



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico

**Effetto di Acido Ortosilicico e Vitamina K2
nel differenziamento osteogenico di cellule
mesenchimali staminali midollari *in vitro*:
potenziale ruolo nella prevenzione e nel
trattamento dell'osteoporosi**

Relatore: Chiar.ma
Prof.ssa Maria Rita Rippo

Tesi di Laurea di:
Costantina Pia Sangermano

Anno Accademico 2020/2021

INDICE

INTRODUZIONE	4
1.1. Tessuto osseo	5
1.1.1. Morfologia.....	5
1.2. Cellule staminali mesenchimali	7
1.2.1. Differenziamento osteogenico	8
1.2.2. Rimodellamento osseo	9
1.3. Osteoporosi	9
1.3.1. Diagnosi	10
1.3.2. Trattamento	11
1.4. Sostanze nutraceutiche.....	12
1.4.1. Acido Ortosilicico	12
1.4.2. Vitamina K2	13
SCOPO DELLO STUDIO	15
MATERIALI E METODI	16
3.1. Modello cellulare	16
3.1.1. Colture cellulari.....	16
3.1.2. Differenziamento osteogenico e adipogenico	17
3.1.2.1. Colorazione Alizari Red	18
3.1.2.2. Colorazione Oil Red O	18
3.1.3. Valutazione della senescenza cellulare: saggio della β -Galattosidasi.....	19
3.2. Saggio MTT per la valutazione della vitalità cellulare	20
3.3. Trattamento dell MSCs con le sostanze naturali	21
3.4. Analisi RNA messaggeri.....	21
3.4.1. Estrazione RNA totale.....	21
3.4.2. Quantizzazione dell'RNA estratto	22
3.4.3. Retrotrascrizione	22
3.4.4. Real-Time PCR	23

3.5. Analisi lunghezza dei telomeri	24
3.5.1 Estrazione del DNA	25
3.5.2 Real-Time PCR	25
3.6. Analisi dell'espressione delle proteine mediante Western Blotting	26
3.6.1. Estrazione delle proteine	26
3.6.2. Quantizzazione con metodo di Bradford.....	26
3.6.3. Elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE)	28
3.6.4. Trasferimento su membrana.....	29
3.6.5. Immunoblotting.....	30
3.6.6. Detection	30
3.7. Analisi statistica.....	31
RISULTATI	32
4.1 Caratterizzazione del modello cellulare.....	32
4.1.1. Validazione della capacità differenziante delle BM-MSC.....	34
4.2 Valutazione della citotossicità delle sostanze in analisi	35
4.3 Valutazione dell'attività pro-osteogenica in cellule mesenchimali	36
4.4 Valutazione dell'attività pro-osteogenica della mix in cellule mesenchimali	38
CONCLUSIONI.....	41
BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA.....	43

INTRODUZIONE

Nel corso degli anni si osserva sempre più l'incremento dell'aspettativa di vita nella popolazione dei paesi sviluppati, che di conseguenza comporta anche un significativo aumento delle più comuni patologie età correlate, definite *age-related disease* (ARD), tra cui diabete, osteoporosi, malattie cardiovascolari e neurodegenerative. Si sostiene la teoria secondo cui possa esistere un collegamento tra l'invecchiamento e lo sviluppo delle ARDs, dal momento che tali patologie si manifestano con frequenza crescente con l'aumentare dell'età e la stessa età viene considerata un fattore di rischio per queste patologie. Infatti, ciò che caratterizza l'invecchiamento è l'accumulo nei tessuti di cellule senescenti, cioè quelle che hanno perso la loro attività proliferativa, con perdita della capacità rigenerativa, e che sono resistenti all'apoptosi e possiedono un fenotipo secretorio detto SASP (*Senescence-Associated Secretory Phenotype*) caratterizzato dalla produzione e rilascio di mediatori chimici pro-infiammatori. Tutte queste caratteristiche compromettono la capacità rigenerativa delle cellule staminali e aumentano il rischio di sviluppare ARDs.

Tra le armi mirate a garantire un invecchiamento in buona salute, oltre alla promozione di un corretto stile di vita, sta emergendo l'utilità di integrare la dieta, sempre più "mordi e fuggi" e poco attenta alle reali esigenze dell'organismo, con integratori, sintetici o costituiti da sostanze presenti in natura. Il numero degli studi scientifici pubblicati su riviste internazionali che dimostrano l'efficacia *in vitro* ed *in vivo* di questi principi attivi e composti naturali sta aumentando esponenzialmente in questi ultimi anni e, tra questi, anche quelli che si focalizzano sulle proprietà anti-invecchiamento e preventive e/o protettive contro alcune patologie associate all'età.

In particolare, alcune molecole di origine naturale hanno dimostrato un efficace ruolo protettivo per l'osteoporosi in modelli *in vitro*, tuttavia il loro meccanismo d'azione risulta ancora poco chiaro.

In questa tesi, verrà analizzato l'effetto biologico dell'Acido Ortosilicico, della Vitamina K2 e della loro combinazione sulle cellule staminali mesenchimali, analizzandone il potenziale differenziativo in senso osteogenico e la capacità replicativa. Questi studi *in vitro* saranno utili per elaborare strategie terapeutiche mirate a prevenire e supportare con un approccio nutraceutico una delle più comuni malattie associate all'età, l'osteoporosi.

1.1. TESSUTO OSSEO

Il tessuto osseo è un tessuto connettivo mineralizzato che rappresenta il principale costituente dell'apparato scheletrico; questo, oltre ad esercitare importanti funzioni di sostegno, protezione e locomozione, funge anche da deposito di sali minerali, soprattutto di calcio e fosforo. Infatti, circa il 90% del tessuto osseo è costituito da matrice extracellulare mineralizzata, mentre il restante 10% è costituito da acqua.

1.1.1. MORFOLOGIA

Le formazioni ossee dello scheletro, cioè le ossa, sono rivestite superficialmente da un tessuto connettivo denso e riccamente vascolarizzato che prende il nome di periostio, da cui partono i vasi sanguigni che penetrano e ramificano all'interno dell'osso. Invece, le cavità interne, in cui è contenuto il midollo osseo, sono rivestite da una sottile lamina detta endostio. Nel tessuto osseo si possono individuare quattro tipi di cellule (Figura 1):

1. Cellule osteoprogenitrici: sono cellule staminali mesenchimali, per questo sono le uniche cellule ossee ad andare incontro a divisione cellulare, dando origine agli osteoblasti. Di norma, queste cellule non sono attive ma si trasformano in osteoblasti quando è richiesta la formazione ossea, come durante l'accrescimento osseo, i processi di neoformazione o di riparazione in seguito a fratture;
2. Osteoblasti: producono la matrice extracellulare e ne regolano la mineralizzazione. Nel momento in cui diventano quiescenti si trasformano in osteociti;
3. Osteociti: derivano dagli osteoblasti che, circondandosi di matrice, rimangono imprigionati nelle loro stesse secrezioni. Possiedono numerosi prolungamenti citoplasmatici tramite i quali si mettono in contatto tra di loro, penetrando nei canalicoli che si irradiano partendo dalle lacune;
4. Osteoclasti: cellule multinucleate dotate di attività fagocitaria. Queste hanno il compito di riassorbire la matrice mineralizzata durante i processi di rimodellamento cui il tessuto osseo va incontro.

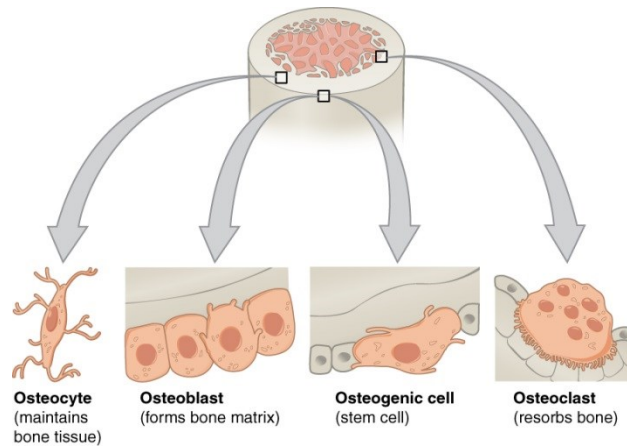


Figura 1 - Cellule del tessuto osseo

L'osso non è completamente solido, ma presenta dei piccoli spazi vuoti tra le cellule e la matrice extracellulare, all'interno dei quali passano dei vasi sanguigni con funzione trofica. Nello specifico, in base alla distribuzione e alla dimensione di questi spazi, le regioni ossee possono dividersi in compatte o spugnose (Figura 2).

Il tessuto osseo compatto costituisce circa l'80% dell'apparato scheletrico, contiene pochi spazi vuoti ed è disposto in unità ripetute dette osteoni. Ciascun osteone è formato da un canale di Havers centrale che contiene vasi sanguigni, nervi e vasi linfatici, attorno a cui si posizionano delle lamelle concentriche di matrice extracellulare calcificata. Tra le lamelle vi sono degli spazi vuoti detti lacune in cui si trovano gli osteociti: questi estendono i loro prolungamenti digitiformi all'interno di minuscoli canalicoli, mettendo così in contatto tra loro le lacune. Inoltre, dei canali perpendicolari e obliqui, detti di Volkmann, mettono in comunicazione i canali di Havers tra loro, con il periostio e con l'endostio, consentendo il passaggio di vasi sanguigni e nervosi.

Il tessuto osseo spugnoso, presente solo per il 20% nell'apparato scheletrico, non contiene gli osteoni ma è costituito da unità dette trabecole, all'interno delle quali sono presenti gli osteociti (Ambrosi G. et al, 2008).

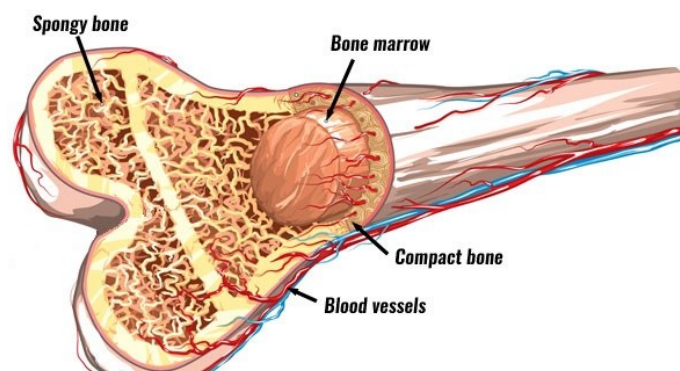


Figura 2 - Struttura ossea

1.2. CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI

Una cellula staminale è una cellula indifferenziata capace di dividersi e dare origine a cellule specializzate in specifiche condizioni. In particolare, per poter essere considerata staminale, una cellula deve presentare due caratteristiche: l'auto-rinnovamento e la pluripotenza (Ding D. et al, 2011).

Con auto-rinnovamento si intende la capacità che queste cellule hanno di compiere un numero illimitato di cicli replicativi mantenendo lo stesso stadio differenziativo. Tale meccanismo è possibile grazie alla mitosi asimmetrica: la cellula staminale progenitrice dà origine a due cellule figlie di cui, una rimane cellula staminale mentre l'altra va incontro a differenziamento, in questo modo, oltre ad ottenere cellule specializzate, viene mantenuto anche un certo numero di cellule staminali.

La pluripotenza, invece, è la capacità di una cellula di differenziarsi in più linee cellulari. In base al loro potenziale differenziativo, si distinguono quattro classi di cellule staminali:

- Cellule staminali totipotenti: sono in grado di differenziare in ogni tessuto embrionale o extraembrionale e dare origine all'intero individuo;
- Cellule staminali pluripotenti: capaci di generare i tessuti embrionali, ne fanno parte le cellule staminali ematopoietiche;
- Cellule staminali multipotenti: possono differenziarsi in tessuti diversi ma appartenenti allo stesso foglietto embrionale;
- Cellule staminali unipotenti: si trovano nei tessuti adulti, sono capaci di auto-rinnovarsi e specializzarsi nel tipo cellulare del tessuto di cui fanno parte, in modo da garantire un costante rinnovo e mantenimento cellulare.

Le cellule staminali adulte, risiedono all'interno delle nicchie staminali, cioè un microambiente in cui sono presenti tutti quegli stimoli che, interagendo con le cellule staminali, ne determinano la differenziazione (Pennings S. et al, 2018).

Fra le cellule staminali adulte multipotenti, ricoprono un ruolo molto importante le cellule staminali mesenchimali (MSC) (Dulak J. et al, 2015). Nello specifico, le MSCs hanno la capacità di dare origine a più linee cellulari in base alle condizioni microambientali in cui si trovano. In particolare, in base all'esposizione a citochine e fattori di crescita e l'attivazione di specifici fattori di trascrizione, sono in grado di differenziare in cellule del tessuto connettivo come osteoblasti, adipociti e condrociti (Dulak J. et al, 2015).

Le MSCs possono essere isolate dal midollo osseo, cordone ombelicale o tessuto adiposo e, più raramente, da altri tessuti quali polipi endometriali (Ding D. et al, 2011). Queste cellule sono riconoscibili mediante marcatori di superficie positivi per CD90, CD105 e CD73, mentre sono negativi per CD45, CD34, CD11b, CD19 e HLA-DR (Antebi B. et al, 2019).

1.2.1. DIFFERENZIAMENTO OSTEOPENICO

Come detto in precedenza, le MSCs, in base alle condizioni cui sono sottoposte, sono in grado di differenziarsi in senso adipogenico, condrogenico o osteogenico, quest'ultimo sarà preso in considerazione in questo elaborato. La capacità delle cellule staminali di poter differenziare dipende da determinati fattori di trascrizione che vengono espressi: quelli essenziali per la differenziazione osteoblastica sono RUNX2, Osterix e la β -catenina. RUNX2, in presenza di opportuni fattori di crescita, orienta le MSCs verso l'osteoblastogenesi e, simultaneamente, inibisce la loro differenziazione adipocitica e condrocitica. Dopo la differenziazione in pre-osteoblasti, si osserva l'espressione del marcatore ALP ed in seguito, per azione di RUNX2 assieme a β -catenina e Osterix, i pre-osteoblasti diventano osteoblasti immaturi che producono proteine della matrice ossea, tra cui Coll1 α 1. Gli osteoblasti immaturi esprimono alti livelli di osteopontina, mentre dopo essersi differenziati in osteoblasti maturi esprimono osteocalcina (OCN) e, infine, vengono incorporati nella matrice ossea diventando osteociti (Figura 3) (Komori T., 2006). L'alterazione di questi *pathways*, causata dalla disfunzione del microambiente e dall'attività di differenziazione delle MSCs può portare alla formazione di un tessuto adiposo midollare a scapito della mineralizzazione ossea.

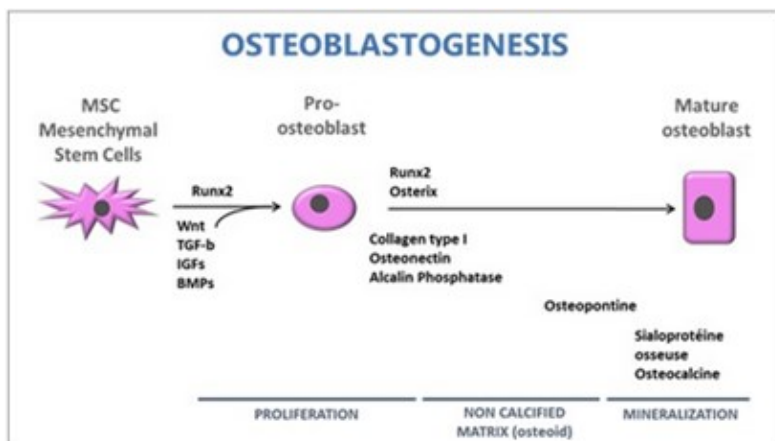


Figura 3 - Differenziazione della cellula staminale mesenchimale in osteoblasto maturo e marcatori coinvolti nella maturazione

1.2.2. RIMODELLAMENTO OSSEO

L'attività di differenziamento delle cellule staminali si trova alla base del processo di rimodellamento osseo, cioè un equilibrio che si instaura tra il processo di deposizione della matrice ossea, dovuto all'azione degli osteoblasti derivanti dalle MSCs, e il suo riassorbimento, causato invece dall'intervento degli osteoclasti che originano dalle staminali ematopoietiche. Pertanto, al contrario di quanto si possa pensare, l'osso è un tessuto dinamico in continuo rinnovamento, seppur senza significativi cambiamenti dopo la seconda decade di vita. Il rimodellamento osseo è un processo molto complesso durante il quale l'osso vecchio o danneggiato viene sostituito con quello nuovo; se tale meccanismo è sbilanciato si può andar incontro a malattie ossee, tra cui l'osteoporosi (Florencio-Silva R. et al, 2015). Tuttavia, nel processo di invecchiamento, la perdita ossea, oltre ad essere causa di una maggiore attività di riassorbimento osseo, può essere anche dovuta a un'alterata funzionalità delle MSCs, in cui si è osservato uno spostamento della differenziazione in senso adipogenico a scapito dell'osteogenesi. Questo porta a un forte squilibrio tra massa ossea e massa grassa che aumenta ulteriormente il rischio di fratture (Infante A. & Rodriguez C., 2018).

1.3. OSTEOPOROSI

L'osteoporosi è una patologia scheletrica associata all'invecchiamento, caratterizzata da una riduzione della massa ossea e da un'alterazione della sua architettura ed è quindi caratterizzata da fragilità ossea e un aumento del rischio di fratture (Cymet T.C. et al, 2000). Le regioni che vengono maggiormente colpite sono la colonna vertebrale toracica e lombare, l'anca, il polso e la spalla; in particolare, le fratture dell'anca sono di particolare interesse clinico a causa del loro alto tasso di mortalità. Inoltre, il deterioramento delle ossa influisce sulle capacità di funzionamento dell'intero corpo.

Questa patologia è molto diffusa nella popolazione e può colpire persone di tutte le etnie, specialmente uomini e donne anziani. Inizialmente la malattia è asintomatica, ma può portare a fratture ossee, come complicanza principale, oltre che a mobilità alterata e ridotta capacità funzionale, per questo motivo viene frequentemente diagnosticata in occasione di fratture derivanti da traumi anche di lieve entità. L'identificazione degli individui ad alto

rischio di complicazioni causate dalla bassa massa ossea e la valutazione della densità ossea sono fattori chiave per combattere questo grave problema di salute (Cymet T.C. et al, 2000).

L'osteoporosi primaria è quella post-menopausale o senile; la sua incidenza aumenta con l'aumentare dell'età e colpisce in media una donna su tre e un uomo su cinque. La frattura rappresenta la complicanza principale e a sua volta determina un importante fattore di rischio sia per fratture successive, entro un lasso temporale che va da uno a cinque anni, che di mortalità: ad esempio, la mortalità da frattura del femore è del 5% nel periodo immediatamente successivo all'evento e del 15-25% entro l'anno. Nel 20% dei casi si ha la perdita definitiva della capacità di camminare autonomamente, a differenza del 30-40% dei casi in cui il soggetto torna alle condizioni precedenti la frattura, con elevati costi sanitari e sociali. In Italia l'osteoporosi colpisce circa 5.000.000 di persone, di queste l'80% sono donne in post menopausa (Ministero della Salute, 2021).

Nella patogenesi dell'osteoporosi sono noti diversi fattori di rischio, primo fra tutti è la mancanza di un apporto sufficiente di calcio e vitamina D, l'età, i fattori genetici e altre circostanze predisponenti come, ad esempio, la scarsa attività fisica. Maggiormente colpite sono le donne dopo la menopausa. Un elemento fondamentale nella prevenzione dell'osteoporosi è il raggiungimento del normale valore di massa ossea: un'adeguata alimentazione con assunzione di calcio e vitamina D, cicli mestruali regolari e un programma di esercizi ben bilanciato, sono elementi essenziali per raggiungere i giusti livelli di massa ossea. Dopo la menopausa, le donne subiscono una perdita ossea accelerata ma, successivamente, donne e uomini perdono gradualmente massa ossea allo stesso modo (Lane J.M. et al, 2000). Per una migliore prevenzione è necessaria una diagnosi accurata nella fase iniziale della perdita ossea. Infatti, la prevenzione dell'osteoporosi è il miglior approccio al problema e dovrebbe essere attuata già dalla prima infanzia con misure generali, come seguire una dieta con sufficiente apporto di calcio o praticare uno stile di vita con adeguato esercizio fisico.

1.3.1. DIAGNOSI

Attualmente, la diagnosi si basa su tecniche di imaging, come la MOC (Mineralometria Ossea Computerizzata), la radiografia della colonna vertebrale e la morfometria vertebrale. La radiografia non è l'esame migliore per diagnosticare l'osteoporosi, infatti, viene di

norma richiesta per effettuare un esame morfologico della colonna così da visualizzare eventuali fratture o cedimenti vertebrali e stimarne la gravità. L'esame di riferimento per la diagnosi è la densitometria ossea, comunemente indicata come MOC, che permette di misurare la densità minerale ossea (*Bone Mineral Density*, BMD), cioè la quantità (espressa in g/m²) di minerali presenti nello scheletro o in alcuni distretti scheletrici particolarmente soggetti alla perdita di massa ossea. La BMD risulta quindi fondamentale per identificare pazienti a rischio frattura, così da poter prendere decisioni terapeutiche oltre che monitorare eventuali terapie. La MOC può essere effettuata con varie metodiche, al momento la più diffusa è la DEXA (*Dual Energy X-ray Absorptiometry*), una tecnica che consiste nel misurare l'assorbimento osseo di raggi X (Pilipovic N., 2001). Di solito, la misurazione si esegue a livello lombare, del femore o del polso. L'analisi fornisce una valutazione di tipo quantitativo e permette di valutare la BMD del paziente esaminato in confronto al valore medio di una popolazione di giovani adulti sani, che hanno raggiunto un valore di massa ossea adeguato. Lo scostamento del valore misurato si esprime come deviazione standard (DS), ogni DS in meno equivale a una riduzione del 10-15% rispetto al valore medio di riferimento; il numero di DS si indica come T-score (Lane N.E., 2006). L'osteodensitometria mediante DEXA è il metodo più importante per valutare l'osteoporosi, poiché la diminuzione della densità minerale ossea è fortemente correlata all'incidenza delle fratture. Inoltre, pur non essendo considerata come un test di screening, la MOC è utile anche per seguire l'andamento della perdita ossea nel tempo. Infine, negli ultimi tempi è stata introdotta anche la valutazione della massa ossea mediante apparecchiature ad ultrasuoni che misurano la velocità di trasmissione dell'onda a livello del calcagno, della patella e delle falangi delle mani. Al momento questa tecnica è ritenuta utile per individuare le persone a rischio da sottoporre quindi alla MOC.

1.3.2. TRATTAMENTO

Il Ministero della Sanità raccomanda una serie di misure generali per prevenire e contrastare l'osteoporosi: oltre a una dieta sana e che preveda un adeguato apporto di calcio (1200 mg per le donne al di sopra dei 50 anni e per gli uomini al di sopra dei 70), all'esposizione giornaliera al sole di almeno 10 minuti e all'attività fisica regolare, è necessaria l'assunzione della vitamina D (800-100UI/die) ed, eventualmente, supplementi vitaminici dopo i 50 anni (Ministero della Salute, 2018).

I trattamenti per l'osteoporosi sono di tipo farmacologico: farmaci anti-riassorbitivi (impediscono al corpo di riassorbire il tessuto osseo, come i bifosfonati, tra cui alendronato, ibandronato, risedronato, acido zoledronico), SERM (modulatori selettivi dei recettori per gli estrogeni, quali il raloxifene), terapia ormonale sostitutiva, farmaci anabolici (ad esempio il Teriparatide), doppio meccanismo d'azione (anti-riassorbitivi e anabolici) oppure anticorpi monoclonali (come il denosumab, un inibitore della citochina RANK-L che svolge un ruolo chiave nell'attività degli osteoclasti) (Gallagher J.C. et al, 2013). Questi agenti aumentano con successo la massa ossea, limitando così il rischio di frattura. Inoltre, i programmi di prevenzione delle cadute dovrebbero essere aggiunti alle cure mediche in quanto fondamentali per contrastare le fratture da fragilità. Infatti, fratture come quella dell'anca sono attribuibili ad una bassa massa ossea associata ad una caduta.

1.4. SOSTANZE NUTRACEUTICHE

Il termine “nutraceutico” è stato coniato da “nutrizione” e “farmaceutico” nel 1989 da Stephen DeFelice, fondatore e presidente della *Foundation for Innovation in Medicine*. Secondo DeFelice una sostanza nutraceutica può essere definita come “*un alimento (o parte di un alimento) che fornisce benefici medici o sanitari, compresa la prevenzione e/o il trattamento di un disturbo*”. Perciò, i nutraceutici, a differenza dei comuni integratori alimentari, devono fornire un apporto positivo nei confronti di una malattia o disturbo; tuttavia, sono necessari ancora molti studi scientifici per supportare e dimostrare la reale efficacia dei nutraceutici (Kalra E.K., 2003).

In questo progetto, le sostanze naturali prese in esame sono l'acido ortosilicico e la vitamina K2.

1.4.1. ACIDO ORTOSILICICO

Il silicio (Si) è uno degli elementi più presenti in natura: si trova principalmente sotto forma di silicati insolubili, ma piccole quantità in forma solubile sono presenti anche nelle acque naturali come Acido Ortosilicico [Si(OH)₄]. Degli studi sul suo assorbimento hanno dimostrato come l'Acido Ortosilicico abbia una biodisponibilità di oltre il 50% della dose ingerita e che poi venga normalmente escreto attraverso le urine. Proprio grazie alla sua

grande biodisponibilità sia per l'uomo che per gli animali, molti ricercatori hanno studiato i suoi effetti associati alla mineralizzazione ossea, alla riduzione del riassorbimento osseo e alla sintesi di collagene, pelle, unghie e capelli (Reffitt D.M. et al, 2003).

Il suo effetto osteogenico è stato studiato sotto molti punti di vista e questo la rende una sostanza naturale di notevole interesse scientifico. Ad esempio, si è studiato l'effetto dell'Acido Ortosilicico sulla sintesi del collagene di tipo 1 e sullo sviluppo osteogenico utilizzando cellule di osteosarcoma umano (MG-63), cioè cellule primarie simili agli osteoblasti derivate da cellule stromali del midollo osseo umano, e una linea cellulare umana precoce immortalizzata (HCC1). Da questo studio è emersa la capacità dell'Acido Ortosilicico di incrementare la sintesi di collagene di tipo 1 (COL1), l'attività della fosfatasi alcalina (ALP) e la sintesi di osteocalcina (OCN) (Refitt D.M. et al, 2003). Altri studi hanno dimostrato l'utilizzo da parte di Si(OH)_4 di un meccanismo per promuovere l'osteogenesi attraverso l'inattivazione di NF-KB, una via di trasduzione del segnale che inibisce la formazione dell'osso, tramite l'*upregulation* di miR-146a (Zhou X. et al, 2016). Questa sostanza naturale è anche in grado di accelerare la formazione ossea tramite il potenziamento del *pathway* P13K-Akt-mTOR e dei marcatori osteogenici correlati (Zhou H. et al, 2019). Inoltre, l'Acido Ortosilicico ha dimostrato di poter stimolare la differenziazione osteogenica e la mineralizzazione dei preosteoblasti inducendo l'autofagia (Chi H. et al, 2019).

1.4.2. VITAMINA K2

La Vitamina K è una vitamina liposolubile che svolge molte attività biologiche, tra cui la regolazione del metabolismo del calcio nei tessuti e la sintesi dei fattori della coagulazione. Le principali forme della Vitamina K sono tre: la VK1 (Phylloquinone) è presente nei cloroplasti di piante e verdure, in particolare nelle verdure a foglie verdi in elevate quantità, può essere convertita in VK2; la VK2 (Menaquinone) viene prodotta a livello intestinale dalla sintesi batterica, ed è indicata come MK-*n*, dove *n* indica il numero delle ripetizioni di 5 unità di carbonio; la VK3 (Menadione) è una provitamina con scarso utilizzo per via della sua potenziale tossicità. Le diverse forme appena citate differiscono tra loro per emivita plasmatica ($T^{1/2}$) e biodisponibilità; quella con maggiore $T^{1/2}$ e biodisponibilità è la VK2/MK-7, utilizzata in questa tesi.

La carenza di VK aumenta il rischio di sanguinamento ed emorragie, tuttavia, un elevato apporto può causare un aumento dell'emolisi, manifestandosi con trombosi, anemia emolitica e ittero, soprattutto nei bambini. Inoltre, la VK agisce sui processi di carbossilazione/decarbossilazione dei tessuti e su proteine specifiche coinvolte nella strutturazione e nella regolazione delle funzioni dell'osso (Cosso R. & Falchetti A., 2016). Infatti, la Vitamina K ha un forte impatto positivo sul metabolismo osseo: esercita un effetto anabolico sul turnover osseo promuovendo la differenziazione degli osteoblasti, la regolazione della trascrizione di geni specifici degli osteoblasti e svolgendo un ruolo fondamentale nella mineralizzazione della matrice ossea extracellulare (Akbari S. & Rasouli-Ghahroudi A.A., 2018). Uno studio effettuato nel 2017 ha dimostrato che la Vitamina K2 promuove il differenziamento osteogenico, inibendo il miR-133a, identificato come regolatore negativo della differenziazione osteogenica (Zhang Y. et al, 2017).

SCOPO DELLO STUDIO

Il progressivo aumento delle malattie associate all'età (ARDs) ha portato ad un maggior interesse scientifico nei confronti di terapie innovative ed efficaci. Per questo, prende sempre più piede lo studio delle proprietà biologiche delle sostanze naturali, della loro capacità preventiva e di trattamento di tali condizioni patologiche. Diverse molecole di origine naturale hanno dimostrato un efficace ruolo protettivo nei confronti dell'osteoporosi in modelli *in vitro*, anche se la loro biodisponibilità risulta bassa e il meccanismo d'azione non del tutto chiaro. Lo scopo di questa tesi è stato quello di valutare l'effetto di Acido Ortosilicico e della Vitamina K2 sulla promozione del mantenimento e della funzionalità delle cellule mesenchimali staminali oltre che del loro differenziamento osteogenico, a scapito di quello adipogenico.

In particolare, si è studiato l'effetto *in vitro* dell'associazione di queste sostanze sia sul differenziamento che sulla capacità proliferativa delle MSCs umane di origine midollare, analizzando anche la modulazione di alcuni marcatori ossei quali RUNX2, ALP, OCN e Coll α 1. L'innovatività del progetto risiede nella ricerca di una combinazione unica di molecole naturali, non esistente sul mercato, efficace e capace di agire sinergicamente su più bersagli molecolari.

In futuro, il prodotto ottenuto verrà anche testato, su pazienti osteopenici reclutati dalla Prof.ssa Espinosa, primario del reparto di geriatria degli Ospedali Riuniti Marche Nord e del centro osteoporosi di Fano così da valutare l'effettiva efficacia del farmaco.

MATERIALI E METODI

3.1. MODELLO CELLULARE

Gli effetti delle sostanze nutraceutiche analizzate sono stati valutati in cellule staminali mesenchimali derivanti da midollo osseo, prelevate dalla testa del femore di una donatrice di razza caucasica di 30 anni, acquistate dalla ditta PromoCell (Heidelberg, Germany). La ditta fornitrice esegue dei rigidi test di controllo sulla qualità di ogni lotto di MSCs, verificando la morfologia cellulare, il potenziale proliferativo e tasso l'aderenza. Inoltre, viene effettuata un'analisi citofluorimetrica per la caratterizzazione dei marcatori di superficie quali CD73, CD90, CD105, CD14, CD19, CD34, CD45 e HLA-DR e della sicurezza escludendo infezioni da HIV-1, HIV-2, HBV, HCV, HTLV-1, HTLV-2, oltre che di contaminanti microbici come funghi, batteri e micoplasma.

3.1.1. COLTURE CELLULARI

Le MSCs una volta scongelate, vengono coltivate in atmosfera umida a 37°C al 5% di CO₂, in terreno di crescita Mesenchymal Stem Cell Growth Medium 2 (PromoCell), addizionato con specifici supplementi (PromoCell) e Penicillina-Streptomina all'1%.

Per il loro mantenimento, ogni 2-3 giorni è opportuno cambiare il terreno di coltura che contiene sostanze di rifiuto tossiche per le cellule; una volta raggiunta una confluenza ottimale non superiore al 70%, le cellule vengono staccate dalla superficie della fiasca mediante l'uso di tripsina-EDTA (1X in PBS), la cui azione viene bloccata con l'aggiunta di un volume di terreno (AlphaMEM, addizionato con il 10% FBS *Fetal Bovine Serum*) in quantitativo almeno doppio rispetto a quello della tripsina. Le cellule vanno quindi contate con la camera di Burker, che permette di calcolare la concentrazione/ml di soluzione.

La camera di Burker è un vetrino portaoggetto che presenta due solchi laterali e due alloggiamenti in rilievo, ciascuno dei quali costituisce una camera, su cui si colloca il vetrino coprioggetto e in cui si fanno defluire per capillarità 10 µl di soluzione. Al microscopio ottico, il vetrino si presenta come una sorta di griglia formata da 9 quadrati delimitati da tre linee, ciascuno formato a sua volta da 16 quadrati: si contano le cellule all'interno di un quadrante grande e sulla periferia di soli due lati, per un totale di 4 quadranti per camera (Figura 4). Per ottenere il numero di cellule per ml, si calcola la media delle cellule contate nelle due camere, questa si moltiplica per il fattore di

conversione (10^4), per il fattore di diluizione e per il volume di sospensione cellulare. Quindi, attraverso una proporzione si calcola il volume di sospensione cellulare da piastrare in base alla concentrazione desiderata; in genere le MSCs vengono seminate in nuove fiasche con una densità di 4000 cellule/cm².

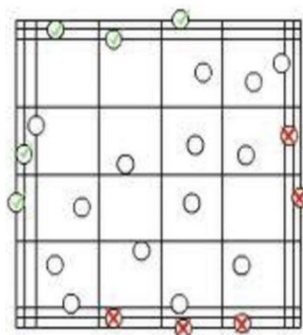


Figura 4 - Un quadrante della camera di Burkler con esempio di conteggio cellulare

Invece, in caso di crioconservazione delle cellule si prepara una soluzione di FBS (*Fetal Bovine Serum*) e DMSO (dimetilsolfossido) al 10% con cui si risospende il pellet di cellule; in seguito, la *cryovial* viene posta in isopropanolo a -80°C per assicurare un graduale abbassamento della temperatura e, successivamente, in azoto liquido, dove possono essere conservate anche per anni.

3.1.2. DIFFERENZIAMENTO OSTEOGENICO E ADIPOGENICO

Il differenziamento osteogenico e adipogenico delle MSCs è stato indotto grazie all'utilizzo di terreni pro-differenzianti, per 7 e per 14 giorni. Tali terreni, a basso contenuto di siero, vengono addizionati con supplementi specifici (PromoCell) e con antibiotici (Penicillina-Streptomicina all'1%). L'efficacia del differenziamento viene testata colorando le cellule con Alizarin Red (osteogenesi) e Oil Red O (adipogenesi), descritte di seguito, oltre che attraverso la valutazione dell'espressione di specifici marcatori di differenziamento.

3.1.2.1. COLORAZIONE ALIZARIN RED

La colorazione Alizarin Red (ARS) (Figura 5) è utilizzata per l'identificazione degli osteociti e consiste in una soluzione di un sale sodico idrosolubile dell'acido alizarin solfonico con formula chimica $C_{14}H_7NaO_7S$.

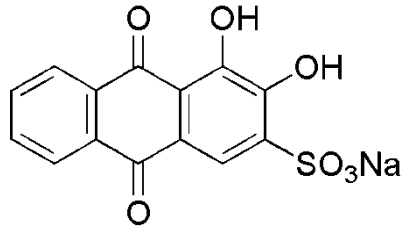


Figura 5 – Struttura molecolare Alizarin Red

L'Alizarin Red si lega ai depositi di calcio in colture differenziate di cellule staminali mesenchimali, colorandole di rosso.

Protocollo sperimentale:

1. Effettuare dei lavaggi delle colture cellulari con PBS;
2. Fissare le cellule in paraformaldeide al 10% per 20 minuti;
3. Lavaggio in H₂O deionizzata;
4. Incubare per 20 minuti a temperatura ambiente con ARS (40 mM in dH₂O);
5. Effettuare lavaggi con dH₂O in agitazione e infine osservare al microscopio ottico.

3.1.2.2. COLORAZIONE OIL RED O

La colorazione Oil Red O si utilizza per la caratterizzazione degli adipociti e consiste in una soluzione di sei parti di soluzione satura di colorante (0,5% Oil Red in isopropanolo), filtrata con un filtro da 0,2 μ m, e quattro parti di acqua deionizzata. All'osservazione microscopica gli adipociti appaiono come cellule tonde contenenti vescicole lipidiche di colore arancio-rosso.

Protocollo sperimentale:

1. Effettuare dei lavaggi delle colture cellulari con PBS;
2. Fissare le cellule in paraformaldeide al 4% per 5 minuti;
3. Lavaggio in PBS;

4. Incubare per 20 minuti al buio con soluzione Oil Red e in seguito effettuare un lavaggio in PBS per rimuovere il colorante in eccesso ed osservare al microscopio.

3.1.3. VALUTAZIONE DELLA SENESCENZA CELLULARE: SAGGIO DELLA β -GALATTOSIDASI

Per caratterizzare meglio il modello cellulare ed eventualmente poter testare in una fase successiva l'effetto delle sostanze prese in esame, è stata analizzata anche la curva di senescenza delle MSC. Lo studio della senescenza cellulare si basa sulla valutazione dell'attività dell'enzima β -Galattosidasi (SA- β -Gal) (Figura 6), che aumenta man mano che la coltura invecchia e quindi all'aumentare dei passaggi replicativi. Per il saggio è stato utilizzato il Senescence Detection Kit (BioVision Inc.), che sfrutta la β -Galattosidasi prodotta dalle cellule senescenti per l'idrolisi del substrato X-Gal, il quale conferisce una colorazione blu alle cellule senescenti.

Dopo aver rimosso il mezzo di coltura ed aver effettuato un lavaggio con PBS, si fissano le cellule con Fixative Solution per 15 minuti a temperatura ambiente. Si procede quindi con la colorazione, che prevede l'aggiunta di una mix di Staining Solution, Staining Supplement e X-Gal. Un'incubazione overnight a 37°C favorisce la formazione di un precipitato intracellulare insolubile e di colore blu, visibile al microscopio ottico. In questo modo, calcolando la percentuale di cellule positive, si è valutato il livello di senescenza delle MSCs.

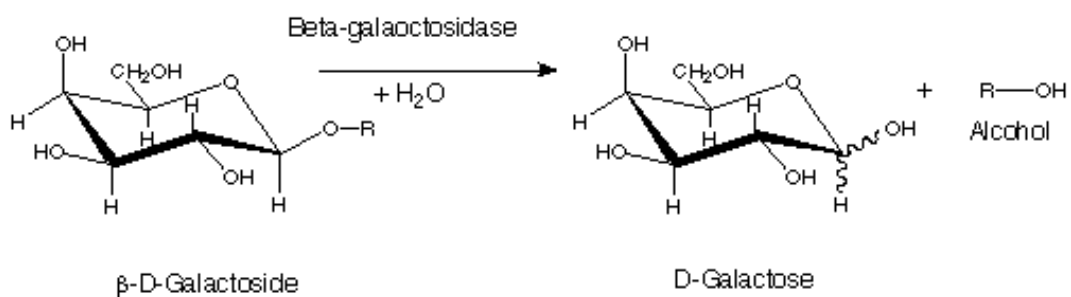


Figura 6 - Reazione β -Galattosidasi

3.2. SAGGIO MTT PER LA VALUTAZIONE DELLA VITALITÀ CELLULARE

Il saggio MTT, dove la sigla indica il composto bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, è un saggio colorimetrico standard per la misurazione dell'attività degli enzimi che riducono l'MTT. Questo, corrispondente a un sistema policiclico, è dotato di un anello tetrazolico che può essere ridotto dalle deidrogenasi mitocondriali o da altri sistemi di trasporto elettronico, formando un composto cromogeno azotato: il formazano (Figura 7). Il formazano forma dei cristalli insolubili nell'ambiente intracellulare a cui le membrane cellulari risultano impermeabili: quindi la molecola entra nella cellula ma non riesce ad essere smaltita se non è stata correttamente metabolizzata, cioè se le catene di trasporto elettronico sono metabolicamente attive. La trasformazione dell'MTT consiste nel viraggio della molecola da giallo a blu-violetto, che viene valutato e misurato mediante lettura spettrofotometrica ad una lunghezza d'onda di 570 nm. In pratica il saggio servirà per stimare il numero di mitocondri attivi e quindi il numero di cellule vitali nel campione.

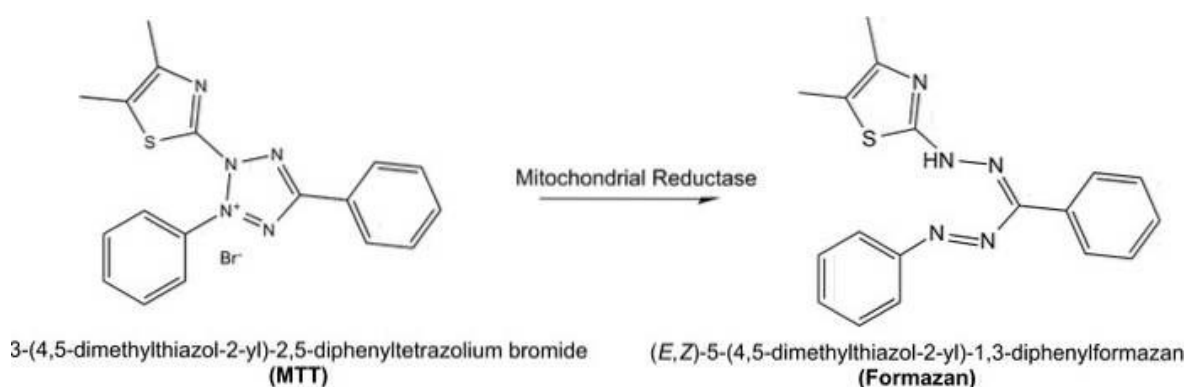


Figura 7 - composto bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) ridotto a formazano per azione del metabolismo mitocondriale.

3.3. TRATTAMENTO DELLE MSCs CON LE SOSTANZE NATURALI

Prima di iniziare i trattamenti per studiare l'effetto delle sostanze oggetto di studio, è stata valutata la loro citotossicità al fine di individuare le concentrazioni ottimali.

La Vitamina K2 (Menaquinone-7, 649 g/mol) è stata preparata utilizzando come veicolo, dopo averne valutato la tossicità, il Cremophor, cioè una miscela di acidi grassi a catena corta, olio di ricino ed esteri del glicerolo. Mentre, l'Acido Ortosilicico sotto forma di sodio metasilicato (122,06 g/mol) è stato preparato con PBS (*Phosphate Buffered Saline*).

Stabilite le concentrazioni che garantiscono una buona sopravvivenza, le MSCs sono state trattate in terreno di mantenimento, con Acido Ortosilicico 75 μ M e Vitamina K2 0,1 μ M per 7 e 14 giorni, utilizzando cellule non trattate come controllo negativo. Lo stesso procedimento è stato effettuato trattando le cellule indotte a differenziare in senso osteogenico.

Prima di iniziare i trattamenti sono stati valutati gli effetti citotossici delle singole molecole al fine di individuare le concentrazioni ottimali per la sopravvivenza cellulare.

La Vitamina K2 (Menaquinone-7, 649 g/mol) è stata preparata utilizzando come veicolo, dopo averne valutato la tossicità, il Cremophor, cioè una miscela di acidi grassi a catena corta, olio di ricino ed esteri del glicerolo. Mentre, l'Acido Ortosilicico sotto forma di sodio metasilicato (122,06 g/mol) è stato preparato con PBS (*Phosphate Buffered Saline*).

3.4. ANALISI RNA MESSAGGERI

3.4.1. ESTRAZIONE RNA TOTALE

L'RNA totale estratto dalle MSCs in coltura è stato isolato tramite un kit per la purificazione dell'RNA, che sfrutta la cromatografia su mini colonna a scambio ionico (Norgen Biotek Corporation, Canada) (Figura 8). L'estrazione dell'RNA viene effettuata a partire da pellet cellulare oppure direttamente da lisi in piastra, attraverso il Buffer RL fornito dal kit. Questo, contiene sali di guanidinio, un agente caotropico che agisce denaturando le proteine intracellulari e inattivando le RNasi. Dopo aver aggiunto etanolo per far precipitare gli acidi nucleici, si trasferisce il lisato nella colonnina. Una successiva centrifugazione favorisce l'adesione dell'acido nucleico al filtro presente all'interno della colonna. Si effettuano tre lavaggi successivi con Wash Solution, alternati a centrifugazioni,

e un'ulteriore centrifugazione a vuoto per asciugare il filtro. L'ultimo passaggio prevede il recupero dell'RNA, utilizzando una soluzione di eluizione. Il campione ottenuto deve essere conservato a -80°C .

Durante la procedura è importante prestare attenzione ad eventuali contaminazioni, essendo l'RNA una molecola instabile, per la presenza dell'ossidrile libero in posizione 2' sul ribosio, e molto suscettibile all'azione delle RNasi. Queste sono presenti nell'ambiente di lavoro, sulle mani dell'operatore o nelle soluzioni e strumenti di uso comune, per questo si impiegano guanti, provette RNasi-free e puntali con filtro.

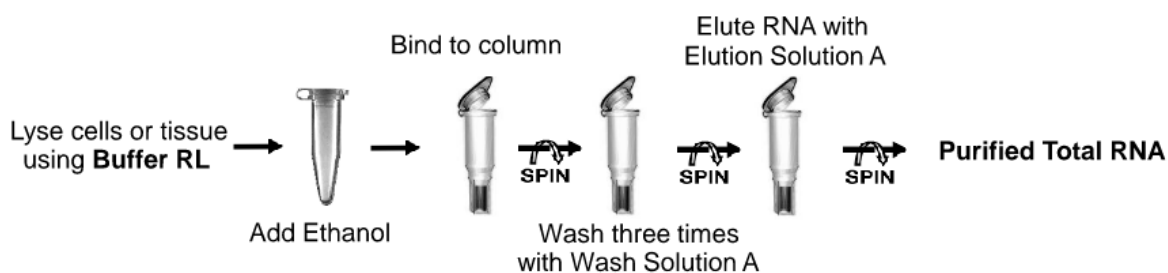


Figura 8 - Procedura di estrazione e purificazione dell'RNA

3.4.2. QUANTIZZAZIONE DELL'RNA ESTRATTO

Per valutare la quantità ed il grado di purezza dell'RNA estratto, è stato utilizzato il Nanodrop ONE (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Questa tecnica spettrofotometrica sfrutta la capacità degli acidi nucleici di assorbire la luce UV a 260 nm, lunghezza d'onda determinata dalla presenza delle loro basi azotate, che ne permette di determinare la quantità; le ulteriori letture a 280 nm e 230 nm, permettono di valutarne la contaminazione rispettivamente da proteine e fenoli. Per un campione di RNA puro, A230:260:280 dovrebbe essere circa 1:2:1.

I risultati ottenuti indicano il quantitativo di acido nucleico in $\mu\text{g/ml}$; quindi, in base alla concentrazione che si decide di utilizzare, si calcola la quantità di campione da prelevare per la successiva fase di retrotrascrizione.

3.4.3. RETROTRASCRIZIONE

La retrotrascrizione (RT) è una tecnica di biologia molecolare che produce una sequenza di DNA a singolo filamento, detto DNA complementare (cDNA), a partire da una sequenza di RNA a singolo filamento, per azione della Trascrittasi Inversa. Per questo lavoro, è stato

utilizzato il PrimeScript RT reagent kit with gDNA eraser kit (Takara Bio Inc.), che prevede una reazione iniziale di 2 minuti a 42°C per l'eliminazione di DNA genomico (gDNA). Questo risulta essere un contaminante per la successiva fase di amplificazione in Real-Time PCR, in quanto sarebbe co-amplificato assieme al cDNA rischiando di alterare i risultati. Quindi, si effettua la reazione di trascrizione inversa vera e propria: il programma di retrotrascrizione prevede un ciclo di 15 minuti a 37°C e uno di 5 secondi a 85°C; il cDNA ottenuto potrà essere utilizzato per una Real-Time PCR.

3.4.4. REAL-TIME PCR

La Real-Time PCR (o qPCR) è una tecnica di biologia molecolare, che misura l'amplificazione in tempo reale di molecole di DNA durante la fase esponenziale della PCR, quando cioè l'efficienza di amplificazione è influenzata minimamente dalle variabili di reazione, permettendo di ottenere risultati molto più accurati rispetto alla PCR tradizionale. Durante la fase esponenziale, infatti, la quantità di copie prodotte è proporzionale al numero di copie di partenza; ciò è rilevabile grazie alla misurazione "in tempo reale" della fluorescenza, generata da coloranti fluorescenti che si intercalano nel DNA a doppio filamento (es. Sybr Green) o da sonde fluorescenti sequenza-specifiche. Nella Real-Time i primi cicli, in cui non è misurabile la variazione nel segnale della fluorescenza, definiscono un importante parametro: la *baseline* della curva. Un aumento della fluorescenza oltre questa linea indica il rilevamento del prodotto di PCR in fase di accumulo. Un secondo parametro importante è la linea-soglia: linea parallela alla baseline, che taglia le curve dei campioni in fase esponenziale (*Threshold cycle*).

In questa metodica è stato utilizzato il TB Green Advantage qPCR Premix (Takara) e la RT-PCR viene eseguita nel termociclatore Rotor-Gene (Qiagen).

La mix di reazione viene preparata per ogni gene di interesse, tenendo conto che ciascun campione deve essere caricato in doppio e che viene considerato un campione in più rispetto a quelli presenti (Tabella 1).

SYBR Green	5 µl	+ 1,5 µl cDNA
Primer FW	0,2 µl	
Primer RW	0,2 µl	
dH ₂ O	3,1 µl	

Tabella 1 - Composizione mix per Real-Time PCR

Le sequenze dei primer utilizzati nella reazione di Real-Time PCR sono:

- IPO8 FW: CGTTCCTCCTGAGACTCTGC
- IPO8 RV: GAATGCCCACTGCATAGGTT
- Col1a1 FW: CCAAATCTGTCTCCCCAGAA
- Col1a1 RV: TCAAAAACGAAGGGGAGATG
- OCN FW: CTCACACTCCTCGCCCTATTG
- OCN RV: GCTTGGACACAAAGGCTGCAC
- RUNX2 FW: GCGGTGCAAACCTTTCTCCAG
- RUNX2 RV: TGCTTGCAGCCTTAAATGACTC
- ALP FW: GAGAAGCCGGGACACAGTTC
- ALP RV: CCTCCTCAACTGGGATGATGC
- p16^{INK4a} FW: GATCCAGGTGGGTAGAAGGTC
- p16^{INK4a} RV: CCCCTGCAAACCTTCGTCCT

Per la valutazione dell'espressione relativa vengono paragonati i Ct dei geni di interesse rispetto ad un gene di controllo (calibratore) e geni *housekeeping* (*reference gene*), geni espressi costitutivamente in tutti i campioni analizzati, necessari alla normalizzazione. La quantificazione di mRNA viene calcolata con il metodo dell'espressione relativa, $2^{-\Delta\Delta Ct}$, dove viene utilizzato come normalizzatore IPO-8.

3.5. ANALISI LUNGHEZZA DEI TELOMERI

I telomeri sono le regioni terminali dei cromosomi, composti da sequenze di DNA ripetuto, che proteggono i cromosomi stessi dal deterioramento. Questi, in seguito al meccanismo di replicazione cellulare, tendono ad accorciarsi; infatti, è stata analizzata la lunghezza dei telomeri per valutare lo stato di senescenza delle cellule in coltura. Questa metodica prevede l'estrazione del DNA cellulare e, in seguito, una Real-Time PCR per la valutazione dell'espressione telomerica.

3.5.1 ESTRAZIONE DEL DNA

Per l'estrazione del DNA è stato utilizzato il Qiagen Kit DNeasy, che si basa sulla proprietà degli acidi nucleici di adsorbirsi alla silice di cui sono impaccate le colonnine. Dopo aver aggiunto la proteina K al campione, si procede utilizzando i buffer di estrazione e si trasferisce il lisato all'interno delle colonnine. A questo punto, il DNA è legato al filtro, quindi si effettuano delle centrifugazioni con le soluzioni di lavaggio, al termine delle quali si eluisce per recuperare il DNA.

3.5.2 REAL-TIME PCR

L'analisi tramite Real-Time PCR permette di misurare, per ogni campione di DNA, la differenza tra il campione stesso e un campione di riferimento nel suo rapporto tra i numeri di ripetizioni telomeriche, rispetto al numero di ripetizioni di un gene a singola copia (Cawthon R.M., 2002). Quindi sono state preparate due mix di reazione: una contenente i primers per i telomeri e una contenente i primers per il gene 36B4, un gene a singola copia utilizzato come normalizzatore.

Diversamente dalla metodica descritta nel capitolo 3.2.4, in questo caso la Real-Time PCR si serve dell'amplificazione contemporanea di una curva standard di DNA, che permette di ottenere una misura relativa della lunghezza dei telomeri stessi. Questa viene ottenuta mediante diluizione di una quantità nota di oligonucleotidi contenenti solo ripetizioni TTAGGG il cui numero, in ogni standard, è calcolato usando dei parametri definiti. Questo sistema permette di determinare contemporaneamente il numero relativo di copie di due differenti sequenze sfruttando un singolo fluoroforo intercalante del DNA, il Sybr Green. La lunghezza media relativa dei telomeri viene poi espressa come il rapporto tra il numero di copie delle ripetizioni telomeriche sintetizzate ed il numero di copie di 36B4 amplificate. Moltiplicando il rapporto per un valore costante pari a 4270, si ottiene la lunghezza del telomero espressa come numero di paia di basi (bp).

3.6. ANALISI DELL'ESPRESSIONE DELLE PROTEINE MEDIANTE WESTERN BLOTTING

Il Western Blotting è una tecnica che permette l'identificazione di una determinata proteina all'interno di una miscela di proteine attraverso l'utilizzo di anticorpi specifici. Il metodo più comunemente usato per la separazione delle proteine sfrutta l'elettroforesi su un gel di poliacrilammide, più 0,1% di SDS (Sodio Dodecil Solfato), in cui la separazione avviene in base al loro diverso peso molecolare (SDS-PAGE). In seguito, si procede al trasferimento su membrana di nitrocellulosa, su cui avverrà l'immunoblotting.

3.6.1. ESTRAZIONE DELLE PROTEINE

Per poter procedere ad una corretta separazione proteica, è necessario isolare le proteine dal campione cellulare. Il pellet cellulare viene lisato per 30 minuti in ghiaccio con RIPA buffer (NaCl 150 mM; Tris-HCl 50 mM pH 7,4; SDS 0,1%; Triton X-100 1%; Sodio Deossicolato 0,5 %) che contiene sali, detergenti per la solubilizzazione delle membrane, SDS per la denaturazione delle proteine e un tampone che permette il mantenimento del pH fisiologico cellulare. Al RIPA buffer si aggiungono gli inibitori delle proteasi, fondamentali per inibire gli enzimi che digeriscono le proteine e che sono normalmente presenti nelle cellule e nel citoplasma. È importante durante la procedura che i lisati vengano tenuti sempre in ghiaccio, per impedire alle reazioni biochimiche cellulari di avvenire. Dopo la lisi si effettua una centrifugazione per 20 minuti a 14000 rpm per recuperare il sovrantante contenente le proteine.

3.6.2. QUANTIZZAZIONE CON METODO DI BRADFORD

Il metodo di Bradford è una procedura spettrofotometrica utilizzata per misurare la concentrazione di proteine in una soluzione. Questa metodica sfrutta la capacità del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 in acido fosforico e metanolo (diluito 1:1 con H₂O deionizzata), di legarsi ai residui amminoacidici basici delle proteine. In questo test la concentrazione proteica dei campioni viene determinata rispetto a una curva di taratura, che viene costruita prendendo in considerazione uno standard proteico a concentrazione nota, in questo caso la BSA (*Bovine Serum Albumin*) 1 mg/ml.

Per la retta di taratura si preparano sei punti con BSA a concentrazione crescente (Tabella 2), mentre per i campioni si utilizza sempre 1 μ l di soluzione in 999 μ l di Bradford.

	Concentrazione	Bradford (1:1 dH ₂ O)	BSA
1	BSA 0 μ g	1 ml	0 μ l
2	BSA 1 μ g	999 μ l	1 μ l
3	BSA 2 μ g	998 μ l	2 μ l
4	BSA 4 μ g	996 μ l	4 μ l
5	BSA 6 μ g	994 μ l	6 μ l
6	BSA 8 μ g	992 μ l	8 μ l

Tabella 2 - Costruzione retta di taratura

La lettura spettrofotometrica viene effettuata a 595 nm in triplicato su una piastra da 96-well.

Si riportano i valori di assorbanza ottenuti in un foglio di lavoro Excel e si calcola la media per ciascuno dei triplicati. In seguito, per la retta di taratura, si costruisce un grafico a dispersione con le medie dei punti della BSA, aggiungendo la linea di tendenza, l'equazione della retta e R^2 , cioè l'indice di correttezza statistica (Figura 9).

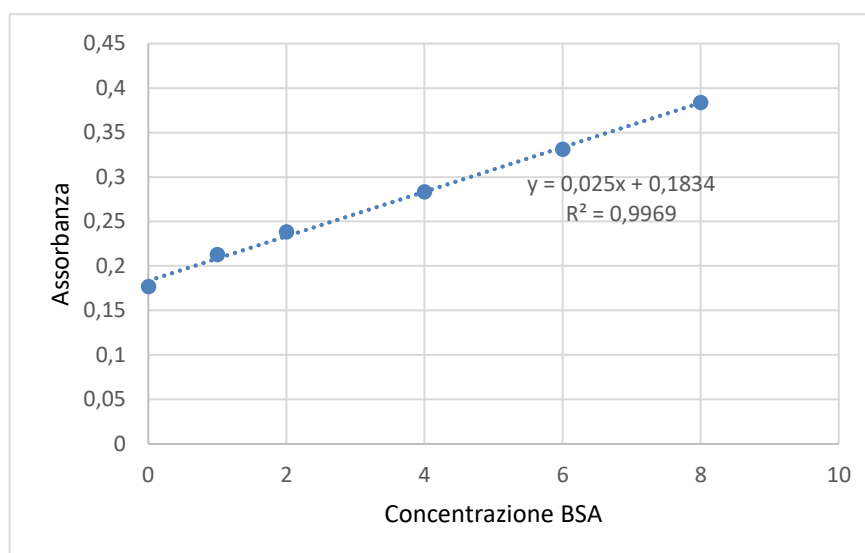


Figura 9 - Retta di taratura per il dosaggio della concentrazione proteica

A questo punto, per calcolare la concentrazione proteica dei campioni presi in analisi, si sostituiscono le medie dei triplicati dei campioni alla y dell'equazione della retta ($y = \mu$ g/ μ l). In genere si utilizzano 25 μ g di proteine, quindi si calcola il volume (μ l) per ogni

singolo campione, a cui vanno aggiunti 5 μ l di Loading Buffer. Per la preparazione del Loading Buffer si utilizza il Laemmli Buffer, cioè una soluzione a base di Tris-HCl contenente glicerolo, SDS e colorante blu di bromofenolo, e β -mercaptoetanololo 1:10. Quindi i campioni vengono fatti bollire a 95°C per 5 minuti per denaturare l'estratto proteico e poi caricati in gel per la corsa elettroforetica.

3.6.3. ELETTOFORESI SU GEL DI POLIACRILAMMIDE (SDS-PAGE)

L'SDS-PAGE è una tecnica elettroforetica che sfrutta l'attività denaturante del sodio dodecil solfato (SDS) per un'efficace separazione delle proteine sulla base del loro peso molecolare. Il gel è costituito da due porzioni: lo stacking gel e il running gel. Questi hanno la stessa composizione ma diversa concentrazione di acrilammide che ne determina la diversa porosità. In particolare, lo stacking gel ha una concentrazione di acrilammide del 4-5% per permettere a tutti i campioni di uscire contemporaneamente dal pozzetto, mentre il running gel presenta una concentrazione che va dall'8 al 14% a seconda delle dimensioni delle proteine. Il gel utilizzato in questo protocollo è il Pre-Cast di Biorad.

Una volta preparata la vaschetta per la corsa, si posiziona il gel all'interno dell'apparato per la corsa, immergendolo nel Running Buffer, un tampone salino acquoso che promuove la migrazione delle proteine (Figura 10).

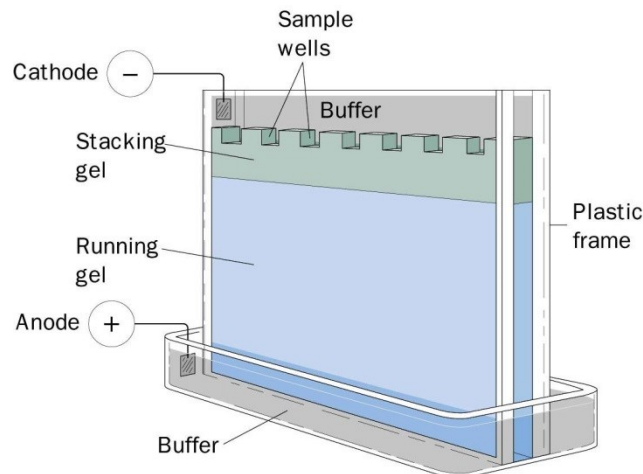


Figura 10 - Apparato di corsa

A questo punto si caricano i campioni nei pozzetti, assieme al marker di riferimento a peso molecolare noto (Figura 11) e al Laemmli Buffer, aggiunto nei pozzetti rimasti vuoti per bilanciare la corsa. Il coperchio della vaschetta presenta due elettrodi, in modo da creare un polo positivo e uno negativo che generano una differenza di potenziale; le proteine, avendo una carica negativa netta, migrano verso il polo positivo, con velocità differente a seconda del loro peso molecolare. Dopo aver collegato gli elettrodi alla corrente si avvia la corsa elettroforetica a 100 V.

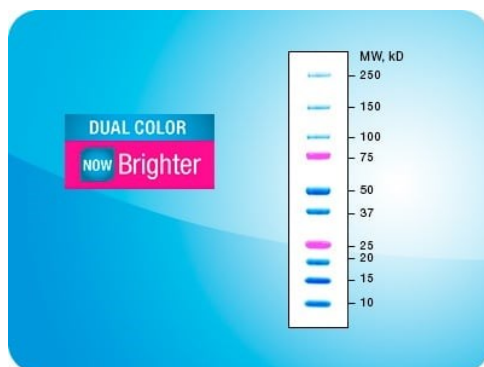


Figura 11 - Il marker utilizzato è Precision Plus Protein Dual Color Standards

3.6.4. TRASFERIMENTO SU MEMBRANA

Il trasferimento delle proteine dal gel su membrana di nitrocellulosa è stato effettuato tramite electroblotting, assemblando il sandwich nel Trans-Blot Turbo Blotting System (Biorad) (Figura 12a).

A trasferimento ultimato, si valuta l'efficienza del trasferimento con la colorazione Rosso Ponceau, cioè un colorante rosso fotosensibile, che si lega alle proteine e che poi viene eliminato attraverso lavaggi con PBS Tween 1X (Figura 12b). Per bloccare tutti i siti aspecifici delle proteine, viene utilizzata una soluzione di blocco, come il Blocking Buffer della Biorad o una soluzione di latte scremato in polvere al 5% in TBS-T per almeno un'ora.

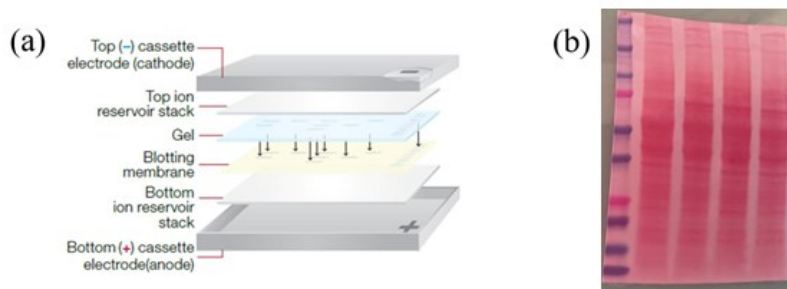


Figura 12 - (a) Allestimento del sandwich. (b) Esempio di colorazione Rosso Ponceau su membrana

3.6.5. IMMUNOBLOTTING

L'immunoblotting permette di rivelare proteine che reagiscono con un anticorpo specifico. Quindi si aggiunge l'anticorpo primario specifico per la proteina da rilevare, con un'incubazione overnight in agitazione a 4°C. In seguito, si effettuano tre lavaggi di 10 minuti in TBS-T e si incuba per 1 ora con l'anticorpo secondario anti-mouse o anti-rabbit coniugato con HRP (Horseradish Peroxidase), diluiti rispettivamente 1:5000 e 1:10000, in latte o in BSA. Dopo la rimozione dell'anticorpo si procede allo sviluppo della membrana.

Per questo studio sono stati utilizzati:

- Anticorpo monoclonale Col1A1 (E8I9Z) (Cell Signaling), di tipo Rabbit, diluito 1:1000 in BSA/TBS-T 5%
- Anticorpo monoclonale GAPDH (14C10) (Cell Signaling), di tipo Rabbit, diluito 1:2000 in BSA/TBS-T 5%.
- Anticorpo monoclonale OPG (Santa Cruz), di tipo Mouse, diluito 1:100 in Blocking Buffer (BioRad).
- Anticorpo policlonale OCN (Biorbyt), di tipo Rabbit, diluito 1:100 in Blocking Buffer (BioRad).
- Anticorpo monoclonale OSX (Santa Cruz), di tipo Mouse, diluito 1:100 in Blocking Buffer (BioRad).
- Anticorpo monoclonale PCNA (Cell Signaling), di tipo Mouse, diluito 1:2000 in Blocking Buffer (BioRad).
- Anticorpo monoclonale RUNX2 (Cell Signaling), di tipo Rabbit, diluito 1:500 in Blocking Buffer (BioRad).
- Anticorpo monoclonale p16^{INK4a} (Santa Cruz), di tipo Mouse, diluito 1:100 in Blocking Buffer (BioRad).

3.6.6. DETECTION

Il kit utilizzato per la reazione di chemiluminescenza è il Clarity Western ECL Substrate (Biorad) costituito da Luminol Enhancer Reagent e Peroxide Reagent in rapporto 1:1. La perossidasi di rafano legata all'anticorpo secondario catalizza l'ossidazione del luminolo a 3-amminoftalato, in uno stato elettronicamente eccitato, che decade allo stato

fondamentale, con emissione di una luce blu a 425 nm. Dopo l'incubazione con l'ECL, la rilevazione viene effettuata mediante l'utilizzo dello strumento UVITEC Alliance (Cambridge), dotato di un sistema di acquisizione delle immagini ad alta risoluzione, grazie al quale è possibile rilevare il segnale chemiluminescente corrispondente alla banda della proteina di interesse, confrontandola con i pesi molecolari noti del marker utilizzato (Figura 11).

3.7. ANALISI STATISTICA

Per la valutazione dei risultati sperimentali, gli esperimenti devono essere eseguiti almeno tre volte e i dati presentati come medie e relative deviazioni standard (\pm SD). In questo studio è stato utilizzato lo "Student T test" per l'analisi della significatività statistica in campioni indipendenti. Valori di p inferiori a 0,05 sono stati considerati significativi.

RISULTATI

4.1. CARATTERIZZAZIONE DEL MODELLO CELLULARE

Il modello cellulare utilizzato per valutare gli effetti delle sostanze naturali in esame, sono cellule mesenchimali stromali derivanti da midollo osseo (BM-MSCs). L'immagine sottostante (Figura 13) rappresenta la curva di crescita, ottenuta calcolando il potenziale replicativo delle cellule come capacità di duplicazione della popolazione cellulare (*Population Doubling*). Si può osservare come le MSCs proliferano, con progressiva diminuzione della capacità replicativa, fino al passaggio P16, in cui si verifica l'arresto del ciclo cellulare e cioè il raggiungimento dello stato di senescenza.

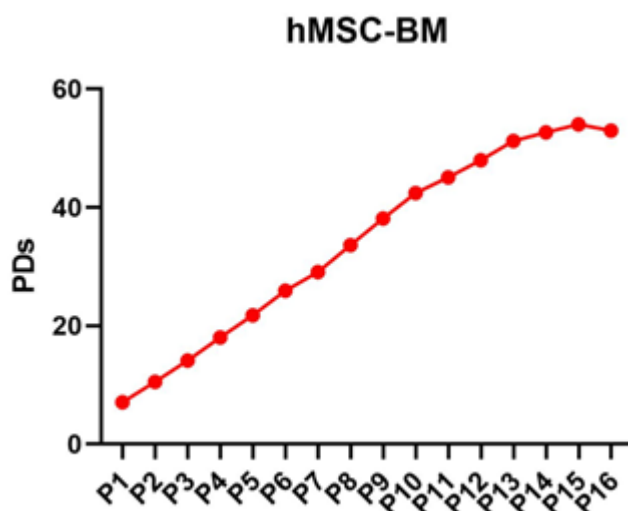


Figura 13 - Curva di crescita delle BM-MSCs, dal passaggio P1 al P16. In ascissa sono riportati i passaggi in coltura, mentre in ordinata i logaritmi in base 10 del numero di duplicazione cellulare ad ogni passaggio in coltura.

Per l'acquisizione dello stato di senescenza replicativa, le MSCs sono state caratterizzate anche dal punto di vista morfologico e biochimico, valutando aspetti tipici delle cellule senescenti, come la maggiore espressione dell'enzima SA- β -Gal, delle proteine p16^{INK4a} e p21, oltre che la lunghezza dei telomeri.

Osservando al microscopio le cellule per l'analisi dell'espressione del SA- β -Gal, si nota un elevato numero di cellule blu con attività β -galattosidasi (Figura 14a); in genere, per definire lo stato di senescenza in una coltura cellulare, la quota di cellule blu contate deve essere superiore al 60% del totale, in questo caso sopra all'80%. Per la valutazione

dell'espressione di p16^{INK4a} e p21 sono stati presi in considerazione differenti passaggi cellulari, corrispondenti a cellule giovani e senescenti, di cui sono stati analizzati sia i livelli d'espressione genica di tali marcatori attraverso Real-Time PCR, sia i livelli d'espressione proteica mediante Western Blotting (Figura 14c-d).

La lunghezza relativa dei telomeri è stata valutata tramite Real-Time PCR, eseguita su tre differenti passaggi in coltura. Dal grafico (Figura 14b) si evince che la lunghezza dei telomeri diminuisce all'aumentare dell'invecchiamento cellulare.

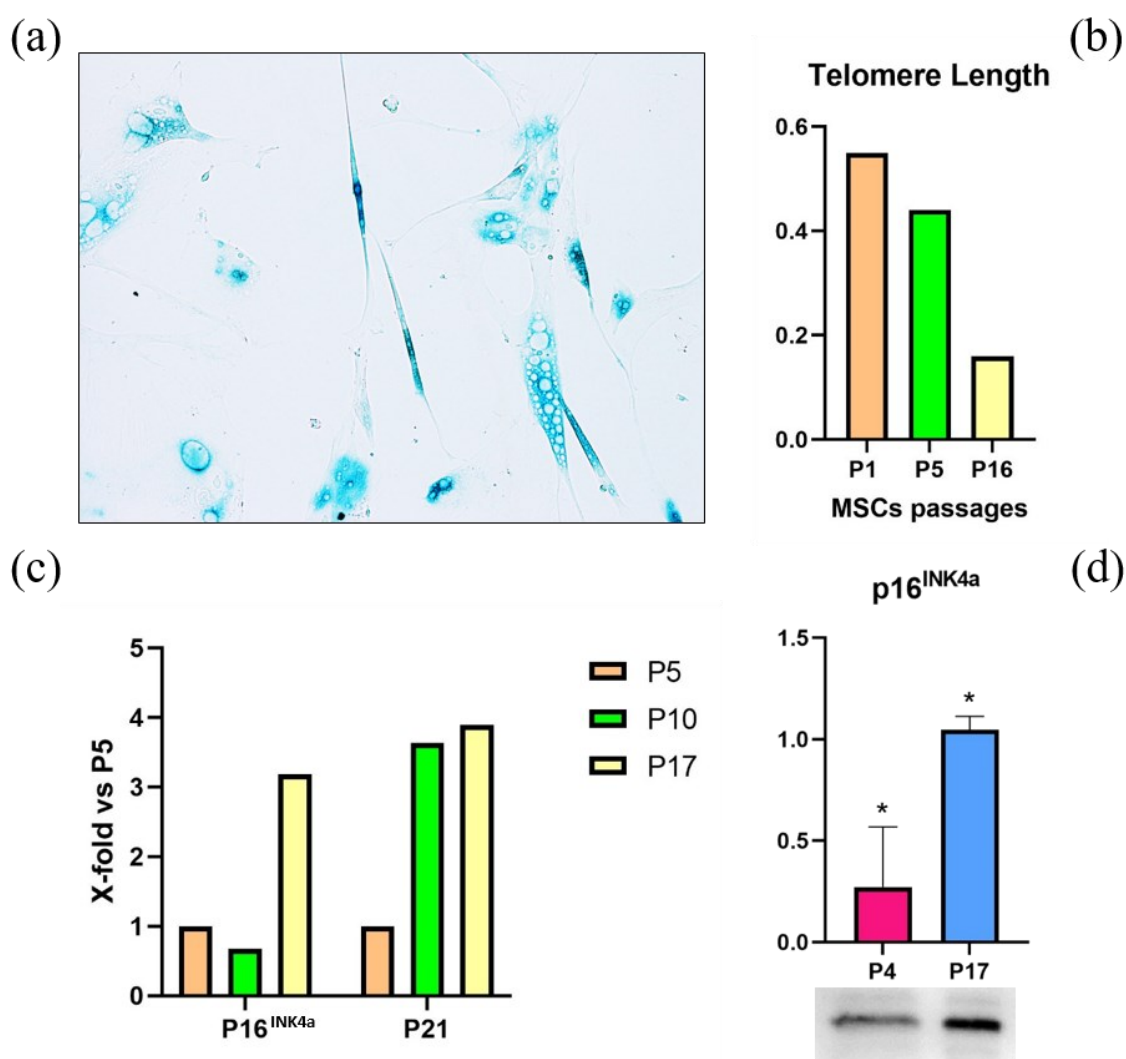


Figura 14 - (a) Fotografia scattata al microscopio ottico relativa alle BM-MSCs dopo il saggio colorimetrico della β-Galattosidasi. (b) Valutazione della lunghezza relativa dei telomeri in relazione a tre differenti passaggi in coltura tramite Real-Time PCR. (c) Valutazione dell'espressione dei marcatori di senescenza p16^{INK4a} e p21 mediante Real-Time PCR di tre passaggi in coltura, corrispondenti a cellule giovani, intermedie e senescenti. In ordinata l'X-fold calcolato per il passaggio in coltura più precoce. (d) Analisi densitometrica e rispettivo blot dell'espressione proteica di p16^{INK4a} di due passaggi in coltura, corrispondenti a cellule giovani e senescenti (*p < 0.05, **p < 0.01, Student T-test).

4.1.1. VALIDAZIONE DELLA CAPACITÀ DIFFERENZIANTE DELLE BM-MSC

Le cellule sono state differenziate in osteoblasti e adipociti utilizzando terreni pro-differenzianti per 7 e 14 giorni. La validazione dei terreni osteogenico e adipogenico è stata effettuata rispettivamente con la colorazione Alizarin Red (Figura 15a) e Oil Red O (Figura 15c). Inoltre, si è valutata l'espressione di marcatori specifici di osteogenesi (Figura 15b) e adipogenesi (Figura 15d) tramite Real-Time PCR.

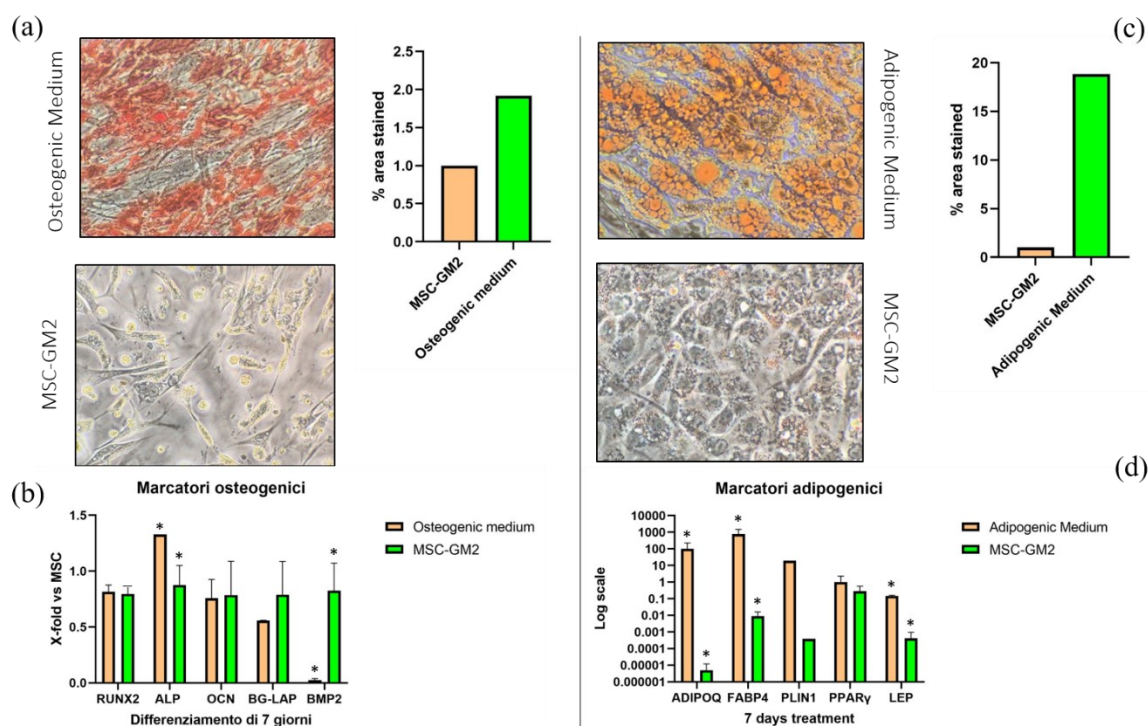


Figura 15 – Validazione terreni pro-differenzianti tramite colorazioni ed espressione di marcatori specifici. **(a)** Colorazione Alizarin Red per osteogenesi: in alto le cellule coltivate per 14 giorni con terreno pro-osteogenico, in basso le cellule coltivate in terreno di mantenimento per 14 giorni; il grafico descrive la percentuale di area colorata ottenuta tramite software ImageJ (Schneider C.A. et al, 2012). **(b)** Analisi dell'espressione dei marcatori osteogenici tramite Real-Time PCR. **(c)** Colorazione Oil Red O per adipogenesi: in alto le cellule coltivate per 14 giorni con terreno pro-adipogenico, in basso le cellule coltivate in terreno di mantenimento per 14 giorni; il grafico descrive la percentuale di area colorata ottenuta tramite software ImageJ. **(d)** Analisi dell'espressione di marcatori adipogenici tramite Real-Time PCR.

Tale analisi è il risultato della media di due esperimenti (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Student T-test).

4.2. VALUTAZIONE DELLA CITOTOSSICITÀ DELLE SOSTANZE IN ANALISI

Prima di valutare i loro potenziali effetti pro-osteogenici, le sostanze naturali sono state testate a diverse concentrazioni e tempi di trattamento, attraverso il saggio MTT su colture primarie di cellule mesenchimali stromali da midollo osseo; in base alla percentuale di vitalità cellulare, sono state scelte le concentrazioni per ogni singola sostanza da utilizzare per i successivi esperimenti.

Per l'Acido Ortosilicico (OA) sono state testate concentrazioni crescenti da 50 a 150 μM (Figura 16a) e per la Vitamina K2 concentrazioni da 78 a 10000 nM (Figura 16b). È importante ricordare che è stata valutata anche la tossicità del Cremophor, veicolo in cui è stata risospesa la Vitamina K2.

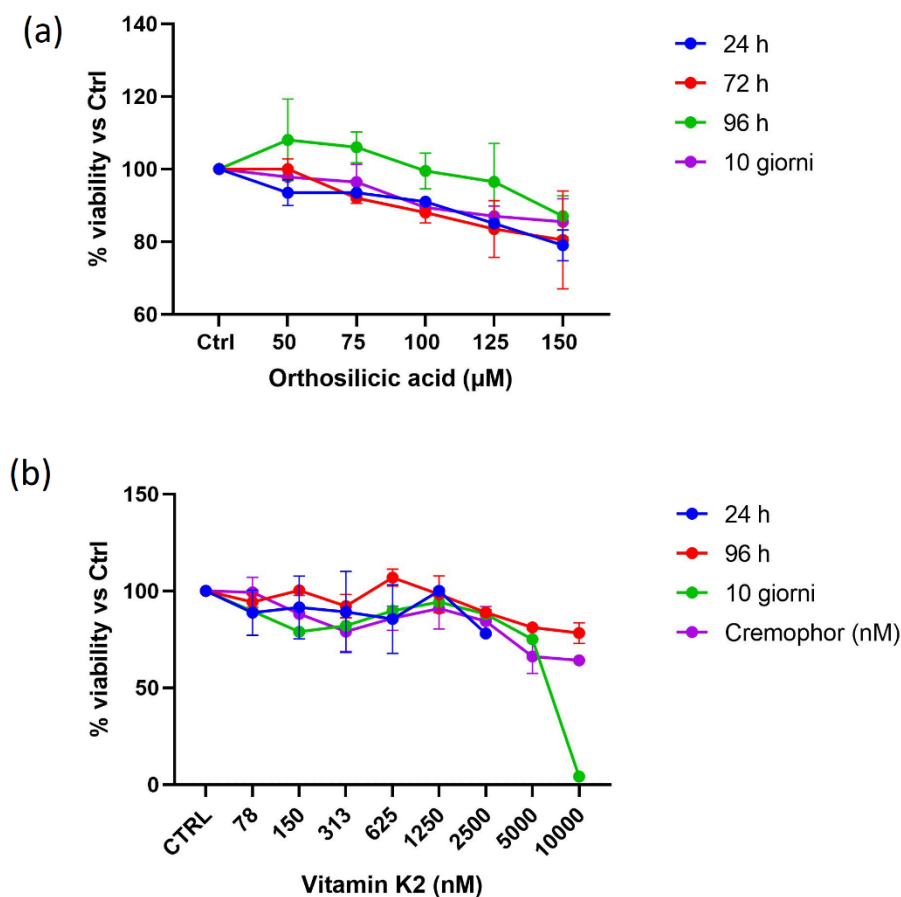


Figura 16 – Valutazione della vitalità cellulare in funzione delle diverse concentrazioni di acido ortosilicico (a) e vitamina K2 (b) nel terreno di coltura a diverse tempistiche (da 24h a 10 giorni). In particolare, della vitamina K2, è stata valutata la vitalità cellulare anche in funzione del veicolo in cui è stata risospesa la molecola, il Cremophor. Tale analisi è il risultato della media di tre esperimenti (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Student T-test).

Le sostanze analizzate non presentano particolare tossicità; tuttavia, sono stati effettuati diversi esperimenti per determinare la concentrazione di sostanze migliore in termini di tossicità e vitalità cellulare. In questa relazione, abbiamo scelto di mostrare soltanto le concentrazioni finali scelte per i successivi trattamenti: OA 75 μM e VK2 0,1 μM (Figura 17) sia con le sostanze da sole che in associazione.

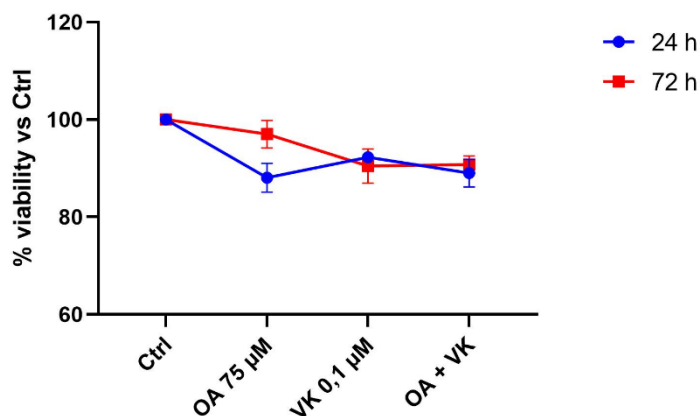


Figura 17 – Valutazione della vitalità cellulare in funzione delle concentrazioni prese in considerazione (OA 75 μM e VK 0,1 μM) in singolo e in combinazione, per 24h e 72h. Tale analisi è il risultato della media di tre esperimenti (*p < 0.05, **p < 0.01, Student T-test).

In tutti i casi analizzati, la vitalità delle cellule mesenchimali stromali risulta essere molto elevata, quando trattate con acido ortosilicico (OA) e vitamina K2 (VK2).

4.3. VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ PRO-OSTEOGENICA IN CELLULE MESENCHIMALI

Dopo aver definito le concentrazioni ottimali di trattamento di OA e VK2, si è investigato il loro effetto pro-osteogenico sulle MSCs. Per questo scopo le cellule BM-MSc giovani sono state coltivate per 7 giorni o 14 giorni in terreno di mantenimento (Figura 18a) o indotte a differenziare per una settimana (Figura 18b) aggiungendo i terreni con le due sostanze. La modulazione di alcuni marcatori osteogenici è stata quindi valutata analizzando l'espressione dei loro mRNA. Le cellule coltivate in terreno non addizionato con le sostanze naturali sono state utilizzate come controllo negativo.

Nei grafici sottostanti vengono riportati soltanto i risultati dell'espressione genica di RUNX2 e ALP, relativa ai trattamenti di 7 giorni.

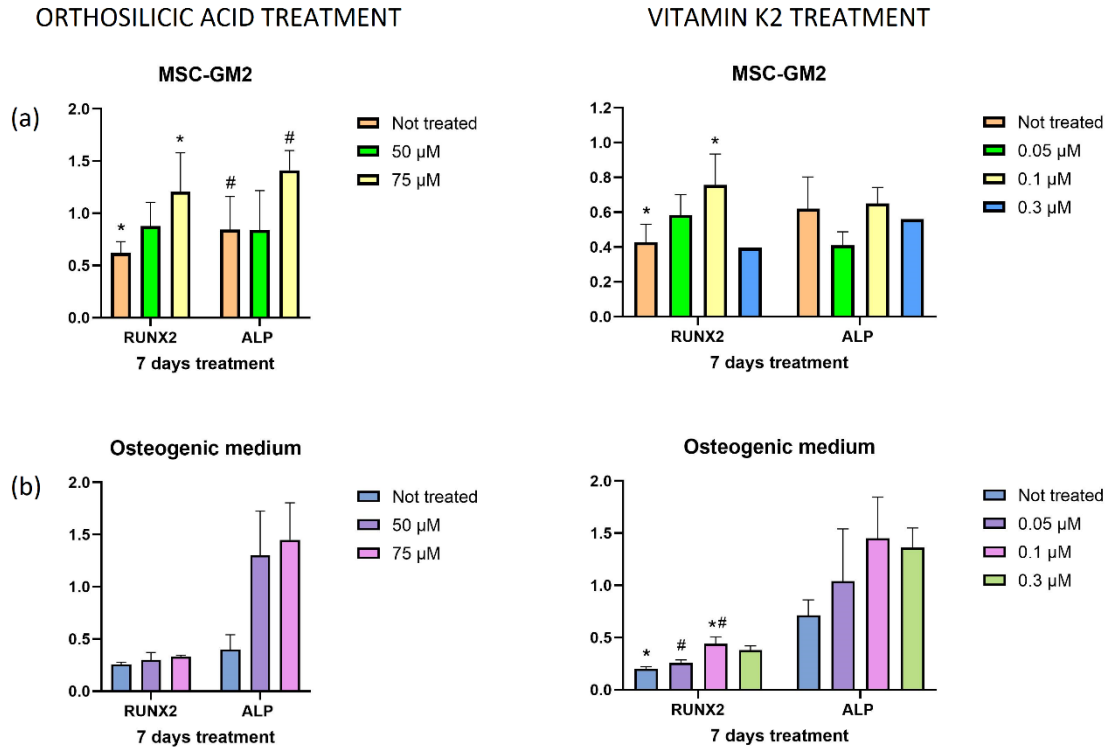


Figura 18 - Espressione genica dei principali marcatori osteogenici RUNX2 e ALP in BM-MSC giovani trattate per 7 giorni con **(a)** terreno di mantenimento e sostanze naturali, tale analisi è il risultato della media di tre esperimenti (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Student T-test), e **(b)** terreno pro-osteogenico e sostanze naturali, Tale analisi è il risultato della media di due esperimenti (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Student T-test).

I risultati ottenuti mostrano che le due sostanze hanno un effetto diverso sui due marcatori osteogenici: l'OA (sia alla concentrazione 50 che 75 μM) aumenta l'espressione della fosfatasi alcalina sia nelle cellule non indotte a differenziare sia in quelle differenzianti, mentre la vitamina K2 è più efficace sul fattore trascrizionale RUNX2, soprattutto alla concentrazione 0.1 μM, sebbene sembrerebbe efficace anche sulla ALP nelle cellule indotte a differenziare.

4.4. VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ PRO-OSTEOGENICA DELLA MIX IN CELLULE MESENCIMALI

Successivamente, le cellule mesenchimali in terreno di mantenimento sono state trattate con una combinazione di Acido Ortosilicico e Vitamina K2, allo scopo di valutarne l'effetto pro-osteogenico.

Sono stati presi in considerazione diversi marcatori osteogenici, tra cui RUNX2, ALP, Col1 α 1 e OCN, tutti analizzati sia dopo un trattamento di 7 che di 14 giorni (Figura 19).

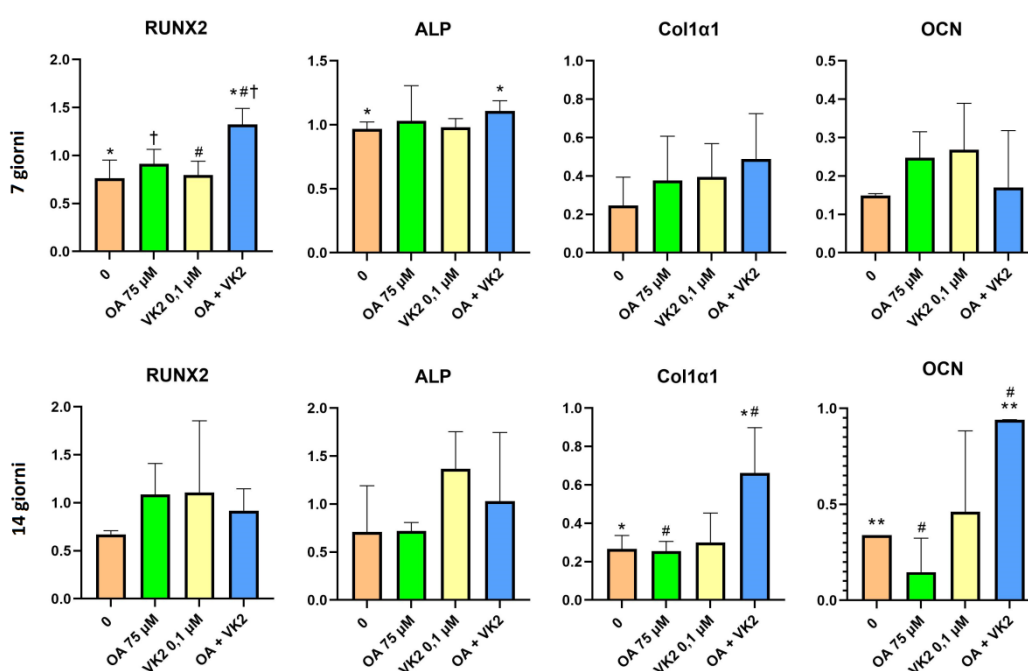


Figura 19 – Espressione genica dei principali marcatori osteogenici RUNX2, ALP, Col-1 α 1 e OCN in MSC giovani trattate per 7 giorni e per 14 giorni. Le concentrazioni utilizzate sono state acido ortosilicico (OA) 75 μ M e vitamina K2 (VK2) 0,1 μ M (*p < 0.05, **p < 0.01, Student T-test).

Oltre all'espressione genica dei marcatori osteogenici, è stata valutata anche l'espressione proteica di RUNX2, Col1 α 1 e OCN attraverso il Western Blotting, nel tentativo di individuare la combinazione di sostanze ottimale, efficace e sinergica. Anche in questo caso sono stati effettuati esperimenti sia dopo 7 giorni (Figura 20) che dopo 14 giorni (Figura 21).

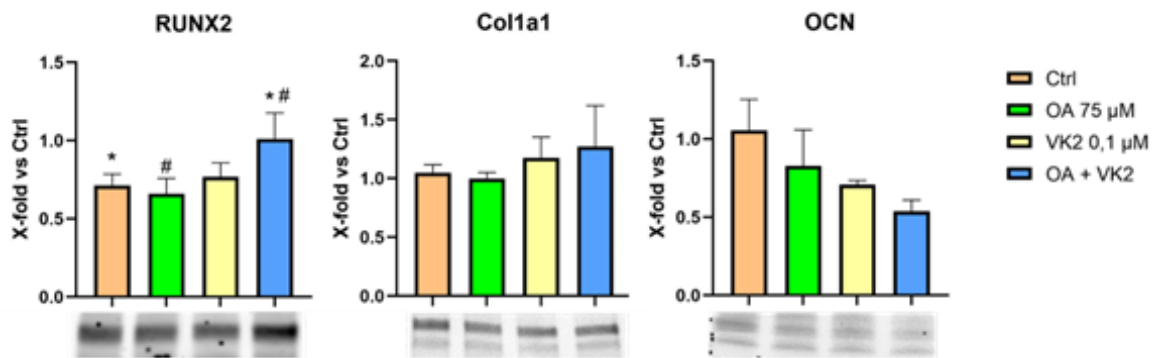


Figura 20 – Espressione proteica dei marcatori osteogenici RUNX2, Col1a1 e OCN dopo 7 giorni di trattamento. L’analisi densitometrica dei blot è il risultato della media di tre esperimenti (*#p<0,05, Student T-test). L’espressione proteica di Col1a1 e OCN non risulta statisticamente significativa.

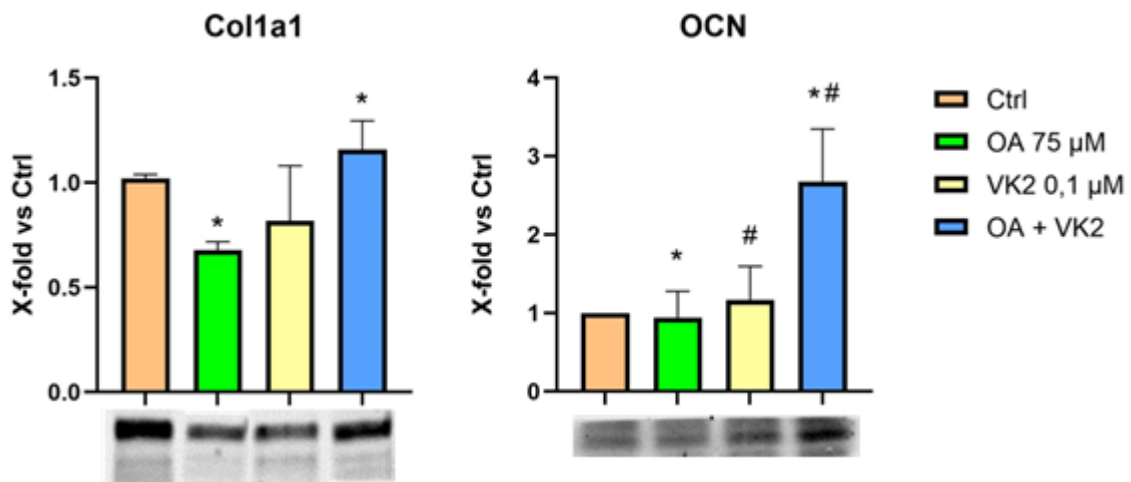


Figura 21 – Espressione proteica dei marcatori osteogenici Col1a1 e OCN dopo 14 giorni di trattamento. L’analisi densitometrica dei blot è il risultato della media di tre esperimenti (*#p<0,05, Student T-test).

L’effetto di due sostanze si definisce sinergico quando l’effetto della combinazione delle sostanze risulta essere maggiore della somma dei singoli effetti, $AB > A + B$.

La valutazione dell’effetto sinergico della combinazione di Acido Ortosilicico e Vitamina K2 è stata analizzata sia sull’espressione genica che proteica dei marcatori osteogenici.

Per quanto riguarda l’espressione genica, le combinazioni che risultano sinergiche sono state individuate per RUNX2 e ALP, dopo un trattamento di 7 giorni, per Col1a1 e OCN dopo un trattamento di 14 giorni (per i grafici si rimanda alla figura 19).

Relativamente all'espressione proteica, invece, le combinazioni di sostanze che risultano sinergiche sono state individuate per RUNX2 dopo un trattamento di 7 giorni, per Coll α 1 e OCN dopo un trattamento di 14 giorni (per i grafici si rimanda alla Figura 20 e 21).

CONCLUSIONI

Le proprietà benefiche di molte sostanze di derivazione naturale sono ben note sin dall'antichità; tuttavia, soltanto negli ultimi decenni, si è visto un interesse sempre maggiore verso l'impiego di queste in campo biomedico.

Questo riguarda soprattutto il trattamento di tutte quelle patologie di tipo cronico-degenerativo non trasmissibili ed età associate, che si presentano con una frequenza sempre maggiore nella popolazione. Recenti sviluppi hanno infatti portato a considerare la possibilità di integrare le medicine naturali alle terapie convenzionali, allo scopo di garantire una migliore offerta terapeutica, sostenibile e completa: molti ricercatori nel mondo hanno focalizzato la loro attenzione sullo studio di queste sostanze, dapprima su modelli *in vitro*, che ne hanno permesso di identificare numerose proprietà biologiche come quelle antibatteriche, antiossidanti e anti-infiammatorie, e successivamente *in vivo* per validare i dati ottenuti *in vitro*.

Parte dell'interesse si è incentrato su quelle molecole che hanno naturalmente un impatto positivo sul metabolismo osseo, promuovendone il differenziamento e la mineralizzazione con lo scopo di poterle impiegare nel trattamento dell'osteoporosi, una patologia legata ad un progressivo impoverimento della massa ossea.

I risultati ottenuti in questo studio preliminare *in vitro* suggeriscono l'effettiva attività pro-osteogenica delle sostanze naturali analizzate, Acido Ortosilicico e Vitamina K2, sul modello di cellule stromali mesenchimali umane da midollo osseo.

In particolare, ne è stata valutata dapprima la tossicità, quindi l'efficacia, in termini di promozione del differenziamento sia della cellula staminale mesenchimale in condizioni non differenzianti sia nella cellula già commissionata, grazie all'analisi di quattro marcatori osteogenici: RUNX2, Col1a1, ALP e OCN.

I risultati ottenuti dimostrano che tali sostanze non compromettono il processo differenziativo (Figura 18) e, sebbene i risultati non siano statisticamente significativi, a causa del numero limitato delle prove sperimentali non ancora concluse, indicano un effetto positivo sul differenziamento: trattando le cellule con Acido Ortosilicico o Vitamina K2 si può osservare un generale aumento dei livelli di espressione degli mRNA dei suddetti marcatori osteogenici.

Spesso l'associazione di singoli principi attivi debolmente efficaci risulta utile per potenziare l'effetto biologico atteso. Nel nostro caso quindi l'idea è stata quella di associare le due dosi prescelte come non tossiche ma indicative di una certa efficacia, per studiarne l'effetto sinergico nell'indurre differenziamento osteogenico. Valutata la non tossicità dell'associazione, è emerso che le due sostanze agiscono sinergicamente sul processo osteogenico ovvero il loro effetto è maggiore quando somministrate insieme, rispetto a quando vengono utilizzate singolarmente.

Già a 7 giorni dal trattamento, infatti, la mix aumenta l'espressione di RUNX2 e ALP, e dopo 14 giorni induce l'espressione di Col1 α 1 e OCN, in entrambi i casi con effetto sinergico e statisticamente significativo (Figure 19-20-21).

Questo non sorprende, dal momento che, come descritto nel paragrafo 1.2.1., nella prima fase del differenziamento della cellula mesenchimale stromale a pro-osteoblasto (Figura3) detta proliferativa, vi è un aumento d'espressione sia di RUNX2 che di ALP, il primo legato alla proliferazione di osteoblasti immaturi e il secondo importante per indurre la seguente fase di mineralizzazione; nella seconda fase, in cui il differenziamento risulta morfologicamente più evidente, si ha un aumento d'espressione anche dei marcatori legati alla deposizione del collagene (Col1 α 1) e al rilascio di osteocalcina (OCN).

Questi risultati *in vitro* nel complesso suggeriscono che l'efficienza di trattamento con queste sostanze naturali, fino ad oggi suggerito come di supporto alle terapie convenzionali per l'osteoporosi, potrebbe essere migliorata associandole in un unico integratore. Tuttavia, la biodisponibilità, non tossicità ed efficacia deve essere valutata *in vivo* mediante trial clinici su soggetti osteopenici o osteoporotici prima di essere immessa in commercio. Questa fase dello studio deve ancora essere intrapresa poiché deve essere previamente approvata dal Comitato Etico Regionale.

BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- Akbari Solmaz, Rasouli-Ghahroudi Amir Alireza. *Vitamin K and Bone Metabolism: A Review of the Latest Evidence in Preclinical Studies. BioMed Research International*, 2018, 1–8. doi:10.1155/2018/4629383
- Ambrosi Glauco, Cantino Dario, Castano Paolo, Correr Silvia, D’Este Loredana, Donato Rosario F., Familiari Giuseppe, Fornai Francesco, Gulisano Massimo, Iannello Annalisa, Magaudo Ludovico, Marcello Maria F., Martelli Alberto M., Pacini Paolo, Rende Mario, Rossi Pellegrino, Sforza Chiarella, Tacchetti Carlo, Toni Roberto, Zummo Giovanni. *Anatomia dell’uomo* Milano, Edi Ermes (2008), seconda edizione
- Antebi Ben, Asher Amber M., Rodriguez Luis A., Moore Robbie K., Mohammadipoor Arezoo, Cancio Leopoldo C. (2019). *Cryopreserved mesenchymal stem cells regain functional potency following a 24-h acclimation period. Journal of Translational Medicine*, 17(1), 297–. doi:10.1186/s12967-019-2038-5
- Chi Hai, Kong Meng, Jiao Guangjun, Wu Wenliang, Zhou Hongming, Chen Lu, Qiao Yini, Wang Hongliang, Ma Wenzheng, Chen Yunzhen (2019). *The role of orthosilicic acid-induced autophagy on promoting differentiation and mineralization of osteoblastic cells. Journal of Biomaterials Applications*, 088532821983770 .doi: 10.1177/0885328219837700
- Cosso Roberta, Falchetti Alberto (2016). *Vitamin K and bone metabolism: the myth and the truth. Expert Review of Precision Medicine and Drug Development*, 1(3), 301–317. doi:10.1080/23808993.2016.1174061
- Cymet Tyler C, Wood Ben, Orbach N (2000). *Osteoporosis. The Journal of the America Osteopathic Association*, 100. PMID: 11105458
- Ding Dah-Ching, Shyu Woei-Cherng, Lin Shinn-Zong (2011). *Mesenchymal Stem Cells. Cell Transplantation*, 20(1), 5–14. doi:10.3727/096368910X

- Dulak Józef, Szade Krzysztof, Szade Agata, Nowak Witold, Józkowicz Alicja (2015). *Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine*. *Acta Biochimica Polonica*, 62(3), 329–337. doi:10.18388/abp.2015_1023
- Florencio-Silva Rinaldo, Sasso Gisela Rodrigues da Silva, Sasso-Cerri Estela, Simões Manuel Jesus, Cerri Paulo Sérgio (2015). *Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells*. *BioMed Research International*, 2015, 1–17. doi:10.1155/2015/421746
- Gallagher J. Christopher, Tella Sri Harsha (2014). *Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis*. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 142(), 155–170. doi:10.1016/j.jsbmb.2013.09.008
- Infante Arantza, Rodríguez Clara I. (2018). *Osteogenesis and aging: lessons from mesenchymal stem cells*. *Stem Cell Research & Therapy*, 9(1), 244–. doi:10.1186/s13287-018-0995-x
- Kalra Ekta K. (2003). *Nutraceutical-definition and introduction.*, 5(3), 27–28. doi:10.1208/ps050325
- Komori Toshihisa (2006). *Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors*, 99(5), 1233–1239. doi:10.1002/jcb.20958
- Lane Joseph M., Russell Linda, Khan Safdar N. (2000). *Osteoporosis*. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 372, 139–150. doi:10.1097/00003086-200003000-00016
- Lane Nancy E. (2006). *Epidemiology, etiology, and diagnosis of osteoporosis.*, 194(2-suppl-S), 0–0. doi:10.1016/j.ajog.2005.08.047
- Ministero della Salute. *Osteoporosi*. (2021). Articolo pubblicato su: “salute.gov”. <https://www.salute.gov.it/portale/donna/dettaglioContenutiDonna.jsp?id=4491&area=Salute+donna&menu=patologie>
- Ministero della Salute. *Osteoporosi* (2018). Articolo pubblicato su: “issalute”. <https://www.issalute.it/index.php/saluteaz-saz/o/443-osteoporosi#bibliografia>

- Pennings Sari, Liu Karen J., Qian Hong (2018). *The Stem Cell Niche: Interactions between Stem Cells and Their Environment*. *Stem Cells International*, 2018, 1–3. doi:10.1155/2018/4879379
- Pilipovic Nada (2001). *Osteoporosis*. 54(1-2):5-9. PMID: 11432323
- Reffitt D.M, Ogston N, Jugdaohsingh R, Cheung H.F.J, Evans B.A.J, Thompson R.P.H, Powell J.J, Hampson G.N (2003). *Orthosilicic acid stimulates collagen type I synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro.*, 32(2), 0–135. doi:10.1016/s8756-3282(02)00950-x
- Schneider Caroline A, Rasband Wayne S, Eliceiri Kevin W (2012). *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. doi:10.1038/nmeth.2089
- Zhang Yuele, Weng Shiyang, Yin Junhui, Ding Hao, Zhang Changqing, Gao, Youshui (2017). *Vitamin K2 promotes mesenchymal stem cell differentiation by inhibiting miR-133a expression*. *Molecular Medicine Reports*, –. doi:10.3892/mmr.2017.6308
- Zhou Hongming, Jiao Guangjun, Dong Meng, Chi Hai, Wang Hongliang, Wu Wenliang, Liu Haichun, Ren Shanwu, Kong Meng, Li Ci, Zhang Lu, Chen Yunzhen (2018). *Orthosilicic Acid Accelerates Bone Formation in Human Osteoblast-Like Cells Through the PI3K–Akt–mTOR Pathway*. *Biological Trace Element Research*, (), –. doi:10.1007/s12011-018-1574-9
- Zhou Xianfeng, Moussa Fouad M., Mankoci Steven, Ustriyana Putu, Zhang Nianli, Abdelmagid Samir, Molenda Jim, Murphy William L., Safadi Fayed F., Sahai Nita (2016). *Orthosilicic acid, Si(OH)₄, stimulates osteoblast differentiation in vitro by upregulating miR-146a to antagonize NF-κB activation*. *Acta Biomaterialia*, (), S1742706116302161–. doi:10.1016/j.actbio.2016.05.007