



Le cellule staminali mesenchimali nel trattamento delle condropatie del ginocchio

A. Grazioli¹, G. Scaravilli¹, F. Di Maggio², G. Bove³, M. Italiano¹, R. Pezone¹, B. Di Maggio^{1,a} (✉)

¹U.O.C. Ortopedia e Traumatologia, A.S.L. Caserta, P.O. Piedimonte Matese (CE), Italia

²Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli Federico II, Napoli, Italia

³Scuola di Specializzazione Ortopedia e Traumatologia Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli, Italia

^abdimaggio@inwind.it

ABSTRACT – MESENCHYMAL STEM CELLS IN THE TREATMENT OF KNEE CHONDROPATHIES

Osteoarthritis (OA) is the most common joint pathology and it is responsible, in the elderly, for a number of cases of disability higher than those caused by other situations. In last years, “regenerative” treatment techniques for cartilage tissue have met with a broad consensus in orthopaedics. For some time, the function of adipose tissue has been re-evaluated as a real endocrine organ, from which the Stromal Vascular Fraction (SVF) is obtained through specific treatments. It contains the mesenchymal adipose stem cells (AdMSC), which are “multipotent” stem cells. For about 10 years, the use of these cells in the treatment of early osteoarthritis has begun in human medicine, thanks to studies that have shown, among other things, the ability of these cells to regenerate hyaline cartilage.

Publicato online: 17 ottobre 2019

© Società Italiana Ortopedici Traumatologi Ospedalieri d'Italia 2019

Introduzione

Le patologie muscolo-scheletriche sono le principali cause di dolore severo e di disabilità fisica a lungo termine [1]. L'osteoartrosi (OA) è la più comune patologia articolare ed è responsabile, negli anziani, di un numero di casi di disabilità superiore a quelli causati da qualunque altra condizione clinica [2]. L'OA colpisce circa 4 milioni di persone e rappresenta la prima causa di invalidità temporanea e la terza di ricovero ospedaliero. L'incidenza è stimata intorno a 100.000 nuovi casi all'anno, con un costo annuo di circa 7,5 milioni di euro, per diagnosi, terapia e costi di mancata produzione, legati alle assenze lavorative. La probabilità di sviluppare OA aumenta in maniera proporzionale ogni 10 anni a partire dai 45 anni di età. Si stima che oltre il 50% della popolazione al di sopra dei 60 anni sia affetta da OA [3].

Attualmente l'OA non viene più inquadrata come un puro processo degenerativo legato solo ad alterazioni biomeccaniche e/o all'invecchiamento, bensì come espressione patologica dell'usura, della flogosi e dello squilibrio immunologico dell'articolazione [4].

Oggi l'OA è definita come *whole joint disease* [5]. Lo stress cellulare condrocitario indotto da micro- e macro-lesioni conduce alla degradazione della matrice extracellulare, attivando risposte adattative di riparazione, incluse le vie di im-

munità innata pro-infiammatorie, e inserendosi in un quadro globale di interessamento dell'intera articolazione: 1) infiammazione e secondaria iperplasia della sinovia; 2) alterazioni della viscoelasticità del liquido sinoviale (riduzione della concentrazione e del peso molecolare dell'acido ialuronico); 3) sclerosi subcondrale; 4) slaminamento dei menischi; 5) retrazione dei legamenti; 6) ipertrofia della capsula articolare; e 7) alterazioni dei muscoli periarticolari e dei nervi [6]. Tale meccanismo si autoperpetua nel circolo vizioso dell'OA.

Fatte queste doverose premesse, ci concentriamo sulla patologia osteoartrosica del ginocchio e sull'importanza, ai fini terapeutici, di inquadrare lo stadio precoce dell'OA, la cosiddetta *Early OA* (Fig. 1).

L'Early OA è per il chirurgo ortopedico condizione molto comune con cui si confronta quotidianamente e per la quale si avvale di trattamenti conservativi per ottenere un miglioramento della limitazione funzionale, della rigidità, del dolore e anche un rallentamento della progressione della malattia. Lo studio radiografico, insieme alla presenza di segni e sintomi clinici sono alla base della classificazione e diagnosi dell'OA.

I sistemi di classificazione più frequentemente usati per la diagnosi radiografica sono:

Fig. 1 - Definizione e classificazione di Early OA del ginocchio

Early OA

Early OA		
Three criteria		
1	Knee pain	At least two episodes of pain for >10 days in the last year
2	Standard radiographs	Kellgren–Lawrence grade 0 or I or II (osteophytes only)
3	At least one	ICRS grade I-IV in at least two compartments or grade II-IV in one compartment with surrounding softening and swelling
	Arthroscopy	
	MRI	
At least two		
Cartilage morphology WORMS 3–6		
Cartilage BLOKS grade 2 and 3		
Meniscus BLOKS grade 3 and 4		
BMLs WORMS 2 and 3		

Fig. 2 - Criteri radiografici di Ahlbäck

Deterioramento radiografico
Criteri di Ahlbäck

Grado 0: normale.

Grado 1: restringimento rima articolare < 50%.

Grado 2: restringimento rima articolare > 50%.

Grado 3: obliterazione spazio articolare / osteofiti sclerosi ossea. e

Grado 4: presenza di erosione ossea / cisti ossee.

Ahlbäck S., Acta Radiol. Supplementum,
1968

- *Kellgren and Lawrence system* for classification of osteoarthritis of knee (Fig. 2)
- *Ahlbäck classification* of osteoarthritis of the knee joint (Fig. 3)

Per la diagnosi clinico-radiografica viene, invece, comunemente usata l'*ACR Clinical Classification Criteria* for osteoarthritis of the knee (Fig. 4).

Materiali e metodi

Negli ultimi anni le tecniche di trattamento “rigenerativo” per il tessuto cartilagineo sono andate incontro a un ampio consenso in ambito ortopedico poiché hanno il vantaggio, rispetto a quelle “riparative”, di ricreare potenzialmente tessuti con caratteristiche più simili, se non addirittura sovrapponibili, a quelle della cartilagine ialina.

Da molti anni si è rivalutata la funzione del tessuto adiposo che, da semplice riserva energetica, è diventato organo endocrino vero e proprio. È stato accertato infatti, da studi in medicina umana, che il tessuto adiposo è coinvolto nella regolazione di funzioni cellulari di molti organi attraverso diversi segnali endocrini, paracrini e autocrini. Questa attività è espletata da tutti i componenti cellulari del tessuto adiposo, in particolare dagli adipociti e dalla frazione stromale vascolare (*Stromal Vascular Fraction, SVF*).

La SVF non è altro che quel reticolo di tessuto connettivo (stroma) e di vasi che sostengono le cellule adipose e che contiene anche cellule staminali mesenchimali. Attraverso metodi meccanici o enzimatici si isola la frazione stromale ottenendo così sia cellule staminali vere e proprie (*Adipose Mesenchymal Stem Cells, AdMSC*), sia la SVF, consistente in una popolazione eterogenea di cellule stromali adipose, cellule staminali ematopoietiche, cellule endoteliali, fibrobla-

Fig. 3 - Criteri radiografici di Kellegren-Lawrence

Criteri di Kellegren-Lawrence

Grado 0: normale

Grado 1: dubbio restringimento / Possibili osteofiti

Grado 2: possibile restringimento / Definiti osteofiti

Grado 3: restringimento definito / Modesti multipli osteofiti / Sclerosi e Possibile deformità ossea

Grado 4: restringimento marcato/ Osteofiti evidenti Sclerosi / Deformità ossea

KELLEGREN J.H., LAWRENCE J.S., *Ann Reum Dis*, 1957

Fig. 4 - Criteri di classificazione ACR

American College of Rheumatology criteria for classification of idiopathic osteoarthritis of knee joints

Clinical and laboratory	Clinical and radiographic
Knee pain + at least 5 of 9	Knee pain + osteophytes on radiography + at least 1 of 3
1. Age > 50 years	1. Age > 50 years
2. Stiffness < 30 min	2. Stiffness < 30 min
3. Crepitus	3. Crepitus
4. Bony tenderness	
5. Bony enlargement	
6. No palpable warmth	
7. ESR < 40 mm/h	
8. RF < 1: 40	
9. White blood cell count < 2000/mm ³	

sti, linfociti, eritrociti, monociti/macrofagi e periciti. Queste cellule sono subito pronte all'uso, senza la necessità di dover essere trattate.

La SVF fu utilizzata inizialmente in combinazione con l'acido ialuronico (HA) in pazienti con OA per indurre la rigenerazione della cartilagine. I primi risultati di un follow-up a 3 mesi furono pubblicati nel 2011: 1) miglioramento della sintomatologia (valutato con il punteggio VAS); 2) miglioramento del range di movimento; e 3) rigenerazione della cartilagine valutata con risonanza magnetica (MRI).

Da allora, numerosi studi clinici hanno confermato l'efficacia della SVF per il trattamento dell'OA [7], grazie alle seguenti proprietà:

- capacità di rigenerazione della cartilagine [8]

- inibizione delle funzioni macrofagiche coinvolte nel processo infiammatorio dell'OA [9]
- produzione di citochine antiinfiammatorie [10]
- incremento del contenuto di GAG nella cartilagine ialina [11].

I grossi vantaggi dell'uso delle cellule mesenchimali di origine adiposa (ASC) sono rappresentati dalla grande disponibilità nel corpo con minima morbilità del sito donatore; minore morbilità rispetto alle cellule ottenute da altre sedi come, ad esempio, il midollo osseo (le *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*, BMMSC); l'assenza di limiti d'età per il prelievo, l'effetto paracrino sui condrociti autologhi (TGF- β , VEGF, BMP-6, PDGF) [12]. Dal punto di vista pratico, inoltre, la preparazione di SVF consente il prelievo e la preparazione estemporanea durante la stessa seduta operatoria

riducendo sensibilmente i costi rispetto ad altre colture purificate di (*Multipotent Stromal Cells*, MSC) come le BMSC [13].

Il sistema di raccolta e processazione del lipoaspirato utilizzato presso la nostra U.O.C. è il Lipogems. Si tratta di un sistema enzyme-free, che prevede cioè la separazione meccanica atraumatica, in un sistema chiuso di lavaggio continuo, del lipoaspirato, riducendolo in cluster di 0,2–0,8 mm, eliminando residui ematici e oleosi [14]. Si garantisce, così, il mantenimento delle nicchie vasculo-stromali che fungeranno da scaffold tridimensionale avvolto da una rete vascolare in cui le cellule protette sopravvivono più a lungo. Il campione ottenuto è un campione omogeneo di cellule staminali mesenchimali non depotenziate, maggiormente sensibili agli stimoli del tessuto ospite. Infine, ma non meno importante, essendo un sistema chiuso si riduce il rischio di contaminazione.

L'intervento viene eseguito in sala operatoria e in totale asepsi. La tecnica utilizzata prevede un'anestesia locale con lidocaina 2% e adrenalina in regione periombelicale controlaterale al ginocchio da trattare, segue il prelievo del tessuto adiposo e il caricamento del reattore, del sistema Lipogems. Il tessuto adiposo microfratturato e microfiltrato ottenuto (circa 10–12 cc) viene infiltrato in accurata asepsi nel ginocchio, attraverso accessi antero-mediale, antero-laterale e nello sfondato sovra-rotuleo.

Ai fini del successo di una tecnica è fondamentale l'accurata selezione dei pazienti. Sono stati trattati pazienti con OA in I, II grado secondo l'Ahlbäck Radiological Classification, che non avevano risposto a trattamento farmacologico e/o infiltrativo con acido ialuronico per almeno tre-cinque mesi. Sono stati esclusi dal trattamento pazienti con malattie metaboliche, neoplasie maligne, infezioni articolari o periarticolari, sinovite reattiva, malallineamento in varo o in valgo superiore a 15°, storia di traumi recenti (es. lesioni legamentose e/o meniscali).

Il protocollo postoperatorio ha previsto: a) divieto di carico sull'arto inferiore trattato per 7 giorni; b) terapia con EBPM per 12 gg; e c) fascia elastica di contenzione addominale per 7 giorni.

Da gennaio 2018 a giugno 2019 sono stati trattati presso la nostra U.O.C. 64 pazienti, di cui 38 donne e 26 uomini; età media: 54,5 anni per le donne e 56,5 per gli uomini.

I pazienti sono stati sottoposti alla VAS per la valutazione rapida della risposta del dolore al trattamento e al questionario *Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score* (KOOS) [15]. Quest'ultimo, grazie all'inclusione di due diverse aree che indagano su una vasta gamma di livelli di attività sia della vita quotidiana sia dell'attività sportiva, risulta completo e adatto al nostro studio trattandosi di pazienti relativamente giovani con grossa variabile di performance sportiva.

Il follow-up è stato a 9 mesi: con controlli a 3, 6, 9 mesi; includendo chiaramente i pazienti trattati da gennaio a settembre 2018.

Risultati

- Nessuna reazione avversa è stata osservata nei pazienti in esame
- VAS: nell'80% dei pazienti da 5–7 è passata a 1–3
- KOOS: l'85% dei pazienti ha mostrato un incremento dei valori ai controlli a 9 mesi:
 - *sintomi*: miglioramento dell'estensione e della flessione del ginocchio
 - *rigidità*: lieve, presente solo dopo il risveglio mattutino
 - *dolore*: notevole miglioramento, specie camminando su superficie piana o salendo e scendendo le scale
 - *funzionamento, attività quotidiane*: maggiore fluidità di movimento nello svolgimento dei lavori domestici
 - *funzionamento, sport e attività ricreative*: miglioramento delle performance sportive, passando da un medio grado di difficoltà a uno lieve (corsa)
 - *qualità di vita*: riduzione dell'attenzione al problema del ginocchio
- Tale miglioramento è persistente nel tempo: in tutti i nostri pazienti a 9 mesi permangono i benefici
- Il 50% dei pazienti con patologia bilaterale ha trattato anche l'altro ginocchio o è in lista per farlo.

Conclusioni

Le cellule staminali mesenchimali sono un regalo della natura che la medicina sta imparando a conoscere e utilizzare; hanno la potenzialità di differenziarsi e diventare qualsiasi cosa di cui il nostro organismo abbia bisogno: muscolo, tendine, osso; rappresentano degli attori di riparazione e delle piccole farmacie che distribuiscono anti-infiammatori.

Il sistema Lipogems è una procedura intraoperatoria facile, sicura ed efficace. Non sono stati osservati eventi avversi; una singola infiltrazione è stata sufficiente per determinare un miglioramento significativo della situazione clinica nei pazienti con stadio I e II di Ahlbäck e tale miglioramento è risultato persistente nel tempo. Concludendo, i dati raccolti fino ad oggi sono indicativi di una buona efficacia nel trattamento delle forme precoci di osteoartrosi di ginocchio a fronte di un bilancio costi/benefici fortemente a favore dei secondi.

CONFLITTO DI INTERESSE Gli autori A. Grazioli, G. Scaravilli, F. Di Maggio, G. Bove, M. Italiano, R. Pezone, B. Di Maggio dichiarano di non aver alcun conflitto di interesse.

CONSENSO INFORMATO E CONFORMITÀ AGLI STANDARD ETICI Tutte le procedure descritte nello studio e che hanno coinvolto essere umani sono state attuate in conformità alle norme etiche stabilite dalla dichiarazione di Helsinki del 1975 e successive modifiche. Il consenso informato è stato ottenuto da tutti i pazienti inclusi nello studio.

HUMAN AND ANIMAL RIGHTS L'articolo non contiene alcuno studio eseguito su esseri umani e su animali da parte degli autori.

Bibliografia

1. Bone E, Health J (2005) Strategies Project. European Action Toward Better Musculoskeletal Health. http://ec.europa.eu/health/ph_projects/2000/promotion/fp_promotion_2000_frep_15_en.pdf. Accessed 21 Dec 2018
2. European Opinion Research Group EEIG (2003) Health, food and alcohol and safety. Special Eurobarometer 186. http://ec.europa.eu/health/ph_determinants/life_style/alcohol/documents/ebs_186_en.pdf. Accessed 21 Dec 2018
3. Ciocci A, Mauceri T (1994) Epidemiologia e costi sociali dell'artrosi in Italia: dati recenti. *Reumatismo* 46:14–20
4. Moldovan F, Pelletier JP, Mineau F, Dupuis M, Cloutier JM, Martel-Pelletier J (2000) Modulation of collagenase 3 in human osteoarthritic cartilage by activation of extracellular transforming growth factor beta: role of furin convertase. *Arthritis Rheum* 43(9):2100–2109
5. Man GS, Mologhianu G (2014) Osteoarthritis pathogenesis—a complex process that involves the entire joint. *J Med Life* 7(1):37–41
6. Lv X, He J, Zhang X et al (2018) Comparative efficacy of autologous stromal vascular fraction and autologous adipose-derived mesenchymal stem cells combined with hyaluronic acid for the treatment of sheep osteoarthritis. *Cell Transplant* 27(7):1111–1125
7. Pak J (2011) Regeneration of human bones in hip osteonecrosis and human cartilage in knee osteoarthritis with autologous adipose-tissue-derived stem cells: a case series. *J Med Case Rep* 5:296
8. Pak J, Lee JH, Pak N et al (2018) Cartilage regeneration in humans with adipose tissue-derived stem cells and adipose stromal vascular fraction cells: updated status. *Int J Mol Sci* 19(7):2146
9. Ceserani V, Ferri A, Berenzi A et al (2016) Angiogenic and anti-inflammatory properties of micro-fragmented fat tissue and its derived mesenchymal stromal cells. *Vasc Cell* 8:3
10. Damia E, Chicharro D, Lopez S et al (2018) Adipose-derived mesenchymal stem cells: are they a good therapeutic strategy for osteoarthritis. *Int J Mol Sci* 19(7):E1926
11. Hudetz D, Borić I, Rod E et al (2017) The effect of intra-articular injection of autologous microfragmented fat tissue on proteoglycan synthesis in patients with knee osteoarthritis. *Genes* 8(10):E270
12. Tremolada C, Palmieri G, Ricordi C (2010) Adipocyte transplantation and stem cells: plastic surgery meets regenerative medicine. *Cell Transplant* 19(10):1217–1223
13. Wu L, Cai X, Zhang S et al (2013) Regeneration of articular cartilage by adipose tissue derived mesenchymal stem cells: perspectives from stem cell biology and molecular medicine. *J Cell Physiol* 228(5):938–944
14. Bianchi F, Maioli M, Leonardi E et al (2013) A new nonenzymatic method and device to obtain a fat tissue derivative highly enriched in pericyte-like elements by mild mechanical forces from human lipoaspirates. *Cell Transplant* 22(11):2063–2077
15. Monticone M, Ferrante S, Salvaderi S et al (2012) Development of the Italian version of the knee injury and osteoarthritis outcome score for patients with knee injuries: cross-cultural adaptation, dimensionality, reliability, and validity. *Osteoarthr Cartil* 20(4):330–335