



## **Cellule staminali mesenchimali di tessuto adiposo (hASCs) differenziano in cellule osteoblasto-simili su scaffold di titanio trabecolare**

Consigliere P.<sup>1</sup>, Asti A.<sup>1</sup>, Gastaldi G.<sup>2</sup>, Benazzo F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Clinica Ortopedica e Traumatologica, Università degli Studi di Pavia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italia e*

<sup>2</sup>*Dipartimento di Scienze Morfologiche, Eidologiche e Cliniche, Sezione di Fisiologia, Università degli Studi di Pavia, Pavia Italia*

### **INTRODUZIONE**

I danni a carico dello scheletro con perdita di tessuto possono riscontrarsi in molteplici circostanze tra le quali traumi, trattamenti chirurgici per patologia tumorale, patologie a carico dello scheletro. Le metodiche ricostruttive messe in atto per ricreare l'integrità meccanica dello scheletro sono di vitale importanza nell'ottica della riabilitazione del paziente. L'obiettivo che ci si prefigge oggi è di rigenerare il tessuto mancante o lesionato con l'intento di ottenere la riparazione dello stesso preservandone le proprietà fisiche e meccaniche. Il *gold standard* per la ricostruzione ossea è ancora il trapianto autologo di tessuto osseo, sebbene il suo utilizzo sia limitato dalla morbilità in sede di prelievo e dalle ridotte dimensioni del tessuto prelevato.

Un approccio recente e innovativo nel trattamento delle perdite di tessuto osseo è l'utilizzazione di tessuto osseo ingegnerizzato. La sua produzione dipende dalla capacità che hanno alcuni tipi di cellule, una volta poste in vitro, di migrare, proliferare e differenziare in senso osteoblastico. Molti tessuti contengono cellule staminali che possono essere coltivate in laboratorio e, con l'aggiunta di opportuni fattori di crescita, fatte differenziare in una linea cellulare di nostra scelta. Diversi tipi di cellule staminali sono stati utilizzati per l'ingegneria tissutale. Il tessuto adiposo contiene cellule staminali mesenchimali (hASCs) che condividono molte caratteristiche con le cellule staminali mesenchimali derivate dal midollo osseo, come l'elevata capacità proliferativa e la capacità di differenziazione verso le diverse linee mesenchimali. Il prelievo di tessuto adiposo è meno traumatico rispetto a quello del midollo osseo, si può ottenere in maggiore quantità e fornisce un numero maggiore di cellule staminali [1]. Per produrre osso ingegnerizzato è inoltre necessario seminare le cellule su appositi *scaffold*, strutture che ne supportano la crescita e la proliferazione, provvedendo a dare una superficie di adesione alle cellule in crescita [2-3]. Alcuni tipi di *scaffold* sono riassorbibili, vengono cioè sostituiti progressivamente dal tessuto osseo neoformato [4-5].

In questo lavoro, sono stati utilizzati *scaffold* di titanio trabecolare Ti6Al4V che è un biomateriale inerte non riassorbibile con eccellente biocompatibilità ed elevata resistenza meccanica [6]. L'obiettivo di questo lavoro è studiare, con metodi biochimici e morfologici, la capacità delle cellule staminali mesenchimali derivate da tessuto adiposo di aderire, proliferare ed esprimere *markers* specifici dell'osteogenesi quando seminate e fatte crescere su *scaffold* di titanio trabecolare in presenza di terreno osteogenico.

## **MATERIALI E METODI**

### ***Scaffold di titanio trabecolare***

Sono stati utilizzati *scaffold* di titanio trabecolare (Ti6Al4V) forniti dalla ditta Lima (San Daniele del Friuli). Le loro caratteristiche erano le seguenti: altezza 6 mm, diametro 12 mm, dimensione pori 640  $\mu\text{m}$  con una porosità totale del 65%.

### ***Cellule staminali umane derivate da tessuto adiposo (hASCs)***

Il tessuto adiposo sottocutaneo prelevato da pazienti sani nel corso di interventi chirurgici ortopedici di protesi all'anca, veniva finemente sminuzzato e quindi sottoposto a digestione enzimatica per 1 h a 37°C con 0.01% collagenasi di tipo II in terreno DMEM contenente FBS 10%, 100 U.I. di penicillina, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  di streptomina e amfotericina. La sospensione cellulare dopo inibizione della collagenasi con terreno completo è stata centrifugata a 1200 rpm per 10 minuti e il pellet contenente le hASCs risospeso in terreno completo.

### ***Coltura cellulare***

Sette  $\times 10^5$  cellule sospese in medium di espansione (DMEM F12-HAM, 10% FBS, antibiotici e amfotericina) sono state piastrate in fiasche da 75  $\text{mm}^2$  e coltivate in termostato a 37°C, in presenza di  $\text{CO}_2$  al 5%. Il terreno era cambiato ogni tre giorni. Raggiunta la confluenza, le cellule erano staccate dalla fiasca tramite trattamento in tripsina per 5', centrifugate per 10' a 1200 rpm e seminate nuovamente in fiasca alla stessa densità. Questo passaggio è stato ripetuto tre volte (P3).

### ***Caratterizzazione dei markers di superficie CD34/45/73/90/105***

Le hASCs al terzo passaggio erano tripsinizzate e quindi incubate per 30' con anticorpi monoclonali specifici per CD34, CD45, CD73, CD90, CD105, coniugati con fluoresceina isotocianato (FITC) o ficoeritrina;

successivamente erano lavate e risospese in PBS ed analizzate con un citofluorimetro a flusso (FACstar, Becton Dickinson). La fluorescenza aspecifica era valutata incubando le cellule con anticorpo monoclonale anti-IgG umana.

#### ***Differenziazione osteogenica delle cellule***

Al terzo passaggio le hASCs, a confluenza, erano tripsinizzate, risospese in terreno di espansione e quindi seminate sugli *scaffold* di titanio trabecolare e lasciate aderire per due ore prima dell'aggiunta di terreno di espansione. Gli *scaffold*, posti in piastre *multi-well* da 12, erano quindi messe in termostato nelle condizioni descritte sopra. Dopo 24 ore dalla semina, per indurre la differenziazione osteogenica, a metà delle piastre contenenti gli *scaffold* era aggiunto terreno osteogenico (DMEM/F12/HAM contenente 15% di FBS, 10 mM beta-glicerofosfato, 100 nM di desametasone, 0.05 mM di acido ascorbico, antibiotici e amfotericina); alla rimanente metà degli *scaffold* era aggiunto terreno di espansione come controllo.

#### ***Metodi per la valutazione della differenziazione osteogenica***

- *Colorazione di von Kossa*. Il deposito di matrice mineralizzata nelle colture in *monolayer* era valutata qualitativamente con la colorazione di von Kossa alla fine del periodo di coltura (14, 21 giorni). Le cellule erano fissate con una soluzione al 50% di etanolo e al 18% di formaldeide per 30 minuti; le colture erano poi incubate con nitrato d'argento al 5% e sottoposte a raggi UV per 30'; alla fine le colture erano lavate con acqua bidistillata ed incubate con una soluzione al 5% di tiosolfato di sodio per 2-5'. Granuli di colore marrone scuro indicavano la presenza di calcio nella matrice.

- *Attività della fosfatasi alcalina.* Il dosaggio dell'attività della fosfatasi alcalina, secreta dalle cellule in crescita sugli *scaffold* nel terreno di coltura era eseguita con il metodo di Murer et al. (1976). Un'aliquota di terreno è stata prelevata ai giorni 4, 7, 10, 13, 17 e 21 dalle piastre *multi-well* contenenti gli *scaffold* seminati con le hASCs e incubati in terreno di crescita e osteogenico. Le aliquote sono state aggiunte a tampone glicina-NaOH (glicina 50 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, ZnSO<sub>4</sub> 2.5 mM, pH 10.5 e p-nitrofenil-fosfato 11 mM) e incubate a 37°C per 30' in bagno termostato in continua agitazione. Al termine la reazione era bloccata con NaOH 1 M e i campioni letti a 405 nm. I risultati sono espressi come  $\mu$ moli di p-nitrofenolo formato/per numero di cellule seminate sugli *scaffold* [8].
- *Espressione dei geni specifici dell'osso.* L'RNA totale era estratto dalle cellule cresciute sugli *scaffold* e differenziate per 24 e 31 giorni con RNA Bee<sup>TM</sup> Isolation Solvent. Un filamento di cDNA era sintetizzato da 1  $\mu$ g di RNA usando *random primers* e la trascrittasi inversa M-MLV reverse Transcriptase. La PCR (30 s a 96°C, 30 s a 60°C, 30 s a 72°C per 35 cicli seguiti da 7 min a 72°C) è condotta come descritto da Bione et al.[9] con 2.5  $\mu$ l di cDNA usando *primers* specifici per  $\beta$ -actina, collagene di tipo I, osteopontina e osteocalcina sintetizzati in base alle sequenze descritte in letteratura. La trascrizione inversa era eseguita in presenza e in assenza della trascrittasi inversa (controllo negativo). I prodotti di PCR erano separati su gel di agarosio per elettroforesi, colorati con etidio bromuro ed acquisiti con il sistema di acquisizione di immagini Image MASTER VDS. L'analisi densitometrica delle bande era

eseguita con l'ausilio del software Total Lab V 1.11 e i risultati erano espressi come rapporto percentuale della densità delle bande proteina/ $\beta$ actina.

- *Proteine della matrice extracellulare.* Alla fine del periodo di coltura è stata effettuata l'estrazione dei costituenti della ECM negli *scaffold*. Questi ultimi sono stati lavati in PBS per rimuovere il medium di coltura e incubati per 24h a 37°C con 1 mL di tampone Tris-HCl (20 mM Tris-HCl, 4 M GuHCl, 10mM EDTA, 0.066% [w/v] SDS, pH 8.0). Successivamente gli *scaffold* sono stati centrifugati per rimuovere il tampone intrappolato nei pori. La concentrazione totale delle proteine era stata valutata con il *BCA Protein Assay Kit* (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) ed era di  $0.311 \pm 0.013$   $\mu\text{g/mL}$  per gli *scaffold* coltivati con cellule indifferenziate, e di  $0.573 \pm 0.021$   $\mu\text{g/mL}$  per quelli coltivati con cellule differenziate in osteoblasti. Sono state effettuate curve di calibrazione per la valutazione quantitativa del collagene di tipo I e III, della decorina, dell'osteopontina, dell'osteocalcina, dell'osteonectina, della fibronectina e della fosfatasi alcalina. I pozzetti di microtitolazione sono stati coperti con concentrazioni crescenti di ogni proteina purificata da 10 ng a 2  $\mu\text{g}$ , nel *coating buffer* (50mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , pH=9.5) *overnight* a 4°C. Alcuni pozzetti sono stati coperti con siero bovino (BSA) come controllo negativo. Per la quantificazione di ogni proteina della ECM è stato effettuato un test ELISA con 100  $\mu\text{L}$  di ECM estratta precedentemente (20  $\mu\text{g/mL}$  in *coating buffer*). Dopo alcuni lavaggi con PBST (PBS contenente 0.1% (v/v) Tween 20), i pozzetti sono stati bloccati con

200  $\mu\text{L}$  di PBS contenente 2% (w/v) BSA per 2 h a 22°C e successivamente incubati per 1.5 h a 22°C con 100  $\mu\text{L}$  di anticorpi policlonali di Fisher's, anti-collagene di tipo I e III, anti-decorina, anti-osteopontina, anti-osteocalcina, anti-osteonectina e anti-fosfatasi alcalina (1:500 diluito in 1% BSA). Dopo ulteriori lavaggi i pozzetti sono stati incubati per 1 h a 22°C con 100  $\mu\text{L}$  di IgG di capra HRP-coniugato anti-coniglio (1:1000 diluito in 1% BSA). Alla fine del procedimento i pozzetti sono stati incubati con 100  $\mu\text{L}$  di soluzione di sviluppo (tampone citrato-fosfato con substrato di *o*-phenylenediamine diidroclore). La reazione colorimetrica era bloccata con 100  $\mu\text{L}$  di  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5M e l'assorbanza misurata a 490nm con un lettore microplate (BioRad Laboratories).

- *Indagine morfologica mediante microscopia elettronica a scansione (SEM)*. Gli *scaffold* sono stati osservati al tempo 0, 7, 14, 21 giorni, per valutare la biocompatibilità del materiale, le differenze morfologiche e la produzione di matrice extracellulare. La fissazione degli *scaffold* è stata effettuata con glutaraldeide 2.5% e tampone Na cacodilato a pH 7.4 per circa 2 h. Dopo l'immersione dei campioni in solo tampone Na cacodilato per 30' è stato effettuato il processo di disidratazione con la scala degli alcoli (50°-100°); successivamente i campioni essiccati all'aria sono stati metallizzati con oro (grado di purezza 99.9%), sotto un'atmosfera di argon, (Sputter coater, Balzer), in modo da poter permettere un'adeguata ricopertura anche della struttura porosa interna. Le osservazioni sono state effettuate con un microscopio elettronico a scansione, Cambridge Stereoscan, operante a 20kV.

- *Microanalisi a raggi X.* È stata effettuata per individuare la presenza degli elementi chimici e la loro localizzazione all'interno degli *scaffold* dopo un periodo di coltura cellulare di 14 e 21 giorni. Le immagini sono state ottenute con un microscopio elettronico a scansione Cambridge Stereoscan 250.
- *Microscopia elettronica a trasmissione (TEM).* Le differenze morfologiche ultrastrutturali, eventualmente presenti, tra le hASCs coltivate sullo *scaffold* in terreno di crescita ed osteogenico sono state valutate con la TEM. Dopo la fissazione e la disidratazione degli *scaffold*, come riportato per la SEM, i campioni erano infiltrati con epossipropano e poi con una miscela di epossipropano/resina 1:1, 1:3 ed infine solo in resina epossidica (Epon 812). Successivamente è stato effettuato il taglio tramite l'ultramicrotomo. Le sezioni semifini per l'osservazione al microscopio ottico sono state colorate con blu di toluidina, le sezioni fini sono state colorate con acetato d'uranile e citrato di piombo per l'osservazione al microscopio elettronico a trasmissione (ZEISS) operante a 80 kV.
- *Immunofluorescenza.* La presenza di osteopontina e osteocalcina nella matrice extracellulare depositata da hASCs coltivate in *monolayer* in presenza di terreno osteogenico è stata valutata con l'immunofluorescenza. Le colture cellulari in *monolayer* sono state fissate in etanolo al 70% a  $-20^{\circ}\text{C}$  per 10', lavate con 0,1 M PBS e bloccate con BSA al 3% in PBS per 30' a T. ambiente. Le cellule sono state successivamente incubate per 2 h con gli anticorpi specifici, lavate con PBS e incubate per 1 h con l'anticorpo secondario fluorescente.



## **RISULTATI**

### ***Valutazione dei marker di superficie***

L'indagine citofluorimetrica ha rivelato la positività per i noti marcatori delle cellule staminali mesenchimali CD105, CD73, CD90 [10]. I marker CD34 e CD45, comunemente utilizzati come marcatori delle cellule staminali ematopoietiche o progenitrici di cellule endoteliali, sono risultati negativi (figura 1).

### ***Osservazione allo stereomicroscopio***

Le hASCs, raggiunta la confluenza, assumevano un aspetto allungato fibroblasto-simile (figura 2A); quando differenziate nell'apposito *medium* di coltura, assumevano un aspetto tondeggianti osteoblasto-simile.

### ***Colorazione di von Kossa***

La colorazione di von Kossa delle hASCs cresciute in *monolayer* in presenza di terreno osteogenico per 21 giorni evidenziava la presenza di numerosi noduli marrone scuro espressione della presenza di matrice mineralizzata secreta delle cellule differenziate in osteoblasti (figura 2B).

### ***Fosfatasi Alcalina***

L'attività della fosfatasi alcalina (AP) era maggiore nel terreno osteogenico condizionato rispetto a quella nel terreno di controllo; inoltre nel terreno osteogenico cresceva progressivamente nel tempo fino ad un valore massimo intorno a 24 giorni, ed era significativamente maggiore dopo 21 giorni rispetto a 14 giorni di coltura (figura 3).

### ***Espressione dei geni specifici***

L'espressione di alcuni geni caratteristici degli osteoblasti era valutata con RT-PCR dopo 24 e 31 giorni dal differenziamento. L'espressione del collagene di tipo I, proteina che rappresenta circa il 90% delle proteine della

matrice extracellulare nel tessuto osseo e che è secreta precocemente durante il differenziamento, era maggiore a 24 giorni e diminuiva dopo 31 giorni di coltura in terreno osteogenico. L'osteopontina e l'osteocalcina erano presenti dopo 24 giorni e tendevano ad aumentare dopo 31 giorni. L'espressione dell'osteocalcina, caratteristica delle cellule differenziate, era minore rispetto a quella dell'osteopontina (figura 4).

#### ***Estrazione delle proteine della matrice extracellulare***

I costituenti proteici presenti nella ECM prodotta dalle cellule, sia indifferenziate che differenziate, coltivate sugli *scaffold* di titanio sono stati valutati tramite test ELISA. La quantità delle proteine estratte dalla ECM secreta dalle cellule differenziate era sempre maggiore rispetto a quella prodotta dalle hASCs in terreno di crescita con incremento che variava da 1.2 a 2.5 volte. La quantità di fosfatasi alcalina, decorina, osteocalcina e osteopontina era significativamente maggiore ( $p < 0.05$ ) negli *scaffold* con cellule differenziate rispetto a quelli con cellule non differenziate (tabella 1).

#### ***Analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM)***

Questa indagine effettuata sugli *scaffold* di titanio trabecolare seminati con hASCs coltivate per 15 giorni in *medium* di controllo e nel *medium* osteogenico, ha mostrato che le cellule si distribuivano sia sulla superficie (figura 5A) che all'interno dei pori; con i loro processi cellulari coprivano quasi completamente la struttura dello *scaffold* (figura 5B), indicando così che il materiale è biocompatibile. Le hASCs adese allo *scaffold* formavano ponti di matrice extracellulare (ECM) attraverso i pori dello *scaffold* stesso. In queste immagini è possibile osservare che le cellule erano immerse nella propria ECM avente aspetto omogeneo e ben organizzato.

### ***Microanalisi a raggi-X***

La microanalisi a raggi-X dei campioni ha consentito di ottenere lo spettro degli elementi chimici presenti nella matrice extracellulare prodotta dalle cellule cresciute negli *scaffold* in presenza di terreno osteogenico. Gli elementi quantitativamente più rappresentati erano calcio, fosforo e, in minor misura, zolfo (figura 6). L'analisi eseguita sugli *scaffold* seminati con hASCs e cresciute in presenza di terreno di controllo ha messo in evidenza come elemento più rappresentato il titanio, mentre il calcio e il fosfato erano presenti solo in tracce (dati non mostrati).

### ***Analisi al microscopio elettronico a trasmissione (TEM)***

Le hASCs in *monolayer* dopo 7 giorni di coltura nel *medium* di controllo, contenevano vescicole lipidiche nello spazio intracellulare e avevano un aspetto tondeggiante simile al fenotipo degli adipociti maturi. Dopo 21 giorni di coltura, le cellule cresciute nel *medium* osteogenico mostravano molte fibre collagene nello spazio intercellulare (figura 7A); queste ultime mostravano l'aspetto caratteristico provvisto di bandeggiatura. Tra le fibre è stato inoltre possibile osservare filamenti molto sottili che si dipartono dalle fibre stesse, presumibilmente riconducibili a glicosaminoglicani (GAG). Alcune cellule osteoblasto-simili mostrano vescicole contenenti cristalli di idrossiapatite (figure 7B e 7C).

### ***Immunofluorescenza***

La reazione di immunofluorescenza effettuata dopo 21 giorni su *monolayer*, ha evidenziato la presenza di osteocalcina e osteopontina (figure 8A e 8B), che sono le proteine che compaiono tardivamente nella matrice ossea.

## DISCUSSIONE

Il tessuto adiposo è una fonte importante di cellule staminali mesenchimali denominate hASCs. Le cellule che sono state utilizzate in questo lavoro esprimono i marcatori specifici di staminalità mesenchimale CD73, CD105 e CD90 ma non i marcatori delle cellule della linea emopoietica CD34 e CD45, in accordo con i dati di letteratura [15].

L'aggiunta di opportuni fattori al terreno di coltura può sia accelerare la proliferazione dei preadipociti *in vitro* che indurre la differenziazione cellulare in senso osteoblastico, come dimostra la perdita della conformazione morfologica fibroblasto-simile a favore di quella simil-osteoblastica, l'aumentata attività della fosfatasi alcalina e la secrezione di una matrice extracellulare mineralizzata, contenente le proteine della matrice coinvolte nei processi osteogenici quali osteocalcina, osteopontina e collagene di tipo I [11].

L'utilizzo di *scaffold* tridimensionali per l'ingegneria tissutale permette una crescita delle cellule in condizioni più simili a quelle che si hanno *in vivo* rispetto alle colture *monolayer*. Le caratteristiche della superficie del materiale con cui è fatto lo *scaffold* sono determinanti per garantire un ambiente adeguato in cui le cellule possano proliferare [12]. Una superficie porosa con pori di dimensioni comprese tra 400 e 640 $\mu$ m, è ottimale per fornire alle cellule una matrice extracellulare temporanea, che facilita l'adesività, la crescita e la differenziazione cellulare. Anche il tipo di materiale con cui è costruito lo *scaffold*, inducendo nel citoscheletro cambiamenti che possono modificare l'interazione tra le proteine della ECM e la cellula, influenza le reazioni cellulari di adesione, migrazione, proliferazione, differenziazione e apoptosi.

Le hASCs che sono state seminate su *scaffold* di titanio trabecolare sono in grado sia di aderire e proliferare sulla superficie e all'interno dei pori che di differenziarsi in cellule osteoblasto-simili, come è stato dimostrato dalla formazione di una omogenea ECM mineralizzata. La microanalisi a raggi-X, eseguita sugli *scaffold* coltivati in terreno osteogenico per 21 giorni, mostra la presenza di elementi chimici quali calcio e fosforo che vanno a formare fosfato di calcio, l'idrossiapatite. Quest'ultima è la componente inorganica dell'osso composta principalmente da carbonato (4%-8%) e da apatite, caratterizzata da piccoli cristalli piastrino-simili di soli 2-4nm di spessore e 50nm di larghezza. La matrice calcificata include cellule ossee che partecipano al mantenimento e all'organizzazione dell'osso. La presenza di calcio è stata documentata con la colorazione di von Kossa anche nella coltura *monolayer* in terreno osteogenico, mentre in presenza del terreno di crescita non si evidenzia alcun deposito.

La capacità delle hASCs di differenziare in senso osteoblastico è stata confermata anche dallo studio della attività della fosfatasi alcalina, *marker* precoce degli osteoblasti: l'attività era maggiore nel terreno osteogenico condizionato rispetto a quella nel terreno di controllo.

Il dosaggio delle proteine della matrice estratte dagli *scaffold* coltivati per 21 giorni in terreno osteogenico e di controllo conferma il differenziamento delle hASCs in cellule osteoblasto-simili. Il collagene è una proteina essenziale della ECM formata da fibrille composte da catene di molecole di tropocollagene, ciascuna formata da tre eliche di catene aminoacidiche. Il collagene di tipo I compare costituisce circa il 90% delle proteine della matrice del tessuto osseo e compare precocemente durante la fase di proliferazione e di differenziazione degli osteoblasti [13]. Infatti

l'espressione del suo mRNA è maggiore dopo 24 giorni di coltura rispetto a 31 giorni. L'osteopontina è una fosfoproteina glicosilata dell'osso secreta durante i primi stadi dell'osteogenesi prima della mineralizzazione, che lega il calcio e promuove l'attacco cellulare alla matrice dell'osso. L'osteocalcina è prodotta dagli osteoblasti maturi durante il processo di mineralizzazione e lega i minerali dell'osso; è una delle più abbondanti proteine non collageniche e una proteina vitamina K-dipendente. La loro quantità nella matrice secreta dalle cellule differenziate cresciute sugli *scaffold* era maggiore rispetto a quella secreta dalle cellule indifferenziate e l'espressione del loro mRNA aumentava col tempo di coltura, indicando la progressiva trasformazione delle cellule in osteoblasti.

Nella matrice prodotta dalle hASCs cresciute sugli *scaffold* in terreno osteogenico sono presenti anche quantità significativamente più elevate di decorina, membro della famiglia dei proteoglicani della matrice extracellulare considerata una regolatrice dell'assemblaggio e della funzione di molte proteine della ECM [14].

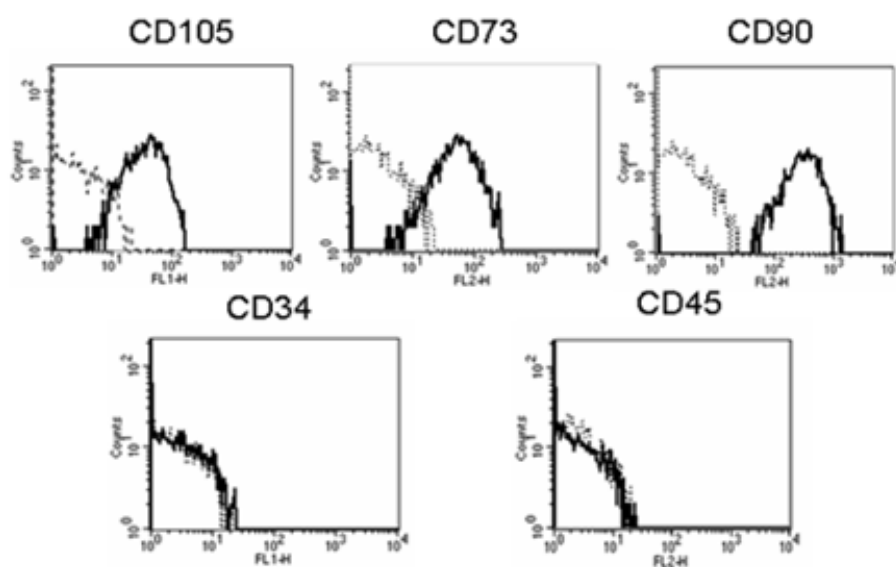
L'indagine morfologica mediante microscopia elettronica a scansione (SEM), effettuata dopo 14 giorni di coltura mostra la presenza di un denso strato di cellule sullo *scaffold* e anche all'interno dei pori dello *scaffold* di titanio trabecolare confermando che questo materiale è biocompatibile e che le dimensioni dei pori sono adeguate per la colonizzazione profonda dello *scaffold* anche in presenza di una coltura statica. Le cellule inoltre già dopo 14 giorni hanno prodotto una grande quantità di matrice nella quale sono inglobate.

L'analisi con microscopio elettronico a trasmissione delle cellule coltivate in *monolayer* per 14 giorni in *medium* osteogenico, ha mostrato la presenza nella matrice extracellulare di fibre collagene riconoscibili per la

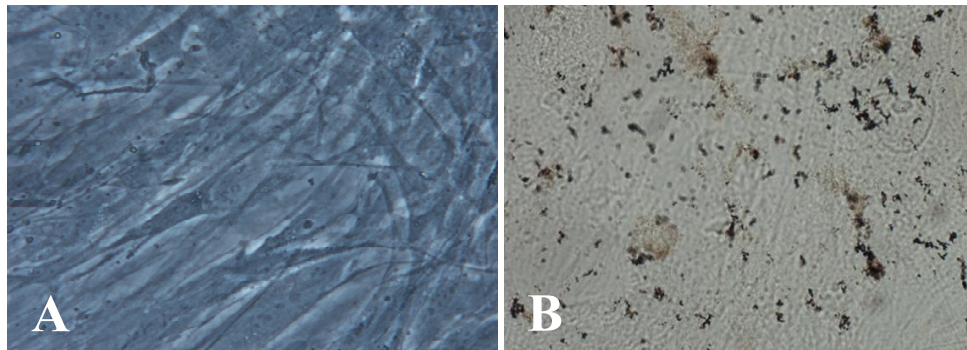
caratteristica bandeggiatura e localizzate negli spazi intercellulari. Possiamo quindi concludere che le hASCs sono cellule adatte alla produzione di tessuto osseo ingegnerizzato: sono infatti capaci di aderire, proliferare e colonizzare uno *scaffold* tridimensionale come quello di titanio trabecolare e inoltre si differenziano in presenza di terreno osteogenico in senso osteoblastico, producendo una ricca matrice extracellulare calcificata.

<b>Proteine della matrice pg/(cell X <i>scaffold</i>)</b>	<b>hASCs Indifferenziate</b>	<b>hASCs Differenziate</b>	<b>hASCs Differenziate/ hASCs Indifferenziate</b>
Fosfatasi alcalina	1.6 ± 0.1	4.0* ± 0.3	2.5
Decorina	15.3 ± 0.4	24.5* ± 0.5	1.7
Fibronectina	1.25 ± 0.2	1.61 ± 0.1	1.3
Osteocalcina	0.30 ± 0.02	0.6* ± 0.05	2.0
Osteonectina	0.5 ± 0.01	0.6 ± 0.01	1.2
Osteopontina	5.32 ± 0.31	7.0* ± 0.13	1.4
Collagene di tipo I	17.0 ± 2.6	26.5 ± 15.1	1.6

**Tabella 1.** Proteine della matrice extracellulare secrete e depositate su *scaffold* di titanio trabecolare coltivati nel *medium* di controllo (hASCs indifferenziate) o nel *medium* osteogenico (hASCs differenziate) (\*Abbreviazioni  $p \leq 0.05$  hASCs differenziate vs hASCs indifferenziate).

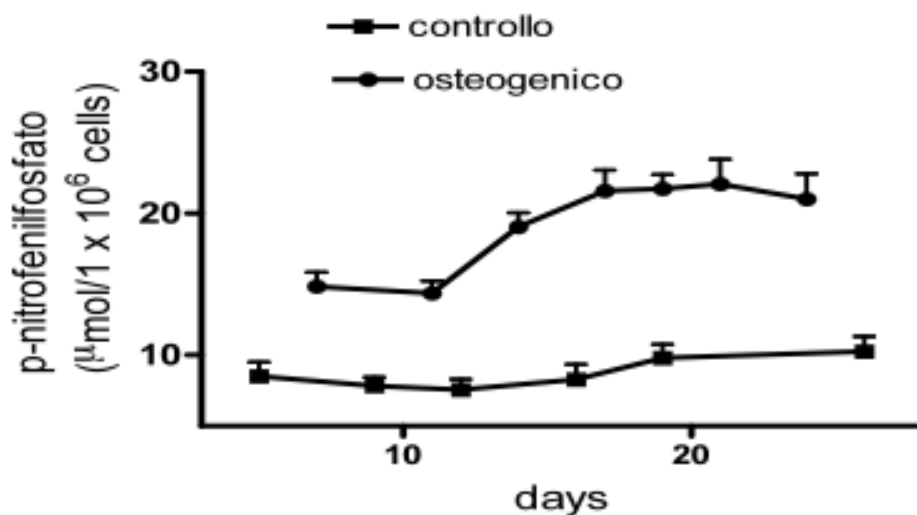


**Figura 1.** *Marker* di superficie. Le hASCs risultano essere positive per i marcatori di staminalità quali i recettori CD105, CD73, CD90 e negative per i marcatori emopoietici CD34 e CD45.

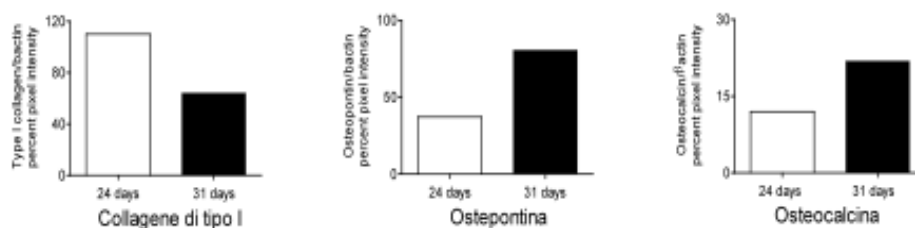


**Figura 2.** **A)** Le hASCs allo stereomicroscopio dopo tre passaggi (P3) in fiasche da 75 cm<sup>2</sup>; **B)** Colorazione di von Kossa. Le cellule sono state coltivate per 21 giorni su *monolayer* in terreno osteogenico.

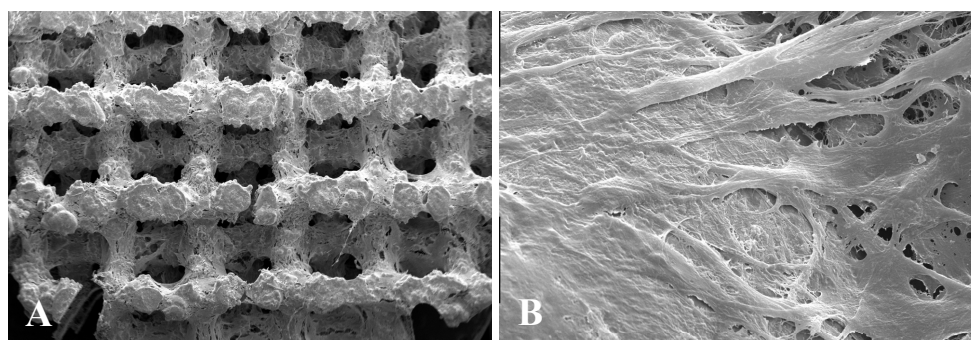




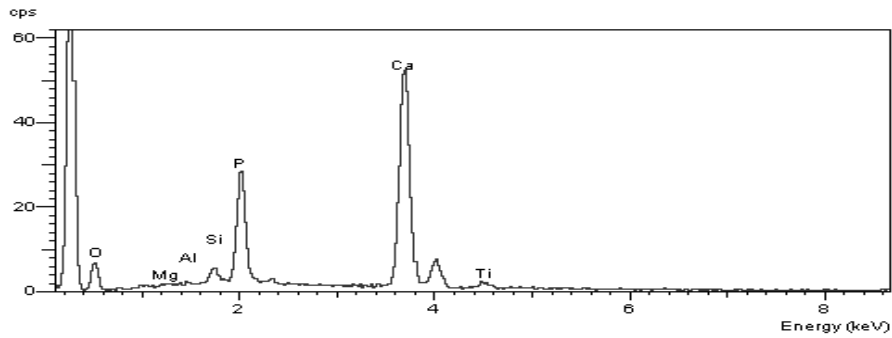
**Figura 3.** Attività della fosfatasi alcalina nel terreno di controllo ed in quello osteogenico.



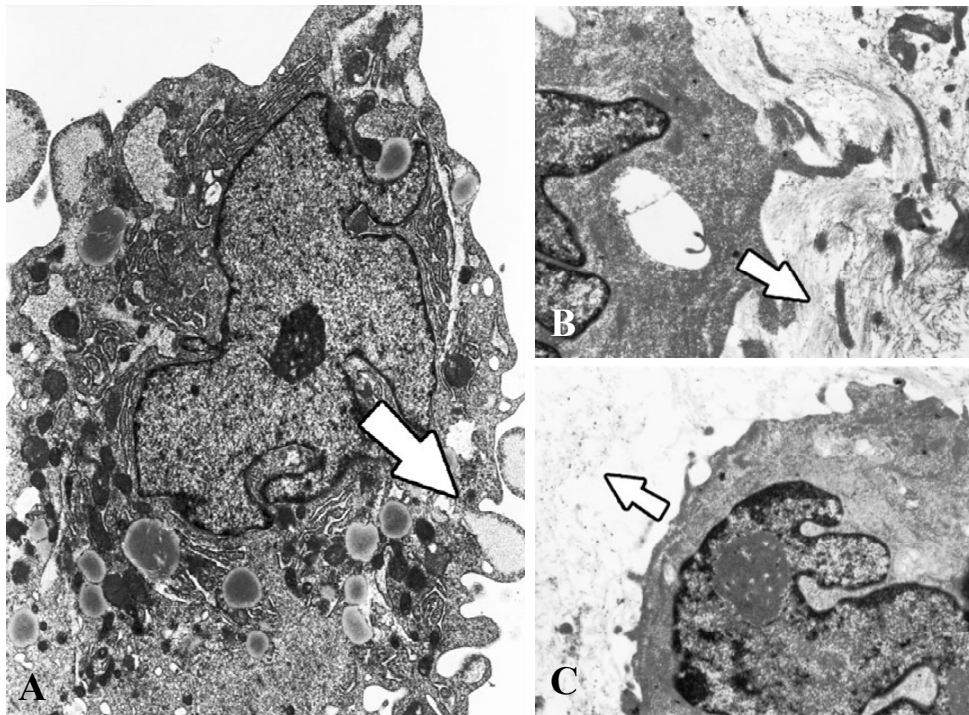
**Figura 4.** Espressione genica del collagene di tipo I, dell'osteopontina e dell'osteocalcina a 24 e 31 giorni.



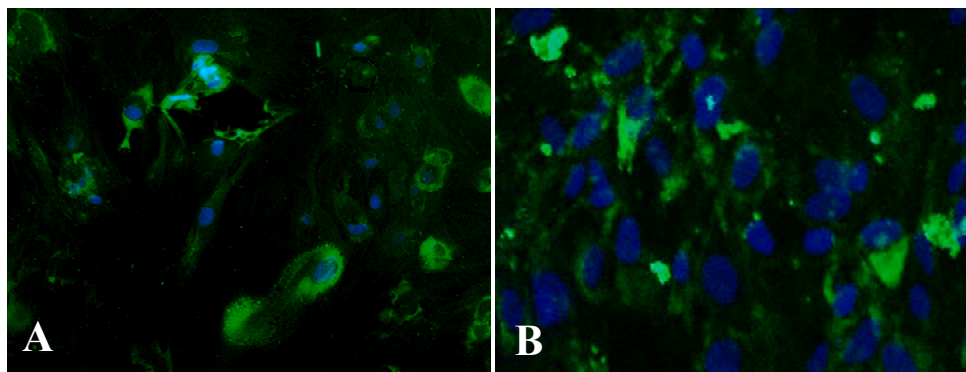
**Figura 5.** Microscopia elettronica a scansione (SEM) di *scaffold* di titanio trabecolare con hASCs adese sulla superficie **A)** Trama dello *scaffold* con cellule a basso ingrandimento, Ing. 16x. **B)** Cellule con pseudopodi immerse nella propria matrice extracellulare, Ing. 1100x.



**Figura 6.** Microanalisi a raggi-X. Spettro del Ca e del P presente sulla matrice extracellulare di cellule cresciute in terreno osteogenico dopo 21 gg di coltura.



**Figura 7.** A) Microscopia elettronica a trasmissione (TEM). Particolare di cellula cresciuta in terreno osteogenico su *monolayer* dopo 21 giorni di coltura. E' possibile osservare vacuoli contenenti materiale di tipo granulare (freccia), presumibilmente idrossiapatite come confermato dalla microanalisi a raggi-X, Ing 10000x. B) Cellula osteoblasto-simile con nucleo ben sviluppato. Presenza di fibrille collagene nello spazio intercellulare (freccia), Ing.5000x. C) Fibrille collagene con la caratteristica bandeggiatura (freccia), Ing. 10000x.



**Figura 8.** Reazione di immunofluorescenza per l'osteocalcina (A) e per l'osteopontina (B).

## RIASSUNTO

Il tessuto adiposo sottocutaneo è stato prelevato da donatori sani nel corso di interventi chirurgici ortopedici di protesi all'anca previo consenso informato da parte dei pazienti.

Le hASCs sono cellule capaci di differenziarsi in diverse linee cellulari, una volta prelevate, vengono coltivate in piastre fino ad ottenere una coltura di cellule che presenti i *marker* specifici di staminalità.

Il vantaggio derivante dall'utilizzo di queste cellule rispetto a quelle prelevate dal midollo osseo (MSCs) è che queste ultime hanno un certo grado di morbilità, che la quantità di tessuto prelevabile è limitata e che di conseguenza viene prolungato il tempo di coltura necessario per ottenere una quantità terapeutica di cellule.

In questo studio le hASCs sono state seminate su appositi *scaffold* di titanio trabecolare (ditta LIMA), strutture di supporto per l'adesione e la crescita cellulare, che avranno lo scopo di ripristinare il tessuto mancante. Questi supporti hanno una struttura esagonale multiplanare a cella che imita la struttura cellulare dell'osso trabecolare la cui morfologia e dimensioni sono state ottimizzate per aumentare la vascolarizzazione e l'osteointegrazione.

La struttura base della cella può essere variata a seconda della necessità di applicazione. Con opportuni stimoli (*medium* e fattori di crescita) le cellule differenziano in osteoblasti esprimendo i geni specifici e le proteine tipiche dell'osso, quali la fosfatasi alcalina, il collagene di tipo I, l'osteopontina, l'osteocalcina e una matrice extracellulare calcificata che viene depositata da parte delle cellule differenziate nello spazio extracellulare.

In base all'analisi dei risultati ottenuti in questa sperimentazione, è possibile affermare che le hASCs aderiscono, proliferano e si differenziano in cellule osteoblasto-simili se seminate su *scaffold* di titanio trabecolare in presenza di terreno osteogenico.

Le strutture 3D hanno mostrato di essere il tipo di coltura più adeguato per la crescita di queste cellule rispetto alle colture *monolayer*, in quanto forniscono un ambiente più simile alle condizioni che si verificano *in vivo*. Le cellule proliferano all'interno della loro matrice extracellulare conservando così l'interazione con le proteine della matrice stessa, controllando direttamente il comportamento cellulare e preservando la trasmissione dei segnali intercellulari che regolano la proliferazione e la differenziazione delle cellule che sono deputate a ripristinare il tessuto mancante.

## **SUMMARY**

The adipose tissue has been taken during an hip prosthesis surgery. The hASCs, as staminal cells, can differentiate in more cellular tipes. After been taken they are coltivated on plates till appear a cellular colture that express specific staminal markers.

In this work the hASCs are seed on titanium trabecular scaffolds that allowed cellular adhesion and cellular growing. This complex should be used than to replace the lost bone tissue.

To stimulate cells growing and differentiation it been added specific proliferative and osteogenic media that allowed to have an osteogenic population. To prove osteoblastic origin of the cells it been used specific laboratory methods that allowed to demonstrate the presence of specific bone proteins in the ECM, as alcalin fosfatasi, collagen I, osteopontin, osteocalcin and a calcific ECM that is deposited in the extracellular space by the cells.

#### **BIBLIOGRAFIA**

1. Cowan CM et al. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat Biotechnol* 2004;22:560-567
2. Patrick Jr CW. Adipose tissue engineering: the future of breast and soft tissue reconstruction following tumor resection. *Semin Surg Oncol* 2000;19(3):302-311
3. Stock UA, Vacanti JP. Tissue engineering: current state and prospects. *Annu Rev Med* 2001;52:443-451
4. Griffith LG. Emergine design principles in biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Ann N Y Acad Sci* 2002;961:83-95
5. Fuchs JR, Nasser BA, Vacanti JP. Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction. *Ann Thorac Surg* 2001;72(2):577-591
6. Dalla Pria P, Presacco M, Veronesi E. Nuove frontiere nell'osteointegrazione: 1 trabecular titanium TM. *Sphera Med* 2008;7:4-50
7. Tapp H, Hanley Jr EN, Patt JC et al. Adipose-derived stem cells: characterization and current application in orthopaedic tissue repair. *Society for experimental biology and medicine* 2008;1535-3702
8. Murer H, Ammann E, Biber J et al. *Biochim. Biophys Acta* 1976;433:509
9. Bione S, D'Adamo P, Maestrini E et al. A novel X-linked gene, G4.5. is responsible for Barth syndrome. *Nat. Genet* 1996;12:385-389
10. Dicker et al. *Experimental Cell Research* 2005;308:283-290

11. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2008, vol. 84A, issue I
12. *Technology and Health Care*, 19-21
13. Lee JH, Won Rhie J, Young Oh D et al. Osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stromal cells (hASCs) in a porous three-dimensional scaffold. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008;370:456-460
14. Fassina L, Visai L, Asti L et al. Calcified matrix production by SAOS-2 cells inside a polyurethane porous scaffold, using a perfusion bioreactor. *Tissue Engineering* 2005;11(5/6)
15. Tocci A, Forte L. Mesenchymal stem cell: use and perspectives. *Hematol J* 2003;4:92-96