

borsa di studio anno 2009 per progetto: **“APPLICAZIONE CLINICA DELLE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI AUTOLOGHE NELLA SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA”**

Dott Lucia Testa

Clinica Neurologica, Università del Piemonte Orientale, Novara

L'utilizzo di cellule staminali, via trapianto o tramite attivazione della neurogenesi endogena, è universalmente riconosciuto come un promettente approccio terapeutico per preservare – e se possibile riparare- il sistema nervoso centrale in diverse patologie degenerative, inclusa la SLA .

La SLA, patologia neurodegenerativa a prognosi infausta e attualmente priva di trattamenti realmente impattanti sulla prognosi e la disabilità funzionale, presenta tuttavia diversi aspetti critici ai fini di una possibile terapia cellulare.

La neurodegenerazione è infatti spazialmente diffusa in tutto il neurasse, causa la perdita o il riarrangiamento di connessioni complesse e a lunga distanza (neuronal, interneuronali e neuromuscolari), ha carattere progressivo, ma con una grossa variabilità inter e intra paziente, e presenta una patogenesi complessa e tuttora in buona parte ignota, in cui sembrano coinvolti diversi tipi cellulari. Diversi recenti lavori hanno infatti evidenziato un coinvolgimento del microambiente (cellule gliali, in particolare astrociti e microglia), piuttosto che del motoneurone in primis, come uno dei targets patogenetici principali .

Il nostro gruppo di lavoro ha in passato condotto 2 successivi trials clinici di fase 1 volti a valutare la fattibilità e sicurezza dell'autotrapianto di cellule staminali mesenchimali nel midollo spinale (tratto toracico) nell'uomo. Tutti i risultati confermano che la procedura è sicura in pazienti affetti da SLA. In particolare, non si sono verificate alterazioni patologiche strutturali in sede di trapianto (eg flogosi o cavitazioni), nè crescite cellulare patologiche, sia nel breve che nel lungo termine (fino a 5 anni di follow-up).

Non si sono inoltre presentati morbidity o effetti collaterali severi correlati alla procedura chirurgica, sebbene tutti i pazienti abbiano presentato sintomi sensitivi transitori (disestesie, algie, ipoestesia) in sede di intervento o irradiati a un arto inferiore, dati indicativi del fatto che la procedura chirurgica potrebbe giovare di un ulteriore miglioramento tecnico.

Nei protocolli di fase I finora attuati l'impianto cellulare è stato effettuato a livello toracico per ragioni di sicurezza, ma ciò ha comportato la mancanza metodiche di monitoraggio per i miomeri corrispondenti, al di là della valutazione dell'FVC sopracitata. Tecniche neurofisiologiche di tipo elettromiografico, che sarebbero applicabili e relativamente affidabili e riproducibili per monitorare un impianto che avesse come target la muscolatura degli arti, non permettono infatti per ragioni anatomiche e fisiologiche di valutare potenziali effetti terapeutici a livello della muscolatura intercostale e paraspinale.

Con le tecniche attualmente disponibili non è inoltre possibile documentare direttamente il destino (eg. in termini di sopravvivenza ed eventuale migrazione) delle cellule impiantate: non è infatti attuabile, per limiti legislativi e di sicurezza, il marcare le cellule con mezzi di contrasto che ne permettano l'identificazione in vivo tramite metodiche non invasive (come la risonanza magnetica convenzionale).

Ciò sottolinea a nostro giudizio la necessità di sviluppare metodi non invasivi per rilevare le modificazioni strutturali conseguente al trapianto che porterebbero determinare esiti funzionali. Altro problema cruciale è la scelta del sito di impianto, alla luce sia di un possibile beneficio sulla prognosi che delle attuali difficoltà nel valutare possibili modificazioni post-trattamento dal punto di vista clinico e funzionale.

Nei mesi di gennaio-aprile 2009 il nostro gruppo di lavoro si è quindi concentrato, ai fini di migliorare i limiti dei precedenti studi in vista di un ulteriore trial sull' uomo, sui seguenti problemi metodologici:

1) MIGLIORAMENTO DELLA PROCEDURA CHIRURGICA:

E' stato valutato e testato sull'animale da esperimento un nuovo sistema di microiniezione con siringa di Hamilton modificata, al fine di rendere il meno traumatico possibile l'impianto sia per le cellule che per il midollo del paziente. L'ottimizzazione della procedura chirurgica potrebbe infatti permettere anche la scelta di siti di impianto diversi dal midollo toracico e rispetto ad esso potenzialmente più attraenti in termini sia di facilità di monitoraggio che di eventuali effetti clinici.

Mentre in passato tutti gli studi in vivo di impianto cellulare intramidollare erano stati compiuti su piccoli animali, in analogia al recente lavoro del gruppo americano di Cleveland (Dr Boulis e Coll.) abbiamo scelto di compiere una serie di interventi di chirurgia sperimentale sul maiale, più simile all'uomo per anatomia spinale e dimensioni.

Attualmente sono stati eseguiti 3 interventi di impianto su altrettanti animali da esperimento, opportunamente anestetizzati e posti in posizione prona, in analogia a quanto avviene nell'uomo.

Nel primo esperimento il midollo è stato inoculato con sola soluzione o fisiologica (per simulare la sospensione cellulare), il secondo con iniezione di un volume analogo di gadolinio, il terzo con cellule staminali marcate con mezzo di contrasto ferromagnetico.

Gli impianti sono stati effettuati rispettivamente nel midollo cervicale distale (livello C6-C7) in 2 animali e prossimale (C2-C3) nel terzo, valutando con esame obiettivo e test comportamentali post-intervento gli eventuali danni neurologici conseguenti alla procedura chirurgica.

Nel primo e nel terzo impianto il materiale impiantato è stato inoculato, previa laminectomia, in prossimità delle corna anteriori del midollo, con approccio posteriore paramediano. Nel secondo si è invece creata, tramite commissurotomia posteriore e successiva sutura, una tasca in vicinanza delle corna anteriori.

In tutti e tre gli interventi dopo il sacrificio dell'animale da esperimento lo studio RMN del tratto midollare impiantato (midollo nudo) ha permesso di valutare:

- I traumatismi in sede di accesso
- I rapporti anatomici del sito di impianto (e nel secondo e terzo esperimento del materiale impiantato, visibile direttamente per la presenza di mezzo di contrasto) con le corna anteriori (sito target)

Nel terzo esperimento (animale iniettato con sospensione cellulare), sono inoltre stati compiuti sia uno studio di vitalità sulle cellule residue nel micro-iniettore (al fine di valutare la traumaticità per le cellule dei passaggi di preparazione pre-impianto e del passaggio nell'iniettore), sia uno studio istologico sul pezzo autoptico (per valutare posizione e stato delle cellule impiantate).

2) TECNICHE DI MONITORAGGIO:

I recenti progressi tecnici nel campo della RM con tensore di diffusione e le tecniche di fiber tracking pongono le basi per un potenziale impiego della RM nella SLA come marker diagnostico precoce di coinvolgimento del primo motoneurone e nel monitoraggio della progressione di malattia a livello dei fasci cortico-bulbari e cortico-spinali. In particolare, la RM con tensore di diffusione permette di valutare l'orientamento dei fasci di fibre e l'integrità della sostanza bianca. Il parametro principale di tali studi è la cosiddetta FA (Fractional Anisotropy), che analizza la frazione di anisotropia della diffusione dell'acqua nell'unità spaziale. In diversi lavori sono stati recentemente riportati la riduzione del parametro FA e l'aumento del parametro MD (mean diffusivity) nel tratto corticospinale dei pazienti affetti da SLA. Alcuni autori riportano inoltre un progressivo decremento dell'ADC (apparent diffusion coefficient) tra corona radiata e peduncoli cerebrali.

La valutazione prospettica della simmetria dei diversi indici di immagini di diffusion-tensor RM (ad esempio diffusività media [MD], anisotropia frazionaria [FA] ed eigenvalues) dei tratti cortico-spinali danneggiati nei pazienti con sclerosi laterale amiotrofica (ALS) potrebbe fornire informazioni qualitative e quantitative sulla progressione di malattia e nei pazienti sottoposti a trapianto di cellule staminali e sull'eventuale influenza dello stesso sul trend di perdita delle fibre. Le Tecniche RMN-DTW (diffusion tensor imaging) permette inoltre potenzialmente di valutare indirettamente eventuali modificazioni anatomiche nel sito di impianto.

Per i fini sopracitati, sono state in questi mesi valutate con software DTW di recente acquisizione le immagini di RMN ottenute durante il follow-up di pazienti sottoposti ad impianto di cellule staminali mesenchimali nei precedenti trials di fase I (vedi sopra).