

METODICHE SPERIMENTALI DI PRELIEVO E DI TRAPIANTO DI MIDOLLO NEL SUINO

*F. Abbiati, F. Fayer, E. Zitelli, S. Zonta, P.F. Piccioni, F. Magnoni, M. Viola,
L. Cobianchi, C. Zampaglione, A. Venetis, A. Deho, B. Burroni, M. Balestreri*,
M. Bonfichi*, A. Lorenzi*, M. Alessiani, A. Zonta*

*CHIRURGIA GENERALE A, DIPARTIMENTO DI CHIRURGIA,
°ANESTESIA E RIANIMAZIONE 2, *ISTITUTO DI EMATOLOGIA,
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI E IRCCS POLICLINICO S. MATTEO, PAVIA*

INTRODUZIONE

Diversi centri hanno dimostrato con dei trials clinici che l'infusione di alte dosi di midollo da donatore, effettuate in concomitanza con trapianti di organo solido nel tentativo di indurre una tolleranza immunologica, al momento attuale non espone i pazienti a rischi aggiuntivi rispetto a quelli che non lo ricevono (1,2). Il dosaggio e il momento temporale dell'infusione risultano essere in questi studi le due variabili più importanti ed in grado di modificare la sopravvivenza del graft (3).

Basandoci su queste acquisizioni lo scopo del nostro studio è stato quello di mettere a confronto, a livello pre-clinico, varie metodiche di isolamento di cellule midollari al fine di valutare, in termini qualitativi e quantitativi di resa cellulare, la metodica più vantaggiosa.

MATERIALI E METODI

Per questo studio sono stati utilizzati, come donatori di midollo e di organo, diciannove suini di razza Large-White del peso medio 30 ± 2 Kg.

Gli animali sono stati quindi divisi in tre gruppi in base alle metodiche di prelevamento e di isolamento delle cellule midollari impiegate.

Nel Gruppo 1 (n=10) il midollo osseo è stato prelevato asportando quasi completamente la colonna toraco-lombare (in media 12 vertebre) del donatore cadavere. Per il prelievo delle vertebre è necessario che prima vi sia stata la rimozione degli organi toraco-addominali e la dissezione dei muscoli ileo psoas e paravertebrali per mezzo di scalpelli in modo da poter agevolmente riconoscere i dischi intervertebrali. A questo punto inizia la processazione delle vertebre (4, 5): una volta ripulite a banco dal periostio e private dei processi trasversi con pinze ossivore tipo Rongeur, vengono lavate dapprima con soluzione di Betadine® al 10%, poi con soluzione salina ed, infine, conservate

in Dulbecco's Modified Eagle's Medium con aggiunta di Bacitracina, Polimixina B, eparina e DNAsi. Le cellule midollari si ottengono quindi per rilascio passivo sminuzzando - sempre con pinze ossivore - le vertebre e sospendendo le cellule in RPMI con aggiunta di DNAsi, Eparina e Gentamicina. La sospensione cellulare viene poi filtrata attraverso filtri di acciaio (450 e 180 micron), centrifugata a 1500 RPM per 10 minuti a 21°C, risospesa nell'RPMI e conservata a 4° C prima di essere infusa in terza giornata postoperatoria.

Nel Gruppo 2 (n=6) il midollo è stato invece prelevato dalla cresta iliaca posteriore di donatore vivente di rene. La metodica prevede molteplici prelievi da 6-10cc di sangue midollare con aghi G13 x 58mm, sino ad ottenere un quantitativo di 400 cc che viene immagazzinato in una sacca per emotrasfusione con 60 ml di CPDA (6). Il campione una volta diluito in Fisiologica viene separato su gradiente di densità (Ficoll-Hypaque 1077g/L) e centrifugato a 1500 RPM per 20 minuti a 20°C per ottenere una separazione delle cellule mononucleate (7). In seguito le cellule vengono sottoposte a lavaggio, a risospensione in Fisiologica e DMSO (10% concentrazione finale) e criopreservate a -80°C (criopreservazione non effettuata con congelatore automatizzato) fino al momento dell'infusione in settima giornata postoperatoria (8).

Nel Gruppo 3 (n=3) infine il midollo è stato prelevato con la stessa metodica del gruppo uno (asportando la colonna da donatore cadavere, sminuzzando le vertebre e sospendendo il tutto in RPMI), ma trattato come nel gruppo due (separazione su densità e successiva criopreservazione).

Il controllo della qualità finale della criopreservazione delle cellule staminali nei gruppi 2 e 3 e della conservazione a 4°C per gli animali del gruppo 1 è la ricostituzione ematologica del ricevente. Prima di infondere cellule midollari è infatti utile assicurarsi che la ricostituzione abbia buone possibilità di verificarsi. Per valutare questo il metodo più affidabile è sicuramente la coltura clonogenica di CFU-GM (è generalmente accettato che dosi di cellule staminali superiori a 13×10^4 /kg di peso corporeo assicurino la ricostituzione emopoietica) (9). Per questo motivo i campioni di cellule mononucleate ottenute dalla separazione su Ficoll-Hypaque e provenienti da i tre gruppi di studio, sono stati risospesi in misura di 10^5 cellule/ml e seminati in terreno di coltura Iscove's Modification Dulbecco's Medium contenente 0.8% di Metilcellulosa, addizionato con L-Glutamina e basse dosi di Penicillina e Streptomina. Per stimolare la crescita abbiamo poi aggiunto 2 U/ml di Eritropoietina e 1-5% di LCM-PHA. Abbiamo infine seminato le cellule in piastre di plastica sterile a 24 pozzetti e le abbiamo poste in incubazione in termostato umidificato a pressione costante di CO² (5%) sino alla lettura dei risultati con microscopio inver-

tito in 14° giornata. In questo modo si distinguono, in base alle caratteristiche morfologiche, la presenza di colonie di origine monocito, macrofagica, eritroide e miste. I campioni di cellule mononucleate provenienti dai tre differenti gruppi sono stati, infine, congelati in DMSO a -80° e scongelati per valutarne la vitalità cellulare dopo criopreservazione.

RISULTATI

Nel Gruppo 1 abbiamo ottenuto una media cellulare di $5.8 \times 10^8 \pm 2.01$ cellule midollari intere/kg, nel Gruppo 2 una media di $1.01 \times 10^8 \pm 0.05$ cellule mononucleate/kg ed infine nel Gruppo 3 una media di $1.22 \times 10^8 \pm 0.08$ cellule mononucleate/kg.

La crescita delle CFU-GM ha mostrato una importante variabilità di risultati specialmente tra i gruppi 2 e 3 da una parte ed il gruppo 1 dall'altra. Ciò può essere dipeso da molteplici concause, fra cui la bassa numerosità dei campioni esaminati e il succedersi di interventi tecnici atti a perfezionare l'efficienza di piastra delle colture stesse. Tali interventi hanno influito non tanto sul numero di progenitori totali ottenuti, quanto sulla normalizzazione delle dimensioni e dell'aspetto delle colonie stesse che va di pari passo con la riduzione delle difficoltà relative alla loro identificazione.

Per quanto riguarda, infine, la valutazione della vitalità dopo scongelamento, i dati ottenuti hanno evidenziato una analogia di risultati tra i gruppi 1 e 3 (rispettivamente $67.3 \pm 6\%$ e $70.5 \pm 4\%$) rispetto al gruppo 2 ($87.5 \pm 49\%$).

Tabella riassuntiva

	Gruppo 1 (N=10)	Gruppo 2 (N=6)	Gruppo 3 (N=3)
Sede prelievo	Vertebre Colonna dorso lombare	Spina iliaca posteriore	Vertebre Colonna dorso lombare
Metodica di lavorazione	<ul style="list-style-type: none"> • Sminuzzamento vertebre • Sospensione in RPMI 	<ul style="list-style-type: none"> • Prelievi multipli da corteccia • Separazione su Ficoll-Hypaque 	<ul style="list-style-type: none"> • Sminuzzamento vertebre • Sospensione in RPMI
Metodica di conservazione	• Conservazione in RPMI a 4° C	• Criopreservazione con DMSO a -80° C	• Criopreservazione con DMSO a -80° C
Resa cellulare media	$5.8 \times 10^8 \pm 2.01$ cellule midollari intere/kg	$1.01 \times 10^8 \pm 0.05$ cell. mononucleate/kg	$1.22 \times 10^8 \pm 0.08$ cell mononucleate/kg
Crescita CFU-GM	55.16 ± 64 Col x 10^5 cell	28.5 ± 17 Col x 10^5 cell	32 ± 34.4 Col x 10^5 cell
Vitalità	$67.3 \pm 6\%$	$87.5 \pm 49\%$	$70.5 \pm 4\%$

DISCUSSIONE

Tutte le metodiche che abbiamo preso in considerazione ci hanno permesso di isolare un quantitativo elevato di cellule midollari con buona vitalità e capacità ricostitutive, requisiti indispensabili per ottenere un buon

“engrafment”. Le significative differenze di valori che abbiamo ottenuto in termini di crescita delle CFU-GM, al di là dei problemi tecnici incontrati nel perfezionare la metodica di inseminazione e lettura, hanno però dimostrato come la presenza di progenitori sia rilevabile anche a distanza di molti giorni dalla “semina”, elemento questo suggestivo della persistenza di condizioni ricostitutive dell’attività ematopoietica. Tuttavia, nei gruppi 2 e 3 l’isolamento delle cellule mononucleate e la loro criopreservazione ha portato ad un notevole progresso rispetto alla sospensione di cellule midollari intere ottenute nel gruppo 1. Il midollo conservato a 4° in sacca da emotrasfusione sospeso in circa 800 cc di RPMI è risultato infatti essere di difficile gestione nei giorni precedenti all’infusione per la presenza di abbondanti precipitati cellulari dovuti, forse, all’attivazione di sostanze liberatesi dalla rottura delle cellule in corso di lavorazione. Inoltre mentre la resa cellulare di mononucleati nei gruppi 2 e 3 è praticamente sovrapponibile, la vitalità cellulare del gruppo 3 risulta più simile a quella del gruppo 1 che a quella del gruppo 2. Questo risultato può far ipotizzare un danno cellulare dovuto allo sminuzzamento delle vertebre in fase di lavorazione che, se anche non modifica il valore numerico delle cellule, si ripercuote però sulla loro vitalità finale.

Le metodiche combinate di estrazione e lavorazione del midollo illustrate nei gruppi 2 e 3 permettono, in caso di donatore cadavere, di ottenere elevate quantità di cellule mononucleate per plurime infusioni di midollo associate a singolo trapianto di organo solido o, in alternativa, singole infusioni per più trapianti. Al momento attuale sono in corso studi sperimentali per pretrattare un eventuale donatore vivente di organo solido e midollo proveniente da cresta iliaca (vedi gruppo 2) con fattori di crescita midollare allo scopo di incrementare ulteriormente la quota di cellule mononucleate da infondere al potenziale ricevente.

BIBLIOGRAFIA

1. Fontes P., Rao A., Demetria A.J. et al. Bone marrow augmentation of donor-cell chimerism in kidney, liver, heart and pancreas islet transplantation. *Lancet* 1994; 344: 151
2. Zeevi A., Pavlick M., Lombardozzi S., et al. Immune status of recipient following bone marrow augmented solid organ transplantation. *Transplantation* 1995; 59(4): 616-620.
3. Ricordi C., Karartzas T., Nery J., et al. High-dose bone marrow infusion to enhance allograft survival. *Transplantation* 1997; 63: 7.
4. Strong M. Seattle protocol: vertebral body recovery for bone marrow. 1992

(PRO-550 G) 1-5

5. Fontes P., Ricordi C., Rao A. Human vertebral bodies as source of bone marrow for cell augmentation in whole organ allografts. 1995 (Methods in Cell Transplantation-H 1)
6. Buckner CD, Clift RA, Sanders JE et al. Marrow harvesting from normal donors. Blood 1984; 64: 630
7. Dragani A., Angelini A., Lacone A. et al. Comparison of five methods for concentratig progenitor cells in human bone marrow transplantation. Blut 1990; 60:278-281
8. Makino S., Harada M., Akashi K. Et al. A simplified method for cryopreservation of peripheral blood stem cells at -80° without rate controlled freezing. Bone Marrow Transplant 1991; 8: 239-244
9. Metcalf D. Hemopoietic colonies. In vitro cloning of normal and leukemic cells. Springer-Verlag, Berlin, 1977

Ricerca finanziata dal Progetto Finalizzato n. 180RFM97/01 del Ministero della Sanità.