



Isolamento, coltura e caratterizzazione di cellule staminali mesenchimali autologhe da donatori di tessuto adiposo e midollo osseo in età avanzata: un approccio alternativo della terapia cellulare in campo ortopedico

Isolation, cell culture and characterization of autologous mesenchymal stem cells from adipose tissue and bone marrow older donors: an alternative approach of cell therapy in the orthopaedics

Andrea Fidanza^{1,2} (foto), Erika Leonardi², Eleonora Migliore², Vittorio Calvisi¹, Pier Francesco Indelli²

¹ Ortopedia e Traumatologia, Università degli Studi dell'Aquila; ² Department of Orthopaedic Surgery and Bio-engineering, Stanford University School of Medicine, Palo Alto, CA, USA

Ricevuto: 9 settembre 2020
Accettato: 22 ottobre 2020

Corrispondenza

Andrea Fidanza

Ortopedia e Traumatologia, Università degli Studi dell'Aquila

E-mail: andrea.fidanza@graduate.univaq.it

Conflitto di interessi

Gli Autori dichiarano di non avere alcun conflitto di interesse con l'argomento trattato nell'articolo.

Come citare questo articolo: Fidanza A, Leonardi E, Migliore E, et al. Isolamento, coltura e caratterizzazione di cellule staminali mesenchimali autologhe da donatori di tessuto adiposo e midollo osseo in età avanzata: un approccio alternativo della terapia cellulare in campo ortopedico. Giornale Italiano di Ortopedia e Traumatologia 2022;48:82-92; <https://doi.org/10.32050/0390-0134-392>

© Copyright by Pacini Editore Srl



OPEN ACCESS

L'articolo è OPEN ACCESS e divulgato sulla base della licenza CC-BY-NC-ND (Creative Commons Attribuzione – Non commerciale – Non opere derivate 4.0 Internazionale). L'articolo può essere usato indicando la menzione di paternità adeguata e la licenza; solo a scopi non commerciali; solo in originale. Per ulteriori informazioni: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.it>

Riassunto

Introduzione. La medicina rigenerativa si pone come obiettivo il ripristino delle funzionalità perdute di tessuti e organi degenerati o danneggiati e, nell'ambito della rigenerazione tissutale, le cellule staminali mesenchimali adulte posseggono un ruolo di primo piano, protagoniste nella letteratura scientifica degli ultimi anni per favorire approcci terapeutici innovativi e alternativi rispetto ai metodi più tradizionali. L'ipotesi degli Autori è che cellule staminali mesenchimali adulte (MSCs) estratte da pazienti anziani affetti da patologia osteoartrosica (OA), possano mostrare caratteristiche di staminalità equivalenti a quelle che si riscontrerebbero in pazienti più giovani.

Materiali e metodi. In uno studio prospettico caso-controllo sono stati inclusi 4 pazienti over 70 (casi) e un paziente under 45 (controllo), sottoposti a protesi totale d'anca o protesi totale di ginocchio per osteoartrosi primaria avanzata. Durante la procedura chirurgica ad ogni paziente è stato prelevato un campione sia di tessuto adiposo (sottocutaneo o Corpo di Hoffa) che di midollo osseo (canale femorale) processati rispettivamente mediante digestione enzimatica e centrifugazione in gradiente di densità. Le cellule così estratte sono state quindi messe in coltura usando la stessa concentrazione iniziale, e mantenute in condizioni di crescita per diverse settimane. Le cellule ottenute dalle due procedure sono state quindi differenziate in vitro in 3 linee cellulari (adipociti, osteociti, condrociti) utilizzando specifici terreni di coltura, mentre il fenotipo è stato caratterizzato mediante citofluorimetria a flusso, seguendo le linee guida della *Society for Cellular Therapy*.

Risultati. Sebbene entrambe le tipologie cellulari fossero state seminate in fiasca alla stessa concentrazione iniziale, il numero di cellule in coltura si è rivelato leggermente più elevato per le cellule mesenchimali estratte da tessuto adiposo, rispetto a quelle estratte da midollo osseo. A circa una settimana di coltura, tutte le cellule ottenute da entrambi i tessuti (adiposo e midollare) si presentavano adese alle fiasche di coltura, mostrando una morfologia tipicamente mesenchimale (*spindle like morphology*). La proliferazione cellulare dei donatori anziani si presentava esponenziale nel tempo e pressoché sovrapponibile a quella del campione di controllo. Una volta espanse e trattate con i 3 terreni differenziali (passaggio 3), le cellule hanno mostrato di esser capaci di differenziarsi

nelle tre linee desiderate. Infine, all'analisi citofluorimetrica, i campioni cellulari hanno mostrato di esprimere un fenotipo prettamente mesenchimale con una espressione di marcatori staminali mesenchimali superiore al 90% (CD90, CD44, CD105) e una quasi assenza di marcatori non mesenchimali (CD34, CD45, CD31).

Discussione. In questo studio, la nostra attenzione si è centrata sulla caratterizzazione di campioni di cellule derivanti tessuto adiposo e da midollo osseo isolate dallo stesso donatore durante al procedura chirurgica. I campioni sono stati ottenuti generando un *discomfort* minimo per il paziente e in quantità sufficiente da portare a termine la nostra sperimentazione. Il risultato della ricerca conferma l'ipotesi che anche da campioni provenienti da pazienti anziani affetti da OA è possibile ottenere un significativo numero di MSCs in possesso di tutte le caratteristiche di staminalità.

Conclusioni. Le cellule ottenute da entrambi i siti di prelievo (adiposo e midollare) hanno risposto a tutti i criteri di staminalità con risultati sovrapponibili, confermando la possibilità di ottenere MSCs anche da pazienti adulti ed affetti da OA. Ai fini terapeutici rigenerativi, le cellule ottenute da tessuto adiposo possono rappresentare una valida e più facilmente accessibile alternativa al tessuto midollare suggerendoci che il midollo osseo, storicamente più studiato, possa ad oggi non rappresentare più il solo *gold standard* del prelievo di cellule mesenchimali staminali.

Parole chiave: cellule staminali mesenchimali, MSC, medicina rigenerativa, tessuto adiposo, midollo osseo, PTA, PTG

Summary

Introduction. Currently, regenerative medicine field is going toward a better comprehension of the physiological and cellular mechanisms related to aging degeneration of human body. During the past years, Adult Mesenchymal Stem Cells have been a very popular topic in the scientific literature. Using alternative therapeutic approaches, these cells shown a potential key role in tissue regeneration. This study is focused to demonstrate that mesenchymal stem cells (MSCs) harvested from elderly patients with a diagnosis of osteoarthritis (OA) may show stem characteristics equivalent to those found in younger patients.

Methods. All participants were recruited and evaluated in accordance with institutional review board-approved protocols and all participants provided informed consent. In a prospective case-control study, 4 patients over 70 years of age (cases) and 1 patient under 45 years of age (control) have been enrolled before a total joint replacement surgery (hip or knee). During the surgical procedures, a sample of adipose tissue (subcutaneous or Hoffa's fat pad) and a sample of bone marrow from femoral canal was collected from each patient. Cells from adipose tissue were processed using enzymatic digestion and then seed in flasks for culturing in vitro. Primary cells from bone marrow samples have been processed using a density gradient centrifugation and then cultured in vitro. Both adipo and bone marrow cells have been seed in flasks for culture at the same initial concentration. Both cell types were treated with special growth media for several weeks, until fully differentiated in three cell lineages. Immunophenotype of each cell lineage was characterized by flow-cytometry, following the guidelines of the Society for Cellular Therapy.

Results. Although both type of cells were collected from the same donor and seed in the flasks at the same initial concentration, the number of fat MSCs was slightly higher compared to the number of bone marrow MSCs. After one week of culture, both adipose and bone marrow cells were able to adhere to the flask plastic surface, showing a typical spindle like mesenchymal morphology. The cell growth from elderly donors was esponential and almost comparable to the control case. After the expansion and the treatment of the cells in vitro with 3 different specific colture media, all cells were differentiated in three cell lines (adipocytes, osteocytes, chondrocytes respectively). At the end of the treatment, analysis with flow-cytometry evidientiated the expression of the surface mesenchymal markers CD90, CD44, and CD105 respectively. All cells from both tissues showed more than 90% of the steminess markers and almost lack of non mesenchymal markers (CD34, CD45, CD31) at the same time

Discussion. The main purpose of this study was the characterization of cell samples obtained from adipose tissue and bone marrow isolated from the same elderly donors with OA undergoing surgery. The samples were obtained with a minimal discomfort for the patient and in a sufficient quantity for the experiments. The results confirm the Authors' hypothesis: the possibility of extracting adult mesenchymal cells from elderly patients with OA in a significant number and having stem cell characteristics and equivalent to those found in younger patient.

Conclusion. Although the samples were obtained from elderly patients with OA, a significant number of MSCs from both adipose and bone marrow tissue has been collected, and just after three weeks of differentiation treatment in vitro, all cells from both tissues showed stemness qualities. Data from flowcytometry also highlighted the difference in terms of extraction and collection methodology between MSCs from fat tissue and the ones obtained from bone marrow. The number and the stemness features of MSCs obtained from adipose tissue was slightly higher compared to the cells obtained from bone marrow. For this reason, Authors believe that bone marrow may not be the only gold standard for human MSCs harvesting in regeneration therapy. In conclusion, fat MSCs could represent a potential future therapy for the treatment of osteoarthritis and a valid and easily alternative to the adult stem cells extrated from bone marrow.

Key words: mesenchymal stem cells, MSC, regenerative medicine, adipose tissue, bone marrow, TKA, THA, hip, knee

Introduzione

L'osteoartrosi (OA) è una delle più diffuse patologie cronico-degenerative che colpisce un'ampia gamma di popolazione, oltre che una delle più frequenti cause di disabilità nell'anziano. Si calcola che l'artrosi sintomatica colpisca, solo in Italia, almeno 4 milioni di persone, con un costo pubblico annuo di circa 6,5 miliardi di euro ¹. L'OA è una patologia complessa e multifattoriale ove l'alterazione biomeccanica della cartilagine determina una progressiva ed irreversibile distruzione delle componenti articolari in toto, sia a livello cellulare che biochimico intra-articolare. Diversi sono i fattori che favoriscono la progressione della malattia, come l'invecchiamento, le lesioni post-traumatiche articolari, l'obesità. Il suo quadro clinico è caratterizzato da dolore e progressiva rigidità sino a completa impotenza funzionale della sede colpita. Per di più, il processo riparativo nel tempo diventa inefficace, e l'iniziale terapia basata fondamentalmente sulla gestione del dolore ed il mantenimento funzionale si evolve, nella maggioranza dei casi, nella sostituzione protesica dell'articolazione ^{2,3}.

La medicina rigenerativa ha come obiettivo quello di riparare e/o favorire il ripristino delle funzionalità perse di tessuti e organi degenerati o danneggiati. Già da diverso tempo, nell'ambito della rigenerazione tissutale, le cellule staminali rivestono un ruolo di primo piano per le loro proprietà non solo rigenerative in senso stretto ma anche immunomodulatorie ed antinfiammatorie, oltre all'abilità di secernere sostanze bioattive e vescicole extracellulari capaci di interagire con l'ambiente circostante ^{4,5}. Le cellule staminali mesenchimali adulte (MSC), reperibili in diversi tessuti, sono diventate sempre più oggetto di studio in molteplici modelli *in vitro* ed *in vivo* ⁶⁻⁸. Tutto questo incrementa il notevole interesse che le cellule staminali mesenchimali possano suscitare nella ricerca di approcci terapeutici innovativi e alternativi rispetto ai metodi più tradizionali. Il medesimo interesse si è riscontrato anche in campo ortopedico-traumatologico col fine di supportare e/o migliorare le attuali metodiche terapeutiche sia in senso rigenerativo che riparativo.

Tra le cellule staminali adulte, la nostra attenzione si è centrata su quelle derivanti da midollo osseo (BM-SC) e da tessuto adiposo (ASC). La sede di isolamento e il mantenimento a seguire delle loro caratteristiche di staminalità sono da anni oggetto di studio e dibattito sia a livello quantitativo che qualitativo. Lo scopo del nostro studio è stato quello di dimostrare se anche da pazienti anziani affetti da patologia osteoartrosica fosse possibile estrarre cellule mesenchimali in grado di rispondere ad uno stimolo differenziativo.

Materiali e metodi

Previo ottenimento del consenso informato secondo le

direttive dell'Institutional Review Board della Stanford University School of Medicine (Palo Alto, California USA), sono stati inclusi nello studio di ricerca 5 pazienti di sesso maschile di cui 4 di età superiore ai 70 anni (range 71-76, rispettivamente identificati con OA32, OA33, OA34 e OA35) che presentavano un grado di osteoartrosi grave e pertanto candidati a chirurgia elettiva di protesi totale d'anca (THA) o protesi totale di ginocchio (TKA) ed 1 come caso controllo di età inferiore ai 45 anni affetto da OA e sottoposto a chirurgia di sostituzione totale di ginocchio (OA36). Durante le procedure chirurgiche, eseguite secondo metodiche standard ^{9,10}, il tessuto adiposo è stato prelevato dal corpo di Hoffa nel caso di intervento di protesica del ginocchio oppure dal tessuto sottocutaneo nel caso di intervento di protesi d'anca, e successivamente sottoposto a digestione enzimatica. Dallo stesso paziente, allo stesso momento è stato prelevato il midollo osseo (minimo 5 cc) mediante siringa da aspirazione dal canale femorale dopo osteotomia della testa del femore (THA) e dal canale femorale prossimale (TKA): le cellule sono state isolate tramite centrifugazione in gradiente di densità.

Digestione enzimatica

Le cellule staminali da tessuto adiposo sono state isolate mediante un protocollo precedentemente validato ¹¹. In breve, circa 10g di tessuto sono stati digeriti mediante collagenasi IV (Sigma) per circa 60 minuti, filtrati con filtri da 50µm, risospesi in RBC lysis buffer 10x (BioLegend) per 10 minuti e ulteriormente risospeso in terreno di coltura contenente alpha-MEM (Invitrogen), 20% of fetal-bovine-serum (FBS-Thermo Scientific), Glutamax 100x (Invitrogen), Penicillin-Streptomycin (Invitrogen). La vitalità cellulare al momento della semina in piastra è stata valutata del 90% tramite l'utilizzo del colorante selettivo Trypan Blue. Le cellule sono state seminate alla densità di 0.5×10^6 in T-25 flask ed incubate a 37°C, 5% CO₂. Raggiunta la confluenza del 90% le cellule sono state quindi espanse 1:3 per tre passaggi consecutivi per la caratterizzazione *in vitro*.

Gradiente di centrifugazione tramite Ficoll

L'isolamento delle BM-SC è stato ottenuto tramite gradiente di densità su Ficoll-PaqueTM Plus, GE Healthcare ¹². Circa 10 mL di tessuto midollare sono stati centrifugati a 445rpm per 35 minuti a RT al fine di ottenere il buffy coat. Il buffy coat contenente tutte le cellule nucleate è stato trasferito e lavato due volte con DPBS a 300g per 10 minuti a RT. I globuli rossi residui sono stati rimossi tramite lisi ematica per 10 minuti. Le cellule nucleate sono state centrifugate a 200g per 15 minuti a RT e risospese in terreno contenente DMEM/F12, 15%Fetal Bovine Serum (FBS), 10ng/ml FGF, 1% Penicillin-Streptomycin, 2ng/ml L-glutamina. La vitalità e la conta cellulare sono state va-

lutate tramite Trypan blue. Le cellule sono state seminate alla densità di 0.3×10^6 in T-25 flasks ed incubate a 37°C , 5% CO_2 . Raggiunta la confluenza del 90%, le cellule sono state espanse 1:3 per tre passaggi consecutivi per la caratterizzazione in vitro.

Caratterizzazione di cellule stromali mesenchimali (MSC)

Per verificare che le cellule isolate con le procedure descritte precedentemente fossero MSC, sono state seguite le linee guida della *Society for Cellular Therapy* (ISCT)¹³ che definiscono le cellule estratte da tessuti differenziati come staminali adulte in base a tre distinte caratteristiche:

1. capacità di aderire alle superfici plastificate durante il periodo di coltura;
2. potenziale differenziativo in almeno tre diversi tipi cellulari;
3. specifico pattern fenotipico di superficie.

Differenziazione in vitro

La differenziazione in vitro è iniziata al terzo passaggio per tutti i campioni con osteoartrite (OA32, OA33, OA34 e OA35) e per il campione controllo OA36 in entrambe le tipologie cellulari (tessuto adiposo e midollo osseo). Le cellule venivano piastrate in una 6-well plate e indotte al differenziamento adipogenico, osteoblastico e condrogenico attraverso tre diversi terreni di coltura dedicati e successivamente analizzate al microscopio.

Per il differenziamento in senso adipogenico è stato usato il terreno Eagle Medium High Glucose modificato di Dulbecco (DMEM-HG) con il 10% di siero bovino fetale, 200 μM Indometacin, 0,05 mg/L di insulina umana, 3-isobutil-1-metilxantina 5 μM e 1 desametasone 1 μM (Invitrogen); le cellule sono state coltivate per un periodo di due settimane. Al termine delle due settimane, sono state fissate in paraformaldeide al 4% (Sigma) e colorate con soluzione Oil-red-O (Sigma) e soluzione di ematossilina ed eosina (Gibco).

Per la differenziazione osteoblastica, le MSC sono state coltivate in un terreno Eagle Medium High Glucose modificato di Dulbecco (DMEM-HG, Invitrogen) con 10% di siero bovino fetale (FB Thermo Scientific S-), desametasone 100nM (Sigma), 0,05 mM di acido ascorbico (Sigma) e 10mM di β -glicerolfosfato (Sigma) per un totale di 21 giorni. Le cellule differenziate sono state fissate in paraformaldeide al 4% (Sigma) e colorate con Alizarin Red e soluzione di ematossilina ed eosina (Gibco).

Per la differenziazione in senso condrogenico le cellule sono state coltivate in terreno Dulbecco Eagle Medium High Glucose (DMEM-HG, Invitrogen), 10^7 M Desametasone (Sigma), 10^4 M Acido ascorbico (Sigma), 1 mM Sodio Piruvato (Gibco), amminoacidi non essenziali (ITS 1x-Thermo Fisher Scientific), $4,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ acido linoleico (Sigma), $80,5 \mu\text{g mL}^{-1}$

BSA (Thermo Fisher Scientific) e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ Transforming Growth Factor $\beta 3$ (eBioscience) per 21 giorni. Alla fine del periodo di differenziamento, i pellet cellulari sono stati fissati in paraformaldeide al 4% (Sigma) e colorati con Alcian Blue (Gibco) e soluzione di ematossilina ed eosina (Gibco).

Caratterizzazione del fenotipo

Le cellule provenienti da entrambi i tipi di tessuto e per tutti e 5 i campioni (pazienti OA e paziente controllo), sono state caratterizzate al terzo passaggio mediante citofluorimetria a flusso (FACS). Al fine di definire il pattern fenotipico delle cellule staminali, sono stati selezionati i seguenti anticorpi e i rispettivi fluorocromi in base alle linee guida della ISCT: CD90 FITC, CD105 Texas Red, CD44 ALEXA Fluor 700 per quanto riguarda i marker staminali mesenchimali di superficie definiti positivi. Contemporaneamente, gli anticorpi per CD45 Pacific Blue, CD34 Pacific Blue, e CD31 Pacific Blue rispettivamente sono stati selezionati per definire i marker di superficie cellulari non mesenchimali, quindi negativi per la staminalità cellulare. Ad ogni anticorpo è stato associato il corrispettivo isotipo anticorpale come controllo negativo. Una quantità di cellule pari a 1×10^6 per entrambe le tipologie cellulari è stata raccolta e successivamente lavata con Phosphate-Buffered-Saline (PBS, Invitrogen) tramite centrifugazione. Le cellule sono state quindi risospese nuovamente in PBS, filtrate attraverso un filtro a maglie di $70 \mu\text{m}$ e raccolte negli appositi tubi per citofluorimetria. Il procedimento di *staining* anticorpale è stato svolto mediante iniziale incubazione con L/D Zombie Aqua (Invitrogen) per 20-30 min al buio. Successivamente, le cellule sono state ulteriormente lavate con soluzione di lavaggio Flow Wash buffer (BD) e incubate prima con Fc blocking (BD Bioscience) per 10 mn e successivamente con gli anticorpi e i rispettivi isotipi menzionati precedentemente per 30 minuti al buio a temperatura ambiente. Per finire, tutti i campioni cellulari sono stati fissati in 1% di paraformaldeide (Sigma) e analizzati tramite apparecchiatura FACS (BD LSR FortessaTM). I risultati ottenuti sono stati quindi elaborati mediante FlowJoTM software (v10.6.2, Tree Star Inc).

Risultati

Isolamento e coltura cellulare

Dopo 24 ore dall'iniziale messa in coltura, le cellule di tutti e 5 i campioni, provenienti sia dal tessuto adiposo che dal tessuto midollare, iniziavano ad aderire alla plastica delle flask di coltura, e a circa una settimana risultavano tutte completamente adese. Inoltre, già dopo tre giorni di messa in coltura, all'analisi microscopica le cellule di entrambi i tessuti si mostravano con una morfologia allungata di tipo

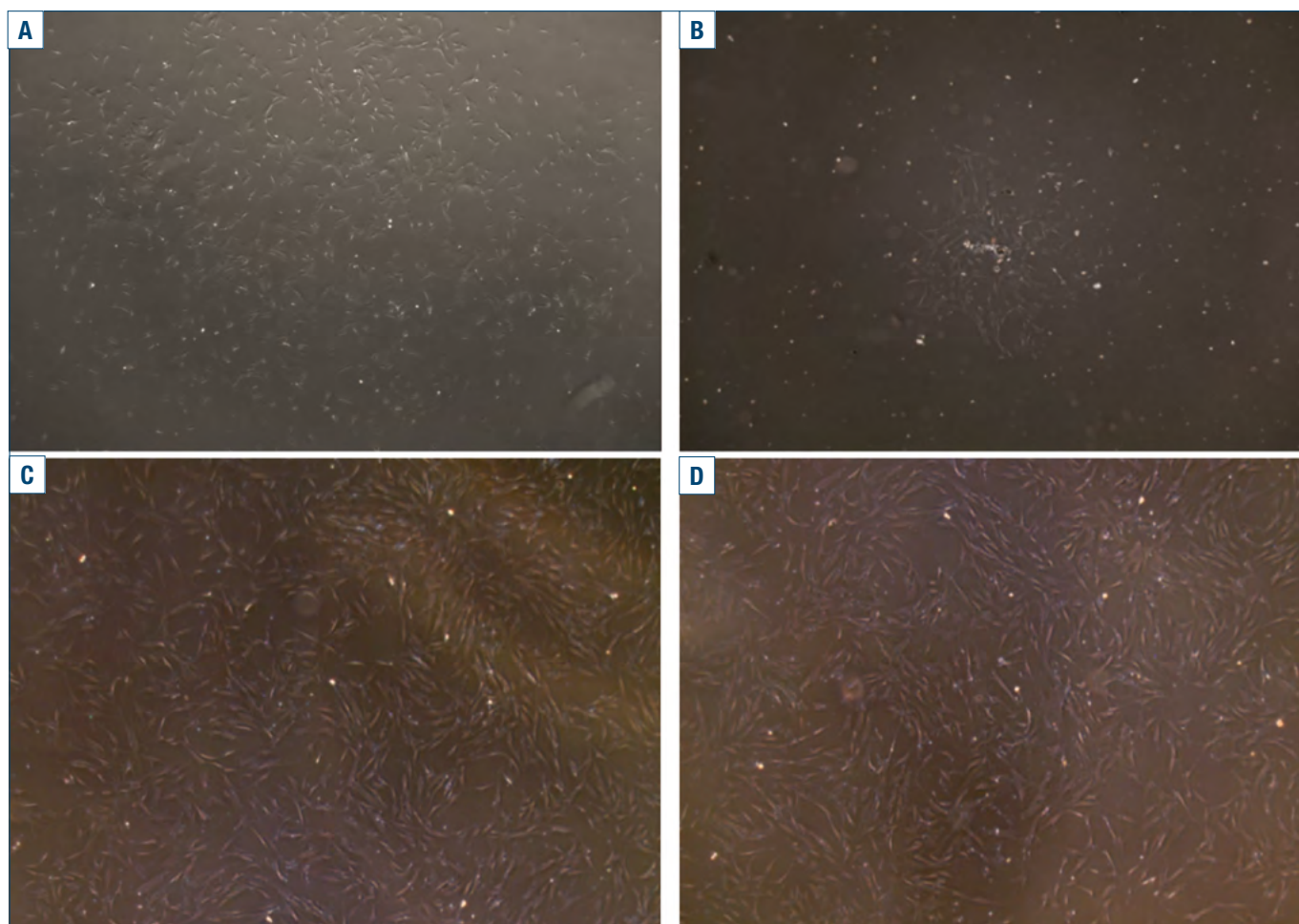


Figura 1. Analisi tramite microscopia a contrasto di fase: primo passaggio delle cellule isolate da tessuto adiposo (A) e da midollo osseo (B). Si noti come già al secondo passaggio (C, t.adiposo; D, midollo osseo) le cellule mostravano la *spindle-like cell morphology*.

fusiforme, la *spindle-like cell morphology*, tipica delle cellule staminali mesenchimali (Fig. 1). Questa morfologia è stata mantenuta sino a passaggio 2 (terzo passaggio) in cui è stata terminata l'espansione in coltura ed è stata osservata una crescita di tipo esponenziale in tutti i campioni (Fig. 2).

Differenziazione in vitro

La capacità di differenziarsi nelle tre linee cellulari precedentemente descritte (adipocitica, osteocitica e condrocitica), è stata valutata al terzo passaggio di coltura per entrambe le colture cellulari (Figg. 3-5). Le cellule estratte sia da tessuto adiposo che da midollo osseo dei pazienti affetti da OA e dal paziente controllo, dopo essere state trattate con il corrispettivo terreno differenziativo, presentavano l'abilità di differenziarsi nelle tre linee cellulari desiderate, come dimostrato dalla corrispettiva colorazione selettiva. Per l'analisi morfologica, i campioni differenziati

sono stati tutti valutati attraverso la colorazione con Ematossilina ed Eosina.

Differenziazione adipogenica

La differenziazione in senso adipogenico è stata ottenuta entro 2 settimane. Al termine di questo tempo, le cellule sono state colorate con soluzione colorante Oil-red-O, che evidenzia i vacuoli lipidici intracitoplasmatici degli adipociti. Eseguita la colorazione secondo protocollo, le cellule presentavano un accumulo di colorante all'interno delle cellule, segno di avvenuto differenziamento in senso adipogenetico rispetto ai controlli non trattati, che invece non presentavano alcuna colorazione. Nei rispettivi campioni trattati con Ematossilina ed Eosina si notava inoltre come le cellule trattate mediante terreno differenziativo non apparissero più di forma allungata ma rotondeggiante e di maggiore dimensione (Fig. 3).

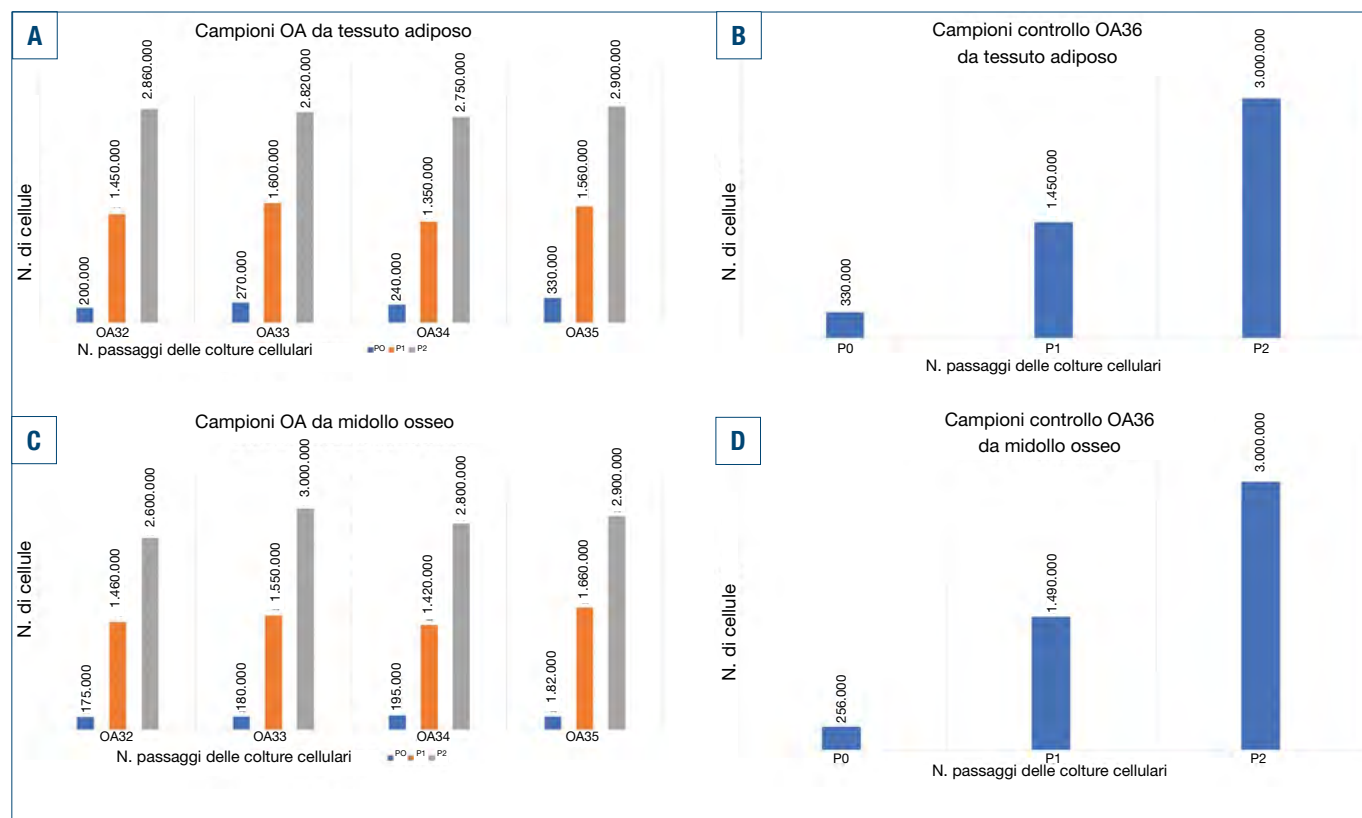


Figura 2. Crescita esponenziale nei tre passaggi di coltura delle cellule provenienti da tessuto adiposo (A, B) e da midollo osseo (C, D) in cui si nota una sostanziale sovrapposizione della numerosità cellulare tra i campioni affetti da osteoartrosi (OA) con età over 70 (A, C) e il campione di controllo (identificato con OA36) (B, D).

Differenziazione osteogenica

La differenziazione in senso osteogenico è stata analizzata dopo 3 settimane. Al termine di questo periodo, le cellule trattate ed i rispettivi controlli non trattati sono stati colorati con Alizarin Red. Il colorante si fissa ai depositi di calcio extracellulari prodotti dalle cellule osteoblastiche, formando un precipitato di colore rosso mattone. Eseguita la colorazione, ogni campione differenziato ha mostrato un abbondante presenza di precipitato di calcio rispetto al controllo negativo, anche in questo caso segno di differenziazione avvenuta. I campioni trattati con Ematossilina ed Eosina evidenziavano la presenza di cellule con forma rotondeggiante perdendo quindi quella morfologia mesenchimale (Fig. 4).

Differenziazione condrogenica

Anche la differenziazione in senso condrogenico è avvenuta in un range di tempo di 21 giorni. I pellet sono stati sottoposti a trattamento con terreno differenziativo dedicato, e successivamente colorati con Alcian Blue, un colorante basico polivalente usato per la colorazione dei mu-

copolisaccaridi acidi come i glicosaminoglicani (GAG), costituenti della matrice cartilaginea. Anche in questo caso, all'esame microscopico dopo la colorazione con Alcian Blue, sia nei campioni provenienti dal tessuto adiposo che da tessuto midollare, si evidenziava una vasta presenza di aggregati GAG colorati in blu rispetto al campione non trattato, evidenziando così l'avvenuta differenziazione in senso condrogenico. Inoltre, i pellet trattati con Ematossilina ed Eosina mantenevano la loro compattezza rispetto alle cellule non trattate, che invece si presentavano distribuite lungo tutto il piano delle 6-well plate con aspetto allungato (Fig. 5).

Espressione degli antigeni di superficie

È stata valutata la presenza dei marcatori di superficie secondo le linee guida ISCT¹³ in tutti i campioni esaminati (pazienti OA e paziente controllo). Fra quelli riportati nelle linee guida, sono stati selezionati i marcatori mesenchimali CD90, CD44, CD105 e marcatori non mesenchimali CD34, CD45, CD31. Le popolazioni di staminali adulte sottoposte allo studio del fenotipo sono state sia quelle ot-

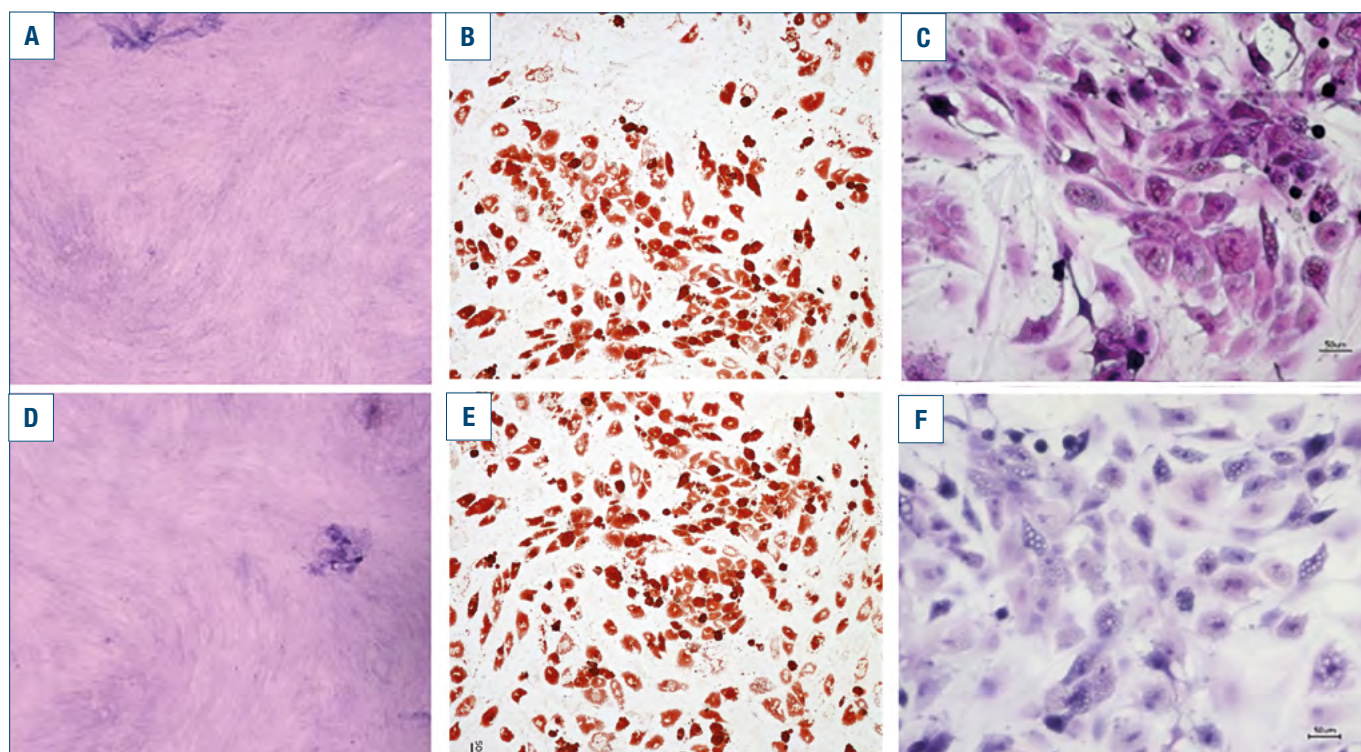


Figura 3. Cellule isolate da tessuto adiposo (A, B, C) e da midollo osseo (D, E, F). (A, D) controllo negativo colorato con Ematossilina e Eosina (HE); *Adipogenesi* dopo lo staining con Oli-Red-O (B, E) e HE (C, F) a evidenziare i vacuoli lipidici intracitoplasmatici degli adipociti.

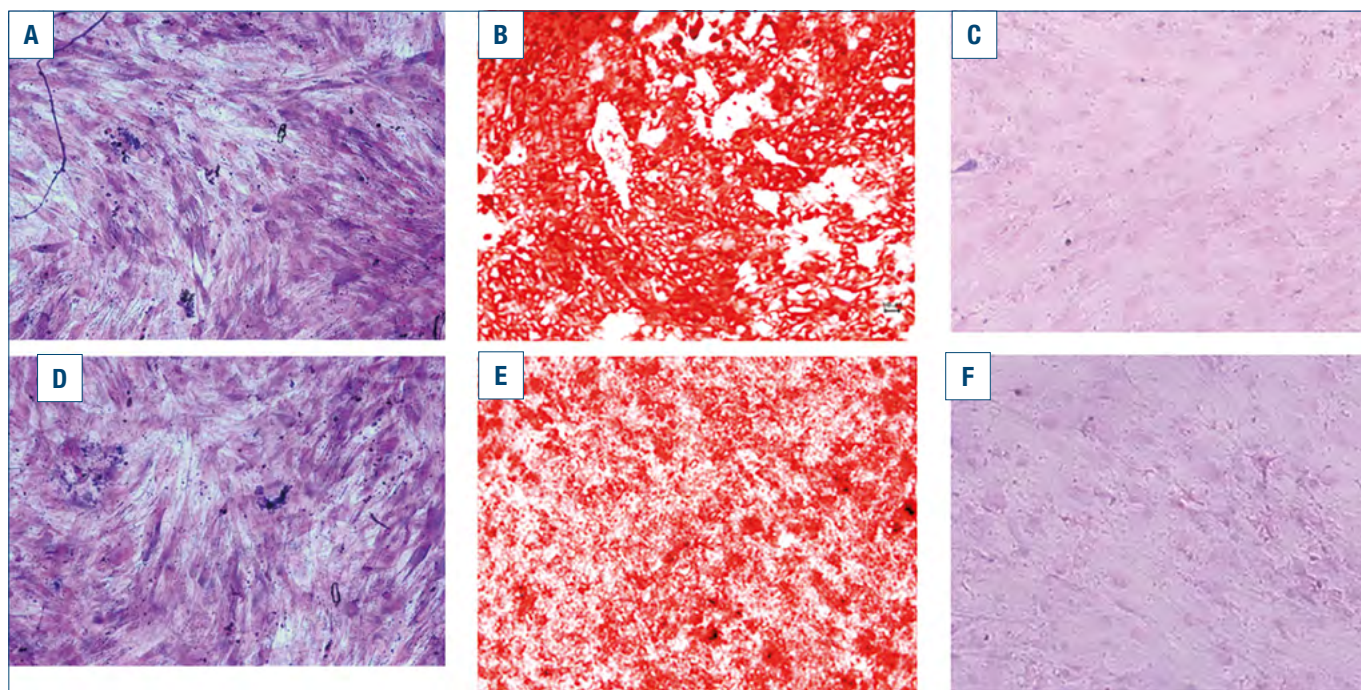


Figura 4. Cellule isolate da tessuto adiposo (A, B, C) e da midollo osseo (D, E, F). (A, D) controllo negativo colorato con Ematossilina e Eosina (HE); *Osteogenesi* dopo lo staining con Alizarin Red (B, E) e HE (C, F) a evidenziare i depositi di calcio extracellulare prodotti dagli osteoblasti.

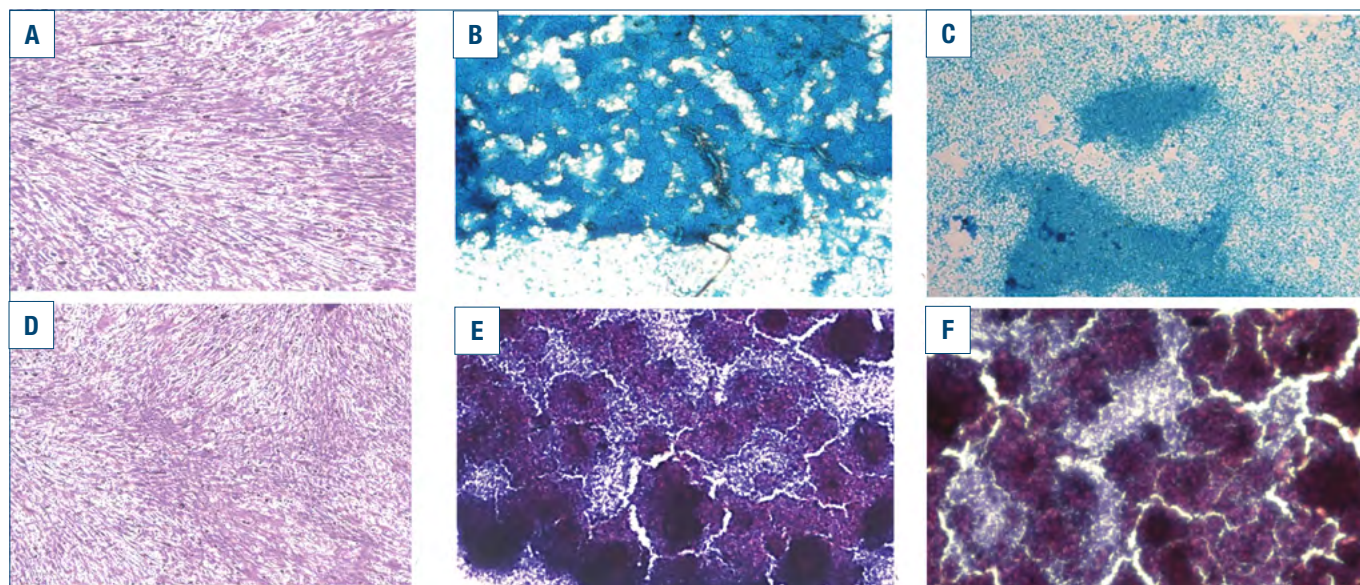


Figura 5. Cellule isolate da tessuto adiposo (A, B, C) e da midollo osseo (D, E, F). (A, D) controllo negativo colorato con Ematossilina e Eosina (HE); *Condrogenesì* dopo lo staining con Alcian Blue (B, E) e HE (C, F) a evidenziare la vasta presenza di glicosaminoglicani.

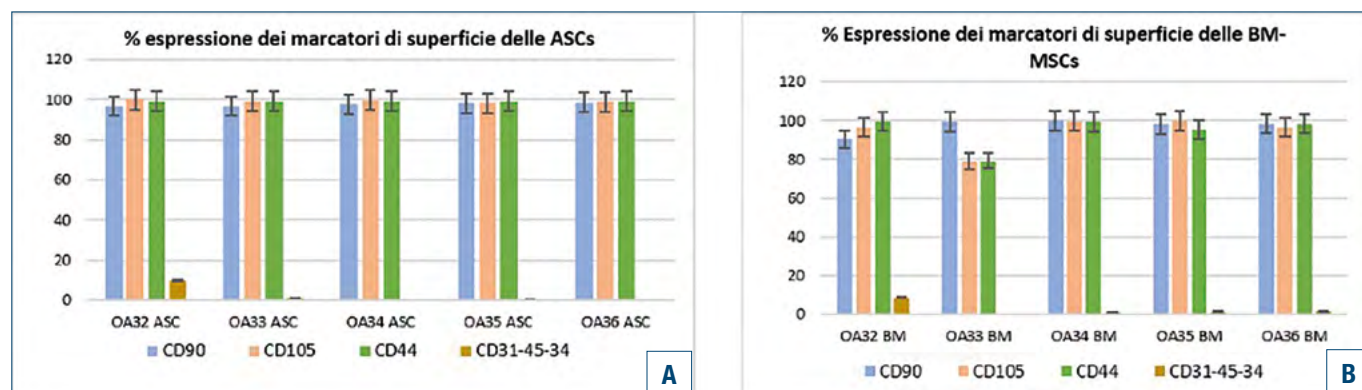


Figura 6. Fenotipo di superficie di cellule staminali adulte derivanti da tessuto adiposo (ASCs, a) e da midollo osseo (BM-MSCs, b). Nei progressivi passaggi le cellule hanno mostrato di possedere un fenotipo mesenchimale, caratteristica rimasta stabile nei successivi passaggi in tutti i campioni.

tenute da tessuto adiposo ed isolate mediante digestione enzimatica, sia quelle provenienti da tessuto midollare ed isolate mediante gradiente di centrifugazione. Lo staining di ogni campione è stato eseguito al terzo passaggio e la presenza dei marcatori valutata con FACS (BD LSR Fortessa™) e successivamente analizzata con FlowJo™ software (v10.6.2). L'analisi citofluorimetrica ha mostrato una netta prevalenza dei marcatori mesenchimali di superficie tipici delle staminali mesenchimali (> 90%) ed una bassissima percentuale (< 10%) dei marcatori non specifici. Questo risultato, ottenuto per ogni campione trattato, ha

confermato che le popolazioni cellulari ottenute da pazienti anziani ed espanse in coltura fossero costituite da cellule staminali mesenchimali adulte (MSCs). La popolazione si è inoltre mostrata stabile anche nei successivi passaggi (Fig. 6).

Discussione

I risultati di questo studio hanno validato l'ipotesi originale degli nonostante i campioni provenissero da pazienti di età avanzata ed affetti da patologia OA, è stato possibile iso-

lare cellule staminali mesenchimali adulte mediante l'applicazione di protocolli precedentemente validati da Leonardi et al.¹¹ per quanto riguarda il tessuto adiposo e protocolli standard per quanto riguarda il midollo osseo¹²; inoltre, fra i criteri standard di staminalità, le MSC da noi isolate hanno mostrato la capacità di differenziare in tre diverse linee cellulari suggerendo la possibilità del loro impiego come metodica alternativa ed innovativa anche in capo ortopedico-traumatologico.

La cartilagine presenta una minima o nulla capacità di autorigenerazione, condizione fisiologica che nel tempo determina una progressiva limitazione funzionale, culminando in un danno articolare permanente ed invalidante. Come si evince dai pregressi studi *in vitro* ed *in vivo*¹⁴⁻¹⁶ le cellule staminali mesenchimali adulte hanno mostrato di possedere un'importante capacità rigenerativa, plastica ed antinfiammatoria, suscitando pertanto un crescente interesse in ricercatori e clinici. Lo sviluppo di terapie basate sull'uso di MSC anche nel trattamento dell'OA è in una fase cruciale poiché l'uso delle medesime potrebbe potenzialmente contrastare o ridurre la progressione della malattia e conseguentemente ritardare o prevenire la successiva sostituzione protesica^{17,18}. La possibilità, inoltre, di usare MSC provenienti da diversi fonti dello stesso individuo, soprattutto se anziani, e quindi prevalentemente colpiti da OA, potrebbe risolvere il problema del reperimento di abbondanti quantità di MSC ed i vincoli legati ad un eventuale trapianto non autologo³⁰. Nel nostro studio abbiamo prelevato il tessuto adiposo ed il tessuto midollare durante l'intervento di protesi d'anca o ginocchio in pazienti anziani affetti da OA con un minimo o nullo discomfort aggiunto per il paziente e in quantità necessaria ad eseguire una caratterizzazione *in vitro* delle cellule. Come è stato già dimostrato da studi precedenti^{11,31} un aspetto importante da considerare, per ottenere una buona caratterizzazione, è la quantità di tessuto iniziale dalla quale isolare le MSC. Nel nostro studio abbiamo cercato di ottenere almeno 10g di tessuto adiposo e 5cc di midollo osseo al fine di ottenere un numero consistente di cellule vitali da poter processare. Abbiamo inoltre dimostrato come le cellule isolate dai due tessuti rispondessero ai tre criteri della International Society for Cellular Therapy. Dopo l'isolamento, infatti, le cellule ottenute tramite digestione enzimatica per il tessuto adiposo e gradiente di densità per il tessuto midollare, hanno iniziato ad aderire alla plastica delle flask di coltura, assumendo una morfologia allungata tipica delle cellule staminali mesenchimali, sino raggiungere in pochi giorni una confluenza tale da poter essere espanse. La crescita esponenziale durante il periodo di coltura cellulare si è inoltre mantenuta nel tempo. Le stesse cellule sono state inoltre trattate con tre diversi terreni di coltura (adipogenico, osteogenico, condrogenico) dalle 2 alle 3 settimane,

periodo durante il quale si evidenziava al microscopio un cambiamento della morfologia delle stesse con il passare dei giorni, ed infine la trasformazione nelle tre linee desiderate mediante colorazione istochimica. Si è osservato infatti l'accumulo di vacuoli adipocitici mediante colorazione con Oil-Red-O, la presenza di matrice calcica mediante Alizarin Red e la deposizione di collagene mediante colorazione con Alcian Blue, a testimonianza dell'avvenuta differenziazione sia da parte del tessuto adiposo che da parte del tessuto midollare.

È stato infine valutato il terzo criterio della ISCT: l'espressione di un fenotipo di superficie mesenchimale, dato dalla presenza di marcatori mesenchimali e contemporanea assenza di marcatori non mesenchimali. Gli Autori hanno dimostrato come le cellule isolate dai loro campioni avessero un immunofenotipo mesenchimale, poiché esprimevano marcatori di superficie specifici, rispettivamente CD90, CD105, CD44, con la contemporanea assenza dei marcatori non specifici, ovvero CD31, CD34, CD45. In relazione ai singoli tessuti, possiamo quindi asserire che la popolazione di cellule staminali mesenchimali estratte dal tessuto adiposo, in termini di morfologia, resa e vitalità cellulare, fenotipo di superficie e potenziale differenziativo, è sovrapponibile alla popolazione ottenuta dal midollo osseo che sino ad oggi è stata storicamente considerata come il "Gold Standard"²¹⁻²⁵.

Conclusioni

In conclusione, questo studio supporta l'ipotesi principale degli Autori, ovvero che anche nei pazienti anziani sia possibile isolare cellule mesenchimali adulte con caratteristiche e potenzialità di *stemness* equivalenti a quello che si riscontrerebbe in pazienti più giovani con caratteristiche finali di ASC e BM-MC pressoché sovrapponibili. La possibilità di isolare cellule staminali mesenchimali adulte da pazienti anziani e affetti da patologia osteoartrosica, apre un nuovo fronte in campo ortopedico a terapie cellulari innovative e più avanzate, che potrebbero supportare o anche sostituire le terapie già esistenti. Questo studio supporta il potenziale ruolo che le MSC potrebbero avere in campo rigenerativo, con il vantaggio inoltre di poter essere estratte da diverse fonti dallo stesso paziente, sfruttando quindi anche delle eventuali proprietà tessuto-specifiche²⁶⁻²⁹. Futuri studi in materia dovranno concentrare il proprio obiettivo su rendere accessibile a tutti i pazienti, a prescindere dall'età, un trattamento autologo con cellule staminali.

Ringraziamenti

Le borse di studio SIOT rappresentano la più concreta offerta di investimento sui giovani professionisti appassionati di ricerca in campo ortopedico e traumatologico.

Ringrazio pertanto la mia Società madre che mi ha dato la possibilità di volare negli States e il mio Direttore di Scuola, il Prof. Vittorio Calvisi, per avermi supportato in questa esperienza. E ovviamente il più affettuoso ringraziamento lo rivolgo al Prof. Pier Francesco Indelli e alle Dottoresse Erika Leonardi e Eleonora Migliore che mi hanno accolto e pazientemente incoraggiato e spronato a *crescere* durante il mio periodo di studio presso una delle università con più alta produzione scientifica di qualità al mondo.

Bibliografia

- ¹ Veronese N, Cereda E, Maggi S, et al. Osteoarthritis and mortality: A prospective cohort study and systematic review with meta-analysis. *Semin Arthritis Rheum* 2016;46:160-167. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2016.04.002>
- ² Chu CR, Beynon BD, Buckwalter JA, et al. Closing the gap between bench and bedside re-search for early arthritis therapies (EARTH): report from the AOSSM/NIH U-13 Post-Joint Injury Osteoarthritis Conference II. *Am J Sports Med* 2011;39:1569-78. <https://doi.org/10.1177/0363546511411654>
- ³ Anderson DD, Chubinskaya S, Guilak F, et al. Post-traumatic osteoarthritis: improved understanding and opportunities for early intervention. *J Orthop Res* 2011;29:802-9. <https://doi.org/10.1002/jor.21359>
- ⁴ Kang JW, Kang KS, Koo HC, et al. Soluble Factors-Mediated Immunomodulatory Effects of Ca-nine Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells AND Development* 2008;681-694. <https://doi.org/10.1089/scd.2007.0153>
- ⁵ Gonzalez-Rey E, Gonzalez MA, Varela N, et al. Human adipose mesenchymal cells reduce inflammatory and T cell responses and induce regulatory T cells in vitro in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2010(69):241-248. <https://doi.org/10.1136/ard.2008.101881>
- ⁶ Diekmann BO, Guilak F. Stem cell-based therapies for osteoarthritis: Challenge and opportunities. *Curr Opin Rheumatol* 2013;25(1):119-126. <https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e32835aa28d>
- ⁷ Palumbo P, Lombardi F, Siragusa G, et al. Methods of isolation, characterization and expansion of human adipose-derived stem cells (ASDs): an overview. *Int J Mol Sci* 2018;19:1897. <https://doi.org/10.3390/ijms19071897>
- ⁸ Rossi M, Alviano F, Bonsi L, et al. In vitro multilineage potential and immunomodulatory properties of adipose derived stromal/stem cells obtained from nanofat lipoaspirates. *CellR4* 2016(4);e2212.
- ⁹ Indelli PF, Morello F, Ghirardelli S, et al. No clinical differences at the two-year follow-up between Single radius and j-curve medial pivot total knee arthroplasty in the treatment of neutral or varus knees. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2020;28:3949-3954. <https://doi.org/10.1007/s00167-020-05854-4>
- ¹⁰ Graceffa A, Indelli PF, Latella L, et al. Clinical outcome of design modifications to the CLS Sporo-torno Stem in total hip replacement. *Joints* 2016;4:134-141. <https://doi.org/10.11138/jts/2016.4.3.134>
- ¹¹ Leonardi E, Indelli PF. In vitro Isolation and Characterization of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) from Lipoaspirate: a new Preclinical Protocol. *Aperito J Cell Mol Biol* 2016, 2:1.
- ¹² Seeligmüller N. Isolamento più rapido di PBMC utilizzando Ficoll-Paque® Plus nelle centrifughe da banco polivalenti 5920 R e 5910 R di Eppendorf. Application note n. 372 (https://www.eppendorf.com/product-media/doc/it/169514/Eppendorf_Centrifugation_Application-Note_372_Centrifuge-5920-R_Centrifuge-5910-R-Faster-Isolation-PBMC-Ficoll-Paque-Plus-Eppendorf-Multipurpose-Benchtop-Centrifuges-5920-R-5910-R.pdf last access Apr 19, 2020)
- ¹³ Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy* 2013;641-648. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.02.006>
- ¹⁴ Richardson SM, Kalamegam G, Pushparaj PN, et al. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: Focus on articular cartilage and intervertebral disc regeneration. *Methods* 2016;69-80. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.09.015>
- ¹⁵ Chen Y, Shao JZ, Xiang LX, et al. Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;815-820. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.01.007>
- ¹⁶ Manunta AF, Zedde P, Cudoni S, et al. Early joint degeneration and antagonism between growth factors and reactive oxygen species. Is nonsurgical management possible? *Joints* 2015;3:123-128. <https://doi.org/10.11138/jts/2015.3.3.123>
- ¹⁷ Gimple JM, Bunnell BA, Chiu ES, et al. Concise review: Adipose-derived stromal vascular fraction cells and stem cells: let's not get lost in translation. *Stem Cells* 2011;29:749-754. <https://doi.org/10.1002/stem.629>
- ¹⁸ Pipino G, Risitano S, Alviano F, et al. Microfractures and hydrogel scaffolds in the treatment of osteochondral knee defects: A clinical and histological evaluation. *J Clin Orthop Trauma* 2019;10:67-75. <https://doi.org/10.1016/j.jcot.2018.03.001>
- ¹⁹ Michalek J, Dudasova Z, Kristova Z, et al. Stem cell therapy of Osteoarthritis using stromal vascular fraction cells-proceeding of the STEMSO conference. *CellR4* 2014;2(1):e778.
- ²⁰ Suire C, Brouard N, Simmons PJ. Isolation of the stromal-vascular fraction of mouse bone marrow markedly enhances the yield of clonogenic stromal progeni-

- tors. *Blood* 2012;119:e86-e95. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-372334>
- 21 Riordan NH, Ichim TE, Min W, et al. Non-expanded adipose stromal vascular fraction cell therapy for multiple sclerosis. *J Transl Med* 2009;7:29. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-7-29>
 - 22 Premaratne GU, Ma L, Fujita M, et al. Stromal vascular fraction as an alternative therapy for ischemic heart failure: Anti-inflammatory role. *J Cardiothorac Surg* 2011;6:43. <https://doi.org/10.1186/1749-8090-6-43>.
 - 23 Ciurlia E, Puddu L, Caggiari G, et al. Peri-prosthetic humeral non-union: where biology meets bio-mechanic. A case report. *Int J Surg Case Rep* 2017;39:102-105. <https://doi.org/10.1016/j.ijscr.2017.08.001>
 - 24 Requicha JF, Viegas CA, Albuquerque CM, et al. Effect of anatomical origin and cell passage number on the stemness and osteogenic differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Stem Cell Rev Rep* 2012;1211-1222. <https://doi.org/10.1007/s12015-012-9397-0>
 - 25 Wang DW, Fermor B, Gimble JM. Influence of oxygen on the proliferation and metabolism of adipose derived adult stem cells. *Journal of Cellular physiology* 2005;204:184-191. <https://doi.org/10.1002/jcp.20324>.
 - 26 Stolzing A, Jones E, McGonagle D, et al. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mech Ageing Dev* 2008;129:163-173. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2007.12.002>
 - 27 Zaim M, Karaman S, Cetin G, et al. Donor age and long-term culture affect differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Ann Hematol* 2012;91:1175-1186. <https://doi.org/10.1007/s00277-012-1438-x>
 - 28 Stenderup K, Justesen J, Clausen C, et al. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* 2003;919-926. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2003.07.005>
 - 29 De Girolamo L, Lopa S, Arrigoni E, et al. Human adipose-derived stem cells isolated from young and elderly women: their differentiation potential and scaffold interaction during in vitro osteoblastic differentiation. *Cytotherapy* 2009;11:793-803. <https://doi.org/10.3109/14653240903079393>
 - 30 Ferracini R, Roato I, Maccari L, et al. L'uso di cellule staminali di derivazione adiposa in Ortopedia. Indicazioni e limiti normativi. *Giornale Italiano di Ortopedia e Traumatologia* 2020;46:3-8. doi 10.32050/0390-0134-188
 - 31 Vakharia RM, Roche MW, Alcerro JC, et al. The current status of cell based therapies for primary knee osteoarthritis. *Orthop Clin N Am* 2019;50:415-423. <https://doi.org/10.1016/j.ocl.2019.06.001>