

CASE REPORT

Utilizzo di cellule mononucleate autologhe da sangue periferico in un caso di piede diabetico

Use of autologous peripheral blood mononuclear cells in a case of diabetic foot

G. Di Vieste¹, I. Formenti¹, S. Lodigiani¹, G. Balduzzi¹, B. Masserini¹, R De Giglio¹

¹ Unità Operativa Piede Diabetico, Ospedale C. Cantù, Abbiategrasso (MI)

Corresponding author: giacoma.divieste@asst-ovestmi.it

Abstract

The implantation of peripheral blood mononuclear cells (PBMNC), an autologous concentrate with high angiogenic and regenerative capability is an innovative therapeutic approach in the treatment of peripheral arteriopathies of patients with critical limb ischemia. We describe the case of a 59-year-old patient with type 2 diabetes mellitus who had a gangrene of the right toe. The critical limb ischemia required an angioplasty that was ineffective due to the widespread, obstructive, intractable and calcific disease of the distal tibial vessels and of the foot vessels. Because of the therapeutic failure, being the patient otherwise candidate for major amputation, it was decided to use a PBMNC therapy. This approach consists in the inoculation in the perilesional area and along the vascular axes of the affected lower limb of a concentrate of mononuclear cells taken from peripheral blood by using a selective filtration separation system. The patient underwent to amputation of the first necrotic toe and three PBMNC treatment sessions with complete surgical wound healing and limb rescue.

KEYWORDS diabetes mellitus; critical limb ischemia; mononuclear cells therapy.

Riassunto

Un innovativo approccio terapeutico nel trattamento delle arteriopatie periferiche è rappresentato dall'impianto di cellule mononucleate da sangue periferico (PBMNC, Peripheral Blood MonoNuclear Cells), un concentrato cellulare autologo ad alta capacità angiogenica e rigenerativa utilizzato nel trattamento di pazienti con ischemia critica dell'arto. Descriviamo il caso di un paziente di 59 anni, affetto da diabete mellito tipo 2, giunto alla nostra osservazione per gangrena del I dito del piede destro. Il quadro di ischemia critica d'arto ha reso necessario un tentativo di angioplastica risultato tuttavia inefficace a causa della malattia diffusa, ostruttiva, intrattabile e calcifica dei vasi tibiali distali e dei vasi del piede. Visto il fallimento terapeutico, in paziente altrimenti candidato ad amputazione maggiore, si



OPEN
ACCESS



PEER-
REVIEWED

Citation G. Di Vieste, I. Formenti, S. Lodigiani, G. Balduzzi, B. Masserini, R De Giglio (2019). Utilizzo di cellule mononucleate autologhe da sangue periferico in un caso di piede diabetico. JAMD Vol. 22/4

Editor Luca Monge, Associazione Medici Diabetologi, Italy

Received September, 2019

Accepted October, 2019

Published November, 2019

Copyright © 2019 Di Vieste et al. This is an open access article edited by [AMD](#), published by [Idelson Gnocchi](#), distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding The Authors received no specific funding for this work.

Competing interest The Authors declare no competing interests.

optava per l'utilizzo di PBMNC. Tale approccio prevede l'inoculazione in sede perilesionale e lungo gli assi vascolari dell'arto inferiore interessato di un concentrato di cellule mononucleate prelevate da sangue periferico, utilizzando un sistema di separazione a filtrazione selettiva. Il paziente veniva pertanto sottoposto ad amputazione del I dito, in gangrena, del piede destro ed a tre sedute di trattamento con PBMNC con completa guarigione della ferita chirurgica e salvataggio d'arto.

PAROLE CHIAVE Diabete mellito; ischemia critica arti inferiori; terapia con cellule mononucleate.

Descrizione del caso clinico

Il Signor F.C. di 59 anni giungeva alla nostra osservazione presso l'ambulatorio del Piede Diabetico dell'Ospedale C. Cantù di Abbiategrasso (MI) in settembre 2018 per lesione ulcerativa post-traumatica al I dito del piede destro, evoluta nell'arco di 10 giorni in gangrena digitale. Il paziente, non fumatore, era affetto da diabete mellito di tipo 2 diagnosticato 11 anni addietro, da sempre in terapia con sola metformina al dosaggio di 2 gr/die e storicamente in scarso compenso glicemico (ultima emoglobina

glicata pari a 10.0% (86 mmol/mol)). Non effettuava tuttavia valutazioni diabetologiche da diversi anni. Dalla raccolta anamnestica si evinceva che il paziente era affetto da ipertensione arteriosa in terapia con sartano; i recenti esami di laboratorio evidenziavano un' insufficienza renale di grado moderato, misconosciuta. Non erano riferite altre complicanze legate al diabete. In anamnesi farmacologica si segnalava collateralmente allergia ad acido acetil salicilico.

Alla valutazione clinica si rilevavano un peso corporeo di 115 kg, BMI 38.9 kg/m², pressione arteriosa 140/85 mmHg. Al piede destro si evidenziava necrosi secca del primo dito con area umida alla base. La lesione si presentava maleodorante con lieve flogosi perilesionale. Il paziente era apiretico.

Il test con monofilamento di Semmes-Weinstein risultava patologico bilateralmente evidenziando perdita della sensibilità protettiva. L'Ankle Brachial Index (ABI) calcolato era 0,4. Visto l'edema del piede non era stato possibile valutare la misura dell'ossigeno transcutaneo (TcPO₂, Transcutaneous Oxygen Pressure).

Si richiedeva valutazione da parte del chirurgo vascolare che, dopo studio ecocolor Doppler, concludeva per un'arteriopatia obliterante cronica periferica al IV sta-

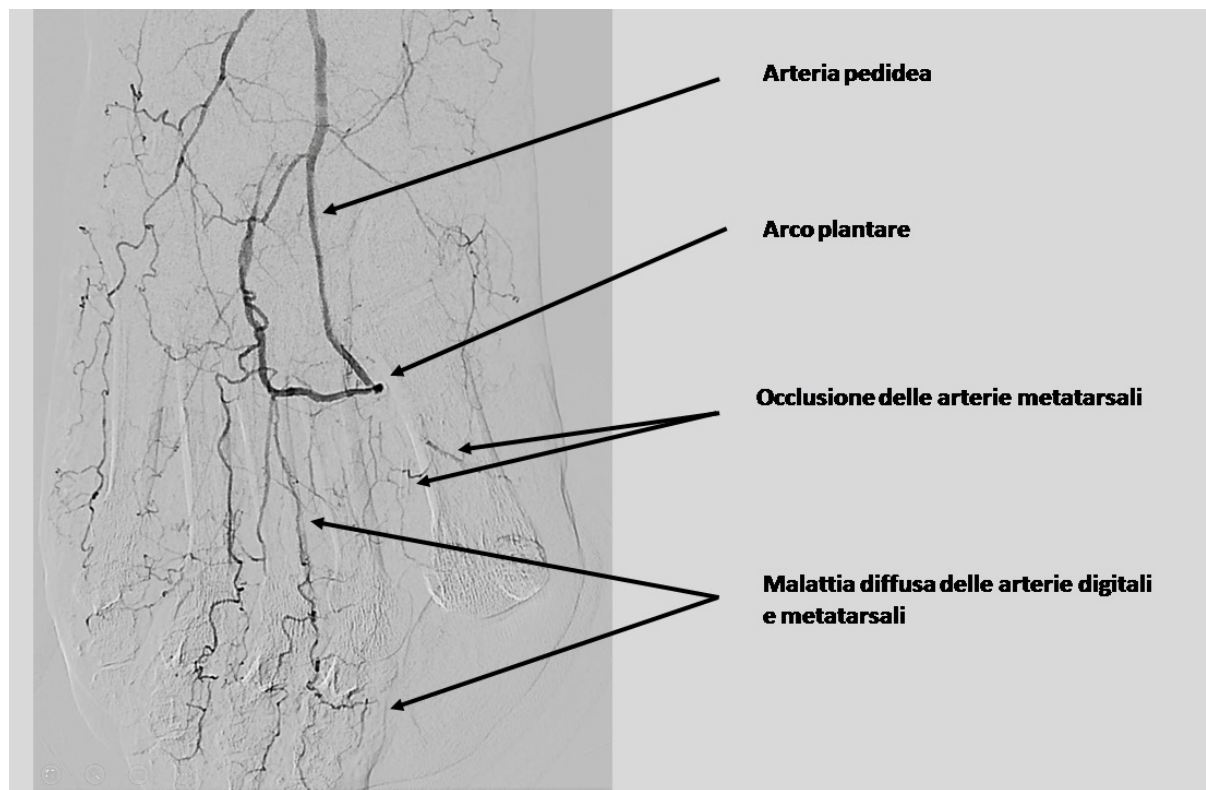


Figura 1 | Spiegazione nel testo. Si ringrazia il Dottor Roberto Ferraresi per l'immagine fornita.

dio di Leriche-Fontaine. La lesione veniva classificata ad alto rischio di amputazione secondo il sistema WIfI (Wound Ischemia and foot Infection)⁽¹⁾.

Il paziente, ricoverato presso la nostra Unità Operativa, veniva trattato con terapia antibiotica empirica, insulina con schema basal-bolus e terapia antiaggregante con clopidogrel in attesa di studio angiografico e contestuale procedura di rivascolarizzazione dell'arto inferiore destro.

Gli esami pre-operatori mostravano una lieve leucocitosi neutrofila, ed un lieve incremento della PCR (2,5 mg/d) oltre ad una anemia microcitica (Hb 9,4 gr/dl, MCV 80 fl) ed un GFR di 41 ml/min.

Allo studio radiografico del piede destro si evidenziava "rimaneggiamento strutturale a prevalente componente litica, della falange ungueale del I dito compatibile con infezione osteomielitica."

L' esame angiografico evidenziava stenosi severa dell'arteria tibiale anteriore, occlusione completa dell'arteria tibiale posteriore, occlusione delle arterie plantari, interessate da malattia calcifica diffusa severa coinvolgente altresì l'arcata plantare, le arterie metatarsali e digitali, determinando una pressoché desertificazione del circolo dell'avampiede.

I tentativi di angioplastica distale (PTA, Percutaneous Transluminal Angioplasty) fallivano a causa della malattia diffusa, ostruttiva, intrattabile e calcifica dei vasi tibiali distali e dei vasi propri del piede (Figura 1).

A distanza di due giorni il paziente veniva sottoposto ad amputazione aperta del I dito del piede destro. L'esame colturale del tessuto osseo rimosso evidenziava positività per *Pseudomonas Aeruginosa*. Dopo studio ecocardiografico, che non mostrava patologie di rilievo, veniva avviata terapia medica con prostanoidi, effettuando al termine del ciclo di infusione valutazione della TcPO₂ al piede destro che mostrava valori non soddisfacenti (9 mmHg lungo la prima linea metatarsale dorsalmente e 23 mmHg in sede perimalleolare interna). Clinicamente al piede si evidenziava una iniziale evoluzione ischemica della testa del I metatarso che appariva brunastra. Vista la scarsa efficacia del trattamento effettuato, in paziente altrimenti necessariamente candidato ad amputazione maggiore, si optava per un approccio terapeutico innovativo mediante l'utilizzo di una terapia cellulare ad alta capacità angiogenica e rigenerativa. Tale approccio prevede l'inoculazione in sede perilesionale e lungo gli assi vascolari dell'arto inferiore interessato di un concentrato di cellule mononucleate (monociti, macrofagi, linfociti) prelevate dal sangue periferico del paziente (cellule autologhe). Per ottenere il pool cellulare è stato utilizzato un sistema di separazione a filtrazione selettiva (Kit Athena Monocells Solution), che permette in

tempi rapidi la concentrazione di cellule mononucleate a partire da bassi volumi di sangue periferico (200 milioni di cellule mononucleate ogni 120 ml di sangue processato). Il trattamento prevede due successive inoculazioni di cellule mononucleate a distanza di uno e due mesi dal primo impianto.

In occasione del secondo impianto di cellule mononucleate, il paziente veniva sottoposto contestualmente a bonifica della testa ischemica del I raggio metatarsale. Ai successivi controlli post dimissione si evidenziava una diastasi parziale della ferita chirurgica che tuttavia presentava tessuto di fondo deterso e con iniziale tessuto di granulazione, senza segni di flogosi.

In dicembre 2018 si effettuava terzo ed ultimo ricovero per couretage e chiusura di diastasi di ferita e contestualmente ultima inoculazione di cellule mononucleate autologhe. Il paziente veniva infine dimesso con sutura in ordine.

Si constatava guarigione completa in Marzo 2019. In tale occasione venivano prescritte al paziente calzature di prevenzione a suola rigida e plantari su calco e programmate visite periodiche di controllo.

Discussione

Sebbene la terapia chirurgica ed endovascolare abbia ridotto l'incidenza di amputazioni degli arti inferiori, la percentuale delle stesse nei casi di ischemia critica rimane purtroppo elevata. Un innovativo approccio terapeutico nel trattamento delle arteriopatie periferiche è rappresentato dall'impianto di cellule mononucleate da sangue periferico (PBMNC, Peripheral Blood MonoNuclear Cells), un concentrato cellulare autologo di ultima generazione ad alta capacità angiogenica e rigenerativa, utilizzato nel trattamento di pazienti con ischemia critica dell'arto non rivascolarizzabili o sottoposti a rivascolarizzazione efficace ma con lesioni che non guariscono.

È noto che i pazienti affetti da arteriopatía periferica tendono spontaneamente a sviluppare vasi collaterali bypassando l'occlusione. La terapia cellulare con PBMNC fonda il proprio razionale sull'imitazione della risposta fisiologica di queste cellule al danno ischemico, aumentandone velocità ed intensità di azione attraverso l'impianto nel tessuto danneggiato/ischemico. L'effetto angiogenico è legato principalmente ad un effetto paracrino di rilascio da parte dei monociti di citochine angiogeniche (in particolare VEGF e bFGF) e fattori di crescita⁽²⁻³⁾. Oltre alla capacità angiogenetica è stato inoltre dimostrato che monociti e linfociti giocano un ruolo fondamentale nella guarigione dell'ulcera⁽⁴⁻⁵⁾. Nel caso clinico

presentato, l'impianto di PBMNC è stato effettuato in un quadro di gangrena digitale ed arteriopatía periferica. La procedura di PTA dell'arto inferiore effettuata si era mostrata scarsamente efficace, come confermato dai bassi valori di TcPO₂ post-procedura e dall'evoluzione negativa del quadro clinico locale (necrosi della testa del primo raggio metatarsale). D'altra parte, l'impianto di cellule mononucleate ha fortemente contribuito, alla fine dei tre cicli terapeutici, alla guarigione della diastasi di ferita evitando la ventilata amputazione maggiore.

Il concentrato cellulare è stato prodotto durante seduta operatoria prelevando 100-120 cc di sangue periferico del paziente, subito sottoposto a filtrazione selettiva con sistema PallCeleris (sistema monouso sterile⁽⁶⁾). La filtrazione selettiva rappresenta una tecnologia avanzata nell'isolamento e concentrazione delle cellule, permettendo la separazione delle stesse in base alla carica elettrica di membrana, con una minima contaminazione del concentrato da parte di globuli rossi e neutrofilii. Il sistema inoltre preserva l'integrità di membrana cellulare ed impedisce il rilascio di molecole attive e l'attivazione precoce delle cellule. Le popolazioni cellulari presenti alla fine nel concentrato sono rappresentate da monociti (tra i quali le Endothelial Progenitor cells), linfociti B, T e Natural Killer (con capacità angiogenetica sinergica a quella dei monociti), piastrine, cellule staminali ematopoietiche CD34+, cellule staminali KDR+ e progenitori endoteliali.

Le PBMNC ottenute vengono immediatamente impiantate a livello intramuscolare senza alcuna manipolazione ed in condizioni di sterilità. Le cellule vengono inoculate, tramite multiple iniezioni di 0,25 ml, lungo l'asse vascolare ed in sede perilesionale. Il ciclo terapeutico prevede l'impianto cellulare ripetuto per tre volte a distanza di 30/40 giorni.

Recenti studi indicano che in pazienti non rivascolizzabili il trattamento dell'ischemia critica con terapia cellulare autologa angiogenica è efficace e sicura, permettendo una riduzione delle amputazioni maggiori, una maggiore e più veloce guarigione delle lesioni trofiche, riduzione o scomparsa del dolore ed un miglioramento della TcPO₂⁽⁷⁾.

È stato inoltre proposto l'utilizzo della terapia con PBMNC non solo nei pazienti non rivascolizzabili ma anche come terapia adiuvante in pazienti rivascolizzabili nei quali le sole metodiche di rivascolizzazione potrebbero non garantire un risultato soddisfacente in termini di guarigione dell'eventuale lesione trofica o limitazione del livello di amputazione⁽⁸⁾.

In conclusione, l'utilizzo di PBMNC risulta essere un'innovativa e sicura opzione terapeutica per la gestione delle lesioni ulcerative e delle ischemie degli arti inferiori. Tale procedura appare facilmente applicabile e ripetibile senza necessità di utilizzo di apparecchiature sofisticate o impegnativi training degli operatori.

Bibliografia

1. Mills JL Sr, Conte MS, Armstrong DG, Pomposelli FB, Schanzer A, Sidawy AN, Andros G. The Society for Vascular Surgery Lower Extremity Threatened Limb Classification System: risk stratification based on wound, ischemia, and foot infection (WIFI). Society for Vascular Surgery Lower Extremity Guidelines Committee. *J Vasc Surg* 59:220-34, 2014.
2. Gurevich DB, Severn CE, Twomey C, Greenhough A, Cash J, Toye AM, Mellor H, Martin P. Live imaging of wound angiogenesis reveals macrophage orchestrated vessel sprouting and regression. *EMBO J* 37(13), 2018.
3. Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 107:1164-9, 2003.
4. Brancato, S. K. & Albina, J. E. Wound Macrophages as Key Regulators of Repair. *Am J Pathol* 178:19-25, 2011.
5. Novak, M. L. & Koh, T. J. Macrophage phenotypes during tissue repair. *J Leukoc Biol* 93(6):875-81, 2013.
6. Spaltro G, Straino S, Gambini E, Bassetti B, Persico L, Zoli S, Zanobini M, Capogrossi MC, Spirito R, Quarti C, Pompilio G. Characterization of the Pall Celeris system as a point-of-care device for therapeutic angiogenesis. *Cytotherapy* 17:1302-13, 2015.
7. Rigato M, Monami M, Fadini GP. Autologous Cell Therapy for Peripheral Arterial Disease: Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized, Nonrandomized, and Noncontrolled Studies. *P Circ Res* 120 1326-1340, 2017.
8. Persiani F, Paolini A, Camilli D, Mascellari L, Platone A, Magenta A, Furgiuele S. Peripheral Blood Mononuclear Cells Therapy for Treatment of Lower Limb Ischemia in Diabetic Patients: A Single-Center Experience. *Ann Vasc Surg* 53:190-196, 2018.