

Isolamento di cellule staminali ad ultrasuoni

La cavitazione ultrasonica è un metodo meccanico altamente efficace per isolare le cellule staminali dal tessuto adiposo umano.

La frazione vascolare stromale ad Ultrasuoni isolata (SVF) mostra un elevato potenziale rigenerativo per applicazioni mediche.

Hielscher Ultrasonics offre varie opzioni di sonicazione diretta e indiretta per la raccolta di cellule staminali.

Isolamento ultrasonico delle cellule staminali

Dal tessuto adiposo estratto dal corpo umano (tramite liposuzione) viene trattato mediante ultrasuoni per rimuovere il tessuto dalle cellule staminali e da altre cellule di crescita. Questa porzione separata di cellule è nota come cellule della frazione vascolare stromale (SVF).

La tecnica di isolamento a ultrasuoni delle cellule staminali dal tessuto adiposo si basa esclusivamente sul principio di funzionamento della cavitazione derivata da ultrasuoni, che è la cesoia meccanica. Le forze di taglio cavitazionali interrompono il tessuto adiposo, così che le cellule staminali vengono rilasciate dalla struttura del tessuto grasso. L'isolamento con cellule staminali ad ultrasuoni è una procedura priva di enzimi, che evita l'uso di collagenasi, tripsina o dispacciamento.

Per separare le cellule staminali estratte, le cellule staminali mesenchimali, i precursori endoteliali e altri tipi di cellule di crescita, il tessuto adiposo sonicato viene centrifugato.

Le cellule staminali separate vengono raccolte e analizzate per la loro qualità, tra cui conta cellulare, vitalità, endotossina e colorazione di Gram prima di essere usate immediatamente per il trapianto autologo o sono conservate in crioconservazione.

Dr. Craig Saunders Adult Stem Cell Therapy

<https://youtu.be/obw8ai6qavY>

Perché evitare gli enzimi?

Poiché la digestione enzimatica per l'isolamento delle cellule staminali è accompagnata da costi elevati e possibili rischi per la sicurezza, nonché dalla mancanza di efficacia [Oberbauer et al. 2015], sono preferiti i metodi di isolamento non enzimatici come la cavitazione ultrasonica. Il passaggio dell'isolamento ultrasonico sostituisce la digestione enzimatica separando meccanicamente le cellule e gli aggregati cellulari dal tessuto adiposo.



Vantaggi di sonicazione

- Rapido
- Efficiente
- Riproducibile
- Sicuro
- Enzyme-Free
- Costo effettivo
- Opzioni sterili

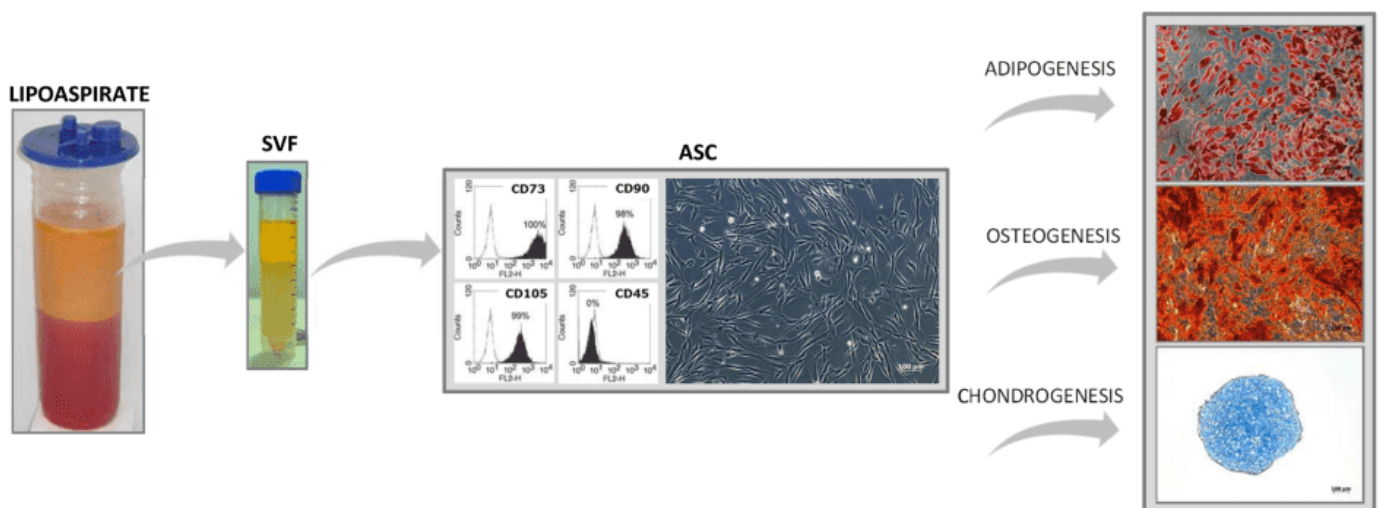
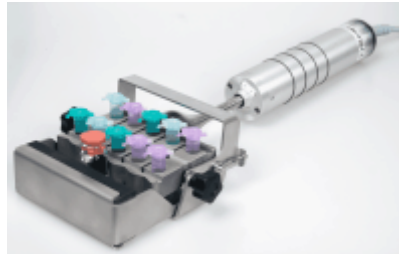


Fig. 1 Adipose-derived cells: origin, immunophenotype, morphology, and differentiation potential. Lipoaspirate can be easily obtained from the patient and processed to obtain a heterogeneous cell population, the stromal vascular fraction (SVF). Adipose-derived stromal/stem cells (ASC) can be isolated from the SVF by in vitro cultivation on plastic surfaces. ASC are characterized mainly by mesenchymal stem cell marker (CD73, CD90, CD105) at the expense of hematopoietic stem cell marker (CD45) and their spindle-shaped morphology with the ability to differentiate into the adipogenic, osteogenic, and chondrogenic lineages. The differentiation potential can be analyzed by histological stainings, such as Oil red O for adipogenic, Alizarin red for osteogenic, and Alcian Blue for chondrogenic differentiation

Resa delle cellule staminali

Metodo di isolamento SVF pubblicato che utilizza la resa di cavitazione ultrasonica in cellule $1.67-2.24 \times 10^7$ con una vitalità del 97.1-98.9% [Victor, S., 2014]. Rese cellulari di circa 2-4 milioni di cellule / tessuto adiposo sono state ottenute mediante lisi ultrasonica di adipociti maturi in tessuto adiposo dissociato [Bright et al., 2014].

Le cellule preparate a ultrasuoni possiedono un potenziale di differenziazione adipogenico e osteogenico altrettanto elevato rispetto a un metodo standard di isolamento enzimatico [Oberbauer et al. 2015].

Sistemi ad ultrasuoni per l'isolamento delle cellule staminali

Per garantire la massima sicurezza e la migliore qualità, le affidabili apparecchiature a ultrasuoni, che consentono un controllo preciso sul trattamento delle cellule staminali, sono un fattore chiave per il successo del trattamento dei pazienti. Hielscher Ultrasonics offre varie opzioni per un processo di separazione della cavitazione ultrasonica autologo per isolare e raccogliere cellule staminali precursore ed endoteliale.

Direct Sonication

Per il processo di isolamento delle cellule staminali tramite sonicazione diretta, il corno ultrasonico (sonotrodo, punta / sonda a ultrasuoni) viene immerso nel tessuto adiposo grasso. Attraverso il sonotrodo, le onde ultrasoniche vengono accoppiate direttamente al grasso autologo in modo che la cavitazione ultrasonica rilasci le cellule staminali e le cellule stromali dal tessuto residuo. I processori ultrasonici Hielscher UP200Ht e UP200St con sonotrodo S26d14 sono sistemi comunemente usati per il trattamento autologo di cellule staminali. L'isolamento SVF mediante sonicazione diretta è per lo più adatto all'uso in strutture per camere bianche.



Sonicazione indiretta

Poiché le cellule staminali sono utilizzate per le applicazioni autologhe, la sterilità del processo è molto importante. Pertanto, Hielscher ha sviluppato diverse opzioni di sonicazione indiretta come GDmini2, VialTweeter e altri sistemi personalizzati. Mediante sonicazione indiretta, le onde ultrasoniche sono accoppiate attraverso il contenitore della parete nel tessuto adiposo. La frazione vascolare stromale (SVF) è dissociata dal tessuto adiposo mediante cavitazione ultrasonica come durante la sonicazione diretta.



VialTweeter block sonotrode S26d11x10 per UP200St

Il processo di sonicazione indiretta offre il vantaggio di elaborare le celle in un contenitore chiuso in condizioni prive di contaminazione poiché il rischio di contaminazione incrociata mediante l'inserimento del corno ad ultrasuoni (sonotrodo) viene eliminato. L'isolamento cellulare viene eseguito in un sistema chiuso garantendo condizioni di processo sterili.

I dispositivi digitali ad ultrasuoni di Hielscher possono essere controllati con precisione tramite touch display o controllo del browser. Le procedure di sonicazione possono essere preimpostate tramite il menu intuitivo. I dispositivi a ultrasuoni sono dotati di una registrazione automatica dei dati (tutti i dati dei

processori sonici sono memorizzati su una SD-Card integrata). L'ingresso di potenza ultrasonica può essere adattato esattamente al protocollo di isolamento della cella.

Fatti da sapere

Cellule staminali

Le cellule staminali sono cellule indifferenziate di un organismo multicellulare che hanno la capacità di produrre indefinitamente più cellule dello stesso tipo. Sono caratterizzati dal notevole potenziale di svilupparsi in molti diversi tipi di cellule nel corpo durante lo stato iniziale di vita e la crescita. La caratteristica distintiva delle cellule staminali è la loro capacità di rinnovarsi attraverso la divisione cellulare e la loro capacità di trasformarsi in cellule specifiche di tessuti o organi con funzioni speciali. Le cellule staminali pluripotenti hanno il potenziale per differenziarsi in ognuna delle tre cellule germinali: endoderma (rivestimento interno dello stomaco, tratto gastrointestinale, polmoni), mesoderma (muscolo, ossa, sangue, urogenitale) o ectoderma (tessuti epidermici e sistema nervoso).

In alcuni organi, come l'intestino e il midollo osseo, le cellule staminali si dividono regolarmente per riparare e sostituire i tessuti usurati o danneggiati. In altri organi, come il pancreas e il cuore, le cellule staminali si dividono solo in condizioni speciali.

Le cellule stromali / staminali mesenchimali (MSC), che offrono un elevato potenziale per molteplici applicazioni terapeutiche nella medicina rigenerativa ed estetica, si trovano principalmente nel midollo osseo, ma possono essere isolate da altri tessuti (ad es. Cartilagine, grasso, cellule muscolari), pure. Le cellule staminali mesenchimali sono considerate come cellule staminali adulte prototipiche caratterizzate dalla loro capacità di autorinnovarsi.

La ricerca e i trattamenti delle cellule staminali sono utilizzati per coltivare tessuti e organi per scopi di trapianto (ingegneria tissutale). Altri campi medici per l'applicazione delle cellule staminali si possono trovare nel trattamento della malattia del cervello (ad esempio il morbo di Parkinson e l'Alzheimer), la terapia di deficienza cellulare, malattie del sangue (es. Leucemia), degenerazione articolare e cartilaginea (ad es. Osteoartrite) e trattamenti cosmetici (es. trattamenti anti-invecchiamento). In generale, le cellule staminali hanno una dimensione di ca. 15-25 micron di diametro.

Le cellule staminali mesenchimali (MSC) sono cellule stromali multipotenti, che hanno la capacità di differenziarsi in una varietà di tipi cellulari, inclusi osteoblasti (cellule ossee), condrociti (cellule cartilaginee), miociti (cellule muscolari) e adipociti (cellule adipose).

Stromal Vascular Fraction (SVF)

Stromal Vascular Fraction (SVF) è un componente del lipoaspirato che può essere estratto attraverso la liposuzione dal tessuto adiposo nel corpo umano. Il lipoaspirato consiste in una miscela eterogenea di cellule e ha un alto contenuto di cellule staminali, note come cellule staminali derivate da tessuto adiposo (ASC o ADSC), che mostrano somiglianze con cellule staminali del midollo osseo, come la loro capacità di differenziarsi in cellule multilineage.

La popolazione eterogenea di SVF include cellule endoteliali, eritrociti, fibroblasti, linfociti, monociti / macrofagi e periciti, oltre a una frazione importante di cellule staminali derivate da tessuto adiposo.

Cellule stromali / staminali derivate da tessuto adiposo (ASC)

Cellule stromali / staminali derivate dal tessuto adiposo (ASC / ADSC) rilasciano alti livelli di fattori di crescita bioattivi come fattore di crescita epidermico (EGF), fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), fattore di crescita dei fibroblasti basico (bFGF), fattore di crescita dei cheratinociti (KGF), fattore di crescita piastrinico (PDGF), fattore di crescita degli epatociti (HGF), fattore di crescita trasformante beta (TGF- β), fattore di crescita dell'insulina (IGF) e fattore neurotrofico derivato dal cervello (BDNF). ACS non rilascia solo fattori di crescita, ma secerne anche citochine tra cui ligando di tirosina chinasi 3 (Flt-3), fattore stimolante le colonie di granulociti (G-CSF), fattore stimolante la colonia dei macrofagi dei granulociti (GM-CSF), macrofagi fattore stimolante la colonia (M-CSF), interleuchina (IL) come IL-6, IL-7, IL-8, IL-11 e IL-12, fattore di inibizione della leucemia (LIF) e fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- α).

Estrazione di tipi di cellule staminali

Le cellule staminali autologhe degli adulti possono essere estratte dalle seguenti fonti:

1. Midollo osseo, che richiede l'estrazione mediante la raccolta, cioè la perforazione nell'osso.
2. Tessuto adiposo (cellule lipidiche), che richiede l'estrazione mediante liposuzione.
3. Sangue, che richiede l'estrazione attraverso l'aferesi, in cui il sangue dal donatore passa attraverso una macchina "dialisi" in cui vengono estratte le cellule staminali mentre gli altri componenti del sangue vengono restituiti al donatore.