

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA
SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE
CORSO DI LAUREA IN MEDICINA E CHIRURGIA



**Trattamento dell'artrosi di ginocchio
con cellule mesenchimali staminali
autologhe: analisi biologica e clinica**

Relatore:

Ch.mo Prof. Riccardo Ferracini

Correlatore:

Dr. Mattia Alessio Mazzola

Candidato:
Simone Furlan

Anno accademico 2021-2022

INDICE

Capitolo 1: Anatomia del ginocchio	5
1.1 Fondamenti anatomici.....	5
1.1.1 Mezzi di unione.....	7
1.1.2 Legamenti crociati.....	8
1.1.3 Menischi.....	9
1.2 Biomeccanica.....	10
1.2.1 Movimenti di abduzione adduzione.....	11
1.3 Forze articolari.....	12
Capitolo 2: Artrosi	13
2.1 Introduzione.....	14
2.2 Epidemiologia.....	14
2.2.1 Invecchiamento.....	14
2.2.2 Obesità.....	14
2.2.3 Genere.....	15
2.2.4 Genetica.....	15
2.2.5 Sovraccarico articolare.....	16
2.2.6 Alterazioni della stabilità articolare.....	16
2.2.7 Componente muscolare.....	17
2.2.8 Varismo e valgismo.....	17
2.3 Istologia ed anatomia patologica dell'artrosi.....	18
2.3.1 Alterazioni cartilaginee.....	18
2.3.2 Osso subcondrale.....	21
2.3.3 Sinovia.....	23
2.4 Patogenesi.....	24
2.5 Segni e sintomi.....	29
2.6 Diagnosi.....	30
2.7 Terapia.....	34
2.7.1 Antidolorifici ed antinfiammatori.....	35
2.7.2 Viscosupplementazione.....	35

2.7.3 Corticosteroidi.....	37
2.7.4 PRP.....	37
2.7.5 Chirurgia Protesica.....	38
2.7.6 Protesi monocompartimentale.....	39
2.7.7 Protesi totale.....	40
2.7.8 Complicanze.....	41
2.7.9 Protesi 3D-printed.....	43
Capitolo 3: Nuovi approcci terapeutici: l'utilizzo delle staminali mesenchimali.....	44
3.1 Introduzione.....	44
3.2 Cellule staminali.....	44
3.2.1 Differenziamento e metabolismo delle staminali.....	45
3.3 Metodiche di prelievo ed isolamento delle staminali mesenchimali.....	47
3.3.1 Aspetti normativi.....	48
3.3.2 Metodo Enzimatico.....	50
3.3.3 Metodo non enzimatico: Lipogems.....	50
3.3.4 Prelievo del tessuto adiposo.....	51
3.3.5 Preparazione del sistema Lipogems.....	51
3.3.6 Metodo non enzimatico: Lipocell.....	52
3.3.7 Puregraft.....	54
3.4 Artroscopia.....	54
Capitolo 4: Studio Sperimentale.....	58
4.1 Materiali e metodi.....	58
4.1.1 Intervento Chirurgico.....	60
4.1.2 Analisi immunofenotipiche ed istologiche.....	62
4.1.3 Analisi Statistica.....	63
4.2 Risultati.....	64
Capitolo 5 discussione e conclusione.....	73
5.1 Discussione.....	73
5.2 Conclusione.....	76

CAPITOLO 1

ANATOMIA DEL GINOCCHIO

1.1 Fondamenti anatomici

Il ginocchio è un'articolazione di fondamentale importanza per la deambulazione, una struttura anatomica di grande complessità che pone in connessione l'epifisi distale del femore con tibia e patella. Nonostante presenti un'estesa mobilità è in grado di sostenere il peso corporeo grazie ad un complesso sistema legamentoso che ne assicura la stabilità [1].

Il ginocchio può essere definito ginglino laterale o troclea, risultato della connessione tra diverse strutture ossee ovvero i condili femorali, la faccia articolare tibiale superiore e la faccia articolare patellare. La troclea femorale risulta costituita dalla superficie convessa dei condili che, anteriormente, convergono a livello della faccia patellare. La faccia articolare superiore della tibia corrisponde alle due cavità glenoidee dei condili tibiali separate dall'eminenza intercondiloidea. La rotula, un osso sesamoide costituito da una porzione anteriore convessa ed una faccia articolare rivestita da cartilagine, è posta anteriormente all'estremità distale del femore e superiormente alla tibia, a cui risulta fissata grazie al legamento patellare [1].

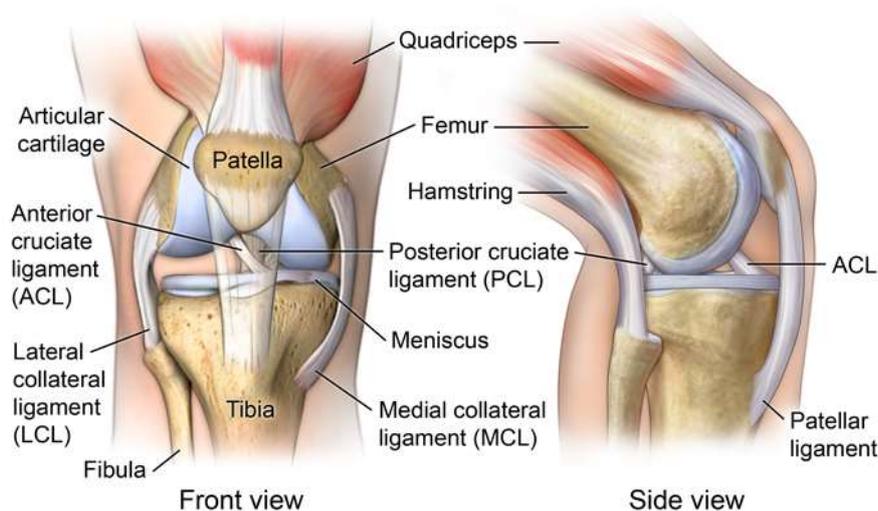


Figura 1.1 - Vista anteriore e laterale del ginocchio destro

Poiché le cavità glenoidee della tibia sono più piane rispetto ai condili femorali, tra le superfici articolari sono interposti due menischi fibrocartilaginei, di forma semilunare, che rendono concordanti le superfici stesse. Ogni menisco, in sezione, ha forma triangolare con base esterna, aderente alla capsula articolare con apice rivolto all'interno della cavità articolare. La faccia superiore concava è in rapporto con i condili femorali mentre la faccia inferiore piana si mette in rapporto con la superficie articolare superiore della tibia. Lateralmente i menischi risultano più spessi mentre appaiono più sottili medialmente; questa caratteristica concorre ad aumentare la concavità della superficie articolare tibiale [1].

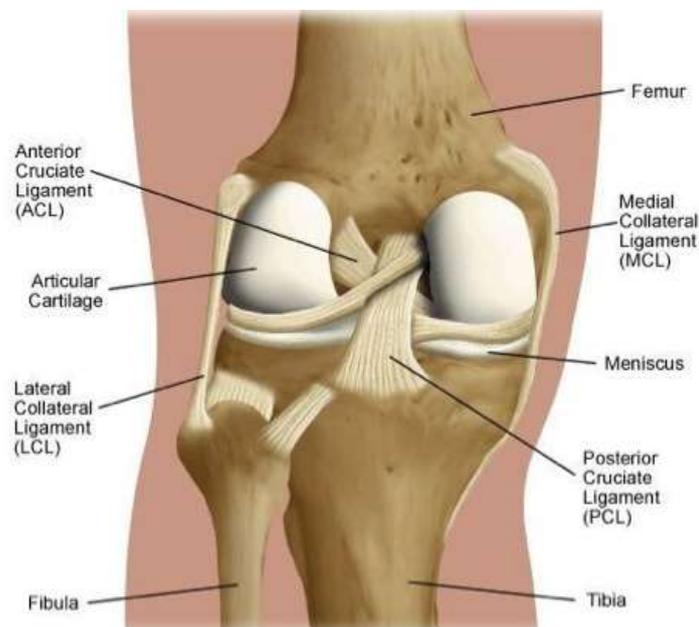


Figura 1.2 - Vista posteriore ginocchio sinistro

Il menisco laterale ha forma di cerchio quasi completo e si interrompe medialmente per l'inserzione delle estremità sull'eminanza intercondiloidea; a questo livello esso aderisce anche ai legamenti crociati anteriore e posteriore. Dal menisco laterale originano i legamenti menisco-femorali anteriore e posteriore che lo uniscono al condilo femorale mediale. La parte periferica di questo menisco aderisce al legamento collaterale laterale. Il menisco mediale presenta invece forma di semiluna e risulta più ampio del corrispettivo laterale; si inserisce alle aree intercondiloidee anteriore e posteriore. Le estremità anteriori dei due menischi sono unite dal legamento trasverso del ginocchio [1].

1.1.1 Mezzi di unione

I mezzi di unione dell'articolazione del ginocchio sono rappresentati dalla capsula articolare e da numerosi legamenti di rinforzo. Essi risultano cruciali nel supplire alla non perfetta congruenza dei capi articolari, garantendo il sostegno del peso corporeo e l'ampia escursione dell'articolazione durante la flessione e l'estensione. La capsula fibrosa si fissa ad alcuni millimetri dai capi articolari; anteriormente si inserisce sopra la faccia patellare, lateralmente e medialmente sotto agli epicondili, posteriormente sopra ai condili e nella fossa intercondiloidea. Sulla tibia si fissa subito al di sotto del margine della cartilagine articolare. Posteriormente ed ai lati, la capsula è piuttosto tesa e densa, mentre anteriormente è più lassa [1].

La membrana sinoviale riveste la superficie interna della capsula fibrosa e si fissa sul contorno della cartilagine articolare; a livello dei menischi si interrompe e si sdoppia per l'adesione degli stessi alla membrana fibrosa. La membrana sinoviale si porta superiormente tra il femore ed il muscolo quadricipite femorale, formando la borsa sovrapatellare. Posteriormente essa circonda con concavità posteriore i legamenti crociati, che risultano quindi intracapsulari ma extra-articolari. Sono poi presenti tra la cute e la patella altre borse sinoviali non comunicanti con la cavità articolare, ovvero la prepatellare, e, più in basso, tra il legamento patellare e la tibia, la borsa infrapatellare profonda. Sopra quest'ultima, tra il legamento patellare e la rima articolare, si trova il corpo adiposo infrapatellare, un cuscinetto adiposo dalla cui parte superiore origina la piega sinoviale infrapatellare che lo fissa alla fossa intercondiloidea [1].

Ci sono poi numerosi legamenti che rinforzano la membrana fibrosa anteriormente, ai lati e posteriormente. Il legamento patellare è un robusto cordone fibroso che unisce il margine inferiore della rotula alla tuberosità tibiale; è la continuazione verso il basso del tendine quadricipitale, in cui la patella risulta inserita come osso sesamoide, e trasmette alla tibia la forza generata dal muscolo quadricipite [1].

I retinacoli laterale e mediale della patella sono due lamine fibrose che, originatesi dalle aponevrosi dei muscoli vasto laterale e vasto mediale, si inseriscono sulla

superficie anteriore della tibia, ai lati della tuberosità tibiale, decorrendo ai lati della patella ed aderendo alle corna anteriori dei menischi.

Il legamento collaterale mediale origina dall'epicondilo mediale del femore e si inserisce sulla faccia mediale della tibia, aderendo alla capsula articolare ed al menisco mediale. Si oppone allo stress in valgo applicato al ginocchio. Ha un aspetto nastriforme ed è lungo circa 8-9 cm [1].

Il legamento collaterale laterale origina dall'epicondilo laterale del femore e si inserisce sulla testa della fibula, senza aderire alla capsula articolare. Si oppone alle forze in varo. È lungo circa 5 cm e ha un aspetto cilindrico.

Il legamento popliteo obliquo corrisponde all'espansione del tendine del muscolo semimembranoso sulla faccia posteriore della capsula. Si porta dal basso in alto e lateralmente, fino a raggiungere la porzione della capsula che riveste il condilo laterale del femore.

Il legamento popliteo arcuato origina dall'estremità laterale del legamento popliteo obliquo e si porta in basso ad inserirsi sulla testa della fibula [1].

1.1.2 Legamenti crociati

I legamenti crociati sono robuste strutture, costituite da fasci organizzati di collagene, perlopiù di tipo I, il cui nome deriva dalla caratteristica disposizione anatomica [2]. Sono cordoni fibrosi che rappresentano i mezzi di unione più importanti tra femore e tibia. Si incrociano all'interno della fossa intercondiloidea del femore, all'interno della capsula ma all'esterno della cavità articolare. Originano dalle aree intercondiloidee anteriore e posteriore e si inseriscono alla faccia interna dei condili.

Il legamento crociato anteriore origina dall'area intercondiloidea anteriore della tibia e si inserisce alla faccia mediale del condilo laterale del femore. Si oppone alla traslazione anteriore della tibia sul femore, specialmente a 30 e 90 gradi di flessione.

Il legamento crociato posteriore è più robusto; origina dall'area intercondiloidea posteriore e si inserisce sulla faccia laterale del condilo mediale del femore. Oppone

resistenza alla traslazione posteriore della tibia sul femore e alla traslazione anteriore del femore sulla tibia [1].

Il legamento crociato anteriore è il freno principale alla traslazione della tibia e partecipa anche alla stabilizzazione delle sollecitazioni in varo e valgo. Esso svolge, inoltre, le funzioni di controllo dell'iperestensione e controllo della rotazione interna [3].

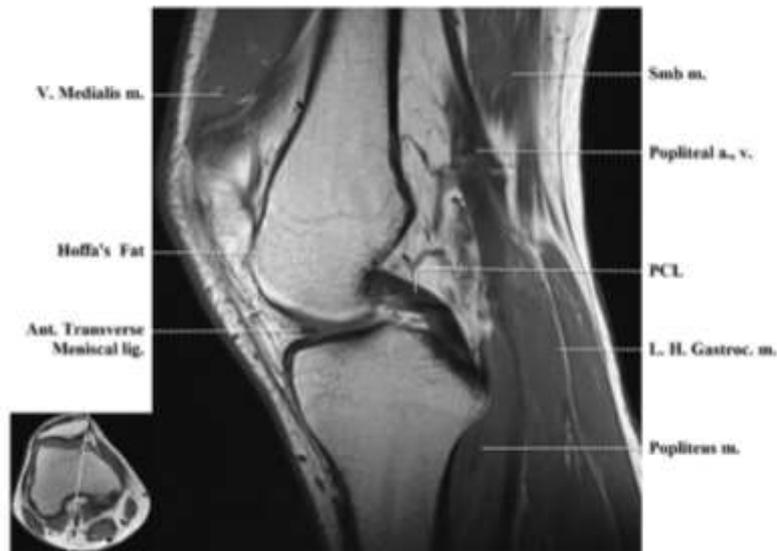


Figura 1.3 – Risonanza magnetica nucleare di un ginocchio in sequenza T1 pesata con sezione sagittale a livello dell'area intercondiloidea, può essere apprezzata la porzione mediale dell'articolazione e il crociato posteriore.

1.1.3 Menischi

All'interno del ginocchio sono presenti due menischi, uno mediale e uno laterale, che hanno la funzione di proteggere l'intera articolazione facilitandone i movimenti e ammortizzando gli urti. Durante la deambulazione i menischi consentono di scaricare una quota importante del peso gravante sulla cartilagine articolare stabilizzando il ginocchio. La loro forma, leggermente rialzata ai bordi, evita lo slittamento dei condili femorali e stabilizza ulteriormente l'articolazione. Essi sono formati da cartilagine fibrosa di colore biancastro e sono particolarmente resistenti alle sollecitazioni meccaniche. Il principale componente della cartilagine è il collagene di tipo I [1].

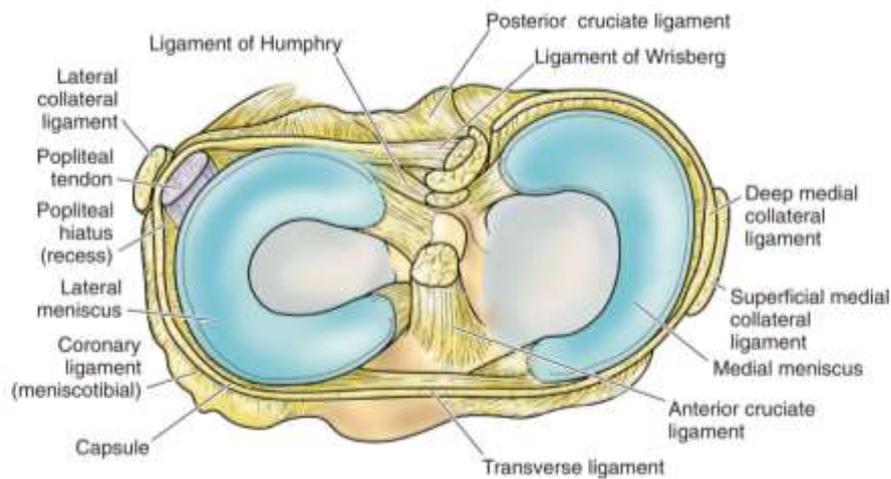


Figura 1.4 – *Visione superiore del plateau tibiale*

1.2 Biomeccanica

La flessione è il movimento che avvicina la porzione posteriore della gamba alla parte posteriore della coscia, l'estensione si riferisce al movimento opposto, definito anche come movimento di ritorno. Questi movimenti compongono l'asse di flesso-estensione.

Il grado di flessione raggiunto dipende dalla tipologia di mobilizzazione (attiva o passiva): la massima flessione, infatti, viene ottenuta in mobilizzazione passiva e può raggiungere i 160°, mentre l'estensione fisiologicamente riporta l'arto a 0° e, solo in caso di lassità legamentosa, può raggiungere circa i 10° [4].

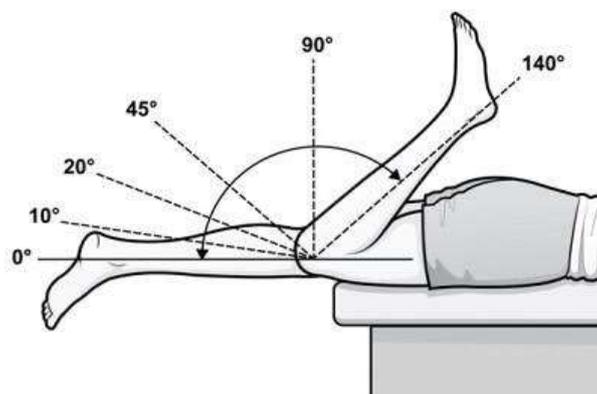


Figura 1.5 – *Movimenti di Flessione ed Estensione*

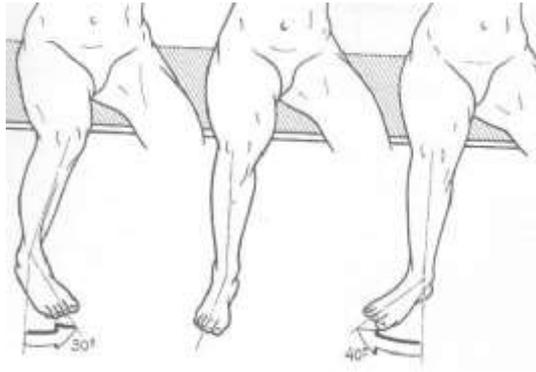


Figura 1.6 – *Movimenti di Rotazione*

I movimenti di rotazione sono limitati dalla presenza dei legamenti crociati e collaterali. All'interno dell'articolazione, il femore ruota e scorre su entrambi i menischi. Il Range di movimento in rotazione interna è di circa 30° mentre in rotazione esterna è 40° [4].

1.2.1 Movimenti di Abduzione-Adduzione

Il ginocchio non si caratterizza per la possibilità di eseguire movimenti di abduzione-adduzione. A questo proposito, durante l'esame obiettivo del ginocchio, si valuta il grado di lassità dell'articolazione mediante l'esecuzione del varo-valgo stress test, ottenendo un riferimento su eventuali alterazioni patologiche articolari [4].

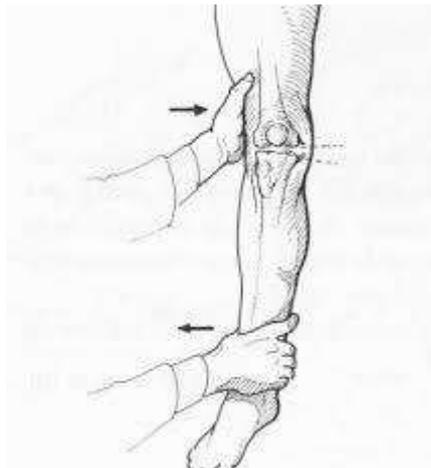


Figura 1.7 – *Varo-valgo stress test*

1.3 Forze articolari

Le forze che agiscono sull'articolazione del ginocchio si suddividono in femoro-tibiali e femoro-patellari, mentre il carico dipende da diversi fattori, tra cui l'allineamento tra femore e tibia, la velocità del cammino, la salita e la discesa delle scale.

Tra le forze femoro-patellari più significative vi sono quelle che si creano nel momento in cui il soggetto seduto si alza senza avvalersi degli arti superiori, le forze femoro-tibiali si verificano invece nelle attività sportive intense, in particolar modo durante i salti.

Il ginocchio risulta essenziale per la deambulazione e pertanto la patologia di questo distretto ha una grande rilevanza nell'autonomia delle attività quotidiane. Le diverse attività svolte durante la vita di un individuo si caratterizzano per diversi pattern di carico e diverse sollecitazioni biomeccaniche. Durante la deambulazione, si alternano fasi di carico e scarico, e l'articolazione lavora tutto il tempo per assicurare stabilità ed equilibrio, in sinergia con l'azione antigravitaria dei muscoli della coscia e della gamba [4].

CAPITOLO 2

ARTROSI

2.1 Introduzione

L'artrosi è una patologia cronica largamente diffusa nella popolazione globale: il suo impatto sociale e sanitario risulta estremamente rilevante, arrivando a colpire all'incirca il 15% della popolazione [5].

Può essere definita un complesso processo degenerativo, caratterizzato da progressivo deterioramento cartilagineo ed alterazioni patologiche a livello delle altre componenti articolari [6]. La patogenesi di questa condizione non risulta tuttora completamente definita, seppur negli ultimi anni sia emerso in modo rilevante il ruolo del substrato infiammatorio nella genesi di questo processo patologico [7].

Da un punto di vista epidemiologico presenta una prevalenza ed una incidenza in aumento, un fenomeno conseguente in gran parte all'invecchiamento generale della popolazione [8]. Valutando l'andamento attuale ci si aspetta che il numero di soggetti colpiti da artrosi continui ad aumentare nel futuro, rendendo ancora maggiore il peso sociale ed economico di questa patologia [5]. Nonostante l'artrosi affligga a livello anatomopatologico pressoché ogni individuo oltre la settima decade, solamente una parte di questi presenta il tipico corredo sintomatologico [8]. La presentazione clinica può risultare differente in base all'articolazione coinvolta e può avere una diversa progressione a seconda del soggetto in analisi.

Il sintomo principale dell'artrosi è il dolore, che si manifesta in particolar modo durante il movimento ed è tipicamente accentuato dall'applicazione di carico. Frequentemente risulta più severo nelle ore serali come conseguenza dell'affaticamento diurno, mentre nelle fasi più avanzate può rendersi ininterrotto, arrivando ad essere causa di grave disabilità e di disturbi del sonno. Un ulteriore sintomo cardine è la limitazione funzionale, causa di importante riduzione dell'autonomia nei pazienti affetti da artrosi. Disturbi della motilità possono

talvolta comparire anche nelle prime fasi di malattia, rappresentando l'espressione di una problematica meccanica o di un riflesso antalgico [8].

Nel corso della patologia si può reperire un variabile grado di flogosi articolare, che può essere differente nei diversi pazienti ed assente nelle prime fasi evolutive dell'artrosi. L'infiammazione è un reperto rilevante poiché, oltre ad influire in maniera rilevante nello sviluppo della sintomatologia, secondo le teorie più attuali può svolgere un'importante ruolo nella patogenesi della degenerazione tissutale [9].

2.2 Epidemiologia

L'epidemiologia, così come la patogenesi, risulta un argomento estremamente complesso, sono infatti numerosi i fattori che possono influire sull'insorgenza e sulla progressione di questa condizione patologica. [5] La prevalenza di soggetti sintomatici si stima attestarsi, secondo statistiche della World Health Organization (WHO), intorno al 10% degli uomini ed il 20% delle donne oltre la sesta decade. In particolare, a livello dell'arto inferiore il ginocchio è il segmento maggiormente colpito [10].

2.2.1 Invecchiamento

L'invecchiamento rappresenta un fattore di rischio indiscutibile. Il riscontro di artrosi in età giovanile è piuttosto raro e, laddove presente, correlato in particolar modo alle conseguenze di esiti traumatici [5]. I processi senili includono numerosi meccanismi patogenetici, non solo relazionati all'usura cronica a cui è stata sottoposta l'articolazione ma associati soprattutto ad alterazioni del metabolismo cellulare. Questi processi hanno come conseguenza una minore capacità di far fronte al danno tissutale e lo sviluppo di un progressivo danno cartilagineo, evento patogenetico centrale nella genesi dell'artrosi [11].

2.2.2 Obesità

L'obesità è un fattore di rischio che va al di là degli aspetti di sovraccarico biomeccanico. Un'eccessiva massa corporea è correlata, a livello epidemiologico, ad un'incidenza precoce di artrosi e ad una più rapida progressione della patologia.

Questo andamento è facilmente riscontrabile nelle articolazioni dell'arto inferiore sottoposte a maggiore carico; nonostante questa evidenza, è stata osservata una maggiore prevalenza di artrosi anche in articolazioni dell'arto superiore rispetto a soggetti normopeso. Questa associazione mette in luce il complesso legame tra artrosi e stato infiammatorio. È stata ben descritta in soggetti affetti da sindrome metabolica la presenza di una condizione flogistica cronica di bassa intensità, causata in particolar modo dall'eccessiva presenza di tessuto adiposo viscerale. Diverse citochine potrebbero influire a livello del metabolismo cartilagineo alterando meccanismi di riparazione tissutale. Queste complesse interazioni possono esitare in un complessivo stato catabolico dei tessuti articolari, predisponendo all'instaurarsi del fenomeno artrosico. Pertanto, alla luce di questi aspetti patogenetici, risulta fortemente consigliata la perdita di peso nei soggetti a rischio. [12].

2.2.3 Genere

In letteratura vi sono chiare evidenze delle relazioni epidemiologiche tra genere e sviluppo di artrosi. Nel sesso femminile, questa patologia presenta un picco di incidenza durante il periodo post-menopausale, mentre nel sesso maschile segue un incremento lineare con l'età. Questa relazione è spiegata principalmente dall'influenza degli ormoni sessuali sul trofismo tissutale, il cui deficit, presente al termine del periodo fertile, spiega in parte questo andamento epidemiologico [13].

2.2.4 Genetica

Il ruolo della genetica, seppur rilevante, non risulta ad oggi completamente compreso. Tramite moderne tecnologie di sequenziamento sono emersi diversi polimorfismi associati allo sviluppo di artrosi, prettamente legati a geni codificanti per proteine strutturali articolari. Probabilmente la genetica è il substrato che influisce con maggiore rilevanza nei soggetti con artrosi precoce [14]. Un esempio è la mutazione gain of function della osteoprotegerina, correlata ad un quadro a rapido esordio di artrosi diffusa [15]. Studi effettuati su gemelli omozigoti hanno dimostrato grandi analogie nel decorso clinico della patologia, supportando l'importanza di questo fattore di rischio [16]. Vi sono anche evidenze riguardo al

ruolo della familiarità nel coinvolgimento di determinati distretti, in particolare delle articolazioni della mano in soggetti di sesso femminile [8].

Oltre a fattori di rischio di natura sistemica vi sono meccanismi che influiscono in modo rilevante direttamente a livello articolare. Su questa tipologia di fattori di rischio possono essere attuate diverse strategie di prevenzione in grado di ridurre sensibilmente il rischio di sviluppare la patologia o di rallentarne la progressione.

2.2.5 Sovraccarico articolare

Il sovraccarico articolare ha grande importanza in particolar modo per l'arto inferiore [15]. A livello del ginocchio un reperto di frequente riscontro è il maggiore coinvolgimento artrosico del compartimento mediale. Su questo compartimento fisiologicamente grava il maggior peso durante la deambulazione e per questo motivo risulta essere la sede anatomica più soggetta ad artrosi. Le forze che agiscono sull'articolazione sono causa, laddove vi sia un substrato di danno tissutale, di ulteriori lesioni che possono contribuire ad aggravare il quadro degenerativo. Conseguenza di questo meccanismo patogenetico è il fatto che determinate professioni, in cui sono svolti movimenti ripetitivi e traumatici sull'articolazione, sono associate allo sviluppo precoce di questa patologia [8].

2.2.6 Alterazioni della stabilità articolare

Lesioni che compromettono la stabilità articolare sono in grado di favorire l'instaurarsi di processi degenerativi, alterando la fisiologica biomeccanica e causando eccessivo traumatismo sul tessuto cartilagineo. Il ginocchio è un'articolazione frequentemente colpita da traumi, sia nella popolazione generale che in soggetti sportivi e molto frequenti sono le lesioni a carico del crociato anteriore. Questa struttura assicura la stabilità dei capi ossei impedendo alla tibia di traslare anteriormente rispetto al femore, una lesione a carico di questa struttura può avere come esito una minore stabilità articolare, con conseguente incremento della sollecitazione meccanica e più rapida degenerazione cartilaginea [3].

2.2.7 Componente muscolare

Anche la componente muscolare, qualora presenti un minor trofismo ed un minore contributo alla stabilità articolare, può rendersi responsabile, in modo analogo alle lesioni del crociato, di una precoce insorgenza di artrosi [6].

2.2.8 Varismo e valgismo

Le deformità in valgo o in varo del ginocchio sono fattori molto importanti nello sviluppo di questa patologia. Queste deformità si associano ad un'importante alterazione della biomeccanica, con maggiore sollecitazione di un compartimento anatomico. Per ginocchio varo si intende una condizione di alterato rapporto tra i capi ossei in cui, femore e tibia formano un angolo ottuso aperto medialmente. Per valgismo si intende invece la condizione opposta, in cui è presente un angolo ottuso aperto verso l'esterno. Nel momento in cui si presenta una di queste deformità, si crea un importante sovraccarico di un compartimento con implicazioni importanti sullo sviluppo e progressione di questa patologia. Secondo dati di letteratura, il varismo si associa ad un rischio quadruplicato di coinvolgimento del compartimento mediale, il valgismo ad un rischio addirittura cinque volte maggiore per quanto riguarda l'artrosi del compartimento laterale [17].

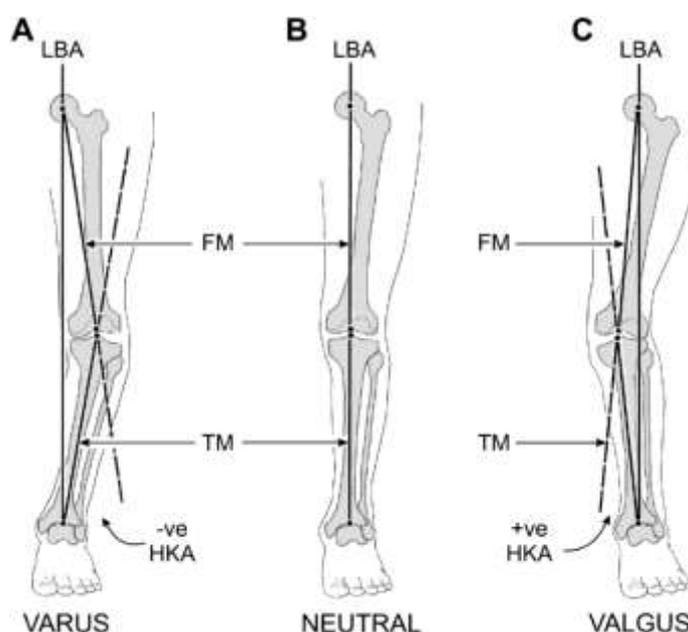


Figura 2.1 – Alterazioni dell'asse meccanico dell'arto inferiore in condizioni di varismo e valgismo

2.3 Istologia ed anatomia patologica dell'artrosi

In corso di artrosi sono presenti numerose alterazioni anatomopatologiche a livello dei tessuti articolari. La conoscenza di queste lesioni risulta fondamentale per comprendere la patogenesi e il quadro clinico di questa patologia.

2.3.1 Alterazioni Cartilaginee

La cartilagine è un tessuto fondamentale per la funzionalità articolare. A livello istologico esistono tre tipologie di cartilagine: ialina (la più rappresentata), elastica e fibrocartilagine (tessuto che va a comporre menischi e dischi intervertebrali). La funzione biomeccanica della cartilagine articolare, posta nel ginocchio al di sopra dell'osso subcondrale, è di cruciale importanza, consentendo ai capi ossei di muoversi senza frizione. Questa caratteristica è possibile grazie alla particolare composizione strutturale e alla componente sinoviale fluida, costituita principalmente da acido ialuronico e lubrificina.

A livello microscopico la cartilagine è composta da differenti strutture, l'unica componente cellulare è rappresentata dai condrociti. Quest'ultimi hanno la funzione di mantenere ed organizzare la matrice extracellulare, costituita da diverse molecole in grado di conferire particolari caratteristiche meccaniche. Ogni movimento del ginocchio si caratterizza per una pressione a livello cartilagineo e pertanto questa struttura, nel momento in cui perde la sua normale funzionalità, risulta maggiormente sollecitata e talvolta lesionata [18].

A seconda della sede anatomica, più prossimale o distale rispetto all'osso, e in base alla funzione, la cartilagine presenta dei fenotipi cellulari differenti. La diversa disposizione delle fibre si tramuta in differenti proprietà meccaniche che conferiscono elasticità e capacità di rendere fluidi i movimenti articolari.

I condrociti nella zona più superficiale presentano una morfologia appiattita e fibre collagene di tipo II disposte parallelamente, permettendo una grande resistenza allo stiramento. La porzione centrale è deputata perlopiù alla resistenza nei confronti di stimoli compressivi e, a livello microscopico, appare caratterizzata da condrociti non più appiattiti e fibre non disposte parallelamente. La zona più profonda, definita radiale, presenta dei condrociti disposti in strutture verticali con fibre

perpendicolari, organizzazione che la rende la zona con maggiore proprietà di resistenza a forze compressive.

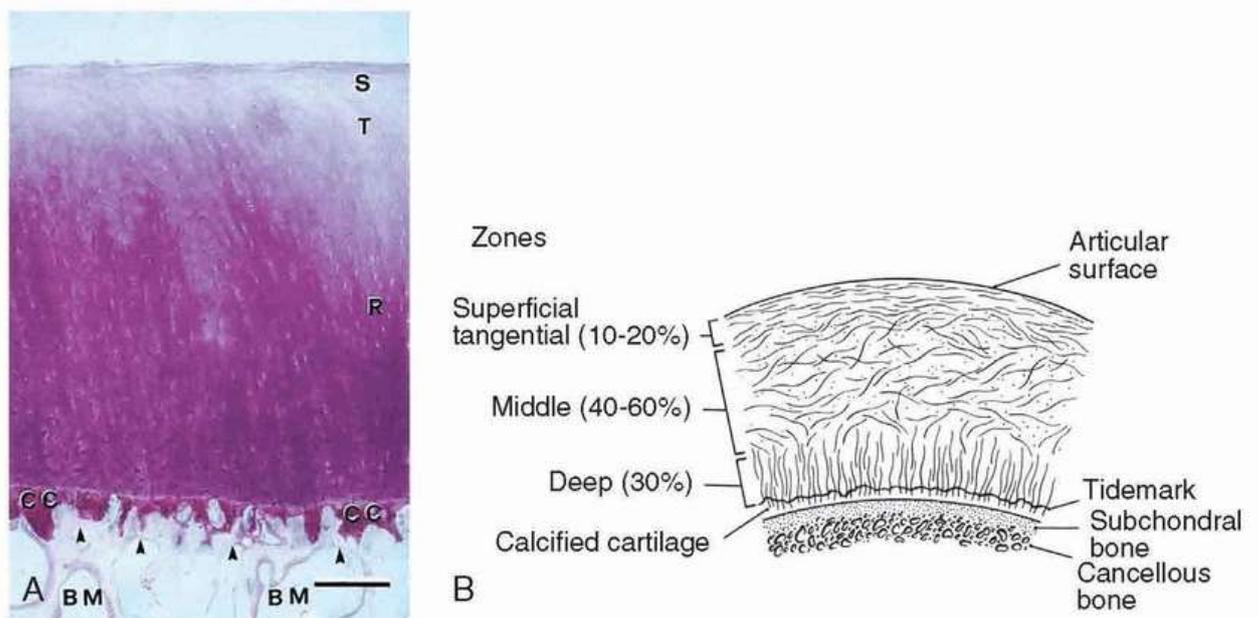


Figura 2.6 - Nell'immagine si osserva la tipica disposizione delle fibre nel tessuto cartilagineo del ginocchio

Inferiormente è poi presente la cartilagine ossificata caratterizzata da condrociti ipertrofici, il cui ruolo è assicurare la continuità e l'adesione del tessuto all'osso subcondrale [19].

Anche la produzione di matrice da parte dei condrociti risulta essere differente in base alla sede anatomica, nelle porzioni più profonde vi è maggiore produzione di aggreganti e collagene di tipo II. I condrociti superficiali sono invece responsabili della produzione di lubrificina, molecola fondamentale nel ridurre la frizione articolare [20].

Tra le molecole principali prodotte dalla cartilagine vi sono:

- Aggreganti
- Collagene di tipo II
- Proteina oligomerica della matrice cartilaginea
- Fibronectina
- Lubrificina

Quest'ultima, se deficitaria, configura un quadro di maggiore attrito tra i capi articolari con maggiore usura dei tessuti.

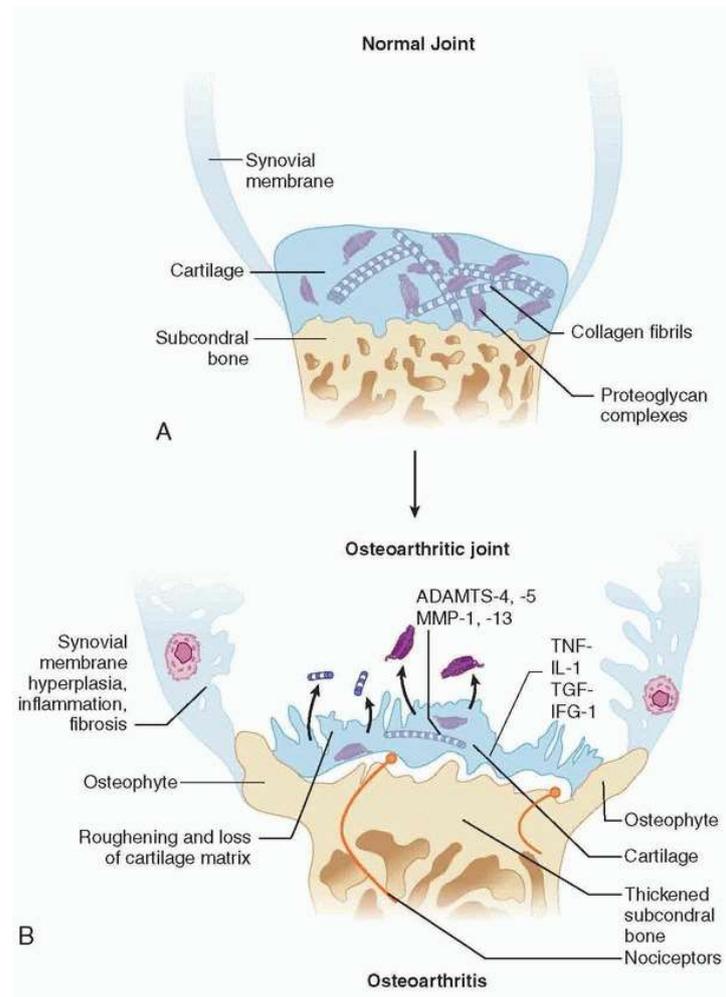


Figura 2.7 – Alterazioni della struttura articolare in corso di artrosi, si nota degradazione della cartilagine, sinovite, osteofiti ed alterazioni dell'osso subcondrale

La perdita quantitativa della componente cartilaginea risulta un normale processo senile e in corso di artrosi assume maggiore rilevanza. Questo evento è dovuto ad uno squilibrio tra processi di anabolismo e catabolismo tissutale, una progressiva riduzione del trofismo di questo tessuto è il risultato di numerosi fattori collegati principalmente al ruolo catabolico di determinati enzimi e dell'ambiente citochinico [11]. Durante l'invecchiamento è stato descritto come i condrociti presentino un fenotipo pro-infiammatorio con la liberazione di numerosi fattori promuoventi la flogosi quali IL-1 ed IL-6, presentando inoltre un globale deficit di produzione di proteine della matrice.

La cartilagine è un tessuto che presenta scarsa vascolarizzazione ed innervazione, per questo motivo l'omeostasi della matrice è strettamente legata alla funzionalità cellulare. In condizioni fisiologiche i condrociti non si dividono ed hanno una scarsa capacità nel far fronte ai danni cellulari; in corso di artrosi questo fine equilibrio risulta alterato. Alcuni studi hanno dimostrato che non esiste turnover di alcune componenti della matrice e pertanto un danno cartilagineo primario potrebbe essere estremamente rilevante nel favorire l'instaurarsi di processi degenerativi [21].

Queste caratteristiche, unite all'incapacità dei condrociti di rigenerare, possono portare all'instaurarsi di un processo degenerativo qualora si presentino stimoli lesivi, alterando progressivamente la struttura tissutale, fino a quadri di apoptosi cellulare diffusa.

2.3.2 Osso subcondrale

Per osso subcondrale si intende la porzione di tessuto osseo sottostante la componente cartilaginea. Questo tessuto è caratterizzato da porosità, a livello microscopico le trabecole sono orientate secondo gli stimoli meccanici dati dal carico. L'osso subcondrale potrebbe avere un ruolo importante nel nutrimento della cartilagine e pertanto essere implicato nella patogenesi dell'artrosi contribuendo al rimodellamento patologico [22].

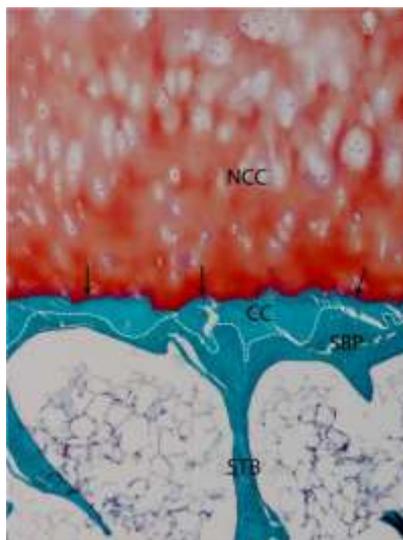


Figura 2.8 – *Morfologia della giunzione tra cartilagine ed osso subcondrale con colorazione.*

Un aspetto tuttora controverso in letteratura è la questione riguardante la primarietà o la secondarietà delle lesioni dell'osso subcondrale nell'osteoartrosi [23].

Tra le alterazioni si ritrovano:

- Aumentata porosità
- Assottigliamento della corticale
- Sclerosi ossea
- Micro fratture

Alcune di queste sono perlopiù associate a quadri di artrosi iniziale, altre, come la sclerosi ossea, sono reperti tipici di quadri più avanzati. Una struttura che svolge un ruolo molto importante nella patogenesi del dolore in corso di artrosi è la giunzione tra l'osso subcondrale e la cartilagine. Normalmente questa area risulta scarsamente innervata, durante la progressione del processo patologico è stata invece dimostrata una maggiore presenza di fibre nervose, che potrebbero essere responsabili del dolore marcato nelle fasi più avanzate di malattia.

Secondo modelli attuali nelle prime fasi di malattia si assiste ad un aumento della porosità ed un assottigliamento del piatto subcondrale, in associazione ad un iniziale danno cartilagineo. Successivamente vi sono delle alterazioni trabecolari e, negli stadi più avanzati, il piatto subcondrale aumenta di spessore associandosi a sclerosi ossea. Quest'ultimo processo potrebbe rappresentare una forma di compenso per contrastare l'indebolimento strutturale dovuto alle formazioni cistiche.

Un ulteriore reperto che emerge in questo complesso rimaneggiamento osseo sono gli osteofiti, ovvero quadri di proliferazione ossea abnorme. Queste strutture potrebbero formarsi per un fallimentare tentativo di compenso delle lesioni tissutali, probabilmente stimolati da una presenza eccessiva di TGF-beta [24].

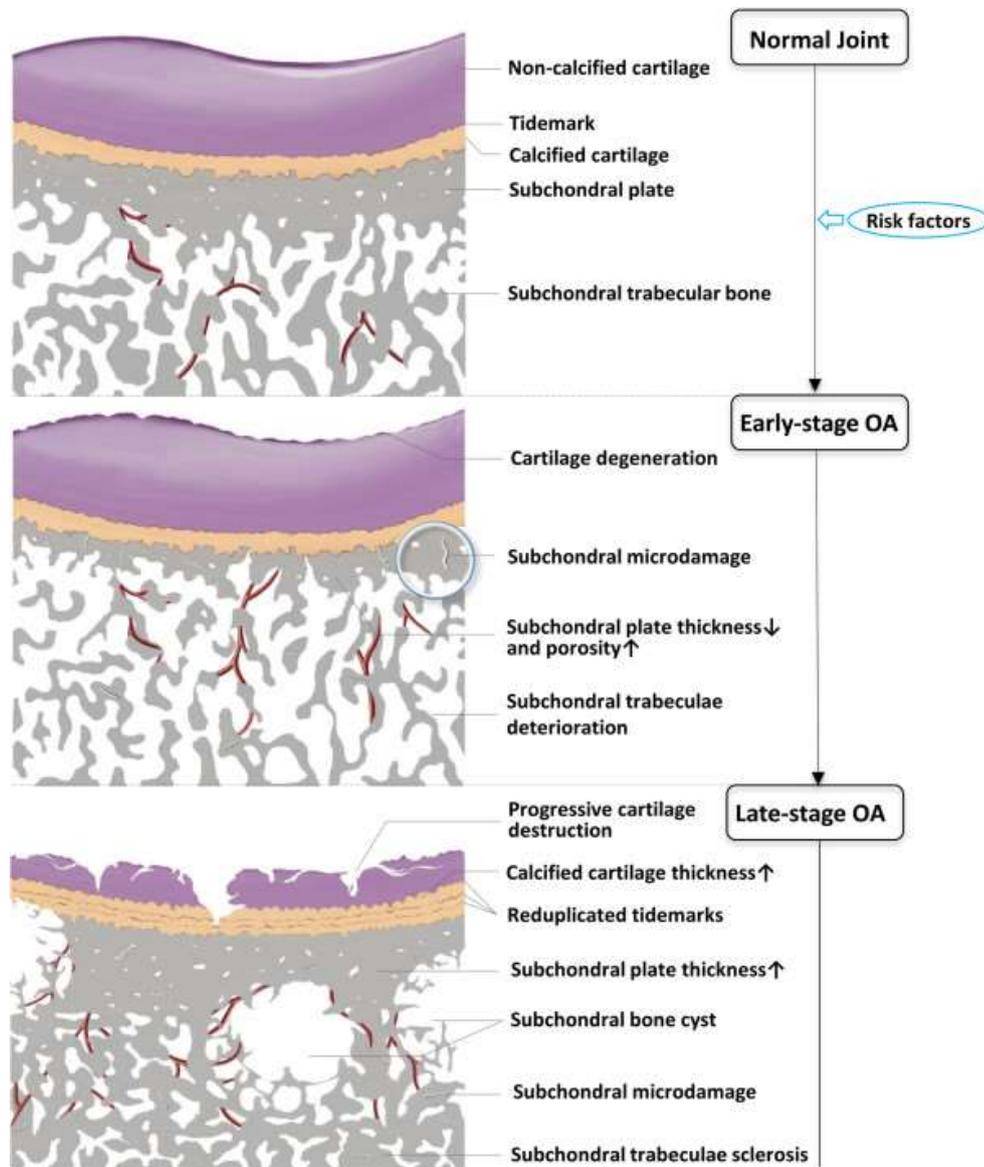


Figura 2.9 - L'immagine descrive le tipiche fasi della progressione delle lesioni subcondrali.

2.3.3 Sinovia

La membrana sinoviale è un sottile strato di rivestimento interno della capsula articolare. Il suo ruolo funzionale è legato alla produzione di liquido sinoviale, costituito, oltre alla componente acquosa, da proteine che consentono una minore frizione dei capi ossei, prevenendo un eccessivo sovraccarico delle strutture articolari. Oltre a questo ruolo, essendo un tessuto molto vascolarizzato, è in grado di assicurare nutrimento alle diverse strutture articolari ed assicurare la rimozione dei frammenti di matrice degenerata grazie a diverse componenti cellulari. A

contribuire a questa funzione vi sono i macrofagi sinoviali, cellule fondamentali nella rimozione di componenti senescenti all'interno del fluido [8].

In corso di artrosi si può infatti reperire un differente grado di flogosi sinoviale, una caratteristica che ha grande rilievo da un punto di vista patogenetico e nello sviluppo della sintomatologia [25].

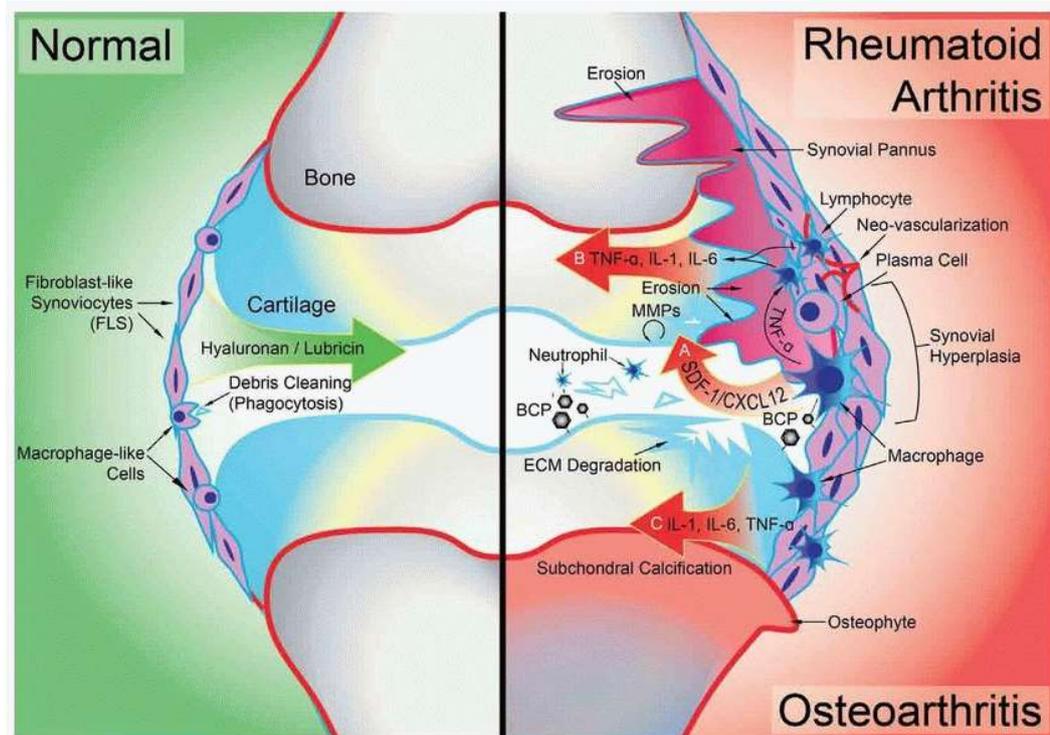


Figura 2.10 - In questa immagine si possono osservare le alterazioni della sinovia in corso di artrosi, caratterizzate da iperplasia, reclutamento di cellule immunitarie e presenza di un marcato ambiente infiammatorio

A livello istologico durante la progressione della patologia si osserva un maggiore reclutamento di cellule immunitarie, un aumento della vascolarizzazione ed iperplasia tissutale. Un'eccessiva produzione di liquido sinoviale conseguente alla flogosi potrebbe portare a stiramento della capsula, che, essendo finemente innervata, genera dolore.

2.4 Patogenesi

La patogenesi dell'artrosi risulta molto complessa e ad oggi non completamente compresa. Inizialmente la comunità scientifica pose l'attenzione quasi

esclusivamente sul ruolo della componente cartilaginea, mentre al momento è risaputo il contributo rilevante delle altre strutture articolari. [10]. La difficoltosa comprensione della patogenesi rappresenta uno dei motivi per cui al momento non è ancora presente un farmaco in grado di arrestare la progressione del danno articolare, come invece accade per altre patologie del sistema muscolo scheletrico [26].

Molto probabilmente, secondo evidenze di letteratura, l'evoluzione del processo artrosico si compone di diversi momenti patogenetici [27]. Un ruolo primario pare essere rappresentato dalla liberazione di molecole in grado di attivare l'immunità innata ed indurre una produzione patologica di mediatori pro infiammatori. La persistenza della flogosi cronica ha come conseguenza un complessivo stato catabolico, influenzando sul metabolismo tissutale e favorendo l'instaurarsi delle lesioni. L'esito di questo processo patologico è una profonda alterazione morfologica e funzionale.

Il ruolo della cartilagine rimane cruciale: il danno a questo tessuto è stato ipotizzato essere conseguenza di numerosi fattori patogenetici, sia di natura meccanica che legati al metabolismo tissutale [28]. L'invecchiamento di questo tessuto o "condrosenescenza" esita in cellule non più abili a svolgere in modo ottimale le funzioni di omeostasi della matrice extracellulare. Instabilità genomica, disfunzioni mitocondriali e minore capacità di sintesi proteica sono solo alcuni dei meccanismi che si tramutano in una funzionalità cellulare compromessa, contribuendo all'instaurarsi di un lieve stato infiammatorio cronico. Lo stress ossidativo associato e il ruolo biologico di alcune interleuchine sembrerebbe in grado di favorire una produzione abnorme di MMP-13 e ADAMTS-15, enzimi in grado di degradare le principali componenti della matrice, rispettivamente collagene ed aggregani [29].

Nell'artrosi molecole di danno come frammenti cartilaginei, componenti della matrice extracellulare e frammenti di cellule necrotiche agiscono da DAMPS (Damage-Associated-Molecular-Pattern), attivando la cascata infiammatoria ed inducendo proliferazione macrofagica [8].

Vi sono evidenze a supporto di quanto frammenti di matrice extracellulare cartilaginea, in particolare elementi degenerati e glicosilati, siano in grado di attivare queste vie. Un esempio è la dimostrazione dell'attivazione di questo pattern a seguito del legame con frammenti di aggrecano clivato da ADAMST-4, una delle proteine più rappresentate nella cartilagine [30].

In questa tipologia di stimolo svolgono una grande rilevanza i segnali mediati dai Toll-Like Receptors. Questi recettori sono presenti su diverse componenti cellulari dell'immunità innata, tra cui macrofagi e cellule dendritiche. Ne esistono diverse tipologie e sono in grado, a seguito del legame con un determinato ligando, di innescare una cascata di segnali intracellulari in cui risulta coinvolto Nf-KB, un fattore di trascrizione fondamentale per la produzione di citochine infiammatorie [8]. È stato evidenziato come durante la progressione dell'artrosi questi recettori siano maggiormente espressi, in particolar modo TLR-4 sui condrociti. Una eccessiva stimolazione delle vie di trasduzione di questi recettori è stata correlata ad apoptosi dei condrociti, e pertanto ad un rimaneggiamento tissutale patologico [31].

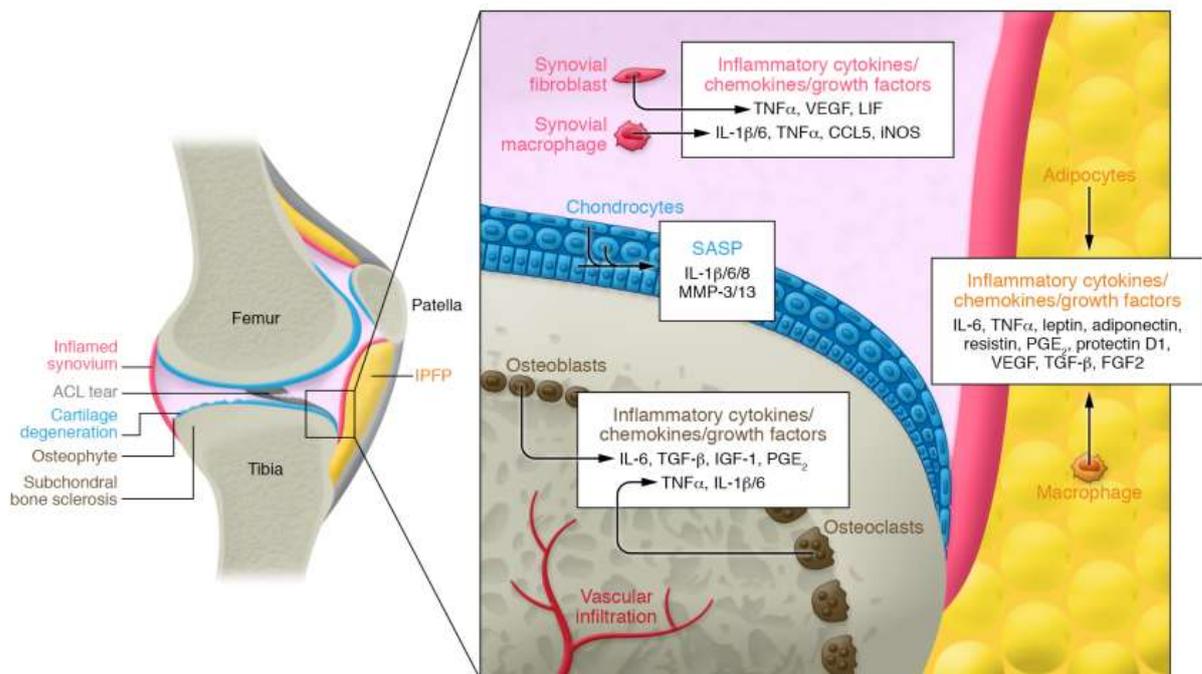


Figura 2.2 – Rappresentazione grafica dell'ambiente citochinico e della produzione di enzimi proteolitici in corso di artrosi

Tra le componenti cellulari coinvolte in questo processo hanno un cruciale ruolo i macrofagi sinoviali. Questi rappresentano la principale componente immunitaria nel liquido sinoviale. Oltre a questo dato si sono dimostrate le cellule che contribuiscono in maggior misura alla produzione di mediatori pro infiammatori [32], tra cui:

- IL-1 β
- TNF- α
- IL-6
- iNOS

In corso di artrosi si osserva una maggiore stimolazione dei macrofagi con conseguente liberazione di enzimi catabolici, in grado di aggravare ulteriormente il danno cartilagineo ed alimentare il processo infiammatorio [33].

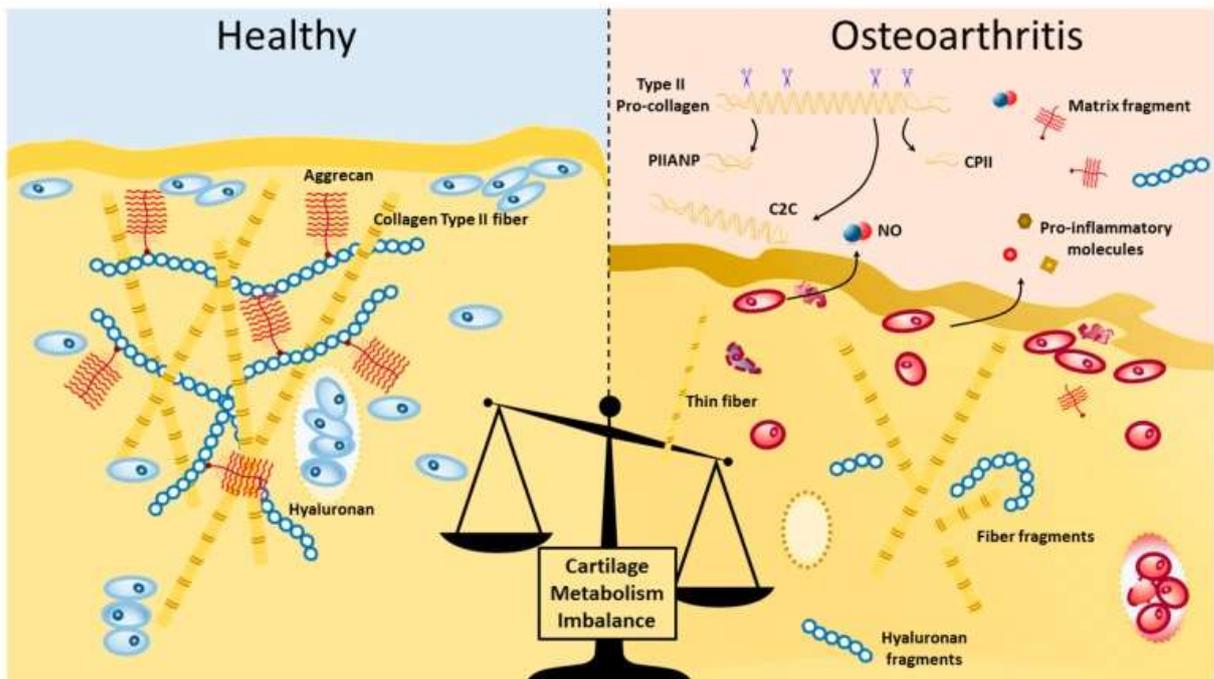


Figura 2.3 – Alterazioni dell'omeostasi della matrice extracellulare in corso di artrosi

Queste cellule sono parte dell'immunità innata e possono presentare due differenti polarizzazioni, definite M1 e M2 a seconda della loro interazione con linfociti T. Seppur la funzione di queste cellule sia principalmente legata alla fagocitosi essi svolgono anche un importante ruolo legato alla riparazione tissutale.

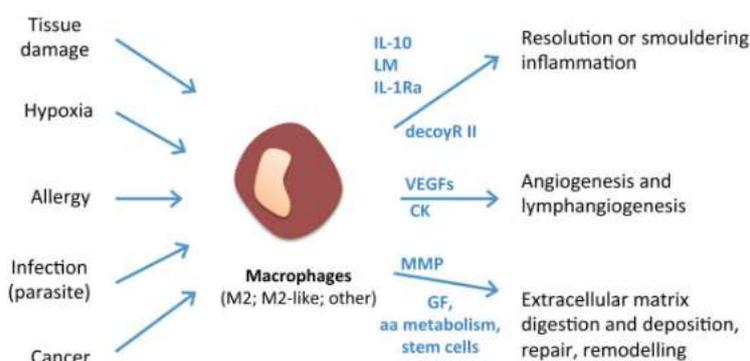


Figura 2.4 – Funzioni dei macrofagi M2

I macrofagi M2, polarizzati in tale senso grazie ad IL-4 e IL-13, presentano la capacità di limitare il processo flogistico e di liberare mediatori che influiscono sulla riparazione tissutale. Tra i principali vi sono PDGF, VEGF e fattori che promuovono la sintesi di collagene. A questo proposito, come si ritrova in articolazioni colpite da artrosi, un ambiente citochinico che sbilanci il rapporto verso un fenotipo M1 rappresenta un elemento di rischio per una eccessiva produzione di fattori in grado di determinare a livello cronico danno tissutale [33].

Oltre ai Toll-Like Receptors l'immunità innata è coinvolta nella patogenesi dell'artrosi anche tramite il sistema del complemento. Quest'ultimo risulta essere implicato in differenti meccanismi patogenetici quali il rimaneggiamento della matrice e la lisi cellulare. Il complemento è un sistema complesso, il cui funzionamento viene classicamente descritto in tre principali vie di attivazione in grado di determinare il clivaggio di C3. A livello articolare il complemento è presente in rilevante quantità nel liquido sinoviale [34] e durante la sua attivazione sono rilasciate delle molecole definite anafilotossine, in grado di influenzare la permeabilità tissutale e la regolazione dell'apoptosi. A tal proposito, alcuni frammenti di complemento presentano dedicati recettori in grado di attivare complesse vie di segnalazione intracellulare, portando alla produzione di mediatori infiammatori e talvolta inducendo l'apoptosi.

L'ambiente infiammatorio che si manifesta durante il processo artrosico può influire nel potenziare il ruolo patogenetico del complemento: è stato infatti dimostrato che citochine quali IL-1B possano avere un ruolo determinante per quanto riguarda l'espressione di alcuni recettori a livello dei condrociti come C5aR. Ulteriormente il complemento pare avere un ruolo nel favorire l'azione di VEGF, responsabile del rimodellamento cartilagineo e della neoangiogenesi.

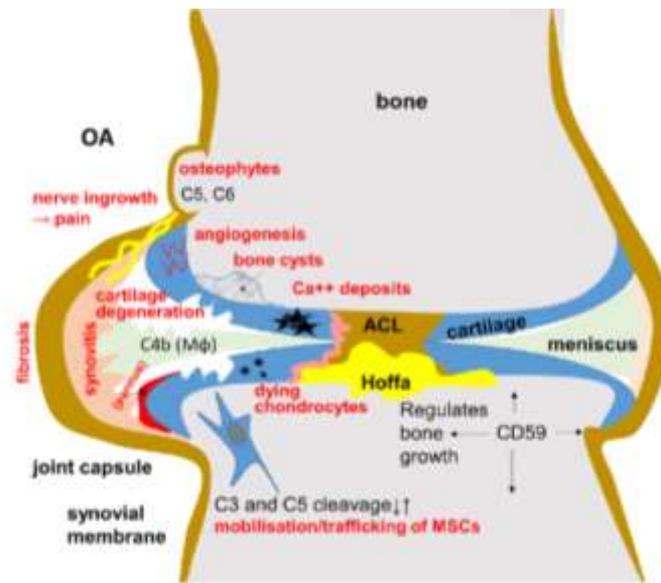


Figura 2.5 – Ruolo del complemento nella patogenesi dell'artrosi

La patogenesi dell'osteoartrosi risulta pertanto un complesso processo influenzato da numerosi fattori. Una conoscenza sempre più accurata di questi meccanismi potrebbe rappresentare la base su cui sviluppare una terapia in grado di arrestare il processo patologico e rallentare definitivamente la progressione.

2.5 Segni e sintomi in corso di artrosi

La presentazione clinica di questa patologia può variare a seconda del compartimento coinvolto e di quanto siano estese le lesioni. L'esame obiettivo risulta fondamentale, permettendo al clinico di riconoscere la patologia ed escludere le possibili diagnosi differenziali. Oltre alla valutazione di segni e sintomi, è necessario inquadrare il paziente tramite una attenta anamnesi mirata alla presenza di fattori di rischio. I principali sintomi sono il dolore e le problematiche legate alla limitazione funzionale. Il dolore è tipicamente esacerbato dal carico e dai movimenti, la genesi di questo sintomo risulta particolarmente complessa. La

cartilagine è un tessuto scarsamente innervato, e pertanto non partecipa in modo diretto allo sviluppo della sintomatologia. L'infiammazione invece, tramite la sensibilizzazione dei nocicettori periferici, ricopre un ruolo fondamentale. Tramite questo meccanismo patogenetico la sinovite pare essere un attore principale nella genesi del dolore, spiegando parzialmente un riscontro molto comune nella clinica di questa patologia, ovvero la discrepanza tra sintomatologia e quadro radiologico. Caratteristica dell'osteoartrosi è una rigidità al risveglio o in seguito ad inattività, tale condizione è tipicamente transitoria e breve, tendendo alla risoluzione con i primi movimenti. Il tipico andamento temporale risulta un elemento importante per la diagnosi differenziale nei confronti di patologie reumatiche.

Con il progredire della degenerazione articolare all'esame obiettivo è possibile oggettivare un aumento delle dimensioni del segmento coinvolto, dovuto principalmente alla presenza di osteofiti e al liquido sinoviale in eccesso, in assenza di ipertermia al termotatto. Sono presenti rumori alla mobilizzazione passiva ed attiva dell'articolazione colpita, segno di degenerazione tissutale avanzata e severa perdita cartilaginea. La limitazione funzionale è solitamente progressiva e rappresenta uno degli aspetti che più impatta nella qualità di vita di questi pazienti. Gli osteofiti sembrano essere sintomatici in particolar modo durante la loro formazione, nelle fasi più avanzate possono contribuire alla deformità articolare apprezzabile all'ispezione [35].

Tipicamente il dolore per coinvolgimento del ginocchio si manifesta con la deambulazione e durante la risalita e la discesa di scale. Si può anche associare, nelle fasi più avanzate, ad una alterazione della marcia su base antalgica. Questa conseguenza può essere responsabile di squilibri biomeccanici e sviluppo di altre patologie del sistema muscolo scheletrico [8].

2.6 Diagnosi

La diagnosi di artrosi è basata sulla presentazione clinica della patologia [36]. I diversi esami strumentali disponibili sono in grado di fornire informazioni sulla

morfologia articolare e, talvolta, sono necessari per indirizzare il paziente al corretto percorso terapeutico.

Sono state dettate delle linee guida da parte delle principali società scientifiche [37], una di queste è l'American College of Rheumatology che elenca segni e sintomi necessari per porre la diagnosi clinica (vedi Tabella 1).

CLINICI E RADIOLOGICI

CLINICI

Dolore al ginocchio	Dolore al ginocchio
ed almeno uno dei seguenti:	ed almeno tre dei seguenti:
Età maggiore di 50aa	Età maggiore di 50aa
Rigidità minore di trenta minuti	Rigidità minore di trenta minuti
Crepitii	Crepitii
Osteofiti	Dolore osseo
	Nessuna alterazione al termotatto
	Aumento di dimensione dell'articolazione

Tabella 1 – Criteri diagnostici dell'American College of Rheumatology

Anche l'European League Against Rheumatism sottolinea l'importanza della valutazione clinica nella diagnosi.

Per meglio indagare le alterazioni patologiche e morfologiche possono essere utili diversi esami strumentali. L' Rx tradizionale risulta un esame poco costoso e tuttora di rilevante importanza. Per lo studio del ginocchio deve essere eseguita in due proiezioni (antero-posteriore e laterale), permettendo la valutazione di eventuali sublussazioni e deformità quali valgismo e varismo.

In genere il compartimento mediale risulta la regione con maggiori reperti strumentali, tra i più caratteristici in corso di questa patologia vi sono:

- Riduzione della rima articolare (femoro-tibiale e patello-femorale)
- Osteofiti
- Sclerosi ossea
- Cisti subcondrali
- Varismo o Valgismo

La scala di Kellegren-Lawrence è molto utilizzata per descrivere radiologicamente il grado di artrosi [36]; essa si basa principalmente sulla riduzione dello spazio articolare e sulla comparsa di osteofiti articolandosi in quattro stadi:

- Grado 0: nessun reperto radiologico
- Grado 1: dubbio restringimento dello spazio articolare e possibili osteofiti
- Grado 2: definito restringimento dello spazio articolare ed osteofiti definiti
- Grado 3: definito restringimento dello spazio articolare, sclerosi ossea iniziale, moderate multiple formazioni osteofitosiche
- Grado 4: grandi osteofiti, marcato restringimento dello spazio articolare, severa sclerosi ossea

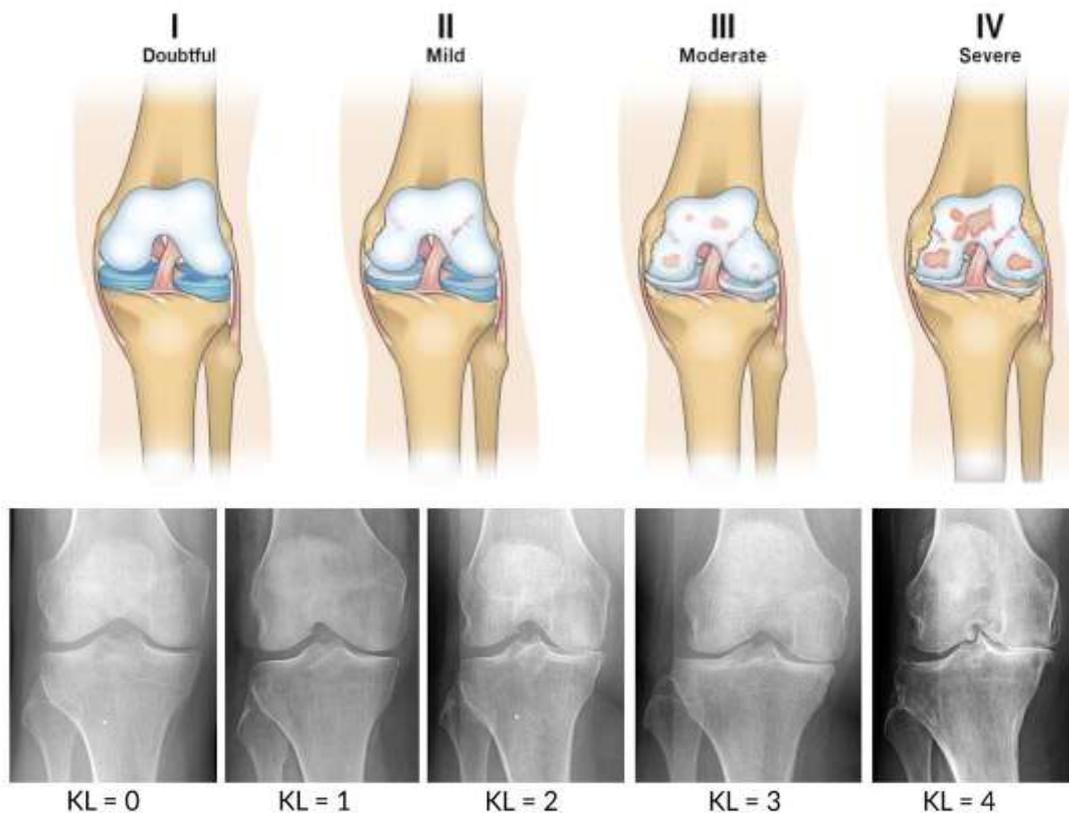


Figura 2.11 – Rappresentazione grafica e Rx antero-posteriori dei diversi gradi della scala di Kellgren-Lawrence

La risonanza magnetica è un esame di secondo livello, particolarmente utile per lo studio dei tessuti molli utilizzabile in pazienti che presentano un esame Rx non dirimente.

Tramite questa valutazione strumentale si può osservare in modo accurato la presenza di edema osseo ed eventuali lesioni dei crociati. La risonanza è inoltre in grado di evidenziare reperti molto precoci di degenerazione cartilaginea tramite studio in sequenze Gradient Echo T2 fat-suppressed e Fast Spin Echo T2.



Figura 2.12 – RMN che evidenzia edema osseo sul condilo femorale tramite sequenza T2

La TC non è invece una metodica molto utilizzata per la diagnosi; infatti, nonostante offra importanti informazioni multiplanari sulla qualità ossea, espone il paziente ad una dose maggiore di radiazioni ed è pertanto meno utilizzata.

2.7 Terapia

La terapia si compone di strategie conservative e chirurgiche, finalizzate a ridurre la sintomatologia e rallentare, per quanto possibile, la progressione della patologia. Per quest'ultimo obiettivo, l'utilizzo di cellule staminali rappresenta una nuova frontiera terapeutica che fino ad ora ha rivelato dati molto promettenti. Oggigiorno, seppur l'artrosi abbia una importante prevalenza e pertanto sia molto studiata, non è ancora disponibile alcun farmaco in grado di arrestare completamente il processo degenerativo articolare ed intervenire in maniera mirata sui processi patogenetici [26]. Molti pazienti durante la loro vita si ritrovano a sottoporsi ad un trattamento chirurgico di sostituzione protesica dell'articolazione che, nonostante rappresenti una terapia con grande probabilità di successo, risulta un trattamento invasivo, associato a possibili complicanze [38]. Questa strategia terapeutica è ottimale in pazienti con sintomi severi che non riescono ad essere controllati tramite terapia conservativa. Un tema di grande interesse attuale, è l'approccio della Medicina Rigenerativa [39]. L'obiettivo di queste tecniche è rallentare i processi degenerativi

stimolando al contempo l'anabolismo tissutale. A questo proposito, le cellule staminali mesenchimali hanno un grande razionale biologico, grazie al loro fisiologico ruolo di favorire i processi riparativi e di ridurre lo stato infiammatorio [40].

Una strategia attuabile in ogni paziente è il controllo dei fattori di rischio, lo stile di vita può infatti influire in maniera importante sulla progressione della patologia e ridurre la comparsa di artrosi sintomatica in altri distretti. Il peso corporeo è uno dei fattori modificabili più importanti [41]. Pazienti con un eccessivo BMI devono essere incoraggiati a perdere peso tramite lo svolgimento di attività fisica di modesta entità, in grado di ridurre il loro BMI e consentire il mantenimento di un adeguato trofismo muscolare [5]. Bisogna altresì tenere presente che eccessivi carichi e determinati movimenti possono costituire fattore di rischio, sovraccaricando le componenti articolari ed avendo pertanto un effetto deleterio.

2.7.1 Antidolorifici ed antinfiammatori

Farmaci in grado di dare un temporaneo sollievo ai sintomi sono oggetto di frequentemente consumo da parte di soggetti affetti da artrosi sintomatica. Tra i più utilizzati vi sono gli antinfiammatori non steroidei che, seppur efficaci nel contenere il dolore, non possono essere utilizzati cronicamente e pertanto risultano una strategia inefficace sul lungo termine. Tra questi, gli inibitori di COX-2 hanno una grande efficacia ma potenzialmente dei grossi effetti avversi a livello cardiovascolare, controindicando questa terapia per lunghi periodi. Oppiacei deboli sono utili a controllare momentaneamente il dolore nei casi più gravi ma anche questi composti, per considerazioni analoghe alla terapia con FANS, non si prestano ad essere utilizzati in maniera cronica [15].

2.7.2 Viscosupplementazione

Oltre a farmaci con effetto sistemico esistono terapie che agiscono direttamente a livello all'articolazione colpita. Si possono effettuare infiltrazioni intra articolari di differenti molecole, riuscendo ad ottenere risultati consistenti e duraturi [42].

L'acido ialuronico è una molecola essenziale per l'articolazione, che contribuisce a garantirne un funzionamento ottimale. La sua produzione avviene ad opera delle

cellule sinoviali e dei condrociti ed è composto da acido glucuronico ed N-acetilglucosamina. La sua principale funzione è ridurre la frizione tra i capi articolari, proteggendo le cartilagini dall'usura meccanica. È stato inoltre dimostrato, studiando i benefici derivati dall'infiltrazione di acido ialuronico, che può essere in grado di ridurre la flogosi intra articolare [42].

Una concentrazione deficitaria di questa molecola, come accade durante i processi senili, può contribuire alla genesi di danno cartilagineo e all'insorgenza di artrosi. Inizialmente, le teorie riguardanti l'efficacia della viscosupplementazione con acido ialuronico attribuivano il beneficio clinico solamente al ruolo biomeccanico di questa molecola. Queste teorie non sono supportate dall'evidenza che l'infiltrato presenti una durata intra articolare molto minore rispetto al miglioramento clinico [43]. Pertanto sono stati effettuati studi riguardo alla modalità con cui questa molecola possa apportare un beneficio in corso di artrosi, evidenziando la capacità dell'acido ialuronico nel promuovere la sintesi endogena di componenti della matrice e di interferire con la produzione di citochine e metalloproteasi [44].

Al momento sono presenti svariate preparazioni, le principali differenze e caratteristiche sono legate a:

- peso molecolare
- presenza di cross link.
- viscosità

L'iniezione è solitamente effettuata lateralmente al tendine rotuleo e, se vi è la presenza di un grande versamento, si procede in un primo momento all'aspirazione di liquido sinoviale.

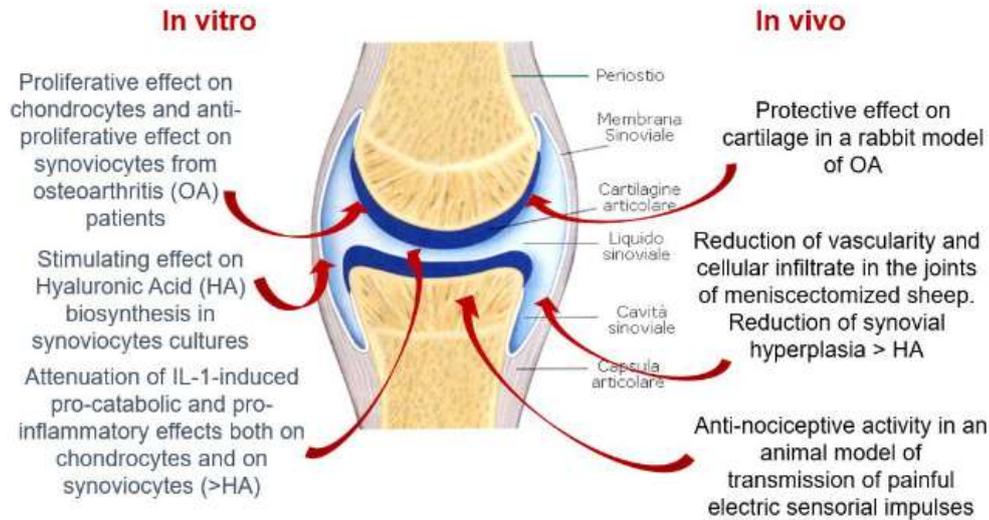


Figura 2.13 – Ruolo delle infiltrazioni di acido ialuronico a livello articolare

2.7.3 Corticosteroidi

Anche i corticosteroidi possono essere infiltrati a livello articolare. Diverse molecole come l'idrocortisone e il metilprednisolone sono utilizzate con il fine di ridurre lo stato infiammatorio articolare e contenere la sintomatologia. Seppur questi farmaci abbiano un grandissimo potenziale nel combattere l'infiammazione articolare è altresì vero che sono si associano ad un grande effetto catabolico, rischiando pertanto di risultare uno stimolo nocivo, in particolare per il tessuto osseo. Per questo motivo si tende a limitare l'uso di queste infiltrazioni che sono una strategia puramente sintomatica e non risolutiva nel lungo termine [45].

2.7.4 Platelets Rich Plasma

Il Platelets Rich Plasma (PRP) è un preparato che sfrutta l'azione dei fattori piastrinici implicati nei processi di guarigione. Il PRP si ottiene tramite un prelievo di sangue periferico che viene processato per ottenere una soluzione attiva biologicamente. In campo ortopedico è utilizzato non solo per il trattamento dell'artrosi ma anche per favorire la riparazione di lesioni tendinee e legamentose [46].

Le piastrine sono componenti cellulari che fisiologicamente partecipano al processo emostatico, contribuendo a contenere le emorragie. In relazione a questa loro funzione, che si verifica in un contesto di lesione vasale, hanno anche un ruolo

favorente la riparazione dei tessuti lesionati grazie alla liberazione di numerosi fattori. Il PRP si ottiene con un processo di centrifugazione che sfrutta il diverso peso specifico cellulare per isolare la componente piastrinica. Solitamente questa procedura si attua seguendo due cicli di centrifugazione, il primo con il fine di separare plasma e contenuto cellulare, il secondo permette la concentrazione del PRP. L'estratto viene poi unito ad una particolare soluzione che permette la liberazione dei fattori implicati in processi rigenerativi, tra cui [47]:

- TGF-beta1-2-3
- PDGF
- IGF-1
- PDAF (platelets-derived angiogenesis factor)
- EGF
- ECGF (epidermal cells growth factor)
- VEGF



Figura 2.14 – Strumento utilizzato per la produzione di PRP

2.7.5 Chirurgia Protetica

La chirurgia protesica rappresenta un campo della chirurgia in continua evoluzione e risulta la strategia terapeutica di maggior successo in pazienti con artrosi avanzata associata a severe limitazioni funzionali. Nuovi design protesici e materiali ottimizzati hanno portato queste procedure a grandi traguardi terapeutici [48]. L'aspetto negativo che permane rispetto a tale metodica è rappresentato

dall'invasività dell'intervento chirurgico e dai rischi correlati ad un approccio intervertebrale. Oggigiorno esistono differenti tipologie di impianti protesici, permettendo al chirurgo di personalizzare la terapia in base alle esigenze e all'anatomia del paziente. Vi è poi una continua ricerca per ottenere le migliori caratteristiche fisiche ed una ottimale biomeccanica, aspetti necessari a garantire una lunga durata dell'impianto. Il chirurgo, in base all'estensione della gonartrosi può scegliere se impiantare una protesi totale di ginocchio o sostituire un solo compartimento.

2.7.6 Protesi monocompartimentale

La protesi monocompartimentale rappresenta una scelta attuabile in pazienti con una artrosi limitata ad un solo compartimento; a tal proposito, è bene ricordare che generalmente il più colpito è il compartimento femoro-tibiale mediale [48]. Questa metodica presenta diversi vantaggi, dovuti alla minore invasività dell'intervento, tra cui [50]:

- minore dolore percepito
- minore perdita ematica
- recupero post-operatorio più rapido
- minore area di incisione

La problematica principale è legata al fatto il paziente potrebbe necessitare una sostituzione totale di ginocchio in un momento successivo, nonostante sia già stato sottoposto ad un intervento di chirurgia protesica.



Figura 2.15 – *Protesi monocompartimentale del ginocchio destro*

2.7.7 Protesi totale

La protesi totale di ginocchio è un intervento dedicato a pazienti con gonartrosi diffusa e si associa in genere ad alti tassi di soddisfazione post-operatori [48]. Dalle prime esecuzioni i materiali e il design protesico sono stati rivoluzionati rendendo questa metodica uno dei più grandi successi ottenuti in campo ortopedico.

Tra gli obiettivi della protesi totale vi sono:

- Risoluzione della sintomatologia
- Aumento della motilità articolare
- Migliore qualità di vita

Le indicazioni principali di questo intervento sono:

- Dolore severo associato a limitazione funzionale
- Dolore persistente durante le ore notturne
- Infiammazione e gonfiore massivi refrattari a terapia medica
- Insuccesso terapeutico della terapia conservativa

La protesi può essere installata tramite l'uso di sostanze cementanti o senza l'ausilio di quest'ultime. Sono realizzate da diverse componenti e necessitano adeguatezza da un punto di vista dimensionale, evitando alterazioni biomeccaniche e conflitti anatomici. Si compongono di una componente tibiale, una porzione in polietilene e della componente femorale. La rotula può essere a sua volta protesizzata o mantenuta in sede.

La componente femorale è realizzata in metallo e può essere inserita sul condilo femorale dopo un'osteotomia preparatoria. Durante l'intervento il chirurgo valuta la misura corretta della protesi con numerose prove per assicurarsi un ottimale posizionamento dell'impianto.

La componente tibiale è inserita in seguito alla preparazione del piatto tibiale e risulta composta da metallo (piatto tibiale) e da una porzione in polietilene che si articola con la controparte femorale. La porzione in polietilene è la principale struttura sottoposta ad usura.

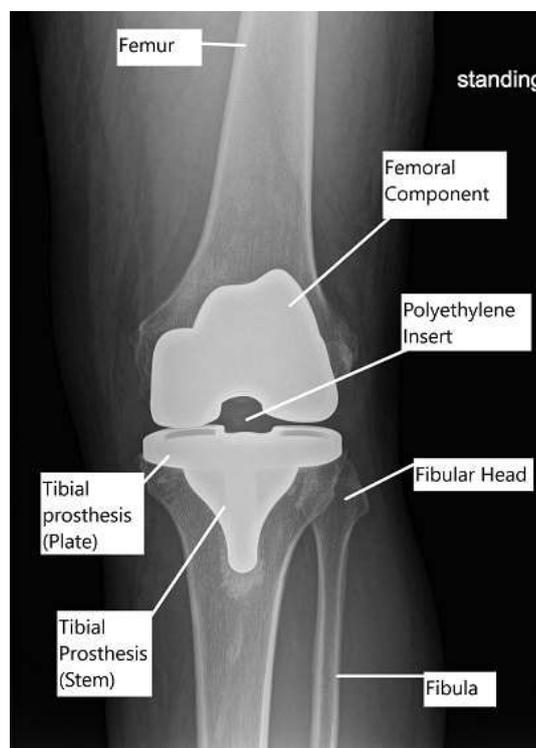


Figura 2.16 – *Protesi totale di ginocchio*

2.7.8 Complicanze

Possono presentarsi diversi eventi avversi relazionati a questo intervento chirurgico, sia in modo tempestivo che a distanza di anni dall'inserimento della protesi.

Le complicanze peri-operatorie sono legate al generico rischio correlato ad un intervento chirurgico [51]. Tra queste vi sono perlopiù eventi di natura cardiaca o infettiva alle basse vie aeree e al tratto urinario, verificandosi più frequentemente in soggetti di età avanzata. Una seria complicanza è la mobilitazione asettica della

protesi che può essere dovuta ad un impianto chirurgico non ottimale o a condizioni di alterata densità ossea. Incorre solitamente dopo tempo e si manifesta tipicamente con dolore ed instabilità.



Figura 2.17 – *Mobilizzazione asettica di una protesi di ginocchio, si possono notare evidenti aree di osteolisi*

La complicanza tardiva di maggior rischio è l'infezione dell'impianto protesico. L'infezione è causata dalla contaminazione da parte di patogeni, per via ematogena o per contatto diretto. La clinica si caratterizza per un imponente rialzo febbrile, arrossamento del segmento interessato e dolore. Tale condizione deve essere inquadrata mediante l'uso di Triple-phase technetium-99 bone scan [52]. Nei casi più gravi, oltre alla terapia antibiotica, è necessario rimuovere l'impianto ed inserirne momentaneamente uno in cemento biotato, in associazione a terapia antibiotica sistemica. In un secondo tempo può essere attuato l'impianto di una nuova protesi.

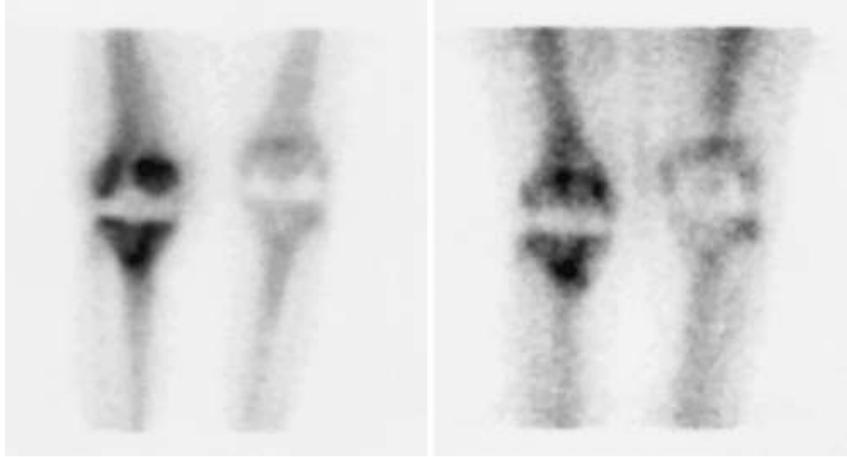


Figura 2.18 - *Protesi infetta visualizzata tramite scintigrafia ossea*

2.7.9 Protesi 3D-printed

Un'ulteriore frontiera della sostituzione totale di ginocchio è la realizzazione di protesi personalizzate tramite l'utilizzo di stampanti 3D. In chirurgia protesica, per evitare complicanze e ridurre i tassi di insuccesso, risulta fondamentale la precisione dell'impianto. A questo proposito, la più recente tecnologia mette a disposizione la produzione di protesi in grado di garantire una eccezionale funzionalità biomeccanica, ottenuta grazie alla progettazione basata esclusivamente sull'anatomia di un determinato paziente.

Questo approccio, per problematiche legate ai costi e alle tempistiche, non rappresenta ancora lo standard nella sostituzione del ginocchio ma è ipotizzabile che nel futuro andrà a diffondersi in maniera sempre maggiore. Sono diverse le caratteristiche che rendono questa tecnologia vantaggiosa, grazie alla minore resezione di tessuto articolare e del rischio di sviluppare complicanze. Ulteriormente, essendo progettate su misura con una precisione pari al millimetro, non sono causa di conflitto con strutture anatomiche, una problematica frequentemente responsabile di dolore con impianti tradizionali. Per creare il modello 3d è necessario lo studio TC non solo del ginocchio ma anche di anca e caviglia, studiando gli assi dell'arto inferiore ed indagando in modo dettagliato l'anatomia ossea del paziente [53].

CAPITOLO 3

NUOVE PROSPETTIVE TERAPEUTICHE: LE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI

3.1 Introduzione

Da alcuni anni è emerso un grande interesse verso le potenzialità terapeutiche delle cellule staminali in numerosi campi della medicina. In particolare, il razionale di questa strategia è legato al ruolo biologico di queste cellule, capaci di differenziare in cellule tipiche del tessuto lesionato e al contempo modulare i processi infiammatori, creando un microambiente che predisponga alla riparazione tissutale [54]. Tra le varie tipologie si annoverano le cellule mesenchimali staminali: queste cellule sono facilmente ottenibili dal tessuto adiposo grazie a strumenti che permettono il loro isolamento in maniera rapida ed efficace, permettendone l'infusione in una determinata sede anatomica a fini terapeutici. In ortopedia queste tecniche sono state utilizzate in particolar modo per contrastare la progressione del processo artrosico e la letteratura evidenzia l'efficacia di questo tipo di trattamento. L'infusione di staminali, nel caso dell'artrosi di ginocchio, può essere associata a procedure artroscopiche andando a costituire un trattamento chirurgico con enormi potenzialità terapeutiche [55]. Seppur diversi aspetti molecolari non siano ancora stati completamente compresi, sono numerosi gli studi che dimostrano l'efficacia delle staminali nel migliorare la qualità di vita del paziente.

3.2 Cellule Staminali

Per staminali si intende cellule capaci di rinnovarsi e dare origine a differenti linee cellulari. In base alla capacità differenziativa si distinguono in:

- cellule totipotenti: esse sono presenti prima dell'impianto del feto tra il terzo e il quinto giorno dalla fecondazione e sono capaci di dare origine a qualsiasi tessuto umano ed extraembrionale (placenta);

- cellule pluripotenti: sono in grado di differenziare in ogni tipologia di tessuto umano adulto;
- cellule multipotenti: da questa tipologia di cellule derivano solo determinate tipologie di cellule differenziate [56].

Le cellule staminali si classificano inoltre in base alla loro origine come staminali embrionali o dell'adulto.

Ulteriormente, in tempi recenti, grazie ad un metodo sviluppato da Yamanaka si è riusciti ad ottenere delle cellule staminali pluripotenti indotte riprogrammando fibroblasti, una scoperta che ha permesso maggiore comprensione nei confronti di queste particolari cellule, talvolta difficili da maneggiare [57].

Le cellule staminali dell'adulto sono presenti in differenti sedi quali il tessuto adiposo, midollo osseo ed altri tessuti, svolgendo un ruolo importante in diversi processi di rigenerazione tissutale, tra queste vi sono cellule:

- ematopoietiche
- mesenchimali
- epiteliali

Hanno un ruolo fondamentale nei processi di riparazione ed omeostasi tissutale, caratteristica per cui si sono dimostrate efficaci in patologie degenerative. Esse presentano infatti diversi recettori per chemochine che permettono di reclutarle in sede di flogosi [56]. A questo livello svolgono la loro funzione tramite produzione di fattori di crescita, favorendo angiogenesi e sintesi di matrice. Rispetto alla componente staminale embrionale, la cui manipolazione risulta difficoltosa e gravata da severe problematiche bioetiche, le staminali mesenchimali si prestano all'utilizzo terapeutico in diversi contesti patologici [56].

3.2.1 Differenziamento e metabolismo delle staminali

La sede di prelievo delle staminali si associa alla propensione verso un particolare tipo di differenziamento. Questi passaggi sono stati ben dimostrati in vitro e sono conosciute alcune citochine capaci di indurre una determinata differenziazione.

Un esempio di questo fenomeno è la spiccata capacità differenziativa nei confronti di linee neuronali da parte di staminali isolate dalla matrice del cordone ombelicale [56].

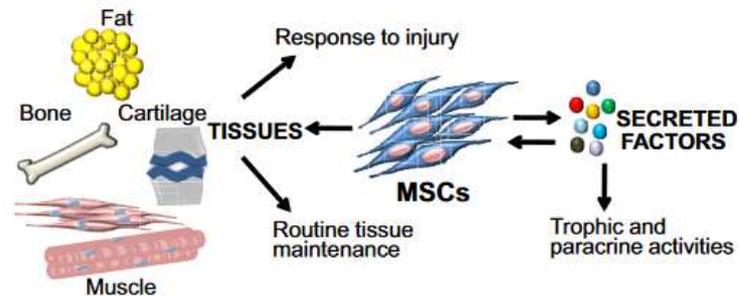


Figura 3.1 – Schema rappresentante la capacità differenziativa delle cellule mesenchimali staminali indotta da fattori presenti nel microambiente

Le staminali hanno una morfologia simil-fibroblastica, possono essere caratterizzate in base all'espressione di CD73 e CD90 e alla minore espressione di marcatori quali CD34 e CD45 [55].

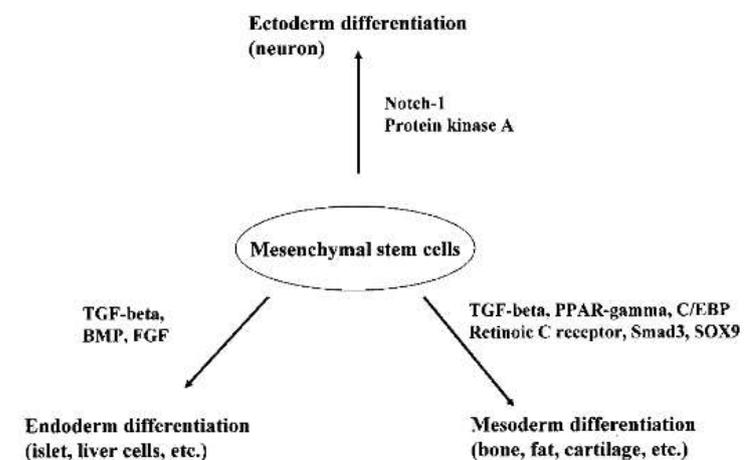


Figure 3. Effects of various pathways on MSCs differentiation. MSCs can differentiate to form various lineages through different cytokines and pathways. TGF, transforming growth factor; BMP, bone morphogenetic protein; FGF, fibroblast growth factor.

Figura 3.2 – Principali fattori coinvolti nel differenziamento delle staminali mesenchimali

Oltre all'aspetto implicato nella riparazione tissutale, le cellule mesenchimali svolgono un ruolo altrettanto importante nella modulazione immunitaria. Durante qualsiasi danno tissutale risulta fondamentale contenere il processo infiammatorio poiché, in caso di cronicizzazione, andrebbe ad ostacolare la riparazione delle lesioni. Per questo motivo tali cellule sono una grande risorsa autologa utilizzabile

in processi in cui la flogosi ha un rilevante ruolo patogenetico, alcuni esempi di grande successo sono le applicazioni nella Malattia di Crohn e nella GvHD [58].

Una evidenza di grande importanza è rappresentata dal fatto che le staminali possano influenzare la polarizzazione macrofagica e ridurre la migrazione di queste cellule, una funzione che potrebbe risultare di concreto aiuto nel ridurre la flogosi articolare in corso di artrosi.

Il loro ruolo biologico è svolto principalmente dal secretoma. Con questo termine si intende l'insieme di citochine e fattori secreti dalle staminali in grado di esplicare le funzioni immunomodulanti e riparative.

Il secretoma contiene numerose fattori tra cui:

- IL-10
- TGF beta
- IL-1Ra
- VEGF

L'IL-10 è un'interleuchina ha un forte ruolo nello spegnimento del processo flogistico, una molecola con azione simile è il TGF beta, che si è dimostrato in grado di attivare le T-regolatorie e ridurre l'attivazione dei linfociti Th-17. L'IL-1Ra è in grado di legare direttamente l'IL-1, una delle più potenti interleuchine infiammatorie e di indurre la polarizzazione macrofagica M2 [59].

Oltre ad interleuchine sono secreti anche miRNA, in grado di ridurre l'espressione di chemochine e fattori di crescita come VEGF, HGF-1 e Leukemia Inhibitory Factor [56]. Pertanto l'insieme di questi meccanismi contribuisce a contrastare le alterazioni patogenetiche presenti in corso di artrosi e migliorare l'andamento clinico della patologia.

3.3 Metodiche di prelievo ed isolamento delle cellule staminali mesenchimali

Il tessuto adiposo rappresenta una grande riserva di staminali mesenchimali e si presta pertanto molto bene a prelievi autologhi con fini terapeutici nei confronti dell'artrosi di ginocchio [60].

Al momento, l'infusione di staminali si utilizza in un unico momento durante l'intervento chirurgico; la crioconservazione di staminali mesenchimali potrebbe essere una prospettiva in grado di amplificare i miglioramenti clinici, una strategia non attualmente permessa dalla legislazione europea. Questa terapia può rappresentare una risorsa concreta in grado di procrastinare la sostituzione protesica dell'articolazione e costituire un'opportunità per il trattamento di pazienti in cui la sostituzione di ginocchio risulta controindicata. Al momento numerosi studi testimoniano l'efficacia di queste cellule, e in futuro, con i progressi della ricerca e l'osservazione dei risultati clinici, risulteranno ancora più definite le lesioni che traggono il maggior beneficio da questa terapia [61].

Le cellule staminali contenute nel tessuto adiposo possono essere isolate tramite diverse strategie e sono prelevate generalmente tramite lipoaspirazione del tessuto adiposo. Questa metodica storicamente si avvale della soluzione di Klein, contenente 250 ml di fisiologica, 0.5 ml di adrenalina 1mg/ml e 20 ml di lidocaina al 2%. L'utilizzo di questa soluzione permette di assicurare analgesia e vasocostrizione, riducendo le perdite ematiche e la contaminazione del prelievo. In ambito di medicina rigenerativa è stato osservato che la lidocaina possiede un effetto tossico sulla componente mesenchimale staminale e pertanto dovrebbe essere evitato l'uso di questa molecola [62]. Ulteriormente la lidocaina presenta anche tossicità sui condrociti, un ulteriore ragione per cui non deve essere utilizzata durante il prelievo del tessuto adiposo [63]. Per quanto riguarda la processazione esistono metodi enzimatici e non enzimatici. I primi sono complessi e generalmente richiedono tempistiche maggiori, mentre i metodi meccanici sono nettamente più maneggevoli in sala operatoria. Oggigiorno infatti quest'ultimi sono i dispositivi più utilizzati: sono stati condotti studi che hanno dimostrato quanto questi possano risultare affidabili nella manipolazione del tessuto adiposo e che non vi siano sostanziali differenze a livello biologico tra i differenti kit presenti sul mercato.

3.3.1 Aspetti normativi

L'utilizzo terapeutico di staminali è sottoposto a numerosi aspetti giuridici che ne regolamentano l'uso e pongono limiti al loro utilizzo. La legislazione in Italia fa riferimento all'Agenzia Italiana del Farmaco e al Centro Nazionale Trapianti, in

accordo con le linee dettate dall'European Medicines Agency (EMA). In altri contesti sono presenti differenti regolamenti talora molto più permissivi di quelli vigenti in Europa. A seconda del trattamento attuato al lipoaspirato si possono configurare differenti situazioni [64]. Il prodotto ottenuto tramite utilizzo di collagenasi e centrifugazione è definito una terapia avanzata. Le terapie avanzate si dividono in quattro categorie:

- Terapia genica
- Terapia con cellule somatiche
- Ingegneria tissutale
- Dispositivi medici contenenti cellule o tessuti

Queste terapie sono state regolamentate dall'EMA nel 2007 al fine di definire delle normative per l'utilizzo di queste moderne tecnologie. Vi sono specifiche commissioni che hanno valutato la sicurezza di questi trattamenti e pertanto le staminali trattate con metodo enzimatico sono considerate da un punto di vista legislativo come un farmaco.

Rientra in un altro contesto legislativo una minima manipolazione tissutale, come avviene con Lipogems. In particolare questo genere di procedure viene assimilato giuridicamente ad un trapianto ed è pertanto regolamentato dal Centro Nazionale Trapianti. Un concetto fondamentale è la definizione di "omofunzionalità" che esclude l'inclusione del tessuto adiposo minimamente manipolato nei dispositivi medici avanzati. L'EMA definisce questo concetto in un documento del 2015, in cui sono affrontati diversi temi tra cui l'utilizzo di cellule staminali a fini terapeutici [65]. In questo documento l'EMA afferma che si può definire omofunzionale, e pertanto escludibile dalla definizione di farmaco avanzato, un prelievo di cellule o tessuto non sottoposto a grandi manipolazioni usati per la stessa, essenziale funzione svolta nel tessuto di origine. Pertanto, alla luce di queste osservazioni, è presente una complessa legislazione nei confronti di questo genere di procedure che deve necessariamente essere conosciuta dal chirurgo per agire rispettare i canoni delle agenzie regolamentatrici presenti sul territorio Europeo.

3.3.2 Metodo enzimatico

Il metodo enzimatico è stato il primo strumento utilizzato per trattare il tessuto adiposo aspirato. È una metodica complessa che richiede un ambiente sterile, effettuando ogni operazione sotto cappa a flusso laminare. In particolare si sottopone il lipoaspirato a lavaggio con tampone fosfato salino contenente penicillina/streptomicina. Dopo questi passaggi è possibile attuare la digestione enzimatica tramite una soluzione contenente collagenasi. A seguito della centrifugazione si formeranno differenti fasi, rispettivamente di trigliceridi nella porzione superiore, cellule di interesse terapeutico nella porzione centrale e un sedimento di emazie. Una volta isolata la porzione centrale si può procedere all'infusione.

3.3.3. Metodo non enzimatico: Lipogems

Lipogems è un kit monouso costituito da un circuito chiuso ideato per la manipolazione del lipoaspirato a fini terapeutici. Lipogems rappresenta un efficace metodo non enzimatico per la separazione di componenti attive a livello biologico, ovvero di staminali mesenchimali tramite la formazione di cluster adiposi della dimensione di circa 0.8 mm [66].

La procedura, a livello chirurgico, inizia tramite il prelievo del lipoaspirato. Il tessuto è prelevato solitamente con una liposuzione a livello dell'addome; talvolta possono essere preferite altre sedi quali il gluteo o la coscia. Nel caso venisse attuato un prelievo in sede addominale, il paziente è posizionato in posizione supina ed è infusa la soluzione di Klein modificata. Come già descritto, la lidocaina è un composto condrotossico e nocivo per le staminali e pertanto la scelta ottimale è attuare una anestesia spinale, utile anche ai fini dell'artroscopia. Tramite l'uso di cannule, dopo una breve incisione, può essere collezionato il tessuto adiposo. Solitamente questo passaggio chirurgico non è gravato da importanti complicanze: le più frequenti si presentano a livello locale, principalmente con la formazione di ematomi. A livello teorico, in particolar modo nei pazienti anziani, la liposuzione potrebbe generare squilibri elettrolitici, ma essendo la quantità di aspirato molto ridotta in questa procedura non è solito verificarsi questa complicanza.

Il kit Lipogems è costituito da:

- Cannula per l'infiltrazione di anestetico 17Gx185 mm
- Cannula per la liposuzione 13Gx185mm
- Cannula per l'infiltrazione di lipoaspirato processato 20Gx70mm
- Siringa VAC160 vacuum
- 3x siringhe in policarbonato da 1ml
- 4x siringhe di policarbonato da 10 ml
- 4x siringhe di policarbonato da 60 ml
- 2x connettore Luer Lock
- Sacca sterile
- Sistema cilindrico di separazione meccanica

3.3.4 Prelievo del tessuto adiposo

Dopo aver iniettato la soluzione di Klein e aver atteso qualche minuto, è possibile connettere la siringa VAC vacuum alla cannula specifica per l'aspirazione e procedere, tramite movimenti "a violino", al prelievo del lipoaspirato.

3.3.5 Preparazione del sistema Lipogems

Per la preparazione occorre collegare il sistema alla soluzione fisiologica avendo cura di riporla in modo che una volta aperta riesca a defluire per gravità. La sacca per gli scarti sarà invece posta inferiormente in modo che vi si possano depositare le porzioni non desiderate dopo i cicli di lavaggio. Quando il cilindro risulta riempito di soluzione fisiologica, è possibile chiudere le due connessioni con le sacche.

Una volta collezionata una quantità di grasso sufficiente, il lipoaspirato può essere infiltrato nel cilindro contenente soluzione salina attraverso il filtro colorato. Aprendo la soluzione salina e mantenendo in posizione il cilindro si può iniziare ad apprezzare la separazione delle varie componenti, separando la componente ematica dalla soluzione. Questo passaggio può essere ripetuto aggiungendo nuovamente lipoaspirato.

Una volta iniettata nel sistema di separazione una quantità di lipoaspirato sufficiente si può procedere a scuotere il cilindro: questo passaggio deve essere attuato idealmente in quattro passaggi ciascuno da circa 15 secondi. Al termine di questa fase si procede con un'ulteriore lavaggio rimuovendo ulteriormente la componente oleosa e residui cellulari.

Infine con una siringa da 10 ml collegata al polo inferiore si deve quindi attuare una pressione che spingerà il lipoaspirato processato a livello della siringa apicale; a questo punto, si può procedere con l'infusione a livello articolare.

Lipogems rappresenta pertanto una innovativa tecnica per la manipolazione del tessuto adiposo, caratterizzata da una ottimale eliminazione della componente oleosa pro infiammatoria e da una minima modulazione meccanica, in grado di preservare la componente cellulare biologicamente implicata nei processi riparativi [66].

3.3.6 Metodo non enzimatico: Lipocell

Il sistema Lipocell è un ulteriore dispositivo per il processamento non enzimatico di tessuto adiposo autologo a fini terapeutici. Si presta a diverse applicazioni tra cui, in campo ortopedico, l'infiltrazione di staminali a livello articolare.

Il concetto cardine su cui è stata sviluppata la progettazione di questo sistema è la creazione di un dispositivo che limiti il più possibile eventi potenzialmente traumatici e dannosi per le cellule. Questo aspetto rappresenta il maggiore vantaggio di questa tecnica rispetto ad altre concorrenti.

Per questo motivo, Lipocell è caratterizzato da un isolamento delle staminali garantito da membrane semipermeabili, tramite un meccanismo simile ad un processo dialitico, permettendo di preservare al meglio l'integrità cellulare e le potenzialità terapeutiche delle mesenchimali.

La raccolta del tessuto adiposo viene effettuata come di consueto previa infusione di soluzione contenente adrenalina. Successivamente, una volta ottenuto il lipoaspirato, quest'ultimo viene trasferito in un'altra siringa per testare la presenza di contenuto fibroso che se presente dovrà essere rimosso.

I passaggi più importanti avvengono a livello della sacca contenuta nel kit. In essa sono presenti delle membrane rispettivamente di 15, 20 o 50 μm ed una volta iniettato il lipoaspirato si procede al lavaggio con circa 500 ml di soluzione fisiologica o in alternativa del Ringer lattato. Attuati questi passaggi il contenuto risulta macroscopicamente semi-trasparente e pertanto il lipoaspirato processato è pronto per essere aspirato ed infuso a livello dell'articolazione tramite un ago 18G.

Il trattamento del tessuto adiposo con Lipocell ha dimostrato ottenere una importante quota di cellule staminali, grazie alla minima manipolazione prima dell'applicazione di grosse forze fisiche.

Vi sono studi che hanno analizzato a livello microscopico l'efficacia di questo sistema confrontando il lipoaspirato non processato a quello trattato con Lipocell: a livello del tessuto trattato è stata dimostrata una quota molto bassa di sostanze oleose e potenzialmente pro-infiammatorie. Pertanto complessivamente Lipocell risulta una metodica che ha dimostrato, sia a livello clinico che biologico, eccellenti risultati e può rappresentare una grande risorsa per manipolare le mesenchimali staminali a fini terapeutici.



Figura 3.4 - *Kit Lipocell*

3.3.7 Puregraft

Puregraft è un ulteriore kit, che risponde ai canoni delle principali agenzie del farmaco, costituito da un sistema chiuso per la processazione di innesti autologhi con scopo rigenerativo. È disponibile in differenti configurazioni volumetriche. Il sistema è in grado di attuare una rapida filtrazione del lipoaspirato, è composto da un litro di soluzione di Ringer lattato, un dispositivo di filtrazione e due siringhe di 60 mL e due di 10 mL.

Il volume di lipoaspirato deve essere circa il doppio di quanto si desidera infiltrare a livello articolare. Una volta trasferito quanto prelevato dal paziente nel dispositivo di filtrazione si procede ad aspirare con una siringa da 60 ml la prima porzione di scarto, questo passaggio consente l'eventuale aggiunta di ulteriore lipoaspirato. Successivamente seguono dei cicli di lavaggio ed aspirazione per processare il contenuto ed una volta terminata questa fase si può procedere al prelievo della componente biologicamente attiva.

3.4 Artroscopia

L'artroscopia rappresenta una delle tecniche chirurgiche maggiormente utilizzate per la chirurgia del ginocchio. Le procedure artroscopiche permettono il trattamento di numerose condizioni patologiche e si sono diffuse principalmente a partire dagli anni 70' grazie ai progressi del supporto tecnologico necessario per questo approccio chirurgico. La tecnologia in questo campo risulta fondamentale e in futuro saranno disponibili strumenti ancora meno invasivi e maggiormente efficaci [2].

Inizialmente questa tecnica era utilizzata in particolar modo come strumento diagnostico, oggi, grazie ai progressi in campo radiologico e alla diffusione della RMN, questa indicazione risulta più limitata, seppur alla artroscopia si possano apprezzare con eccellente sensibilità le lesioni articolari.

Tra le più frequenti procedure svolte in artroscopia vi sono:

- Meniscectomie
- Suture meniscali
- Ricostruzione del crociato anteriore
- Interventi sulla componente cartilaginea

Tra i fattori che hanno costituito il successo di questa metodica vi è l'eccellente e dinamica visualizzazione delle strutture anatomiche e la minore invasività rispetto a tecniche open. Quest'ultima caratteristica rappresenta un'enorme vantaggio in termini di recupero post-operatorio, di riduzione del dolore e dei costi sanitari, rendendo l'artroscopia uno strumento terapeutico eccellente. Il ginocchio è frequentemente oggetto di interventi artroscopici, seppur questa metodica sia attuabile anche in altri distretti, avendo rivoluzionato ad esempio la chirurgia della spalla.

Durante un intervento artroscopico vengono usati differenti strumenti. L'artroscopio è fondamentale nel permettere la visualizzazione dell'articolazione e del gesto chirurgico. Può essere caratterizzato da diversi gradi di orientamento e lunghezza, il più frequentemente utilizzato ha un orientamento di 30°. La lunghezza deve risultare adeguata, in alcuni soggetti infatti, un artroscopio di dimensioni non sufficienti renderebbe difficoltosa la visualizzazione del corno posteriore del menisco mediale. La larghezza comunemente usata nell'artroscopia di ginocchio è di circa 4 mm, una dimensione che non genera particolare traumatismo e permette di muovere l'artroscopio con agilità all'interno dell'articolazione. Un dettaglio fondamentale è la qualità dell'immagine, requisito necessario al chirurgo per attuare una corretta stadiazione di un eventuale lesione intra articolare oltreché maggiore sensibilità chirurgica. Durante le fasi dell'intervento l'artroscopio è utilizzato tramite diverse vie di accesso per visionare tutte le componenti del ginocchio: queste manovre sono talvolta coadiuvate movimentando l'arto interessato.

Il video durante l'artroscopia è trasmesso su un monitor permettendo quando necessario l'acquisizione di immagini o video. Oltre all'artroscopio sono disponibili

diversi strumenti che, sotto visione indiretta del chirurgo, sono utilizzati per trattare lesioni tissutali. Differenti caratteristiche degli strumenti permettono un più facile accesso in determinate aree anatomiche e una maggiore adeguatezza nei confronti della procedura che deve essere svolta. Questi strumenti sono utilizzati per manipolare i tessuti ed attuare manovre meccaniche, eliminando talvolta componenti meniscali degenerate, ottenendo prelievi di sinovia e numerosi altri atti chirurgici. Oggigiorno hanno una grande diffusione strumenti meccanici motorizzati utilizzabili durante l'artroscopia che permettono una grande precisione, sono anche disponibili dispositivi per l'elettrocoagulazione adattati all'artroscopia. Vi sono differenti vie di accesso all'articolazione: il chirurgo durante l'artroscopia deve essere in grado di valutare i diversi compartimenti. Solitamente sono usate due vie di accesso, una anterolaterale ed una anteromediale.

I punti di accesso sono posti a livello del margine inferiore rotuleo, evitando di lesionare il tendine patellare. Spesso l'accesso superomediale è utilizzato per attuare l'irrigazione dell'articolazione. Sono possibili anche accessi a livello posteriore, questi sono utilizzati meno di frequente e sono particolarmente utili per visualizzare il crociato posteriore. In termini generali, durante un'artroscopia di ginocchio si vanno a valutare diverse componenti, il ginocchio solitamente è tenuto con una flessione di circa 70°. Prima di posizionare gli accessi è necessario identificare le strutture anatomiche che potrebbero essere danneggiate quali il tendine rotuleo.

Durante l'artroscopia il chirurgo può descrivere eventuali lesioni nei diversi compartimenti. Determinate aree sono raggiunte tramite una mobilizzazione dell'arto inferiore, andando ad esaminare:

- menisco mediale (più facilmente visualizzabile tramite valgo-stress)
- borsa sovra-patellare (a ginocchio esteso)
- articolazione femoro-rotulea
- inserzione del tendine popliteo
- fossa intercondiloidea
- legamenti Crociati

In corso di artrosi, saranno reperti comuni lesioni condrali, osteofiti ed altri reperti. L'artroscopia può essere uno strumento utile a stadiare le lesioni cartilaginee, a questo proposito si utilizza la scala di Outerbridge, divisa in quattro differenti gradi [2].

Grado 0 si intende una cartilagine nei limiti fisiologici, priva di degenerazione e caratteristiche abnormi.

Grado 1: presenta riduzione della consistenza e rigonfiamento, questo aspetto si può apprezzare esaminando la consistenza durante la procedura artroscopica

Grado 2: frammentazioni di misura inferiore ai 1.5 cm

Grado 3: frammentazioni di misura maggiore ai 1.5 cm

Grado 4: esposizione dell'osso subcondrale



Figura 3.5 – *Nell' immagine destra si osserva una condropatia di grado I, a sinistra di grado II del condilo femorale interno secondo la classificazione di Outerbridge*

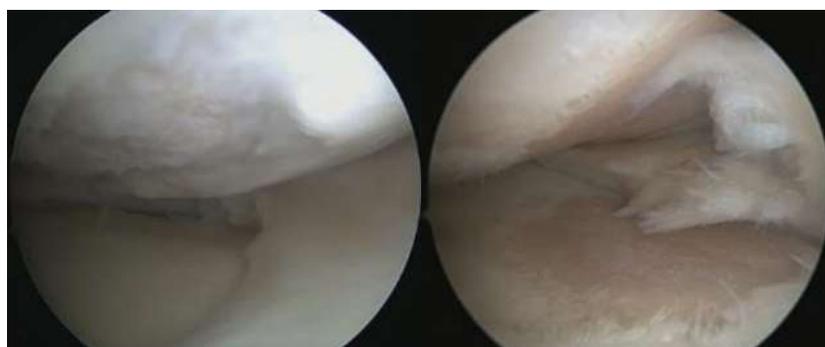


Figura 3.6 – *A sinistra lesione osteocondrale di grado III del condilo femorale mediale e a destra si osserva esposizione dell'osso subcondrale*

CAPITOLO 4

STUDIO SPERIMENTALE

4.1 Materiali e metodi

Lo studio condotto ha coinvolto 101 pazienti selezionati con specifici criteri, eseguendo un follow-up prospettico di 12 mesi. Ogni paziente è stato trattato con una singola dose di tessuto adiposo manipolato tramite il sistema Lipogems.

Numero di pazienti	91
Età (anni)	62.8 ± 10.1 (36 to 84)
Genere (femminile/maschile)	47 (51.6%) / 8 (48.4%)
Articolazione trattata (destra/sinistra)	51 (56.0%) / 40 (44%)
Volume infiltrato (mL)	26.8 ± 10.1 (3 to 50)
Indice di massa corporea (BMI)	25.3 ± 3.8 (20.0 to 37.1)
Procedura combinata	33 (36.3%)
Meniscectomia mediale	26 (28.6%)
Meniscectomia laterale	3 (3.3%)
Ricostruzione crociata anteriore	4 (4.4%)
Precedenti interventi (sì/no)	4 (5.3%) / 87 (94.7%)

Tabella 4.1 – *Caratteristiche dei pazienti coinvolti nello studio*

Gli obiettivi dello studio hanno previsto:

- La conferma dell'efficacia e della sicurezza dell'M-FAT per l'artrosi di ginocchio
- Il miglioramento delle capacità funzionali e la riduzione del dolore
- L'analisi della correlazione tra età, sesso, BMI, lesioni articolari, livello di attività di malattia e sinovite con l'efficacia del trattamento
- L'identificazione di specifici fattori predittivi di successo o insuccesso del trattamento
- La correlazione dei risultati con reperti radiologici, biologici, istologici e storia clinica del paziente

Lo studio ha adottato i seguenti criteri di inclusione: pazienti sintomatici presentanti limitazione funzionale, artrosi di grado lieve e moderato definita tramite studi radiografici, difetti cartilaginei evidenti alla valutazione MRI 1.5 T e fallimento di qualsiasi trattamento conservativo.

Sono stati esclusi dal reclutamento; donne in gravidanza, anamnesi positiva per patologie reumatiche, coagulopatie, abuso di sostanze, patologie infettive della cute e dell'articolazione interessata, diabete, pregresse fratture e ASA score ≥ 3 .

Ogni paziente è stato valutato tramite RX pre operatoria e MRI 1.5 T.

Per la valutazione dei pazienti sono stati utilizzati i questionari Lysholm knee score, WOMAC (Western Ontario and McMaster University) e VAS (per la valutazione del dolore), intervistando i pazienti prima dell'intervento a 6 e 12 mesi.

Lysholm	Womac
Claudicatio	Frequenza dei sintomi
Dolore	Dolore
Sensazione di blocco articolare	Limitazione nel salire le scale
Limitazione nel salire le scale	Limitazione nelle attività quotidiane
Necessità di supporto	Rigidità
Instabilità	Tumefazione articolare
Gonfiore	Presenza di scrosci articolari
Squatting	Range of motion

Tabella 4.2 -*Principali aree indagate negli score Lysholm e Womac*

4.1.1. Intervento chirurgico

Gli interventi sono stati eseguiti con tecnica standardizzata, scegliendo come metodo di analgesia l'anestesia spinale.

Inizialmente si procede con la preparazione del campo operatorio, tramite teli sterili e disinfezione con tintura di iodio. Il paziente è disposto in posizione supina, con esposta la sede addominale e l'articolazione interessata.

La raccolta del tessuto adiposo è stata effettuata preferenzialmente a livello addominale da chirurghi plastici, qualora vi fosse poca disponibilità di tessuto il lipoaspirato è stato prelevato dalla sede glutea. Il totale di infiltrato in articolazione varia da 5 a 40 mL.

La procedura di prelievo del tessuto adiposo si svolge in seguito all'infiltrazione della soluzione di Klein modificata, non contenente lidocaina; tale molecola è infatti stata dimostrata come condrotossica e potenzialmente in grado di interferire con il metabolismo delle staminali [62].

In seguito all'iniezione di questa soluzione è necessario attenderne l'azione vasocostrittiva, utile a ridurre il sanguinamento e ad evitare il prelievo di eccessive emazie. Successivamente è possibile procedere con l'aspirazione del tessuto tramite siringa 13G e sistema Vacklock, svolgendo movimenti paralleli al piano cutaneo.



Figura 4.3 - *Prelievo del tessuto adiposo in sede addominale*

Si procede successivamente all'artroscopia: vengono posizionati gli accessi e si valutano i diversi compartimenti, definendo e trattando i differenti reperti patologici. Il portale utilizzato durante questi atti operatori viene successivamente sfruttato per infiltrare il lipoaspirato processato.



Figura 4.4 - *Posizionamento dell'artroscopio in sede articolare*

Il lipoaspirato viene trattato con l'ausilio del kit Lipogems, ottenendo micro frammenti di tessuto adiposo, eliminando al contempo le componenti di scarto pro-infiammatorie. Il processo si compone di diversi passaggi come descritto nel capitolo 3. Durante questa fase si procede a diversi cicli di lavaggio tramite soluzione fisiologica o Ringer lattato.

In seguito, isolata la frazione di lipoaspirato contenente le cellule mesenchimali, si può procedere alla frammentazione dei cluster adiposi grazie all'azione delle sfere contenute nel kit Lipogems. Dopo aver svolto questi passaggi è possibile ottenere il tessuto manipolato, caratterizzato da frammenti di circa 0.8mm ed è pertanto possibile procedere con l'infusione in articolazione.



Figura 4.5 - *Prelievo del tessuto manipolato ed infusione in articolazione*

4.1.2 Analisi dell'immunofenotipo e istologiche

Durante lo studio sono state svolte analisi di laboratorio per meglio caratterizzare i lipoaspirati ottenuti e correlarne le caratteristiche con i risultati clinici. Sono stati collezionati diversi campioni di lipoaspirato trattato, analizzando il fenotipo e le caratteristiche cellulari. Utilizzando la collagenasi è stata isolata la componente cellulare, rendendola così disponibile per le analisi al citofluorimetro.

Il citofluorimetro utilizzato per le analisi è il MACsQUANT10. In seguito alla lisi della matrice extracellulare attuata ad opera della collagenasi è possibile prelevare una quantità di cellule e marcarle con anticorpi associati a fluorocromi. Il citofluorimetro permette di identificare la popolazione di cellule mesenchimali staminali presenti nel campione tramite parametri fisici e immunofenotipici. Il risultato di queste analisi è stato visualizzato tramite il software MACs quantify software (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) ed è stato pertanto possibile conoscere la percentuale di cellule mesenchimali staminali all'interno del campione.

In particolare, le cellule staminali mesenchimali risultano positive per CD105, CD73, CD90 e CD44, tipici di questa popolazione.

Oltre alla presenza della positività verso tali marcatori, per meglio contraddistinguere le cellule di interesse si è valutata la negatività ad ulteriori Cluster of Differentiation. Tra questi vi sono il CD34 e CD45, tipicamente espressi dalle staminali ematopoietiche, l'HLA-DR, espresso dai leucociti, e il CD31 presente su numerose cellule, particolarmente sulle cellule endoteliali.

Inoltre sono state svolte delle indagini istologiche per valutare le caratteristiche del tessuto sinoviale dei pazienti trattati. I campioni sono stati prelevati nei casi di fallimento del trattamento, durante la sostituzione protesica dell'articolazione. I prelievi di tessuto sinoviale sono stati analizzati tramite i protocolli standard, ottenendo dei preparati colorati in ematossilina ed eosina, analizzando alla microscopia ottica la tipologia di cellule presenti e le caratteristiche del tessuto. Questi reperti sono stati confrontati con prelievi di tessuto appartenenti ad altri pazienti andati incontro a chirurgia protesica, non sottoposti in precedenza ad infusione di cellule staminali.

4.1.3 Analisi statistica

Sulla base dei risultati ottenuti è stata effettuata l'analisi statistica. Lo Shapiro-Wilk test, uno strumento statistico particolarmente efficace per piccoli campioni, è stato utilizzato per calcolare la distribuzione normale dei dati. Le variabili continue di gruppi indipendenti sono state comparate con il Mann-Whitney U test.

L'analisi della varianza, ovvero della variabilità tra due diversi gruppi, è stata effettuata tramite Post Hoc test, per comparare outcome a distribuzione continua a 6 e 12 mesi.

Le variabili categoriche sono state confrontate con il Chi-Square test o Fisher's exact test. Il coefficiente di Pearson, una formula utilizzata per calcolare la correlazione lineare tra due variabili, è stato utilizzato per indagare le relazioni tra variabili continue. Si sono definite statisticamente significative tutte le variabili con $p < 0.05$.

4.2 Risultati

Sono stati coinvolti 101 pazienti in un periodo compreso tra giugno 2015 e dicembre 2020; il follow-up è stato effettuato tramite una valutazione pre-operatoria, a sei mesi e ad un anno dall'intervento. 10 pazienti sono stati persi al follow-up, pertanto la casistica finale presa in considerazione nelle indagini statistiche è di 91 pazienti.

Il punteggio medio dello score Lysholm dei pazienti al baseline è di 63.0, presentando un miglioramento medio di 17.5 punti alla valutazione ai sei mesi e di 23 punti all'anno.

Lysholm	Baseline	6 months	1 year
Mean (SD)	63.0 (14.2)	80.5 (13.4)	86.3 (13.8)
Range	40.0 - 99.0	37.2 - 100.0	40.0 - 100.0
95% CI	60.0 – 65.9	77.7 – 83.3	83.4 – 89.2

Tabella 4.6 – *Score Lysholm*

Il punteggio medio dello score Womac al baseline è di 68.6; il miglioramento medio è rispettivamente di 18 e 22.8 punti alle seguenti valutazioni.

Womac	Baseline	6 months	1 year
Mean (SD)	68.6 (15.1)	86.7 (14.2)	91.5 (13.2)
Range	43.5 - 100.0	40.4 - 100.0	43.5 - 100.0
95% CI	65.5 – 71.7	83.7 – 89.7	88.7 – 94.2

Tabella 4.7 – *Score Womac*

Come si evidenzia nei grafici riportati, è presente un forte impatto clinico e miglioramento degli score, con un grande incremento nei primi sei mesi e ulteriori progressi al termine del follow-up.

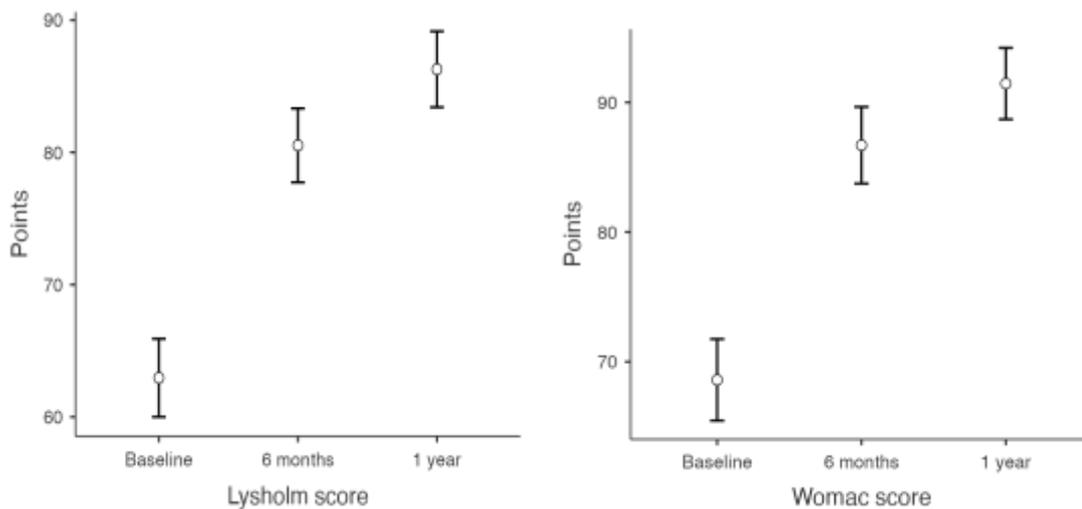


Tabella 4.8 – *Miglioramenti degli score Lysholm e Womac nelle tre valutazioni*

Il 36.3% dei pazienti è stato trattato con procedura combinata tramite artroscopia ed infusione di staminali; il 31.9% del totale ha subito una meniscectomia (26 mediali e 3 laterali) e il 4.4% dei pazienti una ricostruzione del crociato anteriore.

Non si sono evidenziate differenze ad ogni valutazione temporale tra il gruppo di pazienti che ha ricevuto una procedura combinata e chi ha ricevuto solamente l'infusione di M-FAT. ($p > 0.05$)

I pazienti sottoposti a queste procedure hanno avuto un miglioramento statisticamente significativo degli score Womac, Lysholm, VAS, e del ROM. ($p < 0.05$)

La tabella evidenzia la distribuzione degli outcome, dividendo il risultato in differenti categorie ovvero eccellente (>90), buono (84-90), sufficiente (65-83) e scarso (<65).

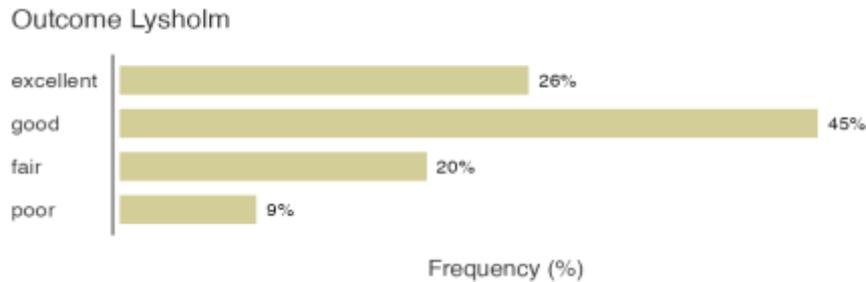


Tabella 4.9 – *Distribuzione degli score Lysholm nei pazienti trattati*

Il fallimento del trattamento si è riscontrato nel 9% dei pazienti, senza differenze tra sesso maschile e femminile ($p>0.05$). La distribuzione degli score in base al genere nelle diverse categorie di risultato si può osservare nel seguente grafico.

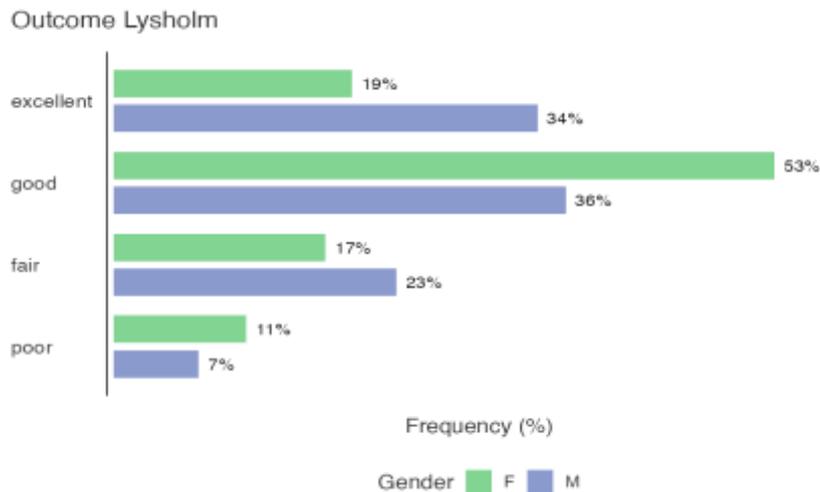


Tabella 4.10 – *Distribuzione degli score in categorie per risultato e genere*

L'età è stata evidenziata come fattore prognostico negativo; in particolare, è presente una correlazione tra età avanzata e minore punteggio agli score Womac e Lysholm ottenuti a 6 mesi e all'anno di follow-up.

	< 60 years (n=41)	≥ 60 years (n=50)	p value	
Baseline				
Lysholm	63.9 ± 15.8 (40 to 84)	61.9 ± 13.2 (40 to 83)	0.461	
Womac	69.6 ± 16.8 (43.5 to 84)	67.5 ± 14.1 (43.5 to 86)	0.426	
VAS	6.0 ± 1.5 (3 to 8)	6.2 ± 1.6 (3 to 8)	0.626	
ROM	118.1 ± 2.7 (110 to 120)	116.7 ± 4.9 (100 to 125)	0.217	
6 months				
Lysholm	85.5 ± 10.6 (45.6 to 100)	76.7 ± 14.5 (37.2 to 93)	<0.001	*
Womac	91.6 ± 10.7 (49.5 to 100)	82.9 ± 15.7 (40.4 to 100)	0.004	*
VAS	2.7 ± 1.6 (1 to 8)	3.5 ± 1.5 (1 to 7)	0.006	*
ROM	122.4 ± 2.5 (120 to 125)	120.8 ± 5.0 (100 to 125)	0.174	
1 year				
Lysholm	91.0 ± 10.6 (49 to 100)	82.7 ± 15.2 (40 to 100)	0.002	*
Womac	95.6 ± 9.6 (53.3 to 100)	88.2 ± 15.0 (43.5 to 100)	0.003	*

VAS	1.9 ± 1.7 (1 to 8)	2.5 ± 1.5 (1 to 7)	0.008	*
ROM	122.4 ± 2.5 (120 to 125)	121.1 ± 4.1 (105 to 125)	0.174	

Tabella 4.11 – Evidenza del ruolo dell'età nel risultato terapeutico

Una maggiore età si correla con valori più alti alla scala VAS, testimoniando maggiore sintomatologia dolorosa nei pazienti più anziani; non è stato invece evidenziato un collegamento tra l'età e questi valori alla valutazione iniziale.

Queste correlazioni si deducono dalla seguente tabella; ciò mette in risalto la minore probabilità di successo dell'intervento nei pazienti con età maggiore di 60 anni ($p < 0.05$).

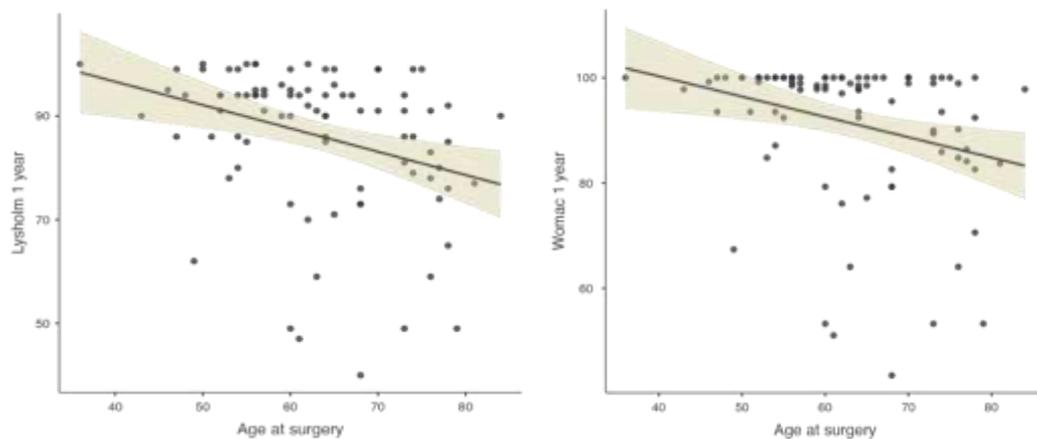


Tabella 4.12 – Correlazione tra decremento lineare degli score Lysholm e Womac all'anno di follow-up ed aumento dell'età

Un ulteriore fattore predittivo negativo è rappresentato dalla sinovite che si è dimostrata essere associata a punteggi più bassi negli score rispetto ai pazienti che non presentavano questo reperto patologico.

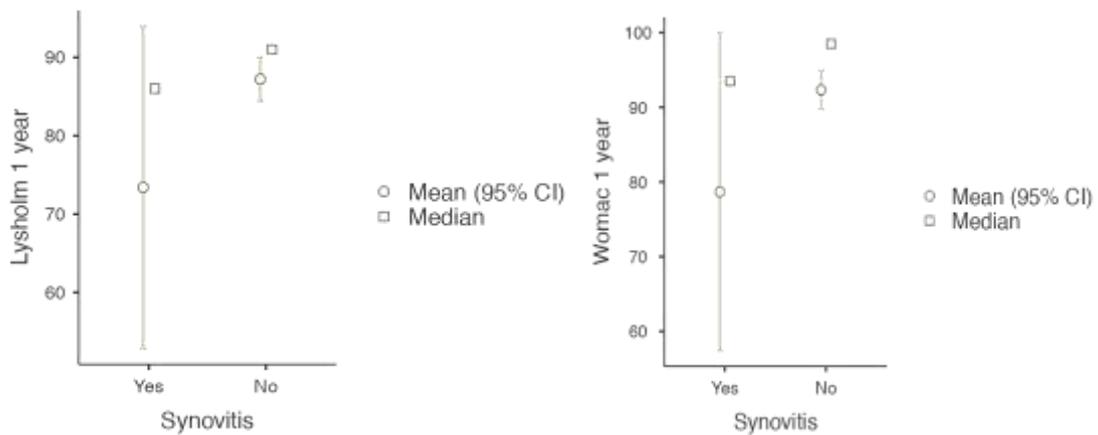


Tabella 4.13 – Confronto del punteggio medio negli score Lysholm e Womac di pazienti presentanti sinovite rispetto ai non affetti

Il BMI non è risultato essere una variabile in grado di influenzare l'outcome della terapia. Stratificando i pazienti con BMI maggiore a 25 e 30 kg/m² non si sono evidenziate differenze nei parametri indicativi di successo terapeutico (p>0.05).

Si è valutata l'anamnesi positiva per meniscectomie pregresse o ricostruzione di crociato anteriore; pregressi interventi non sono risultati essere variabili capaci di influire sull'efficacia del trattamento; allo stesso modo non è stata evidenziata una particolare correlazione tra grado di condropatia e peggiore risultato a sei mesi e all'anno (p>0.05).

L'analisi multivariata ha pertanto definito come le variabili indipendenti in grado di influenzare il successo del trattamento siano rappresentate da età e dalla sinovite.

Durante lo studio, due pazienti hanno sviluppato corpi adiposi associati a sintomatologia dolorosa; i sintomi si sono risolti in tre mesi senza influire sull'efficacia del trattamento. È stata svolta un'aggiuntiva indagine tramite risonanza magnetica per meglio valutare sede e comportamento di questo tessuto.

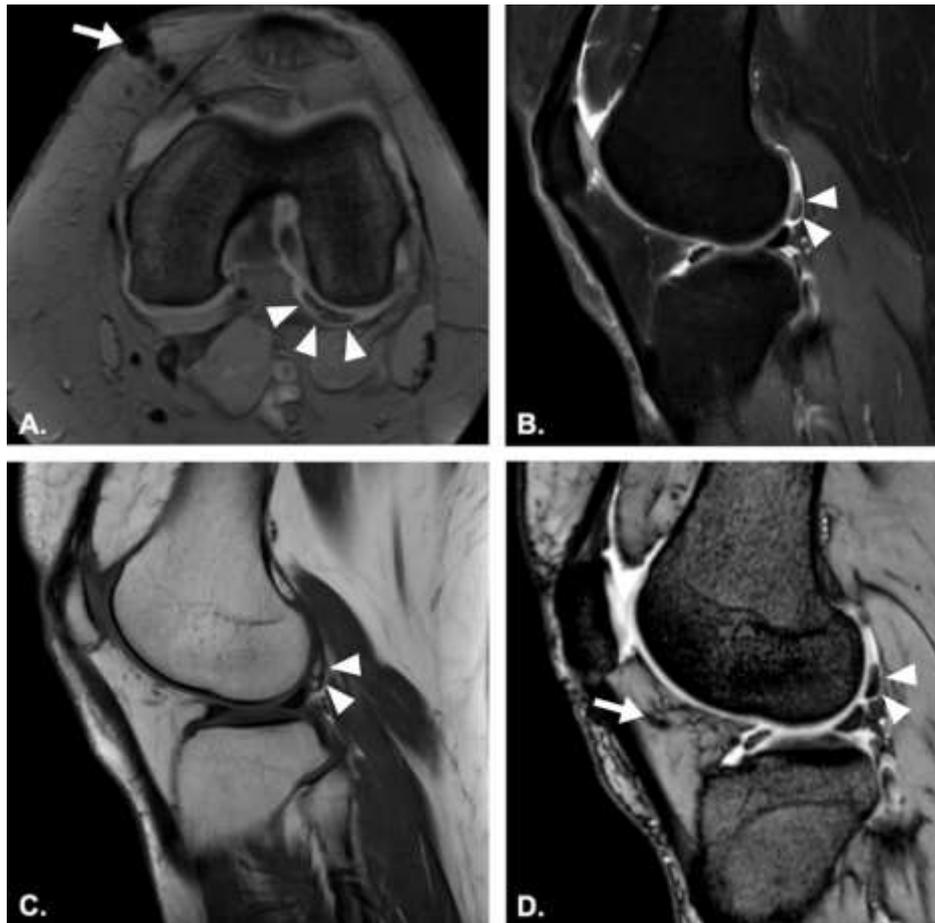


Figura 4.14 – *Presenza di corpi adiposi evidenziati alla risonanza magnetica in diverse sequenze*

Grazie alle analisi al citofluorimetro è stato possibile determinare il numero medio di cellule staminali mesenchimali presenti nel lipoaspirato trattato con Lipogems. Esso risulta essere pari a $0.974 \cdot 10^6 \pm 0.0589 \cdot 10^6$ (range: $0.00530 \cdot 10^6$ to $0.168 \cdot 10^6$).

Non è stata evidenziata una correlazione statisticamente significativa tra numero di cellule e risultato terapeutico ($p > 0,05$).

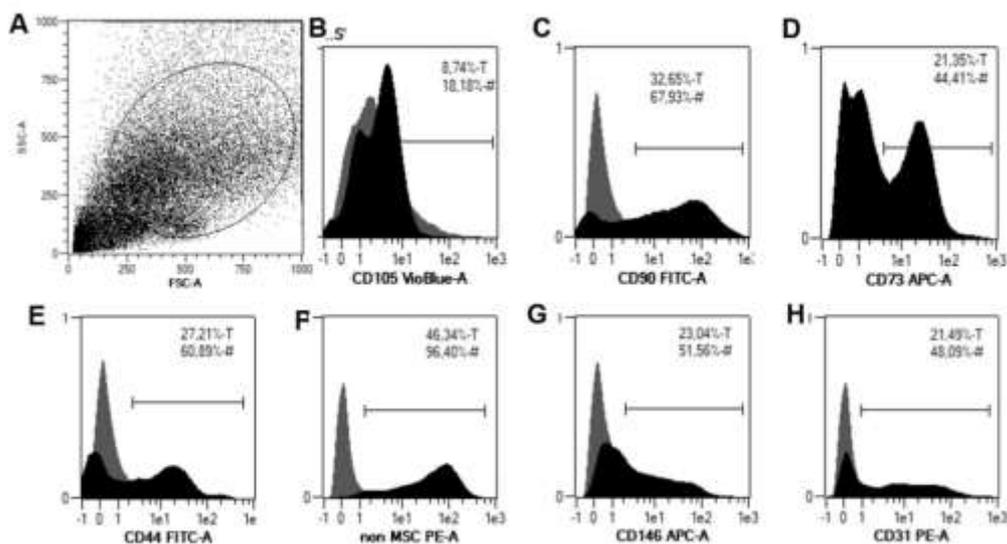


Figura 4.15 – Risultati immunofenotipici di MFAT.

Nella figura 4.15 sono riportati grafici ottenuti tramite analisi citofluorimetrica. Dopo una prima selezione di cellule in analisi secondo i parametri fisici FSC e SSC (grandezza e granulosità, rispettivamente), tali cellule sono state valutate secondo parametri immunofenotipici. I primi marcatori in analisi sono quelli tramite i quali è possibile distinguere le cellule staminali mesenchimali, ovvero CD105, CD90, CD73 e CD44. Come visualizzato nei grafici in figura, per ogni marcatore è possibile ottenere una percentuale di cellule positive allo stesso. Infine, marcatori di cellule non mesenchimali (CD146, CD31) hanno permesso di escludere cellule positive a tali marcatori da quelle di interesse.

Le analisi istologiche svolte hanno evidenziato significative differenze nei campioni di tessuto appartenenti ai pazienti trattati con staminali rispetto ai pazienti non trattati. In particolare, nei pazienti trattati, come si evidenzia nella figura 4.16, è stata notata la presenza di un minore grado di iperplasia sinoviale ed infiltrato linfocitario, testimoniando la capacità di questa componente cellulare di ridurre il grado di flogosi all'interno dell'articolazione. Nei pazienti non trattati è stata invece descritta la presenza di marcata iperplasia sinoviale, organizzata in strutture villose ed un maggior numero di linfociti. Questo risultato ha permesso di evidenziare l'efficacia di questo trattamento nel contrastare determinati meccanismi patogenetici che svolgono un ruolo cardine in corso di artrosi e nello sviluppo della sintomatologia dolorosa.

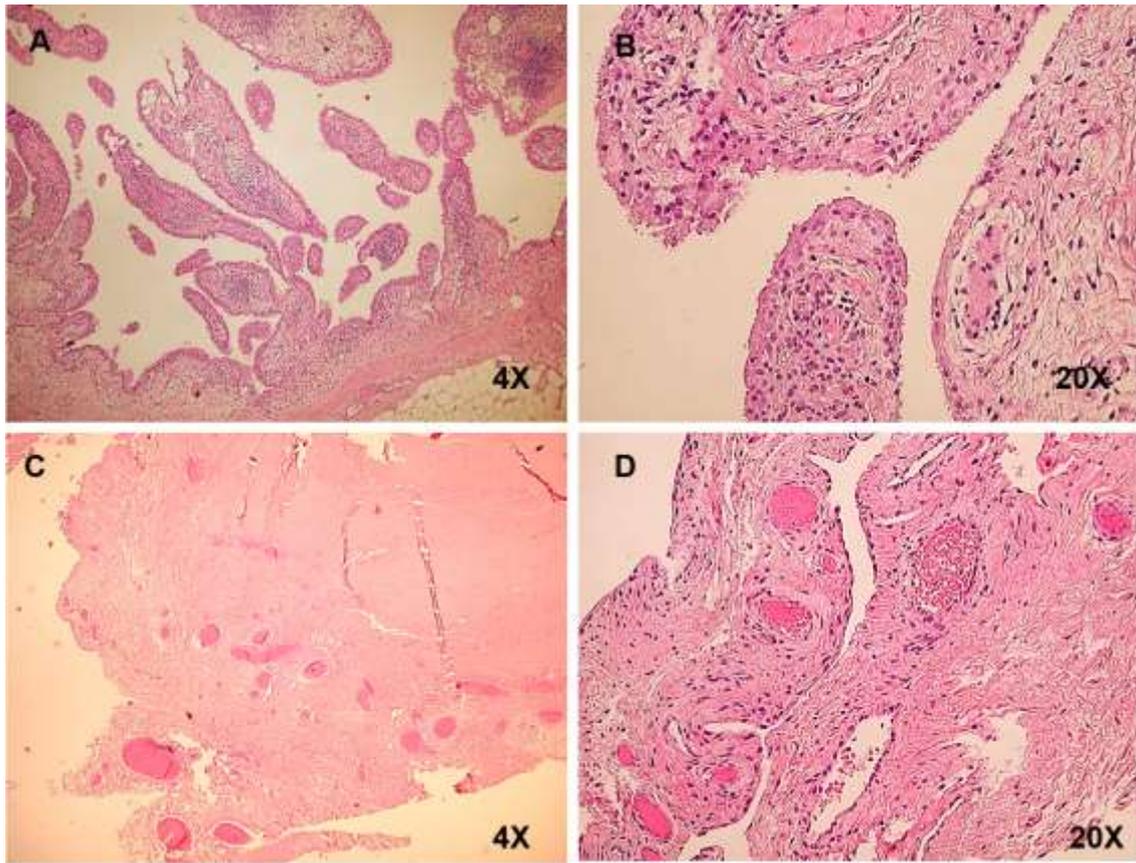


Figura 4.16 – Preparati di tessuto sinoviale colorato tramite ematossilina ed eosina

CAPITOLO 5

DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

5.1. Discussione

L'artrosi di ginocchio rappresenta un problema rilevante non solo da un punto di vista clinico ma anche sul piano sociale, dato il suo importante peso epidemiologico. Per il trattamento di tale patologia ad oggi sono presenti diverse strategie chirurgiche; nonostante la sostituzione protesica dell'articolazione rappresenti la terapia più efficace per le forme più severe di malattia, vi sono pazienti non responsivi ai trattamenti conservativi, per cui questo tipo di chirurgia risulterebbe un trattamento eccessivo.

A questi pazienti, come si ravvisa nei criteri di inclusione dello studio, si rivolge l'uso di M-FAT che, seppur sfrutti un approccio interventistico, rappresenta una strategia nettamente meno invasiva, in grado di preservare l'integrità dell'articolazione. Il campo della medicina rigenerativa risulta un ambito che riscuote un grande interesse da parte della società scientifica. Vi è infatti un continuo sforzo verso lo sviluppo di terapie innovative in grado di interferire con i processi patogenetici e permettere un uso più limitato delle strategie terapeutiche maggiormente invasive.

In particolare, l'uso di M-FAT nell'artrosi di ginocchio si pone come traguardo la possibilità di offrire un sollievo concreto dal dolore riscontrato da questi pazienti, non più responsivi alle terapie conservative. Oltre a questo aspetto vi è la possibilità di ritardare in maniera significativa lo sviluppo di sintomatologia severa, presente negli stadi più avanzati di malattia.

Tipicamente i pazienti trattati con M-FAT sono privi di severe comorbidità, hanno controllato per tempo la sintomatologia tramite infiltrazioni articolari e presentano un'ingravescente progressione dei sintomi alla valutazione precedente all'intervento. In numerosi casi si tratta di pazienti che hanno svolto attività sportiva e trovano, al momento della valutazione iniziale, limitazioni causate da questa

patologia. Valutando il desiderio di tornare a svolgere attività fisica, la sostituzione totale di ginocchio potrebbe avere un particolare impatto negativo per la loro qualità di vita.

Questo studio, oltre a confermare quanto descritto in letteratura riguardo l'efficacia e la sicurezza del trattamento in esame, si è concentrato su aspetti non ancora approfonditi, nonostante di grande rilevanza nella pratica clinica. Pertanto si sono ricercati fattori predittivi di risultato che possano permettere al chirurgo di individuare correttamente i pazienti adatti a questa terapia.

A questo proposito, seppur vi sia da tempo interesse scientifico riguardo a questo argomento, non è ancora stata fornita una definizione del paziente ideale da sottoporre a tale trattamento al pari delle altre strategie terapeutiche. Questo aspetto risulta fondamentale per indirizzare il paziente al migliore percorso terapeutico ed ottenere il massimo beneficio. Inoltre, definendo quali siano le caratteristiche che si associano ad una scarsa efficacia dell'infusione di M-FAT, possono essere evitati trattamenti infruttuosi.

Lo studio ha fornito risultati in questo senso, valutando tramite analisi statistiche correlazioni con numerose variabili. I risultati hanno confermato una significativa capacità dell'M-FAT di agire sulla sintomatologia e sulle capacità funzionali, sia in pazienti sottoposti ad artroscopia che a sola infusione di lipoaspirato processato. Questo aspetto, dimostratosi statisticamente significativo, sta a rappresentare la reale efficacia delle cellule mesenchimali staminali, scartando il possibile effetto confondente delle meniscectomie e dei trattamenti artroscopici.

Riguardo ai reperti artroscopici, un'importante associazione è stata confermata con la sinovite, definita singola variabile predittiva con significato prognostico negativo. Questo dato rappresenta un successo riguardo all'obiettivo dello studio, indicando un primo fattore in grado di modificare l'outcome del trattamento. Valutando questo fenomeno è possibile ipotizzare un'interferenza del micro ambiente citochinico con l'adesione delle staminali ai tessuti articolari. Alla luce di questa evidenza, si ritiene necessario valutare il grado di sinovite prima di candidare il

paziente al trattamento: a tale scopo, oltre alla valutazione clinica, può essere di rilevante ausilio l'utilizzo della risonanza magnetica.

Oltre alla sinovite, un fattore con analogo significato è rappresentato dall'età. Come si evidenzia nel grafico 4.12, pazienti con età superiore ai sessant'anni presentano risultati significativamente peggiori alla valutazione a sei mesi e all'anno.

Questi due fattori, essendo predittivi di un risultato peggiore, devono essere tenuti in considerazione nella valutazione del paziente candidabile all'intervento con M-FAT.

Riguardo al fenotipo e alle caratteristiche del lipoaspirato, sono state condotte analisi con il rationale di comprendere quanto parametri cellulari possano influenzare il miglioramento clinico. La capacità delle cellule staminali di interagire con i processi riparativi è stata ampiamente discussa in letteratura. L'artrosi è una patologia caratterizzata da una patogenesi complessa, caratterizzata da una degenerazione diffusa dei diversi tessuti articolari. Idealmente, una terapia che interferisca con questi processi dovrebbe arrestare la produzione dei mediatori cellulari coinvolti nella genesi del danno. È infatti nota la capacità delle cellule staminali di regolare i processi flogistici grazie a fattori presenti nel secretoma ed apportare uno stimolo rigenerativo ai tessuti. Tramite questi processi si determina un'azione preventiva nei confronti dello sviluppo di ulteriori lesioni.

Nella pratica clinica si presentano pazienti già sintomatici ed affetti da lesioni tissutali, pertanto un solo meccanismo preventivo non risulterebbe efficace per questa condizione. Come testimonia il miglioramento clinico, l'infusione di staminali si caratterizza per un ulteriore ruolo terapeutico. Analizzando il rationale biologico di questa evidenza, la cartilagine rappresenta un tessuto che, per le sue caratteristiche istologiche e per la scarsa vascolarizzazione, svolge un ruolo cardine. Pregressi studi hanno dimostrato la capacità di questo trattamento di migliorare il volume cartilagineo [67], un'evidenza di grande rilevanza dal punto di vista patogenetico. Inoltre, la riduzione dei livelli di citochine pro-infiammatorie in grado di sensibilizzare i nocicettori avrebbe un fondamentale ruolo nel miglioramento della sintomatologia. Pertanto, alla luce di queste caratteristiche, l'infusione di M-

FAT risulta efficace sui due principali fronti patogenetici che caratterizzano l'artrosi.

A questo riguardo è stata analizzata la correlazione tra quantità di cellule staminali introdotte in articolazione e miglioramento clinico, non ottenendo però alcuna associazione statisticamente significativa. Oltre a questa valutazione, è stata scartata l'ipotesi secondo cui pregresse meniscectomie e ricostruzioni di crociato rappresentino un fattore limitante l'efficacia di questa tecnica. Pertanto, l'infusione di M-FAT può risultare efficace anche in pazienti con tali precedenti anamnestici.

Oltre a questi aspetti è stato analizzato il ruolo del BMI, non risultando essere un fattore predittivo negativo, neanche in pazienti con BMI maggiore di 30 kg/m². In letteratura è stata descritta la minore potenzialità del tessuto adiposo in pazienti obesi [68], caratterizzato da una minore funzionalità delle cellule staminali mesenchimali. In considerazione di queste evidenze è stata ricercata una correlazione con questa variabile che, inaspettatamente, non si è dimostrata in grado di precludere il successo terapeutico. Allo stesso modo, si è ottenuto un risultato in linea con altri pazienti in individui con basso BMI, che pertanto non rappresenta un fattore limitante per il trattamento.

5.2. Conclusione

Alla luce delle osservazioni riportate, la metodica di infusione M-FAT si è dimostrata efficace nella particolare casistica di pazienti che al momento costituisce la sfida più grande riguardo al trattamento dell'artrosi di ginocchio. La tecnica risulta associata a scarse complicanze, perlopiù di entità lieve e locale in sede di prelievo. La facile manipolazione del tessuto adiposo sottocutaneo e l'ampia disponibilità di strumenti predisposti al suo trattamento sono importanti vantaggi a favore di questo trattamento.

Lo studio è stato condotto con una ampia casistica e ha pertanto permesso di evidenziare dati statisticamente significativi. Globalmente, valutando come percentuale di successo il 91%, è possibile affermare che il trattamento si è dimostrato efficace nella maggior parte dei casi, eccellente per alcuni pazienti. Oltre

a confermare l'efficacia del trattamento, in accordo con i dati presenti in letteratura, lo studio ha permesso di indentificare fattori predittivi di risultato, realizzando gli obiettivi iniziali ed offrendo pertanto un grande ausilio nella pratica clinica.

BIBLIOGRAFIA

1. Anastasi. Trattato di Anatomia Umana - 4a Edizione Anastasi. In: Volume 1. 2006.
2. Norman Scott. *Insall & Scott Surgery of the knee*, sesta edizione. Elsevier 2017
3. Johnson DL, Urban WP Jr, Caborn DN, Vanarthos WJ, Carlson CS. Articular cartilage changes seen with magnetic resonance imaging-detected bone bruises associated with acute anterior cruciate ligament rupture. *Am J Sports Med.* 1998 May-Jun;26(3):409-14.
4. Abulhasan JF, Grey MJ. Anatomy and physiology of knee stability. *Journal of Functional Morphology and Kinesiology.* 2017.
5. Johnson VL, Hunter DJ. The epidemiology of osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2014 Feb;28(1):5-15.
6. Bennell KL, Wrigley TV, Hunt MA, Lim BW, Hinman RS. Update on the role of muscle in the genesis and management of knee osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2013 Feb;39(1):145-76.
7. Griffin TM, Scanzello CR. Innate inflammation and synovial macrophages in osteoarthritis pathophysiology. *Clin Exp Rheumatol.* 2019 Sep-Oct;37 Suppl 120(5):57-63. Epub 2019 Oct 15.
8. Roy Aaron, *Orthopedic Basic Science: foundations for clinical practice*, fifth edition 2020, American Academy of Orthopaedic Surgeons
9. Robinson WH, Lepus CM, Wang Q, Raghu H, Mao R, Lindstrom TM, Sokolove J. Low-grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2016 Oct;12(10):580-92.
10. Glyn-Jones S, Palmer AJ, Agricola R, Price AJ, Vincent TL, Weinans H, Carr AJ. Osteoarthritis. *Lancet.* 2015 Jul 25;386(9991):376-87. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60802-3. Epub 2015 Mar 4.
11. Mobasher A, Matta C, Zákány R, Musumeci G. Chondrosenescence: definition, hallmarks and potential role in the pathogenesis of osteoarthritis. *Maturitas.* 2015 Mar;80(3):237-44. Epub 2014 Dec 24.

12. Kulkarni K, Karssiens T, Kumar V, Pandit H. Obesity and osteoarthritis. *Maturitas*. 2016 Jul;89:22-8. doi: 10.1016/j.maturitas.2016.04.006. Epub 2016 Apr 11.
13. Prieto-Alhambra D, Judge A, Javaid MK, Cooper C, Diez-Perez A, Arden NK. Incidence and risk factors for clinically diagnosed knee, hip and hand osteoarthritis: influences of age, gender and osteoarthritis affecting other joints. *Ann Rheum Dis*. 2014 Sep;73(9):1659-64. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-203355. Epub 2013 Jun 6.
14. van Meurs JB. Osteoarthritis year in review 2016: genetics, genomics and epigenetics. *Osteoarthritis Cartilage*. 2017 Feb;25(2):181-189. doi: 10.1016/j.joca.2016.11.011. Epub 2017 Jan 16.
15. Michael JW, Schlüter-Brust KU, Eysel P. The epidemiology, etiology,, and treatment of osteoarthritis of the knee. *Dtsch Arztebl Int*. 2010 Mar;107(9):152-62. doi: 10.3238/arztebl.2010.0152. Epub 2010 Mar 5. Erratum in: *Dtsch Arztebl Int*. 2010 Apr;107(16):294. PMID: 20305774; PMCID: PMC2841860.
16. King JB. A radiographic survey of nine pairs of elderly identical twins. *Clin Radiol*. 1971 Jul;22(3):375-8
17. Sharma L, Song J, Felson DT, Cahue S, Shamiyeh E, Dunlop DD. The role of knee alignment in disease progression and functional decline in knee osteoarthritis. *JAMA*. 2001 Jul 11;286(2):188-95. Erratum in: *JAMA* 2001 Aug 15;286(7):792.
18. Carballo CB, Nakagawa Y, Sekiya I, Rodeo SA. Basic Science of Articular Cartilage. *Clin Sports Med*. 2017 Jul;36(3):413-425. doi: 10.1016/j.csm.2017.02.001. Epub 2017 Apr 26.
19. Hoemann CD, Lafantaisie-Favreau CH, Lascau-Coman V, Chen G, Guzman-Morales J: The cartilage-bone interface *Knee Surg*. 2012 May;25(2):85-97
20. Kuettner KE, Aydelotte MB, Thonar EJ: Articular cartilage matrix and structure: A minireview. *J Rheumatol Suppl* 1991;27:46-48
21. Heinemeier KM, Schjerling P, Heinemeier J, Møller MB, Krosgaard MR, Grum-Schwensen T, Petersen MM, Kjaer M. Radiocarbon dating reveals minimal collagen turnover in both healthy and osteoarthritic human cartilage. *Sci Transl Med*. 2016 Jul 6;8(346):346ra90.

22. Castañeda S, Roman-Blas JA, Largo R, Herrero-Beaumont G. Subchondral bone as a key target for osteoarthritis treatment. *Biochem Pharmacol.* 2012 Feb 1;83(3):315-23. doi: 10.1016/j.bcp.2011.09.018. Epub 2011 Sep 22. PMID: 21964345.
23. Madry H, van Dijk CN, Mueller-Gerbl M. The basic science of the subchondral bone. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2010 Apr;18(4):419-33. Epub 2010 Jan 30.
24. Wong SH, Chiu KY, Yan CH. Review Article: Osteophytes. *J Orthop Surg (Hong Kong).* 2016 Dec;24(3):403-410.
25. Haraden CA, Huebner JL, Hsueh MF, Li YJ, Kraus VB. Synovial fluid biomarkers associated with osteoarthritis severity reflect macrophage and neutrophil related inflammation. *Arthritis Res Ther.* 2019 Jun 13;21(1):146.
26. Samuels J, Krasnokutsky S, Abramson SB. Osteoarthritis: a tale of three tissues. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* 2008;66(3):244-50.
27. Mobasheri A, Batt M. An update on the pathophysiology of osteoarthritis. *Ann Phys Rehabil Med.* 2016 Dec;59(5-6):333-339. doi: 10.1016/j.rehab.2016.07.004. Epub 2016 Aug 18.
28. Zheng L, Zhang Z, Sheng P, Mobasheri A. The role of metabolism in chondrocyte dysfunction and the progression of osteoarthritis. *Ageing Res Rev.* 2021 Mar;66:101249. Epub 2020 Dec 29.
29. Jeon OH, David N, Campisi J, Elisseeff JH. Senescent cells and osteoarthritis: a painful connection. *J Clin Invest.* 2018 Apr 2;128(4):1229-1237. Epub 2018 Apr 2.
30. Miller RE, Ishihara S, Tran PB, Golub SB, Last K, Miller RJ, Fosang AJ, Malfait AM. An aggrecan fragment drives osteoarthritis pain through Toll-like receptor 2. *JCI Insight.* 2018 Mar 22
31. Barreto G, Manninen M, K Eklund K. Osteoarthritis and Toll-Like Receptors: When Innate Immunity Meets Chondrocyte Apoptosis. *Biology (Basel).* 2020 Mar 30;9(4):65.

32. Manferdini C, Paolella F, Gabusi E, Silvestri Y, Gambari L, Cattini L, Filardo G, Fleury-Cappellesso S, Lisignoli G. From osteoarthritic synovium to synovial-derived cells characterization: synovial macrophages are key effector cells. *Arthritis Res Ther.* 2016 Apr 4;18:83.
33. Zhang H, Cai D, Bai X. Macrophages regulate the progression of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2020 May;28(5):555-561
34. Wang Q, Rozelle AL, Lepus CM, Scanzello CR, Song JJ, Larsen DM, Crish JF, Bebek G, Ritter SY, Lindstrom TM, Hwang I, Wong HH, Punzi L, Encarnacion A, Shamloo M, Goodman SB, Wyss-Coray T, Goldring SR, Banda NK, Thurman JM, Gobezie R, Crow MK, Holers VM, Lee DM, Robinson WH. Identification of a central role for complement in osteoarthritis. *Nat Med.* 2011 Nov 6;17(12):1674-9.
35. G.Valesini, G.Valentini *Unireuma*, III edizione, Idelson GNocchi
- 36 Braun HJ, Gold GE. Diagnosis of osteoarthritis: imaging. *Bone.* 2012 Aug;51(2):278-88.
- 37 Pereira D, Ramos E, Branco J. Osteoarthritis. *Acta Med Port.* 2015 Jan-Feb;28(1):99-106. Epub 2015 Feb 27
- 38 Siqueira MB, Klika AK, Higuera CA, Barsoum WK. Modes of failure of total knee arthroplasty: registries and realities. *J Knee Surg.* 2015 Apr;28(2):127-38. Epub 2014 Nov 24.
39. Richards MM, Maxwell JS, Weng L, Angelos MG, Golzarian J. Intra-articular treatment of knee osteoarthritis: from anti-inflammatories to products of regenerative medicine. *Phys Sportsmed.* 2016;44(2):101-8.
- 40 Maumus M, Pers YM, Ruiz M, Jorgensen C, Noël D. Cellules souches mésenchymateuses et médecine régénératrice - Quel avenir pour l'arthrose ? [Mesenchymal stem cells and regenerative medicine: future perspectives in osteoarthritis]. *Med Sci (Paris).* 2018 Dec;34(12):1092-1099.
- 41 Taruc-Uy RL, Lynch SA. Diagnosis and treatment of osteoarthritis. *Prim Care.* 2013 Dec;40(4):821

42. Snibbe JC, Gambardella RA. Use of injections for osteoarthritis in joints and sports activity. *Clin Sports Med.* 2005 Jan;24(1):83-91.
43. Bagga H, Burkhardt D, Sambrook P, March L. Longterm effects of intraarticular hyaluronan on synovial fluid in osteoarthritis of the knee. *J Rheumatol.* 2006 May;33(5):946-50.
44. Russu OM, Pop TS, Feier AM, Trâmbițaș C, Incze-Bartha Z, Borodi PG, Gergely I, Zuh SG. Treatment Efficacy with a Novel Hyaluronic Acid-Based Hydrogel for Osteoarthritis of the Knee. *J Pers Med.* 2021 Apr 15;11(4):303.
- 45 Taruc-Uy RL, Lynch SA. Diagnosis and treatment of osteoarthritis. *Prim Care.* 2013 Dec;40(4):821-36
46. O'Connell B, Wragg NM, Wilson SL. The use of PRP injections in the management of knee osteoarthritis. *Cell Tissue Res.* 2019 May;376(2):143-152.
47. Lubkowska A, Dolegowska B, Banfi G. Growth factor content in PRP and their applicability in medicine. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2012 Apr-Jun;26(2 Suppl 1):3S-22S.
48. Canovas F, Dagneaux L. Quality of life after total knee arthroplasty. *Orthop Traumatol Surg Res.* 2018 Feb;104(1S):S41-S46. doi: 10.1016/j.otsr.2017.04.017. Epub 2017 Nov 26.
49. Ollivier M, Parratte S, Argenson JN. Results and outcomes of unicompartmental knee arthroplasty. *Orthop Clin North Am.* 2013 Jul;44(3):287-300, vii-viii.
50. Tyagi V, Farooq M. Unicompartmental Knee Arthroplasty: Indications, Outcomes, and Complications. *Conn Med.* 2017 Feb;81(2):87-90.
- 51 Mulcahy H, Chew FS. Current concepts in knee replacement: complications. *AJR Am J Roentgenol.* 2014 Jan;202(1):W76-86.
- 52 Nagoya S, Kaya M, Sasaki M, Tateda K, Yamashita T. Diagnosis of peri-prosthetic infection at the hip using triple-phase bone scintigraphy. *J Bone Joint Surg Br.* 2008 Feb;90(2):140-4.

- 53 Vaishya R, Vijay V, Vaish A, Agarwal AK. Computed tomography based 3D printed patient specific blocks for total knee replacement. *J Clin Orthop Trauma*. 2018 Jul-Sep;9(3):254-259. doi: 10.1016/j.jcot.2018.07.013. Epub 2018 Jul 18. Erratum in: *J Clin Orthop Trauma*. 2020 Nov-Dec;11(6):1169-1171.
54. Lopa S, Colombini A, Moretti M, de Girolamo L. Injective mesenchymal stem cell-based treatments for knee osteoarthritis: from mechanisms of action to current clinical evidences. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2019 Jun;27(6):2003-2020.
55. Cattaneo G, De Caro A, Napoli F, Chiapale D, Trada P, Camera A. Micro-fragmented adipose tissue injection associated with arthroscopic procedures in patients with symptomatic knee osteoarthritis. *BMC Musculoskelet Disord*. 2018 May 30;19(1):176.
56. Samsonraj RM, Raghunath M, Nurcombe V, Hui JH, van Wijnen AJ, Cool SM. Concise Review: Multifaceted Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells for Use in Regenerative Medicine. *Stem Cells Transl Med*. 2017 Dec;6(12):2173-2185
57. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):663-76.
58. Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, Zhao RC, Shi Y. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*. 2008 Feb 7;2(2):141-50. doi: 10.1016/j.stem.2007.11.014. PMID: 18371435.
59. Luz-Crawford P, Djouad F, Toupet K, Bony C, Franquesa M, Hoogduijn MJ, Jorgensen C, Noël D. Mesenchymal Stem Cell-Derived Interleukin 1 Receptor Antagonist Promotes Macrophage Polarization and Inhibits B Cell Differentiation. *Stem Cells*. 2016 Feb;34(2):483-92.
60. raser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol*. 2006 Apr;24(4):150-4.

61. Bistolfi A, Roato I, Fornelli G, Sabatini L, Massè A, Ferracini R. Treatment of knee osteoarthritis by intra-articular injection of concentrated autologous adipose tissue: a twenty-four-month follow-up study. *Int Orthop*. 2021 Mar;45(3):627-633.
62. Nie H, Kubrova E, Wu T, Denbeigh JM, Hunt C, Dietz AB, Smith J, Qu W, van Wijnen AJ. Effect of Lidocaine on Viability and Gene Expression of Human Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells: An in vitro Study. *PM R*. 2019 Nov;11(11):1218-1227.
63. Jayaram P, Kennedy DJ, Yeh P, Dragoo J. Chondrotoxic Effects of Local Anesthetics on Human Knee Articular Cartilage: A Systematic Review. *PM R*. 2019 Apr;11(4):379-400.
- 64 Ferracini R. The use of mesenchymal stem cell in orthopedics: indications and limits, *Giornale Italiano di Ortopedia*
- 65 Scientific recommendations on classification of advanced therapy medicinal products, EMA 2015
66. Tremolada C, Colombo V, Ventura C. Adipose Tissue and Mesenchymal Stem Cells: State of the Art and Lipogems® Technology Development. *Curr Stem Cell Rep*. 2016;2(3):304-312.
- 67 Roato I, Belisario DC, Compagno M, Lena A, Bistolfi A, Maccari L, Mussano F, Genova T, Godio L, Perale G, Formica M, Cambieri I, Castagnoli C, Robba T, Felli L, Ferracini R. Concentrated adipose tissue infusion for the treatment of knee osteoarthritis: clinical and histological observations. *Int Orthop*. 2019 Jan
- 68 Hu XY, Klomjit N, Conley SM, Ostlie MM, Jordan KL, Lerman A, Lerman LO. Impaired immunomodulatory capacity in adipose tissue-derived mesenchymal stem/stromal cells isolated from obese patients. *J Cell Mol Med*. 2021 Sep;25

Ringraziamenti

Vorrei dedicare quest'ultima pagina alle persone che hanno reso possibile la stesura di questa tesi.

Ringrazio sentitamente il mio relatore, Prof Riccardo Ferracini, per gli insegnamenti e per il tempo dedicatomi in questo anno. Sono riconoscente per la fiducia dimostrata nei miei confronti e per essere stato coinvolto in questo studio.

Sarà per me di grande esempio il suo approccio multidisciplinare nei confronti di questa specialità chirurgica.

Grazie anche al mio correlatore Dott. Mattia Alessio Mazzola per il suo prezioso contributo nella realizzazione di questo lavoro ed alla Dott.ssa Ilaria Roato, per avermi fatto approfondire aspetti di questa materia che altrimenti non avrei mai conosciuto.