



L'uso di cellule staminali di derivazione adiposa in ortopedia. Indicazioni e limiti normativi

The use of mesenchymal stem cell in orthopedics: indications and limits

Riccardo Ferracini¹ (foto), Ilaria Roato², Luca Maccari¹, Emilia Tiraboschi¹, Luca Farinelli³, Antonio Gigante³

¹ Dipartimento di Scienze Chirurgiche e Diagnostiche Integrate, Università di Genova; ² Azienda Ospedaliera Universitaria Città della Salute e della Scienza di Torino; ³ Clinica Ortopedica, Dipartimento di Scienze Cliniche e Molecolari, Università Politecnica delle Marche, Ancona

Riassunto

Le tecniche che fanno uso di cellule staminali mature trovano un promettente impiego in ortopedia. Esse hanno la loro applicazione dagli stadi precoci di artrosi alle perdite di sostanza post-traumatiche, oncologiche, alle pseudoartrosi. La reputazione clinica di questa terapia può essere facilmente danneggiata da trattamenti impropri o eseguiti senza attenersi alle indicazioni tecniche cliniche, in particolare in assenza di chiare linee guida. È fondamentale che il chirurgo ortopedico acquisisca le informazioni necessarie per un corretto uso di questo strumento. L'articolo descrive le attuali indicazioni e i limiti regolatori a livello nazionale e internazionale.

Parole chiave: cellule staminali adipose, cellule mesenchimali, artrosi

Summary

Mature autologous stem cell technology stands out as a unique opportunity to take orthopaedics to the next level, with broad clinical applications ranging from the early phases of osteoarthritis, to post traumatic and oncologic reconstructions. Their clinical value can easily be spoiled by a non-compliant use, while the relevant regulations are still incomplete and often unclear or open to interpretation. It is important for the orthopaedic surgeon to understand the advantages and the regulatory limits concerning the use of such a powerful tool. This article approaches the applications and the regulations of the Italian Medicinal Agencies.

Key words: adipose stem cell, mesenchymal stem cell, osteoarthritis

Introduzione e indicazioni

Nell'ultimo decennio l'utilizzo di cellule staminali ha avuto un forte sviluppo e un crescente interesse in diversi campi della medicina. Questo tipo di trattamento trova largo impiego anche in ambito ortopedico a causa dell'aumento dell'aspettativa di vita e delle sempre maggiori esigenze funzionali dei pazienti. Si definisce cellula staminale una cellula che presenta capacità auto-rigenerativa e plasticità differenziativa. Non vi sono dati sul mantenimento della capacità auto-rigenerativa

Ricevuto: 15 ottobre, 2019
Accettato: 7 dicembre, 2019

Corrispondenza

Riccardo Ferracini

Dipartimento di Scienze Chirurgiche e Diagnostiche Integrate, Università di Genova
E-mail: riccardoferraciniweb@gmail.com

Conflitto di interessi

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

Come citare questo articolo: Ferracini R, Roato I, Maccari L, et al. L'uso di cellule staminali di derivazione adiposa in Ortopedia. Indicazioni e limiti normativi. *Giornale Italiano di Ortopedia e Traumatologia* 2020;46:1-6; <https://doi.org/10.32050/0390-0134-188>

© Copyright by Pacini Editore Srl



OPEN ACCESS

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

nell'impiego terapeutico *in vivo*. Invece in relazione al potenziale differenziativo esse si suddividono in totipotenti, pluripotenti, multipotenti, oligopotenti e unipotenti. Le cellule staminali utilizzate in medicina rigenerativa in ambito ortopedico sono mesenchimali multipotenti, ovvero cellule in grado di differenziarsi nei tessuti connettivali di origine mesodermica, come il tessuto osseo, cartilagineo, adiposo, muscolare, connettivale e vascolare¹. Il meccanismo d'azione delle cellule staminali mesenchimali (MSC) è molto complesso. In passato si credeva che fossero direttamente loro a proliferare e differenziare andando a ricostituire il tessuto danneggiato; in realtà, secondo recenti studi, queste cellule svolgono un ruolo "gestionale", coordinando le cellule residenti nel tessuto danneggiato attraverso un effetto paracrino. Tale attività viene svolta grazie alla produzione di numerose citochine, fattori di crescita e peptidi bioattivi che stimolano le cellule presenti nel tessuto danneggiato². Un'altra caratteristica delle MSC è rappresentata dall'effetto immunomodulante, realizzato grazie alla produzione di citochine antinfiammatorie e alla capacità d'inibire cellule *natural killer*, linfociti T e cellule dendritiche³. Il tessuto adiposo è costituito principalmente da cellule adipose organizzate in lobuli. È un tessuto altamente specializzato costituito da adipociti maturi, che costituiscono più del 90% del tessuto e una frazione stromale vascolare (SVF), che comprende, preadipociti, fibroblasti, periciti, muscolatura liscia vascolare, cellule endoteliali, monociti/macrofagi interstiziali, linfociti e cellule staminali adipose. Le cellule staminali adipose possono essere isolate dalla SVF mediante coltura *in vitro*. Tali cellule crescono in maniera simil fibroblastica e sono caratterizzate dal possedere diverse caratteristiche: 1) auto-rinnovamento; 2) alta capacità proliferativa; 3) capacità differenziativa in diverse linee cellulari come tessuto osseo, cartilagineo, ma anche neurologico e muscolare. Esse possono essere evidenziate attraverso l'analisi immunoistochimica di alcuni marcatori come ad esempio la doppia positività per CD34 e CD90 (markers di natura mesenchimale)⁴. In passato le MSC si ottenevano a seguito di espansione *in vitro*, tuttavia studi successivi hanno evidenziato che il tessuto adiposo contiene di per sé un'altissima concentrazione di staminali rispetto al midollo osseo, insieme a una facile accessibilità, pertanto quest'espansione *in vitro* non è più considerata indispensabile, eliminando così gli eventuali elevati costi connessi alle procedure di espansione e la necessità di una procedura di utilizzo a "two steps"⁵. Al posto dell'espansione *in vitro* si preferisce utilizzare la frazione vascolare stromale (SVF), che contiene anche le MSC. In ambito ortopedico il trattamento con cellule staminali è indicato in numerose patologie prevalentemente degenerative, ma anche traumatiche e ricostruttive⁶. Le indicazioni principali e maggiormente consolidate riguar-

dano il trattamento dell'artrosi lieve-moderata del ginocchio e l'osteonecrosi idiopatica della testa del femore⁷. Inoltre, possono essere utilizzate nelle riparazioni tendinee o legamentose⁸ o nelle lesioni cartilaginee od osteocondriti dissecanti⁹.

Processazione tessuto adiposo

Per quanto concerne i metodi di processazione del lipoaspirato, nel corso degli anni ne sono stati proposti diversi che possono essere per comodità differenziati in due grandi linee: le tecniche di processazione enzimatica e non-enzimatica. Nel primo caso, la processazione viene considerata come una manipolazione di alto grado in quanto vengono usati enzimi come la collagenasi, la tripsina e la dispasi al fine di ottenere la completa digestione del lipoaspirato. Nonostante le tecniche siano diverse, tutte seguono una procedura standard. Tale procedura deve essere fatta in ambienti controllati, quali le *cell-factory*. D'altro canto, i metodi d'isolamento non enzimatici si basano sulla forza di centrifugazione, pressione, filtrazione e lavaggio. Tutti questi meccanismi sostituiscono la digestione enzimatica per separare le cellule o gli aggregati cellulari dal tessuto adiposo. Sono metodi che prevedono una manipolazione minima attraverso Kit facilmente utilizzabili in sala operatoria con risultati riproducibili per quanto riguarda l'estrazione sia per numero di cellule ottenute che per rimozione della frazione acquosa e oleosa dell'estratto. In commercio esistono diversi sistemi di isolamento cellulare che generano un tessuto adiposo arricchito di SVF. Tra questi abbiamo i dispositivi per la raccolta e l'omogeneizzazione del tessuto adiposo rappresentati da Puregraft (Bimini Technologies LLC, USA), Fastkit (Fastem) (Corios Soc. Coop, Italy), LipiVage (Genesis Biosystems, Inc, USA), Lipogems (Lipogems International Spa, Italy), Lipo-Kit GT (Medikan International Inc, USA). In un recente studio, Senesi et al. hanno confrontato in termini di vitalità cellulare e caratterizzazione cellulare mediante citofluorimetria varie metodiche di disgregazione meccanica disponibili in commercio paragonandole alla digestione enzimatica considerata il "gold standard" per l'ottenimento della SVF. Dai loro risultati, si evince che le metodiche meccaniche sono risultate essere inferiori alla metodica enzimatica per entrambi i metodi di valutazione. La riduzione della vitalità cellulare può ritenersi significativa in tutti i trattamenti sia dopo 72 ore che al tempo zero di coltura. La collagenasi è il metodo che ha mostrato valori più alti rispetto alle restanti metodiche "non-enzimatiche" caratterizzate da risultati molto simili tra loro. Allo stesso tempo però, la stessa collagenasi è quella che presenta una maggiore riduzione in termine di vitalità dopo 72 ore rispetto ai metodi meccanici¹⁰.

Trattamento dell'artrosi di ginocchio

La ricerca di strategie innovative per il trattamento dell'artrosi del ginocchio è di crescente interesse soprattutto in pazienti con quadri iniziali di gonartrosi sintomatica (grado Kellgren Lawrence I-II) o comunque giovani o adulti con età inferiore ai 70 anni o con richieste funzionali incompatibili con l'artroplastica. Nell'immaginario collettivo e nella letteratura medica, l'uso di cellule staminali di origine adiposa sta diventando un'opzione terapeutica sempre più diffusa e allettante specialmente nelle forme iniziali dell'artrosi del ginocchio. I risultati ottenuti in vitro, in sistemi animali e nei primi trials su pazienti con artrosi, hanno evidenziato come il trattamento con SVF risulti efficace in termini clinici sul controllo della sintomatologia algica e sulla funzionalità articolare^{11,12}. Alcuni studi a lungo termine hanno dimostrato effetti positivi anche sulla ricostruzione osteocondrale documentabili alla RMN. Tali effetti sono comunque visibili, per ora, solo con macchine ad alta definizione usando sequenze specifiche e con follow-up superiore a un anno¹¹. Il grande interesse suscitato dall'utilizzo della SVF attraverso infiltrazione intra-articolare nel ginocchio per il trattamento delle condropatie, si è progressivamente ridotto nell'ultimo decennio. Questo a causa della complessa legislazione poiché l'uso di collagenasi, indispensabile per la produzione di SVF attraverso la digestione enzimatica del tessuto, deve avvenire all'interno di un laboratorio che sia attrezzato e autorizzato (GMP grade) secondo la normativa europea.

Trattamento della necrosi avascolare della testa del femore

L'osteonecrosi della testa femorale rappresenta una patologia derivante da una crisi vascolare. Al danno vascolare segue un progressivo deficit strutturale osseo dovuto alla carenza di turnover. Il trattamento delle fasi precoci della lesione consiste nella carotatura del collo del femore definito dagli autori anglosassoni *core decompression*. Essa mira alla ripresa della vascolarizzazione attraverso la riduzione della pressione e dell'edema intra-osseo. Nel 2002 Hernigou et al. ha pubblicato il primo studio pilota che associava l'utilizzo della carotatura associato all'iniezione di cellule staminali da aspirato di midollo osseo autologo da cresta iliaca, negli stadi precoci della lesione¹³. Il follow-up tra i 5 e i 10 anni dimostrava l'efficacia e l'assenza di complicanze di questo trattamento. I risultati clinici erano direttamente proporzionali al numero di cellule iniettate da midollo a parità di stadio della malattia. Il razionale consisteva nella stimolazione da parte delle cellule infuse di una neo-angiogenesi associata a un aumento della potenzia-

L'uso di cellule staminali di derivazione adiposa in ortopedia.
Indicazioni e limiti normativi

lità ricostruttiva del tessuto osseo da parte degli elementi staminali midollari. Nel corso degli anni, gli studi clinici sull'argomento hanno confermato i dati di Hernigou, pertanto attualmente il trattamento con staminali da midollo autologo per l'osteonecrosi della testa del femore associato alla forage biopsie è diventato il trattamento di scelta nelle fasi precoci della malattia¹⁴.

L'infusione delle cellule staminali può avvenire attraverso tre diverse vie di somministrazione:

- iniezione di concentrato midollare nell'arteria circumflessa capsulare del collo femorale¹⁵;
- infusione di cellule durante la "core decompression" usando aghi sottili e infondendo MSC con "carrier" che stabilizzino le cellule *in situ*;

Attraverso l'impianto di cilindri formati da *scaffold* solidi in grado di sostituire la carota di tessuto malato con una carota di sostituto osseo caricato di staminali *ex vivo*¹⁶.

I *carrier* e gli *scaffold* dovrebbero presentare caratteristiche di osteointegrazione, biodegradabilità e osteoconduzione. I *carrier* includono matrice ossea demineralizzata, xenotrapianti, colla di fibrina, sottomucosa di intestino tenue e *buffy-coat* da aspirato di midollo. Gli *scaffold* invece possono essere xenotrapianti, sintetici o autotrapianti e presentano il vantaggio di garantire anche un apporto strutturale per ridurre il rischio di crollo della testa femorale.

L'uso delle MSC autologhe è già entrato nella normale pratica clinica per il trattamento della necrosi avascolare. L'utilizzo di cellule da midollo, aspirate da cresta iliaca rappresenta infatti un sistema a minima manipolazione, che utilizza cellule autologhe in un sistema omotopico e omofunzionale, ove le cellule midollari sono estratte da midollo e inserite nuovamente nel midollo (trapianto omotopico) e riprendono nel sito di trapianto la stessa attività biologica che svolgevano nel sito di prelievo (trapianto omofunzionale). In considerazione di alcuni svantaggi dell'utilizzo di MSC autologhe prelevate da midollo (morbidity del sito donatore e bassa resa delle cellule staminali), l'attenzione si è anche rivolta verso le MSC da tessuto adiposo. Studi preclinici su conigli dimostrano un aumento del volume e della densità trabecolare nell'area necrotica dopo somministrazione di MSC da tessuto adiposo nel tunnel formato dalla *core decompression*¹⁶. Tali dati incoraggianti aprono nuove prospettive terapeutiche per il trattamento dell'osteonecrosi asettica della testa del femore.

Trattamento della pseudoartrosi

Si tratta in questo caso di una metodica per il trattamento della pseudoartrosi ancora in fase completamente sperimentale (fase III). È presentata in dettaglio nello studio ORTHO UNION e rappresenta un esempio di sperimentazione

prospettica randomizzata multicentrica con MSC. Questo studio clinico prevede il trattamento delle pseudoartrosi di tibia in esiti di fratture di gamba, in cui il trattamento chirurgico standard mediante osteosintesi con placca o chiodo sia supplementato da un concentrato autologo di staminali da midollo osseo. Dopo amplificazione *in vitro*, le cellule sono applicate localmente su un *carrier* di idrossiapatite. Lo studio è multicentrico: coinvolge 20 centri Europei in 4 nazioni (5 siti in Francia, 4 in Germania, 5 in Italia e 6 in Spagna), prospettico, randomizzato, aperto e a tre bracci. Un braccio prevede il trattamento standard con uso di un trapianto autologo da cresta iliaca, senza aggiunta di cellule staminali. Il secondo braccio prevede l'uso di *carrier* di idrossiapatite con staminali da midollo amplificate *in vitro* a basso dosaggio (fino a 100 milioni di cellule) e il terzo braccio prevede l'uso di *carrier* con le stesse cellule in dosaggio alto (oltre 200 milioni di cellule). Lo studio prevede l'arruolamento di 108 pazienti con un follow-up di 24 mesi dalla data dell'intervento. I risultati saranno analizzati in base a criteri radiologici definiti dagli studi precedenti (REBORNE) e in base a criteri clinici standard¹⁷. Lo studio non è sponsorizzato ma è finanziato dai fondi europei (EudraCT). Il modello è complesso e prevede un grande sforzo economico e organizzativo. Esso è stato portato ad esempio come sistema per validare e per evidenziare il crescente interesse dell'uso delle MSC autologhe in differenti patologie ortopediche.

Aspetti normativi

Dal punto di vista regolatorio l'uso del tessuto adiposo in ortopedia è giuridicamente complesso in quanto può ricadere sia nella regolamentazione prevista per i prodotti cellulari che in quella dei prodotti tissutali. I prodotti cellulari sono considerati farmaci a tutti gli effetti e sono regolamentati dall'Agenzia italiana del Farmaco (AIFA) mentre i prodotti tissutali sono considerati trapianti e sono regolamentati attraverso in Centro Nazionale Trapianti (CNT). La differenza tra i due tipi di prodotti dipende dalle modalità di preparazione. Se il tessuto è processato con una manipolazione minima, che prevede per esempio lo smembramento e la centrifugazione, eliminando solo la componente oleosa e le componenti ematiche, esso mantiene le caratteristiche di tessuto (tessuto adiposo microframmentato M-FAT). Se il tessuto viene destrutturato con l'uso di digestione enzimatica o sonicazione, il tipo di manipolazione è di alto grado e l'estratto cellulare ottenuto è considerato un farmaco (Fig. 1). Il tessuto adiposo può essere utilizzato sullo stesso paziente (trapianto autologo) mentre l'estratto cellulare può anche essere considerato per l'utilizzo su pazienti diversi dal donatore (allogenico). In quest'ultimo caso il trattamento è soggetto a ulterio-

ri restrizioni normative. Infine, il trattamento con tessuto adiposo si può considerare omotopico quando il tessuto adiposo viene trasferito a una zona ricevente che contenga tessuto adiposo (per esempio il sottocute), mentre si considera non omotopico quando viene trasferito in una regione non contenente tessuto adiposo (per esempio un'articolazione). Pertanto, il ginocchio, dal punto di vista esclusivamente normativo, viene considerato omotopico per il trapianto di tessuto adiposo, poiché al suo interno è presente la nota formazione adiposa corpo di Hoffa le cui staminali residenti possiedono un elevato potenziale in senso condrogenico¹. Da un punto di vista normativo quindi anche l'infusione di staminali nell'anca può essere considerata omotopica, possedendo infatti al suo interno tessuto adiposo del pulvinar. Il legislatore Europeo ha aggiunto, oltre al concetto di omotopico, il concetto di omofunzionale o non omofunzionale inserendo i limiti di utilizzo di un tessuto alla stessa funzione essenziale del tessuto di origine: "L'uso non omofunzionale di tessuti, per quanto minimamente manipolati, viene considerato come Prodotto per Terapia Avanzata a causa dell'aumentato rischio per il paziente, con la conseguenza che il tessuto in questione, ancorché con minima manipolazione o in assenza di manipolazione, diventa a tutti gli effetti un medicinale per terapie avanzate". Sullo stesso tema, già nel 2010, si è espresso, con raccomandazioni non vincolanti, il *Committee for Advanced Therapies* (CAT) che è un organismo che fa parte dell'*European Medicinal Agency* (EMA). Nel capitolo "Reflection paper on classification of advanced-therapy-medicinal-products" e datato 21 maggio 2015 (EMA/CAT/600280/2010 Rev.1) viene introdotto il concetto di utilizzo omofunzionale. Questo documento non rappresenta una normativa ma una semplice raccomandazione per l'uso. Esso raccomanda quindi che le cellule estratte da un tessuto debbano mantenere la loro funzione originale in un tessuto istologicamente omologo, utilizzando un meccanismo cellulare sovrapponibile a quello di origine. Gli stessi esperti dell'EMA, interrogati direttamente sul problema dell'omofunzionalità, ammettono che le cellule staminali multipotenti adulte sono per definizione multifunzionali e pertanto il loro ruolo non può essere ristretto al concetto di omofunzionalità. In una nota del 2015 invece il CNT italiano ritiene che l'estratto adiposo sia da considerarsi un trapianto (ai sensi del D.Lgs. 191/2007) in quanto l'azione dell'estratto sarebbe di tipo biomeccanico e riempitivo "esplicando una funzione di protezione e ammortizzazione dei tessuti/organi circostanti"; in questo modo però il suo ruolo si ridurrebbe a un'attività visco-supplementativa analoga a quella dall'acido ialuronico. Alla luce di quest'ultima interpretazione sembrerebbe possibile utilizzare un estratto di tessuto adiposo minimamente manipolato per qualsiasi patologia

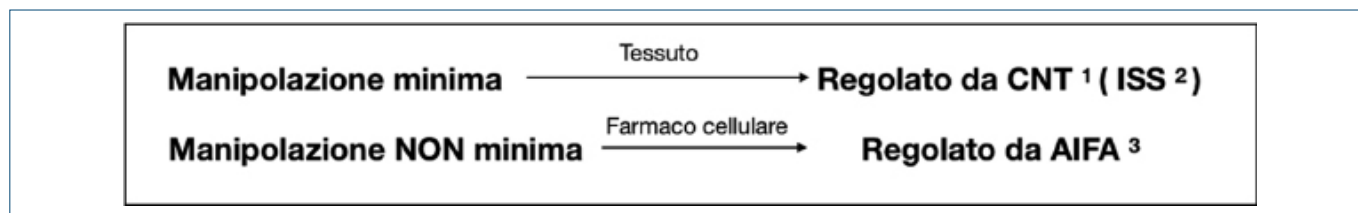


Figura 1. Per manipolazione minima si intende il trattamento meccanico, di filtrazione o centrifugazione. Per manipolazione non minima si intende l'uso di enzimi, espansione in vitro o altra ingegnerizzazione cellulare o molecolare. Il trattamento con "farmaco cellulare" sottostà alla regolamentazione dei farmaci.

¹ Centro Nazionale Trapianti; ² Istituto Superiore di Sanità; ³ Agenzia Italiana del Farmaco.

articolare. Se da un lato quest'interpretazione consente da un punto di vista normativo l'utilizzo del prodotto in maniera estremamente ampia, dall'altra ne riduce drasticamente gli aspetti biologici precedentemente descritti, pertanto quest'interpretazione dovrà trovare un superamento normativo che sia più confacente alla reale funzione di questi estratti a livello dell'articolazione. Attualmente, infine, si può desumere che, in attesa di pronunciamento ulteriori da parte degli enti regolatori (AIFA CNT e Istituto Superiore di Sanità), in Italia, il trattamento con staminali nel ginocchio ricade nel novero delle pratiche cliniche consolidate e pertanto il clinico debba solamente attenersi alle norme della buona pratica clinica (GCP) e ad uno specifico consenso informato riguardo all'uso del tessuto adiposo estratto. Per quanto riguarda invece il trattamento con staminali nelle altre articolazioni si deve configurare o come sperimentazione clinica regolata dal Comitato Etico competente oppure come terapia innovativa "con l'unico specifico obiettivo di apportare giovamento al paziente, decisa dal medico in singoli casi". La terapia innovativa, al contrario della sperimentazione clinica, non prevede l'acquisizione di nuove conoscenze che possano essere successivamente applicate alla comune pratica clinica e prescinde da qualsivoglia autorizzazione preventiva. La terapia innovativa infine richiede un consenso informato specifico e molto articolato e la responsabilità del medico nella scelta di tale trattamento deve avere un supporto scientifico e di esperienza clinica che giustifichi la scelta terapeutica.

Conclusioni

L'ambito dei trattamenti con staminali mesenchimali è dunque ampio e i vari campi di utilizzo riportano risultati clinici definitivi in alcuni casi, incompleti in altri o del tutto preliminari in altri ancora. In generale la letteratura manca di studi definitivi e rigorosi e in particolare mancano studi prospettici con i relativi bracci di controllo. Tali studi presentano difficoltà di carattere strutturale, economico

e regolatorio che possono venire superate grazie a sforzi collaborativi multicentrici e a finanziamenti importanti. Tale complessità non deve scoraggiare chi sia interessato a iniziare una sperimentazione clinica perché tale processo è alla base evolutiva di nuove terapie, tra le quali l'uso di MSC rappresenta un grande capitolo. I professionisti che vorranno fare uso di questi strumenti innovativi senza dover affrontare il fardello della sperimentazione dovranno attenersi alle indicazioni della buona pratica clinica e dovranno discutere a fondo con i pazienti i tipi di trattamenti proposti con informazioni circostanziate e attuali.

Bibliografia

- Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, et al. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for Stem Cells International biotechnology. *Trends Biotechnol* 2006;24:150-4. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.01.010>
- Caplan AI, Correa D. The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell* 2011;9:11-5. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.06.008>
- Kokai LE, Marra K, and Rubin JP. Adipose stem cells: biology and clinical applications for tissue repair and regeneration. *Translational Research* 2014;163:399-408. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2013.11.009>
- De Francesco F, Ricci G, D'Andrea F, et al. Human adipose stem cells: from bench to bedside. *Tissue Eng Part B Rev* 2015;21:572-84. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2014.0608>
- Baer PC, Geiger H. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem Cells Int* 2012;2012:812693. <https://doi.org/10.1155/2012/812693>
- Saxer F, Scherberich A, Todorov A, et al. Implantation of stromal vascular fraction progenitors at bone fracture sites: from a rat model to a first-in man study. *Stem Cells* 2016;34:2956-66. <https://doi.org/10.1002/stem.2478>
- Hernigou P, Guerin G, Homma Y, et al. History of concentrated or expanded mesenchymal stem cells for hip osteonecrosis: is there a target number for osteonecrosis repair? *Int*

- Orthop 2018;42:1739-45. <https://doi.org/10.1007/s00264-018-4000-1>
- ⁸ Figueroa D, Espinosa M, Calvo R, et al. Anterior cruciate ligament regeneration using mesenchymal stem cells and collagen type I scaffold in a rabbit model. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2014;22:1196-202. <https://doi.org/10.1007/s00167-013-2471-6>
- ⁹ Gabusi E, Manferdini C, Paoletta F, et al. Focal defects of the knee articular surface: evidence of a regenerative potential pattern in osteochondritis dissecans and degenerative lesions. *Biomed Res Int* 2017;2017:9036305. <https://doi.org/10.1155/2017/9036305>
- ¹⁰ Senesi L, De Francesco F, Farinelli L, et al. Mechanical and enzymatic procedures to isolate the stromal vascular fraction from adipose tissue: preliminary results. *Front Cell Dev Biol* 2019;7:88. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00088>
- ¹¹ Pak J, Hun Lee J, Park KS, et al. Current use of autologous adipose tissue-derived stromal vascular fraction cells for orthopedic applications. *J Biomed Sci* 2017;24:9. <https://doi.org/10.1186/s12929-017-0318-z>
- ¹² Koh YG, Choi YJ, Kwon SK, et al. Clinical results and second-look arthroscopic findings after treatment with adipose-derived stem cells for knee osteoarthritis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2015;23:1308-16. <https://doi.org/10.1007/s00167-013-2807-2>
- ¹³ Hernigou P, Beaujean F. Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. *Clin Orthop Relat Res* 2002;405:14-23. <https://doi.org/10.1097/00003086-200212000-00003>
- ¹⁴ Hua KC, Yang HG, Feng JT, et al. The efficacy and safety of core decompression for the treatment of femoral head necrosis: a systematic review and meta-analysis. *J Orthop Surg Res* 2019;14:1:306. <https://doi.org/10.1186/s13018-019-1359-7>
- ¹⁵ Mao Q, Jin H, Liao F, et al. The efficacy of intraarterial delivery of concentrated autologous bone marrow containing mononuclear cells in the treatment of osteonecrosis in the femoral head: a five year follow-up study. *Bone* 2013;57(2):509-16. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2013.08.022>
- ¹⁶ Abudusaimi Y, Aihemaitijiang, Y, Wang H, et al. Adipose derived stem cell enhance bone regeneration in vascular necrosis of the femoral head in rabbit. *J Int Med Res* 2011;39:5:1852-60. <https://doi.org/10.1177/147323001103900528>
- ¹⁷ Gomez-Barrena E, Rosset P, Gebhard F, et al. Feasibility and safety of treating non-unions in tibia, femur and humerus with autologous, expanded, bone marrow-derived mesenchymal stromal cells associated with biphasic calcium phosphate biomaterials in a multicentric, non-comparative trial. *Biomaterials* 2019;196:100-8. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.03.033>