



R. Bianchi

RIASSUNTO

Questa ricerca enfatizza l'utilità delle metodiche che utilizzano sangue autologo attivante i Fattori di Crescita tissutali e le cellule staminali multipotenti per introdurre metodiche biologiche di terapia biocompatibili e non invasive che consentano un'efficace riparazione tissutale in ambito sportivo, traumatologico e ortopedico-reumatologico.

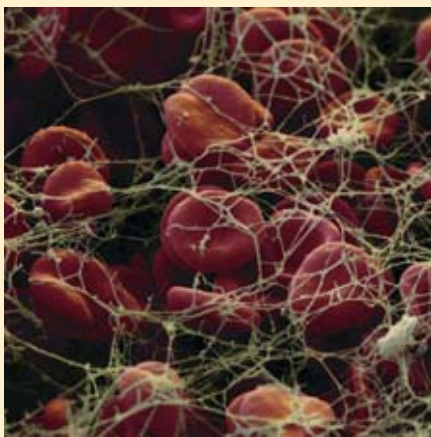
– Il sangue autologo additivato con "scaffold" biologici *low dose* ed iniettato nei tessuti lesionati, permette di attuare una terapia rigenerativa in ambito ortopedico-traumatologico comparabile ai risultati della chirurgia miniinvasiva.

PAROLE CHIAVE AUTORIPARAZIONE, EMOTERAPIA AUTOLOGA RIGENERATIVA, CELLULE STAMINALI, OMOTOSSICOLOGIA, SCAFFOLD BIOLOGICI *LOW DOSE*

SUMMARY: This research utilizes autologous blood methods, with the main aim to activate tissue Growth Factors and multipotent stem cells. The aim is to activate biological methods to completely repair tissue and structures in the orthopedic, traumatologic and rheumatologic medicine.

– Diluted autologous blood with biologic *low dose scaffolds* reinoculated in the damaged tissues, allows a regeneration in orthopedic and traumatologic medicine comparable with the results of miniinvasive surgery.

KEY WORDS: AUTOREPAIRING, AUTOLOGUE REGENERATIVE HAEMOTHERAPY, STEM CELLS, HOMOTOXICOLOGY, *LOW DOSE BIOLOGICAL SCAFFOLDS*



– Immagine tratta da:
<http://media-2.web.britannica.com/eb-media/28/98328-004-5514AFAC.jpg>

EMOTERAPIA AUTOLOGA RIGENERATIVA CON MEDICINALI OMOTOSSICOLOGICI, POSSIBILI FATTORI DI CRESCITA E CELLULE STAMINALI – STUDIO CLINICO PILOTA

REPARATIVE AUTOLOGUE HAEMOTHERAPY WITH HOMOTOXICOLOGICAL DRUGS, GROWTH FACTORS AND STEM CELLS

– *A PILOT CLINICAL TRIAL*

COME RIPARA UN TESSUTO DANNEGGIATO

In seguito ad una lesione traumatica che determini emorragia esterna o interna, si forma:

- 1) in una prima **fase emorragica**, un coagulo che funge da *scaffold* (impalcatura) con rilascio di numerosi Fattori di Crescita, chemiotattici e mitogeni.
- In questa prima fase si attivano i polimorfonucleati ed i linfociti.

Il sangue esercita un'azione ossigenante, nutritiva e riparatrice tissutale, descritta e dettagliata in personali precedenti pubblicazioni (Bianchi, 2007a;b); 2) entro 48 h si attiva la **fase infiammatoria** (FIG. 1) con intervento dei macrofagi che digeriscono (fagocitosi) il tes-

suto necrotico ed altri *detriti* prodotti dal danno tissutale. Macrofagi e cellule intrinseche secernono Fattori di Crescita che inducono la neovascolarizzazione e lo sviluppo del tessuto di granulazione (TAB. 1).

Le cellule presenti attorno o nell'area lesionata (solo nella prima settimana) includono anche un certo numero di **cellule staminali multipotenti**.

– I **macrofagi** sono chemiotattici per i fibroblasti, stimolano la proliferazione di fibroblasti e la sintesi di collagene tipo I, III, V e proteine non collagenose, attraverso specifici Fattori di Crescita: il Fattore di Crescita Derivato dalle Piastrine (PDGF), il *Transforming Growth Factor-alpha* (TGF- α), il *Basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF);

3) nella terza fase (**proliferativa**), dopo

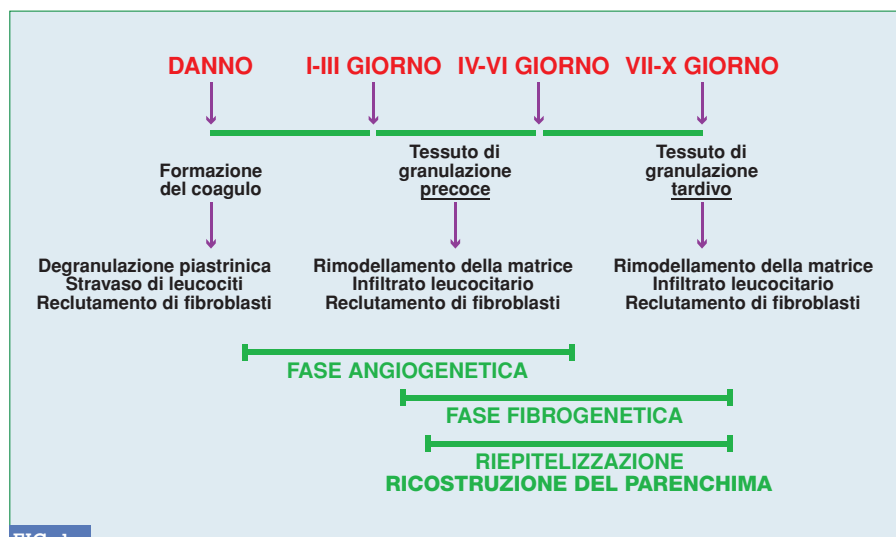


FIG. 1

Fasi in cui evolve la riparazione di un tessuto danneggiato.

circa una settimana, i fibroblasti richiamati dai tessuti *viciniori* e dal circolo sistemico, sintetizzano diverse proteine di matrice (collagene, elastina, ecc.).

In questa fase si forma il tessuto neo-organizzato neo-vascularizzato con successivo rimodellamento e rinforzo strutturale.

In questo modo si viene a formare progressivamente un tessuto di granulazione con rimodellamento strutturale, presente esclusivamente negli organismi viventi (FIG. 1).

– Dai dati reperibili in Letteratura scientifica aggiornata, l’attivazione precoce della cellule staminali sembra dipen-

dere prevalentemente dall’**attivazione piastrinica**, che implica anche la liberazione di granuli citoplasmatici attivanti diversi Fattori di Crescita.

I **Fattori rilasciati dalla piastrine** più noti sono il Fattore Aggregante Piastrinico (PAF), il Fattore di Crescita Derivato dalle Piastrine (PDGF), il *Trasforming Growth Factor-Beta* (TGF- β), l’*Epidermal Growth Factor* (EGF) ed alcuni altri, come indicato in FIG. 2.

I FATTORI DI CRESCITA

I Fattori di Crescita (*Growth Factors*) so-

no molecole *segnale* per la comunicazione **tra** le cellule di un organismo; gli esempi più noti sono le **citochine** e gli **ormoni** che si legano ai recettori *target* transmembrana.

La funzione principale dei Fattori di Crescita è il controllo esterno del ciclo cellulare, l’entrata in mitosi, la sopravvivenza, proliferazione, migrazione e il differenziamento cellulare.

– Le citochine, proteine secretorie che regolano l’immunità, l’inflammatione e l’emopoiesi, vengono prodotte in risposta a stimoli immunitari. Agiscono in bassa concentrazione, legando specifici recettori transmembrana con un processo *a cascata* che porta all’attivazione di uno specifico *set* di geni (*in Milani, 2007*). Ciò comporta una modulazione di proteine di membrana con proliferazione cellulare e secrezione di molecole effettrici.

Le citochine sono prodotte da molte popolazioni cellulari; i principali produttori sono i **linfociti Th** ed i **macrofagi**.

Le citochine che stimolano l’emopoiesi sono indicate come **CSF (Colony Stimulating Factor)** per la capacità di indurre il differenziamento di cellule midollari in coltura.

In questo gruppo sono presenti numerosi componenti che agiscono a vari livelli del processo di formazione delle cellule del sangue.

Le citochine coinvolte nella stimolazio-

TAB. 1
Composizione della matrice extracellulare nelle diverse fasi del processo di riparazione tissutale.

Numero di giorni dopo il danno tissutale	Coagulo	Derivazione	Tipo di cellule produttrici
I - III	<i>Fibrinogeno e fibrina</i> <i>Fibrinonectina</i> <i>Vitronectina</i> <i>Osteopontina</i> <i>Trombospondina</i>	Sangue Tessuti adiacenti	Piastrine Cellule mesenchimali
IV - VI	<i>Fibrinonectina</i> <i>Acido ialuronico</i> <i>SPARC</i> <i>Tenascina</i>	Tessuti e Sangue	Macrofagi Fibroblasti
VII - X	<i>Fibronectina</i> <i>Collagene tipo I</i> <i>Collagene tipo III</i> <i>SPARC</i> <i>Proteoglicani</i>	Tessuti	Fibroblasti

ne-espansione delle cellule staminali sono:

Stem Cell Factor/steel factor (KitL), trombopoietina (TPO), Interleuchine 1, 3, 6, 11 + mieloeritroidi GM-CSF, G-CSF, M-CSF, eritropoietina (questi ultimi quattro in fase di valutazione-conferma).

– L'azione angiogenetica è, quindi, un vero e proprio **programma metabolico attivato** in modo sinergico dal sangue, come illustrato in precedenti lavori e prospettato in questo (FIG. 3).

• Partendo da una strategia riparativa, l'attuale obiettivo è di giungere ad una vera e propria Medicina Rigenerativa.

CELLULE STAMINALI: DALLA MEDICINA TERAPEUTICA ALLA MEDICINA RIGENERATIVA

Le Cellule Staminali (C.S.) rappresentano una rivoluzione nella moderna medicina.

Aprono – infatti – l'orizzonte che segna il passaggio da Medicina Terapeutica a Medicina Rigenerativa.

– Si profila un cambiamento radicale, poichè si prospetta la possibilità di rigenerare organi e tessuti.

L'applicazione terapeutica delle C.S. potrebbe portare ad un cambiamento radicale in medicina, con nuovi ed efficaci trattamenti per una serie importante di patologie come sclerosi multipla, leucemie, mielomi, ecc.

"POTENZA" DELLE CELLULE STAMINALI

Le C.S. si reduplicano dando origine sia a **cellule uguali** a se stesse (staminali), sia a **precursori** di progenie destinati a differenziarsi in uno o più tipi cellulari.

Questi processi biologici manifestano tre aspetti fondamentali, quali:

- **morfoinesi** (generazione dell'organizzazione spazio-temporale di cellule e prodotti per costituire le parti dell'organismo);
- **proliferazione cellulare** (reduplicazione ed accrescimento delle strutture organiche);

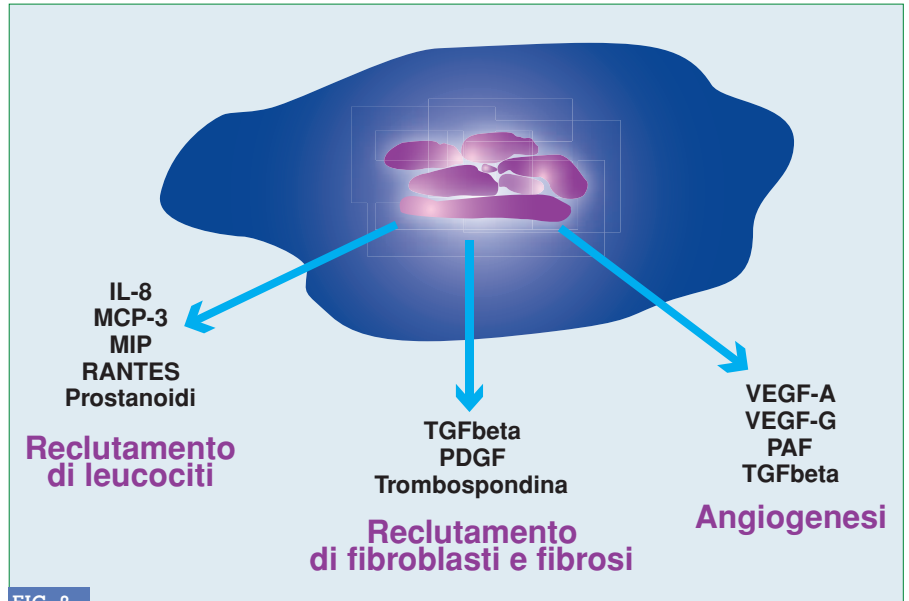


FIG. 2

Ruolo delle piastrine nell'induzione della riparazione tissutale.

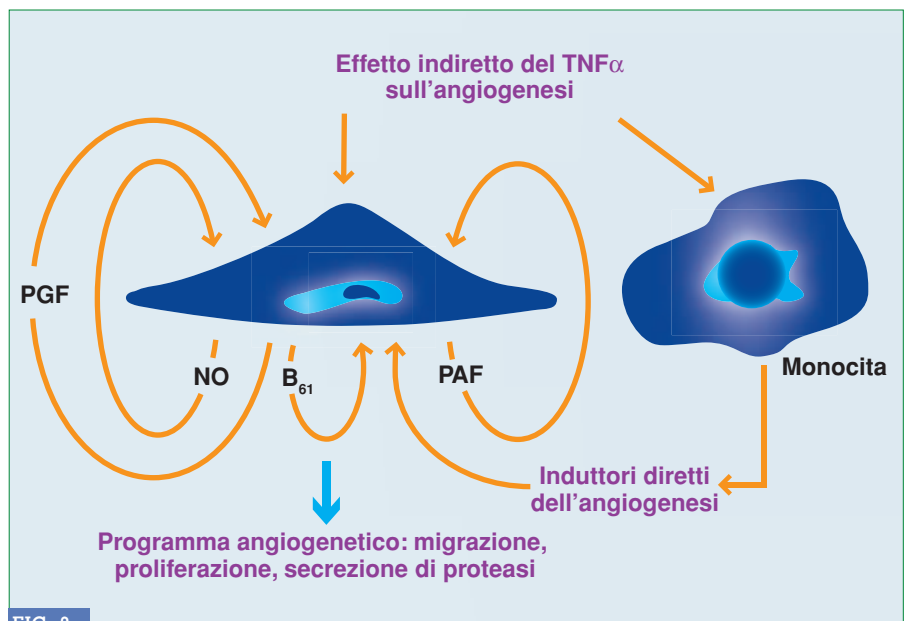


FIG. 3

Meccanismo con cui il TNF α stimola l'angiogenesi.

– **differenziazione cellulare** (acquisizione di caratteri biologici delle diverse linee cellulari ed organizzazione morfo-funzionale).

In ambito scientifico si discute sull'irreversibilità di questo ultimo processo che, con la differenziazione cellulare, porterebbe all'abbandono della proliferazione illimitata con perdita di una sorta di "immortalità" (cellule somatiche).

Smith (2006) ha distinto tale livello di potenza in:

- Totipotenza
- Pluripotenza
- Multipotenza
- Oligo/Unipotenza.

La differenza tra queste consiste, oltre che nella possibilità di dare origine a tutte le linee cellulari, anche nel **non essere** soggette all'invecchiamento (TAB. 2).

“POTENZA” DELLE CELLULE STAMINALI

Spettro di opzioni disponibili per il differenziamento di una cellula:

- **Totipotenza.** Autosufficienza per formare un organismo intero, caratteristica dello zigote e della *cellula meristemica* dei Vegetali, non dimostrata in altri tipi cellulari dei Vertebrati.
- **Pluripotenza.** Tutte le linee cellulari di un organismo, incluse le cellule germinali e alcune, se non tutte, le tipologie cellulari extraembrionali. Esempio: cellule staminali embrionali.
- **Multipotenza.** Linee cellulari multiple che costituiscono un intero tessuto o più tessuti. Esempio: cellule staminali emopoietiche.
- **Oligopotenza.** Due o più linee cellulari che appartengono ad un determinato tessuto. Esempio: cellule staminali neuronali che formano una sottopopolazione di neuroni nel cervello.
- **Unipotenza.** Una singola linea cellulare. Esempio: cellule staminali che danno origine agli spermatozoni (precursori degli spermatozoi).

TAB. 2

Le C.S. embrionali (che possiedono la massima potenza) non diventano totipotenti se non vengono incorporate nella *blastocisti*.

La prima tesi di questo lavoro è che in un **idoneo contesto biologico** si possa aumentare il livello di potenza riproduttiva e staminale.

CELLULE STAMINALI MULTI POTENTI – SANGUE E EMOPOIESI

Nell'adulto vi sono **C.S. multi-, oligo- e uni-potenti**, tessuto-specifiche.

Esse provvedono alla sostituzione continua delle cellule di tutti i tessuti dell'organismo, al mantenimento dei tessuti ed alla loro riparazione dopo un danno.

– Ad oggi vengono utilizzate a scopo di trapianto le C.S. emopoietiche ottenute dal midollo osseo o dal sangue periferico. Il midollo osseo contiene anche un secondo tipo di C.S. adulte, le C.S. mesenchimali. Studi recenti hanno dimostrato che le **C.S. emopoietiche** e mesenchimali, in particolari condizioni, si differenziano in **cellule con differenti specificità tissutali** (transdifferenziazione o plasticità): sono considerate le più plastiche per la rigenerazione tissutale. Ogni giorno l'organismo produce alcuni miliardi di nuove cellule emopoietiche. Tale continua produzione dipende

proprio e solo dalla presenza delle C.S. emopoietiche. L'iniezione di sospensioni di cellule midollari può riparare il midollo di ratti irradiati *total body*.

Anche dosi sub radioprotettive di cellule midollari sviluppano colonie di cellule eritroidi e mieloidi nella misura di 1 su 7000 cellule iniettate.

L'uso di cellule fluorescenti quantifica le C.S. in popolazioni cellulari miste nella misura di 1 - 2/10.000 o ancor meno.

– Un secondo dato importante: nelle emazie sono presenti proteine di superficie che riconoscono 8-14 *panels* di anticorpi monoclonali, di fatto marcatori delle C.S. emopoietiche.

Per aiutare a riconoscere la presenza di una singola C.S. è stata scoperta una varietà di marcatori.

– Nel sangue, le C.S. emopoietiche si differenziano in **cellule progenitrici** delle diverse linee, come quella linfocitaria e granulocitaria.

I progenitori perdono la capacità di auto-rigenerazione e riducono quella di differenziazione, ma vengono costantemente rigenerati dalla popolazione delle C.S. (FIG. 4).

I progenitori possono espandersi temporaneamente, ma continuano sempre a differenziarsi (tranne che in alcune leucemie).

– Il punto di riflessione è, all'oggi della ricerca sperimentale mondiale (maggio

2009), la valutazione di **quanta potenza** si possa ottenere dalle C.S. adulte e da quelle **più multipotenti** presenti nel midollo osseo e nel sangue, ovvero quanta potenzialità rigenerativa sia presente nel sangue di individui adulti e come attivarlo.

– Nei Mammiferi adulti in condizioni basali le **C.S. residenti sono prevalentemente presenti nel midollo osseo**.

La mobilitazione tramite introduzione di Fattori di Crescita produce un maggior numero di C.S. anche nel sangue.

Il sangue periferico mobilizzato contiene – quindi – un *mix* di C.S. emopoietiche e cellule progenitrici.

Nel sangue periferico circolano C.S. (definite HSCs, emopoietiche).

Purtroppo la quantità di queste è molto bassa. Il problema risiede nell'estrema difficoltà a coltivarle, nonostante la loro capacità all'auto rinnovamento.

E' più facile coltivare C.S. neuronali o embrionali.

E' indispensabile, quindi, **mobilitare** il sangue. Come?

– Attualmente si utilizzano stimolatori delle C.S., come le succitate citochine, quali: Stem Cell Factor/steel factor (KitL), trombopoietina (TPO), IL 1, 3, 6, 11.

Si evidenzia attualmente la **difficoltà di trapiantare infusioni di C.S. pure**; è più semplice tramite donatore di midollo o di sangue mobilizzato.

– L'impiego di donatore sano come fonte di C.S. progenitrici comporta, da un lato, l'individuazione del tipo e delle dosi ottimali del Fattore di Crescita da somministrare e, dall'altro, impone che ogni Servizio Trasfusionale indichi la quantità minima di C.S. da raccogliere affinché il trapianto abbia successo.

Altrettanto importante è la determinazione del momento in cui eseguire la staminoafesi: la somministrazione dei Fattori di Crescita – infatti – determina un picco di produzione intorno al 5° giorno di somministrazione.

– Nel **trapianto eterologo di “sangue mobilizzato”** oggi diffuso (più pratico di quello midollare) sono – però – contenute anche cellule periferiche, potenzialmente neoplastiche.

– Ecco quindi tornare *in auge* il **trapianto di sangue autologo**, forma di autoemoterapia più raffinata.

In alternativa si sta valutando l'utilizzo delle C.S. mesenchimali del midollo che presentano un ampio raggio di differenziazione *in vitro*, non solo dei tessuti mesodermici.

Si è scoperto che, in adatte condizioni, le C.S. emopoietiche midollari, parzialmente o totalmente purificate, possano anche rigenerare tessuti non ematici in risposta a segnali rigenerativi tessuto-specifici (muscolo, miocardio, cervello, fegato, intestino, rene, diversi tipi di epitelio). Tale fenomeno è definito transdifferenziazione / plasticità.

Recenti sperimentazioni (2008) hanno utilizzato in trapiantati di trachea, vescica, cute in ustionati, ecc. **C.S. midollari** del ricevente per rimpiazzare larghi segmenti anatomici mancanti.

In questi casi sono state utilizzate le C.S. da midollo osseo per la capacità di transdifferenziarsi in diversi tipi di tessuto, con il vantaggio etico di evitare le C.S. embrionali.

Alcuni ricercatori israeliani (2006) hanno isolato le **C.S. mesenchimali** dal sangue periferico mobilizzato mediante il Fattore Stimolante le Colonie Granulocitarie (G-CSF).

– Nel 2009, in pazienti affetti da sclerosi

multipla, si sono ottenuti risultati significativi sulla disabilità motoria iniettando C.S. non mieloablativa da sangue additivato con *ciclofosfamide* e *filgastrim*.

Tra i dati più interessanti è la scoperta italiana pubblicata su *Circulation Research*, 2008 su **una nuova popolazione di C.S. ad elevata potenza** (totipotent?) che, in idonee condizioni, possono differenziarsi in molteplici tipi cellulari (endotelio, adipociti, osteoblasti, neuroni, sangue).

CELLULE STAMINALI MULTI POTENTI E SCAFFOLDS

Dopo una lesione tissutale, tendinea o cartilaginea, si crea una soluzione di continuo che viene "riempita" da un coagulo.

Il coagulo funge da "scaffold" (impalcatura) per strutturare la riparazione del tessuto nelle tre già citate fasi successive.

L'elevata e crescente frequenza di patologie ortopedico-traumatologiche impone alla chirurgia nuove ed innovative strategie di ingegneria tissutale ricostruttiva con l'utilizzo di *scaffolds*, cellule o fattori bioattivi per rigenerare tessuti come menischi, tendini, cartilagini in modo naturale e biocompatibile.

– In campo chirurgico si va diffondendo l'associazione tra tecniche operatorie invasive ed iniezioni di Fattori di

Crescita, cercando di individuare, ove possibile, alternative alla chirurgia protesica sostitutiva.

– Le C.S. possono riparare tessuti lesi anche "appoggiandosi" su matrici o impalcature che ne favoriscano l'attecchimento.

I tessuti più esposti a lesione e con maggiori difficoltà rigenerative sono spesso anche i più colpiti: i menischi e le cartilagini articolari, strutture avascolari.

I BIOSCAFFOLDS

Gli *scaffolds* sintetici presentano alcuni svantaggi: possono alterare le proprietà meccaniche del tessuto da riparare, perdere integrità e resistenza nel tempo, causare abrasioni, flogosi reattive, difetti riparativi cutanei, ecc.

► In questo studio abbiamo selezionato ed utilizzato **scaffold biologici** (*bio-scaffolds*) sia per la miglior tenuta, biocompatibilità e minori recidive di lesione, ma anche più coerenti secondo i principi della Medicina Fisiologica Rigenerativa. Riteniamo i più interessanti:

■ FIBRINA E TAPPO PIASTRINICO

Sono fondamentali *scaffold* naturali la FIBRINA umana e il TAPPO PIASTRINICO, per i seguenti motivi:

– la fibrina fresca funge da *scaffold* naturale nella guarigione di una ferita;

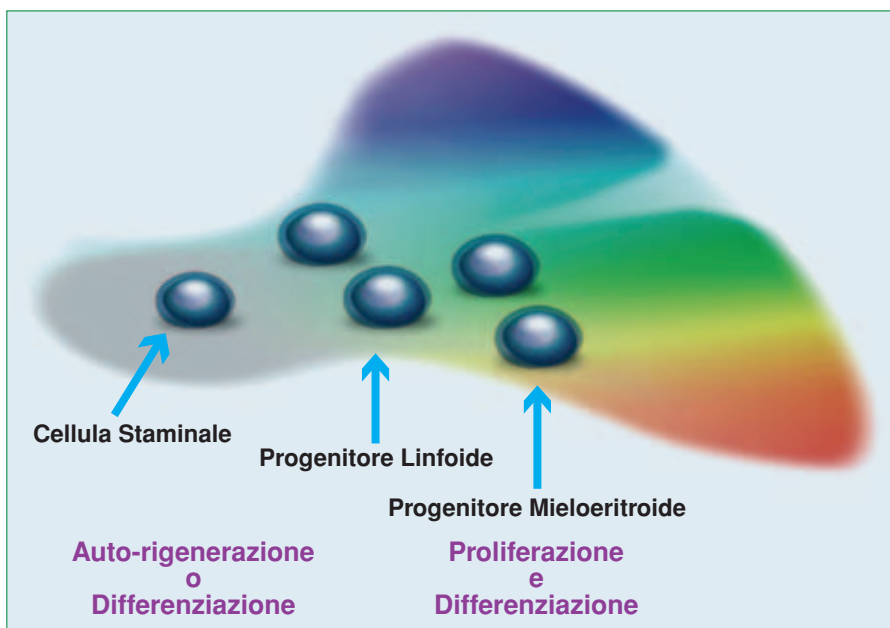


FIG. 4

Relazioni tra C.S. emopoietiche e cellule progenitrici. La differenziazione è indicata dai colori progressivamente più intensi secondo il grado di maturazione della cellula. Le C.S. possono scegliere tra differenziazione ed auto-rigenerazione.

– i tessuti poco vascolarizzati come la cartilagine ialina hanno scarsa capacità rigenerativa e di completa guarigione;

– le fratture emorragiche guariscono più rapidamente a parità di lesione di quelle senza stravaso ematico;

– l'utilizzo del sangue come collante e tappo fibrinico al termine dell'intervento chirurgico facilita il processo riparativo. Recenti ricerche hanno documentato che sia il plasma, sia il sangue autologo, ricco in piastrine e fibrinogeno, possono migliorare la velocità e qualità riparativa dopo lesioni traumatiche, chirurgiche, nei casi di artrosi e varie patologie ortopediche. Ciò dipende dall'elevata concentrazione dei Fattori di Crescita rilasciati durante la degranolazione piastrinica. Inoltre, è nota la capacità delle piastrine di ridurre il dolore e la capacità riparativa clinico-funzionale.

– Lo *scaffold* fibrinico fornisce – di fatto – una superficie che facilita l'adesio-

ne, la sopravvivenza, la proliferazione, la migrazione e la differenziazione delle C.S.

■ **DERMA**

Dal derma umano si ricavano frammenti tissutali che hanno caratteristiche idonee per ottenere maggiori valori di proliferazione cellulare, fibronectina e IL6.

■ **LETTI MICROCIRCOLATORI**

E' di quest'anno (marzo) l'utilizzo di letti microcircolatori o frammenti tissutali porcini usati come *bioscaffolds* funzionali da intelaiatura per la deposizione e proliferazione dell'innesto di sangue autologo. Sperimentazioni c/o la Stanford University hanno utilizzato frammenti tissutali (letti microcircolatori EMBs) come *complessi ingegneristici tridimensionali* su cui impiantare le C.S.

■ **COLLAGENE, CARTILAGINE IALINA, MATRICE MESENCHIMALE**

Le matrici extracellulari di tessuti umani, suini, bovini sono un valido substrato rigenerativo, poiché contengono collagene, macrofagi e Fattori di Crescita.

Il collagene tipo I è particolarmente efficace nella riparazione dell'articolazione della spalla (cuffia dei rotatori).

■ **PLASMA PRIMORDIALE**

E' verosimile l'ipotesi che le prime sequenze stabili di aminoacidi abbiano utilizzato come stampi e impalcature biochimiche ed elettromagnetiche i sali minerali abbondantemente presenti nell'ambiente idrotermale degli oceani primordiali (FIG. 5).

**L'EMOTERAPIA
COME TRAPIANTO AUTOLOGO
IN AMBITO ORTOPEDICO
– STUDIO CLINICO PILOTA**

L'Emoterapia Rigenerativa Autologa (E.R.A.) che utilizza sangue umano come autoinnesto in ambito ortopedico-traumatologico, è documentata da molteplici lavori da almeno 70 anni.

Come già pubblicato (Bianchi, 2007 a;b), il **sangue** non è solo il sistema emuntoriale più efficace e costante, ma possiede anche **intrinseche capacità riparative e rigenerative** che possono essere potenziate attraverso procedimenti biologici (*in* Milani, 1997).

La ricerca scientifica sta dimostrando in modo sempre più inequivocabile che la presenza nel sangue periferico di C.S. **può rigenerare la produzione di neotessuti attraverso trapianti autologhi**. Recenti lavori clinici in ambito ortopedico-traumatologico lo confermano sia in campo umano che veterinario.

I più recenti studi clinici supportano la validità del trapianto autologo di sangue in differenti condizioni lesive.

► In campo omotossicologico l'utilizzo di **Cartilago suis-Injeel®**, **Discus intervertebralis suis-Injeel®**, **Funiculus umbilicalis suis-Injeel®**, **Embryo totalis suis-Injeel®** ha confermato risultati clinici di rilevante interesse in campo or-

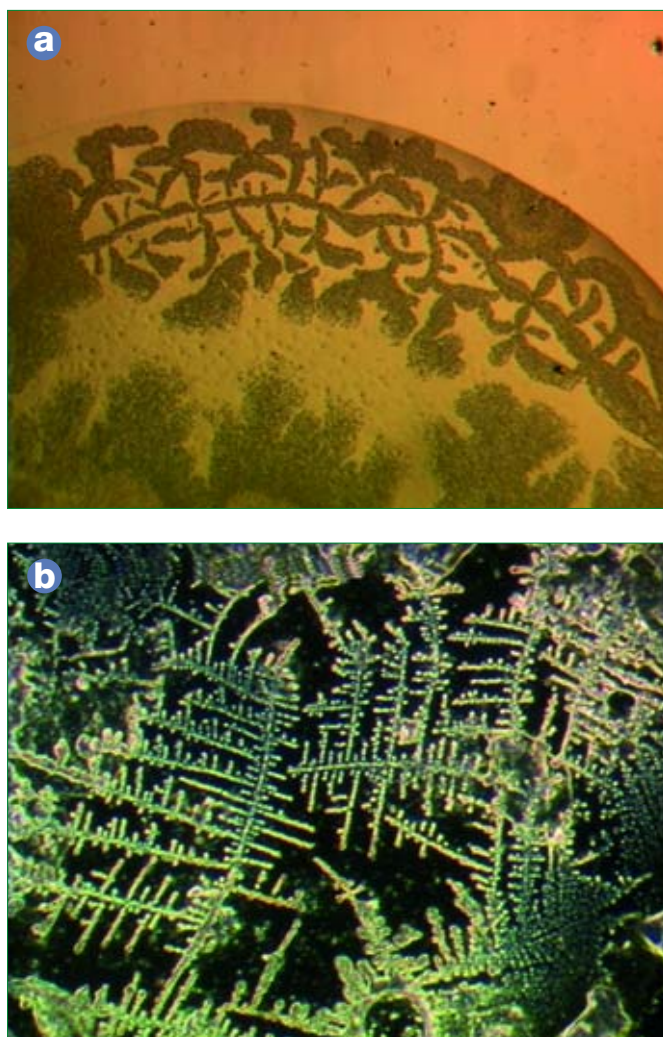


FIG. 5

Impalcature saline e proteiche in liquidi biologici umani:

a liquido peritoneale;

b saliva.

– Microfotografie al microscopio a contrasto di fase in campo oscuro. 40X.

– Foto dell'autore.

topedico, sia iniettati come tali che in miscelazione con sangue autologo.

– Lo stimolo *low dose* di lisati di *bioscaffolds* può facilitare i meccanismi di reazione isospecifica e di riparazione guidata attraverso fini meccanismi d'interazione recettoriale.

CITOCINE E SISTEMI A CASCATA LOW DOSE IN MEDICINA RIGENERATIVA

L'E.R.A. si "sposa" con una nuova era, quella della Medicina Rigenerativa.

Per meglio spiegare i meccanismi legati alle potenzialità rigenerative dei tessuti e delle C.S., la ricerca progredisce in almeno tre ambiti potenzialmente sinergici:

1) Analisi dell'espressione e sequenza genomica

2) "Sistemi biologici" *commitment* staminale e *processi a cascata flogistica*

Le citochine influenzano sintesi ed azione di altre citochine (cascata immunitaria, ormonale, coagulativa, nervosa) necessitando di specifici recettori promossi da segnali esterni alle cellule bersaglio che reagiscono modificando l'espressione genica.

3) *Low dose* e Medicina Fisiologica di Regolazione

Citochine, Fattori di Crescita ed altri peptoni secretori, lisati tissutali di *bioscaffolds*, brodi di sequenze aminoacidiche fungono da stimoli immunitari e riparativi che – di fatto – attivano l'immunità aspecifica, l'infiammazione, la rigenerazione e l'emopoiesi.

Sali minerali, Fattori di Crescita, oligoelementi, stimoli neurali, equilibratori recettoriali, biostimolatori possono promuovere la rigenerazione dei tessuti traumatizzati.

Molti medicinali omotossicologici fungono, attraverso stimoli *low dose*, da **attivatori** e **mobilizzatori del sangue periferico ossigenato**; ulteriore innesto di stimolo sui recettori di membrana attraverso peptoni che attivano citochine

proinfiammatorie quali IL1, TNF, IL3, Steel factor.

La ricerca d'avanguardia conferma la validità della **Medicina Fisiologica di Regolazione** come strumento di ricerca per sfruttare appieno la potenza del "*commitment*" staminale in relazione a vari stimoli.

– Modificando l'espressione genica, le citochine possono fungere da potenti attivatori cellulari.

– Da questo punto di vista ritengo che la ricerca sull'ambiente attivante le C.S. possa aprire **il nuovo orizzonte di una Medicina Fisiologica di Rigenerazione.**

EMOTERAPIA AUTOLOGA RIGENERATIVA: EFFICACIA INTRA – E PERI-ARTICOLARE

L'obiettivo di questo studio è stato:

1) Perfezionare un metodo fisico-biologico ed offrire un protocollo per l'attivazione-mobilizzazione del sangue periferico a scopo rigenerativo.

2) Verificare la percentuale di efficacia delle applicazioni peri- ed intra-articolari in campo ortopedico-traumatologico con un miglioramento clinico in almeno il 50% dei pazienti sofferenti di patologie croniche, superiore alla percentuale di risultati comunemente considerati riferibili all'effetto placebo (30-40%).

3) Verificare la possibilità di una riparazione funzionale, con sostituzione degli interventi ad alta invasività (chirurgia e sostituzione protesica) ed attivazione dei processi rigenerativi tissutali.

PAZIENTI E METODI

► Criteri di ammissione

Sono stati inclusi in questo studio **25 pz** (17 M; 8 F) di età compresa tra 32 e 78 anni, affetti da patologie ortopedico-traumatologiche croniche da almeno 2 anni:

– **7** artrosi, tendinite calcifica della spalla, lesioni della cuffia dei rotatori (6M, 1F);

– **5** coxartrosi (4M, 1F);

– **7** discopatia ed ernia discale, cervicartrosi (6M, 1F);

– **6** meniscopatia e lesioni meniscali (1M, 5F).

► Modalità e durata dello studio

Su 25 pz considerati, il 65% aveva ottenuto insuccessi o risposte poco significative dai trattamenti convenzionali (massoterapia, terapia farmacologica o chirurgica); il 35% insuccessi da altri trattamenti (fitoterapia, osteopatia, ecc.).

– A tutti è stato proposto un protocollo di emoterapia integrato con l'osservanza di corrette abitudini vitalizzanti: igienico-dietetiche (alimentazione mediterranea, attività fisica o sportiva adeguata laddove possibile) e in, alcuni casi, tecniche adjuvanti secondarie.

– Il trattamento è consistito in sedute ambulatoriali settimanali o mensili.

Il numero di sedute è variato **da 3 a 20**, secondo il grado di patologia e di cronicità. I tempi di sperimentazione sono stati relativamente brevi (1-6 mesi).

Sono stati esclusi dalla terapia i F.A.N.S. ed i corticosteroidi per non inibire l'attività delle citochine proinfiammatorie, il processo flogistico-riparativo e per poter valutare nel tempo gli effetti del trattamento sul dolore.

PROTOCOLLO CLINICO E.R.A.

1) Il braccio del paziente viene sottoposto ad idroterapia con bracciluvio alternato caldo-freddo, per aumentare la vascolarizzazione, l'ossigenazione, la mobilizzazione dei Fattori di Crescita e la demarginalizzazione dei leucociti.

2) Con cotone idrofilo viene massaggiato il punto di prelievo fino all'ottenimento della vasodilatazione locale.

– **1 ml** di sangue viene prelevato dalla vena cubitale, o da altra vena dell'avambraccio.

3) Il sangue viene diluito al 25%, con liquidi isotonici.

Sono stati utilizzati medicinali omotossicologici nella totalità del campione, con l'integrazione di Magnesio pidolato (36%), Plasma di Quinton (20%), Acido

MEDICINALI	RATIO - MECCANISMO D'AZIONE
Cartilago suis-Injeel®	Riparatore cartilagineo
Meniscus suis-Injeel®	Riparatore meniscale
Arnica compositum-Heel®	Riparatore tissutale, antiflogistico
Ledum compositum	Riparatore connettivo-discale
Kalmia compositum	Antiflogistico cervicale
Zeel T®	Riparatore cartilagineo, antidegenerativo
Galium-Heel®	Drenante mesenchimale (di matrice)
Procaina	Neuralterapico
Lidocaina	Neuralterapico
Plasma di Quinton	Polisalino metabolico-attivante
Acido ialuronico	Viscosupplementazione
Magnesio pidolato	Antiflogistico, antispastico muscolare
O ₂ in forma gassosa	Attivatore metabolico ossidante

TAB. 3

Medicinali utilizzati nella sperimentazione.

jaluronico (12%) e, nei casi di dolore severo, Procaina o Lidocaina (16%) (TAB. 3).
4) Il sangue viene ossigenato e miscelato.

5) La miscela viene **mobilizzata**, mediante cinque violente succussioni (tindallizzazione) in modo che ogni emazia venga ossigenata ed idratata.

6) **La reinoculazione viene eseguita in sede intra-articolare o peri-articolare nella zona attigua la sede della lesione.**

RACCOLTA DATI, ETICA, INFORMATIVA DEL PAZIENTE

A tutti i pazienti è stata chiarita l'opportunità di intraprendere una terapia non convenzionale, concordato il consenso informato scritto, compilata una cartella clinico-anamnestica.

GESTIONE DEI DATI

L'analisi dei risultati clinici e laboratoristici è stata raccolta e sintetizzata statisticamente sul campione generale diviso per patologia. È stata effettuata una prima valutazione statistica dei dati ad oggi raccolti (N.d.R.: aprile 2009).

– È stata anche effettuata una valutazione tipo *case report* sui casi più significativi.

RISULTATI

Modificazioni isto e citologiche del sangue mobilizzato e attivato

L'analisi in microscopia ottica all'He-moli Test (studio isto-morfologico su sangue capillare) evidenzia che il sangue si modifica profondamente se diluito, mobilizzato e trattato con O₂ e soluzioni isotoniche (Bianchi, 2007 a;b).

– In sintesi la E.R.A. utilizza sangue **fresco, mobilizzato e nelle condizioni di massima attivazione metabolica.**

► La totalità dei pz ha aderito al protocollo E.R.A., il 92% l'ha concluso (2 *drop out* su 25 pz inclusi). Solo 11 pazienti (44%) hanno aderito alle integrazioni igienico-dietetiche e salutistiche raccomandate; il 56% ha proseguito le abitudini di vita antecedenti, sottoposti esclusivamente alla E.R.A.

I risultati clinici sono stati **molto soddisfacenti nell'84%** dei casi. La scomposizione tra campione "*salutista*" e "*abitudinario - solo E.R.A.*" premia il primo con risultati molto soddisfacenti nel 93%. Anche gli "*svogliati*" hanno goduto di ampio beneficio, confermando nel 78% dei casi **l'efficacia della terapia** indipendentemente dal *life-style*.

– Per quanto riguarda la tollerabilità, nel 20% si sono registrati segnali di dolore

al momento dell'infiltrazione; 12% lieve fastidio durante le successive 24 h, prontamente autorisolti.

Non si sono registrati *drop out* per reazioni dopo l'inizio della terapia.

– L'elenco circostanziato dei pazienti, diagnosi, terapia e risultati sono esposti in TAB. 4.

Il **92%** dei pazienti (tranne due: uno si è rifiutato di proseguire la terapia dopo le prime sedute; uno dopo 3 mesi per risultato dubbio o insoddisfante), **ha ottenuto miglioramenti** (modesti nel 8%; netti nel 48%; guarigioni-remissioni cliniche nel 36%) (FIG. 6), documentati – talora – anche con esami strumentali.

La valutazione media [Scala Analogica Visiva (V.A.S.)], sul livello di dolore e limitazione funzionale prima e un mese dopo l'ultima seduta di E.R.A. ha mostrato un miglioramento medio altamente significativo ($p < 0,01$).

Il dolore passa da **7,3** (stressante-insopportabile) a **2,6** (lieve) secondo la valutazione MPQ (Mc Gill Pain Questionnaire); la limitazione articolare media passa da **110°** a **40°** (FIG. 7).

– Una scomposizione della casistica per patologia dimostra l'efficacia nelle patologie di spalla (remissione clinica = 43%; netto miglioramento = 57%), del ginocchio (remissione clinica = 50%; netto miglioramento = 34%; lieve miglioramento = 16%), del rachide (remissione clinica = 43%; netto miglioramento = 19%; lieve miglioramento = 13%), nelle coxartrosi (netto miglioramento = 80%) (FIG. 8).

DISCUSSIONE

• Efficacia e tollerabilità

L'E.R.A. può essere considerata una tecnica efficace, rapida e poco invasiva nella risoluzione di casi clinici a decorso cronico e datati.

– La Letteratura scientifica d'avanguardia (in forma mobilizzata o concentrata in pappa piastrinica) e il presente lavoro (in forma ossigenata, additivata e dinamizzata) rivaluta la E.R.A. come strumento maneggevole di **terapia rigenerativa** (staminale?), efficace nei casi di

PAZIENTI	Età Sesso	DIAGNOSI	EMOTERAPIA RIGENERATIVA AUTOLOGA ADDITIVATA	RISULTATO
● SPALLA				
F.P.	57 M	Tendinite della cuffia dei rotatori spalla dx	Intraarticolare con O2 e Zeel T + Kalmia comp. + Magnesio pidolato	Guarigione clinica
D.A.	55 F	Tendinosi del m. sottoscapolare Sclero-calcificazioni del m. sovraspinoso	Intraarticolare con O2 e Kalmia comp. + Magnesio pidolato	Guarigione clinica
P.G.	56 M	Lesione della cuffia dei rotatori	Sottocutanea con O2 e Engystol + Galium Heel	Miglioramento dell'escursione articolare. Risoluzione della sintomatologia algica
B.A.	68 M	Artrosi della spalla dx con lesione tendinea del m. sovraspinoso (7 mm)	Intraarticolare con Kalmia comp. + Magnesio pidolato	Guarigione clinica
O.G.	66 M	Artrosi acromio-claveare con degenerazione del m. sottospinoso	Intraarticolare con Arnica comp. + Magnesio pidolato + Procaina	Netta riduzione algica
O.D.	69 M	Artrosi della spalla sx calcificata, anchilotica, lussata	Intraarticolare con Kalmia comp. + Magnesio pidolato + Lidocaina	Netto miglioramento
F.A.	70 M	Artrosi calcifica di spalla dx	Intraarticolare con Arnica comp. + Magnesio pidolato + Lidocaina	Netto miglioramento
● ANCA				
C.G.	78 F	Coxartrosi monolaterale	Intraarticolare con O2 e Zeel T	Risoluzione della sintomatologia algica
C.C.	60 M	Coxartrosi monolaterale	Intraarticolare con O2 e Zeel T + Ledum comp. + Arnica comp. + Cartilago Suis-Injeel	Netto miglioramento, risoluzione della sintomatologia algica
P.G.	75 M	Coxartrosi monolaterale	Intra e periarticolare con O2 e Zeel T + Ledum comp.	Rinuncia
D.C.S.	41 M	Coxartrosi bilaterale	Periarticolare con O2 e Zeel T + Ledum comp.	Miglioramento clinico
B.M.	61 M	Grave coxartrosi bilaterale in insufficienza renale cronica	Intra e periarticolare con O2 e Zeel T + Ledum comp.	Miglioramento della deambulazione senza stampelle. Risoluzione della sintomatologia algica
● GINOCCHIO				
B.F.	70 F	Degenerazione del menisco mediale dx	Intra e periarticolare con O2 e Ledum comp. + Magnesio pidolato	Miglioramento della sintomatologia algica
G.C.	32 F	Meniscopatia mediale	Intra e periarticolare con O2 e Zeel T + Meniscus Suis-Injeel	Risoluzione con totale ripristino dell'attività sportiva
A.E.	62 F	Meniscopatia bilaterale	Intra e periarticolare con O2 e Zeel T + Meniscus Suis-Injeel	Miglioramento con totale ripristino dell'attività sportiva
P.R.	65 F	Degenerazione del corno posteriore del menisco mediale	Periarticolare con O2 e Zeel T + Meniscus Suis-Injeel	Guarigione clinica
M.G.	70 F	Meniscopatia mediale	Periarticolare con O2 e Zeel T + Meniscus Suis-Injeel	Guarigione clinica
G.E.	47 M	Lesione meniscale del ginocchio dx	Intra e periarticolare con O2 e Zeel T + Meniscus Suis-Injeel + Magnesio pidolato	Miglioramento clinico
● RACHIDE				
T.R.	71 F	Discopatie multiple con protrusioni lombari e spondilolistesi	Paradiscale con O2 e Zeel T	Risoluzione della sintomatologia algica
L.D.	44 M	Ernia discale	Paradiscale con O2 e Ledum comp.	Risoluzione
D.T.G.	40 M	Ernia discale espulsa	Paradiscale con O2 e Ledum comp.	Risoluzione completa
M.A.	45 M	Ernia discale espulsa	Paradiscale con O2 e Ledum comp.	Risoluzione completa
M.G.	65 M	Discopatia	Paradiscale con O2 e Ledum comp. + Magnesio pidolato	Stazionario Rinuncia
C.G.	58 M	Protrusione discale circonferenziale L4-L5 in politraumatizzato	Paradiscale con O2 e Zeel T	Miglioramento clinico
D.P.I.	72 M	Cervicartrosi	Paradiscale con O2 e Kalmia comp.	Netto miglioramento

TAB. 4

Relazione tra diagnosi, terapia e risultato clinico in 23 pazienti (2 drop out su 25) affetti da patologie ortopedico-traumatologiche.

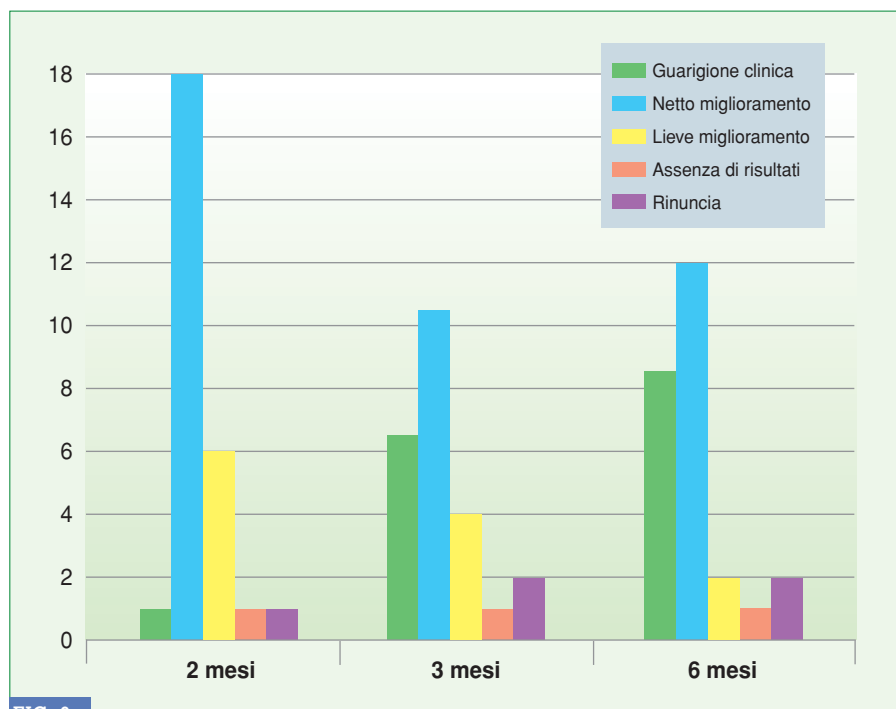


FIG. 6

Riassunto percentuale di efficacia nella casistica presentata.

periartrite, ernia discale, discopatia degenerativa, meniscopatia e coxartrosi. Poiché la E.R.A. è una forma di **trapianto autologo** di sangue (tessuto connettivo liquido), si conferma in Ortopedia sia come **alternativa efficace all'intervento chirurgico**, sia come **approccio complementare-sinergico** nella fa-

se acuta e nell'accelerazione della riabilitazione post-operatoria. Elevata la tollerabilità, previa informazione al paziente circa la positiva e non pericolosa reazione pro-infiammatoria, con lievi e transitorie sensazioni di gonfiore, dolore, calore e pressione in sede di inoculazione. Non so-

no stati registrati casi di reazione allergica.

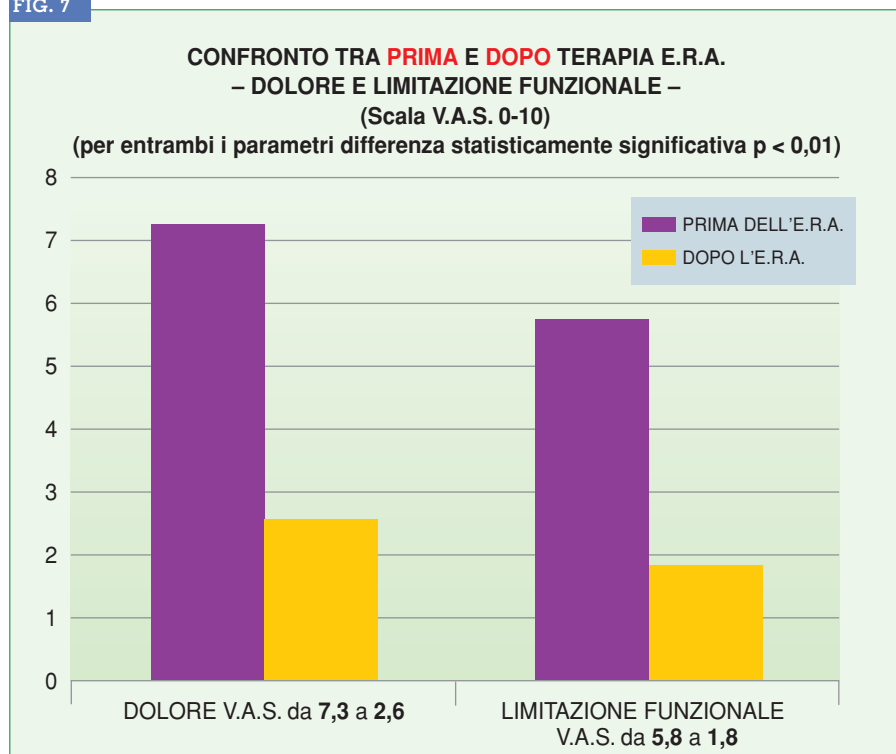
• **Compliance ed evidenza clinica**

La *compliance* è stata elevata (92%), poiché la terapia viene vissuta come "medico-scientifica" ed efficace. – Infatti, già dalle prime sedute si registra un miglioramento della sintomatologia nell'85% dei casi trattati (FIG. 6).

L'Emoterapia Rigenerativa Autologa (E.R.A.):

- 1) si conferma **valida e moderna tecnica medica** a supporto/integrazione e/o valida/riconosciuta alternativa alle tecniche medico-chirurgiche per le stesse patologie;
- 2) da pratica obsoleta dello scorso secolo, è attualmente (quando adeguatamente supportata dalla ricerca d'attivazione citochinica, staminale e recettoriale) una tra le più raffinate e competitive **strategie d'avanguardia di Medicina bio-rigenerativa**. ■

FIG. 7

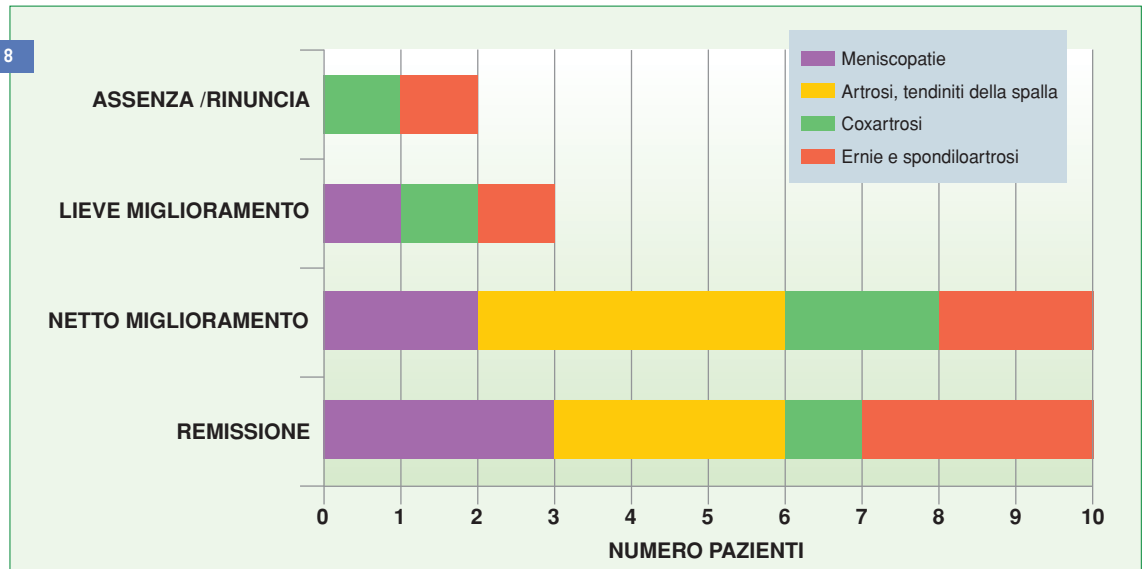


Letteratura

1. Anitua E. e Coll. – Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. **2006**.
2. Anitua E. e Coll. – Autologous fibrin matrices: a potential source of biological mediators that modulate tendon cell activities. *J Biomed Mater Res A*. **2006** May; 77(2): 285-93.
3. Asefi M., Augustin M. – Regulative therapy: treatment with nonspecific stimulants in dermatology in traditional and modern perspectives *Forsch Komplementarmed.*, **1999** Apr; 6 Suppl 2:9-13. Review. (German).
4. Bianchi R. (a; b) – Potenzialità dell'Autoemoterapia nelle Patologie croniche. *La Med. Biol.*, **2007**/2; 37-47 (Prima Parte); **2007**/3; 35-9 (Seconda Parte).
5. Burt R.K. et Al. – Autologous non-myeloablative haemopoietic stem cell transplantation in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase I/II study. *Lancet Neurol.*, **2009** Mar; 8(3): 219-21.
6. Burt R.K., Loh Y., Pearce W. et Al. – Clinical applications of blood-derived and marrow-derived stem cells for nonmalignant diseases. *JAMA* **2008**: 299 (8): 925-36.

FIG. 8

Scomposizione della casistica per patologia e sede di lesione anatomo-patologica.



7. Couri C. et Al. – C-peptide levels and insulin independence following autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *JAMA* **2009**; 301: 1573-1579.
8. Couri C.E., Oliveira M.C., Stracieri A.B. et Al. – C-peptide levels and insulin independence following autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *JAMA* **2009** Apr 15; 301(15): 1573-9.
9. De Monte A., van der Zee H., Bocci V. – Major ozonated autohemotherapy in chronic limb ischemia with ulcerations. *J Altern Complement Med.*, **2005** Apr; 11(2): 363-7.
10. Di Paolo N., Gaggiotti E., Gallii F. – Extracorporeal blood oxygenation and ozonation: clinical and biological implications of ozone therapy. *Redox Rep.*, **2005**; 10(3): 121-30.
11. Fritzenwanger M., Lorenz F., Jung C., Fabris M., Thude H., Barz D., Figulla H.R. – Differential number of CD34+, CD133+ and CD34+/CD133+ cells in peripheral blood of patients with congestive heart failure. *Eur J Med Res.*, **2009** Mar 17; 14(3): 113-7.
12. Grebnev E.N., Shumskii A.V. – Immunocorrective therapy in the treatment of chronic herpetic stomatitis by using magnetic autohemotherapy. *Stomatologiya (Mosk)*. **1995**; 74(2): 37-9. *Russian*.
13. Kiesewetter H., Jung F., Koscielny J., Pindur G., Wenzel E. – Quality assurance in autologous blood collection from critically ill patients. *Beitr Infusionsther.*, **1993**; 31: 202-8. *German*.
14. Hongyan Zhou et Al. – Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Recombinant Proteins. *Cell Stem Cell*, 23 April **2009**: 10.
15. Inanç B., Elçin A.E., Elçin Y.M. – Human embryonic stem cell differentiation on tissue engineering scaffolds: effects of NGF and retinoic acid induction. *Tissue Eng Part A*. **2008** Jun; 14(6): 955-64.
16. Ivanova N.B., Dimos J.T., Schaniel C., Hackney J.A., Moore K.A., Lemischka I.R. – A stem cell molecular signature. *Science*. Vol 298; **2002**: 601-604.
17. Lur'e B.L., Alekseev A.A., Kadiev O.A. – Effect of UV-autohemotherapy on the level of medium-molecular peptides in the blood. *Lab Delo*. **1986**; (8): 466-8. *Russian*.
18. Mastrandrea F., Semeraro F.P., Coradduzza G., Manelli M., Scarcia G., Pezzuto F., Serio G. – CD34+ hemopoietic precursor and stem cells traffic in peripheral blood of celiac patients is significantly increased but not directly related to epithelial damage severity. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. **2008** Nov; 40(3): 90-103.
19. Milani L. – Sottopopolazioni linfocitarie come indicatore di benessere in terapia autoematica omotossicologica. *La Med. Biol.*, **1997**/3; 9-18.
20. Milani L. – I motori-messaggeri dell'informazione in Medicina Fisiologica di Regolazione. Nuove idee e medicinali innovativi. *La Med. Biol.*, **2007**/4; 41-52.
21. Olwin J.H., Ratajczak H.V., House R.V. – Successful treatment of herpetic infections by autohemotherapy. *J Altern Complement Med.*, **1997** Summer; 3(2): 155-8.
22. Prokopi M., Pula G., Mayr U., Devue C. et Al. – Proteomic analysis reveals presence of platelet microparticles in endothelial progenitor cell cultures. *Blood*. **2009** Apr 15.
23. Randelli P.S., Corsi M.M. et Al. – I fattori di crescita e gli "scaffold" biologici nella chirurgia della cuffia dei rotatori. *Lo Scalpello*, **2008**; 22: 66-76.
24. Schippling S., Heesen C., Zander A., Martin R. – Stem cell transplantation in multiple sclerosis. *J Neurol*. **2008** Dec 255 Suppl 6: 43-7.
25. Tylicki L., Biedunkiewicz B., Rachon D. et Al. – No effects of ozonated autohemotherapy on inflammation response in hemodialyzed patients. *Mediators Inflamm.*, **2004** Dec; 13(5-6): 377-80.
26. Tylicki L., Biedunkiewicz B., Nieweglowski T. et Al. – Ozonated autohemotherapy in patients on maintenance hemodialysis: influence on lipid profile and endothelium. *Artif Organs.*, **2004** Feb; 28(2): 234-7.
27. Vox S. – Use of the haematopoietic progenitor cell parameter in optimizing timing of peripheral blood stem cell harvest. **2009**, Apr 7.

– La Redazione ringrazia l'Editor del sito internet da cui è stata tratta la fotografia di p 13.

Riferimento bibliografico

BIANCHI R. – Emoterapia autologa rigenerativa con medicinali omotossicologici, possibili Fattori di Crescita e Cellule Staminali – Studio clinico pilota. *La Med. Biol.*, **2009**/3; 13-23.

Indirizzo dell'Autore

Dr. Roberto Bianchi
Casalute – Clinica di Terapie Naturali e Biologiche – Laboratorio di Ricerca
Via Castelleone, 60
I – 26022 Castelveverde (CR)