



Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione
Corso di Laurea in Ingegneria Biomedica

Il trapianto di trachea ingegnerizzata

Laureando:

Simone ZANCANARO

Relatore:

Dott. Andrea BAGNO

Anno accademico 2009/2010

Abstract

Questa tesi tratta del primo trapianto di trachea ingegnerizzata eseguito sull'uomo. Nell'introduzione sono stati brevemente esposti i principali punti sviluppati nella relazione e la metodologia di lavoro.

Nel secondo capitolo si è invece introdotto l'argomento, attraverso un breve viaggio nel mondo dell'ingegneria tessutale, per capire che cosa sia, a cosa serva, quali strategie utilizzi e quali siano i suoi principali campi di applicazione.

Il terzo capitolo si è focalizzato sul trapianto e sul processo di ingegnerizzazione della trachea. Dopo aver descritto approfonditamente il caso clinico nelle sue fasi pre e post-operatoria, l'elaborato si è concentrato sui due passi principali che hanno contraddistinto l'intero lavoro, ovvero il lavaggio del supporto con detergenti enzimatici, che ne ha consentito la decellularizzazione, e la semina e coltura cellulare, avvenute all'interno di un bioreattore appositamente ideato e realizzato.

Indice

1. Introduzione

2. Tissue Engineering

2.1. Introduzione

2.2. Neomorfogenesi

2.2.1. *Impiego di sostanze capaci di favorire la formazione di tessuto*

2.2.2. *Utilizzo di cellule isolate*

2.2.3. *Uso di cellule seminate su matrici*

2.3. Applicazioni

2.3.1. *Cute*

2.3.2. *Cartilagine*

2.3.3. *Cornea*

2.3.4. *Tessuto osseo*

2.3.5. *Vasi sanguigni*

3. Il trapianto di trachea ingegnerizzata

3.1. Il caso clinico

3.1.1. *Introduzione*

3.1.2. *Situazione pre-operatoria*

3.1.3. *Anatomia della trachea*

3.1.4. *Ingegnerizzazione della trachea*

3.1.5. *Intervento e situazione post-operatoria*

3.1.6. *Risultati*

3.2. Matrice decellularizzata

3.2.1. *Introduzione*

3.2.2. *Espianto*

3.2.3. *Lavaggio della matrice*

3.2.4. *Impianto*

3.2.5. *Risultati*

3.2.6. *Considerazioni*

3.3. Bioreattori

3.3.1. Introduzione

3.3.2. Funzioni principali

3.3.3. Progettazione di un bioreattore

3.3.4. Il bioreattore per l'ingegnerizzazione della trachea

4. Bibliografia

1. Introduzione

Con questa tesi ci si è posti lo scopo di esaminare il trapianto di trachea ingegnerizzata, ponendo particolare attenzione al processo di decellularizzazione della matrice e alle fasi di progettazione e costruzione del bioreattore.

L'argomento principale è stato introdotto attraverso un'analisi dell'ingegneria tessutale, ovvero di quel campo multidisciplinare che applica e fonde i principi propri dell'ingegneria e delle scienze biologiche al fine di sviluppare dei sostituti biologici che ripristinino, mantengano o migliorino il funzionamento di un tessuto o di un intero organo. In particolare sono state esaminate le tecniche usate al giorno d'oggi per creare tessuti biologici in vitro, attraverso il processo chiamato neomorfogenesi. È stato brevemente analizzato anche l'impiego delle cellule staminali nell'ambito della medicina rigenerativa, specialmente per quanto riguarda le fonti di cellule staminali pluripotenti e multipotenti. Quindi ci si è soffermati sulle principali applicazioni dell'ingegneria tessutale, spiegando i diversi processi utilizzati e cercando di evidenziarne i vantaggi e gli svantaggi.

In seguito si è descritto nel dettaglio il caso clinico che ha rappresentato lo spunto dal quale si è partiti per svolgere l'intero lavoro. Una donna nel 2004, in seguito ad una malattia delle vie aeree, ha riportato una grave stenosi del bronco principale sinistro. Dopo un iniziale trattamento dell'occlusione con l'impianto di uno stent che ha avuto esito negativo, nel 2008 è stato proposto il trapianto di trachea ingegnerizzata come alternativa alla pneumonectomia. Dopo aver espantato l'organo da un donatore, il tessuto è stato trattato per rimuovere tutte le cellule del donatore ed ottenere solo la matrice decellularizzata. Nel contempo, sono state prelevate cellule epiteliali e condrociti dal bronco principale destro della paziente. Il supporto ottenuto è stato condizionato all'interno di un bioreattore, dove sono avvenute le operazioni di semina e di coltura cellulare. Infine la trachea ingegnerizzata è stata impiantata nella paziente in sostituzione del bronco occluso. La paziente è stata seguita nel decorso post-operatorio, per verificare l'assenza di fenomeni di rigetto e di processi infiammatori.

Il lavoro è proseguito con una disamina più approfondita del processo di decellularizzazione. Si sono riportati lo svolgimento e i risultati di uno dei primi

esperimenti effettuati sugli animali, che ha poi aperto la strada all'applicazione sull'uomo.

L'ultima parte è stata introdotta da un'analisi dei bioreattori utilizzati nell'ingegneria tessutale, in modo da comprendere meglio le varie funzioni che assolvono e l'approccio ingegneristico che accompagna la progettazione di un bioreattore. Sono quindi state descritte le peculiarità del bioreattore rotante a doppia camera costruito appositamente per l'ingegnerizzazione della trachea, studiando i vari passi che ne hanno consentito l'ideazione e la realizzazione.

Il lavoro svolto si è composto principalmente di una ricerca bibliografica di testi e articoli nella letteratura scientifica, in modo da avere una visione d'insieme del problema, accompagnata da una ricerca personale che ha permesso una comprensione più approfondita anche degli aspetti clinici del particolare caso analizzato.

2. Tissue Engineering

2.1. Introduzione

Infortuni, malattie e malformazioni congenite hanno sempre fatto parte dell'esperienza umana. Mentre inizialmente tutti gli sforzi erano indirizzati, se possibile, alla rimozione degli organi danneggiati da traumi o malattie, nella medicina moderna si cerca sempre più spesso un modo per sostituirli e ripristinare le funzioni a essi associate. Purtroppo i metodi attualmente più diffusi non soddisfano appieno le richieste [1]: il trapianto d'organi presenta degli evidenti limiti dovuti all'insufficienza di donatori e ai problemi di compatibilità, mentre l'utilizzo di organi artificiali è limitato da problemi tecnologici non ancora risolti (Figura 2.1).



Figura 2.1.: Cuore artificiale Abiocor.

Esaminando più in dettaglio i problemi correlati ai diversi tipi di trapianto d'organo, si possono fare le seguenti osservazioni. L'autotrapianto, o trapianto autologo (innesto di materiale prelevato dal paziente stesso) è limitato dall'insufficiente quantità di tessuto asportabile senza arrecare maggiori danni al paziente e dalle disfunzioni biologiche che si hanno spostando un tessuto da una posizione a un'altra (ad esempio utilizzando l'intestino come tratto urinario) [2]. L'allotrapianto (innesto di materiale prelevato da un organismo della stessa specie) e lo xenotrapianto (innesto di materiale prelevato da specie animali diverse) costringono il paziente a seguire per molto tempo una terapia a base di immunosoppressori per evitare il rischio di rigetto. Inoltre si deve in tutti i casi

controllare che il materiale innestato non sia portatore di pericolose infezioni virali, quali HIV o epatite [1].

Le difficoltà connesse agli organi artificiali riguardano invece, come già detto, la complessità delle funzioni e delle strutture che si vogliono sostituire. Nemmeno le più moderne tecnologie riescono ad ottenere risultati soddisfacenti e comparabili agli organi naturali. Inoltre, a causa delle dimensioni e dei necessari dispositivi di alimentazione elettrica, gli organi artificiali spesso limitano la libertà di movimento dei pazienti.

L'ingegneria tessutale (tissue engineering), invece, è in grado di superare molte di queste difficoltà: grazie a particolari tecniche è possibile coltivare, non solo a livello di laboratorio ma anche a livello industriale, tessuti viventi a partire da cellule associate a matrici o supporti per favorirne lo sviluppo [2]. I tessuti ingegnerizzati, poiché creati a partire da cellule del paziente, avranno le stesse caratteristiche del paziente nel quale saranno poi innestati. Per questo si integrano perfettamente con quelli del paziente, evitando fenomeni di rigetto: in questi casi non è richiesta nessuna terapia a base di immunosoppressori.

L'ingegneria tessutale è una scienza multidisciplinare che coinvolge le scienze di base, dei biomateriali, le biotecnologie, la bioingegneria, la biologia molecolare e la medicina rigenerativa. Una sua possibile definizione moderna è la seguente: l'uso di materiali biodegradabili, sintetici o naturali, eventualmente ripopolati con cellule viventi, per rigenerare la forma e/o la funzione di un tessuto o organo danneggiato o malato in un paziente umano [2].

La sfida che si propone l'ingegneria tessutale è quella di imitare la natura, ovvero di sfruttare i meccanismi biologici naturali per formare del nuovo tessuto in vitro. Per imitare la natura è necessario studiare in modo approfondito la biologia di base delle cellule, dei tessuti e degli organi di interesse. Solo conoscendo a fondo i processi biologici che regolano il loro sviluppo, è possibile mettere a punto strategie che permettano l'ingegnerizzazione di tessuti viventi o la promozione della loro riparazione e rigenerazione.

Il punto d'inizio per creare un tessuto ingegnerizzato è la scelta delle cellule da utilizzare. In secondo luogo è necessario sviluppare un'architettura bi- o tri-dimensionale che abbia caratteristiche simili a quelle del tessuto che si desidera

riprodurre. Infine è necessario inserire il tessuto ingegnerizzato all'interno del sistema vivente.

L'ingegneria tessutale si sta sviluppando verso la rigenerazione e la riparazione di tessuti sempre più complessi e persino la sostituzione di organi completi. In questo campo le prospettive future sono la rigenerazione in vivo di tessuti danneggiati tramite tecniche riparative che stimolino la guarigione autonoma di organi prima considerati irreparabili [2]. Inoltre l'ingegneria tessutale consente agli scienziati di coltivare in vitro tessuti e organi e di impiantarli quando il corpo stesso non è in grado di guarirli. Ipoteticamente qualsiasi malattia derivante dal malfunzionamento o dal danneggiamento di un tessuto può essere curata grazie ad appropriate terapie rigenerative.

2.2. Neomorfogenesi

Il processo fondamentale alla base dell'ingegneria tessutale è la neomorfogenesi, cioè il processo di produzione di nuovo tessuto in vitro. Lo sviluppo di tale processo si basa sulla conoscenza dei meccanismi naturali che presiedono alla crescita cellulare nella morfogenesi e alla riparazione dei tessuti danneggiati. Infatti, in entrambe queste situazioni, le cellule creano o ricreano strutture funzionali, usando informazioni preprogrammate o segnali di vario genere: è esattamente ciò che si vuole ottenere in laboratorio.

Affinché la neomorfogenesi produca i risultati sperati, è necessario creare un ambiente che favorisca la riproduzione e l'aggregazione delle cellule per formare il nuovo tessuto. I metodi più comuni per la creazione di nuovo tessuto sono l'impiego di sostanze capaci di favorire la formazione di tessuto, l'utilizzo di cellule isolate (per esempio, cellule staminali) e l'uso di cellule seminate su matrici [1].

2.2.1. Impiego di sostanze capaci di favorire la formazione di tessuto

Ci sono diversi tipi di molecole segnale di natura proteica che hanno un ruolo importante sia nella crescita sia nella rigenerazione dei tessuti. L'impiego di tali molecole nell'ambito dell'ingegneria tessutale è però ostacolato dalla necessità di poterne disporre in numero sufficiente e dalla loro instabilità. Per ovviare a questi problemi si utilizza una tecnica chiamata *peptide mimicry* [1]: questa consiste nell'utilizzare sequenze ridotte e/o modificate della proteina naturale, che siano

comunque in grado di riprodurre i suoi effetti biologici. Le molecole così ottenute possono essere prodotte in quantità adeguata e possono essere modificate per migliorarne la stabilità. Le molecole segnale che più si prestano a questo tipo di trattamento sono i fattori di adesione e i fattori di crescita.

I fattori di adesione si differenziano in due classi: le molecole di adesione cellulare (CAMs), che realizzano l'adesione cellula-cellula, e le proteine adesive della matrice extracellulare, che realizzano l'adesione cellula-ECM.

I fattori di crescita sono invece proteine che, legandosi a recettori sulla superficie cellulare, ne stimolano la riproduzione e la differenziazione.

2.2.2. *Utilizzo di cellule isolate*

Le metodologie che prevedono l'uso di cellule isolate permettono, in linea di principio, di sostituire selettivamente le cellule malate con cellule in grado di ripristinare la funzione desiderata [1]. Queste tecniche non richiedono interventi chirurgici importanti e permettono la manipolazione in vitro delle cellule prima del loro impianto. I limiti di questa tecnica riguardano la capacità delle cellule di mantenere la loro funzionalità una volta impiantate e la possibilità di fenomeni di rigetto.

Una particolare attenzione meritano le cellule staminali: sono cellule in grado di dividersi in coltura per periodi indefiniti di tempo e di differenziarsi generando cellule specializzate. Una cellula staminale ha quindi le seguenti proprietà: non è una cellula differenziata, si può dividere senza limitazioni e, quando si divide, ciascuna cellula figlia può rimanere staminale oppure seguire la strada che conduce alla specializzazione. Le cellule staminali si dividono in diversi tipi: totipotenti, dalla cui differenziazione si possono ottenere tutti i tessuti sia embrionali sia extra-embryonali; pluripotenti, capaci di differenziarsi in quasi tutti i tessuti di un organismo, ma non in grado di dare origine a un embrione; multipotenti, capaci di differenziarsi in diversi tipi di cellule; unipotenti, capaci di differenziarsi in un unico tipo di cellula.

Le cellule staminali pluripotenti possono essere ottenute da embrioni generati in eccesso durante trattamenti di fecondazione in vitro, da tessuti fetali ottenuti da gravidanze interrotte o tramite il trasferimento nucleare di cellule somatiche (*Somatic Cell Nuclear Transfer*, SCNT) [1]. Quest'ultima tecnica prevede l'estrazione di un nucleo da un normale ovocita; in seguito una qualsiasi cellula somatica viene posta nelle vicinanze di

ciò che rimane dell'ovocita in modo da favorire la fusione tra le due strutture. La cellula che viene a formarsi da tale unione è una cellula staminale totipotente, poiché è in grado di portare alla formazione di una blastocisti e da qui alla formazione di cellule staminali pluripotenti. Le cellule staminali pluripotenti possono essere usate in diversi campi:

- a) avanzamento delle conoscenze dei processi biologici di base: lo studio delle cellule staminali pluripotenti può servire a comprendere meglio come si svolgono gli eventi che avvengono durante lo sviluppo e la differenziazione cellulare;
- b) lo sviluppo di e i test su nuovi farmaci: i nuovi farmaci potrebbero essere provati su diversi tipi di cellule;
- c) ingegneria tissutale e terapie cellulari: la possibilità di indurre cellule staminali pluripotenti a differenziarsi in diversi tipi di cellule offre una fonte rinnovabile di cellule e tessuti che possono essere utilizzati per trattare diverse patologie.

Negli individui adulti si trovano invece cellule staminali multipotenti che servono all'organismo per rimpiazzare le cellule che subiscono un graduale decadimento. Queste cellule possono differenziarsi in molte linee cellulari diverse, aprendo interessanti scenari sul loro impiego terapeutico [1]. I limiti di questa strada sono la scarsa quantità di cellule staminali presenti negli individui adulti, la loro ridotta capacità proliferativa e i lunghi tempi di crescita in vitro.

2.2.3. *Uso di cellule seminate su matrici*

Un altro approccio fondamentale all'ingegneria tissutale è dato dalle tecniche basate sull'uso di cellule seminate su opportuni materiali o inglobate in matrici di varia natura. Queste tecniche sono state impiegate per la costruzione di sistemi sia aperti che chiusi [1]. Nei sistemi aperti, le cellule legate a opportune matrici vengono direttamente impiantate nell'organismo del ricevente; le matrici possono avere origine naturale oppure essere costituite da polimeri di sintesi. Nei sistemi chiusi, una membrana isola le cellule dell'impianto dal resto dell'organismo: questo permette il passaggio delle molecole più piccole (nutrienti e prodotti del metabolismo), mentre impedisce che anticorpi e cellule del sistema immunitario accedano al sistema, distruggendolo.

L'utilizzo di matrici nell'ingegneria tissutale gioca un ruolo essenziale nella ricostruzione dei tessuti. La funzione di una matrice degradabile è quella di fornire un

supporto temporaneo per le cellule trapiantate, in modo da permettere la riparazione o il miglioramento del tessuto. Normalmente sono formate da materiali polimerici che possono essere sia di origine naturale sia di origine sintetica [2]. La forma delle matrici polimeriche è molto importante per la crescita appropriata delle cellule. Per questo motivo, in fase di progettazione bisogna considerare diversi fattori quali tecniche di fabbricazione, struttura, biocompatibilità, biodegradabilità e proprietà meccaniche.

Le matrici polimeriche naturali, formate tipicamente da polisaccaridi o polipeptidi, sono normalmente biocompatibili e biodegradabili. Il principale vantaggio derivante dall'uso di queste matrici è che favoriscono l'adesione, la proliferazione e la differenziazione delle cellule. Gli svantaggi sono invece dovuti alla difficoltà di controllare la loro graduale degradazione, dovuta a enzimi, e alle loro scarse proprietà meccaniche [2].

Le matrici polimeriche sintetiche sono di norma costituite da poliesteri. Presentano diversi vantaggi, come quello di poter controllare la degradazione del materiale nel tempo e di poter formare materiali con caratteristiche meccaniche che più si adattano a quelle richieste per la specifica applicazione.

2.3. Applicazioni

2.3.1. Cute

La rigenerazione della cute è stato il primo ambito di applicazione dell'ingegneria tessutale. Diversi fattori hanno contribuito a questa scelta: le cellule cutanee sono infatti in grado di crescere e riprodursi in vitro facilmente e c'è una grande richiesta clinica di sostituti cutanei per curare ustioni, piaghe, ferite e altre lesioni della pelle.

In un primo approccio al problema si utilizzarono supporti biodegradabili acellulari in grado di indurre una migliore guarigione delle ferite cutanee. Questi supporti erano formati da un materiale a due strati: lo strato interno, ovvero quello utilizzato per sostituire il derma, era formato da condrotin-solfato e favoriva la formazione di nuovi vasi sanguigni e l'adesione di fibroblasti per la costruzione del nuovo tessuto connettivo; lo strato esterno, ovvero quello utilizzato per rimpiazzare l'epidermide, era costituito da silicone e aveva lo scopo di evitare la perdita di fluidi [1]. Durante il processo di guarigione, la matrice cartilaginea endogena depositata dai fibroblasti andava a sostituire lo strato interno che, a poco a poco, si degradava. Una volta

formatosi completamente il nuovo strato di derma, lo strato in silicone veniva rimosso e sostituito con un innesto di cellule epidermiche prelevate dal paziente stesso (Figura 2.2).

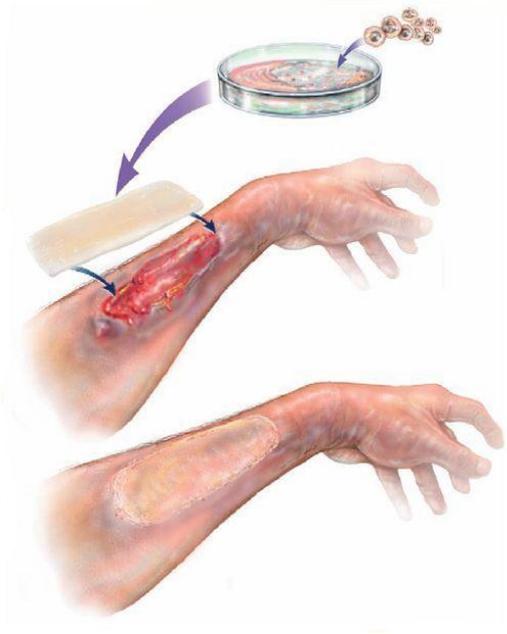


Figura 2.2.: Ingegnerizzazione della cute.

Una tecnica più attuale consiste nel prelevare dal paziente, tramite biopsia, circa 1 cm² di pelle: questo viene poi esteso in laboratorio tramite coltura in vitro, fino a fornire una superficie di pelle pari a quella necessaria per ricoprire un individuo adulto [2]. Per questo processo si utilizzano diversi tipi di supporti formati da copolimeri degradabili a base di acido polilattico e poliglicolico (PLGA), gel a base di collagene idratato o acido ialuronico e suoi derivati. Questo metodo ha come vantaggio principale la possibilità di produrre molto tessuto in grado di coprire anche lesioni estese. Per contro, la crescita del tessuto in vitro richiede tempi abbastanza lunghi (3-4 settimane), che spesso risultano incompatibili con le richieste dovute alla specifica patologia del paziente.

2.3.2. *Cartilagine*

Un altro tessuto che viene ingegnerizzato è la cartilagine. Il processo di produzione prevede l'estrazione dal paziente di condrociti sani tramite biopsia. I campioni vengono poi fatti sviluppare in laboratorio secondo la forma desiderata e, quindi, vengono reimpiantati nel paziente [2]. Un evidente limite di tale tecnica è la scarsa disponibilità

di cartilagine sana dalla quale sia possibile estrarre i condrociti necessari. Inoltre, creare supporti adeguati per la proliferazione della cartilagine in vitro può risultare un'operazione delicata e molto complessa. Infatti è necessario ottenere un tessuto che abbia contemporaneamente lo spessore appropriato e le funzionalità meccaniche desiderate: i migliori risultati sono stati ottenuti utilizzando supporti di gel di agarosio, materiale che fornisce cartilagine con caratteristiche molto simili a quella naturale (Figura 2.3).

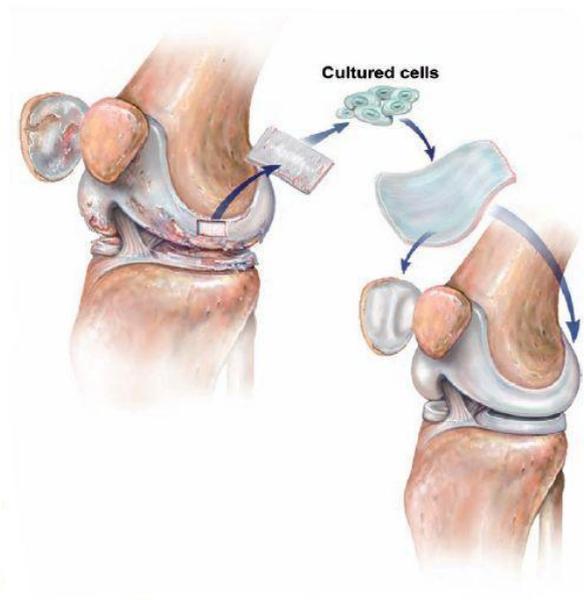


Figura 2.3.: Ingegnerizzazione della cartilagine.

Un'altra tecnica prevede l'utilizzo di protesi in metallo o in materiale polimerico: questi tipi di materiale non consentono però di ottenere risultati soddisfacenti poiché non possiedono le stesse caratteristiche meccaniche della cartilagine che vanno a sostituire.

2.3.3. Cornea

Lo sviluppo della cornea ingegnerizzata è stato reso possibile grazie alla scoperta di una tecnica che permette la produzione di foglietti di cellule intatti [2]. Normalmente durante la coltivazione in vitro, le cellule aderiscono anche al disco di coltura. Per estrarle si aggiungono quindi enzimi e altre sostanze che tagliano non solo i legami fra cellule e substrato, ma anche quelli fra le stesse cellule: in questa maniera si riescono ad ottenere solo singole cellule da utilizzare nelle applicazioni cliniche. La nuova tecnica

prevede invece l'utilizzo di uno strato di N-isopropilammide da applicare sul disco di coltura prima di aggiungere le cellule. In questa maniera, mantenendo una temperatura di coltura normale, le cellule aderiscono tra loro e con il substrato, mentre raffreddando il disco di coltura, l'intero strato di cellule si stacca dal substrato mantenendo intatti i legami cellula-cellula: si ottiene così un foglietto di cellule utilizzabile nella sostituzione della cornea danneggiata (Figura 2.4). Questa stessa tecnica può essere utilizzata anche in altre applicazioni di ingegneria tissutale, come nel ricambio del foglietto di cellule del miocardio o di quello dell'esofago.

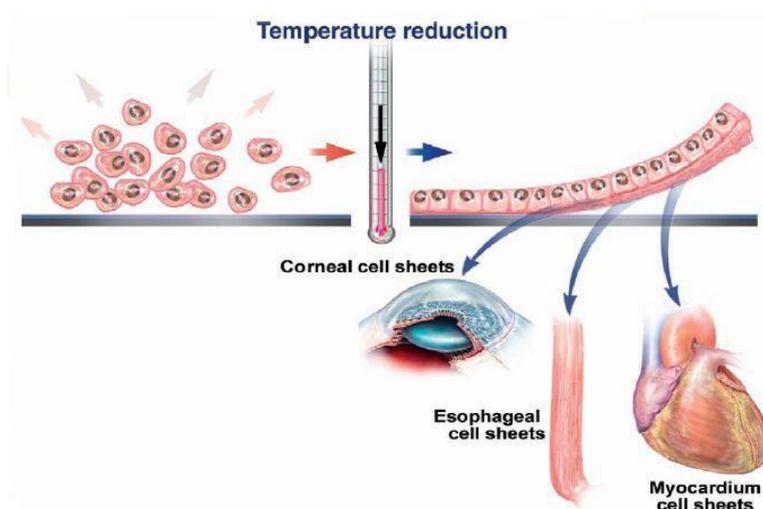


Figura 2.4.: Preparazione in vitro di sottili foglietti di cellule per l'ingegnerizzazione della cornea e di altri tessuti.

2.3.4. Tessuto osseo

Per consentire una rapida riparazione delle ossa si fa ricorso al trapianto autologo o eterologo di tessuto osseo: questi approcci risentono però dei problemi discussi in precedenza e comuni a tutti i trapianti di questo tipo.

Altre tecniche di intervento nella rigenerazione ossea prevedono l'utilizzo di materiali bioinerti, biorisorbibili o bioattivi [1]. I materiali bioinerti non conducono né a un legame del materiale col tessuto, né a fenomeni di incompatibilità: sono spesso usati in odontoiatria e ortopedia, anche grazie ai loro bassissimi coefficienti di attrito e di usura. I materiali biorisorbibili subiscono una progressiva degradazione, senza che questa induca reazioni indesiderate o effetti tossici: spesso si utilizzano in quanto consentono una graduale sostituzione del materiale sintetico con il tessuto che si rigenera. I materiali bioattivi inducono nell'organismo specifiche attività biologiche, permettendo

la formazione di legami e interazioni dirette con il tessuto biologico: in questa maniera la ricrescita del tessuto viene addirittura favorita dall'impianto.

Spesso questi materiali sono anche porosi, consentendo, se i pori hanno diametro maggiore di 100 nm, la crescita di nuovo materiale osseo all'interno del poro [1]: in questo modo si rafforza il legame tra l'impianto e l'osso.

In una delle applicazioni più recenti si usa una spugna di collagene cosparsa della proteina morfogenetica dell'osso (*Bone Morphogenetic Protein*, BMP) [2]. Questa proteina ha il compito di stimolare la ricrescita dell'osso. Tale particolare combinazione fra un materiale biodegradabile (cartilagine) e una molecola biologica che stimola la formazione di tessuto (proteina) è un perfetto esempio di applicazione dell'ingegneria tissutale: l'osso andando a sostituire la cartilagine, salda la frattura, tornando nella condizione iniziale (Figura 2.5).

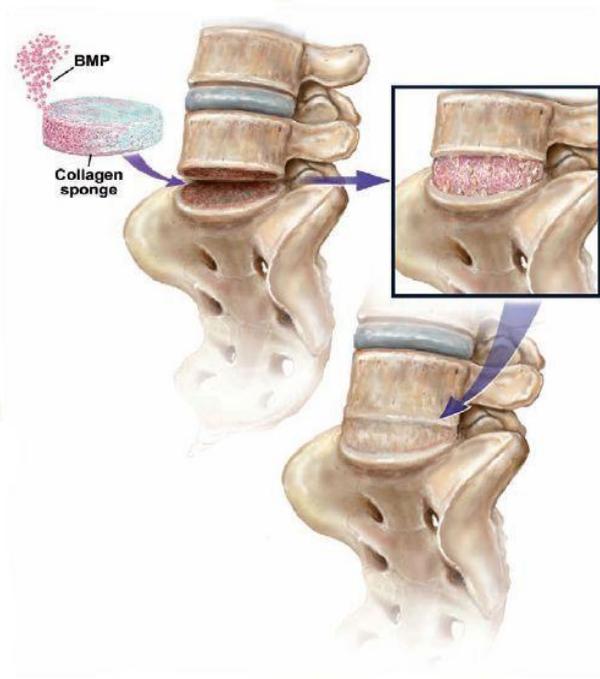


Figura 2.5.: Ingegnerizzazione del tessuto osseo.

2.3.5. Vasi sanguigni

La tecnica di ingegnerizzazione dei vasi sanguigni prevede l'utilizzo di una matrice tubolare di materiale biodegradabile sulla quale vengono seminate delle cellule estratte dal midollo osseo del paziente (Figura 2.6).

Alcuni esperimenti hanno dimostrato che il tempo di degradazione della matrice, una volta impiantata nel paziente, è sufficientemente lungo da permettere la sostituzione del vaso artificiale con quello naturale senza che si verificano rotture.

Questo tipo di approccio rende però complicata la sostituzione di vasi sanguigni di piccolo calibro, ovvero con diametro inferiore a 5 mm [1]. In questi casi, infatti, sia all'interfaccia sangue-materiale sia all'interfaccia materiale-tessuto si sviluppano delle reazioni che provocano il restringimento del lume del vaso, fino alla possibile ostruzione totale. Per evitare questo problema si utilizzano materiali inerti e una ricopertura della parete interna dell'innesto con sostanze anticoagulanti: in questa maniera si previene la formazione di trombi e la conseguente ostruzione del vaso.

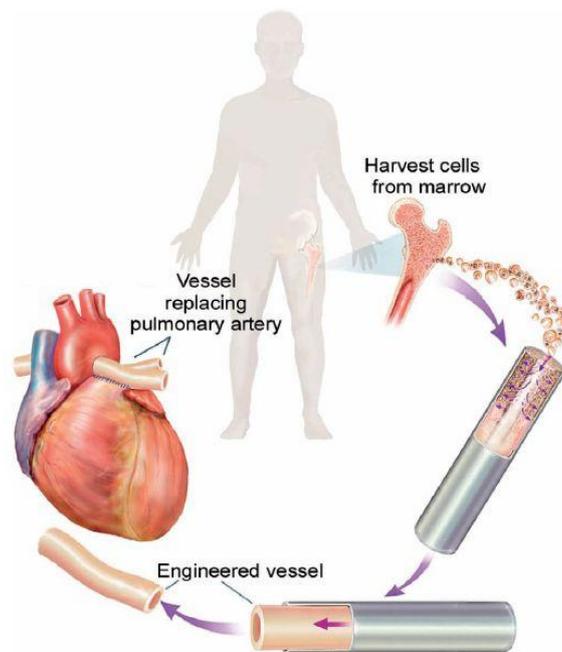


Figura 2.6.: Ingegnerizzazione dei vasi sanguigni.

3. Il trapianto di trachea ingegnerizzata

3.1. Il caso clinico

3.1.1. Introduzione

I difetti strutturali delle vie aeree sono solitamente trattati con la resezione del tratto interessato dall'ostruzione e il conseguente ricongiungimento chirurgico delle due estremità. Purtroppo questa tecnica può essere utilizzata solo nei casi in cui la restrizione del dotto interessi al massimo il 30 % della lunghezza totale nel caso in cui il paziente sia un bambino e 6 cm nel caso in cui il paziente sia un adulto [3]. Si è quindi pensato di utilizzare l'ingegneria tessutale per poter superare queste limitazioni. Le prime sperimentazioni in tale direzione sono state fatte su topi e maiali: si è osservato che, seminando su una matrice decellularizzata proveniente dal donatore cellule provenienti dall'organismo ricevente, si ottenevano dei tratti di trachea corti ma vitali e senza l'insorgenza di risposta immunologica né nel caso di allotrapianti né nel caso di xenotrapianti [4]. Grazie a questi esperimenti è stato possibile stabilire una procedura standard da poter utilizzare in ambito clinico anche sull'uomo. Il primo tentativo è stato quello di ingegnerizzare un tratto di trachea lungo più di 6 cm e di applicare la procedura trovata nel caso di un paziente umano con una malattia delle vie aeree in fase terminale.

3.1.2. Situazione pre-operatoria

Nel 2004 una donna di trenta anni si è presentata in ospedale presentando disfonia e tosse causate da un'infiltrazione di tubercoli nella parte cervicale della trachea e nell'intero bronco principale sinistro [3]. In seguito ad un esame più approfondito tramite TAC sono stati evidenziati:

- a) una stenosi, ovvero un restringimento, che interessava un tratto di circa tre centimetri della via aerea posto a circa due centimetri dalla cavità orale e tanto pronunciata da occludere quasi completamente il dotto;
- b) uno sviluppo ridotto del bronco principale sinistro.

L'infezione microbatterica è stata trattata con successo durante i sei mesi successivi. Purtroppo è rimasto un grave problema di dispnea dovuto alle complicazioni descritte in

precedenza. L'esame istologico ha portato alla diagnosi di una tracheite cronica e di una grave forma di broncopneumopatia, ovvero del collasso della parete cartilaginea bronchiale, che ne provocava l'ostruzione.

La stenosi tracheale è stata trattata con successo tramite resezione del tratto occluso e una successiva anastomosi terminale-terminale che ha permesso di collegare direttamente le parti terminali dei due tratti di trachea rimasti. La broncopneumopatia è stata invece trattata inizialmente inserendo uno stent nel bronco principale sinistro, in modo da ripristinare l'apertura originale. Purtroppo questo intervento non è andato a buon fine: infatti, nonostante molte pulizie dell'impianto effettuate in endoscopia, si sono verificati ricorrenti episodi di polmonite, tosse non curabile e ritenzione di muco [3]. Per questi motivi si è deciso di togliere lo stent.

Nel 2008 la paziente si è ripresentata in ospedale con una grave dispnea che non le permetteva di eseguire nemmeno le più comuni faccende domestiche. Un nuovo esame effettuato tramite TAC ha confermato una via aerea normale nella parte superiore, dove era stata trattata la stenosi tracheale, mentre il lume del bronco principale sinistro era molto ridotto, con un diametro residuo di 4 mm, dovuto alla compressione della aorta sulla parete superiore del bronco (Figura 3.1). Questa restrizione non consentiva il passaggio di aria verso il polmone sinistro, escludendolo di fatto dalla respirazione.

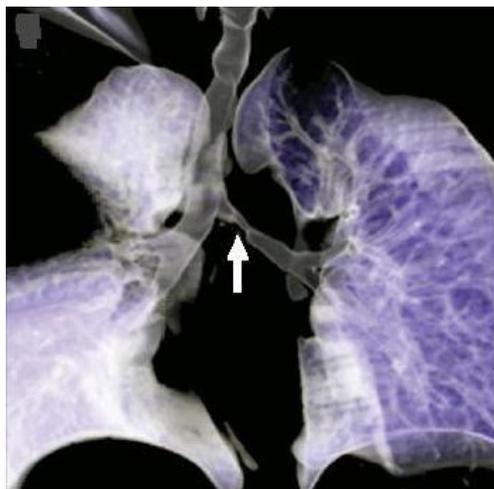


Figura 3.1.: Immagine ottenuta tramite TAC prima dell'operazione. La freccia bianca indica la stenosi del bronco principale sinistro [3].

Gli esami ematici hanno mostrato una grave ipossia a riposo dovuta alla presenza di uno shunt ventilatorio destro-sinistro con perfusione preservata. Questo shunt era dovuto al fatto che in uscita dai polmoni si aveva un'unione fra sangue arterioso (ovvero quello ossigenato proveniente dal polmone destro) e sangue venoso (ovvero quello non ossigenato proveniente dal polmone sinistro). La perfusione era mantenuta poiché il sangue, pur non ossigenandosi completamente, raggiungeva in ogni caso gli alveoli di entrambi i polmoni. Anche i risultati dei test di funzionalità polmonare hanno evidenziato, ovviamente, valori molto diversi da quelli normali (Tabella 3.1).

	prima dell'operazione
FVC [L]	2,35 (62%)
FEV₁ [L]	1,75 (55%)
FEV₁/FVC	0,74
R_{aw} [kPa/L·s]	5,57
SG_{aw} [kPa ⁻¹ ·s ⁻¹]	0,058

Tabella 3.1.: Risultati dei test di funzionalità polmonare prima dell'operazione. La Forced Vital Capacity (FVC) è il volume massimo di aria, misurato in litri, che l'organismo può espirare in seguito ad un'inspirazione forzata (tra parentesi si ha la percentuale del valore rilevato rispetto al valore normale in individui adulti sani). La Forced Expiratory Volume at timed intervals of 1 second (FEV₁) è il volume di aria, misurato in litri, che l'organismo può espirare in un secondo in seguito ad un'inspirazione forzata (tra parentesi si ha la percentuale del valore rilevato rispetto al valore normale in individui adulti sani). Il valore del rapporto tra FEV₁ e FVC è compreso tra 0,75 e 0,80 in un individuo adulto sano. La Airway Resistance (R_{aw}) è usata per descrivere i fattori che limitano l'ingresso d'aria all'interno degli alveoli polmonari. La Specific Airways Conductance (SG_{aw}) è l'inverso della Airway Resistance per unità di volume espirato [3].

L'unica opzione convenzionale rimasta era effettuare una pneumonectomia completa del polmone sinistro. Tale operazione non è però priva di rischi e inoltre richiede lunghi trattamenti post-operatori. Per questi motivi, è stata proposta una strada alternativa, consistente nella resezione del bronco sinistro e nella sua sostituzione con una trachea umana ingegnerizzata.

3.1.3. Anatomia della trachea

Per capire un possibile approccio all'ingegnerizzazione della trachea, è opportuno conoscere meglio l'anatomia di questo organo (Figura 3.2).

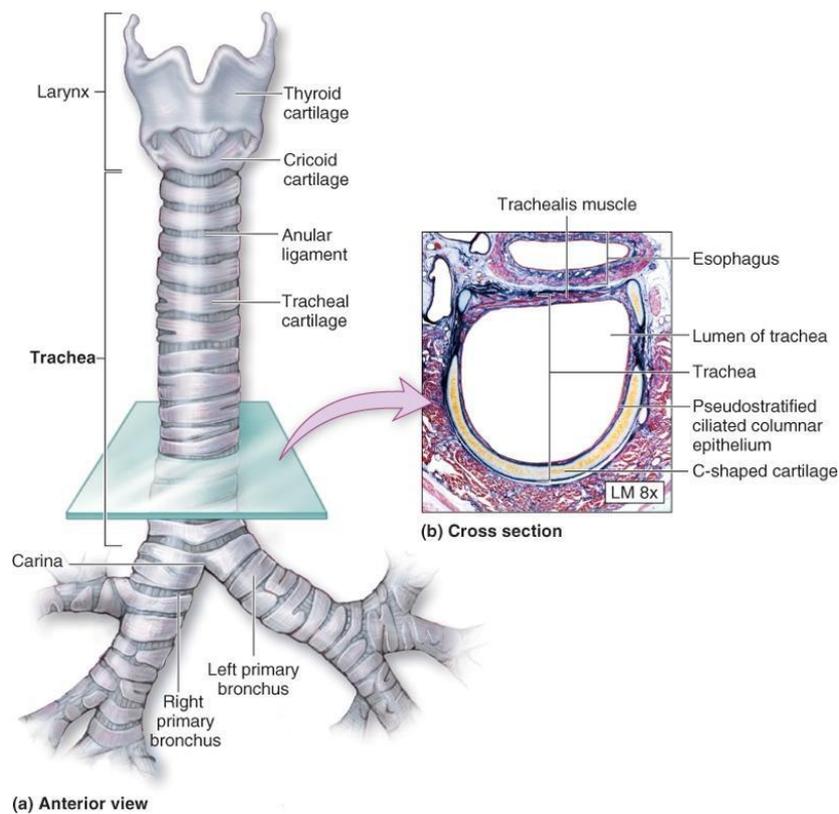


Figura 3.2.: Vista anteriore (a) e sezione (b) della trachea umana.

La trachea è una struttura elastica tubolare lunga circa 12 cm posta fra la laringe e i bronchi [5]. E' formata da una serie di anelli cartilaginei a forma di C collegati tra loro da tessuto connettivo. Posteriormente i vari anelli sono uniti grazie al muscolo tracheale che permette l'espansione della trachea durante l'inspirazione. La superficie interna della trachea è ricoperta da un epitelio di rivestimento ciliato sul quale si trova uno strato di muco. Il muco ha la funzione di intrappolare le particelle presenti nell'aria, in modo da mantenere pulite le vie aeree. Le ciglia, muovendosi dal basso verso l'alto, espellono il muco, portandolo fino alla cavità orale e quindi verso l'esofago e da qui nello stomaco, dove viene digerito dai succhi gastrici.

Dalla suddivisione della trachea si formano i due bronchi principali, ciascuno dei quali penetra, dopo un breve tratto (bronco extrapolmonare), nel rispettivo polmone. All'interno di ogni polmone, il bronco si divide andando a formare l'albero bronchiale con rami di calibro sempre più piccolo sino agli alveoli polmonari.

3.1.4. *Ingegnerizzazione della trachea*

L'ingegnerizzazione di una trachea è un processo che si è sviluppato in più fasi. Innanzitutto è stato prelevato un tratto di trachea lungo 7 cm da un donatore morto in seguito ad emorragia cerebrale [3]. Successivamente si è provveduto a rimuovere le cellule del donatore dal segmento tracheale prelevato, in modo da mantenere solo la matrice extracellulare. Infine il supporto ottenuto è stato ripopolato con le cellule della paziente ricevente mediante la coltura in un particolare bioreattore costruito appositamente per questa applicazione. In questa maniera sono stati evitati i possibili rischi di rigetto normalmente presenti negli allotrapianti, senza costringere il paziente a seguire per molto tempo una terapia a base di immunosoppressori.

Decellularizzazione

Dopo l'espanto, è stato rimosso tutto il tessuto connettivo circostante il dotto da trattare e la trachea è stata sciacquata in una soluzione tampone (PBS), contenente antibiotici e battericidi (penicillina e streptomina) e antifungini (amfotericina B). Questa soluzione, essendo isotonica e non tossica per le cellule, è appunto usata per il lavaggio cellulare. Il processo di lavaggio è stato ripetuto venticinque volte durante un trattamento durato complessivamente sei settimane [3]. Dopo ogni ciclo è stata verificata la presenza residua di cellule tramite l'osservazione istologica di alcune sezioni rimosse dal segmento iniziale.

Per quantificare il numero di cellule rimaste dopo ogni ciclo di lavaggio, le sezioni sotto analisi sono state colorate con un colorante fluorescente (4'-6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) che, legandosi fortemente al DNA, evidenzia la presenza dei nuclei delle cellule. Grazie alla microscopia a fluorescenza è stato possibile determinare il numero dei nuclei presenti e quindi delle cellule.

Per l'analisi morfologica, le sezioni sono state colorate con ematossilina ed eosina (EE) [3]. Si tratta di una colorazione di base nello studio microscopico dei tessuti animali: colora in blu violaceo, grazie all'ematossilina, le componenti cellulari cariche negativamente come gli acidi nucleici, le proteine di membrana e le membrane cellulari che sono quindi detti basofili, mentre colora in rosso, tramite l'eosina, le componenti cariche positivamente come molte proteine cellulari, le proteine mitocondriali e le fibre collagene che sono quindi dette acidofile.

Infine un ulteriore controllo della presenza di cellule all'interno della matrice è stato effettuato tramite la quantificazione dell'espressione dell'antigene MHC, utilizzando gli anticorpi HLA che reagiscono appunto alla presenza di cellule umane con l'espressione di MHC.

Coltura di cellule epiteliali

Dopo aver decellularizzato la matrice, si è provveduto a prelevare dalla ricevente dei campioni della mucosa del bronco principale destro tramite broncoscopia [3]. Questo tessuto è stato quindi trattato con una soluzione contenente tripsina: questa sostanza catalizza il taglio proteolitico ed è quindi in grado di ridurre le proteine a polipeptidi più piccoli o singoli aminoacidi. Il tessuto così lavorato è stato disgregato in componenti più piccole tramite la stimolazione con una pipetta di vetro. Per neutralizzare la soluzione contenente tripsina e permettere nuovamente l'adesione cellulare, è stato quindi utilizzato un particolare terreno di coltura (medium).

Un terreno di coltura è normalmente una soluzione liquida o solida che contiene sostanze nutritive grazie alle quali è possibile far crescere diversi tipi di cellule e microrganismi. Ci sono molte qualità di terreni di coltura: i più semplici servono solo a garantire la sopravvivenza delle cellule in vitro, mentre quelli più complessi possono svolgere anche altre funzioni, come favorire la crescita di determinate linee cellulari, sfavorendo contemporaneamente la proliferazione di altre, oppure identificare il tipo di cellule isolato nella specifica coltura.

Nel caso in esame è stato utilizzato un terreno di coltura contenente del siero bovino fetale, penicillina e streptomina (*Dulbecco's modified Eagle Medium*, DMEM). L'intero processo di disgregazione è stato ripetuto e infine le cellule sono state inserite in una centrifuga per 10 minuti a 1000 giri al minuto [3].

Le cellule ottenute dalla disgregazione del tessuto sono state quindi poste in provette contenenti del nuovo terreno di coltura DMEM e incubate per circa due giorni a una temperatura costante di 37° C in modo da favorirne l'adesione. Dopo questa fase, il terreno di coltura, ormai prosciugato dalle sostanze nutrienti che conteneva, è stato sostituito con un nuovo medium, contenente il fattore di crescita dell'epitelio, che veniva cambiato ogni cinque giorni.

Prima di seminare queste cellule sulla matrice decellularizzata, la coltura è stata centrifugata per prepararla all'analisi microscopica. In questa maniera è stato possibile assicurarsi che tutte le cellule contenessero citocheratina, la proteina necessaria per formare il tessuto epiteliale. Inoltre, per confermare il fenotipo delle cellule epiteliali, queste sono state contrastate con il colorante DAPI. Né l'analisi morfologica né quella immunohistologica hanno evidenziato la presenza di fibroblasti fra le cellule coltivate [3].

Coltura di condrociti

Oltre alle cellule epiteliali è stato necessario preparare anche i condrociti a partire dal midollo osseo della paziente. Questo è stato mischiato, centrifugandolo, a un terreno di coltura DMEM. In questo modo è stato possibile rimuovere lo strato che rimaneva in superficie e che era composto principalmente da grassi. Il composto ottenuto era formato da cellule staminali mesenchimali, ovvero pluripotenti e quindi capaci di differenziarsi in quasi tutti i tessuti di un organismo. Queste cellule sono state immerse in un nuovo terreno di coltura, dove sono state contate e quindi ridistribuite in diverse provette dove si trovava il fattore di crescita dei fibroblasti. Le cellule sono state quindi lasciate a riposo a una temperatura costante di 37° C per diversi giorni in modo da favorirne l'adesione e la proliferazione. Il terreno di coltura era sostituito ogni tre giorni, garantendo un corretto e continuo apporto di sostanze nutritive e rimuovendo contemporaneamente i cataboliti formati. Quando la confluenza, ovvero la percentuale della superficie della provetta ricoperta da cellule, ha raggiunto il 90 %, il tipo di medium è stato cambiato e le cellule sono state immerse in un terreno di coltura contenente, oltre alle sostanze necessarie alla loro sopravvivenza in vitro, degli specifici fattori di crescita atti a indurre la differenziazione in condrociti. Alla fine di quest'ultima fase, durata 72 ore, non si notava alcuna traccia di fibroblasti nelle cellule che si erano sviluppate [3].

Ripopolamento nel bioreattore

Dopo aver preparato sia la matrice sia le cellule, è stato preparato un apposito bioreattore che soddisfacesse contemporaneamente la richiesta di seminare e coltivare due diversi tipi di cellule su ciascun lato della matrice tubolare, di favorire lo scambio di

sostanze nutritive e prodotti di scarto delle attività metaboliche cellulari e di fornire segnali biomeccanici sotto forma di sforzi tangenziali idrodinamici [6]. Inoltre, per la comodità di utilizzo, l'intero sistema doveva poter essere trattato in autoclave, ovvero in uno strumento usato per sterilizzare con vapore ad alta temperatura, senza subire danni. Il dispositivo, che al suo interno è stato riempito per metà da un terreno di coltura adatto alle richieste di entrambi i tipi di cellule, faceva ruotare la matrice lungo il suo asse longitudinale: in questo modo le cellule erano costantemente spostate fra la fase liquida, costituita dal terreno di coltura, e la fase gassosa, costituita dall'aria (Figura 3.3). L'intera struttura era ospitata all'interno di una camera più grande formata da polisulfone, mentre la rotazione era garantita da un motore esterno alla camera di coltura, controllato da un processore, in modo che compisse 1-1,5 giri al minuto. Il bioreattore era completato da alcuni elementi secondari che servivano a mescolare continuamente il terreno di coltura in modo da favorire lo scambio di elementi nutritivi e di cataboliti da e verso le cellule seminate sulla matrice.

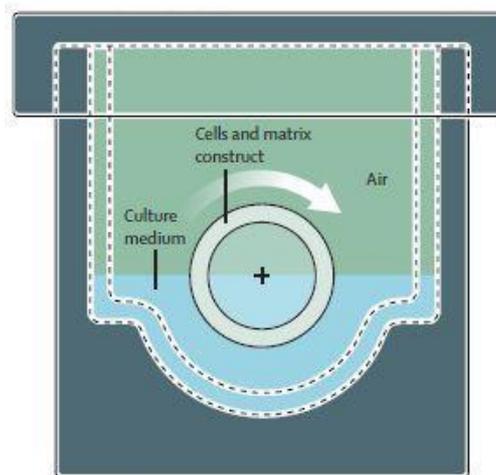


Figura 3.3.: Visione laterale schematizzata del bioreattore [3].

Dopo aver introdotto la matrice nel bioreattore, le cellule coltivate in vitro sono state seminate sulla sua superficie. I condrociti, estratti dalle provette, sono stati applicati longitudinalmente sulla superficie esterna della matrice grazie ad una microsiringa. Contemporaneamente, le cellule epiteliali sono state seminate sulla parete interna della matrice grazie ad un'apertura secondaria nel cilindro che fungeva da supporto. Ogni 30 minuti la matrice è stata ruotata di 90°, fino a quando tutte le superfici non sono venute

a contatto con le cellule [3]. Quindi è stato aggiunto dell'ulteriore terreno di coltura ed è iniziato il trattamento descritto in precedenza. Per garantire un apporto sufficiente di sostanze nutrienti, il terreno di coltura esterno, ovvero quello dei condrociti, veniva cambiato ogni 48 ore, mentre il terreno di coltura interno, ovvero quello delle cellule epiteliali, veniva cambiato ogni 24 ore. L'intero periodo di coltura all'interno del bioreattore è durato 96 ore.

3.1.5. *Intervento e situazione post-operatoria*

La paziente, dopo essere stata anestetizzata e sottoposta a intubazione tracheale double lumen, per permettere la ventilazione di un singolo polmone, è stata sottoposta a una toracotomia, così da permettere la mobilizzazione della parte distale della trachea e dell'intero bronco principale sinistro [3]. Quindi il bronco principale sinistro è stato reciso, cercando di riformare l'apertura naturale che collega trachea e bronco tramite un orifizio di circa 2 cm x 2 cm e mantenendo invece l'apertura presente nel polmone.

Quindi l'impianto prodotto è stato tagliato e collegato tramite una anastomosi terminale-terminale alle due aperture ricreate: grazie all'elasticità della trachea ingegnerizzata è stato possibile adattare perfettamente il dotto. In questo modo è stata ripristinata la ventilazione bilaterale: anche il polmone sinistro riusciva a ventilare in modo naturale. Dopo aver controllato la presenza di eventuali perdite, il torace della paziente è stato richiuso ed è stato rimosso il tubo endotracheale. Per due giorni la ricevente è stata tenuta sotto controllo nel reparto di terapia intensiva, per essere poi spostata in un reparto generico ed essere dimessa già al decimo giorno dopo l'operazione.

Come di norma, la paziente è stata seguita anche nel periodo postoperatorio: a distanza di quattro, quattordici, trenta e sessanta giorni sono state effettuate broncoscopie e test sierologici [3]. Le broncoscopie sono servite principalmente per prelevare campioni di tessuto tramite biopsia da analizzare in laboratorio, mentre gli esami sierologici avevano il principale scopo di evidenziare l'eventuale presenza di anticorpi antidonatore HLA, in modo da prevedere fenomeni di rigetto.

I test di funzionalità polmonare eseguiti a due mesi dall'operazione hanno mostrato dei valori perfettamente in linea con quelli normali (Tabella 3.2) e la paziente riusciva a svolgere l'attività fisica quotidiana senza problemi.

	2 mesi dopo l'operazione
FVC [L]	3,81 (100%)
FEV₁ [L]	3,17 (100%)
FEV₁/FVC	0,95
R_{aw} [kPa/L·s]	3,06
SG_{aw} [kPa ⁻¹ ·s ⁻¹]	0,122

Tabella 3.2.: Risultati dei test di funzionalità polmonare a due mesi dall'operazione (per il significato dei vari valori, si veda la Tabella 3.1) [3].

Esaminando l'impianto nel suo complesso, già al quarto giorno dopo l'operazione, questo risultava praticamente indistinguibile rispetto alla mucosa bronchiale adiacente: all'esame con il laser Doppler si poteva notare lo sviluppo di un ricco letto microvascolare. Dopo quattordici giorni la superficie dell'impianto era stata ricoperta da uno strato di mucosa sano e gli esami citologici evidenziavano l'assenza di ogni risposta infiammatoria. Dopo un mese, prendendo un campione di tessuto per gli esami, si è verificato un sanguinamento locale della mucosa, a significare una consistente rivascolarizzazione dell'impianto.

Le immagini provenienti dalla TAC effettuata un mese dopo l'intervento hanno mostrato un ripristino pressoché totale del lume originario del vaso e, se confrontate con la situazione preoperatoria, evidenziavano i benefici portati dall'operazione (Figura 3.4).

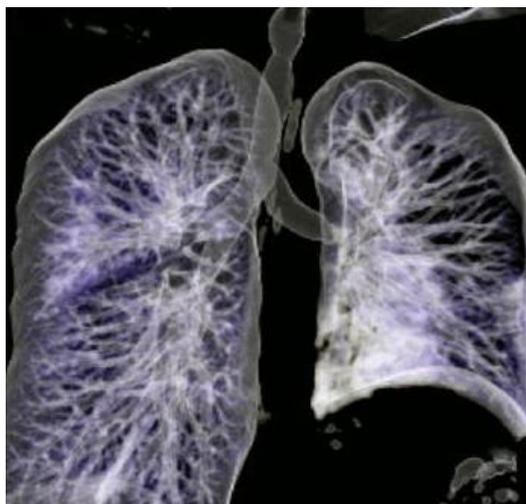


Figura 3.4.: Immagine ottenuta tramite TAC dopo l'operazione. L'area che inizialmente risultava occlusa è ora tornata alla normalità [3].

Infine l'esame citologico della superficie interna ha mostrato che il fenotipo delle cellule epiteliali presenti era esattamente lo stesso osservato prima della semina delle cellule sulla matrice: questa operazione non è quindi andata a modificare le cellule stesse.

3.1.6. *Risultati*

Una delle difficoltà principali che si incontrano nel processo di ingegnerizzazione di una via aerea è dovuta al fatto che questa rappresenta un'interfaccia fra l'interno e l'esterno del corpo umano. In queste aree si ha infatti presenza di molte cellule immunologicamente attive, necessarie a contrastare tutti gli agenti patogeni che potrebbero entrare nel corpo dall'esterno [3]. La presenza di queste cellule ha come effetto indesiderato quello di favorire l'insorgenza di rigetto nel caso di allotrapianti tradizionali: per evitare l'eventualità di rigetto, il paziente che si sottopone a un tale intervento deve assumere per lungo tempo dosi molto massicce di immunosoppressori. Poiché normalmente un intervento alle vie aeree come quello presentato non è di assoluta necessità, ma ha come scopo quello di migliorare la qualità di vita del paziente, il rapporto costi/benefici di un allotrapianto non è certamente favorevole. Per questo motivo si è pensato di rivolgersi all'ingegneria tessutale, in modo che, utilizzando una matrice decellularizzata da ripopolare con le cellule del ricevente, i rischi di rigetto venissero ridotti al minimo, pur mantenendo intatti i benefici derivanti dall'operazione. Tramite i diversi esami effettuati sulla matrice decellularizzata, è stato notato che i vari cicli di lavaggio non riescono a eliminare tutte le cellule del donatore, specialmente nelle aree cartilaginee. Questa presenza residua porta sia dei vantaggi sia degli svantaggi [4]: è stato dimostrato, infatti, che le cellule rimanenti da un lato possono contribuire a ridurre la risposta infiammatoria, oltre a fornire importanti segnali per le cellule che verranno seminate, mentre dall'altro possono portare a fenomeni cronici di rigetto.

Nonostante tutti i trattamenti enzimatici applicati alla matrice, questa ha mantenuto quasi completamente le sue proprietà elastiche tanto da permettere il suo adattamento in fase operatoria alle aperture preparate per accogliere l'impianto [4]. Inoltre non è stato possibile determinare se lo strato mucoso sviluppatosi un mese dopo l'operazione sulla

superficie interna dell'impianto derivi dalle cellule seminate sulla matrice oppure se sia stato originato dalle cellule adiacenti all'impianto. In ogni caso, anche dai test su animali fatti in precedenza, si può ipotizzare che, pur non essendo essenziali per la riuscita dell'operazione, le cellule seminate contribuiscano a velocizzare e migliorare la completa guarigione.

Si è anche potuto notare che l'adesione in vitro delle cellule epiteliali e dei condrociti sulla matrice decellularizzata raggiunge risultati soddisfacenti già in sole 24 ore [3]: ciò fa capire come questo supporto rappresenti un ottimo ambiente per l'adesione delle cellule seminate. Tale risultato è stato confermato anche dal fatto che, esaminando i terreni di coltura 24 ore dopo il loro inserimento nel bioreattore, non era possibile individuare la presenza di cellule, suggerendo un'adesione del 100%.

I risultati degli esami citologici hanno messo in luce la presenza sia di condrociti sia di cellule epiteliali su entrambe le superfici dell'impianto, nonostante i due ambienti del bioreattore fossero completamente separati. Una possibile interpretazione di questo risultato è che le cellule, nonostante il breve periodo di tempo a disposizione, siano state in grado di attraversare l'intero spessore della matrice: questa ipotesi, se confermata, aprirebbe nuovi scenari per il futuro dell'ingegneria tissutale.

Un altro aspetto interessante di questa applicazione innovativa è il bioreattore utilizzato per il ripopolamento della matrice decellularizzata [6]. Infatti le cellule epiteliali seminate sulla superficie interna hanno bisogno di diverse condizioni di coltura rispetto ai condrociti seminati sulla superficie esterna. Per questo motivo è stato necessario progettare un nuovo tipo di bioreattore con due camere di coltura separate, ognuna delle quali consentisse una rotazione fra la fase liquida e quella gassosa. In ultimo, è necessario porre attenzione alla rotazione data dal motore esterno. Questa ha due scopi principali: favorire gli scambi di sostanze nutrienti e di prodotti di scarto del metabolismo e fornire degli stimoli biomeccanici sotto forma di sforzi idrodinamici tangenziali che favoriscano lo sviluppo e la giusta differenziazione cellulare.

3.2. Matrice decellularizzata

3.2.1. Introduzione

Il trapianto umano di trachea ingegnerizzata è stato preceduto da esperimenti sugli animali [3]. In questa maniera è stato possibile stabilire una procedura da utilizzare

anche in ambito clinico sull'uomo. L'obiettivo finale era quello di creare segmenti di trachea ingegnerizzata lunghi più di 6 cm, che rappresenta la massima lunghezza di trachea malata asportabile in un individuo adulto senza bisogno di ricorrere a una sostituzione.

L'ingegnerizzazione era necessaria per evitare la possibilità di fenomeni di rigetto senza dover ricorrere a lunghe terapie a base di immunosoppressori.

Come donatori sono stati utilizzati tredici maiali maschi, da ognuno dei quali è stato prelevato un tratto di trachea lungo circa 12 cm [4]. Dopo l'espianto, ogni segmento è stato diviso a metà: una parte è stata trattata con dei detergenti enzimatici, mentre l'altra parte è stata usata come controllo. Le matrici ottenute sono state divise per i seguenti scopi:

- a) sei matrici trattate e sei matrici di controllo sono state utilizzate per analisi in vitro;
- b) sei matrici trattate e sei matrici di controllo sono state impiantate in dodici maiali di entrambi i sessi in modo da studiare le reazioni in caso di allotrapianto;
- c) le rimanenti due matrici, una per tipo, sono state tagliate in otto tratti l'una e quindi impiantate in sedici topi di entrambi i sessi in modo da studiare le reazioni in caso di xenotrapianto

3.2.2. *Espianto*

I tredici maiali donatori sono stati sedati e mantenuti sotto anestesia per tutta la durata dell'operazione di prelievo della trachea. Sono stati sottoposti a una intubazione orotracheale, seguita dall'asportazione dell'intera trachea in condizioni di sterilità. Effettuato l'espianto, è stata indotta la morte con una dose massiccia di agente anestetico, come previsto per gli esperimenti sugli animali.

Il segmento prelevato è stato diviso a metà in due tratti da 6 cm circa l'uno. Una parte, usata come controllo, è stata immersa in soluzione tampone (PBS), composta per l'1% da antibiotici e antifungini [4]. L'altra parte è stata trattata nella stessa maniera per le prime 24 ore e in seguito è stata sottoposta al processo di ingegnerizzazione. Sono state prelevate anche delle piccole sezioni in modo da sottoporle a un esame immunoistologico in vitro.

3.2.3. *Lavaggio della matrice*

Il trattamento di ingegnerizzazione della trachea, consistente principalmente in un trattamento detergente tramite enzimi, è iniziato con il distacco del muscolo tracheale e con la rimozione del tessuto che la ricopriva. Quindi il tessuto rimanente è stato immerso per quattro volte (4 ore ogni volta) nella soluzione PBS [4]. Quindi il tessuto è stato immagazzinato a 4° C per 48 ore e poi incubato in una soluzione al 4% di sodio desossicolato, che ha il compito di sciogliere le membrane cellulari e nucleari. Quindi i campioni sono stati immersi nuovamente nella soluzione PBS per un periodo lungo fino a due mesi, senza che perdessero le loro caratteristiche. Dopo ogni ciclo di trattamento, per quantificare le cellule rimaste, sono state analizzate dieci sezioni al microscopio. Queste sono state colorate col colorante fluorescente DAPI, che, legandosi al DNA, evidenzia i nuclei delle cellule: utilizzando un microscopio a fluorescenza sono state contate le cellule rimanenti. Inoltre le sezioni sono state sottoposte alla colorazione con ematossilina ed eosina in modo da valutare gli eventuali cambiamenti morfologici presenti nel tessuto.

Alla fine dell'intero processo di lavaggio, sia i campioni di trachea non trattata sia quelli ingegnerizzati sono stati sottoposti a degli esami per valutarne le proprietà meccaniche. E' stato utilizzato un dispositivo in grado di misurare con estrema precisione la tensione che si sviluppava nel tessuto applicando diverse deformazioni. Ogni campione di test è stato sottoposto a un carico monoassiale sempre crescente fino alla rottura, che si manifestava con una perdita di carico e con la comparsa di lacerazioni nel tessuto [4].

3.2.4. *Impianto*

I maiali riceventi sono stati divisi casualmente in due gruppi, a uno dei quali sarebbe stata impiantata la trachea ingegnerizzata mentre all'altro sarebbe stata impiantata la trachea non trattata. Dopo averli anestetizzati, i vari campioni sono stati inseriti sotto la cute e gli estremi distale e prossimale sono stati suturati alla cute circostante, in modo da lasciarli aperti [4]. Gli animali sono stati tenuti sotto osservazione per trenta giorni dopo l'operazione, alla ricerca di segni clinici di infiammazioni o di rigetto. Inoltre sono state fatte accurate analisi del sangue per valutare lo sviluppo di anticorpi dovuti a una risposta infiammatoria. A un mese dall'operazione, gli animali sono stati soppressi e le matrici sono state prelevate insieme a campioni di tessuto circostante.

Ai topi riceventi, dopo essere stati divisi come i maiali, sono stati impiantati i campioni di matrice sotto la cute del dorso [4]. Dopo sette, quindici, ventitre e trenta giorni i topi sono stati soppressi e sono stati prelevati dei campioni di tessuto da analizzare sia macroscopicamente sia microscopicamente (Figura 3.5).

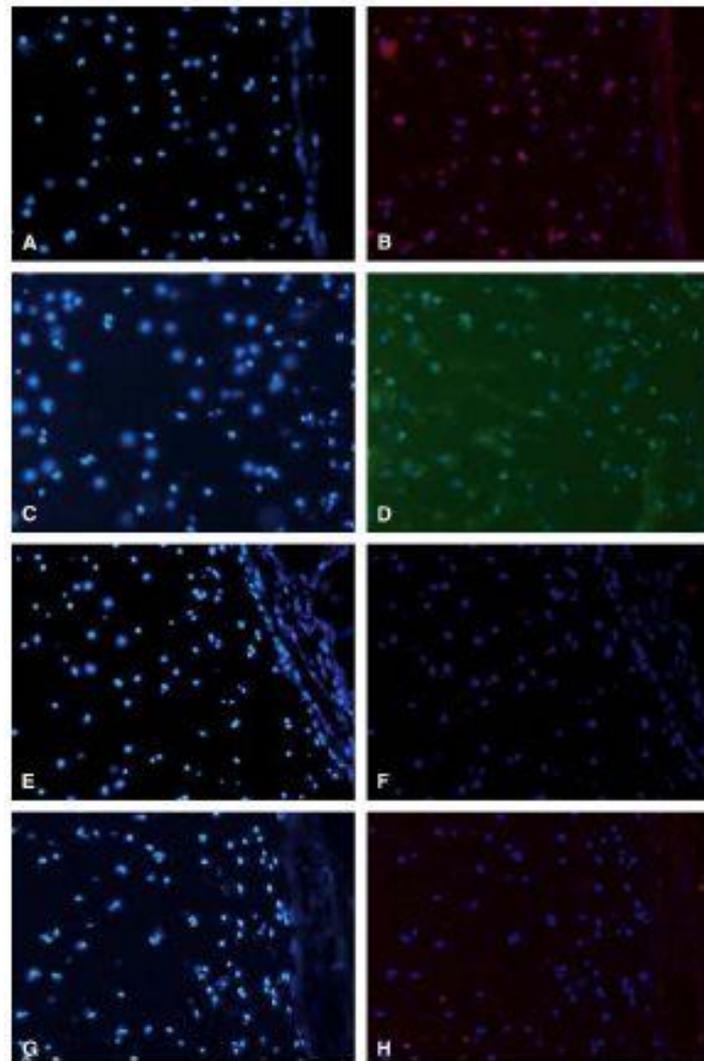


Figura 3.5.: Sezioni trasversali della trachea non trattata (A, C, E e G) e dopo diciassette cicli di lavaggio (B, D, F e H). Le immagini sono state contrastate con il colorante DAPI per evidenziare i nuclei cellulari e gli anticorpi anti MHC di classe I e II [4].

3.2.5. Risultati

Dopo diciassette cicli di lavaggio, le matrici tracheali ingegnerizzate mostravano la presenza residua di alcuni nuclei di condrociti, mentre non c'era traccia di anticorpi anti MHC di classe I e di classe II. Per quanto riguarda l'analisi delle proprietà meccaniche,

si è notato che fino al diciassettesimo ciclo di lavaggio le matrici ingegnerizzate presentavano valori dei parametri comparabili con quelli delle matrici non trattate. Un numero superiore di cicli invece comportava un iniziale cambiamento nelle proprietà della matrice (Tabella 3.3).

Caratteristiche	Trachea non trattata	Trachea ingegnerizzata (cicli di lavaggio)		
		10	17	20
Forza massima [N]	173,4 ± 3,2	189,1 ± 8,8	171,5 ± 4,6	162,4 ± 8,5
Forza di rottura [N]	56,1 ± 3,3	55,5 ± 1,8	55,5 ± 2,4	48,2 ± 3,1
Punto di rottura della trachea [cm]	12,2 ± 0,8	12,1 ± 0,5	12 ± 0,5	8,6 ± 1,2
Deformazione del tessuto [%]	203 ± 13	202 ± 9	200 ± 8	146 ± 15

Tabella 3.3.: Risultati dei test delle proprietà meccaniche. Con forza massima s'intende la massima forza applicata al campione [4].

Sia nel caso degli allotrapianti sia nel caso di xenotrapianti, gli impianti ingegnerizzati non hanno mostrato segni di fenomeni di rigetto o di risposta infiammatoria. A trenta giorni dall'operazione, le trachee ingegnerizzate presentavano livelli di infiammazione molto più contenuti rispetto agli impianti di controllo, che hanno mostrato anche la comparsa di aree necrotiche.

Nei maiali riceventi non si è verificata la comparsa di anticorpi SLA e nei topi non si è notato nessun aumento dei livelli di immunoglobuline M e immunoglobuline G (Tabelle 3.4 e 3.5).

Caratteristiche	Giorni dopo l'impianto	
	7	15
Macrofagi/mm²	125 ± 51 vs 13 ± 9	262 ± 53 vs 15 ± 5
Linfociti T/mm²	200 ± 85 vs 152 ± 43	367 ± 121 vs 160 ± 55
Anticorpi SLA	0/6 vs 0/6	0/6 vs 0/6

Caratteristiche	Giorni dopo l'impianto	
	23	30
Macrofagi/mm²	310 ± 47 vs 16 ± 6	392 ± 43 vs 15 ± 6
Linfociti T/mm²	655 ± 291 vs 158 ± 57	874 ± 289 vs 167 ± 55
Anticorpi SLA	1/6 vs 0/6	6/6 vs 0/6

Tabella 3.4.: Risultati dei test immunologici sulle matrici impiantate nei maiali [4].

Caratteristiche	Giorni dopo l'impianto	
	7	15
Macrofagi/mm²	111 ± 36 vs 10 ± 6	202 ± 29 vs 13 ± 7
Linfociti T/mm²	199 ± 76 vs 145 ± 46	297 ± 98 vs 140 ± 44
Siero IgM [mg/mL]	2,13 ± 0,25 vs 0,56 ± 0,11	2,11 ± 0,4 vs 0,51 ± 0,2
Siero IgG [mg/mL]	8 ± 4 vs 8 ± 2	9 ± 4 vs 8 ± 3

Caratteristiche	Giorni dopo l'impianto	
	23	30
Macrofagi/mm²	278 ± 60 vs 16 ± 8	341 ± 45 vs 17 ± 8
Linfociti T/mm²	595 ± 203 vs 144 ± 39	855 ± 178 vs 141 ± 33
Siero IgM [mg/mL]	1,51 ± 0,3 vs 0,48 ± 0,12	0,75 ± 0,35 vs 0,47 ± 0,21
Siero IgG [mg/mL]	19 ± 5 vs 10 ± 4	25 ± 6 vs 10 ± 3

Tabella 3.5.: Risultati dei test immunologici sulle matrici impiantate nei topi [4].

Gli antigeni di istocompatibilità suina (SLA) sono proteine presenti su tutte le cellule dei suini (a parte gli eritrociti). Queste proteine regolano la risposta immunitaria contro un gran numero di agenti patogeni e giocano un ruolo fondamentale nei meccanismi di espressione degli antigeni. Nei maiali come in altri animali si sono trovati tre tipi di antigeni di istocompatibilità, denominati SLA I, SLA II e SLA III. Nel caso avvenga un allotrapianto fra suini con antigeni diversi, si sviluppano anticorpi specifici, chiamati appunto anticorpi SLA.

Le immunoglobuline M (IgM) sono un tipo di anticorpi, ovvero delle proteine che sono coinvolte nella risposta immunitaria dell'organismo. Sono i primi anticorpi a essere prodotti dalle plasmacellule in caso di necessità. Le immunoglobuline G (IgG) sono anch'esse un tipo di anticorpi e sono maggiormente impiegate durante la risposta immunitaria secondaria, ovvero sono prodotte tardivamente.

Nella diagnostica di laboratorio, la presenza di questi anticorpi evidenzia lo sviluppo di un processo infettivo. Inoltre, quantificando e rapportando la popolazione dei due tipi di immunoglobuline, è possibile stabilire con una certa approssimazione da quanto tempo è iniziato il processo infiammatorio.

3.2.6. Considerazioni

A differenza di altre sostituzioni di organi, l'innesto di vie aeree è più complicato, poiché rappresentano l'interfaccia fra interno ed esterno del corpo. Per questo motivo la

mucosa che riveste le vie aeree contiene numerose cellule immunologicamente attive [3]: queste giocano un ruolo essenziale nel trapianto delle vie aeree, contribuendo a un rigetto acuto nel caso di allotrapianti e richiedendo una lunga e massiccia somministrazione di farmaci immunosoppressori. Poiché, come già detto, il trapianto di trachea non rappresenta un intervento salvavita, è necessario produrre una trachea ingegnerizzata che sia perfettamente compatibile con il ricevente e che possiede le stesse caratteristiche strutturali e funzionali dell'organo originale.

E' stato dimostrato che il lavaggio enzimatico rappresenta un ottimo metodo per produrre matrici tracheali che rispettino i requisiti richiesti. Si è inoltre visto che il tempo necessario per produrre un impianto con questo metodo è di circa trentacinque giorni, corrispondenti a diciassette cicli di trattamento [4].

Nonostante tutte le cellule epiteliali, interstiziali e muscolari siano scomparse dopo diciassette cicli di lavaggio, sono rimasti alcuni nuclei di condrociti (Figura 3.6). Questi però non hanno portato a una risposta immunologica, in quanto gli antigeni di questo tipo di cellule si trovano solamente sulla membrana cellulare e non su quella nucleare. Al contrario, la presenza di questi nuclei può aver portato benefici nella biocompatibilità generale della matrice e nel mantenimento delle caratteristiche meccaniche. Inoltre, le proprietà immunologiche e meccaniche si sono mantenute per due mesi nelle matrici immerse nella soluzione PBS.

Come evidenziato dagli esperimenti effettuati [4], un numero di cicli maggiore di diciassette comporta un peggioramento delle proprietà meccaniche del tessuto che è anche evidenziato dalle grandi dimensioni della matrice (Figura 3.6).

Le trachee ingegnerizzate hanno confermato le loro proprietà immunologiche durante gli studi effettuati dopo gli impianti: un possibile problema può essere la mancanza di vascolarizzazione dell'impianto.

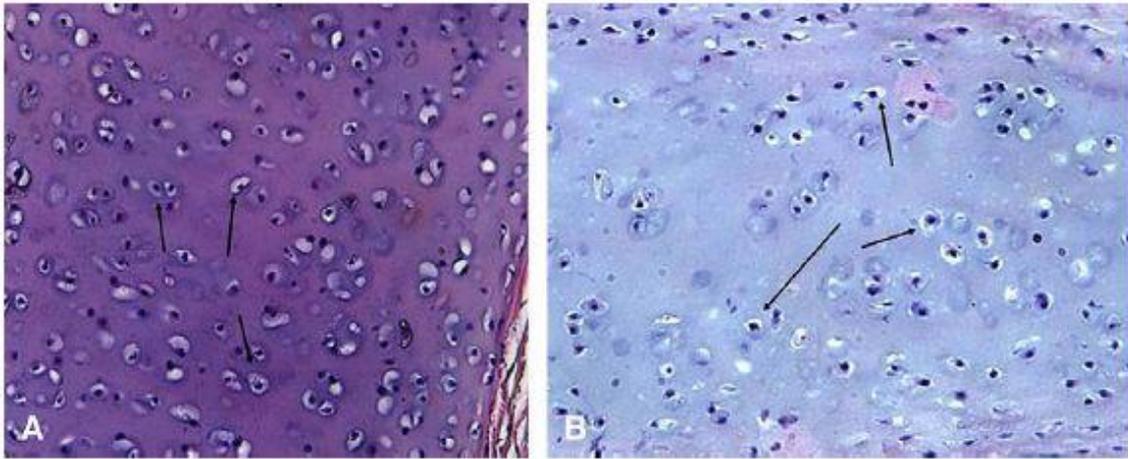


Figura 3.6.: Sezioni trasversali della trachea non trattata (A) e dopo diciassette cicli di lavaggio (B) contrastate con ematossilina ed eosina. Le frecce indicano i nuclei dei condrociti ancora intatti dopo il processo di ingegnerizzazione [4].

3.3. Bioreattori

3.3.1. Introduzione

Un bioreattore è un dispositivo la cui funzione principale è quella di controllare le condizioni ambientali, quali temperatura, pressione e umidità, e i parametri fisicochimici che consentono lo sviluppo di una cultura cellulare (Figura 3.7).

Un altro obiettivo che ci si pone con l'utilizzo dei bioreattori è quello di standardizzare e, possibilmente, automatizzare la creazione di impianti per l'ingegneria tissutale. Quest'ultima caratteristica consente di abbattere i costi, spesso molto elevati, richiesti normalmente dai processi utilizzati nella formazione di tessuto in vitro. Non si può ancora però parlare di una industrializzazione dell'ingegneria tissutale: infatti, il campo dei bioreattori è un settore di nuova concezione, in cui la ricerca gioca un ruolo chiave [7]. Per questo motivo ogni bioreattore deve essere concepito anche per raccogliere dati e informazioni in modo da consentire uno sviluppo adeguato.

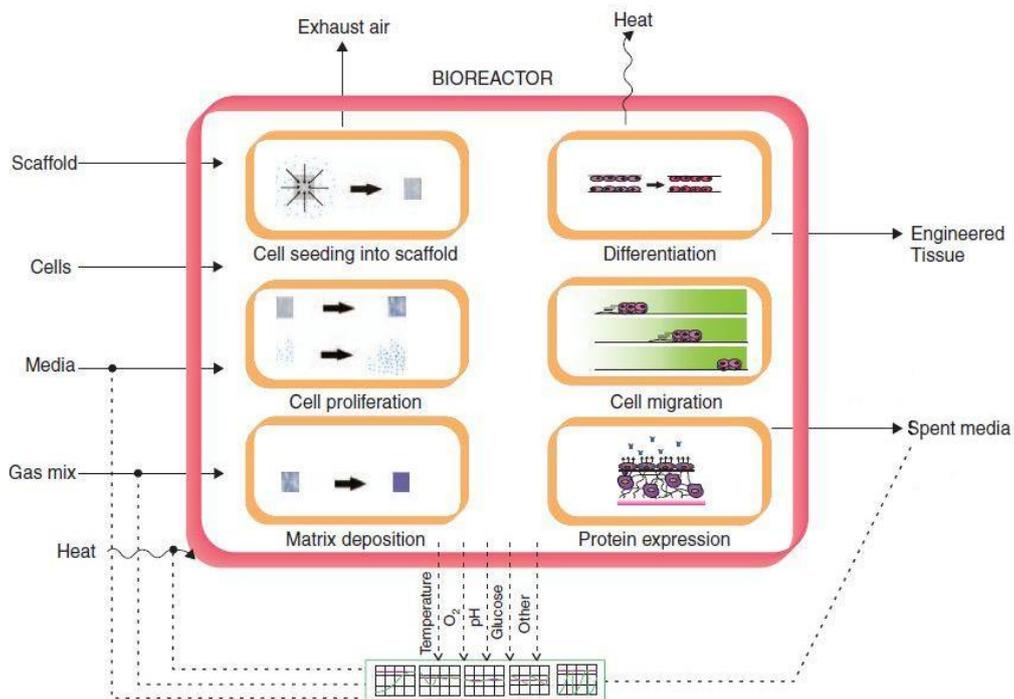


Figura 3.7.: Rappresentazione schematica di un bioreattore. Sulla sinistra si hanno tutti gli elementi che sono inseriti nel bioreattore, mentre sulla destra ci sono i prodotti del bioreattore. In basso si trovano i sensori che forniscono informazioni sui parametri interni del sistema: sulla base delle informazioni raccolte, si vanno a variare alcuni elementi inseriti, in modo da mantenere un ambiente favorevole alla coltura cellulare. All'interno del bioreattore sono infine schematizzati i processi principali delle operazioni di produzione di tessuto [7].

3.3.2. Funzioni principali

Verranno ora presentate le funzioni principali che deve possedere un bioreattore per cominciare e sviluppare una coltura cellulare tridimensionale.

Semina cellulare

Il processo di semina cellulare rappresenta uno dei passi fondamentali nel processo di creazione di un tessuto ingegnerizzato. La semina, la densità cellulare iniziale e la distribuzione delle cellule sul supporto tridimensionale sono variabili che vanno a influenzare la struttura, la composizione e, di conseguenza, la funzionalità del tessuto ingegnerizzato.

Poiché la fonte delle cellule da seminare è normalmente molto limitata, si deve cercare di massimizzare l'efficienza di tale operazione, in modo da conseguire il massimo risultato con la minima quantità di risorse impiegate. Le difficoltà maggiori si

incontrano nella semina di supporti tridimensionali, specialmente se questi hanno grandi dimensioni e un'architettura complessa.

La tecnica più comune per seminare le cellule su un supporto consiste nell'utilizzare una microsiringa, andando a inserire una sospensione concentrata di cellule all'interno di un supporto poroso (Figura 3.8.B). In questo modo però non è possibile né controllare né standardizzare l'applicazione delle cellule poiché il processo è effettuato manualmente da un operatore [7].

Per questo motivo sono stati introdotti dei bioreattori che "rimescolano" le cellule da seminare e che sfruttano quindi moti convettivi (Figura 3.8.C). Tale tecnica è in grado di aumentare la qualità e la riproducibilità dell'operazione, soprattutto nel caso di supporti sottili e molto porosi. In supporti diversi da quelli indicati, l'utilizzo di questo tipo di bioreattori non è ottimale: l'efficienza del sistema risulta infatti ridotta e comporta una semina non uniforme, con gran parte delle cellule che vanno a ricoprire la superficie esterna del supporto.

Un'altra tecnica di semina delle cellule, chiamata perfusione, consiste nell'inserire il supporto poroso direttamente nella sospensione cellulare (Figura 3.8.A). Evidenze sperimentali hanno mostrato che, in questa maniera, la semina risulta più efficace e uniforme, specialmente nel caso di supporti poco porosi e molto spessi. Inoltre, se il supporto ha delle caratteristiche anisotrope, grazie alla perfusione è possibile seminare le cellule secondo le caratteristiche non uniformi della matrice [7].

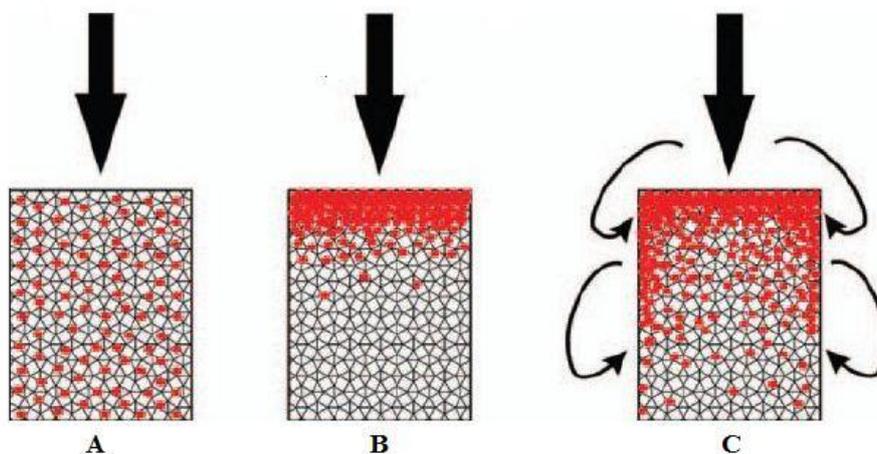


Figura 3.8.: Risultati della semina cellulare con diversi metodi: tramite perfusione (A), manualmente da parte di un operatore (B) e sfruttando moti convettivi (C) [7].

Un'ultima considerazione va fatta in merito a tutte quelle tecniche che sfruttano il movimento o il flusso delle cellule da seminare. In questo caso bisogna tener presente che tali operazioni possono influenzare sia la sopravvivenza delle cellule sia il loro fenotipo. Perciò sarà necessario sviluppare nuove tecniche che permettano di seminare anche le cellule che risentono molto dei problemi appena descritti, come ad esempio le cellule cardiache.

Trasporto di nutrienti

Dopo aver seminato le cellule sul supporto, il passo successivo consiste nel mantenerle in vita. Per fare ciò è necessario che i bioreattori forniscano alle cellule una quantità sufficiente di sostanze nutrienti e, allo stesso tempo, rimuovano adeguatamente i prodotti di scarto derivanti dal loro metabolismo [7]. Infatti, un apporto non adeguato di elementi nutritivi si può tradurre in una struttura e una composizione disomogenea dei supporti trattati: spesso questa situazione si riflette nella presenza di una zona necrotica all'interno degli impianti, dovuta alla morte delle cellule che non hanno ricevuto abbastanza sostanze nutrienti.

Rispetto ai bioreattori convenzionali, quelli che sfruttano i moti convettivi per il trasporto del terreno di coltura garantiscono un aumento degli scambi da e verso la superficie dell'impianto e, anche se in misura molto minore, all'interno dei pori. Inizialmente la convezione all'interno dei pori dipende esclusivamente dalla geometria e dalla permeabilità del supporto. In seguito, dopo lo sviluppo dell'impianto, i pori del supporto vengono occlusi dalle cellule e dalla matrice extracellulare che si formano: per questo motivo, l'efficienza della convezione si riduce col passare del tempo.

I bioreattori che usano invece la perfusione direttamente attraverso i pori del supporto per il trasporto del terreno di coltura permettono l'aumento dell'apporto delle sostanze nutrienti non solo sulla superficie ma anche nei pori più interni dell'impianto, eliminando idealmente i limiti di quantità di elementi nutritivi trasportabili [7]. È stato dimostrato che l'utilizzo di questo tipo di bioreattori favorisce la crescita e la differenziazione delle cellule, oltre a permettere un controllo più sensibile del consumo di risorse, come ossigeno e glucosio, da parte delle cellule grazie ad appositi biosensori. Questa possibilità è molto importante nella fase di creazione e sviluppo di nuovi

bioreattori, in quanto consente il monitoraggio della crescita cellulare passo passo. Purtroppo, anche nel caso dei bioreattori a perfusione, c'è la possibilità che si venga a creare un flusso del terreno di coltura lungo una direzione preferenziale, specialmente nel caso di supporti con una struttura anisotropa, lasciando così alcune parti senza un apporto adeguato di sostanze nutritive [7].

Riassumendo, per migliorare le prestazioni del bioreattore è necessario trovare un equilibrio tra il trasporto di elementi nutritivi e sostanze di scarto, la ritenzione dei componenti di nuova sintesi della matrice extracellulare all'interno del supporto e gli stimoli derivanti dagli sforzi tangenziali all'interno dei pori.

Stimoli meccanici

I tessuti presenti all'interno del corpo sono normalmente soggetti a impulsi derivanti da un complesso ambiente biomeccanico, formati da sollecitazioni dinamiche, tensioni, flussi fluidi e pressioni. Tutti questi stimoli possono risultare utili anche in vitro per incoraggiare e guidare l'attività delle cellule sul supporto.

I bioreattori hanno quindi anche lo scopo di fornire uno o più regimi di stimoli fisiologici all'impianto in modo da migliorare o accelerare la formazione di nuovo tessuto. Da evidenze sperimentali è risultato che, applicando opportuni stimoli, si aveva una maggiore produzione di matrice extracellulare, veniva migliorata l'organizzazione strutturale delle singole cellule e di conseguenza dell'intero tessuto, si induceva la differenziazione cellulare e si riusciva a migliorare la funzionalità complessiva del tessuto specifico.

La scelta e l'applicazione degli stimoli risulta però molto complessa: infatti non è ancora chiaro quali forze meccaniche siano in grado di stimolare un tessuto. Il tutto è complicato anche dalla presenza di numerosi tipi di cellule e di supporti, formati da materiali anche molto diversi tra loro, che richiedono diversi tempi di coltura. Inoltre, poiché i legami fra cellule e supporto variano durante il tempo di coltura, è facilmente intuibile che anche gli stimoli biomeccanici applicati debbano variare nel tempo [7].

Per stabilire i vari parametri da utilizzare nelle diverse applicazioni, si è proceduto empiricamente, imparando dai vari errori che sono stati commessi. L'unica maniera per migliorare la comprensione di come tali stimoli influenzino la crescita del tessuto è lo sviluppo, in contemporanea con i bioreattori, di modelli che riescano a prevedere i

risultati dell'applicazione di flussi fluidi e forze fisiche sulle cellule e sulla struttura alla quale aderiscono.

3.3.3. Progettazione di un bioreattore

La progettazione di un bioreattore è un processo assolutamente necessario [7]. A prescindere dalla sua complessità, che dipende dal tipo di applicazione che si vuole realizzare, anche a questo problema è possibile applicare il tipico approccio ingegneristico.

La progettazione inizia con la definizione del problema che si deve affrontare: per comprendere come meglio muoversi nelle fasi iniziali di progettazione di un bioreattore, è necessario formulare una definizione precisa dell'obiettivo che ci si pone. Questo, insieme alle richieste riguardanti il costo e la performance, sono le prime indicazioni che si devono individuare.

Dopo aver definito il problema, è possibile ideare una soluzione per la progettazione del bioreattore. Per prima cosa, sulla base delle richieste, bisogna trovare una serie di parametri, quali temperatura massima e minima, pH, umidità e pressione. In seguito tutti questi parametri vanno utilizzati per calcolare le caratteristiche dei diversi componenti che andranno a formare il bioreattore. Oltre a quelle necessarie per la specifica applicazione, ci sono altre caratteristiche che il sistema deve possedere: è necessario che sia biocompatibile, che impedisca l'adesione cellulare e che duri abbastanza a lungo da permettere il completamento dell'applicazione [7]. Inoltre, anche se non è essenziale, è desiderabile che il bioreattore sia facile da utilizzare e da pulire e che i vari componenti possano essere riuniti in un unico modulo.

Dopo aver creato il bioreattore di base, il passo successivo consiste nell'ottimizzare il sistema. Per procedere con questa operazione è necessario come prima cosa quantificare le prestazioni del sistema [7]. Poi si possono utilizzare i dati raccolti per variare i parametri che regolano il bioreattore, in modo da migliorarne i risultati. Da notare che l'ottimizzazione dei singoli componenti non comporta di fatto l'ottimizzazione dell'intero sistema.

3.3.4. Il bioreattore per l'ingegnerizzazione della trachea

Introduzione

Spesso si desidera sostituire un organo tubolare in modo da risolvere i problemi derivanti da una patologia o da un trauma. L'ingegneria tessutale è in grado di fornire degli impianti che riescono a soppiantare l'organo naturale sia nella struttura sia nella funzionalità [3]. La trachea rappresenta perfettamente uno di questi casi: si tratta di un condotto semplice la cui sostituzione può però portare a notevoli benefici (Figura 3.9).

Una trachea impiantabile deve soddisfare numerosi requisiti dei quali i due essenziali sono: deve possedere una struttura cartilaginea esterna semirigida mentre la superficie interna deve essere ricoperta da cellule epiteliali.

Il bioreattore per il trattamento della trachea deve quindi possedere le seguenti caratteristiche [6]:

- a) consentire diverse condizioni di coltura sulle due superfici, interna ed esterna, del supporto;
- b) fornire un apporto adeguato di sostanze nutrienti e gas all'interno dell'impianto.

Quest'ultimo è un punto chiave: infatti, risulta molto difficile soddisfare tale richiesta nel caso di strutture con dimensioni maggiori di 4 cm. Da queste premesse, si è progettato un nuovo tipo di bioreattore che riuscisse a superare questa difficoltà.



Figura 3.9.: Matrice tracheale all'interno del bioreattore durante la semina cellulare [6].

Progettazione

In fase di progettazione del nuovo bioreattore per l'ingegnerizzazione della trachea sono stati posti i seguenti obiettivi:

- a) facilitare le procedure di semina delle cellule su entrambi i lati della matrice tubolare tridimensionale;
- b) consentire la semina e la coltura di diversi tipi di cellule su ciascuno dei due lati del supporto;
- c) garantire l'ossigenazione del terreno di coltura e lo scambio di sostanze nutritive e cataboliti fra il terreno di coltura e le cellule;
- d) stimolare le cellule con stimoli idrodinamici che favoriscano l'attività metabolica e il processo di differenziazione;
- e) mantenere elevati standard di qualità;
- f) garantire la possibilità di automazione e, in futuro, di industrializzazione del processo.

Per soddisfare tutte queste richieste è stato progettato un bioreattore con due camere rotanti [6]. Questo dispositivo permette la semina e la coltura di cellule diverse da ognuna delle due parti della matrice tubolare e consente il movimento rotatorio della matrice lungo l'asse longitudinale. La rotazione permette un'alternanza fra la fase gassosa (atmosfera dell'incubatore) e quella liquida (terreno di coltura). In questo modo durante l'esposizione alla fase gassosa, la superficie della matrice rimane umida e si satura completamente di ossigeno.

Il dispositivo è costituito da tre parti principali (Figura 3.10): la camera di coltura, l'unità di controllo e l'unità che consente il movimento. La camera di coltura, in materiale polimerico, contiene per tutto il tempo necessario la matrice e il terreno di coltura. Per sostenere il supporto, sono stati costruiti dei sostegni in grado di ospitare matrici tubolari di diverse dimensioni (da 10 a 25 mm di diametro). La parte centrale di questi sostegni ha un diametro minore, in modo da consentire l'esposizione della superficie interna del supporto per la semina e la coltura cellulare.

Dopo aver posizionato la matrice, lo spazio interno, chiamato camera interna, è isolato dal resto dell'ambiente di coltura dalla parete della matrice. Un condotto collega la camera interna con l'esterno, garantendo così un accesso per la semina e

l'alimentazione delle cellule. L'apertura è protetta da un apposito filtro che garantisce l'ossigenazione e la sterilità della camera interna.

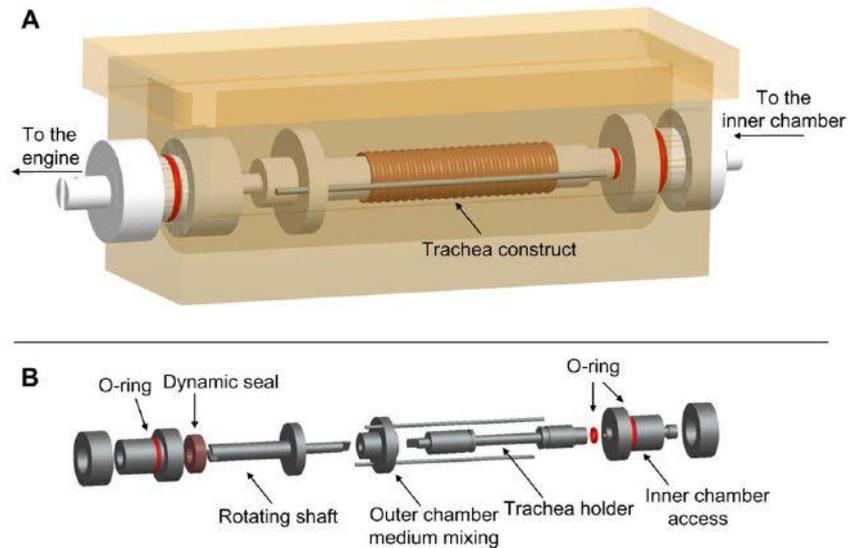


Figura 3.10.: Immagine tridimensionale dei componenti del bioreattore (A) e loro visione esplosa (B) [6].

Degli elementi secondari, che ruotano insieme ai sostegni ai quali è fissato il supporto, garantiscono un continuo rimescolamento del terreno di coltura, aumentando l'ossigenazione e migliorando il trasporto di sostanze nutrienti e cataboliti. La camera esterna è chiusa con una speciale copertura che garantisce contemporaneamente sterilità e adeguata ossigenazione. Infine l'intero sistema è trattabile in autoclave, ovvero può essere sterilizzato con vapore ad alta temperatura senza subire danni: questa caratteristica abbatte i rischi di contaminazione.

L'impianto è mosso da un motore DC esterno a velocità variabile (da 0 a 5 giri al minuto) e quindi separato dalla camera di coltura. La connessione fra l'unità di movimento e la camera di coltura è tale da permettere di muovere la seconda (ad esempio per cambiare il terreno di coltura) mentre la prima rimane ferma. All'esterno è posta anche l'unità di controllo, che regola e monitorizza le rotazioni.

Alla fine del periodo di coltura, si spegne il motore e, dopo aver sostituito il terreno di coltura, la camera di coltura viene staccata dal bioreattore e utilizzata per trasportare l'impianto dove necessario [6].

Ossigenazione

Il primo problema che si è affrontato è stato capire se era possibile fornire sufficiente ossigeno a una struttura biologica abbastanza grande da soddisfare le richieste avanzate in fase di definizione del progetto. Per studiare questa questione è stato sviluppato un modello matematico che si basava sui seguenti parametri: consumo di ossigeno, profondità di adesione cellulare e densità cellulare [6]. Per semplificare il modello sono state quindi fatte le seguenti assunzioni:

- a) si è ipotizzato che la struttura fosse un cilindro perfetto;
- b) la matrice è stata divisa in tre zone di diverso spessore (regione 1: si affaccia sulla camera interna del bioreattore ed è formata da cellule epiteliali; regione 3: si affaccia sulla camera esterna del bioreattore ed è formata da condrociti; regione 2: è acellulare e si trova tra la regione 1 e la regione 3) (Figura 3.11).

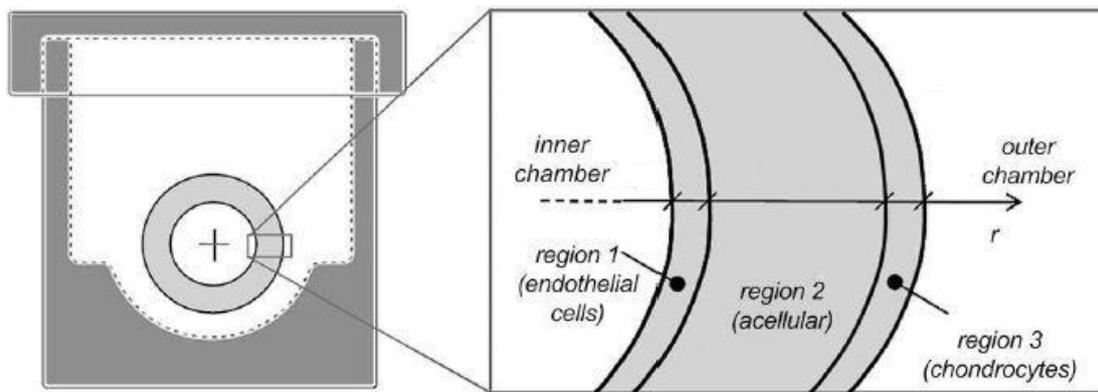


Figura 3.11.: Modello della trachea utilizzato per semplificarne lo studio e prevederne il comportamento. In particolare si nota la divisione in tre zone in base al tipo di cellule presenti: cellule endoteliali (regione 1), senza cellule (regione 2) e condrociti (regione 3).

Un secondo modello matematico è stato sviluppato per valutare la variazione della concentrazione d'ossigeno durante i lassi temporali nei quali veniva tolta la rotazione del bioreattore (ad esempio in occasione del trasporto del bioreattore).

Dalle previsioni dei modelli si è poi provveduto a impostare i vari parametri del bioreattore durante le fasi di semina e di coltura, in modo che si riuscisse ad ottenere quanto desiderato.

Semina e coltura cellulare

Dopo aver costruito il bioreattore, sono state preparate la matrice decellularizzata, proveniente dal donatore, e le cellule da seminare, provenienti dalla ricevente, come descritto in precedenza [4].

Sia l'operazione di semina sia quella di coltura delle cellule sono avvenute all'interno del bioreattore, in modo da evitare il più possibile rischi di contaminazione e da impedire una eventuale manipolazione fra le due fasi. La matrice è stata posizionata sul sostegno cilindrico, fissata a entrambe le estremità con punti di sutura per garantire la rotazione uniforme dell'impianto e posizionata all'interno del bioreattore. Le cellule coltivate in vitro sono state quindi prelevate dalle provette e, dopo essere state diluite all'interno del terreno di coltura, sono state applicate sulla matrice. I condrociti sono stati seminati longitudinalmente sulla superficie esterna della matrice con una microsiringa, mentre le cellule epiteliali sono state inserite sulla superficie interna. Dopo aver completato l'operazione di semina, all'interno di ognuna delle due camere del bioreattore è stato inserito dell'ulteriore terreno di coltura adatto allo specifico tipo di cellule fino a sommergere completamente la matrice. Il tutto è stato mantenuto in condizioni statiche a 37° C per 24 ore in modo da favorire l'adesione cellulare [7]. Dopo questo periodo iniziale il terreno di coltura è stato rimosso fino a quando circa metà della matrice non risultava esposta all'atmosfera dell'incubatore. Quindi è iniziato il periodo di coltura dinamico: l'impianto è stato messo in rotazione (1,5 giri al minuto) per 72 ore, durante le quali si è provveduto a cambiare il terreno di coltura (ogni 48 ore per i condrociti e ogni 24 ore quello delle cellule epiteliali).

Infine la rotazione è stata fermata ed entrambe le camere sono state svuotate dal terreno di coltura e il bioreattore è stato trasportato in sala operatoria. Qui la matrice è stata prelevata, adattata secondo le esigenze di forma richieste dall'applicazione e impiantata nella paziente a sostituire il bronco principale sinistro.

Risultati

L'ingegneria tessutale offre una valida risposta nella sostituzione di organi tubolari, ripristinando la funzione compromessa senza bisogno dell'utilizzo di immunosoppressori. L'utilizzo di strutture ingegnerizzate, realizzate con la semina di

cellule autologhe, sta mostrando risultati molto promettenti in queste prime applicazioni [7].

Più le funzioni e le strutture da rimpiazzare diventano complesse, più l'ambiente di coltura in vitro assume un ruolo essenziale. Diventa infatti necessario coltivare linee cellulari diverse le une dalle altre e realizzare strutture sempre più grandi: ciò comporta una crescente difficoltà di ossigenazione dell'intero impianto.

All'interno del sistema vengono a crearsi gradienti di ossigeno e di sostanze nutritive dovute al bilancio fra il loro apporto dall'esterno e il loro consumo da parte delle cellule. I modelli matematici sono utili vista la complessità del monitoraggio di questi gradienti all'interno del tessuto [7]. I modelli si concentrano maggiormente sul consumo di ossigeno in quanto il suo trasporto è limitato dalla sua solubilità in un mezzo acquoso: in questa applicazione il modello matematico è stato usato per prevedere la concentrazione d'ossigeno all'interno della matrice e dei terreni di coltura ed è servito a confrontare diverse configurazioni di coltura e condizioni di operatività del bioreattore fino a trovare quella che più rispondeva alle esigenze richieste dalla specifica applicazione. Nonostante alcune assunzioni fatte si siano rivelate troppo stringenti, i modelli hanno previsto che la concentrazione di ossigeno non sarebbe diminuita a valori critici in nessun passaggio del processo di ingegnerizzazione. Forti di questa conferma, si è proceduto alla realizzazione vera e propria del bioreattore.

Un limite del bioreattore progettato e realizzato è la bassa automazione [7]: per diminuire ulteriormente i rischi di contaminazione sarebbe innanzitutto necessario che i cambi del terreno di coltura avvenissero automaticamente. Inoltre, utilizzando dei sensori, ancor meglio se associati a un sistema di controllo a retroazione negativa, sarebbe possibile controllare più strettamente le varie fasi del processo di ingegnerizzazione del tessuto. Ciò permetterebbe di ottenere una maggiore riproducibilità dell'intero sistema.

Il lato innovativo di questo bioreattore è stato invece la prova che è possibile "personalizzare" la trachea proveniente da un donatore e impiantarla in un ricevente senza dover ricorrere alla somministrazione di immunosoppressori. Durante gli esami postoperatori si è notato al microscopio che il tessuto epiteliale che ricopriva la superficie interna della matrice risultava discontinuo [7]. In futuro sarebbe necessario migliorare le tecniche di applicazione delle cellule epiteliali, in modo da ottenere una

copertura più omogenea. Infine si può supporre che l'applicazione diretta di stimoli nel compartimento interno del bioreattore possa portare a un allineamento e, di conseguenza, a una funzionalità migliore delle cilia delle cellule epiteliali già prima dell'impianto. In questo modo la mucosa verrebbe ripulita in modo appropriato fin dal primo giorno dopo l'operazione.

4. Bibliografia

1. Di Bello C. (prima edizione, marzo 2004), “Biomateriali: introduzione allo studio dei materiali per uso biomedico”, Bologna (Italia), Pàtron Editore
2. Lanza R. et al. (terza edizione, agosto 2007), “Principles of Tissue Engineering”, San Diego (USA), Elsevier Academic Press
3. Macchiarini P. et al. (dicembre 2008), “Clinical transplantation of a tissue-engineered airway”, *The Lancet*, vol. 372, no. 9655, pp. 2023-2030
4. Jungebluth P. et al. (settembre 2009), “Structural and morphologic evaluation of a novel detergent–enzymatic tissue-engineered tracheal tubular matrix”, *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, vol. 138, no. 3, pp. 586-593
5. Burdett E. & Mitchell V. (agosto 2008), “Anatomy of the larynx, trachea and bronchi”, *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, vol. 9, no.8, pp. 329-333
6. Asnaghi M. A. et al. (ottobre 2009), “A double-chamber rotating bioreactor for the development of tissue-engineered hollow organs: From concept to clinical trial”, *Biomaterials*, vol. 30, no. 29, pp. 5260-5269
7. van Blitterswijk C. (prima edizione, marzo 2008), “Tissue Engineering”, San Diego (USA), Elsevier Academic Press
8. Fisher J.P. et al. (prima edizione, maggio 2007), “Tissue Engineering”, Boca Raton (USA), CRC Press
9. Conconi M. T. et al. (giugno 2005), “Tracheal matrices, obtained by a detergent-enzymatic method, support *in vitro* the adhesion of chondrocytes and tracheal epithelial cells”, *Transplant International*, vol. 18, no. 6, pp. 727-734