

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA**

**SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE  
E FARMACEUTICHE**

*Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia*



**“DERIVATI PIASTRINICI NELLA PATOLOGIA  
DEGENERATIVA DEL DISCO INTERVERTEBRALE:  
RISULTATI E REVISIONE DELLA LETTERATURA”**

**Candidato:** Emanuele Altovino

**Relatore:** Prof. Matteo Formica

**Correlatrice:** Prof.ssa Maddalena Mastrogiacomo

*Anno accademico: 2019-2020*

# **INDICE:**

## **I. INTRODUZIONE**

### **I.1. Anatomia del disco intervertebrale**

**I.1.a.** Morfologia macroscopica

**I.1.b.** Morfologia microscopica

### **I.2. Modificazioni morfologiche età-correlate**

### **I.3. Vascolarizzazione e Innervazione del disco intervertebrale**

### **I.4. Biochimica e Biomeccanica del disco intervertebrale**

### **I.5. Biochimica e Biomeccanica del disco degenerato**

### **I.6. La degenerazione del disco intervertebrale**

**I.6.a.** Eziologia

**I.6.b.** Patogenesi

**I.6.c.** Classificazione

**I.6.d.** Conseguenze della degenerazione del disco intervertebrale

**I.6.e.** Sintomatologia clinica nella degenerazione del disco

**I.6.f.** Terapia

- Trattamento conservativo
- Tecniche invasive
- Terapia chirurgica
- Terapia rigenerativa

## **II. SCOPO DELLA TESI**

## **III. IMPIEGO DEL PRP NELLA PATOLOGIA DEGENERATIVA DEL DISCO: REVISIONE DELLA LETTERATURA**

### **III.1. Definizione e Classificazione**

### **III.2. Biologia**

### **III.3. Applicazioni in ambito ortopedico**

### **III.4. PRP nella degenerazione di disco intervertebrale**

**III.4.a.** Meccanismo rigenerativo

**III.4.b.** Studi in vitro

**III.4.c.** Studi in vivo su modelli animali

**III.4.d.** Studi clinici del PRP nel trattamento del dolore lombare

- Iniezioni intradiscali
- Altre tipologie di iniezione

## **IV. MATERIALI E METODI**

**IV.1.** Preparazione dei derivati piastrinici umani

**IV.2.** Isolamento cellulare dal campione di disco degenerato

**IV.3.** Ottenimento di cellule da diverse fuoriuscite

**IV.4.** Procedura di distacco e conta cellulare

**IV.5.** Valutazione della capacità proliferativa: doublings

**IV.6.** Analisi citofluorimetrica

## **V. RISULTATI**

**V.1.** Valutazione della proliferazione di cellule NPwd in PL ed FBS

**V.2.** Caratterizzazione delle cellule NPwd

**V.3.** Confronto in termini di capacità proliferativa tra cellule derivate dallo stesso frammento (NPwd) nelle diverse fuoriuscite

**V.4.** Analisi citofluorimetrica di confronto tra le cellule ottenute nelle diverse fuoriuscite

**V.5.** Confronto tra la proliferazione di NPCswd e NPCsd

**V.6.** Confronto delle caratteristiche fenotipiche tra NPCswd ed NPCsd

## **VI. DISCUSSIONE**

## **VII. CONCLUSIONE**

## **VIII. BIBLIOGRAFIA**

# I. INTRODUZIONE

La discopatia degenerativa è una patologia molto diffusa che si instaura a livello della colonna vertebrale portando, con l'avanzare del tempo, all'insorgenza di dolore alla schiena.

Essa trova le sue fondamenta nelle alterazioni patologiche che coinvolgono il disco intervertebrale; tali mutamenti sono processi cronici, età-correlati e consistono in un progressivo indebolimento del disco, con riduzione dei suoi componenti in senso qualitativo e quantitativo, portando a fenomeni di disidratazione.

Si assiste dunque ad una diminuzione della resistenza e dell'elasticità di quest'organo, le cui funzioni sono principalmente di ammortizzare i carichi assiali e di stabilizzare la colonna vertebrale.

Inevitabilmente questi cambiamenti hanno ripercussioni anche a livello clinico, determinando una sintomatologia dolorosa a carico della schiena, che più frequentemente si localizza a livello lombare; l'intensità del dolore spesso non è direttamente proporzionale ai reperti radiologici, non di rado si assiste a quadri sintomatologici imponenti con scarse evidenze alle indagini strumentali e viceversa<sup>1</sup>.

Nel tempo la degenerazione discale può esitare in altre patologie vertebrali, quali ernia del disco, spondilolistesi degenerativa, instabilità segmentale e stenosi del canale vertebrale, associate a sintomatologia neurologica da radicolopatia o mielopatia.

Le strategie terapeutiche attuali adottate per la discopatia degenerativa variano da trattamenti più conservativi ad altri più invasivi, con lo scopo di controllare i sintomi e di impedire che la degenerazione discale esiti nelle sue complicanze. Tuttavia nessuna di queste strategie consente di interrompere il processo degenerativo e di ripristinare la normale funzionalità del disco.

A tal proposito negli ultimi anni ha preso campo la medicina rigenerativa che, attraverso l'utilizzo di cellule staminali, derivati piastrinici e fattori di crescita, sembra essere in grado di interrompere il processo degenerativo a carico del disco, senza ricorrere dunque all'escissione chirurgica di quest'ultimo.

## **I.1. Anatomia**

Il disco intervertebrale è una giunzione fibrocartilaginea, che connette i corpi di due vertebre adiacenti donando stabilità alla colonna vertebrale; al tempo stesso garantisce una notevole flessibilità colonnare, consentendo movimenti di flessione, torsione ed inclinazione sui vari piani. Svolge inoltre la funzione di ammortizzare i costanti carichi derivati dal peso corporeo e dai movimenti dell'apparato muscolo-scheletrico.

Lo spessore dei dischi varia dai 7mm ai 10mm aumentando in senso cranio-caudale e il loro diametro anteroposteriore raggiunge i 4cm nella regione lombare; il numero totale di essi è 23 e, togliendo le prime due vertebre cervicali e il settore sacrale e coccigeo, li ritroviamo in tutti gli spazi intervertebrali delle porzioni cervicale, toracica e lombare<sup>2,3</sup>. La loro lunghezza complessiva è circa il 25% di quella dell'intera colonna vertebrale, di cui rappresentano la principale articolazione<sup>3</sup>. I legamenti longitudinale anteriore e posteriore contribuiscono a fissare rispettivamente in sede anteriore e posteriore il disco.

### **I.1.a. Morfologia Macroscopica**

Il disco intervertebrale presenta in sezione sagittale una forma a lente biconvessa che ben si adatta a quella dei corpi vertebrali con i quali contrae rapporto tramite i piatti cartilaginei. Il disco è una struttura complessa che si può distinguere in due parti anatomicamente differenti: l'anello fibroso ed il nucleo polposo.

### Anello fibroso

L'anello fibroso è situato più esternamente e circonda il nucleo polposo posto al centro.

In sezione trasversale "l'anulus" è più spesso anteriormente che posteriormente; tale caratteristica fa sì che il nucleo polposo all'interno del disco sia leggermente dislocato all'indietro. L'anello fibroso è formato da fibrocartilagine più abbondante in fibre rispetto al nucleo polposo. Presenta una struttura che varia procedendo in senso centripeto: nei due terzi esterni troviamo una zona in cui si nota una distinta architettura lamellare ad anelli concentrici, mentre nel terzo interno vi è una porzione che presenta un aspetto più omogeneo e che viene definita zona di transizione.

### Nucleo polposo

Il nucleo polposo ha un aspetto gelatinoso e una consistenza molle, in quanto costituito per l'85% da acqua. Ciò vale, in particolare, per i soggetti in età giovanile o media. Il disco intervertebrale presenta infatti notevoli modificazioni con l'invecchiamento, tanto che l'analisi della morfologia discale, sia macroscopica che microscopica, non può prescindere dall'età del soggetto esaminato<sup>3</sup>.

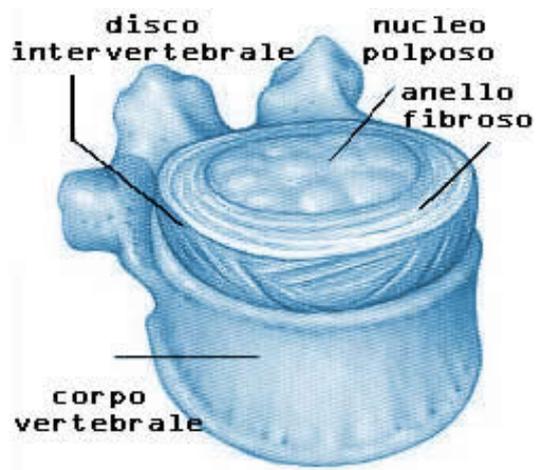
Come accennato precedentemente il nucleo polposo non si localizza perfettamente al centro del disco intervertebrale, ma più posteriormente. Questa caratteristica fa sì che la porzione posteriore dell'anello fibroso sia macroscopicamente più sottile e microscopicamente più povera di fibre collagene rispetto alle porzioni laterali e anteriore. Tali differenze si riflettono in una minor resistenza da parte di questa zona e quindi più suscettibilità ad eventuali erniazioni del contenuto del disco.

### Piatto cartilagineo

Vi è inoltre una terza struttura che non è parte integrante del disco, ma che pone quest'ultimo in stretto rapporto con i corpi vertebrali; questa è rappresentata da una lamina di cartilagine ialina che si interpone fra il disco e il tessuto osseo vertebrale.

Lo spessore della lamina è compreso in un range che varia da 0.1mm a 1.6mm: il massimo spessore si ha nella zona centrale in prossimità del nucleo polposo, mentre va diminuendo nelle zone più periferiche, fino a scomparire nella parte più esterna dell'anello fibroso<sup>4</sup>.

Attraverso un processo di diffusione, il piatto cartilagineo funge da regolatore nonché fonte di nutrimenti e ossigeno per il disco, che è una struttura avascolare; rappresenta inoltre una sorta di filtro denso che controlla gli spostamenti dell'acqua, fondamentali per mantenere il disco idratato e per resistere quindi allo stress derivante dai costanti carichi assiali<sup>4</sup>.



### I.1.b. Morfologia Microscopica

L'anello fibroso del disco è suddiviso a sua volta in due zone distinte: una esterna, detta zona lamellare ed una più interna, detta zona di transizione.

La zona esterna è più densa di fibre collagene rispetto a quella interna, tali fibre, immerse in un gel di proteoglicani, sono composte prevalentemente da collagene di tipo I e vengono prodotte dalla gran parte di cellule che popola questa porzione dell'anulus, i fibroblasti. Questi producono in minima parte anche collagene di tipo III, V, VI<sup>4</sup>.

La zona lamellare è costituita da lamelle fibrose concentriche separate da setti interlamellari di connettivo fibrillare più lasso, in cui sono contenute le cellule.

Le lamelle sono formate da fibre collagene parallele tra di loro e orientate obliquamente rispetto alle fibre delle lamelle adiacenti. La direzione delle fibre è tale da formare un angolo di circa 60° tra le fibre stesse e l'asse verticale del rachide.

Il numero di lamelle presenti in un disco varia tra 15 e 25 e tende a diminuire con l'avanzare dell'età. Le fibre collagene delle lamelle della metà interna dell'anulus fibrosis penetrano profondamente nel piatto cartilagineo vertebrale, mentre le fibre delle lamelle esterne penetrano per breve tratto nel piatto vertebrale osseo<sup>5</sup>. Nei vari spazi interlamellari si trovano dei ponti composti da tralci di tessuto fibroso, che hanno direzione perpendicolare rispetto all'asse delle lamelle; costituiscono una vera e propria rete di fibre che connette le varie lamelle con quelle adiacenti.

La zona di transizione presenta un'architettura lamellare poco definita; è formata prevalentemente da tessuto connettivo fibrillare denso in cui sono disperse cellule con aspetti simil-condrocitari.

Il fenotipo delle cellule dell'anulus fibrosis varia da caratteristiche prevalentemente fibrocitarie nella zona più esterna, a caratteristiche condrocitarie nella zona più interna, in prossimità del nucleo polposo; nella porzione intermedia vi sono cellule con aspetti fibrocartilaginei. La principale differenza nei due fenotipi sta nella produzione di fibre collagene di tipo II e di

proteoglicani da parte delle cellule simil-condrocitarie, mentre le fibrocitarie producono principalmente collagene di tipo I.

All'interno dei setti interlamellari le cellule si dispongono in filiere e presentano prolungamenti citoplasmatici che, attraversando le lamelle, mettono in contatto cellule di filiere adiacenti<sup>4</sup>.

Il nucleo polposo è costituito da un numero inferiore di cellule che si immergono in un'abbondante matrice extracellulare, molto più lassa rispetto a quella dell'anello fibroso; le cellule hanno caratteristiche condrocitarie e sono generalmente rotondeggianti od ovalari.

In questa zona del disco troviamo principalmente collagene di tipo II che, assieme ad altre strutture glicoproteiche, compone la matrice extracellulare. La matrice forma un gel contenente varie fibre collagene organizzate randomicamente e fibre elastiche ordinate in senso radiale. Il gel possiede inoltre un alto contenuto di proteoglicani che, attraverso la loro composizione molecolare, rivestono un ruolo fondamentale nel mantenere un ambiente ben idratato all'interno del nucleo<sup>2</sup>.

## **I.2. Modificazioni morfologiche età correlate**

Con l'avanzare del tempo il disco intervertebrale subisce notevoli cambiamenti che coinvolgono l'anello fibroso e il nucleo polposo, rendendo queste due zone sempre meno distinguibili sia dal punto di vista macroscopico che microscopico. Le variazioni descritte successivamente avvengono in quasi la totalità dei soggetti, nei quali saranno più o meno marcate a seconda dei fattori di rischio dei singoli individui.

Durante i primi anni di vita l'anello fibroso è organizzato in lamelle concentriche ad aspetto regolare e la rete di fibre collagene, che connette le lamelle, risulta ben rappresentata. Il nucleo polposo possiede un colore bianco lucente ed una

consistenza liquido-gelatinosa; occupa circa la metà delle dimensioni del disco e asportandolo residua una cavità rotondeggiante a limiti ben definiti. Si denota dunque un confine netto tra le due parti.

A 20 anni si rileva una demarcazione leggermente più sfumata, tuttavia le due componenti sono ancora ben distinguibili; il nucleo polposo appare meno traslucido, di consistenza leggermente più solida e di dimensioni inferiori, occupando circa un terzo del disco.

A 40 anni l'anello fibroso possiede un colore bianco avorio e all'interno della sua struttura iniziano ad osservarsi delle fessurazioni. La struttura lamellare è più irregolare rispetto a quella del disco giovane e, sia le fibre collagene che quelle elastiche, si presentano in modo disorganizzato. Il nucleo polposo non appare più traslucido, presenta un colore bianco più "sporco" ed un aspetto fibrocartilagineo che si avvicina sempre più a quello dell'anulus fibrosis. La progressiva somiglianza macroscopica delle due strutture è determinata da una crescente produzione di fibre collagene dello stesso tipo.

A 60 anni il limite tra le due zone appare sempre più sfumato rendendone la distinzione quasi impercettibile. L'anello fibroso tende ad avere un colore grigiastro con residui bruni dati dall'accumulo di pigmento senile. La struttura lamellare appare abbondantemente disorganizzata, le fessurazioni si fanno più evidenti e aumentano di numero coinvolgendo anche il nucleo polposo. Quest'ultimo possiede un colore bianco opaco ed un aspetto sempre più di tipo fibroso dato dalla progressiva perdita di proteoglicani e collagene di tipo I con un aumento di collagene di tipo II. Asportando il nucleo polposo permane una cavità a margini irregolari.

A 80 anni il disco intervertebrale si presenta come una struttura omogenea, in cui nucleo polposo e anello fibroso non sono più distinguibili. In entrambe le zone sono presenti numerose fessurazioni, l'anello fibroso perde la sua organizzazione lamellare e il nucleo polposo non possiede più le molecole necessarie a rispondere adeguatamente alle variazioni osmotiche che

consentivano lo spostamento di acqua. Ne deriva un organo incapace di deformarsi in risposta agli stress meccanici.

Anche le lamine cartilaginee sono soggette a cambiamenti irreversibili con l'avanzare dell'età. Nei primi anni di vita questa struttura è composta da cartilagine di accrescimento ed è popolata da condrociti proliferanti, soprattutto nella sua porzione più interna. Quest'ultima è la prima a trasformare andando incontro ad ossificazione già intorno ai 20 anni. Progressivamente anche la porzione più periferica viene sostituita da tessuto osseo, coinvolgendo la lamina in toto.

L'ossificazione del piatto cartilagineo è un processo che rende il passaggio per diffusione di nutrienti e ossigeno sempre più difficoltoso, contribuendo così alla degenerazione del disco intervertebrale<sup>6</sup>.

### **I.3. Vascolarizzazione e innervazione del disco intervertebrale**

Il disco intervertebrale rappresenta la più grande struttura avascolare del nostro organismo. Nel disco del bambino i vasi sanguigni si trovano principalmente nella parte esterna dell'anulus fibrosis e minimamente in quella interna; si è notato inoltre, che essi penetrano con maggiore profondità nella porzione posteriore dell'anello rispetto che in quella anteriore. I vasi provengono da rami collaterali dell'arteria spinale.

Tale vascolarizzazione, già di per sé scarsa, tende a diminuire con l'avanzare dell'età divenendo pressoché minima nel giovane adulto e limitata solamente alle zone più esterne.

Nell'anziano i vasi riducono la loro profondità fino a scomparire; tuttavia è stato dimostrato che, in particolari situazioni di degenerazione, questi possono ricevere uno stimolo ad incrementare grazie all'apposizione di tessuto di granulazione.

La zona interna dell'anello fibroso e il nucleo polposi sono completamente privi di vasi e, grazie ad un processo di diffusione, che avviene attraverso la lamina cartilaginea, provvedono allo scambio di gas e nutrienti derivanti dai capillari dell'osso subcondrale<sup>7</sup>.

L'innervazione del disco è garantita dal nervo senovertebrale di Luschka, dal ramo ventrale del nervo spinale e dalla catena del simpatico. Il nervo senovertebrale provvede all'innervazione della parte posteriore del disco mentre le porzioni anteriore e laterale sono innervate da branche provenienti dal ramo ventrale del nervo spinale o direttamente dalla catena del simpatico. Nel disco si trovano fibre di natura somato-sensitiva come nocicettori e meccanocettori e fibre appartenenti al sistema nervoso autonomo<sup>3</sup>.

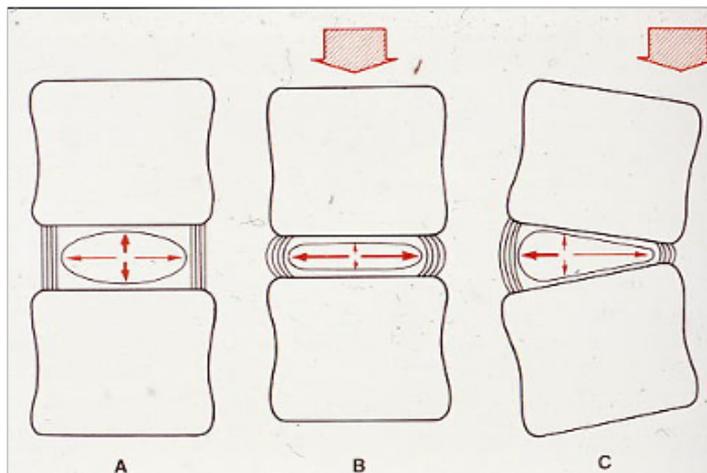
#### **I.4. Biochimica e biomeccanica del disco intervertebrale**

Come accennato in precedenza, nelle varie zone del disco intervertebrale troviamo tipi di collagene che possiedono qualità diverse, contribuendo al corretto funzionamento del disco. Le fibre collagene di maggior riscontro sono del tipo I e II; esse rappresentano l'80% di tutte le fibre presenti nel disco. La quota rimanente è costituita da fibre di tipo III, V e VI. I tipi I e II si distribuiscono in modo eterogeneo all'interno del disco: nella zona esterna dell'anello fibroso troviamo maggiormente il tipo I, mentre progredendo verso l'interno questa quota si fa sempre più scarsa lasciando spazio al collagene di tipo II, che vediamo essere molto rappresentato nel nucleo polposo.

Da ciò si deduce che l'anello fibroso e il nucleo polposo partecipano alla funzione del disco in maniera non del tutto identica. Il primo presenta una maggior densità di collagene con l'interposizione di fibre elastiche, garantendo resistenza alle forze di trazione. Il disco, una volta cessato il carico su di esso, riacquisisce la sua forma originaria grazie all'elastina. Il nucleo polposo invece, avendo una matrice più lassa con spazi interfibrillari ampi, consente l'ingresso e l'uscita di un'ingente quota idrica. È proprio grazie allo spostamento di acqua, che il nucleo

si deforma adattandosi alle forze compressive che provengono dall'alto; esso tende ad espellere acqua quando è sottoposto ad un carico e la richiama dalla vertebra sopra-sottostante quando questo cessa.

In un disco sano e ben idratato l'acqua costituisce l'85-90% del nucleo polposo e il 75-80% dell'anulus; con l'avanzare dell'età si assiste ad una progressiva perdita di acqua in entrambi i compartimenti<sup>8</sup>.



All'interno del gel di matrice extracellulare del nucleo vi è un considerevole numero di proteoglicani; più precisamente nel disco intervertebrale troviamo un particolare proteoglicano, definito aggrecano. Il nucleo (core o asse proteico) di questa macromolecola è rappresentato da una proteina di grandi dimensioni a cui si attaccano lunghe code di glicosamminoglicani, come il condroitin solfato e il cheratan solfato, a formare una struttura simile ad un'inflorescenza a spiga. I gruppi solfato dei glicosamminoglicani generano un ambiente ad alta carica negativa che, oltre ad attirare diversi soluti regolando il bilancio ionico, consente ai glicosamminoglicani di legare elettrostaticamente l'acqua. Attraverso queste strutture si instaura una pressione osmotica che permette al disco di richiamare acqua dall'esterno. Si crea dunque un vero e proprio gradiente osmotico, in grado di regolare l'ingresso e la fuoriuscita di acqua in base alle necessità. Quando la pressione derivante dai carichi supera la pressione osmotica, si ha una fuoriuscita di liquidi; viceversa quando il disco non si trova sottoposto a carichi, assistiamo ad un assorbimento di acqua.

In un disco sano l'osmolarità a livello extracellulare si muove in un range che va da circa 430 mOsm/L a 490 mOsm/L. Queste variazioni osmotiche contribuiscono a mantenere le funzioni fisiologiche del disco e vengono regolate da alcune molecole particolari che possono essere definite osmosensori: parliamo principalmente di proteine carrier e specifici canali<sup>9</sup>.

Gli spostamenti di acqua avvengono anche all'interno delle cellule, il cui volume cambia in relazione al gradiente osmotico che si forma con l'ambiente circostante; qui le molecole d'acqua e i vari soluti si fanno strada attraverso pori e canali ionici situati a livello della membrana cellulare.

Le qualità biochimiche del disco intervertebrale permettono il mantenimento delle sue funzioni meccaniche, che sono cruciali per garantire flessibilità, resistenza e per sostenere i carichi sulla colonna vertebrale. Quest'ultima è costituita da un insieme di segmenti di moto, definiti unità di moto vertebrali, ciascuno dei quali comprende un disco, le due vertebre adiacenti e le strutture capsulo-legamentose tra loro interposte. L'unità di moto vertebrale rappresenta il più piccolo segmento del rachide con caratteristiche biomeccaniche simili all'intera colonna vertebrale; l'insieme di questi segmenti forma una colonna flessibile, retta nel piano frontale e curva in quello sagittale, ideale per assorbire le sollecitazioni mantenendone inalterata la stabilità.

Interposto tra i corpi vertebrali formati da tessuto osseo, il disco intervertebrale rappresenta l'unico organo che, grazie alla sua elasticità e alla capacità di deformarsi, permette di assorbire le vibrazioni e di ammortizzare i carichi assiali, distribuendoli alle vertebre limitrofe.

Il disco, in assenza di carico, possiede una propria pressione positiva, di pre-carico; questa nasce dalla pressione idrostatica del nucleo polposo, che mette in tensione le fibre collagene più resistenti situate nelle zone esterne dell'anello fibroso; notiamo come le varie zone contribuiscono in maniere differenti in base alle loro caratteristiche strutturali. Sotto carico, aumenta la pressione nel disco e la tensione sulle fibre, permettendo dunque al disco di deformarsi proporzionalmente al carico stesso. In questo modo il peso viene assorbito e trasmesso alle vertebre adiacenti, riducendo lo stress eccessivo che si riverserebbe altrimenti sulle singole unità motorie della colonna. Se il carico

persiste, la sua pressione supera la pressione osmotica del disco causando una fuoriuscita di liquidi e un'ulteriore deformazione del disco. Si assiste dunque ad un rialzo della pressione osmotica interna, che si pone in equilibrio con quella esercitata dal carico. Una volta cessato, permane una situazione in cui il gradiente osmotico creatosi, induce un richiamo di liquidi fino ad arrivare ad un bilanciamento delle pressioni osmotiche. In questo modo il disco, aiutato anche dalla componente elastica delle fibre dell'anulus, potrà ripristinare la sua forma di partenza.

La presenza degli aggregati con le molecole di condroitin-solfato e cheratan-solfato è indispensabile per generare la pressione osmotica necessaria a muovere i fluidi.

Tutte queste qualità consentono alla colonna di eseguire movimenti su vari assi, che sottopongono i dischi a diverse sollecitazioni a seconda delle zone di esso su cui agiscono i carichi.

Quando per esempio un carico agisce longitudinalmente sulla colonna, si ha una compressione assiale del disco; il nucleo polposo tenderà ad espandersi orizzontalmente mettendo in tensione le fibre dell'anello fibroso. Si assiste dunque ad una protrusione circonferenziale del disco, che è più marcata posteriormente. Essa è proporzionale all'entità del carico ma anche alla pressione interna del disco; qualora vi fosse una diminuzione di questa, le fibre dell'anulus conterrebbero meno il nucleo esitando in una protrusione discale più marcata.

Nei movimenti di flessione il disco viene sollecitato diversamente nelle varie: nella metà anteriore si assiste ad una compressione delle fibre dell'anulus, mentre in quella posteriore le fibre vengono messe in tensione. Nella flessione laterale abbiamo le medesime sollecitazioni, ma in senso laterale.

Nell'estensione accade l'inverso con le fibre posteriori sottoposte a sollecitazioni in compressione e quelle anteriori in tensione.

L'incurvamento della colonna vertebrale comprime le zone di disco presenti nella concavità della curva. Il nucleo polposo tende a spostarsi verso la convessità della curva, quindi posteriormente nella flessione e anteriormente nell'estensione; le fibre dell'anulus, che risiedono nella zona in cui migra il nucleo, vengono sollecitate in tensione. L'anulus invece tende a protrudere dov'è sollecitato in compressione.

In torsione le fibre dell'anulus si comportano in maniera diversa a seconda delle regioni considerate. Nelle regioni anteriori e laterali le fibre orientate verso la direzione della torsione sono sollecitate in tensione, mentre quelle orientate verso la direzione opposta non subiscono alcuna sollecitazione. Nella regione posteriore dell'anulus tutte le fibre vengono sollecitate dalla torsione indipendentemente dal loro orientamento<sup>10</sup>.

## **1.5. Biochimica e Biomeccanica del disco degenerato**

Nel disco, con il trascorrere del tempo, si presentano una serie di alterazioni interne che portano ad un mutamento strutturale complessivo in senso degenerativo.

In un primo tempo si assiste ad una progressiva riduzione della vascolarizzazione che causa un minor apporto ematico tradotto in un minor trofismo. Contemporaneamente si innescano una serie di processi in cui vi è un'aumentata produzione di citochine infiammatorie, quali interleuchina IL-1 e il fattore di necrosi tumorale alpha TNF-  $\alpha$ . L'ambiente pro-infiammatorio determinatosi altera il metabolismo della matrice extracellulare, portando ad uno squilibrio tra sintesi e degradazione delle componenti della matrice. Tra le molecole deputate al controllo del metabolismo troviamo coinvolte le bone morphogenetic proteins (BMPs), il transforming growth factor beta (TGF $\beta$ ) e l'insuline growth factor (IGF) come principali fattori anabolici mentre sul versante catabolico troviamo metalloproteinasi, collagenasi e proteasi della famiglia ADAMTS; tutti enzimi deputati alla degradazione della matrice extracellulare e dei proteoglicani. Ovviamente lo squilibrio si orienta a favore dell'azione degli enzimi proteolitici.

Lentamente si assiste inoltre ad una maggior produzione di fibre collagene di tipo I a discapito di quelle di tipo II, che si riducono in maniera progressiva. In questo modo il nucleo polposo tende a diventare strutturalmente sempre più simile all'anello fibroso. Inevitabilmente si ha una diminuzione della concentrazione di proteoglicani all'interno del nucleo; in particolare questi subiscono l'azione della stromelisin MMP-3, enzima proteolitico capace di degradare il loro core proteico. Assieme ad essi svaniscono anche le molecole con i gruppi solfato a carica negativa capaci di generare la pressione osmotica, la quale si abbassa notevolmente fino a raggiungere circa le 300 mOsm/L<sup>11</sup>.

Questa serie di cambiamenti porta ad una progressiva incapacità di richiamare fluidi all'interno del nucleo con conseguente disidratazione del disco. Si ha inoltre la compromissione dei processi di diffusione con diminuito ossigeno intradiscale e accumulo di cataboliti. La disidratazione, oltre a determinare un deficit funzionale nel gestire i carichi a cui è sottoposto il disco, è responsabile della generazione di fessurazioni del collagene che lo compone<sup>12</sup>.

Con il crollo della pressione osmotica e l'inefficienza da parte del disco nel richiamare liquidi, si assiste a un progressivo calo della pressione interna; ne deriva una diminuzione della tensione delle fibre, che si traduce in una minor rigidità complessiva del disco. Vengono a comprometersi le principali funzioni. In particolare, la deformazione del disco in risposta a un carico avviene molto più velocemente ed è maggiore. Una volta cessato il carico, il disco ha maggior difficoltà nel ripristinare la sua forma di partenza. La ridotta tensione delle fibre anulari fa sì che, a parità di carico, un disco degenerato presenti una maggior protrusione, specialmente nelle porzioni anteriore e postero-laterale. Tale fenomeno, associato alla maggior deformazione, rende il disco degenerato maggiormente suscettibile all'erniazione del nucleo polposo. Questo accade soprattutto a livello della porzione posteriore dell'anello fibroso, zona in cui lo spazio tra nucleo ed esterno risulta inferiore.

Si genera inoltre un'alterata distribuzione del carico sui corpi vertebrali con un incremento della sollecitazione nelle regioni periferiche dei piatti cartilaginei,

favorendo l'insorgenza di osteofitosi marginale, reperto che si associa spesso alla degenerazione del disco<sup>13</sup>.

## **I.6. La degenerazione del disco intervertebrale**

### **I.6.a. Eziologia**

La degenerazione del disco intervertebrale è il risultato di una complessa interazione tra fattori genetici e fattori ambientali; ne deriva una patologia, che può avere un quadro sintomatologico ben definito oppure più sfumato e che, in alcuni casi, può esitare in diverse complicanze<sup>14</sup>.

#### Fattori genetici

Studi su gemelli hanno dimostrato che la genetica gioca un ruolo predominante, contribuendo per un buon 70% alla determinazione del rischio di degenerazione discale.

I numerosi geni coinvolti vengono raggruppati in categorie diverse in base al ruolo che questi assumono nella determinazione della degenerazione. Per esempio troviamo polimorfismi dei geni che codificano per componenti strutturali del disco come l'aggrecano (ACAN), COL1, COL9, COL11, FN, HAPLN1, CLIP e Asporina (ASPN). Altri polimorfismi si ritrovano nei geni coinvolti nel disequilibrio che si crea tra anabolismo e catabolismo, questi sono i geni che codificano per le metalloproteinasi come MMP1, MMP2, MMP3, PARK2, PSMB9, oppure il gene che codifica per l'inibitore tissutale delle metalloproteinasi (TIMPs). Inoltre troviamo polimorfismi dei geni che codificano per molecole della cascata infiammatoria, tra i più importanti: IL1, IL6, COX2. Un gene che sembra partecipare all'inizio del processo degenerativo è quello che codifica per il recettore della vitamina D (VDR); è emerso da recenti studi che VDR, MMP3, IL1, IL6, ACAN e COL9, sembrano essere i geni in assoluto maggiormente implicati nella degenerazione del disco<sup>14</sup>.

### Fattori ambientali

Diversi sono i fattori ambientali che partecipano, seppur in modo meno incisivo di quelli genetici, al processo degenerativo. Questi riguardano principalmente gli stress meccanici, le comorbidità del paziente e le abitudini di vita.

L'obesità è implicata nella degenerazione, non solo per un fattore meccanico, ma anche per le comorbidità ad essa associate come l'aterosclerosi e le patologie cardiovascolari, che sembrano interferire con la perfusione discale. Indipendentemente da ciò, l'obesità è una condizione che si associa ad un significativo incremento di molecole pro-infiammatorie, come IL-6.

Come già accennato, i ripetitivi carichi assiali derivanti per esempio dallo spostamento di pesi notevoli associato a movimenti di torsione o flessione della colonna oppure il mantenere quotidianamente la posizione seduta, determinano uno stress meccanico che è in grado di anticipare e aggravare la degenerazione<sup>15</sup>. Per tale motivo determinate mansioni lavorative possono rientrare tra i fattori di rischio come anche il lavoro notturne che sembra alterare il fisiologico ciclo di nutrizione discale correlato al clinostatismo notturno<sup>16</sup>.

Infine, fra le abitudini di vita, troviamo il fumo, come unica esposizione chimica associata alla discopatia degenerativa; si è visto come il fumo possa essere implicato nell'inibizione della perfusione di sangue a livello del piatto cartilagineo<sup>14</sup>.

Vengono implicati tra i fattori di rischio anche l'età e il sesso dei soggetti; la degenerazione a carico del disco è certamente un fenomeno età-correlato, che inizia nella maggior parte dei casi tra la III e la V decade di vita. In alcuni casi i primi segni di degenerazione possono essere rilevati già nella II decade con un'incidenza globale doppia nel sesso maschile rispetto che in quello femminile.

### **I.6.b. Patogenesi**

Nella patogenesi della degenerazione del disco troviamo l'interazione di tutti i fattori di rischio accennati in precedenza assieme ad un fisiologico invecchiamento dell'organo avascolare, che porta, più o meno rapidamente a

seconda dell'individuo, a due fenomeni cruciali: la senescenza e la morte programmata delle cellule. Entrambi conducono ad una progressiva riduzione del numero di cellule all'interno del disco.

La senescenza cellulare è uno stato in cui le cellule smettono di proliferare, cessando la produzione di matrice extracellulare; essa è la reazione da parte della cellula ad una serie di stimoli provenienti dal DNA, come l'accorciamento dei telomeri. È emerso come la senescenza cellulare porti ad un'alterazione dell'equilibrio fra catabolismo e anabolismo a favore del primo. Le alterazioni che spingono le cellule a smettere di proliferare sono molteplici; tra le più importanti troviamo la riduzione dell'apporto ematico e della diffusione di nutrienti attraverso il piatto cartilagineo, che va incontro ad una progressiva ossificazione. Al contempo vi è una riduzione di alcuni fattori di crescita come il fattore di crescita insulino-simile (IGF- $\beta$ ), il fattore di crescita piastrinico (PDGF), il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF). Lo stress ossidativo causato dal microambiente infiammatorio e dagli abnormi carichi meccanici rappresenta un ulteriore stimolo ad interrompere il ciclo cellulare.

La concatenazione di questi eventi conduce ad un aumento del catabolismo della matrice extracellulare del disco, alterando il microambiente attorno alle cellule; questo rappresenta un evento chiave nell'innescare diversi processi di apoptosi cellulare che contribuiscono inesorabilmente alla riduzione del numero di cellule nel disco. Ovviamente si assiste a mutamenti da parte della matrice extracellulare anche in senso qualitativo con uno switch di produzione da collagene di tipo II a quello di tipo I, unico presente nel disco degenerato. Il catabolismo coinvolge anche i proteoglicani con la degradazione di questi da parte principalmente delle proteasi della famiglia ADAMTS e MMP-3. Il tutto associato all'alterazione della pressione osmotica getta le basi per l'instaurazione di un circolo vizioso, il quale trasforma più o meno velocemente il disco in un organo funzionalmente inefficiente, responsabile di sintomatologia a livello clinico e che potenzialmente esita in complicanze<sup>14</sup>.

### I.6.c. Classificazione

La degenerazione del disco intervertebrale è un processo fisiologico con l'avanzare dell'età; deve essere considerata patologica quando siamo in presenza di alterazioni degenerative abnormemente marcate in relazione all'età del paziente e alla condizione in cui si trovano gli altri dischi della colonna.

A seguito della progressiva disidratazione e di una consistenza sempre più friabile, nel disco si creano fessurazioni che possono essere circonferenziali o radiali. Le prime sono disposte in modo circonferenziale nell'anello fibroso e sono il risultato di una scissione della contiguità delle lamelle. Quelle radiali le ritroviamo posteriormente e in sezione trasversale appaiono mediane o paramediane; vengono definite complete se raggiungono il legamento longitudinale posteriore, altrimenti sono incomplete. Tali fessurazioni possono talvolta contenere detriti necrotici e, in casi di degenerazione avanzata, possono contenere gas, fenomeno definito "vacuum phenomenon".

In base a studi anatomopatologici e discografici, in cui viene iniettato un fluido radiopaco insieme ad un colorante, Adams et al. suddividono la degenerazione del disco in 5 tipi diversi: a palla di cotone, lobulato, irregolare, fessurato e rotto.

- 1) Nel disco "a palla di cotone" non si evidenziano segni di degenerazione e il nucleo polposo appare come una sostanza bianca e morbida.
- 2) Il disco "lobulato" è un disco maturo con il nucleo che inizia a fondersi in granuli fibrosi.
- 3) Nel disco "irregolare" troviamo segni di degenerazione con fessurazioni e fenditure all'interno del nucleo polposo e della zona interna dell'anulus.
- 4) Il disco "fessurato" è un disco degenerato in cui si notano fessurazioni radiali che si portano fino al bordo esterno dell'anulus.

5) Il disco “rotto” possiede una completa fessurazione radiale che consente la fuoriuscita dal disco del liquido iniettato<sup>17</sup>.

Discogram type		Stage of disc degeneration
1. Cottonball		No signs of degeneration. Soft white amorphous nucleus
2. Lobular		Mature disc with nucleus starting to coalesce into fibrous lumps
3. Irregular		Degenerated disc with fissures and clefts in the nucleus and inner annulus
4. Fissured		Degenerated disc with radial fissure leading to the outer edge of the annulus
5. Ruptured		Disc has a complete radial fissure that allows injected fluid to escape. Can be in any state of degeneration

#### I.6.d. Conseguenze della degenerazione del disco intervertebrale

Il processo degenerativo del disco può esitare, con l'avanzare del tempo, in diverse complicanze, che possono palesarsi clinicamente con un'importante sintomatologia.

Molto frequentemente, a seguito della distruzione delle fibre dell'anello fibroso, si può assistere ad un'erniazione del materiale nucleare con eventuali compressioni mieloradicolari. Come accennato in precedenza, la posizione originaria del nucleo polposo nei confronti dell'anulus, risulta localizzata più vicino al margine posteriore del disco rispetto a quello anteriore; per tale motivo, posteriormente lo spessore delle fibre dell'anello è inferiore rendendo questa zona più suscettibile a rottura. L'ernia discale si forma per lo più sul versante del canale vertebrale, in sede centrale o paramediana (ernia posteriore), oppure all'interno o all'esterno del forame di coniugazione (ernia intraforaminale ed extraforaminale).

Le ernie discali posteriori determinano prima una dislocazione delle strutture epidurali contenute nel canale vertebrale e, di seguito, una compressione sul sacco durale, sulle radici nervose e sul midollo spinale, creando un conflitto disco-radicolare o disco-midollare, che è alla base della sintomatologia neurologica.

Le ernie anteriori, che si verificano a seguito della rottura della zona anteriore dell'anulus con fuoriuscita del nucleo, sono molto più rare delle prime e nella maggior parte dei casi sono asintomatiche.

Il materiale erniato deborda dai margini delle limitanti somatiche in maniera segmentaria o focale; in un primo momento esso mantiene un rapporto di continuità con il restante nucleo polposo contenuto nel disco, tuttavia successivamente questo può rendersi del tutto indipendente dal disco divenendo un frammento libero e quindi un'ernia espulsa.

L'ernia si definisce contenuta, protrusa o espulsa a seconda dei rapporti che mantiene con il disco e quindi dal grado di fuoriuscita da esso.

L'ernia contenuta si presenta come uno stiramento delle fibre dell'anulus che vengono schiacciate dal nucleo polposo, il quale rimane tuttavia contenuto all'interno del disco mantenendone l'integrità. Cosa che non accade nell'ernia protrusa, in cui il nucleo rompe le fibre dell'anello e prende rapporti con il legamento longitudinale posteriore. Nell'ernia espulsa, infine, si ha una rottura dell'anulus con una completa fuoriuscita del nucleo polposo nel canale vertebrale.

Le ernie discali posteriori, sulla base dell'integrità del legamento longitudinale posteriore, vengono ulteriormente distinte in ernie sottolegamentose ed extralegamentose. Nelle prime il materiale estruso supera le fibre dell'anulus e si affaccia al canale vertebrale, rimanendo però al di sotto del legamento longitudinale posteriore. Nell'ernia posteriore extralegamentosa il nucleo polposo si fa strada attraverso il legamento longitudinale posteriore a seguito di una lacerazione di quest'ultimo.

La degenerazione del disco si associa spesso ad alterazioni delle strutture vertebrali limitrofe, che variano in risposta all'aumentato stress meccanico dovuto al deficit funzionale che ne deriva. Tra queste alterazioni troviamo l'osteofitosi

vertebrale, la sclerosi delle ossa limitanti somatiche, le ernie di Schmorl ed infine modificazioni della spongiosa somatica e del suo contenuto, il midollo osseo. In aggiunta, la degenerazione di un singolo disco esita in una ridotta mobilità del segmento di moto a cui esso appartiene comportando un aumentato sovraccarico sui segmenti adiacenti e quindi un'accelerazione del processo degenerativo dei rispettivi dischi.

L'osteofitosi vertebrale è un processo di neoformazione di tessuto osseo che avviene presso la giunzione tra disco e vertebra, più precisamente sul margine anterolaterale dei corpi vertebrali. Raramente gli osteofiti possono localizzarsi sul margine posterolaterale dei corpi vertebrali con conseguente stenosi del canale rachideo e dei forami di coniugazione; a tale condizione possono associarsi sintomi neurologici.

L'osteofita è una sorta di sistema di compenso da parte dell'osso a continui stimoli meccanici derivanti da una mal distribuzione dei carichi da parte di un disco degenerato. Quest'ultimo, aumentando in cedevolezza e di diametro, perde efficienza nella gestione dei carichi, che non avviene più in modo omogeneo e stimola dunque l'osso ad ampliare la superficie articolare attraverso la neoformazione di escrescenze ossee, dette appunto osteofiti.

Per sclerosi delle limitanti somatiche si intende un incremento reattivo delle dimensioni e del numero delle trabecole ossee; solitamente il processo sclerotico si estende non più di 3-10 mm dalla rima articolare, solo raramente arriva a coinvolgere più della metà del corpo vertebrale.

A livello del piatto cartilagineo, in seguito al riassorbimento e la sostituzione con tessuto osseo, si possono formare delle fessurazioni nelle quali talvolta può erniare il contenuto del nucleo polposo. Queste protrusioni del contenuto di nucleo vengono definite ernie di Schmorl. Sono ernie con direzione verticale e si fanno strada tra le fessure dei piatti cartilaginei e del tessuto osseo, il quale appare spesso sclerotico. Possono esser presenti in entrambe le vertebre adiacenti a un disco degenerato, superiormente ed inferiormente e sono per lo più asintomatiche.

La degenerazione del disco è frequentemente associata ad alterazioni del midollo osseo vertebrale; questo è costituito per un 50% da midollo osseo rosso, ricco di cellule corpuscolate del sangue e per il restante 50% da midollo osseo giallo, ricco di cellule adipose ed emopoieticamente inattivo. Il processo degenerativo a carico del disco coinvolge anche il midollo osseo vertebrale causando fenomeni di tipo regressivo.

Modic, sulla base di reperti anatomopatologici e di imaging, suddivide tali alterazioni in 3 tipi differenti:

-nel tipo 1 il midollo osseo adiacente ai piatti cartilaginei disgregati e fessurati appare sostituito da tessuto di granulazione; è una condizione transitoria che da un lato è potenzialmente reversibile mentre dall'altro può evolvere verso il tipo 2.

-nel tipo 2 le alterazioni del midollo sono essenzialmente un'evoluzione di quelle del primo tipo con la cicatrizzazione del tessuto di granulazione e aumento delle cellule adipose.

-nel tipo 3 si sfocia nella condizione finale di una cronica e prolungata degenerazione discale, in cui il tessuto emopoietico del midollo è completamente sostituito da tessuto fibroso con associata una marcata sclerosi della limitante vertebrale<sup>18</sup>.

Le alterazioni Modic sono rilevabili in risonanza magnetica:

Modic 1: ipointensità di segnale nelle sequenze T1 pesate, iperintensità in T2 rappresentano edema del midollo associato ad un processo acuto

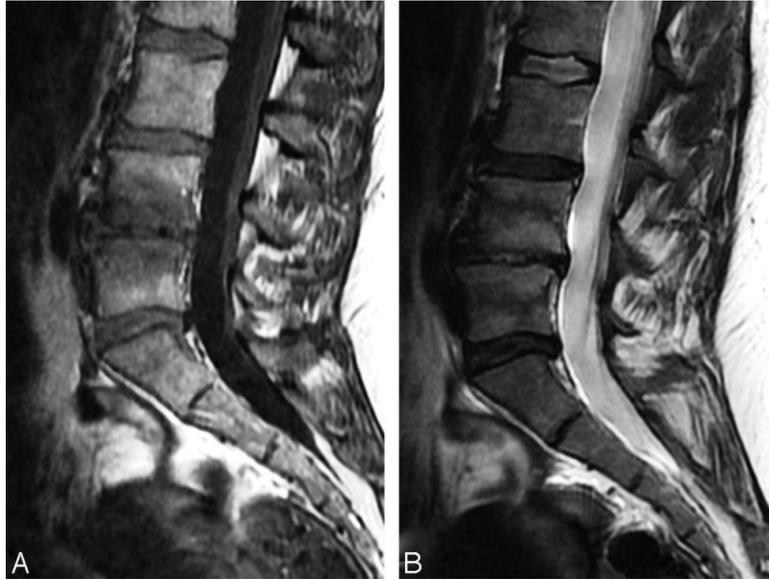


Immagine RMN MODIC tipo 1

Modic 2: iperintensità in T1 e ipointensità o leggera iperintensità in T2 rappresentano la degenerazione del grasso e della spongiosa subcondrale, associato quindi ad un processo cronico.

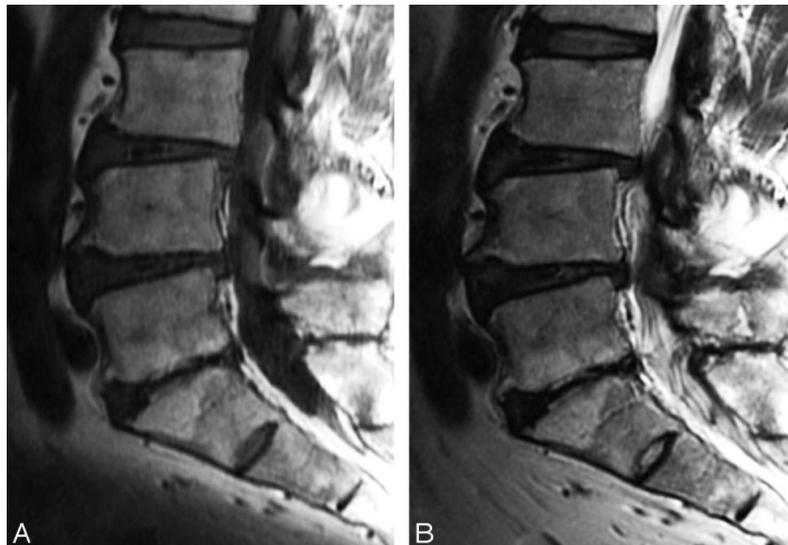


Immagine RMN MODIC tipo 2

Modic 3: ipointensità sia in T1 che in T2, corrispondente ad un'estesa sclerosi ossea, con un tessuto denso e tramato che non produce segnale RM. Anche questo come Modic 2 è un processo cronico.

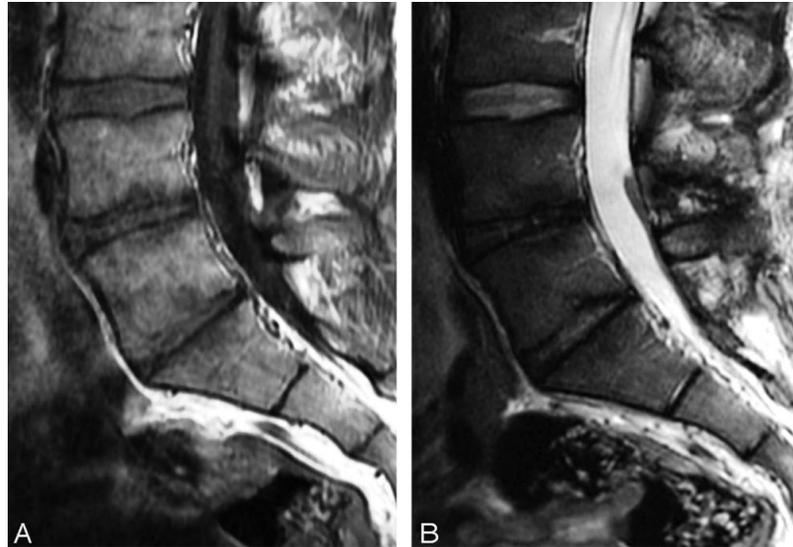


Immagine RMN MODIC tipo 3

La riduzione dello spazio articolare tra le vertebre dei dischi degenerati consegue in un accorciamento e un ispessimento dei legamenti vertebrali, come i legamenti gialli e il legamento longitudinale posteriore, che alla lunga possono determinare un'impronta sul sacco durale con stenosi del canale vertebrale. Inoltre, la riduzione dello spazio intersomatico consente alle vertebre adiacenti di scorrere l'una sull'altra determinando lassità legamentosa, sublussazione cranio-caudale delle corrispondenti faccette articolari e infine artrosi interapofisaria. L'artrosi vertebrale posteriore, nelle sue fasi avanzate può presentarsi con cisti subcondrali o geoidi, sclerosi dell'osso subcondrale, osteofitosi, deformità articolare e spondilolistesi.

Per spondilolistesi si intende uno scivolamento anteriore di una vertebra rispetto a quella sottostante. Nei casi avanzati di degenerazione discale si può assistere

a fenomeni di spondilolistesi degenerativa che comunemente viene suddivisa in quattro gradi sulla base dell'entità dello scivolamento:

-grado 1: 0 – 25%

-grado 2: 25 – 50%

-grado 3: 50 – 75%

-grado 4: > 75%<sup>19</sup>

È da ricordare come tutte queste alterazioni degenerative, specialmente la spondilolistesi, conducano inevitabilmente ad una riduzione delle dimensioni del canale rachideo centrale, dei recessi laterali e dei canali radicolari fino ad arrivare, nei casi più gravi, alla stenosi serrata del canale rachideo.

### **I.6.e. Sintomatologia clinica nella discopatia degenerativa**

La discopatia degenerativa può rimanere silente a livello clinico, oppure può provocare sintomi base come il dolore alla schiena e i sintomi legati alle complicanze di questa patologia.

All'interno del disco degenerato, per via dei fenomeni pro-infiammatori, vengono liberati determinati mediatori come citochine, prostaglandine, monossido d'azoto e altri che attivano i nocicettori presenti sul disco e sulle strutture limitrofe. In alcuni casi queste sostanze possono provocare dolore anche agendo sui meccanicettori, che vengono attivati durante le sollecitazioni meccaniche. Questo meccanismo è alla base dell'insorgenza del dolore in assenza di compressione midollare o radicolare.

Il dolore è localizzato principalmente a livello lombare, dove troviamo i dischi maggiormente colpiti dai fenomeni degenerativi. Lo stimolo dolorifico proveniente da questa sede viene definito lombalgia e rappresenta il sintomo cardine della discopatia degenerativa.

L'insorgenza della lombalgia può avvenire in modo acuto con forte dolore e deviazione antalgica della colonna; a mano a mano che il processo degenerativo progredisce il dolore si presenta sempre più spesso andando incontro a cronicizzazione con una diminuzione dell'intensità.

Se la degenerazione del disco è associata ad erniazione del contenuto nucleare, oltre al dolore nella sede dell'erniazione, si presenta anche una sintomatologia da compressione delle radici nervose da parte del materiale fuoriuscito dal disco. Il tessuto nervoso può andare incontro ad infiammazione e il dolore può irradiarsi in determinate sedi corporee a seconda di quale radice viene colpita, della dimensione dell'ernia e della lateralità di protrusione discale.

La zona più suscettibile a stress meccanici, che possono favorire il processo degenerativo a carico del disco, è sicuramente quella lombosacrale, responsabile di oltre il 60% delle rachialgie. In seconda posizione troviamo il tratto cervicale, da cui originano il 36% di tutte le rachialgie e infine solo il 2% di esse interessano il tratto dorsale.

### Ernia del disco lombare

Nella regione lombosacrale ci sono spazi intersomatici maggiormente interessati come L5-S1 ed L4-L5, che insieme costituiscono il 90% delle ernie lombari e altri livelli in cui il disco ernia meno frequentemente, quali L3-L4, L2-L3 ed L1-L2.

Le ernie lombari causano dolore vertebrale e danno spesso un quadro di radicolopatia, costituito da dolore, ipotrofia ed ipotonia muscolare, parestesie, ipoestesie e riduzione o scomparsa dei riflessi. Le alterazioni muscolari e della sensibilità cutanea si manifestano nei distretti di distribuzione nervosa della radice che viene compressa dall'ernia.

Quando la compressione avviene a livello delle radici di L5 ed S1, a causa rispettivamente di un'ernia compresa negli spazi intervertebrali L4-L5 ed L5-S1, si parla di lombosciatalgia. Chi soffre di lombosciatalgia presenta dolore lungo la superficie posteriore dei glutei, della coscia e del polpaccio fino ad arrivare al

calcagno. Al dolore si associano alterazioni della sensibilità e deficit della forza dei muscoli innervati. L'ernia che coinvolge S1 determina ipovalidità dei muscoli gastrocnemio, tricipite surale, bicipite e grande gluteo. In aggiunta si può presentare una ipoelicitabilità del riflesso achilleo.

Se l'ernia comprime L5, invece, vi sarà prevalentemente un'ipovalidità a livello del muscolo estensore lungo dell'alluce e tibiale anteriore.

È da ricordare che l'ernia del disco non può dare solo dolore, deficit di forza e di sensibilità, ma in rari casi può causare la sindrome della cauda equina: in tale situazione, quando il sacco durale a livello del rachide viene schiacciato da un'ernia grossa, si ha un'alterazione dell'innervazione vescicale (S1-S2) con conseguente ritenzione urinaria ostinata. Si tratta di un'urgenza chirurgica in cui il paziente deve essere operato entro le 48 ore.

Le compressioni della radice di L4, dovute ad ernie situate nello spazio intersomatico tra L3 ed L4, determinano un quadro di lombocruralgia, caratterizzato da dolore e parestesie nella regione anteriore della coscia, del ginocchio, nella parte mediale inferiore della gamba e a livello della caviglia. Al dolore si associa debolezza del quadricipite, del tensore della fascia lata e degli adduttori della coscia. Si può presentare inoltre una riduzione dell'elicitabilità del riflesso rotuleo.

Le rare compressioni che avvengono negli spazi intersomatici più craniali, come su L3, possono dare dolore, intorpidimento e parestesie nella zona anteromediale della coscia e del ginocchio con ipovalidità dei muscoli ileopsoas e quadricipite e diminuzione del riflesso rotuleo.

A livello semeiologico vi sono manovre suggestive per lombosciatalgia e lombocruralgia, le quali aggiungono informazioni complementari ai reperti radiologici al fine di porre diagnosi.

Il segno di Lasegue o test di elevazione dell'arto inferiore a ginocchio teso è una manovra che viene utilizzata per mettere in tensione il nervo sciatico o una delle sue radici; come test presenta una buona sensibilità, tuttavia non ha un'elevata

specificità. L'esecuzione del test prevede la flessione graduale della coscia sul bacino a paziente supino; è importante che la gamba flessa passivamente si trovi in completa estensione. La manovra di Lasegue risulta positiva quando il sollevamento della gamba evoca forte dolore. Essa viene inoltre definita in base al grado di flessione in cui compare il dolore: la massima estensione del nervo sciatico si ottiene con un'inclinazione di 60°, ma il dolore può già comparire a 20-30 gradi.

Il dolore neurologico suggestivo di lombosciatalgia va distinto da quello muscolare che può presentarsi a seguito dello stiramento della muscolatura ischio-crurale; a tal proposito si può affermare, che il dolore da stiramento della struttura nervosa è molto più forte di quello muscolare e spesso porta il paziente a opporre resistenza al sollevamento, contraendo l'arto e sollevando l'emibacino omolaterale. Il dolore di origine muscolare si presenta solo con un'inclinazione importante (vicino ai 70°), mentre il dolore da stiramento nervoso può presentarsi già ad inclinazioni modeste.

Con il segno o test di Valleix si comprime il decorso del nervo sciatico e si valuta la dolorabilità.

Il segno di Wasserman o test di stiramento del nervo femorale è suggestivo di lombocruralgia ed è una manovra che valuta l'interessamento delle radici L2, L3, L4. Il test può essere condotto con il paziente, sia in posizione prona, che in decubito laterale. Con il paziente prono si flette il ginocchio, accompagnando eventualmente il movimento ad un'estensione dell'anca. In decubito laterale invece, il paziente poggia sul lato controlaterale a quello preso in esame, tenendo l'arto inferiore all'altezza del ginocchio con una mano e sulla gamba con l'altra e andando sempre a estendere l'anca e a flettere il ginocchio. Come per il segno di Lasegue dovrà essere fatta una distinzione tra il dolore muscolare ed eventualmente quello di origine nervosa.

## Ernia del disco cervicale

Costituiscono circa il 25% di tutte le ernie del disco e si verificano per un 90% dei casi tra C6-C7 e C5-C6.

Le ernie cervicali possono distinguersi in ernie molle ed ernie dure: nelle prime si ha fuoriuscita esclusivamente del nucleo polposo, mentre nelle seconde si assiste ad una calcificazione del nucleo polposo degenerato con associata osteofitosi.

Se di dimensioni importanti e prevalentemente centrali possono comprimere il midollo dando un quadro sintomatologico di mielopatia, mentre se le ernie sono paramediane e intraforaminali andranno a comprimere le radici dando sintomi di tipo radicolare.

Quando vi è una compressione della radice di C6, a causa di un'ernia situata tra C6-C7, si avverte dolore e disturbi della sensibilità lungo la superficie anterolaterale del braccio, dell'avambraccio e del pollice. A livello muscolare si avverte ipostenia nei movimenti di flessione dell'avambraccio per ipovalidità dei muscoli bicipite, brachiale anteriore e flessore radiale del carpo. In questo caso si avrà riduzione dei riflessi bicipitale e supinatore.

Se la compressione avviene sulla radice di C7, per un'ernia compresa tra C6-C7, si avrà dolore e alterazione della sensibilità localizzati sulla superficie posterolaterale del braccio, sull'avambraccio dorsalmente, sul gomito e al secondo e terzo dito della mano. A livello muscolare si riscontra ipostenia durante i movimenti di estensione dell'avambraccio e di prensione della mano con ipovalidità dei muscoli tricipite, estensori del carpo e delle dita della mano. Il riflesso tricipitale può presentarsi ipoelicitabile fino a scomparire.

Quando è la radice di C8 ad essere coinvolta, ad opera di un'ernia a livello di C8-D1, si avverte dolore sulla parte mediale dell'avambraccio con un'alterazione della sensibilità localizzata a livello della faccia mediale del braccio e dell'avambraccio e della superficie palmare e dorsale del quinto dito e della metà

mediale del quarto dito. Si riscontra inoltre ipostenia a livello dei muscoli adduttore e flessore breve del pollice, interossei e lombricali III e IV.

### Ernia del disco dorsale

Le ernie del disco dorsale sono molto rare e costituiscono circa lo 0,25%-0,75% di tutte le ernie del disco. Nella maggior parte dei casi le ernie dorsali insorgono al di sotto di D8, specialmente a livello di D11 e D12. Le erniazioni in questa sede sono frequentemente ernie dure, quindi calcificate, e nei due terzi dei casi presentano una posizione centrale rispetto al rachide, determinando un quadro sintomatologico di tipo mielopatico, in cui possono presentarsi dorsalgia, ipostenia agli arti inferiori, difficoltà nella deambulazione, ritenzione urinaria, stitichezza e alterazione della sensibilità nei distretti innervati caudalmente rispetto alla sede dell'ernia. Nel terzo rimanente dei casi si ha una protrusione in sede laterale con associati sintomi da compressione radicolare come l'irradiazione del dolore e dei disturbi della sensibilità nei territori di distribuzione della radice interessata dalla compressione.

### Stenosi del canale vertebrale

Non sempre la degenerazione del disco esita in un'erniazione. Talvolta il processo degenerativo si associa ad artrosi delle faccette articolari con ipertrofia dei legamenti gialli ed una globale lassità legamentosa, che favorisce l'instabilità vertebrale, portando a eventuali fenomeni di spondilolistesi. Tutte queste alterazioni convergono sul restringimento del canale vertebrale, che a livello lombare si manifesta a seguito di una compressione sul sacco durale, in cui sono contenute le radici nervose. Tra i sintomi tipici della stenosi lombare, oltre al dolore ed eventuali alterazioni della sensibilità, troviamo una claudicatio neurogena: durante la deambulazione compaiono sintomi bilaterali quali dolore, sensazione di pesantezza agli arti inferiori ed esaurimento delle forze, che costringono il soggetto a fermarsi. Con la sosta si attenuano i sintomi, ma una volta ripresa la marcia questi tenderanno a ripresentarsi.

## I.6.f. Terapia

La terapia della patologia del disco intervertebrale e delle sue complicanze varia da trattamenti conservativi, come il riposo, i farmaci antinfiammatori e analgesici, la fisioterapia, a tecniche più invasive, come le iniezioni epidurali e le tecniche ablative, fino ad arrivare al trattamento con interventi chirurgici.

Il trattamento in questa patologia, sia esso conservativo o invasivo, ha come fine quello di condurre ad una risoluzione dei sintomi con la ripresa di un normale stile di vita e dell'attività lavorativa da parte del paziente; non viene attuato a scopo preventivo.

### Trattamento conservativo

Il trattamento conservativo può essere considerata la prima strategia terapeutica che viene attuata in pazienti che rientrano nei seguenti criteri clinici:

- dolore lombare cronico o radicolopatia di durata inferiore a 6 mesi
- presenza di ernia discale confermata agli esami strumentali quali RM e TC
- coerenza tra le caratteristiche del dolore e l'obiettività neurologica e radiologica
- nessun precedente trattamento conservativo nella storia clinica del paziente.

#### -Riposo a letto

Il riposo a letto è il primo approccio da intraprendere durante la fase acuta di malattia, in cui il paziente presenta una forte sintomatologia algica associata a limitazione funzionale e contrattura antalgica dei muscoli limitrofi alla zona infiammata. Il razionale di questo trattamento è quello di eliminare il carico sulla colonna vertebrale e ridurre in questo modo la pressione sui dischi affetti da patologia. La durata del riposo va dai 2-3 giorni a una settimana. È stato dimostrato come un riposo prolungato (oltre i 4 giorni) possa provocare un indebolimento muscolare con ipostenia e rigidità articolare associati ad un maggior rischio di sviluppare trombosi venose profonde; sarà dunque opportuno riprendere al più presto una moderata attività fisica<sup>20</sup>.

### -Terapia farmacologica

La terapia farmacologica si associa spesso al riposo a letto; lo scopo di questo trattamento è principalmente la riduzione dell'infiammazione, il controllo del dolore e la risoluzione della contrattura muscolare. A tal proposito si utilizzeranno farmaci antinfiammatori non steroidei, farmaci miorilassanti e farmaci analgesici. Se la terapia antinfiammatoria di prima linea fallisce si può optare per l'uso di derivati steroidei cortisonici, seppur per limitati periodi di tempo (cicli di 2 settimane associati a gastroprotezione per ridurre il rischio di sanguinamento). Se il dolore persiste, si può ricorrere ai farmaci di terza linea, come gli oppioidi minori o le benzodiazepine e, infine, si può arrivare ad utilizzare anche oppioidi maggiori, per dolori molto intensi non responsivi alle altre categorie di farmaci. L'uso di oppioidi deve essere limitato a casi particolare con un dolore molto intenso refrattario ad altre terapie. È emerso da uno studio come in realtà, analizzando il decorso sintomatologico per 4 anni in due gruppi di pazienti di cui uno trattato con oppioidi, non vi sono notevoli differenze in termini di risultato clinico finale, se non un peggioramento delle condizioni generali da parte dei pazienti in terapia con oppioidi<sup>21</sup>.

Un trattamento conservativo in pazienti con dolore persistente e deficit neurologici può risultare insufficiente con necessità di ricorrere a tecniche invasive.

### Tecniche invasive

#### -Infiltrazioni locali di anestetici e antidolorifici

La terapia antidolorifica può essere attuata anche tramite infiltrazioni locali di anestetici e antidolorifici. Vengono effettuate anche infiltrazioni di steroidi a lunga durata d'azione in associazione ad un anestetico locale nello spazio epidurale. L'obiettivo delle infiltrazioni è di minimizzare il dolore del paziente attraverso l'applicazione di antinfiammatori, di solito steroidei, nel sito dell'infiammazione con azione diretta su di essa. Tuttavia è stato dimostrato che a distanza di 4 anni non vi è notevole differenza rispetto a pazienti che non avevano ricevuto questo tipo di trattamento; il ruolo delle iniezioni steroidee è dunque principalmente volto

al controllo del dolore nella fase acuta di malattia, grazie alla capacità di ridurre l'edema infiammatorio<sup>22</sup>.

#### -Iniezioni epidurali

Le iniezioni epidurali a livello della colonna lombare si effettuano mediante 3 approcci differenti: iniezioni a livello caudale, interlaminare e transforaminale.

Tali iniezioni vengono utilizzate principalmente per pazienti con ernia del disco, offrendo una strategia alternativa alla chirurgia.

Un recente articolo riporta i risultati di 3 trial randomizzati e controllati, evidenziando un'efficacia sovrapponibile nei tre diversi approcci di iniezione epidurale. Come farmaci iniettati sono stati utilizzati uno steroide e un anestetico locale, con una netta superiorità in termini di outcomes del primo farmaco<sup>23</sup>.

#### -Ozonoterapia

È una tecnica utilizzata prevalentemente per l'ernia del disco e consiste nell'introduzione intradiscale, tramite l'utilizzo di un ago, di una miscela a base di Ossigeno-Ozono. Quest'ultimo possiede un potere antinfiammatorio contribuendo a ridurre la tensione del disco e ad attenuare il dolore. Tale tecnica viene utilizzata solamente quando l'unico sintomo è rappresentato dal dolore e il disco è ancora contenuto. La miscela può essere introdotta a livello intradiscale o intraforaminale (tramite guida radiologica) o nella muscolatura paravertebrale. L'effetto dell'ozonoterapia è antinfiammatorio, analgesico, miorilassante e iperossigenante; l'effetto di questa terapia si valuta in un periodo che va dalle 4 alle 10 settimane e in termini di outcome ha mostrato un'efficienza paragonabile ad altre tecniche mininvasive<sup>24</sup>.

#### -Terapia ElettroTermica Intradiscale (IDET)

Questa procedura consiste nell'inserimento nel disco intervertebrale di una spirale con elettrodo a radiofrequenza, con tecnica percutanea tramite un ago-catetere sotto guida radiologica. La spirale, riscaldata a circa 90°C, distrugge i recettori del dolore sensibili al calore e rimodella il collagene discale.

#### -Percutaneous Laser Disc Decompression (PLDD)

È una tecnica impiegata nel trattamento dell'ernia del disco e consiste nell'asportazione dell'ernia attraverso l'introduzione, tramite accesso percutaneo, di uno speciale ago dotato di una fibra ottica di piccole dimensioni, la quale vaporizza, sotto controllo radioscopico, il materiale discale erniato.

L'obiettivo di questa procedura è quello di minimizzare la compressione dell'ernia sulle strutture nervose andando a diminuire, seppur in quantità molto ridotte, la quota di materiale nucleare erniato vaporizzandolo.

Le controindicazioni a tale procedura sono le diatesi emorragiche, la presenza di spondilolistesi di grado III o IV, le ernie discali completamente espulse, quelle con componente migrata e quelle calcificate; oltre a queste anche i pazienti che presentano bolle d'aria all'interno del disco (il cosiddetto vacuum discale) o che hanno lo stesso completamente degenerato e marcatamente assottigliato.

Studi retrospettivi hanno dimostrato un'efficacia di questa tecnica paragonabile a quella della discectomia chirurgica, tuttavia la PLDD presenta un rapporto costo-efficacia assai più vantaggioso<sup>25</sup>.

#### -Ablazione percutanea

L'indicazione precisa per l'ablazione percutanea sono le ernie sintomatiche, non ancora espulse e pertanto non ancora indicate per l'intervento chirurgico. Il fine di questa procedura consiste nella rimozione del nucleo polposo del disco intervertebrale utilizzando un ago e quindi un elettrodo per l'impiego di energia a radiofrequenza. Si ottiene così una contrazione del collagene, comportando il restringimento ed il riassorbimento del disco stesso. Da studi è emerso che i migliori risultati si ottengono in pazienti giovani e in salute rispetto a quelli anziani<sup>26</sup>.

#### -Ablazione tramite chemionucleolisi

È una tecnica poco utilizzata oggi, in quanto gravata da un elevato tasso di complicanze. Si basa sull'iniezione percutanea di chimodiactina, enzima capace di degradare il nucleo polposo. È una pratica con risultati di efficacia inferiori rispetto alla discectomia standard<sup>27</sup>.

## Terapia chirurgica

Il trattamento chirurgico risulta un'opzione valida per i pazienti con degenerazione del disco non responsiva al trattamento conservativo. La discectomia è rappresentata il gold standard per il trattamento dell'ernia del disco. L'artrodesi intersomatica è il trattamento riservato ai pazienti affetti da ernia del disco con discopatia (Modic 1). Questa consiste nella fusione di due corpi vertebrali adiacenti dopo la rimozione del disco intervertebrale.

### -Microdiscectomia

Consiste nella rimozione del disco eventualmente erniato mediante l'utilizzo da parte del chirurgo di un microscopio operatorio o di occhiali in grado di ingrandire in modo molto dettagliato le immagini delle strutture anatomiche da operare, permettendo di ridurre l'entità di erosione delle lamine ossee che devono essere rimosse per raggiungere l'ernia. Ne deriva un recupero più rapido post-intervento con meno cicatrici e meno dolore nella zona lombare.

### -Discectomia per via endoscopica

Si tratta di un intervento a bassissima invasività e consiste nell'introduzione percutanea di una cannula (camicia esterna) nell'endoscopio del diametro di 0,7 cm. La cannula viene introdotta sotto guida radiologica intraoperatoria, che consente il corretto posizionamento del sistema nel punto in cui si trova. Dopo aver posizionato la cannula si introduce l'endoscopio rigido e si procede con l'asportazione del materiale discale con continuo lavaggio e sotto la visione endoscopica diretta. Attraverso l'utilizzo dell'endoscopio e della guida radiologica si ottiene la massima sicurezza nei confronti di strutture nobili come le radici nervose e il sacco durale.

### -Discectomia tradizionale

La discectomia aperta si realizza praticando un'incisione lungo le apofisi spinose distaccando dalla struttura ossea la muscolatura paravertebrale; si asporta il legamento giallo e si mette in evidenza la tumefazione dell'ernia. Qualora non

fosse ancora espulso si incide il legamento longitudinale e si asporta il tessuto erniato.

#### -Artrodesi intersomatica

A livello lombare l'artrodesi intersomatica consiste nella fusione di due corpi vertebrali adiacenti, dopo la rimozione del disco intervertebrale patologico compreso tra essi. Si procede poi all'inserimento di un impianto (cage, spaziatore o innesto osseo) nello spazio intersomatico. Se necessario, nella parte posteriore della colonna vertebrale, possono essere inserite viti e barre in titanio o in acciaio inossidabile per aumentare la stabilità della struttura servendosi di una stabilizzazione vertebrale posteriore.

Esistono diversi approcci chirurgici per la fusione lombare: posterior lumbar interbody fusion (PLIF), anterior lumbar interbody fusion (ALIF), transforaminal lumbar interbody fusion (TLIF), minimally invasive transforaminal lumbar interbody fusion (MI-TLIF), oblique lumbar interbody fusion/anterior to psoas (OLIF/ATP), lateral lumbar interbody fusion (LLIF)<sup>28</sup>. L'approccio maggiormente utilizzato risulta quello posteriore quindi (PLIF), in quanto gravato da minori complicanze; tuttavia negli ultimi anni queste tecniche sono state migliorate, arrivando ad approcci mini-invasivi, che, grazie ad incisioni molto più piccole, consentono il risparmio della funzione muscolare ed esiti cicatriziali minimi<sup>29</sup>.

Nell'artrodesi intersomatica, andando ad eliminare l'arco di movimento del segmento degenerato senza sostituire il disco rimosso, si incorre in diverse complicanze, quali pseudoartrosi, dolore nel sito donatore, sindromi giunzionali, alterazione del profilo sagittale e dell'equilibrio lombo-pelvico. Inoltre, fondendo due vertebre adiacenti, si altera la funzione biomeccanica del rispettivo segmento di moto, andando dunque a sovraccaricare i segmenti limitrofi e accelerandone il processo degenerativo.

#### -Artroplastica discale

L'intervento prevede la sostituzione protesica del disco intervertebrale degenerato. È un intervento praticato per lo più in pazienti giovani con alte richieste funzionali e che presentano livelli singoli di patologia degenerativa; l'obiettivo è quello di ripristinare le proprietà biomeccaniche del segmento di

moto con impianti protesici biocompatibili in termini di tossicità e carcinogenesi. I vantaggi legati a questa procedura sono la diminuzione del tasso di sindrome giunzionale, il ripristino dell'anatomia foraminale e la riduzione del sovraccarico delle faccette articolari interapofisarie per collasso discale, azzerando quindi il rischio di pseudoartrosi. Nonostante i numerosi vantaggi vi sono diverse complicanze post-operatorie legate a questa procedura come eventi avversi legati alla protesi e la sua perdita di elasticità con irrigidimento della stessa. Diversi studi mostrano che rispetto all'artrodesi si ottengono migliori outcome clinici a 1, 2 e 5 anni dall'intervento con significativa diminuzione del dolore lombare e agli arti inferiori<sup>30</sup>.

### Terapia rigenerativa

I trattamenti visti finora hanno come finalità quella del controllo dei sintomi che derivano dalla degenerazione del disco senza che vi sia la possibilità di utilizzare tali trattamenti a scopo preventivo. Difatti, sia le terapie conservative che quelle più invasive sino alla chirurgia, non intervengono in alcun modo sul processo degenerativo senza interferire sulla sua progressione. A tal proposito, la medicina rigenerativa ha l'obiettivo di modificare la storia naturale della degenerazione discale, interrompendo il processo degenerativo e promuovendo la rigenerazione del tessuto.

Nella rigenerazione del disco intervertebrale sono stati ottenuti buoni risultati in vitro e in vivo, sia su modelli animali che su dischi umani; vengono utilizzate diverse strategie, come i derivati piastrinici, le cellule staminali e la terapia genica volta a incrementare l'espressione di determinati fattori di crescita, i quali si riducono nel disco degenerato.

Questo lavoro tratterà principalmente dell'applicazione della medicina rigenerativa nella patologia del disco intervertebrale, mediante l'utilizzo dei derivati piastrinici correlando i risultati ottenuti in vitro con quelli presenti in letteratura.

## II. SCOPO DELLA TESI

La patologia degenerativa del disco intervertebrale è considerata una delle principali cause di dolore alla colonna vertebrale, che più spesso si localizza a livello lombare, determinando un quadro di lombalgia cronica.

Il processo degenerativo colpisce un organo di per sé avascolare e con capacità rigenerative molto limitate; per tale motivo la maggior parte dei trattamenti hanno come fine quello di eliminare la sintomatologia, senza alcun intervento sulla degenerazione. I trattamenti variano da terapie conservative a interventi mini-invasivi fino alle tecniche di chirurgia open, come la rimozione del disco, la fusione vertebrale o, in casi selezionati, l'artroplastica discale.

Negli ultimi anni la medicina rigenerativa ha offerto una valida alternativa nel trattamento della discopatia degenerativa, mediante l'impiego di cellule staminali, terapia genica e derivati piastrinici. Numerosi sono gli studi pubblicati recentemente, che riportano l'efficace utilizzo dei derivati piastrinici nell'ambito della degenerazione del disco intervertebrale.

Lo scopo del lavoro è quello di riportare gli studi più recenti presenti in letteratura, che riguardano l'analisi dell'efficacia del PRP in vitro, in vivo su modelli animali e infine su pazienti; gli studi vengono riassunti in una revisione della letteratura.

La seconda parte dello studio si è svolta in laboratorio, con il fine di studiare in vitro gli effetti che i derivati piastrinici possiedono su campioni di disco intervertebrale degenerato, derivanti da pazienti sottoposti a interventi chirurgici di discectomia. In particolare, viene valutata la reazione del campione di disco degenerato sotto la stimolazione del lisato piastrinico (PL); le cellule ottenute dal campione mediante espanto vengono inoltre studiate in termini di proliferazione cellulare e caratteristiche fenotipiche mantenendole nelle condizioni di PL e di siero fetale bovino (FBS).

Lo scopo dell'esperimento è di dimostrare che un campione di disco degenerato è in grado di rilasciare cellule corrispondenti alle staminali mesenchimali, se

stimolato con derivati piastrinici (PL), e di studiare la capacità proliferativa di tali cellule in ambiente ricco di lisato piastrinico.

# III. IMPIEGO DEL PRP NELLA PATOLOGIA DEGENERATIVA DEL DISCO: REVISIONE DELLA LETTERATURA

## III.1. Definizione e Classificazione

Il Platelet-Rich-Plasma umano (PRP) o plasma ricco di piastrine è un emocostruito di piastrine ricco di fattori di crescita e citochine noto per le sue capacità rigenerative nei confronti di tessuti danneggiati con cellule scarsamente indotte alla proliferazione<sup>31</sup>.

Come tutti gli emoderivati (lisato piastrinico-PL o plasma povero in piastrine-PPP) è ottenuto da sacche di sangue intero (buffy coat) non più utilizzate dai centri trasfusionali perché scadute e quindi non più adatte a scopi trasfusionali.

Il PRP è stato differentemente classificato da Dohan Ehrenfest et al<sup>32</sup> e DeLong et al<sup>33</sup>, in base al numero di leucociti e il contenuto di fibrina, in 4 tipi di preparazioni.

Il leukocyte-poor platelet-rich plasma (P-PRP) contiene un basso numero di leucociti e una densità di fibrina altrettanto bassa. Invece, il leukocyte and platelet-rich plasma (L-PRP) contiene un elevato numero di leucociti ed una densità di fibrina bassa. Il terzo tipo di preparazione è il P-PRF, pure platelet-rich fibrin, che contiene un basso numero di leucociti e un'elevata densità di fibrina. Infine troviamo il leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF), che contiene un alto numero di leucociti con altrettanto elevata densità di fibrina<sup>32</sup>.

La definizione delle differenti tipologie è stata effettuata secondo la classificazione PAW basata sul numero di piastrine (P), sul sistema di attivazione dei derivati piastrinici (A) e sulla presenza o assenza dei leucociti (W)<sup>33</sup>.

## III.2. Biologia

Il PRP è un concentrato di piastrine in un ridotto volume di plasma, che viene ottenuto mediante centrifugazioni seriali di sangue successivamente alle quali si ottiene un derivato di sangue con una concentrazione di piastrine che è più di un milione per microlitro (circa 94% piastrine e 5 % globuli rossi).

Le piastrine hanno la funzione principale di dare un contributo all'emostasi e alla coagulazione delle ferite mediante processi di adesione, attivazione e aggregazione. Le piastrine sono attivate in risposta alla lesione di un vaso; i loro granuli vengono rilasciati, liberando fattori della coagulazione che promuovono la formazione di un coagulo di fibrina.

Oltre ai fattori della coagulazione, le piastrine rilasciano anche fattori di crescita, i quali portano ad un picco di infiammazione necessario alla riparazione del danno e incentivano la rivascolarizzazione, accelerando la rigenerazione epiteliale nelle varie fasi proliferative del processo di guarigione<sup>34</sup>.

Le piastrine contengono tre tipi di granuli: i granuli alpha, i granuli densi e i lisosomi.

I lisosomi contengono proteasi, come catepsina ed elastasi, e altri enzimi quali fosfatasi e glicosidasi<sup>31</sup>, mentre i granuli densi contengono Istamina, Serotonina,  $Ca^{2+}$ , ADP e ATP.

I granuli alpha, invece, sono l'unica categoria che abbia al loro interno un maggiore contenuto di proteine bioattive, quali proteine della coagulazione e i loro inibitori, proteine di adesione, fattori fibrinolitici e i loro inibitori, fattori di crescita e mitogeni, chemochine, citochine e altre ancora.

Una volta attivate, le piastrine rilasciano tali proteine bioattive, che promuovono diversi processi come la proliferazione cellulare, la chemiotassi, l'angiogenesi, la differenziazione cellulare e la sintesi di matrice extracellulare.

Anche il PRP essendo quindi un concentrato di piastrine, al fine di rilasciare in maniera ottimale i fattori di crescita, necessita di un'attivazione; al fine di utilizzare questo componente per studi in vitro, a meno che le colture non siano in contatto con una matrice di collagene che induce un'attivazione endogena, è importante indurre esternamente una sua attivazione in modo da favorire la fuoriuscita dei

fattori. Solitamente per effettuare questa attivazione vengono utilizzati cloruro di calcio e/o trombina, congelamento e scongelamento che porta alla distruzione delle membrane piastriniche con il successivo rilascio di fattori. Per studi in vivo e studi clinici sono state utilizzate tecniche sia di attivazione esogena che di attivazione endogena<sup>31</sup>.

Tutti i fattori rilasciati dalle piastrine durante il processo di guarigione di una ferita, risultano essere ben orchestrati. Alcuni di questi fattori sono ad esempio:

- platelet-derived growth factor (PDGF) che promuove l'angiogenesi, la replicazione cellulare, l'epitelizzazione e la formazione di tessuto di granulazione;
- vascular endothelial growth factor (VEGF) che promuove l'angiogenesi;
- transforming growth factors (TGF-beta1 e beta2) che stimolano la sintesi di matrice extracellulare;
- insulin-like growth factor (IGF1-2) il quale promuove la crescita e il differenziamento cellulare;
- fibroblast growth factor (FGF) che agisce stimolando la proliferazione delle cellule endoteliali e dei fibroblasti assieme all'angiogenesi.

### **III.3. Applicazioni in ambito ortopedico**

Molti studi riportano come il PRP possa essere applicato con successo nel trattamento di diverse patologie correlate allo sport. Le patologie maggiormente curate con il PRP sono principalmente le tendinopatie. Alcuni tendini sono poco vascolarizzati e con una capacità di guarigione intrinseca molto limitata; una volta lesionati, si instaura una tendinopatia cronica difficile da trattare e che trae solo un parziale giovamento dalle terapie conservative.

Di Matteo et al.<sup>35</sup> nei loro studi riportano come l'impiego di PRP, somministrato mediante un'iniezione intralegamentosa, possa diminuire in modo significativo il dolore a fronte di un incremento delle scale funzionali nelle tendinopatie, al tendine d'Achille e al tendine rotuleo.

Altra applicazione importante del PRP è stata quella relativa al trattamento della gonartrosi. Una recente metanalisi ha riportato come nell'artrosi del ginocchio le

iniezioni di PRP abbiano diminuito notevolmente il dolore con una ripresa funzionale significativa, rispetto alle iniezioni di placebo o acido ialuronico (considerati come controllo). In particolare, uno studio evidenzia un miglioramento molto significativo del dolore e degli score funzionali al sesto e dodicesimo mese dopo il trattamento, rispetto al placebo, e al dodicesimo mese rispetto all'acido ialuronico<sup>36</sup>.

Sanchez et al.<sup>37</sup> hanno trattato 40 pazienti affetti da artrosi dell'anca con 3 iniezioni di PRP eco-guidate settimanali; in una prima valutazione a 6 settimane dal trattamento, si è riscontrata una significativa riduzione del livello di dolore, confermata poi a 6 mesi di follow-up.

Chen et al.<sup>38</sup> hanno condotto uno studio promettente sull'impiego del PRP nel trattamento delle lacerazioni legamentose alla cuffia dei rotatori. Nello studio si evidenzia un notevole decremento delle lesioni a lungo termine con outcomes funzionali migliori nei pazienti che presentano anomalie a livello della cuffia dei rotatori. Tali risultati suggeriscono, che il PRP può influenzare positivamente il trattamento delle lesioni alla cuffia dei rotatori, tuttavia un numero di dati limitati, l'eterogeneità dello studio e la scarsa qualità metodologica impediscono di trarre conclusioni certe.

### **III.4. PRP nella patologia di degenerazione del disco intervertebrale**

#### **III.4.a. Meccanismo rigenerativo**

Molti fattori di crescita con i rispettivi recettori sono stati trovati all'interno di cellule derivanti da disco intervertebrale; questi fattori risultano essere fortemente implicati nel suo metabolismo.

Tra le varie funzioni promosse dai fattori di crescita, oltre a riparazione dei tessuti e loro guarigione, troviamo anche la sintesi di collagene e di proteoglicani, molecole che rivestono un ruolo centrale nella formazione di matrice extracellulare, i principali fattori coinvolti in questo processo sono: TGF-beta, PDGF, EGF.

Una famiglia molto importante per le cellule del disco è rappresentata dalle proteine morfogenetiche dell'osso (BMPs) appartenenti alla superfamiglia dei TGF-beta e si è visto essere capaci di promuovere la proliferazione e il differenziamento di cellule in differenti lineage.

Il recettore delle BMPs è stato individuato anche sulla membrana delle cellule del disco. Su questo recettore sono stati effettuati degli studi riguardanti il legame con la specifica proteina che porta all'incremento della sintesi di proteoglicani, all'upregolazione dell'mRNA del collagene di tipo II e di altri agenti mitogeni del disco.

Come noto, in presenza di degenerazione discale si instaura una condizione ipossica, che porta all'aumento dell'espressione di VEGF (vascular endothelial growth factor), fattore coinvolto nella vasculogenesi; un aumento delle concentrazioni di questo fattore, si sono mostrate essere importanti nel processo di rigenerazione del disco<sup>39</sup>.

In uno studio sul disco intervertebrale Sakai et al.<sup>40</sup> hanno identificato una popolazione di cellule progenitrici multipotenti all'interno del nucleo polposo, suggerendo una potenziale capacità di migrazione e differenziamento di tali cellule, se opportunamente stimolate.

Il PRP rappresenta un "cocktail" di fattori di crescita ad alte concentrazioni in grado di arrestare la degenerazione discale, promuovere il differenziamento cellulare, favorire la proliferazione e portare quindi alla rigenerazione del tessuto. È inoltre da sottolineare la possibilità di ottenere il PRP da sangue proprio (autologo), che nelle applicazioni cliniche permette di evitare trasmissioni di patologie e reazioni immunologiche per incompatibilità. Le preparazioni di PRP sono semplici da applicare e hanno un ottimo rapporto costo-beneficio, a differenza della somministrazione dei singoli fattori di crescita sintetizzati artificialmente, che sono più costosi e con un'emivita più breve<sup>39</sup>.

Negli ultimi anni molti studi sono stati condotti, primariamente in vitro per capire i meccanismi di azione e successivamente in vivo su modelli animali. I risultati ottenuti hanno permesso la traslazione in vivo con l'avvio di clinical trials su pazienti affetti da dolore lombare cronico, con risultati promettenti.

### III.4.b. Studi in vitro

Già da molti anni vengono studiati gli effetti in vitro del PRP su cellule di disco intervertebrale provenienti da diverse specie animali e dall'uomo.

Chen et al.<sup>41</sup>, nel 2006, valutarono l'effetto di PRP arricchito prevalentemente in TGF-beta1, su cellule di disco intervertebrale umane; dallo studio è emerso, come il PRP fosse in grado di stimolare la proliferazione cellulare e incrementare la sintesi di proteoglicani e collagene in colture di cellule del nucleo polposo. Altro risultato ottenuto ha evidenziato un notevole aumento dell'espressione di geni della matrice, che codificano per collagene di tipo II (COLII), aggrecano (AGN) e per un fattore di crescita condrocitario (SOX9), assieme ad un accumulo di glicosaminoglicani. È stato inoltre dimostrato come le cellule stimulate con PRP mantengano le loro caratteristiche fenotipiche.

Un altro studio di Liu et al.<sup>42</sup>, che prevedeva l'utilizzo di cellule umane di nucleo polposo immortalizzate, ha mostrato, anch'esso utilizzando un PRP contenente una concentrazione di 1ng/mL di TGF-beta1, come, oltre al ripristino dei marker condrogenici, che diminuiscono durante il processo di degenerazione (SOX9, COL2 e AGN), si ottenga una riduzione della risposta infiammatoria (IL-1beta, TNF-alpha e MMP3).

A ulteriore supporto dell'evidenza che il PRP possiede capacità antinfiammatorie, vi è lo studio condotto da Kim et al. nel 2014<sup>43</sup>. Essi mostrano principalmente come che la somministrazione di citochine infiammatorie ricombinanti, quali IL-1 (interleukin 1) e TNF-alpha (tumor necrosis factor-alpha), in un terreno di cellule di nucleo polposo umane, riduca notevolmente l'espressione di geni necessari per la sintesi della matrice (COLII, AGN) a fronte di un incremento di quelli che codificano per molecole che la degradano, quali COX-2 (ciclossigenasi-2) ed MMP-3 (matrice metalloproteinasi-3). Tuttavia dallo studio è emerso come la somministrazione di PRP alle colture, porti ad un ripristino dell'espressione dei geni down-regolati durante il processo di infiammazione, con una netta diminuzione dei geni responsabili della degradazione della matrice extracellulare. La letteratura riporta inoltre che il PRP, oltre ad aumentare i processi anabolici e a contenere l'infiammazione ampiamente presente nel processo degenerativo, è anche in grado di sopprimere geni codificanti per determinati tipi di collagene;

questo risultato è stato ottenuto principalmente in studi condotti da Yang et al <sup>44</sup>, effettuati su cellule di nucleo polposo di coniglio. I risultati emersi da questo lavoro hanno mostrato la tipica stimolazione dei geni COLII, AGN e SOX9 assieme ad una soppressione del gene codificante per il collagene X (COLX). Nel loro studio, somministrando un inibitore del TGF-beta (TGF-beta i), che interrompe la via di segnalazione attraverso le proteine Smad2/3, hanno riscontrato un netto calo degli effetti del PRP, suggerendo come il TGF-beta rivesta un ruolo centrale nella stimolazione indotta dai derivati piastrinici.

Precedentemente si è fatto cenno alle diverse caratteristiche del PRP, in base al numero di leucociti e la densità di fibrina; Wang et al. nel 2018<sup>45</sup>, hanno mostrato che la scelta del tipo di PRP può influenzare notevolmente l'espressione di vari geni. Utilizzando il P-PRP e l'L-PRP su cellule di disco degenerato di coniglio, hanno mostrato che il PRP ricco di leucociti è in grado di indurre una maggiore espressione di geni infiammatori e catabolici come MMP-1, MMP-3, IL-1, IL-6 e TNF-alpha. Diversamente il PRP a basso contenuto di leucociti risulta essere in grado di sopprimere tali geni, incrementando COLII e AGN, a favore quindi della sintesi di matrice.

Nello stesso anno Hondke et al.<sup>46</sup> hanno messo in luce gli effetti del PRP su cellule umane dell'anello fibroso con degenerazione in fase precoce e su cellule con degenerazione avanzata; il PRP ha stimolato entrambi i tipi cellulari promuovendo la migrazione e la proliferazione cellulare e la sintesi di matrice extracellulare. Si è riscontrata tuttavia una maggior risposta sulle cellule con degenerazione in fase iniziale, suggerendo una maggior efficacia di un eventuale trattamento preventivo su dischi con degenerazione in fase precoce.

Un recentissimo studio ha analizzato le maggiori capacità stimolanti, che il PRP possiede, se questo viene legato chimicamente all'alginato, formando una struttura che permette di trattenere le proteine bioattive del PRP per un tempo più prolungato<sup>47</sup>.

In vitro quindi risulta ampiamente dimostrato, come il Platelet-Rich-Plasma sia in grado di stimolare la migrazione e la proliferazione cellulare con un aumento della sintesi di matrice extracellulare. Assieme alle proprietà anaboliche delle proteine bioattive del PRP, è stata evidenziata anche un'importante azione

antinfiammatoria, che nel disco degenerato contribuirebbe ad arrestare in maggior misura i processi catabolici responsabili della degenerazione. I risultati sono dunque molto promettenti e offrono le basi idonee per poter condurre studi in vivo.

### **III.4.c. Studi in vivo su modelli animali**

Molti dei risultati ottenuti in vitro sono stati confermati da studi effettuati in vivo su modelli animali; la maggior parte di questi studi è stata condotta su coniglio, maiale e topo. Alcuni studi hanno previsto l'utilizzo di PRP associato in alcuni casi ad agenti inibitori, per esaminare meglio le vie di segnalazione adottate dal PRP nel ritardare la degenerazione del disco intervertebrale, o carriers, con lo scopo di veicolare meglio le molecole rilasciate dal PRP e di determinare quelli che sono i limiti e i metodi per ottimizzare tale trattamento.

Tuttavia, è da riportare, che molti degli studi effettuati sia in vitro che in vivo, seppur con ottimi risultati, non offrono dettagli esatti sulle modalità di attivazione del PRP e sulle concentrazioni utilizzate, impedendo dunque di fissare un protocollo preciso in base ai diversi risultati ottenuti nei vari esperimenti.

Nel 2009 Chen et al.<sup>48</sup>, due mesi dopo l'iniezione di PRP nel disco intervertebrale nel suino, hanno trovato un incremento dell'espressione di mRNA per collagene di tipo II e aggregano, un aumento dell'altezza del disco (DHI-disc height index) e il differenziamento delle cellule staminali mesenchimali nel modello suino di disco con degenerazione indotta dalla chimopapaina, noto enzima proteolitico.

Tre anni dopo anche Obata et al.<sup>49</sup> hanno ottenuto analoghi risultati sul disco intervertebrale degenerato di coniglio, con un incremento dell'indice di altezza del disco (DHI) studiato con tecniche di imaging, riscontrando però uno scarso segnale in T2 della risonanza magnetica<sup>49</sup>.

Wang et al.<sup>50</sup> hanno effettuato uno studio che prevedeva l'iniezione di PRP assieme a cellule staminali mesenchimali derivanti dal midollo osseo (BMSCs) nell'anello fibroso del disco intervertebrale di coniglio; nello studio erano presenti due gruppi a seconda del trattamento ricevuto: uno con il solo PRP e l'altro con il PRP+BMSCs. Complessivamente sono stati ottenuti buoni risultati in entrambi

i gruppi in termini di intensità di segnale in T2, matrice extracellulare e densità cellulare. Inoltre le analisi immunohistochimiche dei campioni recuperati hanno mostrato una forte positività alla colorazione per COLII. A 2 settimane dall'iniezione i risultati dei due diversi gruppi erano sovrapponibili, mentre a 8 settimane il trattamento con il solo PRP diminuiva di efficacia, suggerendo una possibile interazione benefica tra PRP attivato e cellule staminali mesenchimali. Nel 2016 Hou et al.<sup>51</sup> hanno valutato l'effetto biologico della proteina morfogenetica dell'osso 2 (BMP2) nel differenziamento delle cellule staminali mesenchimali di midollo osseo (BMSCs) in cellule condrocito-simili associato a un gel di PRP. Lo studio è stato condotto prima in vitro e poi su modello di disco degenerato di coniglio, in cui si è riscontrata un'inibizione del processo degenerativo, con incremento della produzione di matrice extracellulare all'interno del nucleo polposo.

I risultati ottenuti con gli studi in vivo dimostrano che il PRP possiede notevoli capacità di arresto della degenerazione nel disco intervertebrale del topo, del coniglio e del suino, confermando le buone prospettive create dagli studi in vitro.

#### **III.4.d. Studi clinici sull'impiego del PRP nel trattamento del dolore lombare**

La somministrazione del PRP viene effettuata in diversi modi, comprendendo iniezioni direttamente all'interno del disco oppure iniezioni nelle strutture limitrofe ad esso, come a livello delle faccette articolari, delle strutture muscolari ed epidurali. Per tale motivo la revisione degli studi clinici viene suddivisa in studi condotti mediante iniezioni intradiscali e studi effettuati con iniezioni di altro tipo.

#### **Iniezioni intradiscali nel trattamento del dolore lombare**

Molti sono gli studi che riguardano le iniezioni intradiscali per il trattamento del dolore lombare; di seguito verranno riportati e analizzati i risultati degli studi principali.

Il primo studio clinico prospettico, che riguarda la sicurezza e l'efficacia del trattamento con iniezioni intradiscali di PRP nel dolore lombare è stato condotto nel 2011 da Akeda et al.<sup>52</sup>. In questo studio è stato utilizzato PRP, preparato da un centro di sangue locale e attivato con del siero autologo e cloruro di calcio, somministrato a sei pazienti affetti da dolore lombare cronico con durata superiore a 3 mesi. I risultati dello studio mostrano che gli score del dolore (VAS e Roland Morris Disability Questionnaire-RDQ) precedenti al trattamento sono notevolmente diminuiti dopo 1 mese dall'iniezione e si sono mantenuti buoni fino a 6 mesi. Tuttavia non è stato rilevato alcun cambiamento significativo dei valori T2 alla risonanza magnetica.

Nel 2014 Bodor et al.<sup>53</sup> hanno condotto uno studio su 47 pazienti, a cui è stato somministrato a livello intradiscale il PRP su dischi lombari o toracici. Nello studio è stato utilizzato PRP senza leucociti o eritrociti, preparato usando un kit commerciale (Cascade Autologus Platelet System; ConMed Linvatec; MTF biologics, Edison, NJ, USA) e senza l'impiego di attivatori come CaCl<sub>2</sub> o trombina. Due terzi dei pazienti hanno riportato risultati positivi alle scale numeriche del dolore (NRS) e al Oswestry Disability Index (ODI). In questo studio la maggior parte dei pazienti ha mostrato un miglioramento della lombalgia dalla prima settimana fino a 2 mesi, anche se il resoconto manca di dettagli riguardanti il loro outcome clinico.

Navani et al.<sup>54</sup>, in uno studio simile al precedente, hanno esaminato gli effetti dell'iniezione intradiscale di PRP su 6 pazienti. In tutti i pazienti è stata riscontrata una diminuzione del 50% delle scale verbali del dolore (VPS) e un miglioramento dei punteggi fisici e mentali al questionario sullo stato di salute (SF-36). Tali risultati sono stati raccolti a 3 e a 6 mesi dal trattamento.

Nel 2016 Levi et al.<sup>55</sup> hanno riportato i risultati di uno studio prospettico di 22 pazienti affetti da dolore lombare discogenico e trattati con PRP. Il PRP è stato preparato usando un sistema di preparazione Smartprep (Harvest, MA, USA), che forma PRP ricco di leucociti (L-PRP). A 6 mesi di follow-up il 47% ha ottenuto buoni risultati clinici rappresentati da un miglioramento del 50% alla VAS e un 30% di miglioramento all'indice ODI. Precedentemente al trattamento con PRP, ai pazienti è stata effettuata un'iniezione di mezzo di contrasto contenente gentamicina e lidocaina, con lo scopo di confermare la posizione dell'ago, di

effettuare profilassi per il dolore ed evitare un'eventuale discite post-iniezione. L'uso di queste sostanze rimane tuttavia controverso.

Tuakli-Wosornu et al.<sup>56</sup>, per la prima volta nel 2016, hanno condotto uno studio a doppio cieco, randomizzato e controllato, in cui i pazienti sono stati divisi in due gruppi: un gruppo trattato con PRP e l'altro tenuto come controllo (senza ricevere il PRP), rispettivamente in rapporto di 2:1. In questo studio il PRP è stato preparato usando un kit commerciale (Harvest) e per quanto riguarda la sua attivazione non vengono forniti dati. A 8 settimane di follow-up il gruppo trattato, rispetto al gruppo controllo, ha ottenuto notevoli miglioramenti nella scala NRS, negli indici funzionali (functional rating index-FRI) e al questionario della North America Spine Society (NASS). 15 pazienti su 27 trattati con PRP erano complessivamente soddisfatti del trattamento mentre nel gruppo di controllo solo 3 su 17 lo erano. Gli effetti benefici del PRP valutati mediante NRS, FRI ed SF-36 sono perdurati per 2 anni.

Akeda et al.<sup>57</sup> nel 2017 effettuano un secondo trial prospettico con 14 pazienti, ai quali viene iniettato un PRP ottenuto con il metodo "buffy coat" (BC); tale metodo consente di ottenere un PRP a basso contenuto di leucociti e di citochine infiammatorie. In questo caso il metodo di attivazione del PRP risulta essere cloruro di calcio e siero autologo. Il rilasciato del gel ottenuto dopo l'attivazione del PRP è stato centrifugato e iniettato nel disco dei pazienti.

A un mese dall'iniezione in più del 70% dei pazienti si è riscontrata una netta diminuzione del dolore, che si è mantenuta per tutto il periodo di osservazione; solo in due casi c'è stato un ritorno a valori alti del VAS score e in uno dell'RDQ score. Nessuno dei 14 pazienti ha evidenziato eventi avversi correlati al trattamento.

Tutti questi studi forniscono risultati per un periodo massimo di follow-up di 2 anni senza fornire dati a lungo termine.

Cheng et al.<sup>58</sup>, in un recentissimo studio (2019), analizzano per la prima volta l'efficacia a lungo termine dell'iniezione intradiscale di PRP in pazienti con degenerazione del disco sintomatica. Lo studio comprende un follow-up di 5-9 anni in pazienti randomizzati in un precedente studio, che avevano ricevuto un trattamento con PRP ricco di leucociti e preparato con una centrifuga Harvest. Dei 29 pazienti totali soltanto 21 hanno accettato di completare il follow-up e 19

lo hanno effettivamente portato a termine. L'età media dei pazienti al momento dell'iniezione era 41.1 anni e quasi la metà di essi ha ricevuto iniezioni multiple. In tutti i pazienti è stato evidenziato un miglioramento clinicamente significativo dell'outcome funzionale e del dolore. Circa il 75% di essi sono stati classificati come un successo e un terzo dei pazienti, che ha dovuto subire un intervento chirurgico, sostiene che il PRP abbia ritardato l'intervento. Lo studio non ha evidenziato alcuna correlazione tra il successo della terapia e l'età dei pazienti o le multiple iniezioni. L'efficacia del trattamento è stata documentata con l'impiego delle scale NRS, FRI ed SF-36 a distanza di 5-9 anni con un periodo medio di 6.57 anni.

Nonostante i buoni risultati ottenuti da Chen et al., lo studio non è privo di limiti:

1. sono stati inclusi nel follow-up solo i pazienti che hanno ricevuto il trattamento con il PRP senza includere il gruppo di controllo;
2. il numero di pazienti è ristretto, offrendo una ridotta gamma di risultati;
3. non tutti i pazienti inclusi nello studio hanno completato il follow-up;
4. non è stato accertato se i pazienti avessero beneficiato del solo trattamento di PRP o di altri trattamenti come la terapia fisica o agopunture.

Nel complesso l'iniezione intradiscale si è rivelata una procedura relativamente sicura, ma non completamente scevra di complicanze; nel 2019 Beatty et al.<sup>59</sup> hanno riportato un interessante caso clinico di una donna quarantaquattrenne con una storia di lombalgia cronica, la quale, successivamente ad un'iniezione di PRP guidata fluoroscopicamente, ha sviluppato un peggioramento progressivo del dolore lombare con segni evidenti di spondilodiscite agli esami di imaging. A seguito di un'aspirazione TC-guidata con biopsia, è stato isolato il batterio *Cutibacterium acnes* e la paziente è stata trattata subito con terapia antibiotica endovena. Il *Cutibacterium acnes* è un batterio anaerobico Gram-positivo appartenente alla normale flora della cute, del cavo orale, della congiuntiva, dei condotti uditivi e del tratto intestinale; esso è spesso coinvolto nella patogenesi di infezioni alle ossa e alle articolazioni.

Questo singolo caso ci mostra come vi sia il bisogno di comprendere meglio le possibili complicanze connesse alle iniezioni intradiscali, soprattutto nel caso in cui questo tipo di trattamento dovesse prendere campo nella terapia della degenerazione del disco. Servono, inoltre, studi addizionali per comprendere se

le diverse tipologie di PRP possano offrire maggior protezione dalle infezioni post-iniezione determinate dal *C. acnes*.

Altri studi potranno concentrarsi sull'efficacia di un'eventuale aggiunta di antibiotici per via endovenosa o direttamente nell'iniezione all'interno del disco.

Proprio su questo punto si è soffermato un recentissimo studio in vitro, in cui è stata dimostrata una correlazione diretta tra il numero di leucociti presenti nel PRP addizionato con cefazolina e la vitalità batterica del *Cutibacterium acnes*. È stato notato che un aumento dei leucociti nel plasma ricco di piastrine, combinato eventualmente con cefazolina, sia in grado di contrastare notevolmente l'attività di questo patogeno, offrendo buone prospettive per un trattamento a base di PRP associato a questi agenti come profilassi per la spondilodiscite infettiva<sup>60</sup>.

## **Altre tipologie di iniezione nel trattamento del dolore lombare**

Nel 2016 Wu et al.<sup>61</sup> hanno condotto uno studio prospettico per sperimentare l'impiego di iniezioni di PRP intrarticolari, a livello delle faccette vertebrali, in pazienti con la sindrome delle faccette articolari lombari. In questo studio è stato mostrato come durante i 3 mesi di follow-up i pazienti abbiano riscontrato un miglioramento nei punteggi VAS, RDQ e ODI.

Un anno dopo gli stessi autori hanno riportato i risultati di uno studio controllato e randomizzato per confrontare l'efficacia del PRP con quella di un corticosteroide (betametasone). Si è notato che, dalla prima settimana al primo mese di follow-up, il gruppo trattato con betametasone ha ottenuto risultati migliori del gruppo iniettato con PRP. Al contrario, dopo 6 mesi si è visto un netto miglioramento degli score VAS, RDQ e ODI nei pazienti trattati con il plasma ricco di piastrine rispetto a quelli trattati con il corticosteroide<sup>62</sup>.

In un altro studio Bhatia e Chopra<sup>63</sup> hanno effettuato iniezioni epidurali di PRP autologo in pazienti affetti da erniazioni o prolapsi del disco a livello lombare, con lombalgia della durata superiore a 4 mesi e positività al segno di Lasegue. Successivamente alle iniezioni i pazienti hanno riscontrato un graduale

miglioramento degli score VAS, Modified Oswestry Disability Questionnaire (MODQ) e del segno di Lasegue.

Hussein e Hussein<sup>64</sup> hanno dimostrato che i pazienti con dolore lombare cronico associato ad atrofia del muscolo multifido e a degenerazione monosegmentale del disco possono beneficiare di iniezioni settimanali (per 6 settimane) intramuscolari di PRP. I pazienti sono stati inseriti in un follow-up di 24 mesi, mostrando notevoli miglioramenti degli score VAS e ODI a 12 mesi con un mantenimento fino a 24 mesi.

Infine, nel 2017 Cameron e Thielen<sup>65</sup> hanno dimostrato che, iniettando il PRP in maniera circonferenziale e sottofasciale a livello delle masse laterali, delle faccette articolari e di altre aree attorno al rachide posteriore, si è ottenuto un miglioramento del 75% circa allo score VAS in un 68% dei pazienti.

Alla luce dei risultati presenti in letteratura riguardanti studi in vivo e in vitro, e le traslazioni dell'utilizzo di PRP in clinica, possiamo affermare come l'utilizzo di PRP possa rappresentare una buona strada da percorrere per recuperare o almeno ritardare i casi di discopatia degenerativa.

Naturalmente molti dati sono preliminari e necessitano di ulteriori conferme e approfondimenti, al fine di consolidare l'impiego di PRP in clinica per il trattamento della degenerazione del disco intervertebrale così come è accaduto per altri tipi di patologie.

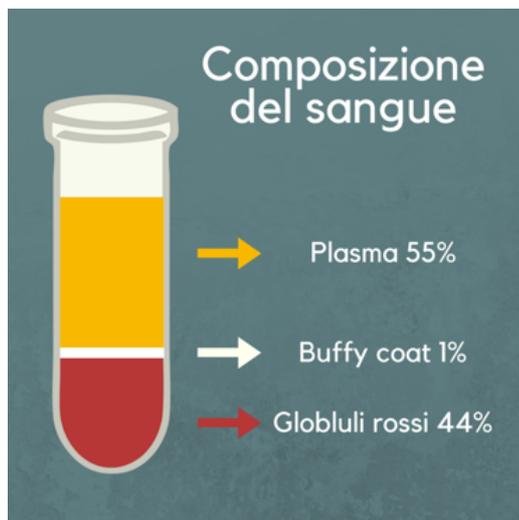
## IV. MATERIALI E METODI

### IV.1. Preparazione dei derivati piastrinici umani

I derivati piastrinici vengono prodotti a partire da campioni di Buffy Coats, ottenuti da sacche di sangue intero di donatori sani, fornite dal centro trasfusionale dell'Ospedale Policlinico San Martino di Genova. Tutte le procedure di preparazione vengono eseguite in un sistema di sacche chiuso per garantire la sterilità dei prodotti finali. Le preparazioni di Buffy Coats derivano dalla connessione sterile di 5-11 sacche non più utilizzabili per scopi trasfusionali, così da ridurre al minimo la variabilità che esiste tra i diversi donatori.

Le sacche vengono centrifugate a bassa velocità e a temperatura ambiente, ottenendo 3 frazioni:

- Plasma nella parte superiore
- Buffy Coat nella parte intermedia
- Globuli Rossi nella parte inferiore



Le prime due fasi vengono recuperate e viene eseguito un emocromo su un piccolo volume di PRP (Plasma e Buffy Coat), Con lo scopo di contare il numero

delle piastrine, che solitamente non supera i  $10^6$  piastrine su  $\mu\text{L}$ , Mediante l'utilizzo di un apposito contatore elettronico.

Viene poi effettuata una centrifugazione ad alta velocità per 20 minuti, la quale permette alle piastrine di sedimentare. Da tale centrifugazione si ottengono una fase superiore, costituita da plasma povero di piastrine (PPP) e il pellet formato dalle piastrine. Il PPP viene trasferito in un'altra sacca e centrifugato in modo da eliminare i possibili detriti e i residui di cellule rimasti.

Il pellet piastrinico ottenuto viene risospeso utilizzando il PPP in modo da ottenere una concentrazione standard di  $10^6$  piastrine su  $\mu\text{L}$ .

Differenti preparazioni buffy coats vengono lavorate per ottenere preparati di PRP standard di diversa provenienza, i quali vengono poi uniti in modo da ottenere un prodotto che deriva da un pool di circa 400 donatori. La scelta di unire un elevato numero di buffy coat di donatori differenti permette di ridurre al minimo la biodiversità molecolare che possiedono i vari donatori. Le sacche di PRP e PPP vengono quindi congelate e conservate a  $-20^\circ\text{C}$  fino al loro utilizzo.

Per formare il lisato piastrinico (PL) si sottopone il PRP, derivato dalle precedenti preparazioni, a 3 cicli successivi di congelamento a  $-20^\circ\text{C}$  e scongelamento a  $+37^\circ\text{C}$ , ottenendo così la rottura delle membrane piastriniche e il rilascio del contenuto piastrinico, che viene poi centrifugato al fine di rimuovere membrane e detriti cellulari e ottenere un sovrinatante rappresentato appunto dal PL.

## **IV.2. Isolamento cellulare dal campione di disco intervertebrale degenerato**

Le cellule di nucleo polposo utilizzate in questo lavoro derivano da campioni di disco intervertebrale degenerato appartenenti a pazienti, che sottoposti a discectomia, a causa di una discopatia degenerativa a livello lombare. I campioni, che rappresentano materiale di scarto da smaltire, sono donati alla ricerca previa sottoscrizione, da parte dei pazienti, di un consenso informato approvato dal comitato etico dell'Ospedale Policlinico San Martino.

Una volta ricevuto il campione di disco intervertebrale questo può essere sottoposto a due differenti manipolazioni al fine di ottenere le cellule da esso: il primo prevede l'isolamento di cellule di nucleo polposo mediante l'impiego di enzimi (NPd), che degradano la matrice extracellulare, mentre il secondo metodo prevede l'immissione diretta di un frammento del campione in piastra, senza nessun tipo di manipolazione, ottenendo cellule di nucleo polposo che fuoriescono spontaneamente dal frammento (NPwd), senza dover impiegare nessun tipo di digestione enzimatica.

L'ottenimento di cellule utilizzando la digestione, per prima cosa si prevede la frammentazione manuale del campione; questo viene posto in un tubo falcon e lasciato digerire in tripsina per 30 minuti a 37°C. Trascorso questo tempo viene rimossa la tripsina dal tessuto digerito e quest'ultimo viene posto in digestione O.N. (over night) con collagenasi II (75% in PBS Ca<sup>2+</sup> Mg<sup>+</sup>) a 37°C in agitazione. La collagenasi viene aggiunta in proporzione 1:8 rispetto al campione. Il giorno seguente il campione digerito viene sottoposto a centrifugazione al termine della quale si distinguono due fasi, una liquida superiore, che verrà scartata, e una compatta inferiore (pellet) che conterrà la componente cellulare. Le cellule sono risospese in un piccolo volume di mezzo di coltura e sono pronte per la piastratura.

Nel caso in cui non venga effettuata nessun tipo di digestione enzimatica, il campione di disco viene frammentato manualmente e i frammenti vengono messi direttamente in piastra.

Dopo circa 10 giorni si otterranno cellule fuoriuscite spontaneamente dal frammento.

Il metodo principalmente utilizzato in questo studio non comprende alcun tipo di digestione enzimatica: Il campione di nucleo polposo degenerato viene suddiviso in frammenti di circa 5x5 mm che vengono posizionati in piastre multiwell da 6 pozzetti utilizzando come mezzo base, Dulbecco's modified Eagle's medium-high glucose (DMEM-HG) addizionato con penicillina 100 U/mL, streptomicina 100 µg/mL e 2mM di glutammina.

I frammenti vengono suddivisi in due gruppi in base al tipo di supplemento a cui si è sottoposto il campione: il primo gruppo comprende frammenti di campione in terreno DMEM-HG addizionato con 10% di siero fetale bovino (FBS); il secondo gruppo costituito da frammenti posti in terreno DMEM-HG addizionato con 5% Lysate Combo, composto da 2.5% di PPP e 2.5% di PL (questo terreno verrà indicato semplicemente come PL).

I camponi sono mantenuti in incubatore alla temperatura di 37°C con aria umidificata e con 5% di anidride carbonica.

I terreni sono stati cambiati indicativamente ogni 3 giorni.

Le cellule una volta raggiunta la confluenza vengono distaccate utilizzando una soluzione di tripsina/EDTA e utilizzate per i successivi esperimenti al fine di valutare la capacità proliferativa ed effettuare la caratterizzazione fenotipica

### **IV.3. Ottenimento di cellule dalle diverse fuoriuscite**

I frammenti di disco degenerato, una volta raggiunta la confluenza dell'80% da parte delle cellule spontaneamente fuoriuscite, vengono rimossi dai pozzetti e posti in nuove piastre multiwell. Questi trasferimenti del campione sono stati effettuati per 5-7 volte successive, al fine di valutare la capacità del frammento di disco degenerato di rilasciare nuove cellule ad ogni spostamento.

Dopo aver eseguito lo spostamento dei campioni su nuove piastre, le cellule vengono distaccate utilizzando tripsina/EDTA e anch'esse utilizzate per analisi fenotipiche e di proliferazione.

### **IV.4. Procedura di distacco e conta cellulare**

La procedura di distacco delle cellule dalla piastra comprende un'iniziale aspirazione del terreno dal fondo della piastra con successivi lavaggi del

monstrato cellulare con PBS (Phosphate-uffered saline), al fine di rimuovere tutte le tracce di siero o PL contenente possibili inibitori delle proteasi. Una volta effettuato il lavaggio, è stata aggiunta una soluzione di tripsina/EDTA (disponibile commercialmente come soluzione contenente 0.05% tripsina e 0.02% EDTA) alle piastre, le quali sono state poi incubate per 5-10 minuti a 37°C. Trascorsi i minuti necessari all'azione della tripsina, le piastre sono state controllate al microscopio per valutare il distacco delle cellule.

Le cellule sono state recuperate con ripetuti lavaggi della piastra con terreno completo (FBS o PL) e sono state trasferite in tubi da centrifuga da 15 mL. A questo punto si è eseguita una centrifugazione delle cellule a 1500 r.p.m. per 10 minuti e, una volta terminata, è stato rimosso il surnatante mediante aspirazione. Il pellet è stato invece risospeso in terreno e, dopo aver contato le cellule con camera di Burker. La camera è costituita da un vetro in cui è ricavata una camera capillare; la parte superiore della camera è costituita da un vetrino bloccato lateralmente. Dopo aver trasferito una parte della sospensione nella camera, le cellule all'interno dei quadrati sono state contate al microscopio ottico.

Una volta determinato il quantitativo di cellule ottenuto, le cellule sono state piastrate in Petri con differenti densità in base alla successiva analisi da effettuare.

#### **IV.5. Valutazione della capacità proliferativa: cell doublings**

La capacità proliferativa delle cellule di nucleo polposo derivate dai frammenti di disco degenerato è stata esaminata tramite il test doubling.

Il test prevede la piastratura di 100.000 cellule per ogni piastra di Petri da 6 cm di diametro.

Le condizioni utiizzate per la valutazione sono state:

-10% FBS

-5% PL.

Per ogni condizione sono state fatte due piastre. Il terreno è stato cambiato 2 volte a settimana e, una volta che le cellule hanno raggiunto la confluenza cellulare dell'80%, sono state distaccate e contate.

Dopo averle contate, sono state ripiastrate, sempre con una densità di 100.000 cellule per piastra, nei rispettivi terreni (PL e FBS).

Per il conteggio dei doubling effettuati per giorno dalle cellule, è stata adottata la seguente formula:

Doublings per giorno =  $[\text{Log}_2(\text{n}^\circ \text{ cellule contate} / \text{n}^\circ \text{ cellule piastrate})] / \text{n}^\circ \text{ di giorni trascorsi dalla piastratura al distacco.}$

## **IV.6. Analisi delle caratteristiche fenotipiche: analisi citofluorimetrica**

L'analisi al FACS (flow cytometry analysis) permette di effettuare una caratterizzazione immunofenotipica delle cellule.

Per questa analisi sono stati scelti anticorpi umani coniugati con fluorescina isotiocianato (FITC) e ficoeritrina (PE).

Gli anticorpi utilizzati sono stati i seguenti: CD34, CD44, CD73, CD90, CD105 in accordo con gli standard proposti dalla International Society For Cellular Therapy (ISCT).

Per l'analisi sono state utilizzate 100.000 cellule per ogni analisi, che sono state poste in appositi tubi e centrifugate. Grazie alla presenza di due coloranti, con i quali gli anticorpi sono coniugati, abbiamo potuto effettuare delle colorazioni in doppio, quindi per ogni 100.000 cellule abbiamo incubato due differenti anticorpi. Le cellule ibridate sono state incubate al buio per 20 minuti a temperatura ambiente (RT).

Successivamente è stato eseguito un lavaggio in PBS e una ulteriore centrifuga al fine di rimuovere l'eccesso di anticorpo.

Il pellet di cellule marcate viene risospeso in 0.5 mL di PBS e sottoposto ad analisi citofluorimetrica.

## V. RISULTATI

### V.1. Valutazione della proliferazione di cellule NPwd in PL ed FBS

La capacità proliferativa delle cellule di nucleo polposo (NPwd) è stata effettuata andando a valutare mediante un test che calcola il numero di duplicazioni cellulari effettuate nel tempo (cell doublings/time). La valutazione è stata effettuata mettendo a confronto le capacità proliferative delle cellule ottenute in terreno supplementato con PL rispetto a quello addizionato di FBS.

Come riportato in Figura 1 i risultati ottenuti mostrano come il tempo di duplicazione nelle due condizioni sia statisticamente differente tra le due tipologie di trattamento. La condizione in PL porta ad un maggiore ottenimento di cellule rispetto alla condizione in FBS. Infatti, le cellule trattate con FBS non sempre riuscivano a raggiungere il time point finale dell'esperimento, che prevede un trattamento di 40 giorni, ma arrestavano preventivamente il loro ciclo portando ad ottenere un numero di cellule uguale o addirittura inferiore rispetto a quelle piastrate.

Fig.1

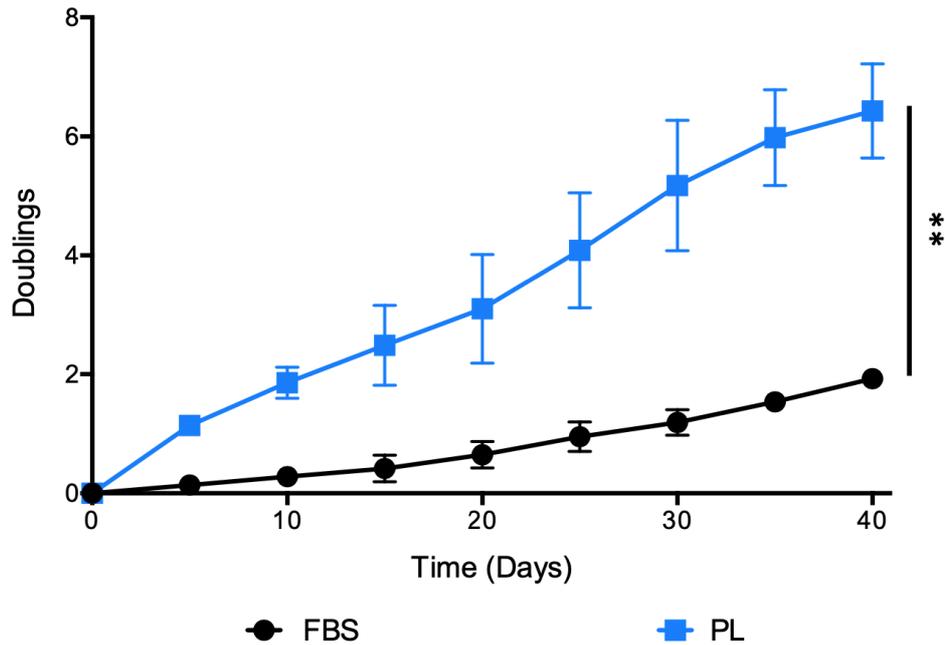


Fig.1: Curva di proliferazione di cellule di nucleo polposo espanso in PL ed FBS

## V.2. Caratterizzazione delle cellule NPwd

Successivamente alla valutazione delle capacità proliferative delle cellule è stata effettuata un'analisi citofluorimetrica (FACS) per valutare se il trattamento con il PL potesse modificare le caratteristiche immunofenotipiche delle cellule.

I marcatori utilizzati per quest'analisi sono CD34, CD44, CD73, CD90 e CD105; sono marcatori tipici impiegati per caratterizzare le cellule staminali mesenchimali derivate da tessuti adulti come ad esempio il midollo osseo o il tessuto adiposo (BM-MSC, AD-MSC).

In figura 2 viene mostrato il risultato delle analisi che mostrano come le cellule in entrambe le condizioni presentino una negatività per quanto riguarda il CD34, marcatore espresso sui tessuti ematopoietici precoci e sul tessuto associato a

vasi, e una positività per i marcatori CD44, CD73, CD90 e CD105, tipici delle cellule staminali mesenchimali.

Fig.2

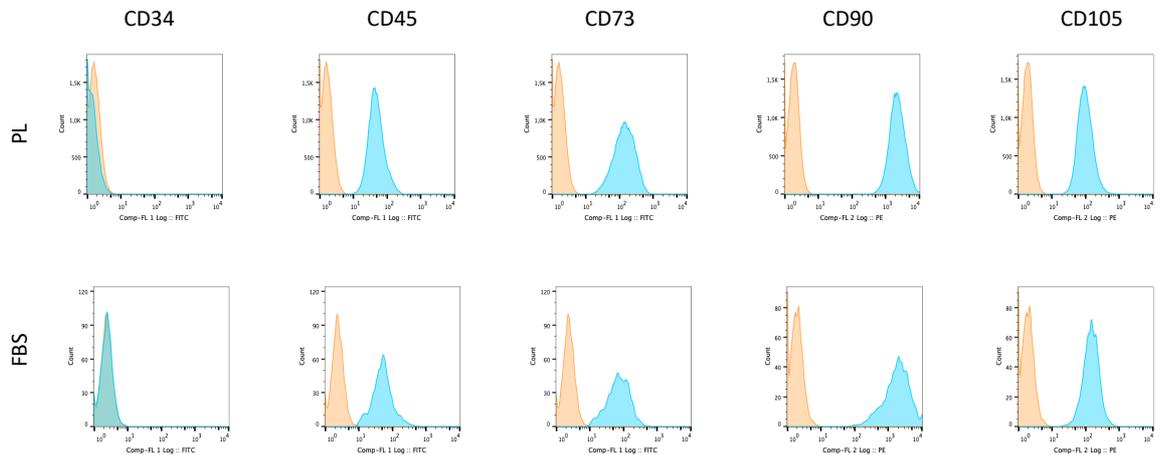


Fig. 2: risultato dell'analisi citofluorimetrica

Inoltre questo risultato dimostra che il PL non va a modificare le caratteristiche delle nostre cellule rispetto al trattamento in FBS.

### V.3. Confronto in termini di capacità proliferativa tra cellule derivate dallo stesso frammento (NPwd) nelle diverse fuoriuscite

Alla luce dei risultati dei precedenti esperimenti abbiamo deciso di effettuare questa analisi utilizzando solamente cellule in PL, dato il mantenimento dell'espressione dei marker superficiali e il maggior numero di cellule ottenibili.

Come precedentemente descritto ogni singolo frammento di disco degenerato, una volta posto in piastra, ha portato alla fuoriuscita di cellule. Una volta raggiunta

la confluenza dell'80%, le cellule sono state distaccate e il frammento è stato posto in una nuova piastra. Questo spostamento permetteva di ottenere nuovamente delle cellule.

Mettendo a confronto le curve di proliferazione delle cellule ottenute dalle diverse fuoriuscite (Figura 3), si può evincere che la capacità proliferativa delle cellule ottenute dalle diverse fuoriuscite rimane costante, senza mostrare differenze statisticamente significative tra le tre differenti curve.

Fig.3

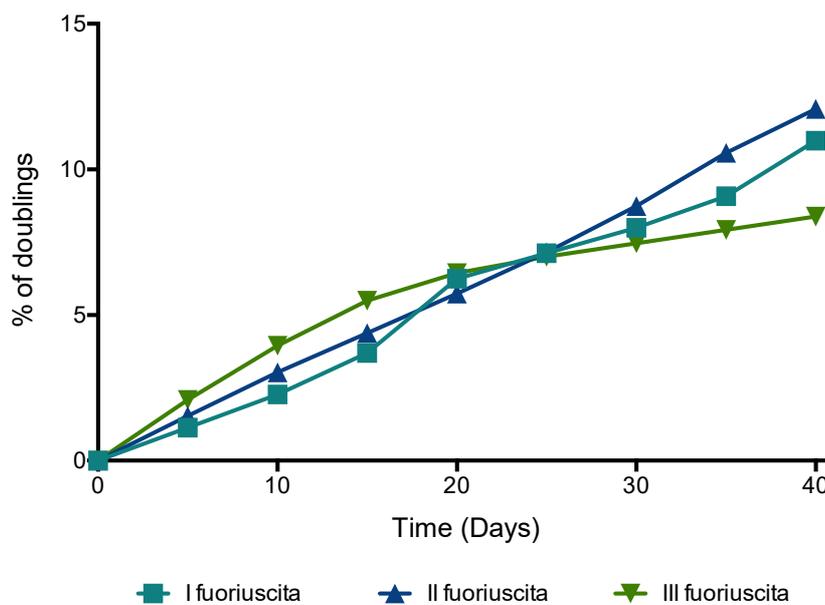


Fig. 3: confronto di curve proliferative di differenti cellule ottenute da differenti fuoriuscite

## V.4. Analisi citofluorimetrica di confronto di cellule ottenute nelle diverse fuoriuscite

Ad ogni nuova fuoriuscita di cellule dal campione è stata effettuata la loro caratterizzazione immunofenotipica.

Anche per quanto riguarda queste cellule possiamo confermare il dato ottenuto precedentemente (Figura 2). Le cellule ottenute dalle diverse fuoriuscite mantengono le stesse caratteristiche fenotipiche in termini di marcatori di superficie (Figura 4).

Fig.4

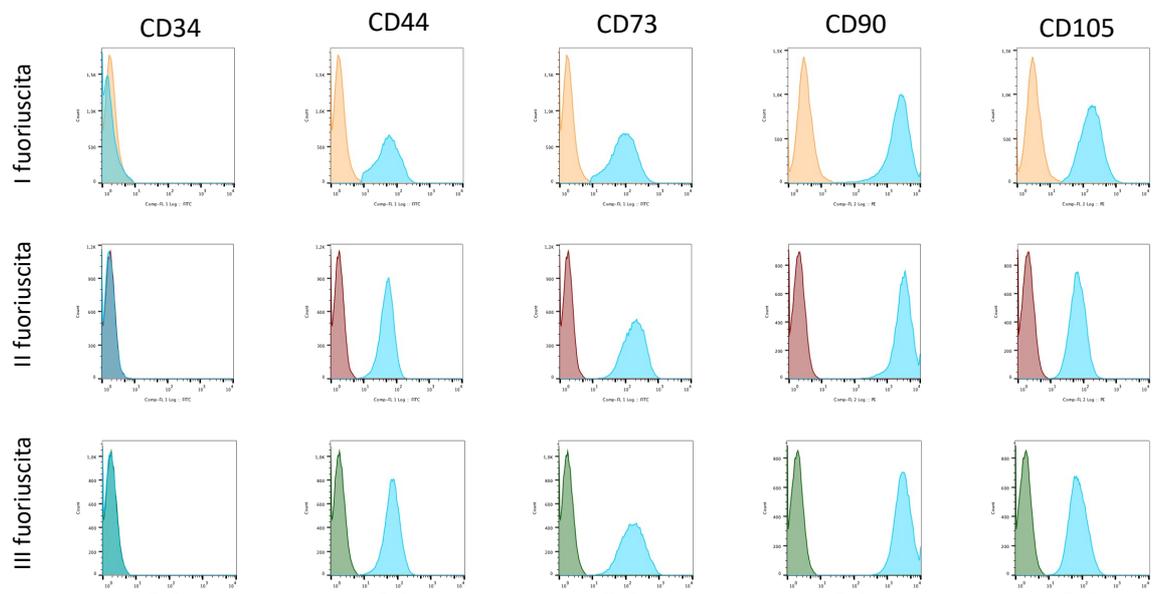


Fig. 4: Confronto citofluorimetrico delle cellule derivanti da diverse fuoriuscite.

Questo risultato insieme al precedente riguardante il mantenimento delle capacità proliferative, ci permette di affermare con certezza che le cellule ottenute dalle differenti fuoriuscite risultano essere le stesse cellule ogni volta, dimostrando come il pezzettino, coltivato in PL, riesca a continuare a far fuoriuscire sempre la stessa tipologia di cellule per un lungo periodo.

## V.5. Confronto tra la proliferazione tra NPwd e NPd

Una volta effettuata una approfondita analisi delle cellule ottenute dalla fuoriuscita spontanea di queste dal pezzettino, è stato fatto un confronto in termini di proliferazione con dati precedentemente ottenuti presso il Laboratorio di Bioterapie della Prof.ssa Mastrogiacomo. I dati precedenti mostravano come cellule ottenute mediante l'impiego di una digestione enzimatica (NPd), applicata al frammento di disco fossero in grado di proliferare maggiormente in presenza di PL, rispetto alla condizione standard in FBS.

Dal confronto emerge che, su entrambi i gruppi di cellule stimulate con PL, le proliferazioni ottenute risultino essere sovrapponibili (Figura 5); la velocità di proliferazione delle cellule rimane dunque invariata. Questo risultato mostra come non vi sia alcuna influenza, da parte del metodo con cui si ottengono le cellule, sulla capacità proliferativa. Anche per le cellule coltivate in FBS sono stati ottenuti i medesimi risultati, ma anche per le cellule ottenute tramite digestione enzimatica, le rese in termini di proliferazione, rimangono comunque statisticamente inferiori rispetto alle cellule ottenute tramite l'utilizzo del PL.

Fig.5

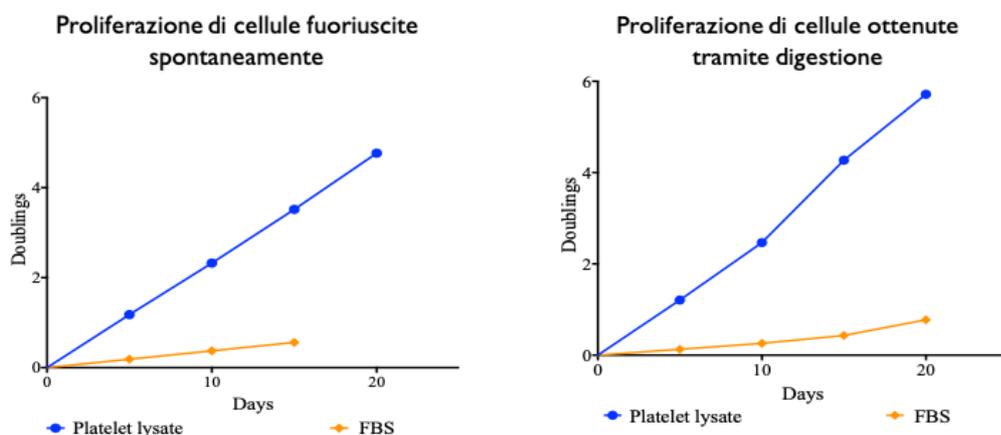


Fig. 5 Confronto di NPwd e NPd in termini di proliferazione, in PL e FBS.

## V.6. Confronto delle caratteristiche fenotipiche tra NPwd e NPd

Anche per quanto riguarda le caratteristiche fenotipiche è stata fatto un confronto, tra le cellule NPwd, ottenute per fuoriuscita spontanea e cellule NPd, ottenute con l'impiego di digestioni enzimatiche.

Anche in questo caso (Figura 6), le cellule, ottenute con i due differenti metodi, mostrano conservare i marker di superficie delle cellule staminali mesenchimali anche indipendentemente dal trattamento.

Fig.6

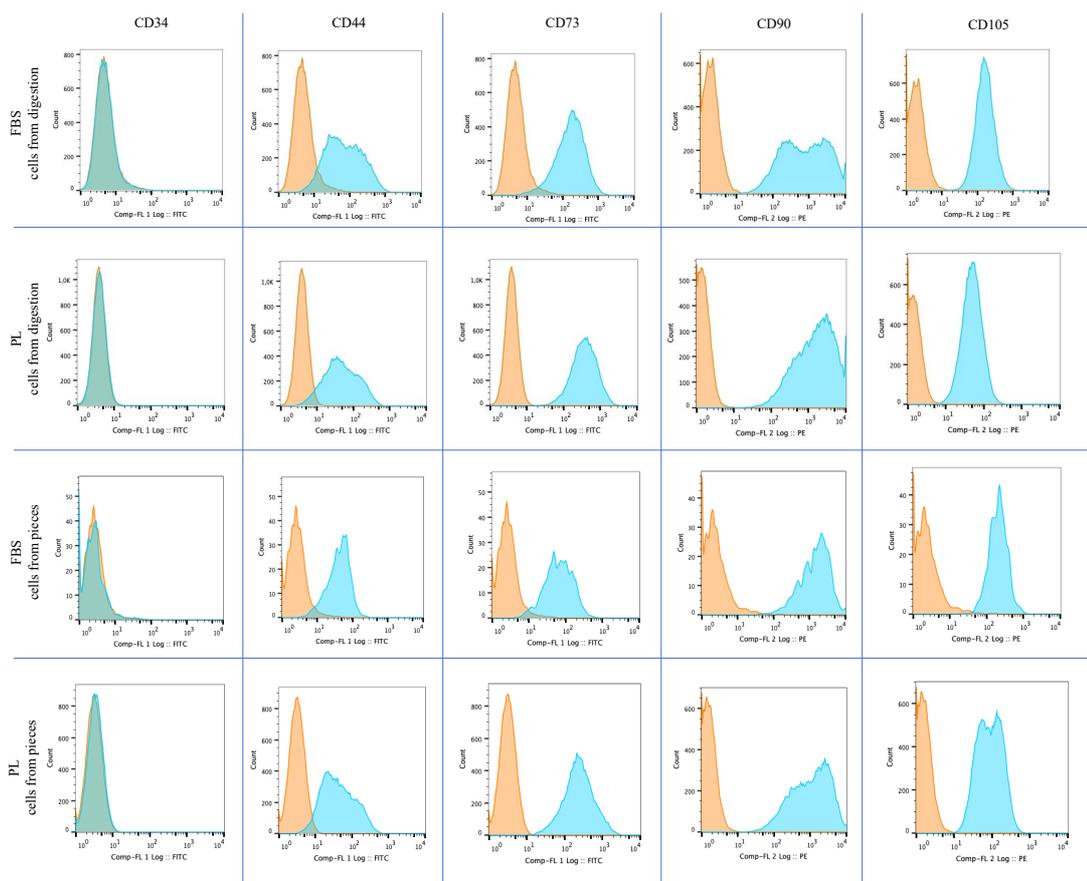


Fig. 6: Confronto fenotipico di NPwd e NPd in FBS e in PL.

## VI. DISCUSSIONE

Le proprietà meccaniche del disco intervertebrale dipendono in maniera rigorosa dalle sue caratteristiche biochimiche ed istologiche. La sua funzione è essenziale nell'assorbimento dei carichi e nel garantire una flessibilità multi-assiale alla colonna vertebrale. Con il processo degenerativo le caratteristiche biochimiche e istologiche si modificano notevolmente. Il contenuto di proteoglicani e di collagene I diminuisce assieme alla pressione osmotica esitando in una ridotta capacità di richiamare fluidi. Si assiste ad un aumento di apoptosi e necrosi cellulare con un incremento delle molecole infiammatorie e degli enzimi catabolici esitando in un aumentata degradazione della matrice extracellulare. Il nucleo polposo si disidrata notevolmente e diventa indistinguibile dall'anello fibroso sul quale compaiono fessurazioni.

A seguito di questi cambiamenti si instaurano diversi quadri clinici che vanno dall'ernia del disco alla discopatia degenerativa con conseguenze che coinvolgono le strutture adiacenti.

Allo stato attuale, il gold standard per la terapia della degenerazione del disco intervertebrale è la chirurgia di fusione vertebrale con varie tecniche. La chirurgia non preserva tuttavia la funzionalità discale, anzi è volta alla rimozione dell'organo limitando le capacità biomeccaniche della colonna vertebrale. I trattamenti conservativi, basati su terapia fisica e farmacologica, lavorano sui sintomi e non si sono mostrati capaci nell'arrestare il processo degenerativo. Pertanto, la ricerca attuale si focalizza sul tentativo di inibire la cascata degenerativa nelle fasi precoci della malattia, con lo scopo di preservare il disco e indurre la sua rigenerazione.

Il disco intervertebrale è un organo avascolare che riceve trofismo mediante un processo di diffusione a livello dei piatti cartilaginei; queste strutture, con il passare del tempo, vanno incontro ad ossificazione ostacolando sempre di più l'apporto di sangue al disco.

La medicina rigenerativa nell'ambito della discopatia degenerativa ha il fine di interrompere il processo degenerativo e indurre la rigenerazione mediante

l'impiego di cellule staminali, terapia genica e plasma ricco di piastrine (PRP) o derivati piastrinici (PL).

Il PRP è un emoconcentrato di plasma ricco di piastrine che contengono i fattori di crescita implicati nella rigenerazione tissutale. Tra i più importanti vi sono: TGF-beta, FGF, VEGF, PDGF, IGF, BMP-7.

Il PRP gode di svariati utilizzi in ambito ortopedico nelle patologie correlate allo sport che coinvolgono soprattutto i tendini, anch'essi scarsamente vascolarizzati. Altri efficaci utilizzi si sono visti nell'ambito dell'artrosi al ginocchio e anca e preliminarmente nelle lesioni dei tendini della cuffia dei rotatori.

Per quanto riguarda l'impiego del PRP nella patologia degenerativa del disco intervertebrale, come si evince dalla revisione della letteratura che è stata fatta, sono stati condotti numerosi esperimenti in vitro che ne consolidano l'efficacia e risultati preliminari si sono ottenuti anche su pazienti. Tuttavia la modalità di somministrazione (intradiscale), la mancata standardizzazione nella preparazione del PRP e nei dosaggi, non offrono una base di evidenza solida su cui impostare una terapia vera e propria.

In questo esperimento abbiamo isolato cellule di nucleo polposo (NPCsWD) da campioni di disco intervertebrale degenerato senza alcuna digestione enzimatica, mettendo frammenti dei campioni direttamente in piastre in PL ed FBS e studiandone la proliferazione e le caratteristiche fenotipiche.

Le cellule in PL presentano un tasso di proliferazione superiore rispetto alla condizione standard FBS. Le NPCsWD ottenute mediante espanto sono state analizzate con l'impiego del FACS e si è visto presentare i marcatori tipici delle cellule staminali mesenchimali.

Le NPCsWD sono state inoltre confrontate in termini di proliferazione e fenotipo con le cellule (NPCsD) isolate mediante la digestione del frammento di disco da parte di enzimi, in un precedente esperimento. I risultati riportano caratteristiche fenotipiche e di proliferazione sovrapponibili, dimostrando come lo stimolo induttivo del PL sia in grado di stimolare la fuoriuscita di cellule corrispondenti

alle staminali mesenchimali e a loro proliferazione senza nessun tipo di manipolazione del campione.

Come già accennato, i marcatori delle NPCsWD corrispondono a quelli tipici delle cellule staminali mesenchimali, fondamentali nella rigenerazione di tessuti fibro-cartilaginei. Tuttavia ulteriori analisi saranno necessarie per comprendere meglio il vero potenziale di tali cellule.

## VII. CONCLUSIONE

I risultati ottenuti in questo esperimento, seppur limitati allo studio in vitro, dimostrano che i derivati piastrinici, se messi a diretto contatto con i campioni di disco intervertebrale degenerato di pazienti sottoposti a chirurgia, sono in grado di far rilasciare cellule staminali mesenchimali e di stimolarne notevolmente la loro proliferazione. Tali cellule possono potenzialmente essere impiegate per incentivare la rigenerazione del tessuto discale.

I risultati rafforzano dunque le evidenze già presenti in letteratura e offrono buone basi su un futuro impiego in clinica, dimostrando che il disco, se stimolato con derivati piastrinici, è in grado di rilasciare cellule staminali anche senza essere manipolato con enzimi digestivi.

Per quanto riguarda i clinical trials effettuati, nonostante i buoni risultati ottenuti, ad oggi non vi è un'evidenza consistente sull'impiego benefico del PRP nella discopatia degenerativa, in quanto spesso non vi sono abbastanza studi che riportano risultati concreti sull'efficacia del trattamento nel medio e lungo termine e le modalità di somministrazione tramite iniezione intradiscale non sempre si sono rivelate sicure ed efficaci.

Il metodo utilizzato in questo esperimento per la stimolazione dei campioni di disco degenerato è un metodo valido ed efficace, che offre opportunità di utilizzo in vivo su modelli animali e su pazienti affetti da discopatia degenerativa eventualmente mediante somministrazioni che non vanno a ledere direttamente il disco, ma che concentrano il PL nelle zone limitrofe, le quali nutrono l'organo per diffusione.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Adams MA, Roughley PJ. What is intervertebral disc degeneration, and what causes it? *Spine (Phila Pa 1976)*. 2006;31(18):2151-2161.
2. Raj PP. Intervertebral Disc : Pathophysiology-Treatment. 2008;8(1):18-44.
3. Shankar H, Scarlett JA, Abram SE. Anatomy and pathophysiology of intervertebral disc disease. *Tech Reg Anesth Pain Manag*. 2009;13(2):67-75.
4. Lehmann-horn K, Sagan SA, Bernard CCA, et al. This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please c. *Laryngoscope*. 2014;(August):2-31.
5. Marchand F, Ahmed AM. Investigation of the laminate structure of lumbar disc anulus fibrosus. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1990;15(5):402-410.
6. Boos N, Weissbach S, Rohrbach H, Weiler C, Spratt KF, Nerlich AG. Classification of age-related changes in lumbar intervertebral discs: 2002 Volvo award in basic science. *Spine (Phila Pa 1976)*.
7. URBAN JPG, HOLM S, MAROUDAS A, NACHEMSON A. Nutrition of the Intervertebral Disc. *Clin Orthop Relat Res*. 1982;NA;(170)
8. Roughley PJ. Biology of intervertebral disc aging and degeneration: Involvement of the extracellular matrix. *Spine (Phila Pa 1976)*.
9. Sadowska A, Kameda T, Krupkova O, Wuertz-Kozak K. Osmosensi ng, osmosi gnalli ng and i nflammati on: How i ntervertebral di sc cells respond to altered osmolari ty. *Eur Cells Mater*. 2018;36:231-250.
10. Oxland TR. Fundamental biomechanics of the spine-What we have learned in the past 25 years and future directions. *J Biomech*. 2016;49(6):817-832.
11. Buckwalter JA. Spine update: Aging and degeneration of the human intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1995;20(11):1307-1314.
12. Le Maitre CL, Pockert A, Buttle DJ, Freemont AJ, Hoyland JA. Matrix synthesis and degradation in human intervertebral disc degeneration. *Biochem Soc Trans*. 2007;35(4)
13. Panjabi MM, Krag MH, Chung TQ. Effects of disc injury on mechanical behavior of the human spine. *Spine (Phila Pa 1976)*.
14. Dowdell J, Erwin M, Choma T, Vaccaro A, Iatridis J, Cho SK. Intervertebral

- disk degeneration and repair. *Clin Neurosurg.* 2017;80(3)
15. Nachemson AL. The lumbar spine an orthopaedic challenge. *Spine (Phila Pa 1976)*.
  16. Videman T, Sarna S, Battié MC, et al. The long-term effects of physical loading and exercise lifestyles on back-related symptoms, disability, and spinal pathology among men. *Spine (Phila Pa 1976)*.
  17. Adams DMA, Dolan P, Hutton WC. *THE JOURNAL OF BONE AND JOINT SURGERY THE STAGES OF DISC DEGENERATION AS REVEALED.*
  18. Modic MT, Steinberg PM, Ross JS, Masaryk TJ, Carter JR. Degenerative disk disease: Assessment of changes in vertebral body marrow with MR imaging. *Radiology.* 1988;166(1 I)
  19. Patino JD, Lafuente J. Degenerative spondylolisthesis. *Spine Surg A Case-Based Approach.* 2019
  20. Dahm KT, Brurberg KG, Jamtvedt G, Hagen KB. Advice to rest in bed versus advice to stay active for acute low-back pain and sciatica. *Cochrane Database Syst Rev.* Published online June 16, 2010.
  21. Radcliff K, Freedman M, Hilibrand A, et al. Does opioid pain medication use affect the outcome of patients with lumbar disc herniation? *Spine (Phila Pa 1976)*. 2013;38(14).
  22. The Impact of Epidural Steroid Injections on the Outcome of Patients Treated for Lumbar Disk Herniation: A Subgroup Analysis of the Spine Patient Outcomes Research Trial (SPORT) - Search Results - PubMed. Accessed June 16, 2020.
  23. Manchikanti L, Singh V, Pampati V, Falco FJE, Hirsch JA. Comparison of the efficacy of caudal, interlaminar, and transforaminal epidural injections in managing lumbar disc herniation: Is one method superior to the other? *Korean J Pain.* 2015;28(1):11-21.
  24. Muto M, Andreula C, Leonardi M. Treatment of herniated lumbar disc by intradiscal and intraforaminal oxygen-ozone (O2-O3) injection. *J Neuroradiol.* 2004;31(3):183-189.
  25. Brouwer PA, Brand R, Van Den Akker-Van Marle ME, et al. Percutaneous laser disc decompression versus conventional microdiscectomy in sciatica: A randomized controlled trial. *Spine J.* 2015;15(5):857-865.
  26. Nucleoplasty as a Therapeutic Option for Lumbar Disc Degeneration Related Pain: A Retrospective Study of 396 Cases - PubMed. Accessed June 16, 2020.

27. Hoffman RM, Wheeler KJ, Deyo RA. Surgery for herniated lumbar discs - A literature synthesis. *J Gen Intern Med.* 1993;8(9):487-496.
28. Mobbs RJ, Phan K, Malham G, Seex K, Rao PJ. Lumbar interbody fusion: techniques, indications and comparison of interbody fusion options including PLIF, TLIF, MI-TLIF, OLIF/ATP, LLIF and ALIF. *J spine Surg (Hong Kong).* 2015;1(1):2-18.
29. Resnick DK, Choudhri TF, Dailey AT, et al. Guidelines for the performance of fusion procedures for degenerative disease of the lumbar spine. Part 8: lumbar fusion for disc herniation and radiculopathy. *J Neurosurg Spine.* 2005;2(6):673-678.
30. Gornet MF, Burkus JK, Dryer RF, Pelozza JH, Schranck FW, Copay AG. Lumbar disc arthroplasty versus anterior lumbar interbody fusion: 5-year outcomes for patients in the Maverick disc investigational device exemption study. In: *Journal of Neurosurgery: Spine.* Vol 31. American Association of Neurological Surgeons; 2019:347-356.
31. Akeda K, Yamada J, Linn ET, Sudo A, Masuda K. Platelet-rich plasma in the management of chronic low back pain: A critical review. *J Pain Res.* 2019;12:753-767.
32. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.* 2009;27(3):158-167.
33. DeLong JM, Russell RP, Mazzocca AD. Platelet-rich plasma: The PAW classification system. *Arthrosc - J Arthrosc Relat Surg.* 2012;28(7):998-1009.
34. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost.* 2004;91(1):4-15.
35. Di Matteo B, Filardo G, Kon E, Marcacci M. Platelet-rich plasma: evidence for the treatment of patellar and Achilles tendinopathy—a systematic review. *Musculoskelet Surg.* 2015;99(1).
36. Dai WL, Zhou AG, Zhang H, Zhang J. Efficacy of Platelet-Rich Plasma in the Treatment of Knee Osteoarthritis: A Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Arthrosc - J Arthrosc Relat Surg.* 2017;33(3):659-670.e1.
37. Sánchez M, Guadilla J, Fiz N, Andia I. Ultrasound-guided platelet-rich plasma injections for the treatment of osteoarthritis of the hip. *Rheumatology.* 2012;51(1):144-150.
38. Chen X, Jones IA, Togashi R, Park C, Vangsness CT. Use of Platelet-Rich Plasma for the Improvement of Pain and Function in Rotator Cuff Tears: A

Systematic Review and Meta-analysis With Bias Assessment. *Am J Sports Med*. Published online 2019.

39. Wang S zheng, Chang Q, Lu J, Wang C. Growth factors and platelet-rich plasma: promising biological strategies for early intervertebral disc degeneration. *Int Orthop*. 2015;39(5):927-934.
40. Sakai D, Nakamura Y, Nakai T, et al. Exhaustion of nucleus pulposus progenitor cells with ageing and degeneration of the intervertebral disc. *Nat Commun*. 2012;3.
41. Chen WH, Lo WC, Lee JJ, et al. Tissue-engineered intervertebral disc and chondrogenesis using human nucleus pulposus regulated through TGF- $\beta$ 1 in platelet-rich plasma. *J Cell Physiol*. 2006;209(3):744-754.
42. Liu MC, Chen WH, Wu LC, et al. Establishment of a promising human nucleus pulposus cell line for intervertebral disc tissue engineering. *Tissue Eng - Part C Methods*. 2014;20(1):1-10.
43. Kim HJ, Yeom JS, Koh YG, et al. Anti-inflammatory effect of platelet-rich plasma on nucleus pulposus cells with response of TNF- $\alpha$  and IL-1. *J Orthop Res*. 2014;32(4):551-556.
44. Yang H, Yuan C, Wu C, et al. The role of TGF- $\beta$ 1/Smad2/3 pathway in platelet-rich plasma in retarding intervertebral disc degeneration. *J Cell Mol Med*. 2016;20(8):1542-1549.
45. Wang SZ, Fan WM, Jia J, Ma LY, Yu J Bin, Wang C. Is exclusion of leukocytes from platelet-rich plasma (PRP) a better choice for early intervertebral disc regeneration? *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1).
46. Hondke S, Cabraja M, Krüger JP, et al. Proliferation, Migration, and ECM Formation Potential of Human Annulus Fibrosus Cells Is Independent of Degeneration Status. *Cartilage*. 2020;11(2):192-202.
47. Growney EA, Linder HR, Garg K, Bledsoe JG, Sell SA. Bio-conjugation of platelet-rich plasma and alginate through carbodiimide chemistry for injectable hydrogel therapies. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2020;108(5):1972-1984.
48. Chen WH, Liu HY, Lo WC, et al. Intervertebral disc regeneration in an ex vivo culture system using mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma. *Biomaterials*. 2009;30(29):5523-5533.
49. Obata S, Akeda K, Imanishi T, et al. Effect of autologous platelet-rich plasma-releasate on intervertebral disc degeneration in the rabbit anular puncture model: A preclinical study. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(6).
50. Wang SZ, Jin JY, Guo YD, et al. Intervertebral disc regeneration using

platelet-rich plasma-containing bone marrow-derived mesenchymal stem cells: A preliminary investigation. *Mol Med Rep.* 2016;13(4):3475-3481.

51. Hou Y, Shi G, Shi J, Xu G, Guo Y, Xu P. Study design: in vitro and in vivo assessment of bone morphogenetic protein 2 combined with platelet-rich plasma on treatment of disc degeneration. *Int Orthop.* 2016;40(6):1143-1155.
52. INTRADISCAL INJECTION OF AUTOLOGOUS SERUM ISOLATED FROM PLAT...: Spine Journal Meeting Abstracts. Accessed June 22, 2020.
53. Bodor M, Toy A, Aufiero D. Disc Regeneration with Platelets and Growth Factors. In: ; 2014:265-279.
54. Navani A, Hames A. Platelet-rich plasma injections for lumbar discogenic pain: A preliminary assessment of structural and functional changes. *Tech Reg Anesth Pain Manag.* 2015;19(1-2):38-44.
55. Levi D, Horn S, Tyszko S, Levin J, Hecht-Leavitt C, Walko E. Intradiscal platelet-rich plasma injection for chronic discogenic low back pain: Preliminary results from a prospective trial. *Pain Med (United States).* 2016;17(6):1010-1022.
56. Tuakli-Wosornu YA, Terry A, Boachie-Adjei K, et al. Lumbar Intradiscal Platelet-Rich Plasma (PRP) Injections: A Prospective, Double-Blind, Randomized Controlled Study. *PM R.* 2016;8(1):1-10.
57. Akeda K, Ohishi K, Masuda K, et al. Intradiscal injection of autologous platelet-rich plasma releasate to treat discogenic low back pain: A preliminary clinical trial. *Asian Spine J.* 2017;11(3):380-389.
58. Cheng J, Santiago KA, Nguyen JT, Solomon JL, Lutz GE. Treatment of symptomatic degenerative intervertebral discs with autologous platelet-rich plasma: Follow-up at 5-9 years. *Regen Med.* 2019;14(9):831-840.
59. Beatty NR, Lutz C, Boachie-Adjei K, Leynes TA, Lutz C, Lutz G. Spondylodiscitis due to *Cutibacterium acnes* following lumbosacral intradiscal biologic therapy: A case report. *Regen Med.* 2019;14(9):823-829.
60. Prysak MH, Lutz CG, Zukofsky TA, Katz JM, Everts PA, Lutz GE. Optimizing the safety of intradiscal platelet-rich plasma: An in vitro study with *Cutibacterium acnes*. *Regen Med.* 2019;14(10):955-967.
61. Liu Q, Wu J, Du Z, et al. Prospective Evaluation A New Technique for the Treatment of Lumbar Facet Joint Syndrome Using Intra-articular Injection with Autologous Platelet Rich Plasma. *Pain Physician.* 2016;19(1):617-625.

62. Wu J, Zhou J, Liu C, et al. A Prospective Study Comparing Platelet-Rich Plasma and Local Anesthetic (LA)/Corticosteroid in Intra-Articular Injection for the Treatment of Lumbar Facet Joint Syndrome. *Pain Pract.* 2017;17(7):914-924.
63. R B, G C. Efficacy of Platelet Rich Plasma via Lumbar Epidural Route in Chronic Prolapsed Intervertebral Disc Patients-A Pilot Study. *J Clin DIAGNOSTIC Res.* 2016;10(9).
64. M H, T H. Effect of Autologous Platelet Leukocyte Rich Plasma Injections on Atrophied Lumbar Multifidus Muscle in Low Back Pain Patients With Monosegmental Degenerative Disc Disease. *SICOT-J.* 2016;2.
65. Cameron JA, Thielen KM. Autologous Platelet Rich Plasma for Neck and Lower Back Pain Secondary to Spinal Disc Herniation: Midterm Results. *Spine Res.* 2017;03(02):1-5.

# RINGRAZIAMENTI

Vorrei ringraziare in primis il Prof. Matteo Formica per avermi dato la possibilità di condurre questo lavoro su un argomento molto attuale e interessante.

Ringrazio inoltre la Prof.ssa Maddalena Mastrogiacomo per aver accettato di aiutarmi nella realizzazione di questa tesi e per avermi introdotto nel mondo della scienza, instaurando un rapporto sincero e istruttivo.

Uno speciale ringraziamento va alla Dott.ssa Marta Nardini, che con immensa disponibilità e simpatia, mi ha dedicato molto tempo in laboratorio e nella realizzazione della parte sperimentale del lavoro. Desidero ringraziare anche la Dott.ssa Irene Zotta, che si è resa disponibile in qualunque momento, dandomi consigli validi e preziosi.

Un ringraziamento molto sentito va ai miei genitori, senza i quali non sarei diventato neanche lontanamente la persona che sono, a mio fratello, a mia sorella e a mio nonno, che insieme costituiscono le gambe con cui è stato fatto questo lungo cammino.

Ringrazio inoltre la mia fidanzata, che con amore mi è sempre stata accanto, anche nei momenti più difficili.

Voglio ringraziare anche gli amici di una vita e colleghi della montagna: Cicci, Matte, Simon e tutti gli altri con cui sono cresciuto, fra chi c'è ancora e chi non c'è più.

Ringrazio anche gli amici di Genova, di Arenzano e di Pegli che, nonostante non li vedessi per lunghi periodi, hanno sempre conservato rapporti speciali, e, ovviamente, anche gli amici e futuri colleghi dell'Università di Genova.