



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTÀ DI INGEGNERIA

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

Tesina

BIOREATTORI PER L'INGEGNERIA TISSUTALE DELLA CARTILAGINE

Relatore: ANDREA BAGNO

Laureanda: DENISE DE ZANET

A. A. 2009-2010

A mamma e papà

(27 settembre 2010)

SOMMARIO

Negli ultimi anni l'ingegneria dei tessuti biologici ha permesso un miglioramento della qualità della vita grazie alle sue applicazioni nell'ambito della medicina rigenerativa. In particolare, per l'ingegnerizzazione della cartilagine articolare, tessuto con limitatissima capacità autorigenerativa, sono stati sviluppati diversi tipi di bioreattori che, a differenza delle tradizionali colture cellulari statiche, favoriscono l'adesione e la crescita di condrociti o cellule staminali mesenchimali - in maniera dinamicamente controllata - su supporti polimerici tridimensionali biodegradabili. I bioreattori per il tessuto cartilagineo possiedono, solitamente, un sistema a perfusione per l'ottimizzazione del trasporto di nutrienti, ossigeno e prodotti di scarto, e sistemi di applicazione di stimoli meccanici, quali pressione idrostatica e idrodinamica, sforzi di taglio e compressione dinamica per conferire al neo-tessuto le proprietà fisiche e strutturali della cartilagine nativa. Un successo in ambito clinico e ospedaliero sarà veramente possibile, però, solo quando verranno colmate le attuali lacune legislative riguardanti l'ingegneria tissutale e quando sarà possibile definire precise relazioni di causa-effetto tra la modulazione dei parametri di coltura e le risultanti proprietà del tessuto.

INDICE

CAP. 1 INTRODUZIONE	9
1.1 L'ingegneria tissutale nella medicina rigenerativa	9
1.1.1 Gli sviluppi della medicina rigenerativa	9
1.1.2 Introduzione all'ingegneria tissutale.....	10
1.1.3 Applicazioni dell'ingegneria tissutale alla cartilagine.....	11
1.2 Limiti dell'ingegneria dei tessuti	12
 CAP. 2 IL TESSUTO CARTILAGINEO	 15
2.1 Anatomia del tessuto cartilagineo.....	15
2.1.1 Generalità sul tessuto cartilagineo e istogenesi	15
2.1.2 Tipi di cartilagine.....	17
2.2 La cartilagine articolare	19
2.2.1 Generalità sulle articolazioni	19
2.2.2 Struttura, composizione e proprietà della cartilagine articolare	20
2.3 Danneggiamento della cartilagine e interventi	24
2.4 Comportamento della cartilagine articolare da considerare per l'ingegnerizzazione.....	28
2.4.1 Comportamento dinamico.....	28
2.4.2 Condizioni in vivo	33

CAP. 3 LA RIGENERAZIONE DELLA CARTILAGINE	41
3.1 Introduzione	41
3.2 Le cellule	42
3.2.1 Le cellule nell'ingegneria tissutale	42
3.2.2 Sorgenti cellulari per costrutti cartilaginei.....	46
3.3 Lo scaffold	48
3.4 Condizionamento biochimico e fisico: i bioreattori	52
3.4.1 I bioreattori nella rigenerazione della cartilagine	52
3.4.2 Regole e mezzo di coltura.....	53
3.5 Fattori critici nell'ingegneria tissutale della cartilagine	55
 CAP. 4 BIOREATTORI PER LA CARTILAGINE INGEGNERIZZATA.....	59
4.1 L'importanza dei bioreattori	59
4.1.1 Coltura statica e coltura dinamica dei costrutti cartilaginei.....	59
4.1.2 Sistemi di coltura utilizzati nell'ingegneria della cartilagine	62
4.1.3 La perfusione	65
4.2 Aspetti importanti nella progettazione di un bioreattore	67
4.3 Gli effetti delle sollecitazioni meccaniche sui costrutti cartilaginei.....	72
 CAP. 5 CONCLUSIONE	77
5.1 Cenni agli aspetti normativi ed etici dell'ingegneria dei tessuti.....	77
5.2 Considerazioni conclusive e prospettive future	79

CAP. 1 INTRODUZIONE

1.1 L'INGEGNERIA TISSUTALE NELLA MEDICINA RIGENERATIVA

1.1.1 Gli sviluppi della medicina rigenerativa

La medicina moderna rappresenta il risultato di continui progressi che si sono sviluppati a partire dall'inizio del secolo scorso. Nonostante gli sviluppi e le sofisticazioni introdotte in campo biomedico, ad oggi la sostituzione di organi danneggiati da traumi o malattie rappresenta un problema cruciale per la medicina. Le tecniche chirurgiche, inizialmente utilizzate per rimuovere tessuti o organi danneggiati, sono presto diventate tecniche di ricostruzione di quegli stessi tessuti o organi [1,4].

Il *trapianto di organi* è tuttora problematicamente limitato dalla scarsa disponibilità di donatori e problemi di incompatibilità. Anche con organi artificiali, ambito di ricerca ancora aperto, si incontrano severi problemi di rigetto cronico dovuto sia a incompatibilità con i materiali artificiali, sia al progressivo deterioramento o danneggiamento dell'organo impiantato e, di conseguenza, alla perdita delle sue originarie funzionalità. Questa forma di danneggiamento progressivo degli organi trapiantati implica la necessaria sostituzione degli stessi, soprattutto in pazienti giovani, per i quali l'intensità di attività e utilizzo dell'organo è maggiore. Le tecniche sviluppate per sostituire la funzionalità degli organi incontrano, in aggiunta, limiti di tipo biochimico: non si è in grado di sostituire le complesse reazioni che sono alla base del funzionamento degli organi originari con dispositivi artificiali e non è possibile riprodurre la minuziosa complessità delle funzioni cellulari che sottendono a tali

reazioni biochimiche. Per questi motivi, molte speranze della medicina rigenerativa vengono riposte nel trapianto di tessuti o cellule [1,4,22].

Il *trapianto di tessuti* può essere di tre tipi [4]. Si parla di trapianto autologo quando il materiale da impiantare proviene dal paziente stesso; in questo caso, si devono tenere in considerazione la limitata disponibilità di tessuto e la possibile insorgenza di dolori cronici nelle regioni da cui si asporta il tessuto sano. Per allotrapianto, invece, si intende il prelievo di tessuto utile da organismi della medesima specie. Infine, lo xenotrapianto è caratterizzato da tessuti provenienti da specie animali diverse. In questi ultimi due casi è necessario fronteggiare fenomeni acuti di rigetto attraverso terapie farmacologiche a base di immunosoppressori e altri farmaci che, oltre a costare tanto, devono essere effettuate per lunghi periodi di tempo causando, a lungo andare, assuefazione, intolleranza o anche comparsa di neoplasie. Inoltre, in tutti i trapianti è assolutamente indispensabile controllare che il tessuto o il materiale di provenienza umana o animale utilizzato per l'innesto non sia veicolo di gravi infezioni virali come HIV e epatite [1,4,12,22].

La risposta a molti di questi problemi sembra poter venire dall'*ingegneria tissutale* (*tissue engineering*), un settore di ricerca sviluppatosi recentemente nell'ambito della medicina rigenerativa e della scienza dei biomateriali. Con metodi ingegneristici, l'ingegneria tissutale si propone di ricostruire in vitro tessuti da innestare nel paziente, ripristinando, così, le funzionalità compromesse senza dover ricorrere al trapianto di materiali biologici estranei al paziente stesso [1,4].

1.1.2 Introduzione all'ingegneria tissutale

L'ingegneria tissutale è stata definita nel 1998 come “*una tecnica interdisciplinare che applica i principi e i metodi dell'ingegneria e delle scienze biologiche con l'obiettivo di comprendere le relazioni fondamentali tra struttura e funzione nei tessuti sani e malati dei mammiferi e di sviluppare sostituti biologici in grado di ripristinare, mantenere o migliorarne le funzioni*” [1]. La rigenerazione dei tessuti in vitro si sta facendo strada all'interno dell'ambito della chirurgia ricostruttiva, con l'obiettivo di favorire o innescare una reazione di rigenerazione che non può avvenire spontaneamente in un organo o tessuto irreversibilmente danneggiato. L'ingegneria tissutale rappresenta un settore di importante e crescente interesse medico e industriale ed è caratterizzato da una grande interdisciplinarietà che prevede la collaborazione di diverse figure professionali: gli ambiti interessati sono le scienze di base, la scienza dei biomateriali, le biotecnologie, la bioingegneria, la medicina

rigenerativa e la biologia molecolare [1]. Tra le diverse discipline che formano le competenze dell'ingegneria tissutale, un'importanza rilevante assume la biologia cellulare; risulta, infatti, sempre più necessario studiare e comprendere nei dettagli i meccanismi che regolano la crescita, la proliferazione e la differenziazione delle cellule modalità attraverso le quali i componenti della matrice extracellulare interagiscono con le funzioni cellulari. Anche l'immunologia risulta rilevante per mettere a punto trapianti compatibili con l'organismo ricevente. Altri aspetti da considerare sono la provenienza e la conservazione delle cellule: ad oggi si assiste a un continuo progresso nella creazione di banche di cellule di tessuti diversi, nelle tecniche di sterilizzazione e di criopreservazione [1,4,23]. La tecnologia si interessa anche di mettere a punto sistemi per la *coltivazione in vitro* su larga scala di cellule, con particolare attenzione alla messa a punto di nuovi *bioreattori* e al controllo dei fenomeni e delle condizioni operative che regolano il trasporto di nutrienti e di prodotti di scarto. La coltivazione in vitro si pone, quindi, l'obiettivo di risolvere la carenza di tessuti e organi per il trapianto e, al tempo stesso, il problema del rigetto, dal momento che le cellule provengono dallo stesso paziente che riceverà il tessuto rigenerato. Ciò incide notevolmente sulla qualità della vita, poiché il processo rigenerativo iniziato in vitro è continuato in maniera più efficiente ed efficace anche in vivo [1,4,6,12,14,18,22].

Lo studio dei materiali utilizzati nell'ingegneria tissutale rappresenta un ulteriore importante settore di ricerca. I materiali naturali hanno il vantaggio di presentare particolari sequenze segnale che favoriscono l'adesione delle cellule mantenendone le funzioni. I materiali di sintesi, invece, hanno il pregio di essere riproducibili, essendo possibile la regolazione delle loro proprietà in fase di produzione [1,11,20]. Non mancano i problemi, primo tra tutti quello del rigetto conseguente all'interazione con l'organismo del ricevente [1].

1.1.3 Applicazioni dell'ingegneria tissutale alla cartilagine

Le tecniche di ingegneria tissutale si stanno rapidamente sviluppando verso la progettazione e produzione di qualsiasi tessuto umano. Sono, infatti, in via di sperimentazione e in piena ricerca avanzata progetti e protocolli per l'ottenimento di pelle, cartilagine, ossa, muscoli, tessuto nervoso, cornea, fegato, pancreas, vasi sanguigni, ureteri, vescica e altri tessuti [1,4].

Un settore particolare dell'ingegneria tissutale interessa la riparazione, sostituzione o rigenerazione del tessuto cartilagineo. In particolare, si punta alla costruzione di protesi per la

sostituzione della cartilagine danneggiata. Le metodologie in uso sono orientate all'espianto di cartilagine sana dal paziente, con conseguente modellazione e impianto autologo nella zona lesionata. I limiti di questo metodo, come già accennato riguardo al trapianto autologo in generale, sono rappresentati dalla scarsa disponibilità di tessuto autologo sano e, in particolare in questo caso, alla difficoltà di modellare tale tessuto nella forma adatta al reimpianto. In alternativa, è stato provato anche l'impianto di protesi di materiale metallico o polimerico con scarso successo, dati i limiti che questi materiali hanno nell'interazione con l'organismo, in particolare riguardo all'impossibilità di adattarsi alle risposte agli stimoli provenienti dall'ambiente in maniera uguale alla cartilagine naturale [4,9,11,22].

Per questi motivi, l'ingegneria tissutale della cartilagine sta orientando esperimenti e studi soprattutto verso la produzione di nuova cartilagine mediante l'utilizzo di supporti porosi (scaffolds) sui quali coltivare cellule cartilaginee. Il punto critico di questo approccio ha a che fare con la necessità di conferire al neo-tessuto le proprietà fisiche e le funzioni meccaniche desiderate. Si parla di *neomorfogenesi* in riferimento al processo che porta alla formazione di nuovo tessuto in vitro [4]. Le principali strategie sviluppate per la creazione di nuovo tessuto sono sostanzialmente tre; esse prevedono l'impiego di sostanze capaci di indurre la formazione di nuovo tessuto, l'utilizzo di cellule isolate (in particolare cellule staminali) e l'uso di cellule seminate su matrici (scaffolds) o inglobate all'interno di esse [4].

1.2 LIMITI DELL'INGEGNERIA DEI TESSUTI

Le potenzialità precedentemente evidenziate, studiate e sperimentate con particolare entusiasmo a partire dagli anni '80 con nuove tecniche di ricostruzione e rigenerazione in vitro e in vivo, si sono scontrate e si scontrano tuttora con importanti fattori limitanti.

La *vascolarizzazione* rappresenta un delicato problema da risolvere. Infatti, la funzionalità di cellule e tessuti dipende in maniera fondamentale dalla possibilità di essere adeguatamente ossigenati e di poter espellere e allontanare i prodotti di rifiuto risultanti dalla normale attività metabolica. Questa funzione deve essere garantita e controllata sia in fase di crescita e maturazione in vitro, sia durante l'impianto e la successiva interazione e integrazione con l'organismo [1,4,12]. Le difficoltà insorgono non tanto nelle colture monostrato, quanto piuttosto nella coltivazione delle cellule in sistemi tridimensionali di particolare struttura geometrica e nel momento dell'impianto in vivo [4,22]. Quindi i tessuti

costituiti da aggregati cellulari di dimensioni consistenti non possono essere impiantati se non si predispone di una sede opportunamente vascolarizzata oppure della possibilità di formare nuovi vasi. Un discorso un po' diverso va dedicato all'impianto di tessuti prossimi alla parete vascolare per i quali il contatto con il sangue garantisce una adeguata ossigenazione, ma può causare problemi di deposito e formazione di trombi. A riguardo, si stanno cercando di utilizzare superfici a contatto con il sangue rivestite da cellule endoteliali del paziente, anche se le difficoltà insorgono nella loro reperibilità e resistenza meccanica al flusso sanguigno [4].

In relazione a quanto appena esposto, la struttura dei tessuti biologici a livello microscopico è molto differenziata proprio in funzione della necessità di garantire il trasporto di sostanze, un'adeguata disposizione delle cellule e una risposta funzionale alla sollecitazione meccanica a cui sono sottoposte [4,12,22]. Questa *specificità strutturale* rende difficile la riproduzione in laboratorio di tessuti biologici anche semplici. Si cerca, quindi, di garantire il più possibile un adeguato supporto meccanico mediante l'utilizzo di scaffolds microstrutturati e di orientare la crescita e la differenziazione cellulare mediante fattori di crescita e opportuni stimoli forniti dall'ambiente di coltura [4,11,14].

Un altro aspetto fondamentale dell'ingegneria tissutale concerne proprio la *differenziazione cellulare*. L'ottenimento di nuovo tessuto prevede, infatti, la differenziazione delle cellule durante la loro maturazione ed espansione in vitro su appositi scaffolds [4]. Si è accennato al fatto che ci sono sostanzialmente due possibilità a riguardo [4,9,20]. La prima prevede la formazione di neo-tessuto a partire da cellule differenziate del paziente; in questo caso le cellule proliferano in vitro andando incontro a un processo iniziale di de-differenziazione a seconda delle condizioni fisico-chimiche che si sperimentano. La seconda possibilità riguarda l'utilizzo di cellule staminali indifferenziate e comporta la conoscenza adeguata e approfondita dei fattori in grado di indurre il differenziamento delle cellule utilizzate. Il percorso di ricerca è ad oggi ancora lungo e ostacolato, in parte, da problemi di natura etico-religiosa [4].

Le colture cellulari sono fortemente dipendenti dai fattori di crescita che ne inducono il differenziamento e la proliferazione; i *fattori di crescita* sono normalmente presenti nel siero fetale utilizzato in laboratorio [1,4]. Anche se la loro composizione è per la maggior parte nota, è difficile realizzare o creare in maniera artificiale una simile composizione di proteine e si deve ricorrere all'utilizzo di siero di origine animale [22]. Anche se il materiale è di origine controllata, il suo impiego in sistemi di coltura potrebbe indurre reazioni autoimmuni o introdurre agenti patogeni o trasmettere malattie. Le normative attualmente in

vigore non consentono l'impiego di prodotti di origine animale per la coltura in vitro di tessuti umani. Per questi motivi la ricerca è indirizzata a soluzioni alternative che coinvolgono la tecnica del DNA ricombinante per produrre fattori di crescita o l'utilizzo di siero umano del paziente stesso [4].

Tra le difficoltà che si incontrano nell'utilizzo clinico di tessuti sostitutivi ingegnerizzati c'è la *risposta dell'organismo* al materiale impiantato. Le reazioni dell'organismo all'impianto di cellule e tessuti è fondamentale per l'integrazione funzionale del neo tessuto e influenza la durata del mantenimento delle proprietà fisico-chimiche e meccaniche dello stesso, evitandone deterioramento, danneggiamento e conseguente perdita della originaria funzionalità. È necessaria una risposta o reazione da parte dell'organismo, poiché se il materiale fosse accettato dall'organismo in maniera passiva non sarebbe possibile ottenere l'interazione funzionale per la quale il tessuto è stato programmato, coltivato e impiantato. La scelta di utilizzare cellule autologhe per ingegnerizzare tessuti destinati ad uso clinico garantisce una completa accettabilità delle componenti cellulari da parte del sistema immunitario del paziente, ma non garantisce una corretta attrazione cellulare e produzione di matrice extracellulare; quanto appena detto è confermato dalla possibile, e non rara, formazione indesiderata di tessuto fibrotico attorno agli impianti. La ricerca si apre, nel tentativo di risolvere anche questo problema, alla coltivazione e differenziazione di cellule staminali adulte. In Italia non è possibile ottenere cellule staminali da embrioni umani per i problemi di natura etico-religiosa di cui si è fatto cenno in precedenza [4,9,11,14,22].

CAP. 2 IL TESSUTO CARTILAGINEO

2.1 ANATOMIA DEL TESSUTO CARTILAGINEO

2.1.1 Generalità sul tessuto cartilagineo e istogenesi

La cartilagine è una forma specializzata di tessuto connettivo caratterizzata da un'abbondante matrice extracellulare nella quale, racchiusi all'interno di lacune o cavità, si trovano i *condrociti*. La matrice amorfa della cartilagine, diversamente dal comune tessuto connettivo, è solida; il suo contenuto in collagene, quello in proteoglicani e altre proteine, come ad esempio le glicoproteine, è variabile a seconda del tipo di cartilagine. Il tessuto cartilagineo appartiene ai tessuti connettivi di sostegno o scheletrici ed è, per questo, dotato di particolari proprietà meccaniche e funzionali: elevata resistenza alla tensione e alla pressione ed elasticità (**Figura 1**) [22].

A differenza del connettivo propriamente detto, la cartilagine non contiene né vasi né nervi, cosicché il nutrimento raggiunge i condrociti situati nelle lacune grazie alla permeabilità della sostanza extracellulare [4,9,12,18,22]. Tranne che nelle superfici articolari, la cartilagine è rivestita da uno strato di tessuto connettivo fibroso compatto ricco di vasi chiamato *pericondrio*, che provvede a conferire maggiore resistenza al pezzo cartilagineo e a nutrire per diffusione la cartilagine stessa, di per sé non vascolarizzata [2,3,22].

Nella vita fetale il tessuto cartilagineo forma la quasi totalità dello scheletro e viene successivamente sostituito da tessuto osseo, tranne che in corrispondenza delle articolazioni e poche altre regioni. Uno strato cartilagineo, detto disco epifisario, localizzato al confine tra

epifisi e diafisi delle ossa lunghe degli arti, permane durante tutto il corso dell'accrescimento corporeo consentendo l'allungamento dell'osso. Con la scomparsa della cartilagine da queste sedi termina anche lo sviluppo scheletrico dell'organismo, ma nell'adulto la cartilagine continua a svolgere un importante ruolo di sostegno, localizzandosi nelle superfici articolari, nella porzione cartilaginea delle coste e formando un sostegno nella parte esterna dell'orecchio, nel naso, nella laringe, nella trachea e nei bronchi [2,3].

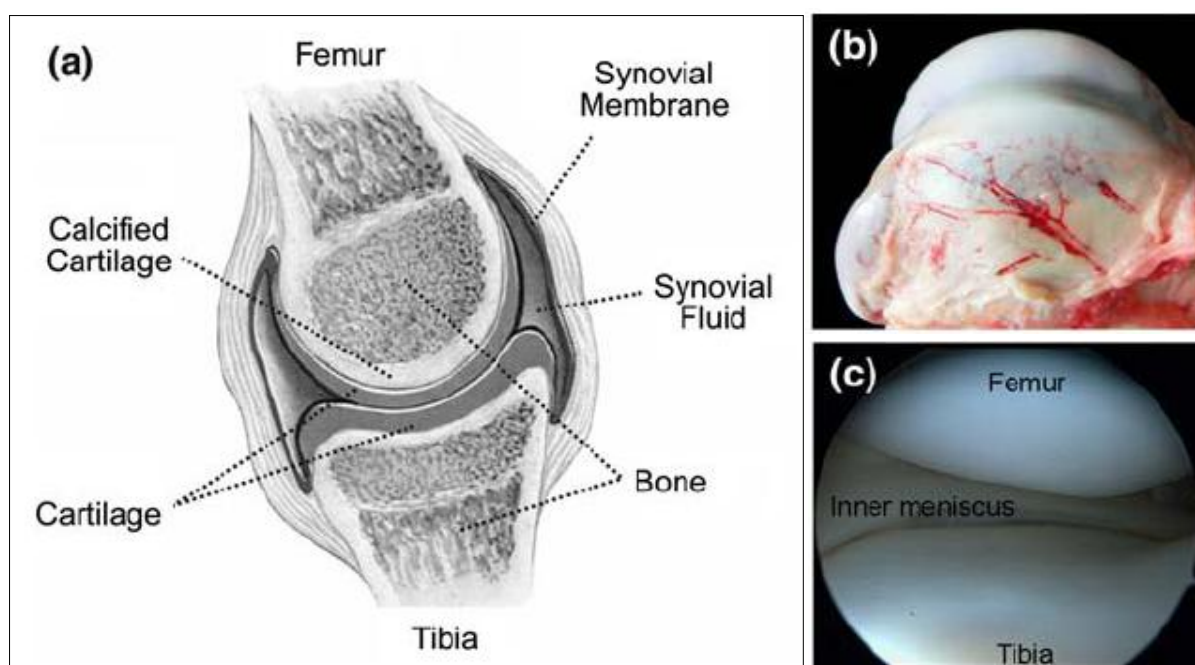


Figura 1 (a) Profilo dell'articolazione del ginocchio, (b) visione laterale della giunzione femorale di un'articolazione scoperta, (c) visione artroscopica di un'articolazione umana di ginocchio sano [22].

Si consideri, nel dettaglio, l'*istogenesi* della cartilagine e la struttura che ne deriva. La cartilagine si forma nell'embrione quando gruppi di cellule mesenchimali o stromali (cellule staminali adulte pluripotenti del midollo osseo capaci di generare condrociti) perdono la loro forma allungata e si trasformano in *condroblasti*, cellule rotondeggianti dotate di elevata attività metabolica appartenenti alla classe dei fibroblasti. I condroblasti si replicano e, nello stesso tempo, iniziano a secernere matrice extracellulare. Grazie al ciclo continuo di produzione e accumulo della matrice, le cellule tendono a distanziarsi le une dalle altre per interposizione di nuovo materiale. La matrice tende a solidificare progressivamente e, di conseguenza, i condroblasti rimangono imprigionati all'interno di lacune scavate nella sostanza da loro stessi prodotta. Avendo compiuto la loro funzione, i condroblasti si trasformano in condrociti, cellule quiescenti di minore volume. Spesso, tuttavia, queste cellule

vanno incontro a divisione anche quando la matrice è già solida al punto di impedire un ulteriore distanziamento tra le cellule figlie. Ciò spiega la presenza di gruppi di condrociti, detti *gruppi isogeni* perché derivati dalla stessa cellula, accolti nella medesima lacuna nella cartilagine dell'individuo adulto. In mancanza di vascolarizzazione, i condrociti isolati nelle lacune scambiano gas e nutrienti necessari a sostenere il loro ridotto metabolismo attraverso la matrice in maniera diretta, per diffusione attraverso le fitte maglie fibrose della sostanza stessa. Questo processo di istogenesi della cartilagine è definito *accrescimento interstiziale* (processo endogeno) ed è integrato da un secondo meccanismo detto *accrescimento per apposizione* (processo esogeno). Uno strato di tessuto mesenchimale circostante i nuclei di accrescimento interstiziale appena descritti si differenzia nel già citato pericondrio, formato da fibroblasti immersi in un'abbondante quantità di fibre di collagene e da un certo numero di cellule indifferenziate, alcune delle quali si trasformano a loro volta in condroblasti che appongono nuovo tessuto cartilagineo intorno al centro di accrescimento [3].

2.1.2 Tipi di cartilagine

Dal punto di vista istologico, la cartilagine è distinguibile in tre tipi fondamentali che differiscono sia per la quantità di fibre nella sostanza amorfa che per il tipo di fibre in essa contenute. Questi tipi (cartilagine ialina, cartilagine elastica e cartilagine fibrosa) sono anche distribuiti diversamente nell'organismo, in base alle proprietà meccaniche che derivano dalla loro struttura e composizione biochimica [1,2,3,4,22].

La *cartilagine ialina* è il tipo più diffuso di cartilagine. Nell'adulto costituisce la cartilagine di rivestimento delle *superfici articolari*, le cartilagini costali, gli anelli tracheali, la maggioranza delle cartilagini laringee, le cartilagini bronchiali e le cartilagini del naso. Ha l'aspetto di una massa traslucida e opalescente di colore bianco-bluastrò. La matrice extracellulare della cartilagine ialina è un gel compatto e omogeneo, con una componente fibrosa costituita da collagene di tipo II [1,4,22]. La sostanza amorfa è caratterizzata dalla presenza di grandi complessi molecolari formati da proteoglicani aggregati a lunghe catene di acido ialuronico (un glicosamminoglicano che conferisce resistenza ed elasticità al tessuto) [3]. Mentre la componente fibrosa è responsabile della elevata resistenza alla trazione, la sostanza amorfa conferisce alla cartilagine una grande resistenza alla compressione e forma superfici perfettamente lisce e privi di attriti, proprietà essenziali, ad esempio, per il normale scivolamento reciproco delle superfici articolari [1]. Per la cartilagine articolare è riservata

una descrizione più approfondita, in relazione alla particolarità strutturale e funzionale di questo tipo di cartilagine e ai problemi di rigenerazione e danneggiamento dai quali essa è colpita.

La *cartilagine elastica* è un tessuto di aspetto giallognolo e opaco, dotato di numerose fibre elastiche disperse nella matrice. Essa è in grado di fornire un sostegno rigido e, allo stesso tempo, molto flessibile grazie alla proprietà delle fibre di elastina (proteina fibrosa che, assieme al collagene, compone la ECM) di tornare alla forma originaria dopo essere state stirate. Il collagene della componente fibrosa è di tipo II e i condrociti sono identici a quelli della cartilagine ialina, ma la sostanza extracellulare, rispetto a quest'ultima, è meno abbondante e contiene una porzione significativa di fibre di elastina, che decorrono in tutte le direzioni formando una rete molto compatta, e un minor contenuto di proteoglicani. Alla periferia le fibre sono meno fitte e continuano nel pericondrio. La cartilagine elastica nell'uomo costituisce il sostegno dell'orecchio esterno ed è presente anche nella laringe e nell'epiglottide [1,2,3,4,22]. Essa è meno vulnerabile a cambiamenti di tipo degenerativo rispetto agli altri tipi di cartilagine [22].

Nella *cartilagine fibrosa* la componente di collagene è preponderante rispetto alla matrice amorfa. Questa cartilagine è in effetti piuttosto simile al tessuto connettivo denso e i due tessuti spesso continuano l'uno nell'altro senza una chiara demarcazione [1]. La cartilagine fibrosa è caratterizzata dalla presenza di grossi fasci fibrosi immersi in una scarsa matrice cartilaginea con piccole quantità di proteoglicani. È costituita da collagene di tipo I che forma fasci sottili e risulta poco comprimibile e molto dura, resistendo a forze di pressione e tensione anche elevate [3,22]. La ECM della fibrocartilagine consiste approssimativamente per il 60-70% di collagene, per l'8-9% di altre proteine che non siano collagene e per circa l'1% di proteoglicani, considerando tali percentuali in relazione al peso secco [22]. Questo tipo di cartilagine è presente in zone soggette a notevoli pressioni quali, ad esempio, i dischi intervertebrali, i menischi, la mandibola, le zone di collegamento tra ossa e tendini, il legamento rotondo del femore, la sinfisi pubica [1,3].

2.2 LA CARTILAGINE ARTICOLARE

2.2.1 Generalità sulle articolazioni

Le articolazioni sono dispositivi anatomici giunzionali che uniscono le ossa a formare lo scheletro. Non necessariamente le articolazioni consentono movimento: alcune di esse rappresentano semplicemente mezzi di saldatura tra ossa vicine [2]. Le articolazioni possono essere classificate sulla base della loro architettura (strettamente collegata alle loro caratteristiche funzionali) in due grandi categorie: sinartrosi e diartrosi [2,3].

Le *sinartrosi* sono articolazioni *per continuità*, nelle quali due elementi ossei sono saldati tra loro per mezzo di tessuto connettivo interposto, in base al quale vengono a loro volta classificate. In questi tipi di articolazioni è totalmente impedito lo scorrimento reciproco dei due elementi ossei.

Le *diartrosi* sono, invece, articolazioni *per contiguità* e sono caratterizzate dalla discontinuità dei due elementi ossei, che sono in rapporto di stretta vicinanza senza che vi sia un tessuto interposto tra essi. Le due ossa, nei loro punti di contatto (capi articolari), possono scivolare l'una sull'altra. La presenza di mezzi di fissità (capsula articolare, legamenti) mantiene comunque il rapporto tra i capi articolari, impedendone l'allontanamento. I capi articolari delle diartrosi presentano superfici articolari rivestite da cartilagine ialina che, per questo, prende il nome di *cartilagine articolare*. Le superfici articolari sono lisce favorendo il movimento reciproco tra capi articolari. La capsula articolare è un manicotto fibroso che avvolge i due capi articolari inserendosi ai limiti delle superfici articolari delle ossa contrapposte chiudendo la cavità articolare. Internamente la capsula presenta una membrana di natura connettiva deputata alla produzione di liquido sinoviale che occupa il limitato spazio della cavità articolare garantendo una funzione di lubrificazione e una funzione trofica e nutritizia nei confronti della cartilagine articolare. Il liquido sinoviale ha un volume di 0,10-3,5 ml variabile a seconda dell'ampiezza della cavità articolare; ha pH di 7,2-8,4 e contiene acido ialuronico; tale liquido si distende a formare un velo sottile sulle superfici cartilaginee. Talvolta, inoltre, le superfici articolari non concordano; in tal caso, la concordanza è assicurata da formazioni fibrocartilaginee (dischi articolari e menischi articolari) [2,3].

Per completare questa visione d'insieme sulle articolazioni, la capsula articolare è rinforzata da legamenti articolari, fibrosi o fibroelastici, che possono aderire o essere incorporati direttamente nella capsula oppure passare anche a notevole distanza dall'articolazione [3].

2.2.2 Struttura, composizione e proprietà della cartilagine articolare

La cartilagine articolare, di spessore variabile tra 1 e 7 mm, rappresenta il tessuto che, tra tutti i tessuti del corpo umano, ha la più bassa densità volumetrica cellulare; infatti i condrociti, unico tipo cellulare presente, contribuiscono solo per poco più dell'1% al volume tissutale. Il rimanente 99% è costituito da una complessa ECM (**Figura 2**) [4,22].

I condrociti influenzano la struttura e la composizione della matrice extracellulare sintetizzandone i componenti necessari. Uno sviluppato complesso di Golgi e un esteso reticolo endoplasmatico rugoso permettono l'attività di sintesi. Le peculiari proprietà viscoelastiche della cartilagine articolare sono una conseguenza dell'architettura nanometrica molecolare e dell'organizzazione in aree specifiche dei componenti del tessuto, sintetizzati dai condrociti cartilaginei [12,22].

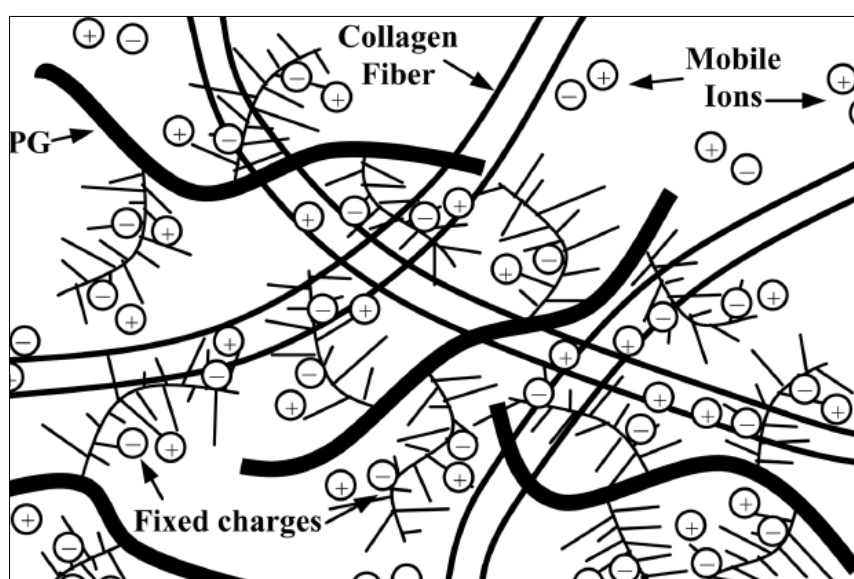


Figura 2 Disegno dell'organizzazione della ECM della cartilagine articolare [12].

La matrice extracellulare della cartilagine articolare consiste, per circa il 60-85% del peso totale, di acqua ed elettroliti disciolti. La complessa reticolazione solida è, invece, composta di collagene (10-30%), proteoglicani (3-10%) e altre proteine e glicoproteine. Nella matrice extracellulare che circonda i condrociti si possono distinguere tre differenti regioni classificate in accordo con la composizione biochimica, con la funzionalità e l'aspetto che presentano; dalla superficie delle cellule, in ordine, si trovano la matrice pericellulare, poi quella territoriale e, infine, la matrice interterritoriale [22].

Finché la cartilagine è presente nelle giunture delle articolazioni deve resistere a stimoli importanti, primo fra tutti quello rappresentato dal carico corporeo, come nel caso significativo di anca e ginocchio. Queste richieste meccaniche implicano la presenza di un'alta organizzazione strutturale che si evidenzia nella differenziazione del tessuto in regioni diverse per composizione biochimica, struttura dei componenti della ECM e numero e forma dei condrociti immersi in quest'ultima. La cartilagine articolare si compone di quattro principali strati orizzontali o regioni distinte: la zona tangenziale superficiale, la zona media di transizione, la zona profonda e la zona calcificata (**Figura 3**). Le cellule cartilaginee, dalla zona superficiale a quelle via via più profonde, diminuiscono in numero e aumentano in dimensioni e attività metabolica. Il contenuto di collagene è maggiore verso la superficie, mentre il contenuto di proteoglicani si comporta in maniera opposta aumentando con la profondità. Assieme al collagene, anche l'acqua è maggiormente abbondante nella zona superficiale tangenziale. Queste variazioni all'interno della struttura e composizione del tessuto influenzano la eterogeneità delle proprietà di trasporto nella cartilagine articolare [12,22].

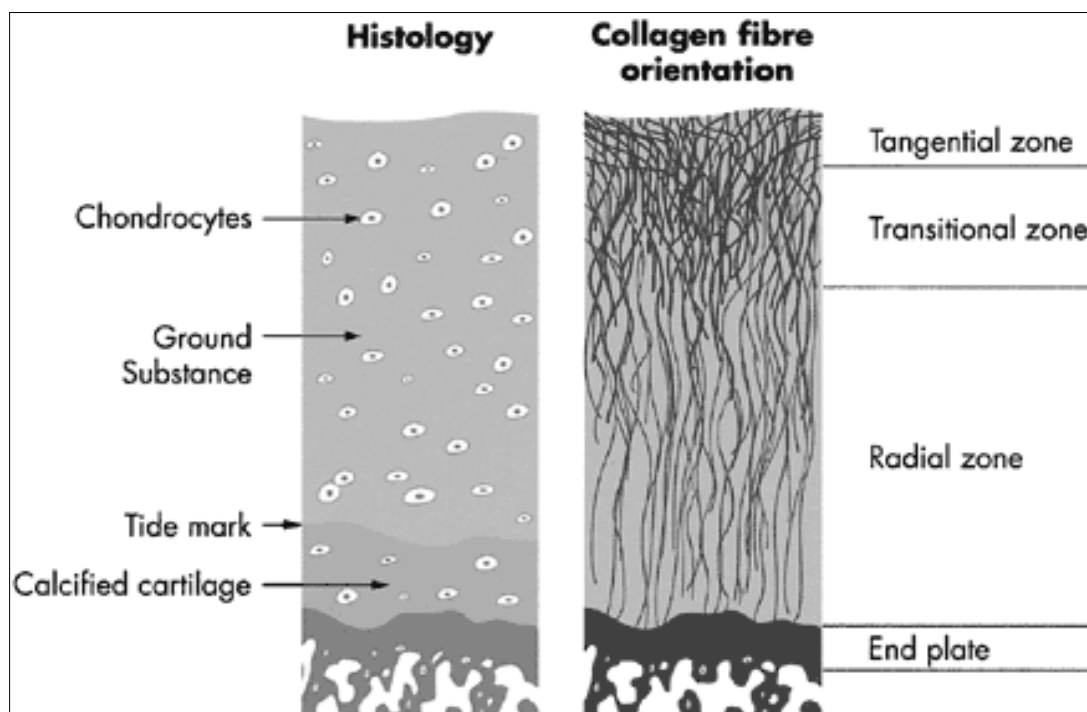


Figura 3 Schema della cartilagine articolare che ne evidenzia le zone distinte in base all'istologia del tessuto e in base alla disposizione e orientazione delle fibre di collagene [31].

Attualmente la superfamiglia del *collagene* contiene 27 tipi differenti. La cartilagine articolare contiene ben 7 tipi di collagene (II, III, VI, IX, XI, XII e XIV) dei quali il collagene II

rappresenta la quasi totalità [22]. È possibile notare un'evidente differenza tra le regioni cartilaginee anche in relazione all'orientazione delle fibre di collagene, oltre che alla loro quantità, all'interno del tessuto (vedi **Figura 3**). Le fibre di collagene superficiali hanno orientamento tangenziale, come le cellule; quelle profonde si impiantano radialmente sull'osso; le fibre intermedie si dispongono in grandi arcate convesse verso la cavità articolare. Tali arrangiamenti di traiettorie hanno un significato meccanico, in rapporto con l'intensità delle sollecitazioni gravitazionali e muscolari e delle forze tangenziali che operano nel movimento di scivolamento. La compressibilità cartilaginea sotto carico raggiunge il millimetro. Il ritorno è elastico, ma le compressioni molto durature e intense possono rappresentare una fonte di lesione per il tessuto [12,22].

La *carica elettrostatica* che presenta internamente la ECM deriva dai proteoglicani che compongono il tessuto e dagli ioni contenuti in essa. I proteoglicani consistono di un filamento di acido ialuronico (HA) al quale sono uniti non covalentemente dei nuclei proteici; su ciascun nucleo sono legati covalentemente dei glicosamminoglicani (GAGs), come cheratan-solfato o condroitin-solfato, in maniera da conferire ai proteoglicani una sorta di forma a spazzola (**Figura 4**) [12,22].

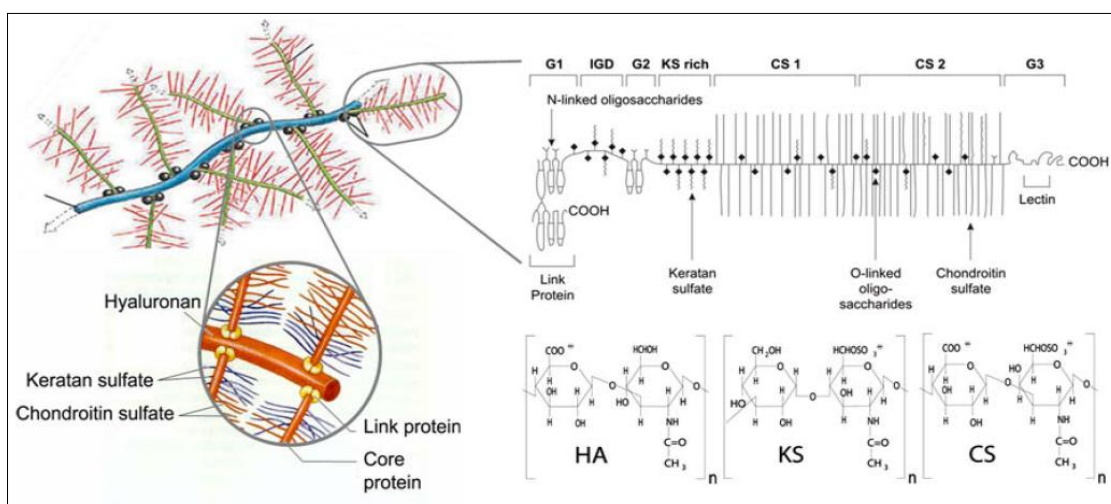


Figura 4 Disegno schematico e struttura chimica dei più rilevanti eteropolisaccaridi (GAGs e PGs) che compongono la ECM della cartilagine articolare [22].

Le catene di GAGs contengono gruppi carichi (SO₃⁻ e COO⁻) che sono considerati saldati alla ECM; così queste cariche sono pensate come cariche negative fisse e contribuiscono alla misura della densità di cariche fisse. Tali cariche attraggono ioni di segno opposto contenuti nella ECM, principalmente Na⁺, disciolti nell'acqua interstiziale, permettendo il mantenimento globale della neutralità elettrica. L'interazione elettrostatica tra le cariche fisse e gli ioni liberi

nel fluido interstiziale induce effetti di pressione osmotica legati al rigonfiamento della matrice per mezzo dell'acqua interstiziale [12].

Un'ulteriore importante caratteristica della cartilagine articolare, che ha una forte influenza sul suo comportamento biochimico e biomeccanico, è la completa *assenza di vasi sanguigni, nervi e cellule del sistema immunitario* (poiché non ci sono vasi linfatici) [1,2,3,4,9,12,17,22]. Di conseguenza, tutti i trasporti intra-tissutali sono più lenti poiché si basano su processi non vascolari. Poiché, inoltre, la cartilagine articolare manca completamente di pericondrio sulla superficie esposta verso la cavità, gli scambi nutritizi avvengono per diffusione e convezione interessando il liquido sinoviale che bagna le superfici, la zona d'attacco all'epifisi ossea e il circolo arterioso che raggiunge il perimetro della cartilagine. Il processo di diffusione può essere sufficiente per nutrire le zone più superficiali del tessuto, ma i processi convettivi e i movimenti delle articolazioni sono fondamentali e necessari affinché l'apporto di sostanze raggiunga anche i condrociti delle regioni tissutali più profonde. Infatti, la diffusione dei singoli elementi è facilitata dal movimento del fluido al suo interno, conseguente alle continue sollecitazioni di compressione cui è normalmente soggetta la cartilagine. I nutrienti e l'ossigeno devono percorrere considerevoli distanze dal sangue alla cartilagine ogni volta; considerando l'ulteriore limite imposto dallo scarso metabolismo cartilagineo, i fenomeni convettivi che si instaurano nel liquido sinoviale, causati dai movimenti naturali delle articolazioni, sono essenziali per rendere il tessuto cartilagineo metabolicamente attivo e funzionale [12,17,22].

Oltre a questo ruolo primario, il liquido sinoviale è importante per la capacità biomeccanica che possiede di distribuire i carichi sulla superficie articolare riducendo al minimo i fenomeni di attrito all'interno della giunzione [22].

La mancanza di pericondrio nella cartilagine articolare comporta una ridotta capacità di auto-rigenerazione, poiché la rigenerazione in seguito a danneggiamento tissutale è possibile solo attraverso il processo endogeno interstiziale, mentre la sostituzione di tessuto tramite apposizione esogena da parte di fibroblasti del pericondrio è assente [9,12,17,22,25]. In conclusione, considerando queste informazioni sulla cartilagine articolare, si può affermare che, a causa della limitata o quasi assente capacità di auto-riparazione o auto-rigenerazione e della spesso inadeguata rimozione dei prodotti di scarto o rifiuto, i danni che interessano la cartilagine articolare rappresentano uno dei maggiori problemi per la salute dell'uomo [4,22]. È qui che entra in gioco l'ingegneria tissutale, che cerca di proporre nuove soluzioni in

alternativa alle classiche tecniche chirurgiche che, in questo specifico campo, non hanno mai avuto un successo duraturo [9,18,22,25].

2.3 DANNEGGIAMENTO DELLA CARTILAGINE E INTERVENTI

In relazione a quanto descritto, è lecito focalizzare l'attenzione sulla cartilagine articolare, tra tutti i tipi di cartilagine, essendo essa soggetta all'incapacità di autorigenerarsi. Di conseguenza, i danni alla cartilagine articolare, rappresentati da traumi o naturali fenomeni degenerativi, portano alla progressiva perdita della funzione dell'articolazione e ad un suo danneggiamento non auto-reversibile.

Il termine “artrite” comprende tutto il gruppo di differenti disturbi della cartilagine articolare detti *disturbi progressivi naturali* caratterizzati da iniziale infiammazione e successivo dolore e gonfiore di una o più giunture articolari. Tra tutti i fenomeni patologici che hanno questa origine, l'artrite reumatoide e l'osteoartrite rappresentano sicuramente i due più problematici (**Figura 5**) [2,3,22,32].

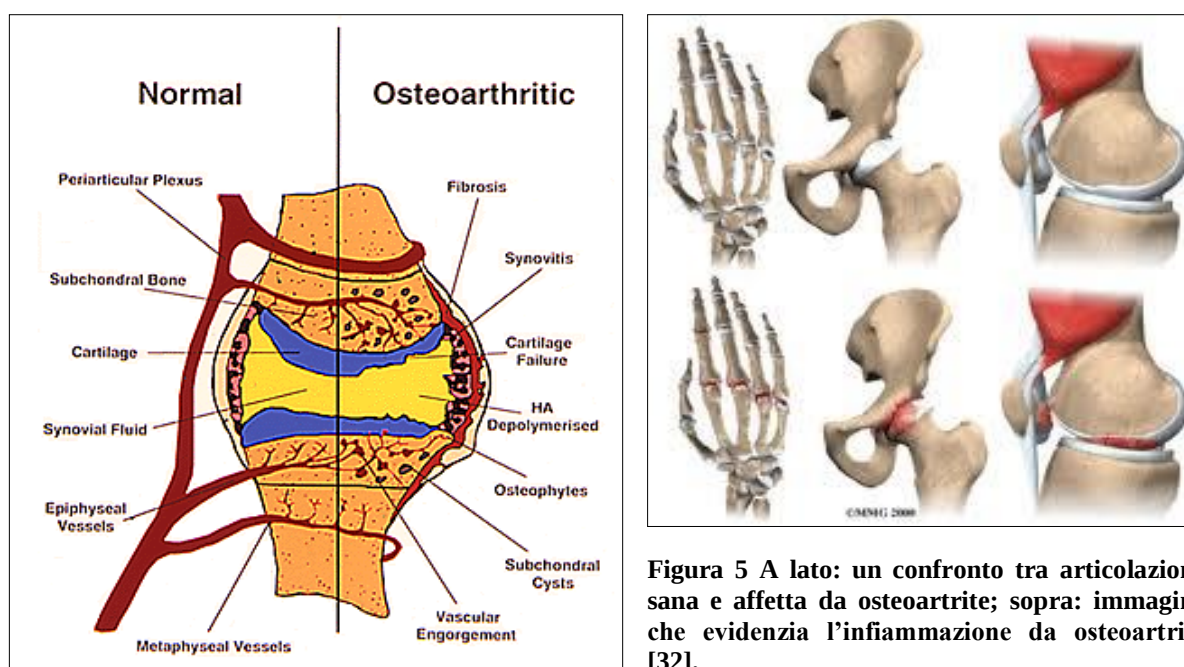


Figura 5 A lato: un confronto tra articolazione sana e affetta da osteoartrite; sopra: immagine che evidenzia l'infiammazione da osteoartrite [32].

L'osteoartrite, che comporta l'erosione delle superfici articolari delle articolazioni, attualmente colpisce più di 200 milioni di persone nel mondo [22]. La degenerazione della cartilagine articolare è caratterizzata da una diminuzione del contenuto di proteoglicani e, parallelamente, da un aumento di acqua. Ciò comporta notevoli cambiamenti all'interno del

tessuto, inclusi la riduzione della densità di cariche fisse e l'aumento della permeabilità del tessuto che causa una diminuzione della pressione all'interno del tessuto stesso. Come risultato, la cartilagine non è in grado di resistere a lungo a stimoli compressivi causando un danno dell'articolazione [9,12,22].

Per avere un'idea quantitativa del problema, più del 25% delle persone al di sopra dei 50 anni soffre di osteoartrite e più dell'80% di quelle al di sopra dei 65 anni è affetto da svariate forme di malattie degenerative delle articolazioni. Questi problemi comportano una diminuzione della qualità della vita e un aumento del costo della stessa per la cura e l'eventuale sostituzione delle componenti tissutali danneggiate. Si pensi che solo negli Stati Uniti annualmente si stimano più di 500.000 interventi alla cartilagine articolare, per un costo complessivo di centinaia di milioni di dollari [22].

Altre frequenti cause di danno al tessuto cartilagineo delle articolazioni sono costituite da traumi meccanici, microtraumi ripetuti e sovraccarichi della giunzione, cioè *fenomeni non naturali*. Queste condizioni, che colpiscono frequentemente pazienti in giovane età, possono causare danni localizzati fino a comportare anche un riassorbimento progressivo delle zone interessate o addirittura l'esposizione dell'osso sottostante con conseguente dolore e inabilità [12,22].

Una volta che la cartilagine articolare è danneggiata o degenerata, può esservi un meccanismo naturale di riparazione del tessuto. Nel caso di traumi o microtraumi che non penetrano in profondità, le cellule iniziano ad avanzare verso la necrosi per l'incapacità del tessuto di autorigenerarsi. In questi casi, la naturale evoluzione del disturbo non dà spazio a miglioramenti o recuperi funzionali. Oltre a questo limite rigenerativo, dovuto anche all'assenza del pericondrio, esiste un importante meccanismo che si esplicita quando i difetti si manifestano nella cartilagine profonda e raggiungono l'osso subcondrale. In questa situazione, il danno è riparato dai precursori delle cellule staminali di origine mesenchimale (pluripotenti o multipotenti) presenti nel midollo osseo; queste cellule invadono il sito da riparare, si differenziano in condrociti, ma rimpiazzano l'originaria cartilagine ialina articolare con tessuto fibrocartilagineo. Tale neo-tessuto, con minore contenuto di ECM rispetto alla componente ialina, manca delle proprietà fisiche e meccaniche della cartilagine articolare normale. Per questi motivi, sono necessari metodi artificiali e approcci tecnico-clinici per riparare o rigenerare la cartilagine articolare in seguito a deterioramento e alterazione del tessuto [22].

Diverse tecniche chirurgiche sono state proposte per cercare di alleviare o risolvere questo problema clinico.

La tecnica delle *microfratture* o perforazioni ossee mira alla formazione di tessuto riparativo fibrocartilagineo a livello della lesione inducendo la migrazione di cellule mesenchimali del midollo osseo che si differenziano in condrociti; sfrutta, cioè, nel caso di piccoli difetti del tessuto ($< 2 \text{ cm}^2$), il fenomeno naturale di riparazione appena descritto. Questa procedura, economicamente non onerosa e minimamente invasiva, è attualmente preferita ad altre tecniche nei pazienti con difetti cartilaginei non trattati precedentemente. Lo svantaggio, come già accennato, consiste nella rigenerazione di tessuto differente dall'originaria cartilagine ialina che caratterizza le articolazioni [4,9,12,22].

La tecnica di ricostruzione a mosaico, detta *mosaicoplastica*, consiste nel prelievo di tasselli di cartilagine sana dalle zone non sottoposte fisiologicamente a carico e nel loro innesto nel sito lesionato. In questo modo, i difetti sono compensati immediatamente da cartilagine ialina articolare. Nonostante ciò, la mosaicoplastica è piuttosto traumatica e nei siti di prelievo possono manifestarsi fenomeni artrosici patologici; inoltre, la rimarginazione dei tasselli innestati è piuttosto difficile e mai del tutto completa, comportando la presenza di superfici irregolari e discontinue. A proposito di questo, un'altra tecnica chirurgica chiamata *condroplastica per abrasione*, anche detta limatura, mira a ripristinare una superficie articolare liscia [9,22].

Nel 1994 è stata sviluppata da *Peterson* una nuova tecnica che si basa nel trapianto di cellule autologhe allo scopo di fornire al tessuto la componente cellulare di cui è difetto (ACT). La tecnica chirurgica consiste in due fasi: l'artroscopia diagnostica, con il prelievo tramite biopsia di cartilagine da zone periferiche della superficie condrale non sottoposte a carico, e l'artrotomia, un'incisione a livello dell'articolazione con successivo innesto dei condrociti coltivati (**Figura 6**) [31]. La sperimentazione clinica di questa tecnica chirurgica di prima generazione ha mostrato risultati soddisfacenti per il 90% dei pazienti trattati, a due anni dall'autotrapianto. Nella maggior parte dei casi è stata, inoltre, evidenziata la formazione di nuovo tessuto di tipo ialino con pochi casi di risultati di tipo fibroso. Questa procedura sperimentale presenta alcune problematiche rilevanti che ne impediscono il pieno successo; i tempi richiesti per la riformazione di tessuto e la successiva riabilitazione sono eccessivamente lunghi, se si considera che il paziente deve mantenere l'articolazione completamente immobile per svariati giorni per permettere l'attecchimento delle cellule, dato

che la difficoltà principale consiste nell'adesione della sospensione cellulare al sito di innesto [4,9,12,22].

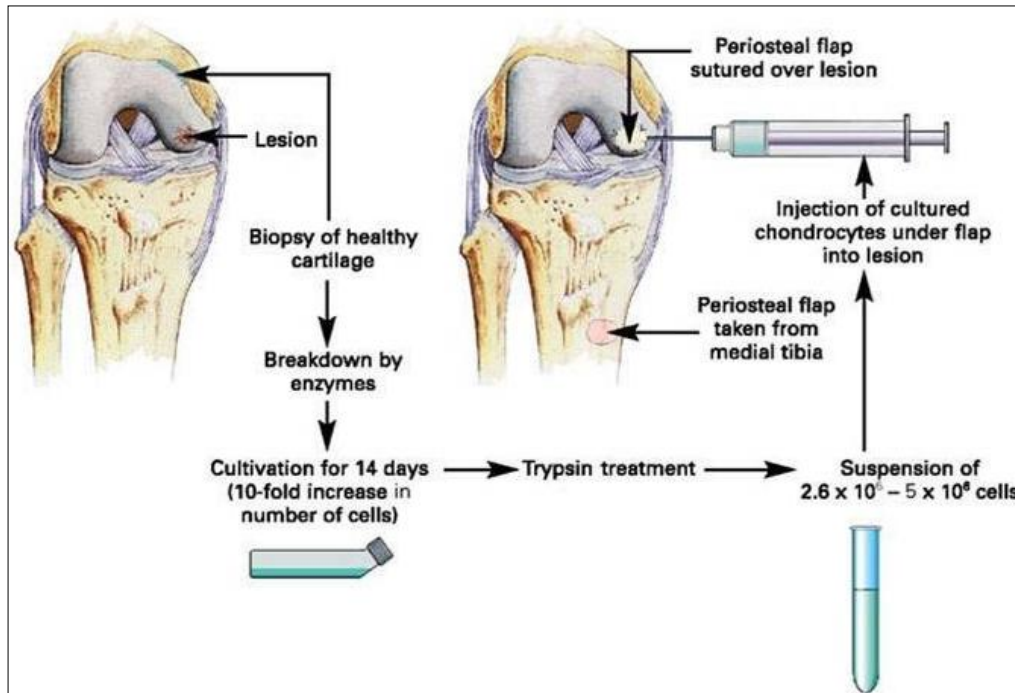


Figura 6 Tecnica di trapianto autologo di condrociti (ACT) introdotta da Peterson (1994) [31].

In tempi più recenti, l'approccio ingegneristico nei confronti della medicina rigenerativa ha contribuito fortemente all'apertura di nuovi sbocchi sperimentali di seconda generazione per il trattamento dei danni cartilaginei. Le *tecniche di ingegneria tissutale* consentono di produrre innesti artificiali biodegradabili cellularizzati in laboratorio, in grado di fornire un supporto meccanico, impedire la dispersione cellulare e diminuire il periodo di immobilità al quale il paziente deve sottostare. Attraverso la rigenerazione in vitro si punta al raggiungimento di due principali obiettivi: riempire il difetto con un tessuto parzialmente formato, istologicamente simile a quello naturale, in grado di rispondere a sollecitazioni meccaniche in tempi brevi e ottenere l'integrazione anatomo-funzionale del tessuto neo-formato con i tessuti circostanti (**Figura 7**). Queste tecniche si basano sull'espansione in vitro e sulla crescita di condrociti autologhi su supporti tridimensionali biodegradabili chiamati scaffolds che, svolgendo una primaria funzione di supporto, sono progressivamente sostituiti dalla ECM prodotta dalla componente cellulare [4,9,12,18,22,25,33]. Uno scaffold deve, inoltre, essere in grado di determinare la crescita cellulare e di garantire il trasporto di nutrienti e prodotti del metabolismo. Il materiale ideale per gli scaffolds non è ancora stato

identificato in assoluto, così come ci sono possibilità diverse che riguardano la scelta della sorgente cellulare da utilizzare, come sarà approfondito in seguito. Le fasi di semina e di crescita delle cellule rivestono molta importanza nel caso di supporti tridimensionali e, per garantire un'adeguata produzione di cartilagine ingegnerizzata, sono stati messi a punto *bioreattori* per la coltura dinamica dei condrociti, di cui si tratterà approfonditamente nei prossimi capitoli.

Un appunto doveroso, per ogni tessuto da ingegnerizzare in vitro, riguarda la necessità di considerare la situazione della cartilagine articolare in vivo e il suo comportamento dinamico, entrambi aspetti collegati alla sua struttura, composizione biochimica e comportamento meccanico; tutto questo è indispensabile per identificare i parametri e le condizioni di coltura da applicare e monitorare durante la stimolazione dei condrociti in un bioreattore [22].



Figura 7 Esempio di innesto artificiale ottenuto a partire da condrociti autologhi. (a) Frammentazione del sito cartilagineo danneggiato; (b) momento dell'attacco tramite fibrina (proteina responsabile della coagulazione del sangue); (c) fissazione della matrice cellularizzata nel sito danneggiato [22].

2.4 COMPORTAMENTO DELLA CARTILAGINE ARTICOLARE DA CONSIDERARE PER L'INGEGNERIZZAZIONE

2.4.1 Comportamento dinamico

La cartilagine articolare è interessata da diversi stimoli biomeccanici, come la compressione diretta, le forze di trazione e gli sforzi di taglio tangenziali, la generazione di pressione idrostatica, la comparsa di gradienti elettrici, le variazioni di pH. I processi dinamici che avvengono nella cartilagine sono necessari al mantenimento della sua struttura e della sua funzione e devono essere applicati in maniera equivalente in vitro per ottenere il tessuto

ingegnerizzato corrispondente. Per comprendere nel dettaglio questi differenti fenomeni e il loro effetto dinamico essi vengono trattati di seguito.

Per valutare e descrivere i processi che avvengono all'interno della cartilagine, questo tessuto può innanzitutto essere considerato come un *modello bifasico*. Una fase è rappresentata dalle componenti solide della matrice extracellulare che forma un materiale poroso e permeabile. La seconda fase è costituita dall'acqua interstiziale assieme agli ioni in essa disciolti. Questo modello è funzionale per la descrizione delle proprietà viscoelastiche della cartilagine; le dinamiche risultanti all'interno della cartilagine dipendono direttamente da queste proprietà oltre che dalle caratteristiche chimiche e strutturali delle sue singole componenti. Si ricordi che l'equilibrio interno del tessuto cartilagineo è raggiunto nel momento in cui si eguagliano la pressione di rigonfiamento, dovuta all'influsso di acqua richiamata dalle cariche fisse dei proteoglicani, e la forza compressiva che deriva dall'esterno e anche dalla rete di collagene presente nella ECM, la quale resiste alla tensione collegata al rigonfiamento del tessuto [22].

La *compressione* è considerata una delle più importanti forme di carico che agiscono in vivo nella cartilagine articolare e, per questo, è frequentemente applicata nelle sperimentazioni ingegneristiche. Appena dopo lo stimolo compressivo, si assiste a un aumento della pressione idrostatica interna nel tessuto. Infatti, le cariche negative della fase solida contribuiscono alla resistenza del tessuto allo scivolamento della fase fluida. Questo quasi inesistente movimento, unito all'impossibilità della soluzione acquosa di essere compressa, rappresenta la ragione per cui la pressione idrostatica aumenta considerevolmente in seguito all'applicazione di compressione diretta; ciò impedisce una deformazione troppo rapida e rovinosa del tessuto.

Considerando globalmente le componenti del tessuto cartilagineo, si afferma che la permeabilità è inversamente correlata alla densità di cariche fisse dei proteoglicani. Nonostante la bassa permeabilità idraulica, la fase fluida del tessuto fuoriesce se la compressione è mantenuta; a questo punto, più liquido esce più consistente è il carico che la rete di collagene è chiamata a sopportare. In dettaglio, è utile approfondire le ragioni per cui la deformazione, inizialmente considerevole, della fase solida è seguita da una successiva diminuzione, come accade in tutti i materiali viscoelastici. Per prima cosa si assiste a una variazione della porosità della matrice, la cui solida struttura è compressa lasciando intatti solo i pori più piccoli. In secondo luogo, con l'aumento della deformazione della fase solida la tensione nella struttura del collagene aumenta e dura finché le fibre di collagene sono

disposte parallelamente lungo l'asse di carico. Un aumento eccessivo della tensione che si viene a creare comporta un danneggiamento della rete di collagene. Quindi, l'abilità di resistere nel tempo alla tensione dovuta a compressione del tessuto dipende da concentrazione e orientazione delle fibre di collagene. In conclusione, la graduale deformazione della cartilagine che deriva dall'applicazione di stimoli compressivi è un meccanismo efficiente e naturale per proteggere le parti rigide della ECM da alti picchi di carico [7,14,22].

Numerosi esperimenti sono stati svolti applicando solo *pressione idrostatica*. La pressione idrostatica non danneggia il tessuto se è possibile uno scambio libero e diretto tra la fase liquida interna e il liquido acquoso circostante. Un graduale aumento della pressione idrostatica avanzerà, infatti, nella fase liquida fino a raggiungere lo stesso livello dell'esterno. In questo caso, quindi, forze uguali ed opposte agiscono da ogni parte della struttura di collagene e proteoglicani senza danneggiarla. La pressione idrostatica raggiunge la fase solida creando in essa una tensione simile a quella che viene trasmessa durante la compressione del tessuto. È molto interessante tener presente che sotto condizioni sia in vivo che in vitro la pressurizzazione del fluido interstiziale è collegata alla maggior parte dei carichi compressivi applicati e solo meno del 10% del carico va a comprimere direttamente la fase solida. Questo significa che è l'applicazione di pressione idrostatica, non la compressione diretta, a rappresentare il più importante e significativo stimolo che si manifesta nelle giunzioni articolari [9,22,26].

Lo *sforzo di taglio* è un altro stimolo al quale la cartilagine deve resistere nel momento in cui il liquido sinoviale è compresso lungo la superficie liscia del tessuto come conseguenza del movimento naturale della giunzione. La cartilagine risponde deformandosi, ma non cambia il proprio volume né si instaura un gradiente di pressione. Le zone superficiali del tessuto cartilagineo reagiscono flessibilmente; infatti i condrociti della zona superficiale reagiscono allo sforzo di taglio tangenziale e modificano la loro conformazione seguendo direzione e verso del vettore della forza. Questa regione è quella che maggiormente reagisce a questo tipo di stimolo e la resistenza del tessuto dipende proporzionalmente dalla concentrazione di collagene. Per poter sollecitare dinamicamente il tessuto attraverso questo tipo di stimolo è necessario quantificare lo sforzo di taglio. Semplificando il concetto, si può considerare il fatto che nel fluido sinoviale in moto laminare a regime lo scorrimento crea sforzi di taglio idrodinamico che tendono ad annullare il gradiente di velocità che si crea nel fluido durante il naturale movimento articolare (**Figura 8**) [4,12,22,26]. Gli sforzi di taglio si calcolano con la legge di Newton, che si esprime con l'equazione

$$\tau_{xy} = -\mu \frac{dv_x}{dy}$$

dove v_x è la velocità in direzione x e μ è la viscosità del fluido. Il liquido sinoviale a contatto con la cartilagine articolare è detto fluido newtoniano se la viscosità è indipendente dal gradiente di velocità [4].

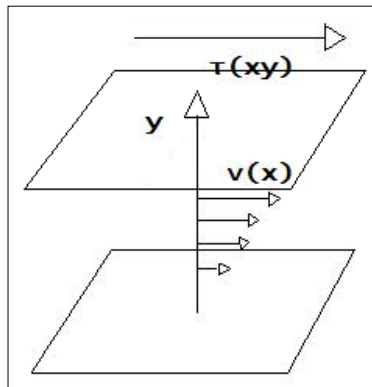


Figura 8 Sforzo di taglio generato dal moto di un fluido tra due lastre parallele [4].

I condrociti sono in grado di rispondere a *stimoli biomeccanici* convertendoli in segnali intracellulari. Questa capacità di trasdurre gli stimoli ha influenza sull'esocitosi, sulla trascrizione e altera l'attività delle pompe sodio-potassio. Non è una novità il fatto che stimoli biomeccanici influenzino l'attività delle cellule, ma in questo caso in particolare gli effetti del comportamento delle cellule della cartilagine sono essenziali per il mantenimento dell'intero tessuto [22].

I condrociti sono in grado di reagire anche a variazioni di corrente e ai risultanti campi elettrici. Un cambiamento artificialmente indotto del pH (legato agli ioni idrogeno presenti e quindi ad un'eventuale corrente elettrica interna) oppure la generazione di campi elettrici durante la coltivazione di condrociti comportano risposte simili a quelle osservate in seguito a stimoli meccanici usuali. Questo fatto evidenzia come ci sia una stretta correlazione e interazione tra i diversi fattori che influenzano lo stato del tessuto. Ad esempio, è noto che la pressione idrostatica sposta l'equilibrio del sistema tampone HCO_3/CO_2 con una conseguente variazione di pH. Inoltre, non si esclude l'esistenza di meccano-sensori cellulari, quali ad esempio proteine di superficie che agiscono legandosi direttamente alla ECM e assicurando così l'aderenza delle componenti extracellulari alle cellule stesse, il loro passaggio attraverso la membrana cellulare e l'inizio della trasduzione dei segnali intracellulari. In aggiunta, anche l'attività dei canali ionici trasduce segnali che sono ottenuti da sorgenti elettromeccaniche: tali

canali, infatti, reagiscono a stimoli meccanici e alla risultante variazione di potenziale di membrana. Infine, sembra possibile che la deformazione dei condrociti stessi, causata da compressione, possa partecipare al percorso trasduttivo di segnali elettromeccanici [12,22].

Importante per il comportamento dinamico della cartilagine articolare è l'influenza che su di esso ha la *composizione biochimica* del tessuto. Numerose osservazioni cliniche hanno dimostrato che una naturale e passiva condizione di carico applicata alla cartilagine delle articolazioni è necessaria per evitare la degenerazione del tessuto. Il problema riguarda la difficoltà di descrivere in maniera dettagliata le relazioni causali tra il tipo di stimolazione meccanica e il cambiamento della struttura e della concentrazione della ECM, nonché le risultanti proprietà meccaniche del tessuto. Inoltre risulta assai complicato giungere ad affermazioni generali a riguardo poiché le differenze più significative emergono quando si comparano cartilagini di varie specie, età o articolazioni diverse [12,18,26]. Approfondendo l'argomento, sembra che esistano differenti sistemi regolatori in grado di influenzare il metabolismo del collagene e dei GAGs in dipendenza alle stimolazioni meccaniche che interessano il tessuto. In relazione alla presenza di collagene all'interno della cartilagine articolare o dei suoi sostituti, è lecito affermare che lo sforzo di taglio o l'applicazione di elevata pressione idrostatica comportano un aumento di sintesi di questa proteina fibrosa, mentre un carico statico, un'eccessiva trazione o la mancanza di sforzo di taglio determinano una diminuzione preoccupante di sintesi di collagene. Infatti, la concentrazione di fibre di collagene, assieme alla loro organizzazione e orientazione, influenza il comportamento meccanico del campione in esame. Anche per quanto riguarda i proteoglicani è difficile ottenere teorie generali su come la loro composizione biochimica possa essere influenzata; questo perché la funzionalità del tessuto dipende non solo dalla loro concentrazione, ma anche dalla loro dimensione e dalla forma e struttura dei collegamenti interni che li caratterizzano, tutte condizioni che possono essere variate dinamicamente durante la coltura cellulare. Per ultimi, i glicosamminoglicani possono aumentare il loro contenuto in seguito a trazione o sforzi di taglio, elevata pressione idrostatica e compressione diretta (se applicata a intermittenza ad alta frequenza). Se, al contrario, sono trasmesse compressione statica o leggera pressione idrostatica, la concentrazione di GAGs diminuisce. Se si considera la componente cellulare del tessuto, si è determinato che la proliferazione dei condrociti è stimolata da sforzi di taglio e perfusione, probabilmente perché sono questi gli stimoli che più permettono alle cellule cartilaginee di rifornirsi di ossigeno e nutrienti. Si ricordi, a proposito,

che per tutti i tipi di cellule, in generale, una differenziazione migliore e più efficace è raggiunta se la densità cellulare iniziale è elevata [12,22].

2.4.2 Condizioni in vivo

L'idea che sottende al progetto di un bioreattore è quella di creare un sistema ben definito che sia in grado di regolare precise condizioni di coltura. Se si pensa di coltivare un certo tessuto, il sistema che caratterizza il bioreattore deve poter riprodurre fedelmente le condizioni che si manifestano in vivo nel tessuto stesso. Affinché la cartilagine, in questo caso quella articolare, venga riprodotta in precise situazioni metaboliche, meccaniche e fisiologiche, è necessario progettare con estrema cura il bioreattore adatto.

In condizioni fisiologiche *forze di carico* considerevoli sono applicate ai sottili strati di cartilagine articolare che rivestono le giunture. Queste forze sono il risultato del normale movimento dell'articolazione, in relazione al quale il peso corporeo rappresenta il maggior carico da sopportare [2,3]. In passato sono stati proposti dei modelli matematici per descrivere questi carichi generati all'interno delle giunture articolari; l'idea alla base di questi modelli è quella per cui strati cartilaginei omogenei aderiscono e si inseriscono perfettamente l'uno rispetto all'altro. Gli stimoli meccanici, invece, sono rappresentati da un'onda sinusoidale nel tempo [7]. In seguito a evidenze sperimentali risultanti da autopsie o da analisi di protesi di ginocchio e di anca espantate, si può affermare che la pressione conseguente all'applicazione di carico sulle articolazioni non si distribuisce uniformemente sulla superficie della cartilagine e forma curve isobare irregolari. Per quanto riguarda, ad esempio, la cartilagine articolare di anca e ginocchio durante una normale serie di passi, si assiste a un carico medio di 0,5-7,7 MPa, che corrisponde poi ad una compressione massima di circa il 13% del tessuto; invece, se lo stimolo è collegato ad attività più intense e cicliche, nelle quali l'individuo flette gli arti o sale le scale, i picchi misurati di carico possono raggiungere pressioni di 18 MPa. Anche a riposo i muscoli e i tendini che sostengono e circondano le articolazioni partecipano alla generazione di deboli stimoli.

Non solo la distribuzione locale della pressione, ma anche la variazione della stessa nel tempo è importante e complessa [22]. In molti esperimenti sono state utilizzate tecniche con elevata risoluzione temporale per caratterizzare l'andamento della pressione nel tempo. Si sono misurati incrementi fino a 6,5 MPa in soli 0,2 secondi [22]. Come detto precedentemente, sono diversi i tipi di forze che interessano la cartilagine durante il movimento. Un numero

considerevole di studi ha quantificato il contatto di carico diretto e la pressione idrostatica, in quanto è la generazione di questa a indurre il maggior effetto tra tutti gli altri tipi di carico. Misurazioni di questo tipo sono collegate agli esempi sopra riportati. Solo pochi studi sono stati, invece, portati avanti con lo scopo di quantificare altre forme di stimolazione. In uno di questi casi è stato quantificato lo sforzo di taglio durante il movimento dell'articolazione ottenendo un modulo di 2,6 MPa. Di conseguenza, la variazione di spessore verticale risultante da questo tipo di stimolazione è compresa tra il 9% e il 15% dello spessore originario [22].

In conclusione, la miglior visione di insieme sui processi di carico che agiscono sulla cartilagine articolare comprende un stimolazione ciclica di compressione diretta unita alla generazione di sforzi di taglio, moderata trazione del tessuto ed elevata pressione idrostatica. Di seguito è esposta la tabella riepilogativa su alcune misure di carichi che possono interessare in vivo il tessuto cartilagineo, riassumendo i risultati fino ad ora discussi (**Tabella 1**).

Tipo di misura	Variazione spessore (%)	Intensità del carico (MPa)
distribuzione di pressione durante sequenza di passi	13	0,5-7,7
distribuzione di pressione durante flessione di arti o scale	/	picchi di 18
variazione di pressione nel tempo	/	variazione max di 6,5 in 0,2 s
pressione conseguente a sforzo di taglio	da 9 a 15	2,6

Tabella 1 Misure degli effetti che interessano la cartilagine durante alcune forze di carico in vivo.

Nell'ingegneria tissutale della cartilagine, se si vuole rigenerare il tessuto danneggiato delle giunture articolari, è essenziale comprendere la relazione che lega la funzionalità della cartilagine alle sue *variazioni strutturali* in condizioni fisiologiche, in vivo. Sia la funzione che la struttura del tessuto variano all'interno della singola giuntura e tra giunture di diversi individui. Queste variazioni influiscono sulle proprietà fisiche, chimiche e morfologiche della cartilagine. Attraverso tecnologie diverse, quali dispositivi a ultrasuoni e risonanza magnetica, si dimostra che all'interno di una singola giuntura articolare lo spessore del piano cartilagineo non è omogeneo e varia in relazione al carico a cui deve resistere. In aggiunta, è assolutamente errata la convinzione che lo spessore cartilagineo sia il risultato della storia di carico di ciascun singolo individuo; infatti, le persone che praticano sport regolarmente da anni non presentano spessore differente del tessuto cartilagineo rispetto a individui sedentari,

così come non c'è differenza di spessore tra uomo e donna. Ciò che può variare da individuo a individuo non è, quindi, lo spessore dello strato di cartilagine, bensì eventualmente l'estensione superficiale dello stesso e la sua robustezza (entrambi maggiori nella cartilagine sottoposta regolarmente a carico). Molti studi hanno tentato, poi, di misurare e determinare i fattori responsabili dello spessore dello spazio che esiste tra gli strati cartilaginei e che è riempito di liquido sinoviale. La distanza che intercorre tra due superfici articolari spesse più di 3 mm dipende dal carico applicato e, in condizioni fisiologiche, varia da 1,5 mm fino a un contatto diretto e completo tra esse [12,22].

Come spiegato in precedenza, un aspetto peculiare e svantaggioso della cartilagine articolare è la limitata capacità di rifornimento di sostanze nutritive e di ossigenazione e il conseguente rallentamento del metabolismo. I microelettrodi sono in grado di quantificare il gradiente di ossigeno tra la superficie e la zona profonda del tessuto; la tensione che esercita l'ossigeno nella zona superficiale è del 7,5% per poi calare fino all'1% nella zona calcificata (tale gradiente può variare leggermente da individuo a individuo) [22]. Ci sono molte prove a favore del fatto che la variazione di ossigenazione che interessa la cartilagine influenza la presenza di differenti composizioni interne di proteoglicani a seconda della regione in esame. È da tener presente che, solitamente, gran parte delle colture cellulari avvengono con una pressione parziale dell'ossigeno del 21%, condizione che non simula, quindi, la situazione fisiologica del tessuto, ma che sembra stimolare comunque adeguatamente la proliferazione di condrociti e la produzione di collagene di tipo II, tipico componente della cartilagine ialina [12,18]. La dettagliata cinetica del consumo cellulare di ossigeno è complessa e dipende dal tipo di popolazione cellulare e dalle condizioni di coltura. Una semplificazione, per affrontare il problema dal punto di vista ingegneristico, è quella di ipotizzare un consumo volumetrico V , funzione della concentrazione stessa dell'ossigeno, sulla base del modello chimico di Michaelis-Menten

$$V(c) = V_{max} \frac{c}{K_m + c}$$

dove V_{max} è il consumo volumetrico massimo, c è la concentrazione di ossigeno e K_m è una costante legata alla concentrazione di saturazione dell'ossigeno nella soluzione. In questo modello, ad elevate concentrazioni di ossigeno il consumo è circa costante (cinetica di ordine zero per $c \gg K_m$) e pari al valore asintotico del consumo massimo; a basse concentrazioni di ossigeno, invece, il consumo è funzione lineare della concentrazione stessa (cinetica del

primo ordine $c \ll k_m$) [4]. Il consumo cellulare di ossigeno è solitamente dato in termini di numero di moli consumate per cellula nell'unità di tempo; noto tale valore, per ottenere il consumo volumetrico nell'unità di tempo si deve conoscere la densità cellulare, parametro importantissimo nella coltura della cartilagine. Per avere un'idea di come ricavare la concentrazione dell'ossigeno, si vede che la concentrazione in soluzione è legata alla pressione parziale del gas (la pressione parziale dell'ossigeno è misurabile con sensori amperometrici) proporzionalmente al coefficiente di solubilità, in base alla legge sperimentale di Henry

$$c = \alpha p$$

Il coefficiente di solubilità dipende dal gas, dal liquido e dalla temperatura. Per l'ossigeno, il coefficiente di solubilità in soluzione in acqua a 37°C vale

$$\alpha = 1,3 \frac{nmol_{O_2}}{mL_{H_2O} \cdot mmHg}$$

Si ricordi che la capacità del sangue di saturarsi di ossigeno è molto maggiore (di circa 30 volte) rispetto a quella dell'acqua, grazie alla presenza nei globuli rossi di emoglobina, la proteina che lega molecole di ossigeno [4].

Le richieste nutrizionali, in generale, delle cellule che devono sintetizzare la matrice extracellulare aumentano durante il processo di differenziazione. Il *trasporto di massa* deve, quindi, aumentare in accordo con le proprietà del tessuto e, parallelamente, deve saper efficientemente eliminare i prodotti di rifiuto e di scarto del metabolismo; a questo proposito, conoscenze approfondite sui fenomeni di trasporto e scambio sono senza dubbio fondamentali per lo sviluppo della cartilagine ingegnerizzata in un bioreattore. Il trasporto di fluido e soluti all'interno dei pori del tessuto è primariamente governato dalle proprietà che riguardano la diffusività dei soluti, la permeabilità idraulica e la convezione [4,12,18,26].

Le molecole sono soggette a processi di diffusione molecolare; questo moto, generato dall'agitazione termica, prevede un progressivo allontanamento dalla posizione iniziale, a seguito di ripetute oscillazioni casuali nelle varie direzioni spaziali. Per comprendere il fenomeno, si quantifica la capacità di un soluto di diffondere all'interno di un solvente ad una data temperatura come una proprietà fisica che prende il nome di coefficiente di diffusione, D , definito dalla legge di Stokes-Einstein

$$D = \frac{kT}{6\pi\mu r_s}$$

dove k è la costante di Boltzmann, la temperatura è quella fisiologica a 37°C , μ è la viscosità del solvente e r_s è il raggio di una particella di soluto, supposta di forma sferica [4,12]. A parità di solvente e temperatura, le molecole più piccole presentano un coefficiente di diffusione più elevato e quindi diffondono anche più velocemente rispetto a molecole più grandi. Per l'ossigeno $D=2,1\cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ in acqua/tessuto a 37°C [4]. Inoltre la diffusività aumenta con l'aumento di contenuto d'acqua, poiché aumentano le dimensioni dei pori, mentre diminuisce se il tessuto viene compresso. Esiste una direzionalità del processo diffusivo. Quando un soluto viene messo in soluzione si genera un gradiente di concentrazione che tende spontaneamente ad annullarsi nel tempo attraverso il flusso diffusivo di massa del soluto. Il modello matematico che calcola il flusso diffusivo nelle tre dimensioni a regime stazionario prende il nome di I legge di Fick

$$\mathbf{J} = -D \nabla c$$

e dice che il flusso vettoriale diffusivo di un soluto è generato dal gradiente di concentrazione del soluto (espresso come campo scalare di concentrazione del soluto nello spazio) ed è proporzionale al coefficiente di diffusione [4,12,26]. La legge per il calcolo del campo di concentrazione in regime non stazionario è nota come II legge di Fick e si esprime con l'equazione

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \nabla^2 c$$

dove l'operatore laplaciano è definito come la divergenza del gradiente del campo scalare; il campo scalare di concentrazione in questione varia nello spazio e nel tempo. Tale equazione differenziale alle derivate parziali non sempre è risolvibile, ma a seconda dei casi è possibile semplificarne la risoluzione in presenza di particolari simmetrie [4]. Inoltre, se nel volume di interesse esiste un consumo volumetrico, ad esempio di ossigeno, l'equazione deve tenere in considerazione anche questo aspetto e l'espressione diventa

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \nabla^2 c - V(c)$$

Si è detto che non solo il trasporto diffusivo provvede al nutrimento cellulare nel tessuto cartilagineo. Nel tessuto naturale, infatti, i nutrienti e l'ossigeno raggiungono tutte le cellule grazie alla combinazione di trasporto convettivo e diffusione. I due fenomeni in gioco

sono correlati da un parametro adimensionale, detto numero di Peclet, che in forma semplificata è espresso come

$$Pe = \frac{UL}{D}$$

dove U è la velocità caratteristica del fluido e L è la distanza di diffusione. Per $Pe > 1$ predomina la convezione, mentre la diffusione è dominante sulla convezione in caso contrario [12]. La diffusione può quindi essere, in aggiunta a quanto detto in precedenza, associata ad un campo vettoriale di velocità, come avviene nel tessuto cartilagineo, dove il liquido interstiziale trasporta vari soluti alle cellule, o come avviene nei bioreattori che generano un flusso del mezzo di coltura. Per quanto detto, la forma completa dell'equazione per il calcolo del profilo di concentrazione, derivata dal principio di conservazione della massa nella diffusione-convezione, risulta

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \nabla^2 c - V(c) - (\mathbf{v} \cdot \nabla) c$$

dove $\mathbf{v}$ è il campo vettoriale di velocità del solvente (che si calcola a partire dalla legge di Navier-Stokes) [4,26].

È stato affermato che anche la permeabilità idraulica è un fattore che, assieme alla diffusione e alla convezione, influenza e governa il trasporto di massa nel tessuto cartilagineo e, in generale, nei tessuti biologici. Tale fattore rappresenta una misura di quanto facilmente un fluido può attraversare la matrice del tessuto; esso è in relazione con il contenuto di acqua nel tessuto, la densità di cariche fisse, la diffusività degli ioni e il coefficiente di attrito tra la fase fluida interna e la matrice solida. Inoltre, la permeabilità diminuisce in fase compressiva [4,12,22]. Si ricordi che quanto detto a riguardo dei fenomeni di trasporto che avvengono nei tessuti biologici in vivo non sempre tiene conto della complessità strutturale del tessuto cartilagineo, caratterizzato da forte anisotropia nelle risposte agli stimoli e da visibile disomogeneità nella composizione e nella struttura interna.

Per completare questa visione d'insieme sul comportamento in vivo del tessuto cartilagineo, diventa importante considerare il suo sviluppo *durante l'embriogenesi*. La cartilagine è un tessuto di origine mesodermica, analogamente al tessuto osseo e agli altri tessuti connettivi. Nello sviluppo ontogenetico, le cellule del mesoderma, uno degli strati germinali che rappresentano una tappa della differenziazione delle cellule staminali durante l'embriogenesi, danno origine a un tessuto connettivo embrionale con organizzazione

indipendente chiamato *mesenchima*. Le cellule rotondeggianti presenti in esso entro la quinta settimana di gravidanza condensano e sviluppano, in un processo chiamato *condrificazione*, lo scheletro primordiale. Questo scheletro è considerato un intermediario necessario allo sviluppo della cartilagine, dalla quale poi deriva il tessuto osseo durante l'*ossificazione endocondrale*. Sette settimane dopo, la formazione di osso e di giunture articolari è quasi completa poiché manca solo il sottile strato di cartilagine ialina in corrispondenza delle superfici articolari. Durante il rimanente periodo di gravidanza e anche successivamente alla nascita dell'individuo, nella cartilagine avvengono significativi sviluppi nella composizione biochimica. Nello sviluppo pre-natale e post-natale, infatti, la cartilagine dispone di un'elevata densità di condrociti che sono interessati da una consistente proliferazione e da un attivo metabolismo cellulare. In generale, la concentrazione di proteine totali diminuisce, il collagene si mantiene costante, ma la quantità di proteoglicani e proteine di adesione aumenta [2,3,4,22].

Un esempio particolare di modificazione biochimica riguarda l'aumento del rapporto tra gli isomeri 4 e 6 della condroitin-solfato presente nei PGs: tale rapporto è di grande importanza perché è usato come indicatore della differenziazione condrogenica. Un altro esempio riguarda la diminuzione, in forma e numero, delle catene di condroitin-solfato, mentre un andamento del tutto opposto riguarda le catene di cheratan-solfato [22].

La questione, in conclusione, riguarda la determinazione ed eventuale riproduzione in vitro degli stimoli meccanici che nascono e sono applicati in maniera naturale durante lo sviluppo dell'embrione e che favoriscono, così, lo sviluppo della cartilagine; a proposito, si può correttamente affermare che questi stimoli abbiano origine dalle prime contrazioni muscolari che interessano l'embrione [2,3,22]. Il fatto, poi, che un bioreattore possa simulare adeguatamente le condizioni di crescita che avvengono durante l'embriogenesi o durante la fase di sviluppo dell'individuo dipende, come sarà trattato in seguito, anche dal tipo di cellule usate per la coltivazione.

CAP. 3 LA RIGENERAZIONE DELLA CARTILAGINE

3.1 INTRODUZIONE

Per ingegnerizzare un tessuto sono necessari tre elementi di base [4], come mostrato (**Figura 9**). Le *cellule* rappresentano l'elemento vitale nella costruzione di un tessuto biologico autologo; le cellule possono provenire da sorgenti cellulari differenti e, quindi, presentare fenotipo diverso. Lo *scaffold* è la struttura tridimensionale, porosa e biodegradabile che accoglie la componente cellulare seminata e che supporta meccanicamente la ricostruzione del tessuto. Oltre a questi due elementi, il *condizionamento biochimico e fisico* riveste un ruolo decisivo nell'ingegnerizzazione di un tessuto; vengono utilizzati bioreattori capaci di generare e controllare stimoli fisici e chimici durante la coltura al fine di ottenere un tessuto biologico che sia strutturalmente e funzionalmente simile al tessuto naturale [4].

Con questi tre elementi si ricostruiscono in vitro i tessuti biologici attraverso il percorso seguente: scelta del tipo o dei tipi cellulari; scelta dello scaffold e della sua struttura; semina delle cellule nello scaffold; coltura in condizioni dinamiche (condizionamento); replica e differenziazione cellulare; secrezione della ECM da parte delle cellule; impianto del costruito nel paziente; adattamento, assimilazione e integrazione funzionale dell'impianto [1,4,9,20].

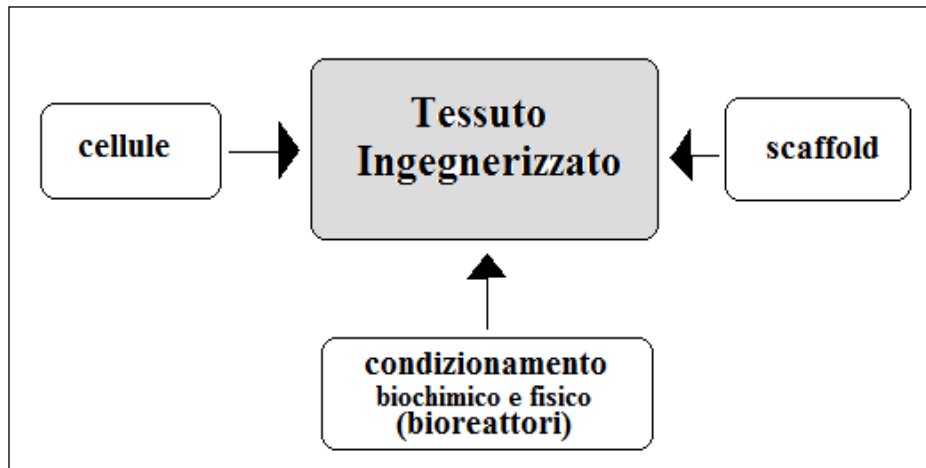


Figura 9 Elementi di base per la rigenerazione di tessuti biologici funzionali.

L'ingegneria della cartilagine, in particolare, concentra la sua attenzione sulle cellule, sui biomateriali che costituiscono le matrici biodegradabili, sui sistemi di coltura e sui fattori di crescita. Le cellule sono isolate da una porzione di tessuto prelevato tramite biopsia, espanse in vitro, seminate nello scaffold e impiantate dopo un determinato periodo di condizionamento dinamico [20]. A questo proposito, è doveroso precisare il fatto che la crescita del neo-tessuto è un processo dinamico, non stazionario, nel quale l'ambiente fisico (meccanico, elettrico) e quello chimico si modificano nel tempo; per questo, l'impiego di sistemi di coltura dinamici, cioè di bioreattori, risulta indispensabile per la corretta maturazione dei tessuti biologici. Lo sviluppo di bioreattori sempre più efficaci rappresenta l'indispensabile contributo dell'ingegneria biomedica alla medicina rigenerativa [4].

3.2 LE CELLULE

3.2.1 Le cellule nell'ingegneria tissutale

I tessuti biologici sono formati da cellule e matrice extracellulare e sono organizzati in maniera gerarchica in modo tale da potervi distinguere scale di grandezze diverse e, di conseguenza, meccanismi di scambio differenti: molecole ($< 10^{-9}$ m, interazioni chimico-fisiche), organelli ($< 10^{-6}$ m, scambi diffusivi), cellule ($< 10^{-4}$ m, scambi diffusivi) e tessuti ($< 10^{-3}$ m, convezione e scambi con capillari) [4]. Al fine di ingegnerizzare un tessuto biologico, è necessario avere un'esauriente conoscenza della sua *organizzazione gerarchica e modulare*

per poter, così, favorire l'integrazione strutturale e funzionale del neo-tessuto con l'organismo ricevente.

Le cellule sono un elemento basilare per la produzione di nuovo tessuto, detta *neomorfogenesi*. Con questo termine si indica il processo che porta alla formazione di nuovo tessuto in vitro; esso si differenzia dalla morfogenesi, cioè lo sviluppo naturale delle forme e delle funzioni di un embrione. Bisogna tener presente che, affinché la neomorfogenesi abbia successo, è necessario creare un ambiente favorevole nel quale le cellule siano in grado di riprodursi e di organizzarsi e, inoltre, è indispensabile fornire loro un supporto che ne indirizzi l'organizzazione in un'opportuna architettura [1]. Di seguito si sottolineano le importanti differenze tra l'ingegneria tissutale che produce nuovo tessuto e il naturale processo di morfogenesi che coinvolge lo sviluppo dell'embrione (**Tabella 2**).

Morfogenesi	Ingegneria Tissutale
Utilizzo di cellule staminali	Cellule adulte o staminali
Le cellule producono ECM	Utilizzo di scaffold
Tessuto e ambiente sono modulati in tempo reale dalla struttura stessa	L'architettura di uno scaffold è pre-programmata
Crescita per aumento di massa da un punto sorgente	Crescita per demolizione dello scaffold e contemporanea produzione di ECM dalle cellule
La morfogenesi è dovuta a segnali interni alle cellule	La forma viene dettata dalla geometria dello scaffold

Tabella 2 Differenze tra la morfogenesi e l'ingegneria tissutale [4].

Il rapporto tra matrice extracellulare e cellule funziona per *reciprocità dinamica* e il coordinamento dei segnali e della *comunicazione* tra i due è essenziale per il corretto funzionamento di un tessuto. Diventa, quindi, di basilare importanza nel contesto dell'ingegneria tissutale la conoscenza dei meccanismi di interazione tra recettori e ligandi, delle soglie di concentrazione e dei tempi caratteristici; ciò permette di controllare i processi cellulari e tissutali durante la realizzazione di un costrutto [4]. I recettori sono le proteine di membrana responsabili della ricezione e trasmissione di segnali dalla cellula alla ECM e dalla cellula alle altre cellule. Si trovano sulla superficie delle cellule e sono di grande importanza nella rigenerazione dei tessuti perché modulano e regolano l'interazione della cellula con i supporti e i substrati, con i biomateriali degli scaffolds e con i fattori di crescita. Legandosi a

ligandi esterni, necessariamente presenti sullo scaffold al cui materiale le cellule devono aderire, i recettori subiscono veri e propri cambiamenti conformazionali; il segnale viene, così, trasmesso al recettore e scatena una cascata di segnali e processi interni che inducono la cellula a esprimere proteine o a dividersi o a morire per apoptosi. Tutti questi processi interni prendono il nome di *trafficking* [3,4]. Quindi si può dire che le cellule sono estremamente sensibili all'ambiente esterno, non solo perché fonte di nutrienti, ma anche perché ricco di segnali biochimici che regolano processi cellulari che nell'ingegneria tissutale sono basilari, cioè adesione, migrazione, crescita cellulare e produzione di matrice extracellulare. Poiché la risposta delle cellule dipende dal numero di recettori legati al ligando, numerosi modelli sono stati proposti negli anni per esprimere il legame tra recettore e ligando, utilizzando equazioni cinetiche con costanti di associazione e dissociazione [4]; questo argomento non viene, però, approfondito in questa sede.

Rimane il fatto che, al fine di poter guidare la crescita di un costrutto in maniera affidabile e riproducibile, sono necessari stimoli provenienti sia dallo scaffold che dall'ambiente biochimico che circonda le cellule, ricordando che non esisterà mai un equilibrio vero e proprio del sistema, ma un bilancio dinamico da controllare, monitorare e condizionare nel tempo. Uno degli elementi fondamentali nella rigenerazione dei tessuti è, ribadendo il concetto, il fatto che le risposte e le funzioni cellulari possono essere modulate e controllate da fattori esterni [4,9,17,22].

Ogni cellula ha una *distanza* e un *tempo di comunicazione* utile con altre cellule e nell'ingegneria tissutale questi dati quantitativi servono per dimensionare i costrutti e controllarne le funzionalità. Partendo da un modello semplice di diffusione in coordinate sferiche si possono calcolare, quindi, la distanza di comunicazione delle cellule e la concentrazione di ligando utile per la comunicazione in relazione alla sua costante di diffusione. Si ricordi, in aggiunta, che il moto cellulare è completamente diverso dal movimento di particelle. Le particelle si muovono in maniera casuale per il trasferimento istantaneo di momento alle altre particelle. Le cellule, invece, si spostano grazie a movimenti e contrazioni del citoscheletro e spostamento del citoplasma, quindi con attacco e distacco dei legami chimici tra recettori e ligandi. In questo senso, la *motilità cellulare* è associata a una forma particolare del moto casuale, detto moto Browniano persistente, in cui l'inerzia della particella aumenta con la probabilità che il moto continui nella direzione originale anziché in qualsiasi direzione con la stessa probabilità. Si rimanda l'approfondimento di questi argomenti al riferimento bibliografico in questione [4].

Si è accennato che le molecole-segnaie giocano un ruolo fondamentale, anche se ad oggi non completamente chiarito, sia nella cascata di eventi che presiedono alla formazione di tessuti durante lo sviluppo embrionale, che sui meccanismi che regolano la rigenerazione e il continuo rimodellamento post-natale dei tessuti. In particolare, la capacità di indurre e di accelerare la formazione di nuovo tessuto da parte di fattori di adesione e fattori di crescita rappresenta una delle tematiche più promettenti nel campo dell'ingegneria tissutale [1,4,9].

L'*adesione cellulare* è un processo necessario alla formazione, al mantenimento della struttura tridimensionale e alla funzionalità dei tessuti. I meccanismi di adesione interessati sono quello cellula-cellula e quello cellula-ECM. Dal punto di vista biochimico, l'adesione cellulare si realizza attraverso interazioni altamente specifiche e selettive tra le proteine presenti sulla membrana delle singole cellule oppure tra queste e le proteine dell'ECM. In particolare, quest'ultimo processo consente alle cellule di legarsi all'entità strutturalmente complessa che circonda e supporta le cellule e che contiene numerosi pori attraverso i quali diffondono le sostanze nutritive e l'ossigeno. Di seguito si riportano le principali e più importanti proteine di adesione presenti sulle superfici delle cellule e sulla matrice tridimensionale (**Tabella 3**) [1,9].

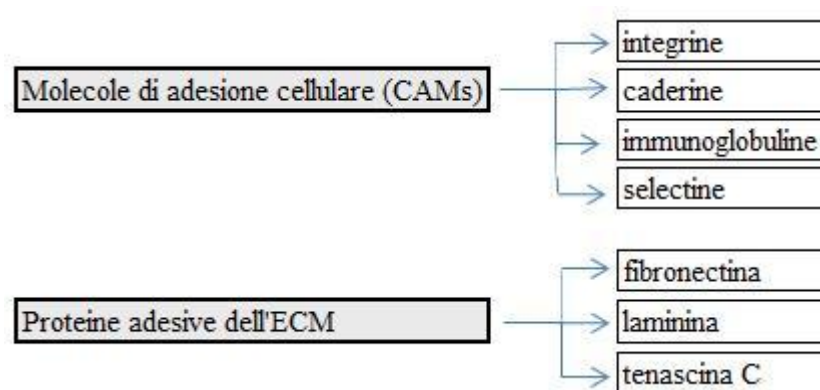


Tabella 3 Fattori di adesione presenti sulle cellule e sulla ECM [1].

I *fattori di crescita* sono, invece, proteine che si legano ad opportuni recettori sulla superficie cellulare, con il risultato di attivare la proliferazione e/o la differenziazione cellulare. Molti fattori sono versatili, stimolando diversi tipi di cellule, mentre altri sono più specifici e si attivano solo nei confronti di determinati tipi cellulari [1]. La famiglia dei fattori di crescita di trasformazione, i TGF (*Transforming Growth Factors*), costituisce la famiglia più numerosa dei fattori di crescita prodotta dagli osteoblasti delle ossa umane ed è utilizzata per la

rigenerazione della cartilagine in vitro poiché può indurre la condrogenesi in maniera controllata [1,4]. Tra di essi, il più importante in questo caso è il TGF- β [4,9,17]. In alcuni casi il TGF- β può essere utilizzato in combinazione con i fattori di crescita insulino-simili (IGFs) e con i fattori di crescita dei fibroblasti (FGFs), soprattutto se si vuole massimizzare il loro impatto nella proliferazione e differenziazione in vitro di costrutti osteocondrali; questi ultimi puntano, infatti, alla co-rigenerazione di tessuto osseo e cartilagineo che, in questo modo, si sviluppano in stretto contatto l'uno con l'altro in vitro, prima ancora che in vivo [9,13].

Lo studio della *meccanotrasduzione* pone in rilievo il ruolo delle cellule nella rigenerazione dei tessuti biologici. Le considerazioni sulla natura dei legami in presenza di forze, siano esse forze di adesione e coesione o forze fisiologiche o forze artificiali, sono molto rilevanti per la progettazione di costrutti e sostituti biologici. La maggior parte delle cellule sono ancoraggio-dipendenti, cioè riescono ad esplicare le loro funzioni (fenotipo) solo se aderiscono e si espandono su un substrato. Le cellule sono, di conseguenza, meccanicamente accoppiate all'ambiente e così formano una sorta di catena cinematica dinamica che risponde alle sollecitazioni meccaniche esterne [4,11]. Le cellule sono, ad esempio, sensibili a sforzi e deformazioni, ma anche alla tipologia e alla rigidità del substrato con cui interagiscono. Esse rispondono cambiando forma e funzione, quindi modificando la loro espressione fenotipica.

La rigenerazione tissutale permette, quindi, di spostarsi da una visione puramente biologica della cellula, come massa viscosa circondata da membrana elastica, a una visione ingegneristica della cellula stessa, secondo la quale questa è studiata come struttura biologica in grado di applicare e trasmettere forze, e di tradurre stimoli fisici in risposte biologiche e meccaniche [4].

3.2.2 Sorgenti cellulari per costrutti cartilaginei

In relazione alle risorse cellulari utilizzate nell'ingegneria della cartilagine, le strategie adottate sono principalmente due. Una soluzione è quella rappresentata dall'utilizzo di condrociti differenziati, isolati da differenti siti anatomici; l'alternativa a questi è rappresentata dall'isolamento di cellule staminali, le quali sono in grado di dare origine a vari tipi di tessuti.

Le *cellule differenziate* sono cellule specializzate che presentano un fenotipo ben definito e stabile nel tempo [4]. Una restrizione nell'uso di cellule cartilaginee differenziate sta nella loro reperibilità e nella capacità di proliferazione, come è spiegato di seguito [1,4,9,15,17,20]. Se l'obiettivo è quello di ricostruire un tessuto partendo da cellule specializzate, nasce il problema del sito del prelievo. Inoltre bisogna avere la certezza che le cellule prelevate siano sane, altrimenti si ottiene un tessuto ricostruito patologico. Ancor più limitante è il problema della capacità proliferativa dei condrociti: le cellule differenziate dei tessuti adulti hanno una capacità proliferativa molto limitata e che diminuisce con l'età. Ciò significa che, all'aumentare dell'età, la numerosità delle cellule a parità di volume diminuisce e le cellule diventano senescenti. La complicazione più svantaggiosa nell'utilizzo di cellule cartilaginee differenziate è rappresentata dalla de-differenziazione di tali cellule quando queste sono amplificate ed espanse in vitro. I condrociti in coltura, infatti, non trovandosi immerse nell'ambiente fisiologico che trovano in vivo, possono perdere il loro fenotipo originale trasformandosi in fibroblasti e riducendo la sintesi di collagene di tipo II e aumentando quella di collagene di tipo I [4,20]. Ciò avviene nella prima fase di espansione cellulare in monostrato. La coltura dinamica di costrutti tridimensionali deve, quindi, favorire la re-differenziazione cellulare attraverso le condizioni di coltura e i biomateriali applicati [20]. In generale, tutte queste problematiche hanno spostato l'attenzione degli scienziati verso una diversa popolazione cellulare: le cellule staminali.

Le *cellule staminali* sono cellule capaci di dividersi in coltura senza differenziarsi per periodi indefiniti di tempo e/o di differenziarsi generando cellule specializzate [1]. Le cellule staminali, come già accennato, sono di diversi tipi; senza entrare nel dettaglio, si consideri che per la rigenerazione della cartilagine sono utilizzate soprattutto le cellule stromali o mesenchimali, che sono cellule staminali adulte pluripotenti situate nel midollo osseo. Altre sorgenti di cellule staminali possono essere il liquido sinoviale, il tessuto adiposo o altri tessuti [4,15,17]. Le cellule staminali adulte hanno elevata capacità proliferativa, tempi di divisione cellulare minori rispetto ai condrociti, elevata potenzialità di differenziazione e il tessuto che ne deriva dipende meno dall'età del donatore rispetto a quello ottenuto da condrociti differenziati. Tuttavia, affinché sia possibile indurre la differenziazione di tali cellule in condrociti, è necessaria l'aggiunta di fattori di crescita che possono presentare comportamenti indesiderati nell'organismo in seguito al trapianto [20].

La differenziazione cellulare è ulteriormente supportata dagli stimoli meccanici applicati che stimolano la secrezione di proteine condrogeniche [9]. In particolare, sono stati effettuati degli

studi specifici sulle proprietà meccaniche della cartilagine ingegnerizzata con cellule staminali mesenchimali e su come queste proprietà siano in relazione con la cartilagine ottenuta con cellule differenziate e con le proprietà della cartilagine articolare nativa [10,22]. Si ricordi che la stabilità delle proprietà meccaniche dei costrutti ottenuti in vitro dipende dall'espressione della ECM e dei componenti di tale matrice, soprattutto collagene di tipo II. L'applicazione di stimoli meccanici, in particolare di compressione dinamica, migliora la maturazione della cartilagine ricostruita a partire da cellule staminali. A questo proposito, devono essere applicati precisi protocolli di carico per il corretto sviluppo di tessuto, con intensità, tipo di carico, durata e orientazione spaziale ben definiti [10].

In aggiunta a quanto detto, per ovviare agli svantaggi che entrambe le soluzioni presentano e sfruttare, invece, i vantaggi che queste possono offrire, si stanno studiando strategie di *co-coltura* di condrociti differenziati e progenitori mesenchimali. Sembra, infatti, che i condrociti siano capaci di favorire la differenziazione di cellule staminali stromali diminuendo, nello stesso tempo, il rischio di ottenere un tessuto ipertrofico, spesso osservato nel caso di utilizzo esclusivo di popolazioni staminali [17].

In conclusione, la disponibilità, l'isolamento e l'espansione di cellule staminali umane è e sarà uno dei principali ambiti di ricerca per l'ingegneria tissutale. Se e come sarà possibile utilizzare precursori multipotenti o totipotenti o direttamente cellule staminali embrionali, dipenderà dai progressi della ricerca, ma soprattutto da questioni politiche e decisioni di ordine etico e religioso, oggi contrastanti e divergenti.

3.3 LO SCAFFOLD

Con l'obiettivo di superare e risolvere disturbi patologici o traumatici che portano alla degenerazione del tessuto cartilagineo, la ricerca ha permesso di iniziare la ricostruzione della cartilagine in laboratorio attraverso la generazione di tessuto ingegnerizzato composto da cellule che aderiscono e proliferano su un supporto tridimensionale sotto precise condizioni di coltura che puntano a simulare quelle fisiologiche. L'utilizzo di scaffold tridimensionali per sostituire tessuti e sostenere le cellule per l'ingegneria tissutale fu proposto circa vent'anni fa da *Robert Langer* e suoi collaboratori [34].

È stato già detto che i tessuti biologici possiedono un'architettura e una struttura spaziale ben definita e correlata alla funzionalità che questi devono esplicare all'interno

dell'organismo. La realizzazione di uno scaffold richiede, quindi, l'utilizzo di tecniche con un elevato grado di controllo sui parametri strutturali dello scaffold, tenendo conto delle diverse *scale di grandezza* che si presentano nei tessuti [4,5,11]. Infatti, a livello nanometrico va controllata la distribuzione di ligandi e siti di adesione attraverso modifica chimica delle superfici per garantire l'espressione fenotipica desiderata. A livello micrometrico, invece, l'attenzione si concentra sulla struttura porosa del tessuto, in modo tale da permettere un'adeguata perfusione di nutrienti. Infine, sulla scala millimetrica il requisito è di avere un costrutto che ricordi la forma dell'organo e che sia adatto al sito di innesto [4].

Gli scaffold sono, quindi, strutture *tridimensionali* naturali o artificiali sulle quali vengono inizialmente seminate e successivamente fatte crescere le cellule, al fine di generare un costrutto biologico funzionale; essi definiscono un vero e proprio spazio tridimensionale, guidando lo sviluppo del tessuto e degradando, poi, progressivamente. In particolare, uno scaffold deve essere biocompatibile, strutturalmente e meccanicamente stabile, deve supportare i carichi applicati alle cellule che ivi si coltivano, deve promuovere la differenziazione e maturazione cellulare e deve essere *biodegradabile* [1,5,11]. Si ricordi che la cinetica di degradazione e riassorbimento dello scaffold deve essere compatibile con la ricostruzione del tessuto e con la secrezione di ECM da parte delle cellule [4,11,22].

Il controllo delle proprietà microstrutturali degli scaffolds, in particolare porosità, dimensione dei pori, grado di interconnessione e distribuzione spaziale è necessario per la realizzazione di costrutti funzionali ingegnerizzati. La *porosità* è definita come il rapporto tra il volume dei vuoti e il volume totale del materiale ed è una proprietà morfologica indipendente dal materiale con cui viene realizzato lo scaffold [4]. La presenza dei pori, come già accennato, è necessaria in quanto permette la migrazione e la proliferazione di cellule all'interno della struttura tridimensionale, il passaggio di sostanze nutritive e la rimozione di prodotti di scarto del metabolismo e, inoltre, offre in un piccolo volume una elevata superficie di adesione [4,5,11,12]. Inoltre, un'adeguata struttura porosa consente il trasferimento di segnali cellulari [4]. Si ricordi che, poiché la cartilagine è priva di vasi sanguigni, lo scaffold non deve ostacolare i processi di diffusione che portano nutrimento alle cellule [20].

La porosità varia nel tempo, diminuendo a causa dello sviluppo di tessuto che occupa i pori. In generale, nel campo dell'ingegneria tissutale, la dimensione minima dei pori richiesta per generare un tessuto funzionale in vitro è di 100 μm , ma vengono utilizzati anche scaffold con dimensioni maggiori dei pori, 200-300 μm . La porosità ottimale per la rigenerazione è intorno all'80-90%, ma può variare in base al tipo di materiale, alle prestazioni meccaniche desiderate

e alle caratteristiche di biodegradabilità e integrità strutturale richieste [4,5,11,20,29]. Ad esempio, la porosità per la cartilagine articolare deve essere di circa il 78% [20]. Le figure successive mostrano due esempi di scaffold con diversa porosità e dimensione dei pori (Figure 10 e 11).

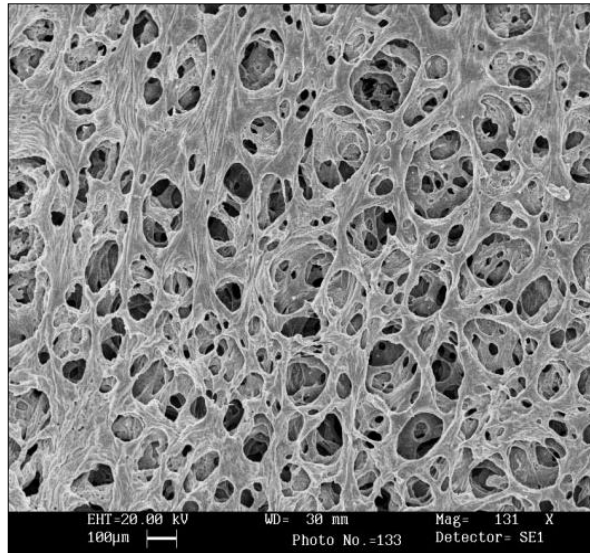


Figura 10 Scaffold polimerico poroso con dimensione dei pori di 100-200 µm [5].

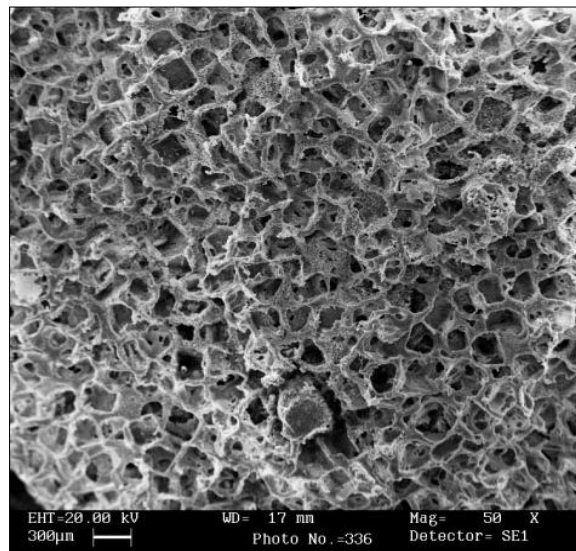


Figura 11 Scaffold polimerico poroso con dimensione dei pori di 200-300 µm [5].

Per l'ingegneria tissutale della cartilagine sono stati studiati e sperimentati una vasta varietà di *biomateriali* che possono costituire gli scaffold di supporto. La scelta ricade nella classe dei materiali sintetici o nella classe dei materiali di origine naturale, come detto in

precedenza. Il punto critico sta nella risposta a lungo termine del materiale, in quanto si richiede una progressiva e controllata sostituzione dello scaffold con matrice extracellulare prodotta dalle cellule impiantate, al fine di ottenere una totale sostituzione del tessuto naturale con materiale biologico che eviti il rischio di complicazioni associate alla presenza di materiale estraneo al corpo [1,4,25].

I *materiali naturali* sono spesso utilizzati nell'ingegneria dei tessuti biologici. Le proteine come il collagene e la fibrina sono comunemente utilizzate [4,11]. Il collagene è la proteina strutturale più diffusa nell'organismo in quanto conferisce ai tessuti stabilità e resistenza e può essere estratto e purificato mediante processi enzimatici; il collagene può essere processato in schiume porose, in fibre o in forma idratata per accogliere componenti cellulari. Anche la fibrina rimane un biomateriale di attrattiva per la biocompatibilità e la biodegradabilità che la caratterizza; per i danni e i difetti cartilaginei sono stati studiati gel e colle iniettabili a base di fibrina [1,4,11]. L'acido ialuronico gioca un ruolo fondamentale nei processi di adesione, proliferazione e migrazione cellulare poiché costituisce il maggior componente della ECM cartilaginea [1,11]. Vale la pena citare anche l'alginato, un polisaccaride usato sotto forma di gel come veicolo di cellule [4].

I *materiali sintetici* utilizzati come scaffold possono essere metallici, ceramici e polimerici. I principali vantaggi che fanno preferire i materiali polimerici rispetto alle altre classi di materiali sono la maggiore biocompatibilità, la biodegradabilità, la possibilità di modificare composizione e proprietà fisiche, la facile processabilità e lavorabilità. Gli svantaggi riguardano, invece, la presenza di sostanze che possono essere rilasciate nell'organismo durante il processo di degradazione, quali catalizzatori o monomeri [1,4]. I materiali di sintesi polimerici che vengono utilizzati nell'ingegnerizzazione dei tessuti sono soprattutto poliesteri (acido polilattico PLA, acido poliglicolico PGA, acido poliglicolattico PLGA) e poli-esteri uterani, poiché presentano entrambi prodotti di scarto non tossici [4].

Per quanto concerne la cartilagine ingegnerizzata, negli Stati Uniti le principali applicazioni utilizzano supporti biodegradabili a base di collagene, mentre in Europa vengono generalmente adottati materiali di sintesi polimerici come copolimeri PGA-PLA o l'acido ialuronico esterificato [4]. In particolare, le applicazioni di questo ultimo materiale sono state sviluppate con successo in Italia dalla *Fidia Advanced Biopolymers*, con sede ad Abano Terme, con il nome commerciale di *Hyaff-11*; questo tipo di materiale sintetico presenta un elevato grado di biocompatibilità ed è usato nella coltura tridimensionale dinamica di condrociti perché riproduce fedelmente la situazione in vivo. Senza approfondire

ulteriormente l'argomento, citiamo lo *Hyalograft-C* che è il tessuto cartilagineo ingegnerizzato risultante dalla crescita di condrociti sul supporto tridimensionale di Hyaff-11; questo costrutto, introdotto nell'uso clinico nel 1999, favorisce positivamente l'espressione fenotipica della naturale cartilagine ialina, incoraggiando, così, l'integrazione del neo-tessuto con le superfici articolari e ossee circostanti. Inoltre, il materiale polimerico dello scaffold viene riassorbito senza provocare una risposta infiammatoria cronica [4,11].

Riassumendo, gli elementi di criticità nella scelta e nella realizzazione degli scaffolds per la medicina rigenerativa sono da individuarsi nelle seguenti caratteristiche. Per essere citocompatibile, lo scaffold non deve essere citotossico e deve promuovere l'adesione delle cellule. Per quanto riguarda la tridimensionalità e la porosità, lo scaffold deve permettere la formazione di un tessuto tridimensionale e deve avere pori di adeguate dimensioni e interconnessi tra loro. In relazione alla provenienza, lo scaffold può essere realizzato utilizzando materiali di origine biologica o biomateriali sintetici. Infine, lo scaffold deve fornire un supporto meccanico adeguato ed essere biodegradabile, cioè deve possedere un profilo di degradazione noto e controllabile.

3.4 CONDIZIONAMENTO BIOCHIMICO E FISICO: I BIOREATTORI

3.4.1 I bioreattori nella rigenerazione della cartilagine

I bioreattori sono definiti come “*dispositivi in cui i processi biologici e/o biochimici si sviluppano in un ambiente e in condizioni operative altamente monitorati e controllati*” [4]. Il processo di crescita cellulare e poi sempre più tissutale è realizzato, quindi, in appropriati ambienti che trasmettono stimoli precisi alle cellule in coltura.

I campi fisici applicati possono indurre le cellule a modificare la loro forma e promuovere la secrezione di particolari sostanze che compongono la matrice extracellulare. Questa stimolazione del metabolismo cellulare attraverso campi fisici è un utilissimo strumento per l'ingegneria dei tessuti. Inoltre, consentendo variazioni riproducibili e controllate di specifici fattori ambientali, i bioreattori forniscono lo strumento tecnologico per individuare i meccanismi che regolano lo sviluppo tridimensionale delle cellule e, quindi, possiedono la capacità di accrescere la qualità di tessuti ingegnerizzati [4,9,22,25,33].

I bioreattori sono utilizzati per favorire diverse realtà durante la coltura, come l'apporto di nutrienti, i fattori di crescita, il rifornimento di ossigeno e la stimolazione

meccanica del neotessuto in via di formazione [33]. I vari sistemi sono classificati in accordo con il principale tipo di stimolo applicato [18,22,33]; alcuni bioreattori utilizzano stimoli meccanici per incoraggiare l'attività di sintesi delle cellule, altri impiegano flussi fluidi a perfusione per sostenere il trasporto di nutrienti e rendere il costrutto omogeneo. Insomma, l'ambiente di coltura dinamico nel bioreattore, controllabile e riproducibile, è essenziale per garantire un trasporto di massa adeguato per lo sviluppo di costrutti tridimensionali e trasmette segnali biomeccanici, in forma di sforzi di taglio per flusso di fluido, pressione idrodinamica o stimoli meccanici diretti che regolano molteplici eventi cellulari guidando lo sviluppo del tessuto [4].

Quindi, i bioreattori rappresentano un'attrattiva per conferire le proprietà biochimiche e meccaniche adeguate al tessuto ingegnerizzato, attraverso un controllo del trasporto di massa e l'applicazione di stimoli fisici. Differenti sistemi di reazione per la rigenerazione della cartilagine articolare sono stati sviluppati negli ultimi decenni e sono basati, come sarà approfondito, su diversi tipi di stimolazione dinamica, ad esempio sforzo di taglio, pressione idrostatica, compressione, perfusione [6,9,22,33]. Lo sviluppo di sistemi di coltura automatici e di monitoraggio non invasivo della produzione di matrice extracellulare sarà oggetto di ricerca nei prossimi anni, assieme al miglioramento economico dei costi dei prodotti dell'ingegneria dei tessuti [6]. All'approfondimento sui bioreattori per l'ingegneria della cartilagine è riservato il capitolo successivo.

3.4.2 Regole e mezzo di coltura

Durante le fasi di coltura cellulare bisogna mantenere la sterilità, perciò si deve operare secondo le regole di buona pratica in laboratorio (GLP: *Good Laboratory Practice*). Sterilità significa assenza totale di batteri e microorganismi. Per evitare, quindi, contaminazioni indesiderate i contenitori in cui avvengono le manipolazioni cellulari, precedenti alla fase di coltura nei bioreattori, devono possedere requisiti strutturali ben precisi ed essere sottoposti a un frequente controllo della qualità dell'aria [4]. L'inibizione della contaminazione di oggetti sterili è possibile solo se si opera secondo GCCP (*Good Cell Culture Practice*), cioè attraverso disinfezione delle mani prima delle operazioni sotto cappa, movimenti lenti per non disturbare il flusso interno alla cappa e utilizzo di attrezzi sterili [4]. Le cellule in coltura devono, in generale, essere mantenute in condizioni di atmosfera controllata mediante appositi incubatori, che permettono di mantenere la temperatura a 37°C e

la pressione parziale di CO₂ pari a quella cellulare misurata all'interno dei tessuti, cioè attorno al 5% [4,18,22].

È importante accennare al fatto che la conoscenza della cinetica cellulare è fondamentale nella progettazione di un costrutto biologico, poiché le funzionalità e la morfologia cellulare mutano considerevolmente in ognuna delle fasi di espansione delle cellule, condizionando i trattamenti a cui queste devono essere sottoposte. Indici di valutazione, ad esempio, del tasso di crescita sono la velocità di duplicazione, il tempo di duplicazione e il numero di cicli cellulari compiuti [4]. Essendo, poi, l'obiettivo della coltura cellulare favorire la proliferazione delle cellule mantenendone stabile il fenotipo, è necessario aumentarne periodicamente la superficie a disposizione, prelevandole quando si trovano in fase di proliferazione e trasferendole su un nuovo substrato di coltura. Solo così si può raggiungere e controllare la densità cellulare adeguata al tessuto da ingegnerizzare evitando la morte delle cellule [4,18].

A seconda della necessità operativa, le cellule vengono crioconservate, sia in forma di prodotto finito dell'ingegneria dei tessuti, sia in forma di sospensione di singole cellule. La crioconservazione, che a differenza dello scongelamento deve essere lenta, prevede che le cellule vengano congelate e conservate in provette contenenti azoto liquido a -196°C. L'azoto liquido ha il vantaggio di non dipendere dall'energia elettrica, quindi in caso di black out elettrico le cellule non subiscono danni [4]. In seguito a risultati sperimentali, nonostante la criopreservazione sembri non causare cambiamenti irreversibili nella morfologia dei condrociti o dei costrutti cartilaginei, si può osservare una diminuzione della capacità di adesione delle cellule alla matrice polimerica. Per questo motivo, i tessuti in cui si utilizzano cellule scongelate rispetto a cellule fresche contengono una quantità minore di matrice extracellulare [23].

Le cellule inserite nel bioreattore sono coltivate in un *mezzo di coltura* (*medium culture*). Le funzioni del mezzo sono diverse e molto importanti. Infatti, il mezzo deve mantenere le cellule in un ambiente biochimico che sia il più simile possibile a quello fisiologico naturale e contenere i nutrienti essenziali per la crescita, la proliferazione, il differenziamento e la sintesi proteica da parte delle cellule presenti [4,12]. Il mezzo di coltura deve necessariamente includere: gli amminoacidi, necessari alla sintesi proteica; il glucosio, principale fonte di energia per la biosintesi; i sali inorganici, essenziali per la crescita cellulare, il mantenimento della loro funzione e la regolazione del potenziale di membrana attraverso il controllo della pressione osmotica; le vitamine, catalizzatori utili nel controllo

delle funzioni metaboliche; fattori di crescita e ormoni, per un corretto sviluppo fenotipico e il mantenimento delle funzioni fisiologiche; lipidi, fonte energetica.

Solitamente nel mezzo di coltura, come accennato in precedenza, può essere presente il siero, cioè la frazione di sangue che rimane dopo la coagulazione e la centrifugazione delle componenti cellulari. Poiché il siero di bovino e di vitello presenta un elevato rischio di citotossicità e contaminazione, per costrutti tissutali umani la medicina rigenerativa utilizza o il siero del paziente o addirittura mezzi di coltura con addizioni chimiche definite, che risultano più sicuri e maggiormente conservabili [4].

Infine, il mezzo deve poter mantenere un pH costante grazie a sistemi tampone bicarbonato-acido carbonico. In genere, il rosso fenolo è l'indicatore che permette di osservare un eventuale cambiamento di pH nel terreno, che può essere provocato da fattori ambientali o dal metabolismo cellulare. Il sistema tampone è un dispositivo chimico che è in grado di mantenere un predeterminato pH nonostante grandi variazioni di concentrazione di H^+ . Senza entrare nel dettaglio del funzionamento del sistema tampone HCO_3^- / H_2CO_3 , il pH complessivo è dato dall'equazione di Henderson Hasselbach:

$$pH = 6,1 + \log \frac{(HCO_3^-)}{(CO_2)}$$

Il valore ottimale del pH per la crescita cellulare è compreso tra 7,2 e 7,4 [4,22].

3.5 FATTORI CRITICI NELL'INGEGNERIA TISSUTALE DELLA CARTILAGINE

Un tipico approccio che riguarda costrutti autologhi ingegnerizzati per la cartilagine articolare è illustrato di seguito (**Figura 12**). Lo schema riassume le differenti fasi di una tipica ingegnerizzazione cartilaginea e i fattori cruciali che possono rappresentare un problema nella rigenerazione e nella riproducibilità del tessuto. Risulta doveroso e importante discutere brevemente le questioni incontrate fino ad ora a questo riguardo.

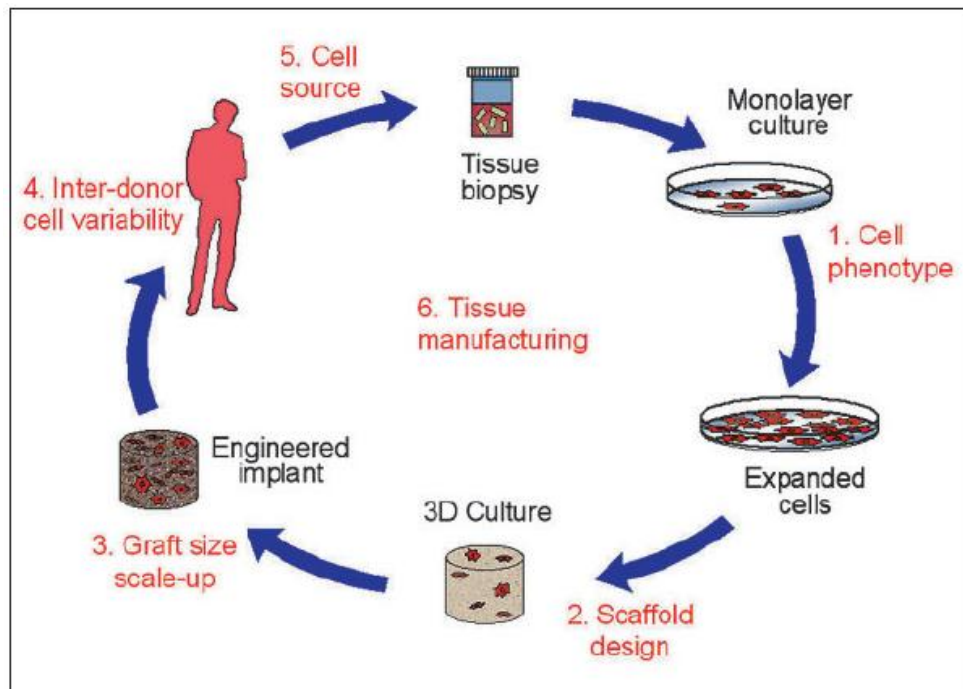


Figura 12 Ingegneria tissutale di costrutti autologhi cartilaginei [17].

Poiché la biopsia permette di ottenere una piccola quantità di cellule, i metodi di ingegnerizzazione dei tessuti richiedono l'espansione di tali cellule per ottenerne un numero sufficiente alla realizzazione del costrutto. Tutto questo è accompagnato da una de-differenziazione cellulare, se le cellule di partenza sono condrociti, che porta a una graduale variazione della morfologia delle cellule stesse e della loro capacità di sintetizzare collagene e altre proteine specifiche della cartilagine articolare [17,22]. I condrociti de-differenziati mantengono, però, la loro capacità di re-differenziarsi se trasferiti in un apparato tridimensionale di coltura detto bioreattore e se coltivati con opportuni fattori di crescita. Di conseguenza, l'espansione cellulare sotto opportune condizioni può portare alla corretta espressione del *fenotipo* delle cellule cartilaginee. Sebbene in questo caso si riescano a raggiungere risultati simili a quelli ottenuti con le cellule staminali mesenchimali, ad oggi è ancora lunga la strada per riuscire ad ottenere un fenotipo uguale a quello che caratterizza la cartilagine nativa [17].

Cruciale risulta il progetto dello *scaffold* da utilizzare che, come ampiamente detto, deve favorire l'adesione e la crescita cellulare, deve possedere una precisa struttura e porosità e deve essere biodegradabile, compatibilmente con la contemporanea produzione di matrice extracellulare.

La generazione di costrutti di una certa dimensione e spessore è ostacolata dalla difficoltà di ottenere una distribuzione omogenea delle cellule nelle diverse aree dello scaffold. Come sarà trattato in seguito, per ottenere un tessuto spesso qualche millimetro è necessario porre l'attenzione sulla *crescita del costrutto* attraverso sistemi a perfusione che, a differenza dei sistemi a coltura statica, favoriscono l'apporto di nutrimento e di ossigeno in tutte le aree dello scaffold in modo da permettere un'omogenea densità cellulare [17,20,22].

Un altro fattore problematico nell'ingegneria tissutale della cartilagine è rappresentato dalla *qualità dei condrociti* di partenza. La loro capacità di proliferare e di rigenerare tessuto è, infatti, dipendente non solo dallo stato di salute della cartilagine in cui si effettua la biopsia, ma è estremamente variabile anche tra individui della stessa età e senza precedenti disturbi articolari. Solo l'impiego di specifici fattori di crescita e piccole percentuali di siero può ridurre la variabilità di proliferazione e re-differenziazione dei condrociti, ma non può comunque garantire un risultato riproducibile dal punto di vista della qualità del tessuto ingegnerizzato ottenuto [17]. In alternativa, si è visto come è possibile usare altre *sorgenti cellulari* per la coltivazione dinamica di costrutti cartilaginei, cioè le cellule staminali adulte mesenchimali o stromali, che presentano una maggiore capacità di rendere il tessuto coltivato riproducibile e meno variabile nelle proprietà e nella struttura [17,20].

Uno dei maggiori ostacoli nella realizzazione di tessuto cartilagineo ingegnerizzato è il costo, in termini di tempo e di precisione, del lavoro; i processi manuali sono, inoltre, difficili da controllare e standardizzare. Per essere adatta all'*applicazione clinica*, la cartilagine ingegnerizzata deve dimostrare che i benefici terapeutici riescono a far fronte ai costi effettivi di produzione e deve garantire che i processi evolvano secondo le regole di laboratorio e siano sottoposti a controlli di qualità [4,9,17]. Ciò che è importante sottolineare, è il fatto che il passaggio dalla realtà sperimentale del laboratorio a quella clinico-industriale richiede un'elevata adattabilità e bioreattori altamente specializzati per attuare processi di produzione standardizzati [18]. Quanto detto non deve, però, sminuire l'importanza dello studio sperimentale rispetto all'applicazione clinica perché esso è fondamentale per completare e aumentare le conoscenze scientifiche sul processo condrogenico [17,18].

CAP. 4 BIOREATTORI PER LA CARTILAGINE INGEGNERIZZATA

4.1 L'IMPORTANZA DEI BIOREATTORI

4.1.1 Coltura statica e coltura dinamica dei costrutti cartilaginei

Il progetto di un modello cartilagineo ideale rappresenta attualmente un problema importante nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti. La cartilagine è un tessuto in grado di resistere e rispondere attivamente a intervalli compressivi anche estesi e altri tipi di stimoli ai quali quotidianamente è sottoposta. Uno degli obiettivi più ardui della ricostruzione in vitro della cartilagine articolare è, quindi, quello di accoppiare le cellule e gli scaffolds alla riproduzione delle proprietà meccaniche del tessuto, in modo da permettere la corretta proliferazione e differenziazione cellulare e riuscire, così, a ricreare strutturalmente e morfologicamente la cartilagine nativa [25].

Le fasi di semina e di crescita dei condrociti in supporti tridimensionali riveste un'importanza basilare nella rigenerazione di tessuto cartilagineo. L'adesione delle cellule e la loro penetrazione all'interno dello scaffold sono, quindi, essenziali per un'adeguata produzione di tessuto ingegnerizzato.

Da tempo è stato dimostrato che la semplice deposizione della sospensione cellulare sullo scaffold e la successiva coltura in *condizioni statiche* non garantiscono una adesione adeguata e una crescita uniforme poiché le cellule tendono a rimanere sulla superficie esterna del

materiale e tendono a distribuirsi su di esso in maniera irregolare [4,17]. In una coltura statica la proliferazione e la differenziazione possono essere controllate con l'utilizzo di fattori di crescita; i parametri di controllo, come temperatura, pH, pressione parziale di anidride carbonica e ossigeno, devono essere mantenuti stabili all'interno di un preciso intervallo per favorire la riproducibilità e la standardizzazione dei costrutti [9]. Tuttavia, le colture in condizioni statiche non permettono al nutrimento di raggiungere le parti centrali del tessuto in via di formazione poiché le sostanze nutritive vengono a contatto solo con le zone superficiali del costrutto, impedendone una crescita omogenea e originando centri necrotici dannosi che non permettono di ottenere un tessuto cartilagineo funzionale [17].

I bioreattori per la rigenerazione di costrutti tissutali tridimensionali sono in grado di regolare un processo di controllo istantaneamente alle richieste delle cellule, attraverso parametri che variano nel tempo in maniera dinamica [8,18]. Come sarà detto in seguito, la *coltura dinamica* di condrociti può essere realizzata mediante diversi tipi di bioreattori; dopo una presentazione delle tipologie progettuali, verranno approfonditi i sistemi a perfusione, che garantiscono il rifornimento nutritivo alle cellule e la generazione di un tessuto omogeneo, e si accennerà ai sistemi con applicazione di sollecitazioni meccaniche al fine di guidare correttamente e dinamicamente la proliferazione e la differenziazione dei condrociti o delle cellule staminali mesenchimali; si ricordi, a proposito di questo, l'importanza della sintesi di componenti extracellulari da parte delle cellule in compresenza con la degradazione progressiva dello scaffold polimerico di supporto.

Questi sistemi di coltura rappresentano una tecnica vantaggiosa in termini di basso rischio di contaminazione e riproducibilità e molti di questi sono serviti, come accennato in precedenza, per studiare gli effetti degli stimoli meccanici imposti dal moto del fluido e dalla pressione idrostatica indotta per simulare lo stato di sollecitazione proprio della cartilagine nativa [4,18].

La semina e la coltura dei condrociti in condizioni dinamiche sembrano, quindi, dare risultati migliori, come si osserva anche nei *risultati sperimentali* riportati di seguito (**Figure 13, 14 e 15**). Nella prima figura sono confrontati le semine e i costrutti finali ottenuti con perfusione dinamica e coltura statica [17]; la distribuzione delle cellule seminate in un bioreattore con sistema a perfusione risulta uniforme (colorazione viola) nella struttura tridimensionale rispetto al risultato ottenuto con coltura statica. Di conseguenza, la coltura dinamica, in questo caso rappresentata da un sistema a perfusione, supporta una formazione più omogenea del

tessuto in vitro ed evita la formazione di centri necrotici tipici dei costrutti ottenuti in condizioni di coltura statica.

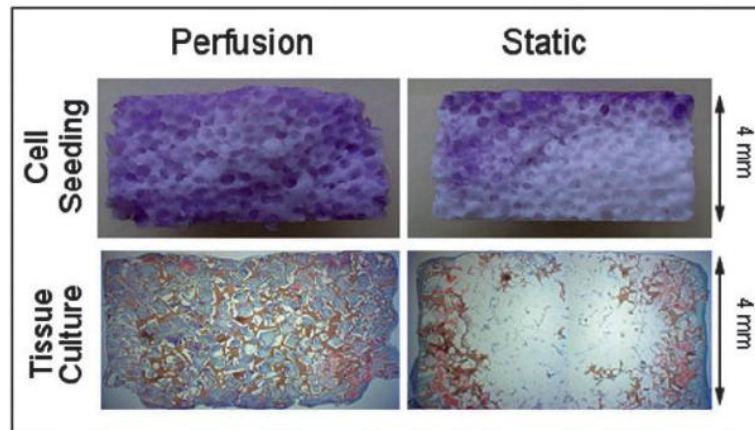


Figura 13 Distribuzione cellulare e sintesi di matrice extracellulare in condizioni dinamiche e statiche [17].

Nella seconda immagine sono evidenziate le differenze strutturali di costrutti ottenuti con coltura statica e dinamica [33]; nei tre differenti esperimenti tali disuguaglianze sono evidenziate rispettivamente con semplice colorazione blu, in base alla presenza di collagene di tipo II e, infine, in base all'allineamento delle fibre evidenziato da luce polarizzata. È evidente che solo la coltura in condizioni dinamiche permette di ottenere un tessuto il più possibile simile a quello cartilagineo nativo.

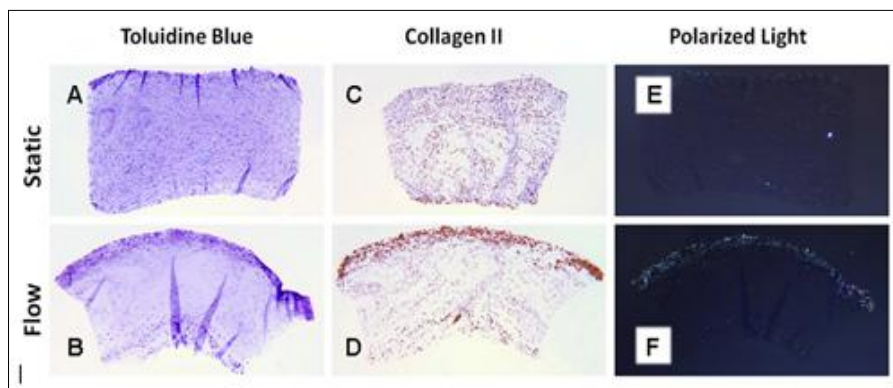


Figura 14 Differenze strutturali nei costrutti ottenuti con coltura statica e dinamica [33].

L'ultima figura che è presentata come risultato di esperimenti in vitro evidenzia la distribuzione di glicosamminoglicani, dopo un mese di coltura, nei costrutti ottenuti in bioreattori a coltura dinamica (B) e in ambienti con condizioni di coltura statiche (C). I risultati sono collegati ai quattro tipi di scaffolds polimerici microporosi sui quali vengono

fatte proliferare le cellule (A). L'immagine conferma il vantaggio della coltura dinamica per quanto riguarda l'ottenimento di un tessuto strutturalmente simile alla cartilagine articolare nativa [16].

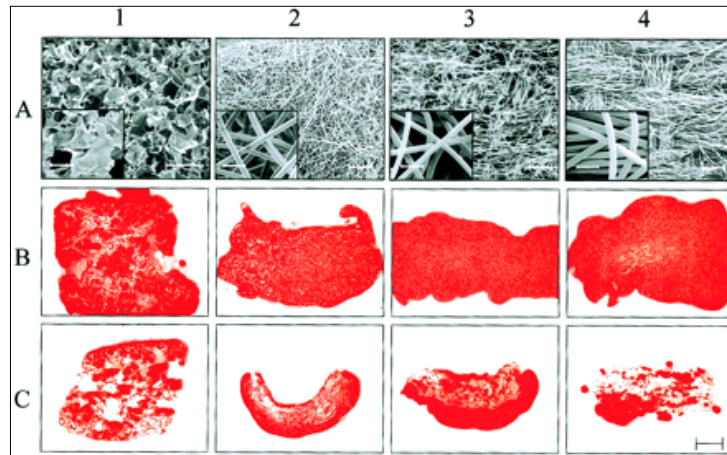


Figura 15 Struttura di quattro tipi di scaffolds (A), con unità di misura 500 µm e 50 µm, e immagini istologiche dei costrutti ottenuti in bioreattori (B) e in coltura statica (C) con unità di misura 1 mm [16].

4.1.2 Sistemi di coltura utilizzati nell'ingegneria della cartilagine

Nell'ingegneria tissutale della cartilagine sono utilizzati diversi tipi di bioreattori [4,9,12,13,14,18,19,24,25,28]; lo scopo comune è quello di favorire il mantenimento e la proliferazione delle cellule e, quindi, la formazione del tessuto (**Figura 16**).

Il mantenimento e l'iniziale proliferazione cellulare sono solitamente gestiti da sistemi bidimensionali di coltura nei quali le cellule vengono fatte semplicemente aderire su supporti monostrato; questi sistemi di utilizzo abituale sono le piastre di Petri (*Petri dishes*), le fiasche di adesione (*T-flasks*) e le placche con più sedi di coltura (*12-well plates*). Questi sistemi permettono di operare in assoluta sterilità e sono elementari da utilizzare, nonché relativamente poco costosi. Nonostante questo, essi richiedono un'attenzione particolare per quanto riguarda la semina e il cambio del mezzo di coltura, poiché il loro uso diventa inopportuno e inadeguato quando si punta alla realizzazione di veri e propri sostituti tissutali; infatti, si ricordi che tali sistemi hanno dimensioni ridotte e layout di progetto estremamente semplice: sono quindi necessari altri sistemi di coltura per superare i limiti di questi apparati [18].

La generazione di un gran numero di cellule richiede, in relazione a quanto appena detto, dispositivi di coltura tridimensionale, chiamati bioreattori, che permettano di incrementare notevolmente la quantità delle cellule e ne favoriscano la differenziazione, al

contrario di quanto fanno i sistemi di coltura statica sopra citati. Questi sistemi di coltura adattati per l'ingegneria dei tessuti e, quindi, anche per la rigenerazione della cartilagine, comprendono fiasche di agitazione (*shake flasks*), reattori agitati (*stirred vessels*) e fiasche rotanti (*spinner flasks*); questi dispositivi, nei quali le cellule vengono fatte crescere in camere microstrutturate, favoriscono la proliferazione cellulare e compongono i bioreattori per la rigenerazione dei tessuti biologici. Infatti, i micropori della struttura di supporto (*scaffold*), siano essi immobili nella struttura (*fixed bed*) oppure flottanti (*fluidized bed*), sono continuamente perfusi con mezzo di coltura che ciclicamente nutre ogni parte del costruito. Il continuo rimescolamento del nutrimento in questi sistemi rotanti guida lo sviluppo della composizione biochimica dei tessuti ed è considerato un fattore determinante nella differenziazione di cellule staminali e nella crescita di condrociti in vitro; quindi, durante la coltivazione il flusso del mezzo di coltura attraverso i pori dello scaffold facilita il trasporto di massa permettendo, in particolare, all'ossigeno di essere disponibile a tutte le cellule immobilizzate nei pori interconnessi [9,12,18].

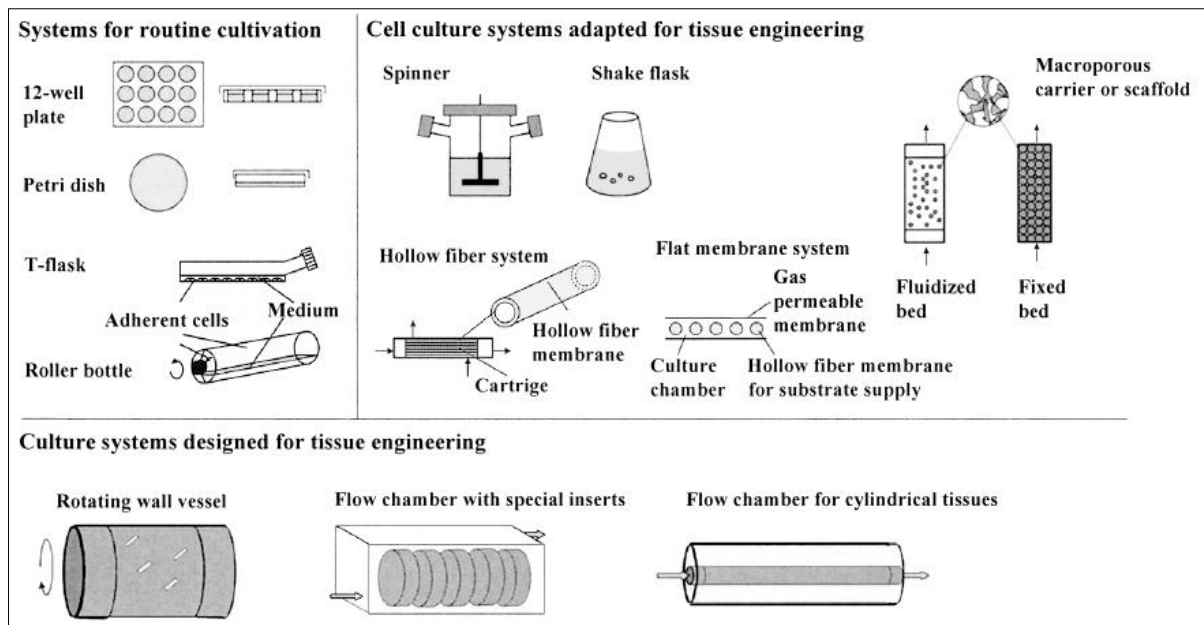


Figura 16 Sistemi di coltura cellulare utilizzati nell'ingegneria del tessuto cartilagineo [18].

I bioreattori progettati appositamente per l'ingegneria dei tessuti, illustrati in basso in figura, rappresentano un tentativo di perfezionamento ed evoluzione dei tradizionali sistemi di coltura e consistono nell'impiego di contenitori solitamente cilindrici e rotanti attorno ad un asse orizzontale in cui i costrutti sono liberi di muoversi. Molti ne sono stati realizzati

specificatamente per i vari tipi di tessuti biologici, ma pochissimi sono commercializzabili ad oggi [4,18]. In futuro la ricerca punterà al perfezionamento di questi sistemi e al loro inserimento nell'ambito clinico e ospedaliero, poiché, per effetto del bilancio dinamico tra forza centrifuga e forza di gravità, esiste un movimento relativo tra supporto tridimensionale e flusso perfusivo che, in maniera controllata e monitorata, favorisce l'adesione cellulare ed origina le sollecitazioni meccaniche desiderate; nel caso della cartilagine articolare si vedrà l'importanza dell'applicazione di pressione idrostatica e idrodinamica, di compressione e di sforzo di taglio [4].

Un esempio concreto di bioreattore per l'ingegneria tissutale della cartilagine riguarda il bioreattore a parete rotante progettato dalla NASA (National Aeronautics and Space Administration) nel 1998 [12,28]. Il flusso del fluido di nutrimento riesce a contrastare la forza di gravità incoraggiando la crescita delle cellule in maniera naturale, le quali si associano e formano una complessa matrice extracellulare; il bioreattore cilindrico ospita, inoltre, un filtro che permette all'ossigeno e ai nutrienti di raggiungere il costrutto e al diossido di carbonio e ai prodotti di scarto di uscire dalla camera di coltura. Si ricordi che la rotazione del fluido deve essere efficiente ai fini del nutrimento, ma non deve avere eccessiva forza da distruggere le cellule (**Figura 17**).



Figura 17 Bioreattore a parete rotante della NASA per l'ingegneria della cartilagine [28].

In conclusione, ogni tipo di tessuto che si voglia rigenerare in vitro e impiantare nell'organismo richiede una precisa struttura geometrica e, per questo, deve essere ricostruito in un adeguato tipo di bioreattore progettato appositamente; in aggiunta, più sistemi di coltura

sono stati progettati e sperimentati per l'ingegnerizzazione dello stesso tessuto biologico, ma non esiste un unico tipo di bioreattore che, in assoluto, riesca a riassumere in sé tutte le caratteristiche strutturali e funzionali atte a generare un tessuto perfetto [9,18]. Come sarà approfondito in seguito, infatti, alcuni bioreattori per la cartilagine possiedono sistemi che puntano di più sulla stimolazione compressiva del costrutto, altri che applicano sforzi di taglio o pressione idrostatica e idrodinamica e altri ancora che stimolano il costrutto con più campi fisici contemporaneamente; tutti permettono di ottenere un tessuto che si avvicina sufficientemente alla cartilagine nativa, ma nessuno può, attualmente, riprodurla in maniera perfetta.

4.1.3 La perfusione

I bioreattori per la rigenerazione della cartilagine articolare e, in generale, per qualsiasi processo di ingegnerizzazione tissutale, devono possedere, come già ampiamente discusso, un sistema che guidi e forzi il mezzo di coltura attraverso lo scaffold, favorendo il trasporto di massa, la semina cellulare e la loro proliferazione e che superi i limiti delle procedure manuali di semina, collegati al ricambio del mezzo di coltura, al rischio di contaminazione e al trasporto diffusivo puramente passivo, tipici delle colture in piastra e in fiasca [8,12,18,21,30].

In particolare, l'impiego di bioreattori a perfusione è vantaggioso perché aumenta l'efficacia dei processi di semina e l'uniformità della distribuzione delle cellule all'interno di scaffolds porosi, consentendo l'ottenimento di costrutti ingegnerizzati più omogenei; aumenta l'efficienza del trasporto di ossigeno e metaboliti e della rimozione di cataboliti; se associato all'uso di sensori di ossigeno e pH e all'implementazione di strategie di controllo in retroazione, consente di automatizzare e controllare le operazioni di ricambio del mezzo di coltura; permette la sollecitazione fisica delle cellule seminate negli scaffolds porosi determinando condizioni di coltura che meglio rappresentano quelle cui i tessuti sono sottoposti nel naturale sviluppo in vivo; inoltre, i bioreattori a perfusione, diminuendo il ricorso alle operazioni manuali, favoriscono la traduzione delle procedure dell'ingegneria dei tessuti dalla ricerca all'applicazione clinica, aumentando la tracciabilità, la riproducibilità, l'efficienza e la sicurezza dei processi, tutti requisiti chiave affinché tali procedure possano competere con le alternative terapeutiche tradizionali, sia in termini di costo che in termini di rispetto delle regole di produzione [21,30].

Uno schema, con relativa fotografia, di un sistema a perfusione per bioreattori applicati nell'ingegneria dei tessuti è riportato di seguito (**Figura 18**) [21].

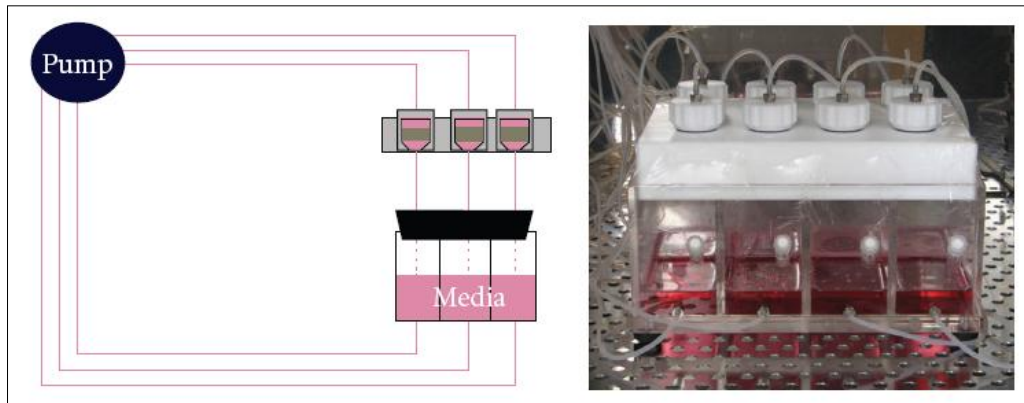


Figura 18 Schema e fotografia di un sistema a perfusione a 8 camere presente nei bioreattori [21].

In generale, i sistemi a perfusione possono possedere filtri sterili per lo scambio dei gas, circuiti chiusi per il mezzo di coltura con pompe peristaltiche, sensori ottici, dispositivi di controllo a retroazione e altri apparati di controllo [18,22]. La sospensione cellulare è tenuta in continuo movimento attorno al supporto e, in queste condizioni, le cellule aderiscono più rapidamente ed efficacemente al materiale e si distribuiscono in maniera uniforme dentro lo scaffold, anche nella parte centrale, a differenza della statica deposizione gravitazionale (**Figura 19**). Di conseguenza, anche la proliferazione e la produzione di matrice extracellulare avviene più uniformemente nello spazio, generando un tessuto più omogeneo, molto simile alla cartilagine naturale. Il movimento del mezzo di coltura, oltre a favorire la penetrazione delle cellule nella matrice porosa, fornisce una sollecitazione meccanica alle cellule stesse, stimolandone l'attività e favorendo il trasporto di sostanze nutrienti e di prodotti di scarto; attraverso il controllo dei parametri di coltura, gli effetti della perfusione incidono positivamente sulla sintesi e accumulazione di GAGs e altri componenti della ECM da parte dei condrociti [4,18].

I dispositivi dotati di sistemi perfusivi rappresentano, pertanto, efficaci strumenti per migliorare le procedure dell'ingegneria dei tessuti biologici, sono ottimi sistemi-modello per lo studio dei meccanismi di sviluppo dei tessuti biologici in vitro e costituiscono una tappa importante nel percorso che porterà sempre di più ad un'affidabile, sicura ed economicamente sostenibile applicazione clinica dell'ingegneria nella medicina rigenerativa [21,30].

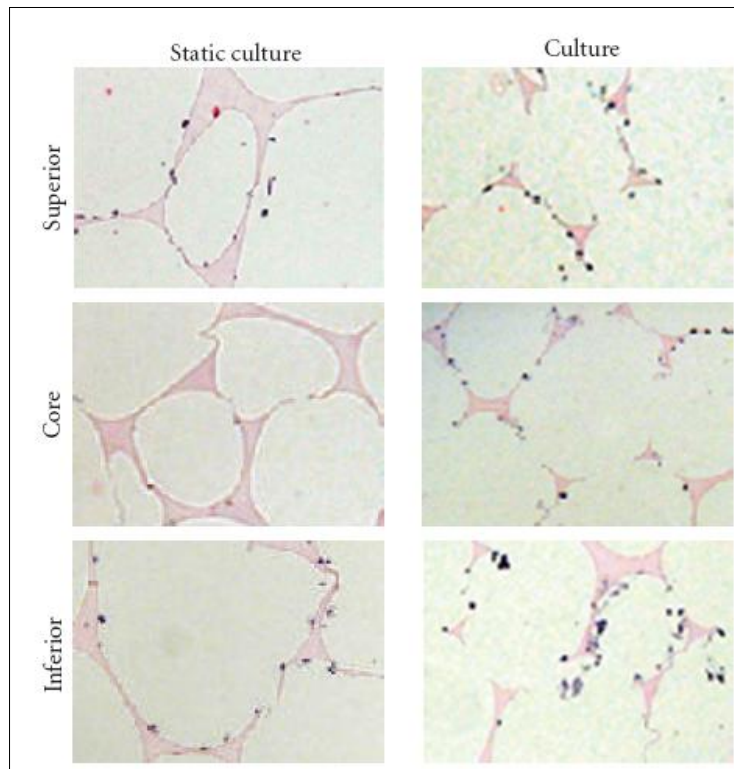


Figura 19 Densità cellulare nella parte superiore, centrale e inferiore dello scaffold. Nel caso di coltura dinamica con flusso perfusivo (a destra) il costruito esibisce una densità cellulare più omogenea rispetto alla coltura statica, in particolare in relazione alla zona centrale del supporto tridimensionale [21].

4.2 ASPETTI IMPORTANTI NELLA PROGETTAZIONE DI UN BIOREATTORE

In relazione alle applicazioni dell'ingegneria dei tessuti, i bioreattori sono impiegati per molteplici scopi, come la proliferazione delle cellule per terapie individuali, la generazione di costrutti tridimensionali in vitro a partire da cellule isolate, dispositivi di supporto diretto agli organi [14,18,29]. Nonostante un protocollo progettuale perfetto non sia ancora stato definito per la cartilagine articolare [9], le potenzialità di un bioreattore sono molteplici e possono essere sfruttate per migliorare la qualità strutturale e funzionale dei tessuti bioartificiali. Al di là dei requisiti globali di progetto presentati successivamente, bisogna ribadire alcune specifiche necessità per la generazione di costrutti cartilaginei tridimensionali; queste includono la proliferazione delle cellule, la semina su scaffolds porosi,

il rifornimento di nutrienti all'interno del tessuto in via di formazione e la stimolazione dello stesso [4,9,14,18].

La *proliferazione delle cellule* è il primo obiettivo che ci si pone nella coltura di un tessuto biologico. Solitamente, come già detto in precedenza, solo un piccolo numero di cellule può essere ottenuto da biopsia e questo richiede un'espansione del numero di cellule di diversi ordini di grandezza. Per una prima espansione cellulare sono solitamente utilizzati piccoli piatti di coltura, come piastre di petri, placche, fiasche; ma successivamente, a causa del processo di de-differenziazione dei condrociti che questi elementari sistemi di coltura non riescono ad evitare, è necessario l'impiego di bioreattori per ottenere un significativo e adeguato livello di espansione cellulare [18].

Nella *semina cellulare su scaffolds* è necessaria non solo un'elevata densità iniziale delle cellule, ma anche una loro omogenea distribuzione all'interno dello scaffold, sia per un'adeguata produzione di ECM sia per il conferimento delle corrette proprietà della cartilagine nativa al neo-tessuto. Una semina efficace e uniforme è possibile solo grazie alla generazione di un flusso del terreno di coltura [4,18]. Inizialmente l'unico metodo disponibile era la semina statica, in cui la sospensione cellulare sedimentava per gravità sullo scaffold, non assicurando nessuna uniformità del costruito; successivamente sono state proposte fiasche in cui la sospensione cellulare è messa in rotazione attorno allo scaffold, ma questi metodi tradizionali non sono riusciti a soddisfare le necessità di semina esposti. Si è reso, in tal senso, opportuno l'utilizzo di bioreattori che inducano un sistema di perfusione della sospensione con una velocità tale da non compromettere, però, la vitalità delle cellule. Tale metodo garantisce, come visto, la massima efficacia consentendo una distribuzione cellulare altamente uniforme su tutta la sezione di interesse [4,22,30].

Una questione critica per i bioreattori coinvolge il problema già visto del *trasporto di massa*; la struttura e la funzione dei tessuti è condizionata da un adeguato trasporto di gas, nutrienti, fattori metabolici e fattori di crescita e dalla presenza di flussi convettivi e diffusivi. La mancanza di una vascolarizzazione nel tessuto cartilagineo rende necessario l'impiego dei bioreattori, in modo da indurre un flusso nel terreno di coltura che favorisca il trasporto di massa e, quindi, la crescita del tessuto stesso [4,12,18,22].

La *stimolazione chimico-fisica* del costruito è finalizzata a simulare più fedelmente la situazione a cui è sottoposta la cartilagine durante lo sviluppo e il funzionamento in vivo. Vari studi hanno confermato, infatti, che la stimolazione meccanica di costrutti cartilaginei, come ad esempio compressione o pressione idrostatica o idrodinamica o applicazione di sforzi di

taglio, migliora notevolmente le proprietà del neo-tessuto ingegnerizzato, anche se non ci sono risultati che attualmente forniscono in assoluto gli intervalli ideali di ampiezza, frequenza e durata degli stimoli da applicare [9,12,18,22].

Di seguito sono riportate e descritte le *specifiche generali di progettazione* dei bioreattori per la medicina rigenerativa [4,14,18] (**Figura 20**).

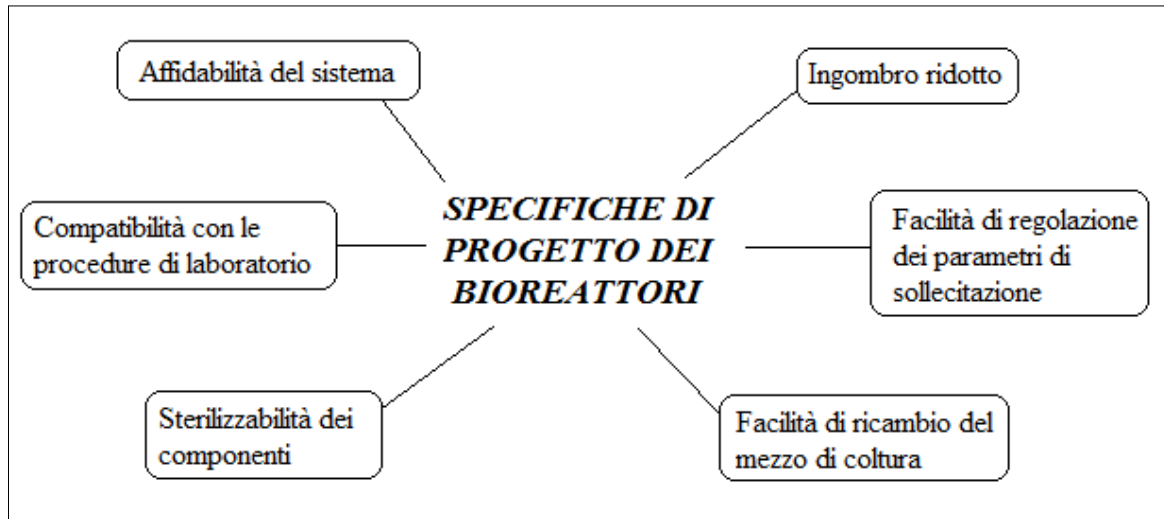


Figura 20 Specifiche generali di progettazione dei bioreattori per la medicina rigenerativa.

L'affidabilità del sistema risulta indispensabile considerando anche i lunghi periodi di coltura spesso previsti. Lo sviluppo di un progetto deve prevedere la possibilità di apportare modifiche successive al dispositivo e deve tener conto dei requisiti di modularità che ne semplifichino l'attuazione e l'utilizzo. Non si dimentichi che i costi di realizzazione e di utilizzo dei dispositivi devono essere quanto più possibile contenuti.

La compatibilità con le procedure di laboratorio prevede che il sistema per la coltura cellulare sia sterile; è consigliabile, di conseguenza, effettuare il minor numero di manovre manuali possibili. La scelta del metodo di sterilizzazione dipende nello specifico dal materiale con cui è realizzato il bioreattore; in ogni caso, è necessaria la proprietà di sterilizzabilità dei componenti a contatto con il mezzo di coltura e con le cellule. La camera di coltura, per quanto detto, deve essere sterile.

Il bioreattore durante il periodo di funzionamento deve essere inserito in un incubatore che garantisca il costante controllo della qualità dell'aria, perciò deve avere ingombro ridotto. Questa specifica potrà essere trascurata quando verranno realizzati bioreattori nella cui struttura è automaticamente compresa la funzione incubatrice. Oltre alla qualità dell'aria, un

bioreattore deve regolare e monitorare gli specifici parametri della coltura e dello stato funzionale del costrutto, così da rendere riproducibili le condizioni di coltura.

Poiché il sistema deve poter essere utilizzato dal più ampio numero di utenti, anche non professionisti del settore, i parametri di sollecitazione devono poter essere regolati con una certa facilità grazie a guide di utilizzo che permettano anche a chi non conosce il programma di impostare correttamente i parametri da regolare.

Infine, considerando il fatto che il ricambio del mezzo di coltura è necessario per mantenere in vita le cellule, esso deve poter essere eseguito con una certa facilità, possibilmente con l'aiuto di un sistema a sensori che lo controlla.

Per fornire un semplice riscontro di quanto esposto, vengono di seguito presentati due *esempi di progetto* di un bioreattore per l'ingegneria dei tessuti [14,18].

Il primo esempio analizzato possiede un sistema di perfusione a flusso continuo per favorire la coltivazione delle cellule in condizioni costantemente controllate attraverso la regolazione e il monitoraggio di parametri di coltura (**Figura 21**) [18]. Al sistema in esame appartengono, poi, pompe di nutrimento, recipienti per il mezzo di coltura, umidificatori, e altri dispositivi di controllo.

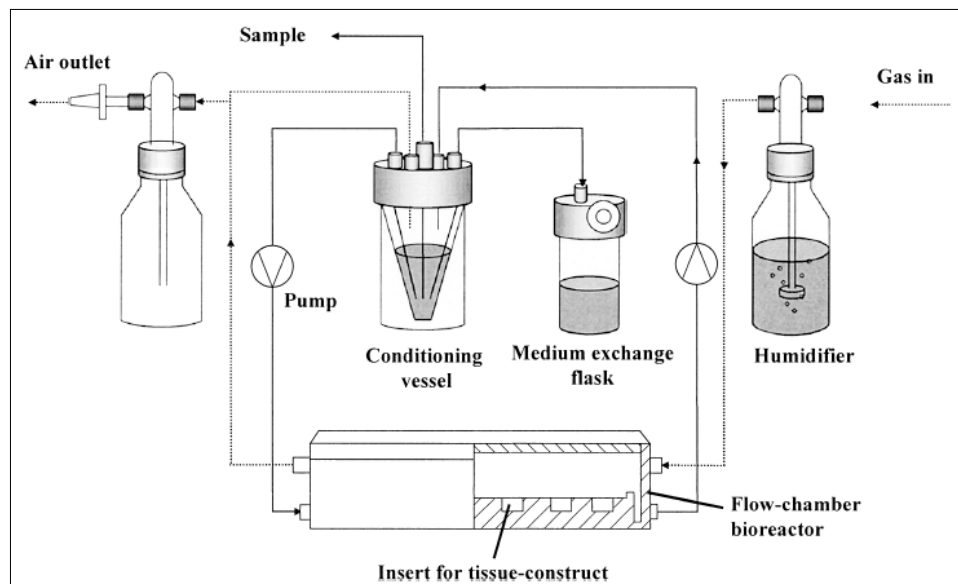


Figura 21 Esempio di progetto di bioreattore a flusso continuo perfusivo [18].

Un secondo progetto prevede la realizzazione di un bioreattore composto di due parti principali: un sistema di sollecitazione dotato di sensore piezoelettrico, nella parte superiore del bioreattore, e una parte inferiore con quattro camere di coltura (**Figura 22**) [14]. Anche in

questo caso, la nutrizione dipende da un flusso continuo che raggiunge i tessuti in via di formazione. Il sistema di sollecitazione consiste in uno stampo che causa deformazione dei costrutti localizzati in camere di acciaio di $30 \times 20 \times 5 \text{ mm}^3$ ciascuna. Un attivatore piezoelettrico solleva e abbassa le quattro componenti dello stampo nello stesso momento. In questo modo, il movimento dello stampo guidato dal sensore piezoelettrico è trasferito al costrutto sotto forma di deformazione. La frequenza e il tipo di sollecitazione possono, così, essere modulati dalla frequenza alla quale si fa andare il generatore. La possibilità di controllare lo stimolo trasferito ai costrutti deriva, ad esempio, dall'applicazione del metodo degli elementi finiti, come approfondito nel riferimento bibliografico, nonostante le semplificazioni matematiche non possano rappresentare completamente la situazione reale [14].

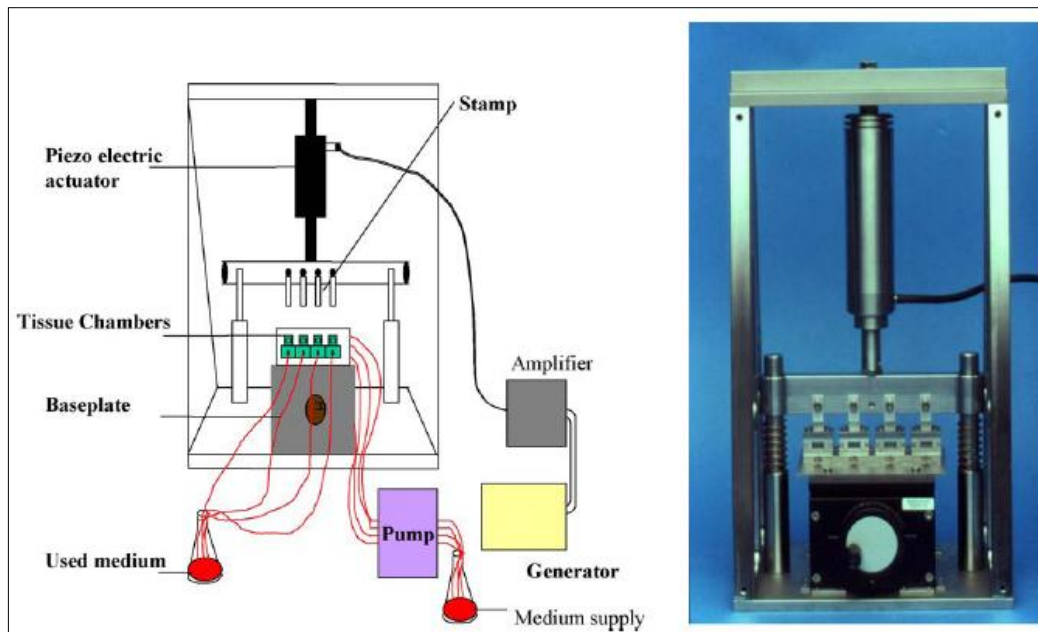


Figura 22 Bioreattore a sensore piezoelettrico [14].

In conclusione di quanto fino ad ora detto, il complesso processo di progettazione di un bioreattore, che richiede appropriate specializzazioni a seconda del tipo di tessuto ingegnerizzato che si intende realizzare, comporta, in generale, la presenza di sensori e unità di controllo di processo che favoriscano la realizzazione di un costrutto bioartificiale di notevole complessità grazie a conoscenze scientifiche e tecnologiche altamente specializzate e innovative [4]. Si ribadisce, però, che, nonostante i numerosi studi in quest'ambito, il perfetto protocollo di produzione della cartilagine articolare non è ancora stato, ad oggi, definito [9].

4.3 GLI EFFETTI DELLE SOLLECITAZIONI MECCANICHE SUI COSTRUTTI CARTILAGINEI

Il comportamento meccanico della cartilagine articolare in vivo è, come visto inizialmente, estremamente complesso. Le sollecitazioni che più incidono sulla risposta meccanica del tessuto e sulle sue proprietà sono la compressione, lo sforzo di taglio e la pressione idrostatica [4,7,9,18,22,25]. Per riprodurre le stesse condizioni di crescita del tessuto nativo, è necessario proporre bioreattori che, unitamente alla diversa tipologia strutturale, trasmettano al costrutto una o più di una delle forze meccaniche citate.

Differenti e/o combinate procedure di stimolazione sono state sperimentate nella coltura dei tessuti biologici; le principali forze impiegate, a questo scopo, nei bioreattori sono illustrate di seguito (**Figura 23**) [9].

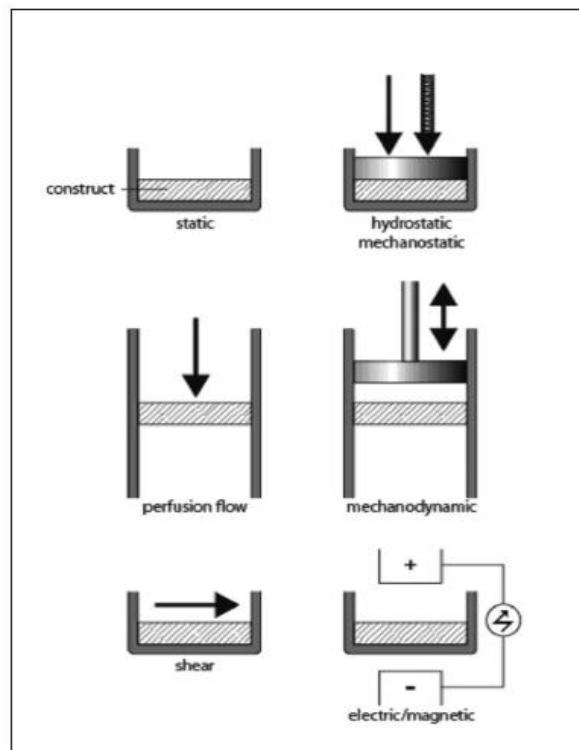


Figura 23 Procedure di stimolazione impiegate nei bioreattori per l'ingegneria dei tessuti [9].

Per la cartilagine articolare, in particolare, le principali forze applicate nei dispositivi di coltura sono la pressione idrostatica, quella idrodinamica, la compressione dinamica applicata ciclicamente e lo sforzo di taglio. Ciò a cui si punta è, infatti, mimare la sollecitazione meccanica che interessa la cartilagine in vivo come risultato del quotidiano e naturale

movimento delle giunture; gli stimoli fisici permettono, quindi, di modulare e controllare il metabolismo cellulare in base all'ampiezza e alla frequenza alle quali vengono applicati [9,22]. Esistono, poi, nella rigenerazione dei tessuti altre forme di stimolazione che includono dispositivi elettrici, ultrasuoni e forze centrifughe; queste, però, non sono applicate sovente nel caso della cartilagine articolare, quindi se ne trascurava l'approfondimento [22].

Lo *sforzo di taglio* è la forza alla quale la cartilagine deve resistere quando il liquido sinoviale è pressato lungo la superficie del tessuto conseguentemente al movimento della giunzione articolare. Esso può essere applicato in maniera piuttosto semplice attraverso vari metodi che generino un gradiente orizzontale di forze durante la coltivazione in fiasche, mantenendo il costrutto libero all'interno del mezzo di coltura. Attraverso bioreattori a cilindro rotante a perfusione, infatti, il mezzo di coltura può formare un flusso fluido laminare e trasmettere al costrutto uno sforzo di taglio simile a quello che si manifesta in vivo e variabile in intensità a seconda di come viene manipolato il mezzo di coltura. L'ambiente deve avere, come già detto, temperatura costantemente controllata, struttura chiusa per evitare la dispersione del mezzo di coltura e, a seconda della struttura del supporto tridimensionale utilizzato, la forza applicata tangenzialmente ad ogni punto del costrutto può raggiungere l'intera popolazione cellulare oppure solo le cellule che crescono in superficie. Si ricordi, infatti, che i componenti cartilaginei responsabili della resistenza allo sforzo di taglio sono le fibre di collagene, che si sviluppano maggiormente proprio nella zona superficiale del tessuto nativo; quindi, una sollecitazione dinamica e controllata delle cellule superficiali incoraggia la sintesi di collagene, componente fondamentale del tessuto desiderato [22].

Si è affermato, inizialmente, che l'applicazione di *pressione idrostatica* rappresenta una delle più importanti sorgenti di carico che interessa le giunture articolari. Per l'ingegnerizzazione della cartilagine, i sistemi che permettono di applicare nei bioreattori questo tipo di stimolazione prevedono, in via generale, l'impiego di pompe idrauliche, siringhe e valvole controllate in maniera computerizzata. La pressione idrostatica è generata in maniera intermittente tramite la compressione del mezzo di coltura che si trova a contatto con il costrutto; una stimolazione *idrodinamica* si può, in aggiunta, ottenere, combinando la pressione idrostatica con un flusso perfusivo dinamico controllato. In ogni caso, i vantaggi di questi sistemi di coltura sono l'abilità di applicare valori di pressione anche superiori a quelli che si manifestano in vivo e la possibilità di monitorare il processo in maniera precisa e altamente controllata; gli svantaggi sono, invece, dovuti all'impossibilità di cambiare il mezzo di coltura durante l'applicazione della compressione. Le conseguenze dell'applicazione di

pressione idrostatica o idrodinamica sui costrutti cartilaginei riguardano un aumento del contenuto di collagene e proteoglicani, l'ottimizzazione della densità cellulare che deve essere omogenea ed elevata, e la qualità della ECM del tessuto ingegnerizzato [9,22,25].

Numerosi studi ed esperimenti sono stati condotti in relazione all'applicazione di *compressione dinamica* ai tessuti cartilaginei in via di formazione. Anche nel caso della compressione, i risultati sono visibili nell'incremento di glicosamminoglicani, nella differenziazione delle cellule cartilaginee o delle cellule staminali, nella robustezza del tessuto e nella qualità della matrice extracellulare, che viene sintetizzata correttamente dalle cellule dal punto di vista della composizione e dell'organizzazione interna [7,9,22].

Démarteau et al. hanno sviluppato un'unità di coltura per la deformazione compressiva delle cellule cartilaginee coltivate nei bioreattori (**Figura 23**) [7].

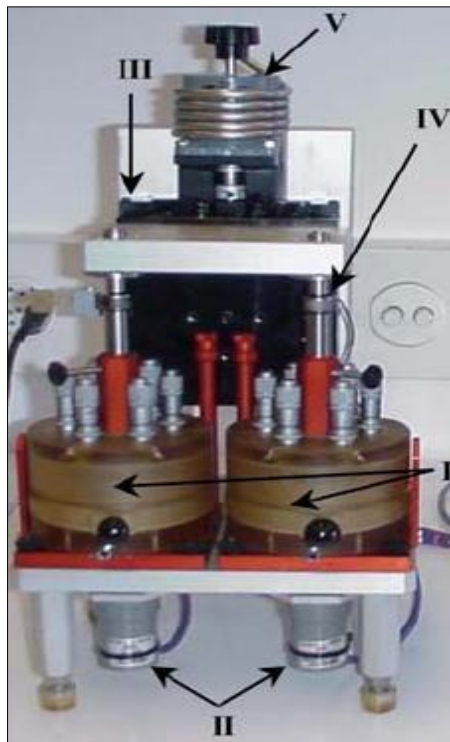


Figura 23 Sistema di stimolazione di Démarteau et al. con camere di compressione a sei postazioni di coltura (I), agitatori magnetici (II), tavolo di posizionamento (III), pistone di carico (IV) e motore (V) [7].

Attraverso l'applicazione di un carico ciclico di tipo sinusoidale, viene stimolata la sintesi di GAGs e di collagene di tipo II da parte delle cellule seminate, evidenziando in tal modo la forte interazione che sussiste tra le cellule e la matrice extracellulare e che è alla base della risposta meccanica del tessuto e della sintesi dei componenti dello stesso. Assieme alla robustezza della cartilagine, con questo tipo di stimolazione ne viene aumentata anche

l'elasticità in quanto alla fine di ogni ciclo compressivo, che corrisponde a intensità di stimolazione nulla, il costrutto viene fatto ritornare completamente al suo originario spessore. L'esempio brevemente descritto dà testimonianza del fatto che un'analisi quantitativa e un modello computazionale di deformazione e sollecitazione che interessano la cartilagine nativa in vivo sono necessari per stabilire precise relazioni tra le condizioni da imporre in vitro nel processo di ingegnerizzazione del tessuto. Assieme, poi, alla caratterizzazione biomeccanica del tessuto generato, gli esperimenti di compressione dinamica aiutano a raggiungere il livello desiderato di integrità meccanica e funzionalità adeguata all'impianto [7].

In conclusione, è doveroso affermare che i migliori risultati in termini di composizione biochimica della cartilagine sono stati ottenuti dalla coltivazione di *composti osteocondrali* in bioreattori a doppia camera [9,13]. Ciò significa che la produzione di cartilagine è più efficace se questa viene coltivata in stretta prossimità del tessuto osseo, come in natura avviene. I migliori risultati si riscontrano nell'aumento di produzione di glicosamminoglicani e collagene totale, anche se non si evidenziano considerevoli aumenti di collagene di tipo II. I composti osteocondrali sono, inoltre, strutturalmente ben definiti, con solo la parte ossea mineralizzata e presenza di GAGs esclusivamente nello strato cartilagineo, il che conferma ulteriormente gli studi fatti da *Mahmoudifar et al.* a dimostrazione del fatto che effetti superiori e vantaggiosi nella composizione del tessuto cartilagineo si ottengono quando esso viene fatto sviluppare in contatto con tessuto osseo in via di formazione; necessaria, a questo scopo, rimane la coltura dinamica nei bioreattori [13].

CAP. 5 CONCLUSIONE

5.1 CENNI AGLI ASPETTI NORMATIVI ED ETICI DELL'INGEGNERIA DEI TESSUTI

Le ricerche sperimentali che riguardano l'applicazione clinica dell'ingegneria dei tessuti hanno sviluppato nuove strategie terapeutiche applicabili a patologie ereditarie e acquisite, ossia i *prodotti per terapia cellulare (PTC)*, definiti dall'Istituto Superiore della Sanità come “*preparazioni somministrate ad un essere umano con finalità analoghe ai medicinali che contengano cellule vive o parti complesse di esse, sia che queste siano somministrate da sole o insieme a matrici di origine sintetica o biologica*”. I prodotti rappresentati da ricostruzioni di cartilagine mediante la semina di staminali stromali o condrociti su scaffolds porosi rientrano, dunque, nella definizione di PTC [4].

I *rischi* connessi con la terapia cellulare e i prodotti per terapia cellulare comprendono la trasmissione di malattie infettive, la proliferazione di cellule non sane e la reazione immunitaria nel caso di utilizzo di cellule eterologhe. Per minimizzare questi rischi vengono imposti test di sicurezza e qualità tali da assicurare l'origine appropriata dei materiali utilizzati, l'integrità funzionale del prodotto, la qualità e la sicurezza durante il processo di produzione, l'efficacia e la non tossicità dei costrutti. A proposito di questo, il Ministero della Salute, in accordo con la legislazione vigente, ha deliberato che i prodotti medicinali per sperimentazione clinica e i PTC vengano sottoposti agli stessi test di qualità richiesti per la loro messa in commercio per minimizzare il più possibile il rapporto rischio/beneficio. Il

Ministero stesso certifica, dopo ispezione, che la produzione avvenga nel rispetto delle regole di *Good Manufacturing Practice* (GMP); in particolare, per i prodotti per terapia cellulare le GMP impongono stanze sterili, procedure operative standard, tracciabilità di prodotti e reagenti, controlli di qualità e requisiti strutturali e ambientali ben precisi. Infine, la normativa sulla sperimentazione clinica prevede che protocolli di studio siano redatti e approvati prima dell'inizio dello studio stesso e che la raccolta e la valutazione dei dati siano effettuate secondo le regole di *Good Clinical Practice* (GCP) [4,9,30].

L'obiettivo della Commissione Europea, con la “*Proposta di regolamento del Parlamento Europeo e del Consiglio sui medicinali per terapie avanzate*” del 2005, sottolinea, a proposito di quanto detto, la necessità di diminuire il livello di rischio associato alla produzione di tessuti biologici e, nello stesso tempo, aumentarne gli standard di qualità ed efficacia. Un problema che la Commissione Europea ha cercato di risolvere, con questo regolamento, riguarda il fatto che il mercato e lo sviluppo industriale nel campo dell'ingegneria dei tessuti sono rallentati perché i prodotti dell'ingegneria dei tessuti non sono classificati come medicinali e, quindi, mancano di un riferimento normativo a livello europeo; questo comporta il fatto che esistono diversi approcci nazionali sia nei riguardi di una classificazione giuridica che in ambito di autorizzazione dei prodotti per terapie avanzate, situazione che penalizza gravemente le capacità innovative e la competitività europea in questo settore chiave della medicina rigenerativa. Ci si propone, quindi, di colmare l'attuale lacuna normativa che riguarda tutte le tecniche di terapie avanzate, compresi in modo particolare i PTC, i quali non sono ancora disciplinati dalla legislazione della Comunità Europea [4].

La sperimentazione e l'utilizzo nella pratica clinica di prodotti biologici ingegnerizzati deve scontrarsi, come accennato in più punti, anche con problematiche che riguardano la sfera *etica*. Nel caso di utilizzo di popolazioni di cellule autologhe l'aspetto etico si limita a garantire che il paziente sia informato dei rischi e dei benefici legati a questo tipo di terapia. Normalmente questi aspetti sono presenti nel protocollo dello studio, nella scheda informativa che viene data al paziente e nel consenso che quest'ultimo può firmare. Ogni studio deve essere accuratamente e preventivamente valutato e approvato da un comitato etico.

Un discorso diverso è riservato ai tessuti o alle cellule conservati nelle apposite banche poiché, nel caso di tessuti ingegnerizzati che si appoggiano a questo tipo di risorsa, viene coinvolto l'aspetto relativo all'appartenenza del materiale di origine da cui sono ricavate le cellule e i possibili diritti di sfruttamento. In questo settore non sono ancora definite le linee

guida e, per i rari casi già affrontati, la pratica clinica si è ricondotta alle normative e alla pratica corrente che regola il trapianto d'organi. Nel caso questi trattamenti con prodotti cellulari eterologhi dovessero permettere risultati clinici importanti, sorgerebbero la necessità e la contemporanea difficoltà di regolamentare queste attività per limitare i rischi nei pazienti e per impedire forme di sfruttamento economico illecito [4]. Nel caso dell'ingegneria tissutale della cartilagine le sorgenti cellulari utilizzate sono cellule autologhe, siano esse differenziate o staminali; si ricordi, però, che, sebbene le ricerche sperimentali nel campo della cartilagine ingegnerizzata siano molto attive, gli studi e le applicazioni cliniche non hanno ancora dimostrato un'effettiva efficacia dei prodotti cellularizzati, anche per i motivi appena esposti [4,14,17,20].

5.2 CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE E PROSPETTIVE FUTURE

Per concludere questo lavoro di approfondimento, risulta utile riassumere in maniera concisa quanto è stato trattato. Il danneggiamento e il deterioramento della cartilagine articolare sono due dei problemi tissutali che maggiormente affliggono la popolazione mondiale. Per tale tipo di cartilagine, essendo essa fortemente limitata nella capacità di autorigenerarsi, ad oggi non esiste una terapia che garantisca qualitativamente e temporalmente un recupero completo del tessuto. Nonostante ciò, per quanto riguarda anche altri ambiti della medicina rigenerativa, le tecniche dell'ingegneria tissutale sono considerate la migliore risorsa per ottenere un tessuto biologico sufficientemente stabile e applicabile in ambito clinico.

Un ruolo centrale nell'ingegneria della cartilagine è ricoperto dai *bioreattori*, progettati per trasmettere al costrutto un flusso a perfusione o sforzi di taglio o pressione idrostatica o compressione ed eventualmente una combinazione di questi fattori, con lo scopo di ricreare in vitro l'ambiente fisiologico e gli stimoli ai quali, in maniera naturale e quotidianamente, è sottoposta la cartilagine articolare. I bioreattori sono utilizzati nella rigenerazione della cartilagine per ottimizzare vari aspetti della coltura cellulare, come ad esempio il trasporto di nutrienti, l'efficienza dei fattori di crescita, la pressione parziale dell'ossigeno e la stimolazione meccanica dei costrutti; ciò è reso possibile grazie a un completo e continuo monitoraggio delle condizioni di coltura. Basilare nella coltura in vitro della cartilagine è, dunque, la riproduzione della struttura e dell'organizzazione interna della

cartilagine nativa, associata alla generazione di un tessuto anisotropo e meccanicamente simile ad essa [22,33]. I vantaggi che i bioreattori offrono alla medicina rigenerativa permettono una più efficiente proliferazione dei condrociti che, a sua volta, determina un miglioramento nella formazione, nella composizione e nell'arrangiamento strutturale della matrice extracellulare. Inoltre, la deformazione del tessuto verso componenti cartilaginee fibrose viene, così, evitata [22].

Nonostante i tanti vantaggi in termini di automazione e controllo della crescita dei costrutti, i prodotti ingegnerizzati e standardizzati in bioreattori ad azione dinamica non hanno ancora, come detto più volte, un riscontro produttivo nella pratica clinica. Sulla base delle condizioni critiche presentate nei capitoli precedenti, la questione che emerge è se sia effettivamente utile e necessaria l'applicazione di metodi ingegneristici per la rigenerazione della cartilagine articolare. Da una parte, una risposta completa potrà probabilmente essere espressa solo quando gli studi clinici sulle prospettive, sui controlli e sulla riproducibilità del tessuto ingegnerizzato saranno condotti a lungo termine, fornendo misure quantitative precise in combinazione con valutazioni qualitative del tessuto impiantato. D'altra parte, c'è già l'importante certezza che il tessuto cartilagineo ingegnerizzato rappresenti una necessaria e potenziale risorsa per ottenere un modello che descriva quantitativamente lo sviluppo fisico e biochimico della cartilagine e che identifichi le precise condizioni richieste per indurne la rigenerazione. Questo sarà possibile quando la ricerca riuscirà a formalizzare le relazioni che legano gli specifici parametri di coltura con le risultanti proprietà meccaniche del neo-tessuto [17]. A riguardo, *Whittaker et al.* hanno sviluppato un modello matematico che, controllando il flusso di coltura attraverso la struttura tridimensionale dello scaffold, determina la distribuzione adeguata degli stimoli da applicare e quantifica apporti nutritivi e prodotti di scarto in modo da contribuire alla progettazione dettagliata ed efficiente di bioreattori per la rigenerazione del tessuto cartilagineo; questo tentativo si applica, però, solo a specifiche configurazioni strutturali semplificate del dispositivo e del costrutto e non è, quindi, ad oggi generalizzabile [26].

Nella figura che segue sono presentate le *potenzialità* offerte dall'ingegneria tissutale della cartilagine (**Figura 24**). L'obiettivo più immediato della rigenerazione in vitro di tessuto cartilagineo è chiaramente quello di riparare i difetti del tessuto nativo (freccia rossa in basso). Come accennato, la ricerca di precise relazioni di causa-effetto tra la modulazione dei parametri (a sinistra) e le risultanti proprietà del tessuto (a destra) guida gli esperimenti nel tentativo di comprendere i generali meccanismi di condrogenesi, importanti, a loro volta, per

migliorare il processo di rigenerazione del tessuto. Queste conoscenze permetteranno sempre di più lo sviluppo di nuove strategie di rigenerazione (freccia rossa in alto) [17].

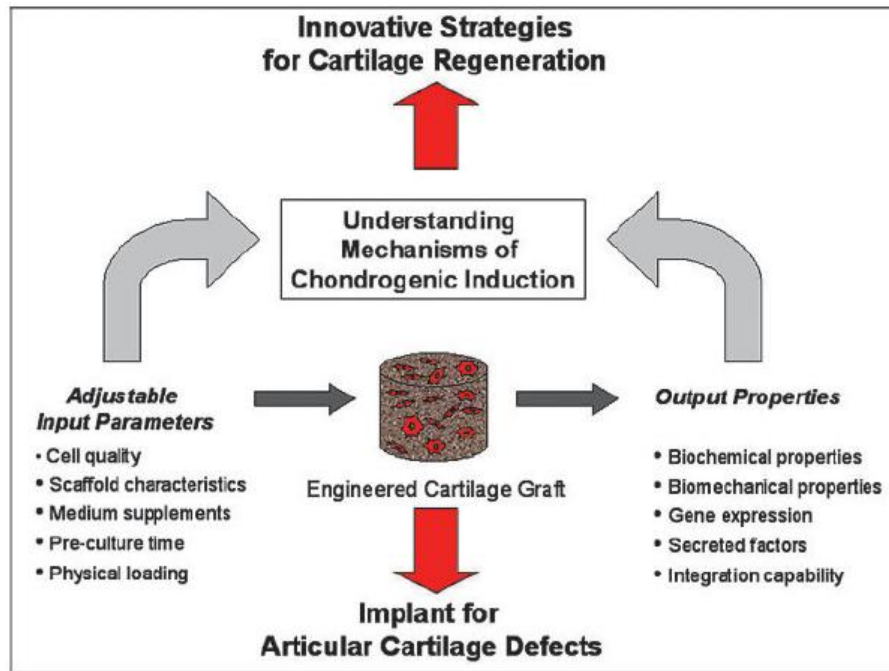


Figura 24 Visione schematica delle potenzialità dell'ingegneria tissutale della cartilagine [17].

In conclusione, lo sviluppo di bioreattori sempre più efficaci costituisce un indispensabile e fondamentale contributo per il successo dell'ingegneria biomedica nell'ambito della medicina rigenerativa. Lo sviluppo del mercato su larga scala dei tessuti umani ingegnerizzati è strettamente legato alle innovazioni tecnologiche volte ad *automatizzare* i processi di produzione dei tessuti stessi a partire dalle cellule del paziente e dipende dai passi che verranno fatti per colmare, come precedentemente detto, le relative *lacune normative*. In particolare, si prevede che i dispositivi per la generazione della cartilagine, che possano essere qualitativamente adeguati e impiegati direttamente nelle strutture cliniche e ospedaliere dove il paziente viene personalmente seguito, forniranno evidenti vantaggi in termini di aumento degli standard di qualità e di sicurezza del processo e del prodotto biologico, diminuzione dei fattori di rischio, diminuzione dei costi della produzione e aumento dei volumi della stessa [4,9,17,20]. Un punto indispensabile e imprescindibile per l'aumento futuro della domanda e degli investimenti nel settore rimane, in ogni caso, la *fiducia* che sarebbe importante le persone dessero sempre di più ai prodotti biologici ingegnerizzati e, in generale, ai progressi della ricerca scientifica.

BIBLIOGRAFIA

Libri

- [1] Di Bello C. *Biomateriali - Introduzione allo studio dei materiali per uso biomedico*. Bologna: Pàtron Editore, Mar 2004.
- [2] Balboni G. C., Bastianini A., Brizzi E. et al. *Anatomia Umana 1*. Edi-Ermes, 3a edizione.
- [3] Bentivoglio M., Bertini G., Cracco C., Esposito V., Geuna S., Giacobini G., Giannetti S., Granato A., Papa M., Passiatore C., Robecchi M. G., Toesca A., Valentino B., Vercelli A., Zancanaro C. *Anatomia Umana e Istologia*. Torino: Edizioni Minerva Medica, Ott 2000.
- [4] Mantero S., Remuzzi A., Raimondi M. T., Ahluwalia A. *Fondamenti di ingegneria dei tessuti per la medicina rigenerativa*. Bologna: Pàtron Editore, Sett 2009.

Articoli

- [5] Ciapetti G., Ambrosio L., Savarino L., Granchi D., Cenni E., Baldini N., Pagani S., Giuzzardi S., Causa F., Giunti A. «Osteoblast growth and function in porous poly - caprolactone matrix for bone repair.» *Biomaterials*, 2003; 24: 3815-3824.
- [6] Concaro S., Gustavson F., Gatenholm P. «Bioreactors for Tissue Engineering of Cartilage.» *Adv Biochem Engin/Biotechnol*, 2009; 112: 125-143.
- [7] Demarteau O., Wendt D., Braccini A., Jakob M., Schafer D. Heberer M., Martin I. «Dynamic compression of cartilage constructs engineered from expanded human

- articular chondrocytes.» *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003: 310: 580-588.
- [8] Grogan S. P., Rieser F., Winkelmann V., Berardi S., Mainil-Varlet P. «A static, closed and scaffold-tree bioreactor system that permits chondrogenesis in vitro.» *Osteoarthritis and Cartilage*, 2003: 11: 403-411.
- [9] Haasper C., Zeichen J., Meister R., Krettek C., Jagodzinski M. «Tissue engineering of osteochondral construct in vitro using bioreactors .» *Injury*, 2008: 39S1: S66-S76.
- [10] Huang A. H., Farrel M. J., Mauck R. L. «Mechanics and mechanobiology of mesenchymal stem cell-based engineered cartilage.» *Journal of Biomechanics*, 2010: 43: 128-136.
- [11] Iwasa J., Engebretsen L., Shima Y., Ochi M. «Clinical application of scaffolds for cartilage tissue engineering.» *Knee Surg Sport Traumatol Arthrosc*, 2009: 17: 561-577.
- [12] Jackson A. R., Gu W. Y. «Transport properties of gartilaginous tissues .» *Curr Rheumatol Rev*, Feb 2009: 1: 1-18.
- [13] Mahmoudifar N., Doran P. M. «Tissue engineering of human cartilage and osteochondral composites using recirculation bioreactors.» *Biomaterials*, Apr 2005: 26: 7012-7024.
- [14] Meyer U., Nazer N., Buchter A., Wiesmann H. P. «Design and performance of a bioreactor system for mechanically promoted three-dimensional tissue engineering.» *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2006: 44: 134-140.
- [15] Pei M., He F., Kish V. L., Vunjak-Novakovic G. «Engineering of Functional Cartilage Tissue Using Stem Cells from Synovial Lining.» *Clin Orthop Relat Res*, 2008: 466: 1880-1889.
- [16] Pei M., Solchaga L. A., Seidel J., Zeng L., Vunjak-Novakovic G., Caplan A. I., Freed L. E. «Bioreactors mediate the effectiveness of tissue engineering scaffolds.» *The Faseb Journal*, 2002: 16: 1691-1694.
- [17] Pelttari K., Wixmerten A., Martin I. «Do we really need cartilage tissue engineering?» *Swiss Med Wkly*, 2009: 139: 602-609.
- [18] Portner R., Nagel-Heyer S., Goepfert C., Adamietz P., Meenen N. M. «Bioreactor Design fot Tissue Engineering.» *Journal of Bioscience and Bioengineering*, May 2005: 3: 235-245.

-
- [19] Potter K., Butler I., Adams C., Fishbein K. W., Mcfarland E. W., Horton W. E., Spencer R. G. S. «Cartilage Formation in a Hollow Fiber Bioreactor Studied by Proton Magnetic Resonance Microscopy.» *Matrix Biology*, 1998: 17: 513-523.
- [20] Rotter N., Bucheler M., Haisch A., Wollenberg B., Lang S. «Cartilage tissue engineering using resorbable scaffolds.» *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Oct 2007: 1: 411-416.
- [21] Sallan A. M., Allori A. C., Davidson E. H., Reformat D. D., Allen Jr. R. J., Warren S. M. «A Novel Flow-Perfusion Bioreactor Supports 3D Dynamic Cell Culture.» *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Sept 2009: 1-7.
- [22] Schulz R. M., Bader A. «Cartilage tissue engineering and bioreactor systems for the cultivation and stimulation of chondrocytes.» *Eur Biophys J*, Jan 2007: 36: 539-568.
- [23] Seddighi M. R., Griffon D. J., Schaeffer D. J., Fadl-Alla B. A., Eurell J. A. C. «The effect of chondrocyte cryopreservation on cartilage engineering.» *The Veterinary Journal*, 2008: 178: 242-248.
- [24] Tare R. S., Howard D., Pound J. C., Roach H. I., Oreffo R. O. C. «Tissue engineering strategies for cartilage generation - Micromass and three dimensional cultures using human chondrocytes and a continuous cell line.» *Biochemical and Biophysical Research Communications*, May 2005: 333: 609-621.
- [25] Tortelli F., Cancedda R. «Three-dimensional cultures of osteogenic and chondrogenic cells: a tissue engineering approach to mimic bone and cartilage in vitro.» *European Cells and Materials*, 2009: 17: 1-14.
- [26] Whittaker R. J., Booth R., Dyson R., Bailey C., Parsons Chini L., Naire S., Payvandi S., Rong Z., Wollard H., Cummings L. J., Waters S. L., Mawasse L., Chaudhuri J. B., Ellis M. J., Michael V., Kuiper N. J., Cartmell S. «Mathematical modelling of fibre-enhanced perfusion inside a tissue-engineering bioreactor.» *Journal of Theoretical Biology*, 2009: 256: 533-546.

Siti Internet

- [27] <http://cercauniversita.cineca.it/php5/prin/cerca.php?codice=2006095380>
- [28] <http://spacescience.spaceref.com/newhome/br/bioreactor.htm>
- [29] http://www.medinfo.dist.unige.it/didattica/Ict/04_Tissue_engineering_of_cartilage.pdf
- [30] <http://www.ske.it/prodotti1.html>

- [31] http://www.google.it/images?hl=it&client=firefox-a&rls=org.mozilla:it:official&gbv=2&tbs=isch:1&&sa=X&ei=_MxoTJOpLtaSjAeB5dHUBA&ved=0CB8QBSgA&q=tissue+engineering+cartilage+bioreactor&spell=1&biw=1169&bih=571
- [32] <http://www.google.it/images?um=1&hl=it&client=firefox-a&rls=org.mozilla%3Ait%3Aofficial&biw=1169&bih=571&tbs=isch%3A1&sa=1&q=articular+cartilage&btnG=Cerca>
- [33] <http://www.urmc.rochester.edu/neuroscience/shared/ResearchProjects/96>
- [34] <http://www.nature.com/nbt/journal/v12/n7/pubmed/nbt0794-689.html>

RINGRAZIAMENTI

Alla fine di questa esperienza ringrazio le persone che mi sono state vicine in questi anni e le persone che tuttora continuano a sostenermi e accompagnarmi in questo impegnativo e intenso percorso di vita.

Un ringraziamento doveroso e sentito va al ***Prof. Andrea Bagno***, che mi ha seguita in questo lavoro con serietà e costanza dimostrando grande professionalità e competenza.

Un grande grazie di cuore va, poi, alla mia ***famiglia***, che sempre mi ha sostenuta in ogni tappa della mia crescita e dei miei studi e a tutti gli ***amici*** che, con la loro unicità, colorano e condividono con me la vita.