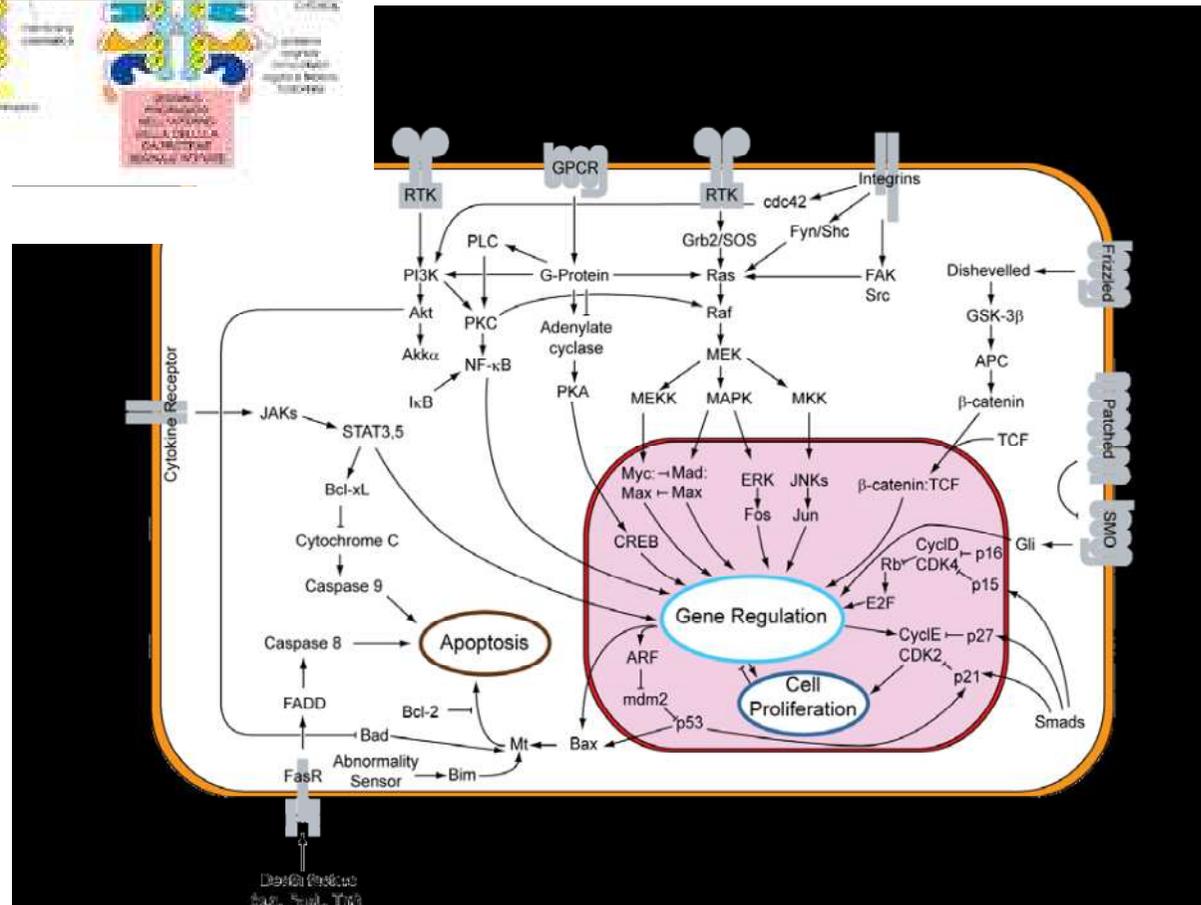
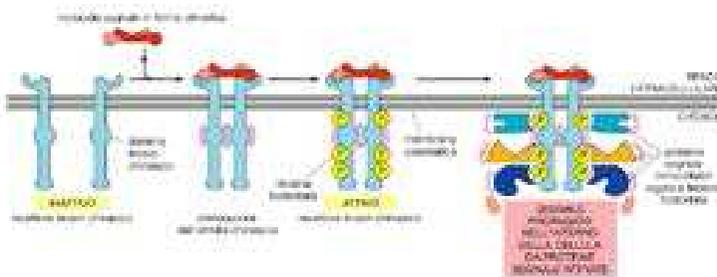


FATTORI DI CRESCITA

Controllano una serie complessa di eventi: interazione cellula-cellula, cellula-matrice e legandosi ai recettori di superficie (tirosina-chinasi, serina-chinasi o treonina-chinasi) trasducono il segnale all'interno della cellula fino ad indurne la proliferazione o il differenziamento



I GF sono molecole segnale che agiscono legandosi ai recettori di membrana delle cellule target attivando la trasduzione del segnale che agendo sulla regolazione di geni determina la proliferazione, differenziazione, apoptosi della cellula



Emocomponenti per uso topico

SIERO: SIEROCOLLIRIO AUTOLOGO E OMOLOGO (ADULTO E CORDONALE)

PRP: COLLIRIO , APPLICAZIONI IN ORTOPEDIA, ODONTOIATRIA, CHIRURGIA GENERALE, MAXILLOFACCIALE, PLASTICA

PRF: APPLICAZIONI IN ORTOPEDIA, CHIRURGIA GENERALE, MAXILLOFACCIALE, PLASTICA

GEL PIASTRINICO : RISOLUZIONE ULCERE

Colliri biologici

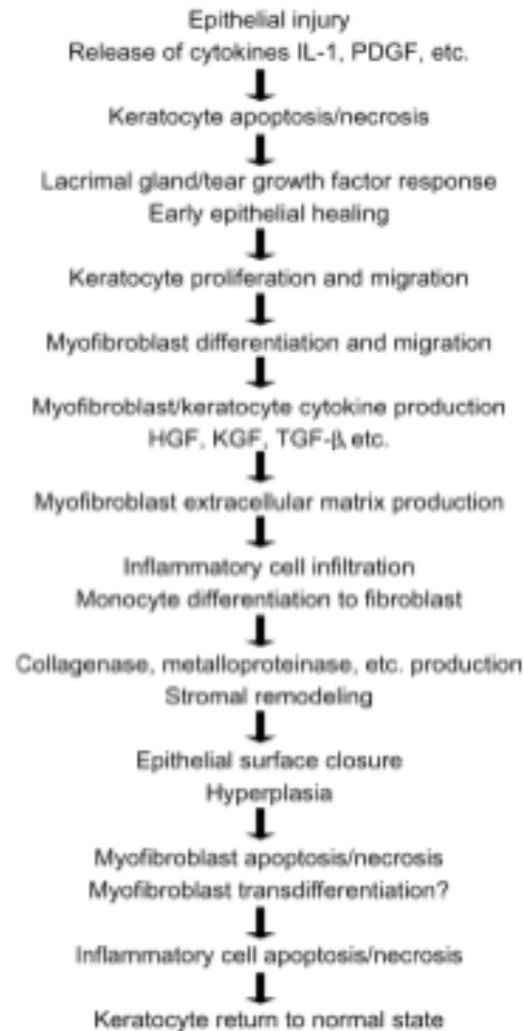
- I colliri biologici derivati dalle componenti del sangue autologhi e omologhi sono stati utilizzati da un pò di anni per la cura di varie patologie oculari perchè contengono alte concentrazioni di **componenti biologicamente attivi** (MUCINA, NEUROPEPTIDI, FIBRONECTINA, Vit.A, ALPHA 2 MACROGLOBULINA) e di CITOCHINE E FATTORI DI CRESCITA tra cui EGF e TGF beta1 normalmente presenti nel film lacrimale e che sono essenziali per la regolazione della proliferazione, differenziazione e maturazione dell'epitelio della superficie oculare.
- Tutte queste componenti biologiche naturali permettono la guarigione dell'epitelio della superficie oculare danneggiato nel caso di diminuzione del contenuto in fattori di crescita come avviene nella DES.

Table 1 Comparison of the biochemical properties of normal, unstimulated human tears, and serum^{51 52}

	Tears	Serum
pH	7.4	7.4
Osmolality (SD)	298 (10)	296
EGF (ng/ml)	0.2-3.0	0.5
TGF- β (ng/ml)	2-10	6-33
Vitamin A (mg/ml)	0.02	46
Lysozyme (mg/ml) (SD)	1.4 (0.2)	6
SlgA (μ g/ml) (SD)	1190 (904)	2
Fibronectin (μ g/ml)	21	205

EGF, epidermal growth factor; TGF- β , transforming growth factor beta; SlgA, surface immunoglobulin A.

Process of corneal damage repair



Klenkler B et al., Exp Eye Res. 2004

First European trial on standardized preparation and clinical evaluation of CBS eye drops

Ophthalmology Unit, Bologna University

Emilia-Romagna cord blood bank (ERCB) Transfusion Service

CLINICAL SCIENCE

EudraCT: 2008-005757-38

Clin Trial Gov Id NCT01234623

Efficacy of Standardized and Quality-Controlled Cord Blood Serum Eye Drop Therapy in the Healing of Severe Corneal Epithelial Damage in Dry Eye

Piera Versura, BSD, Vincenzo Profazio, MD,* Marina Buzzi, BSD,† Alessandra Stancari, PharmD,‡
Mario Arpinati, MD,§ Nazzarena Malavolta, MD,¶ and Emilio C. Campos, MD**

Versura P et al. Growth Factor levels in CB-S and PB-S

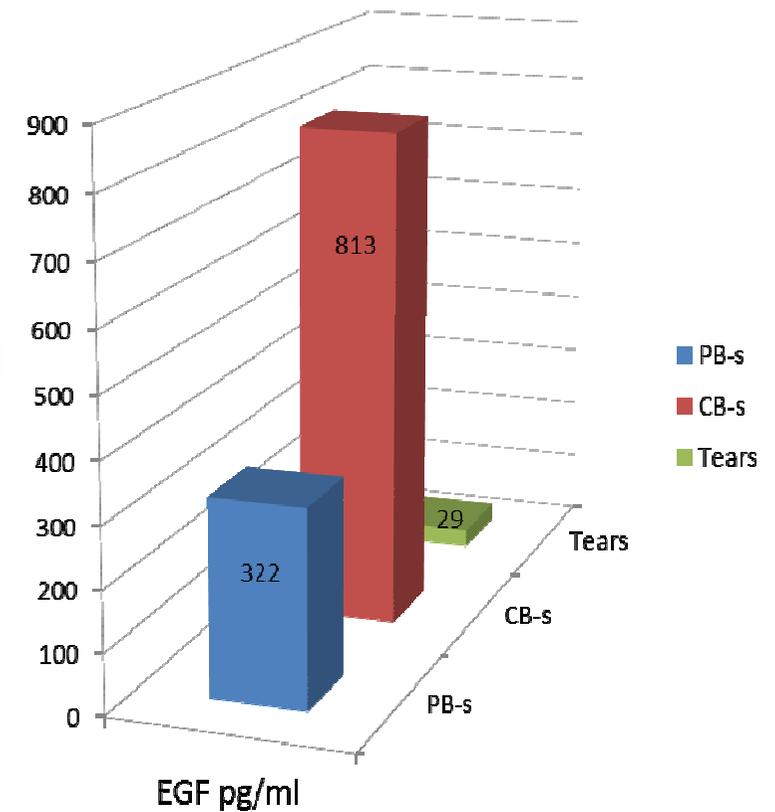
Targeting growth factor supply in keratopathy treatment: comparison between maternal adult peripheral and cord blood sources for preparation of topical eye drops.

Versura P¹, Buzzi M², Giannaccare G¹, Terzi A², Fresina M¹, Velati C², Campos EC¹



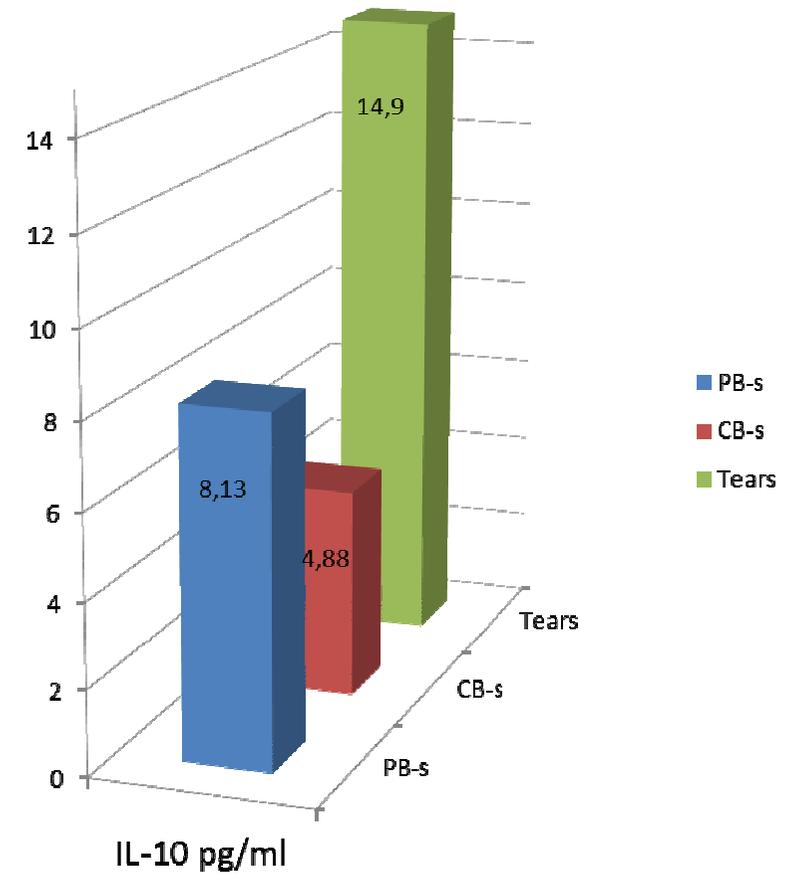
130 campioni di siero cordonale e 130 campioni di siero adulto

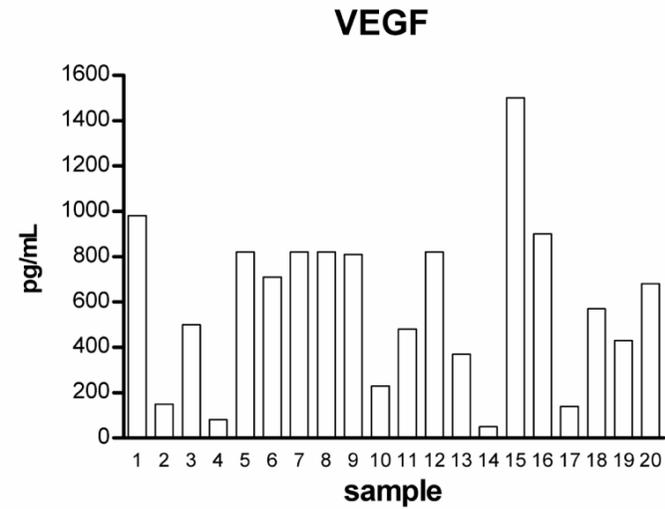
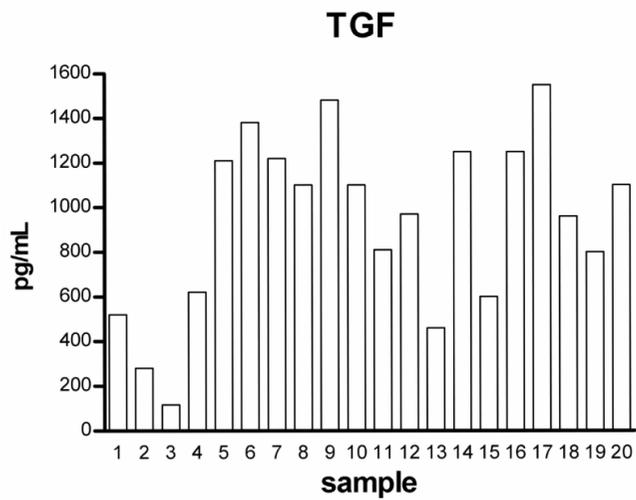
GF	source	mean	CV	median	MIN	MAX	p
EGF _{pg/ml}	PB-s	322	0.38	292.3	50.5	1083	<0.001
	CB-s	813.8	0.57	717	60.6	2273	
TGF- α _{pg/ml}	PB-s	12.2	0.08	9.9	1.7	51.8	<0.001
	CB-s	61	0.65	51.7	6.3	208.3	
TGF- β 1 _{pg/ml}	PB-s	67615.5	0.20	66908.3	7935.3	102596.9	
	CB-s	62067.5	0.21	61728.6	35634.1	107286.9	
TGF- β 2 _{pg/ml}	PB-s	1050.5	0.13	1055.7	61.79	1434.3	
	CB-s	1089.5	0.11	1098.2	810.1	1348	
TGF- β 3 _{pg/ml}	PB-s	633	0.16	629	46.1	832.9	
	CB-s	627.5	0.13	629.24	452.1	858.9	
PDGF- $\beta\beta$ _{pg/ml}	PB-s	1605.4	0.51	1521.4	277.7	5324.7	<0.001
	CB-s	3284.1	0.76	2622	0	15401.3	
VEGF _{pg/ml}	PB-s	83.5	1.16	51.9	0	545	<0.001
	CB-s	382.7	1.26	224	0	2506.5	
FGF-basic _{pg/ml}	PB-s	0.79	4.22	0	0	19.72	<0.001
	CB-s	25.7	1.01	26.1	0	133.4	
NGF- β _{pg/ml}	PB-s	0.75	3.57	0	0	24.8	<0.001
	CB-s	1.12	1.19	0.87	0	11.3	



130 campioni di siero cordonale e
130 campioni di siero adulto

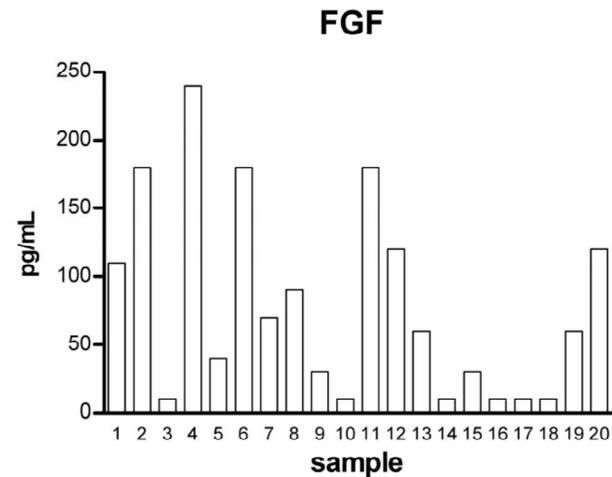
IL	source	mean	CV	median	MIN	MAX	p
IL-1b _{pg/ml}	PB-s	2.2	1.14	0.67	0	27.7	<0.001
	CB-s	554.8	4.22	6.4	0	47099	
IL-4 _{pg/ml}	PB-s	0.42	3.64	0	0	13.51	<0.001
	CB-s	14.19	1.03	0.91	0	96.8	
IL-6 _{pg/ml}	PB-s	30.69	1.23	5.49	0.85	320.9	<0.001
	CB-s	1626.1	4.31	6.92	0.8	105939	
IL-10 _{pg/ml}	PB-s	8.13	1.92	2.59	0	352.4	<0.001
	CB-s	4.88	3.88	4.3	0	15.4	
IL-13 _{pg/ml}	PB-s	1.52	1.98	0.26	0	33.6	<0.001
	CB-s	71.4	1.37	12	0	465.5	





Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE: Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone* 2004; 34:665-671

Borzini F, Mazzucco L: Tissue regeneration and in-loco administration of platelet derivatives. Clinical outcome, heterogeneous products, heterogeneity of the effector mechanisms. *Transfusion* 2005; 35:1759-1767



DOSAGGIO GFs : VARIABILITA' INDIVIDUALE

IERI

- Si* *No* Normativa
- Si* *No* Caratteristiche di prodotto
- Si* *No* Evidence base medicine

OGGI

- Si* *No* Normativa
- Si* *No* Caratteristiche di prodotto
- Si* *No* Evidence base medicine **?**



Grazie dell'attenzione !