

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA



FACOLTA' DI INGEGNERIA

**TRATTAMENTO DI SCAFFOLDS CARTILAGINEI
DECELLULARIZZATI PER LA SEMINA DI
CELLULE MESENCHIMALI AUTOLOGHE**

Relatore: Ch. mo Prof. Alfredo Ruggeri

Correlatore: Ch. mo Ing. Federica Meneghesso

Laureando: Marco Bordignon

Corso di Laurea Triennale in Ingegneria Biomedica

Anno Accademico 2010/2011

INDICE

1. INTRODUZIONE	7
2. INGEGNERIA TISSUTALE PER LA CARTILAGINE	9
2.1. LA CARTILAGINE	9
2.1.1. <i>Patologie che colpiscono la cartilagine, le malattie reumatiche</i>	11
2.1.2. <i>Impatto socio-economico</i>	15
2.1.3. <i>Terapie attuali contro le malattie reumatiche</i>	20
2.2. INGEGNERIA TISSUTALE.....	25
2.3. CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI	29
2.3.1. <i>Semina e coltivazione cellulare</i>	32
3. STRUMENTAZIONE UTILIZZATA.....	35
3.1. IL BISTURI A RISONANZA QUANTICA MOLECOLARE <i>VESALIUS</i> [®]	35
3.2. IL ROBOT YAMAHA	36
3.3. CAPP A STERILE.....	37
3.4. POMPA PERISTALTICA.....	38
4. PROTOCOLLO DI SPERIMENTAZIONE.....	41
4.1. DEFINIZIONE DEI PARAMETRI DI LAVORAZIONE.....	42
4.2. SPERIMENTAZIONE CON CANALI INTRECCIATI	46
4.2.1. <i>Decellularizzazione dello scaffold</i>	48
4.3. TESTING DEL PROTOTIPO PER LA POMPA PERISTALTICA.....	49
5. RISULTATI	55
5.1. ANALISI DELLE MATRICI CARTILAGINEE	55
5.2. ANALISI DEI RISULTATI DI TESTING DEL PROTOTIPO DELLA POMPA PERISTALTICA	57
6. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE	63
BIBLIOGRAFIA.....	65

INDICE DELLE FIGURE

FIGURA 2-1: IMMAGINE AL MICROSCOPIO DI TESSUTO CARTILAGINEO.....	10
FIGURA 2-2: UNA MANIFESTAZIONE DELL'ARTRITE REUMATOIDE	12
FIGURA 2-3: PRINCIPALI CONSEGUENZE DELLE MALATTIE REUMATICHE A LIVELLO ARTICOLARE	13
FIGURA 2-4: <i>SHAVER</i> ALLA SPALLA	22
FIGURA 2-5: LASERTERAPIA NELLE APPLICAZIONI SU TRAUMI SPORTIVI	24
FIGURA 2-6: PRELIEVO DI TESSUTO CARTILAGINEO DA COLTIVARE <i>IN VITRO</i> PER POI ESSERE IMPIANTATO NUOVAMENTE	24
FIGURA 2-7: CELLULE MESENCHIMALI DA STROMA MIDOLLARE	30
FIGURA 2-8: PRELIEVO MIDOLLO OSSEO DA CRESTA ILIACA	32
FIGURA 3-1: <i>VESALIUS</i> [®] MCN, IL MODELLO UTILIZZATO PER LA SPERIMENTAZIONE .	35
FIGURA 3-2: IL ROBOT UTILIZZATO PER LA SPERIMENTAZIONE. L'AGO COLLEGATO AL BISTURI È APPLICATO NELLA COLONNA VERTICALE, CHE SI MUOVE LUNGO L'ASSE Z.	36
FIGURA 3-3: (A) FILTRO HEPA DI ESPULSIONE DELL'ARIA; (B) FILTRO HEPA DELL'ARIA DI RICIRCOLO; (C) ZONA A RISCHIO FACILMENTE RAGGIUNGIBILE PER LA DECONTAMINAZIONE; (D) FILTRO HEPA SOSTITUIBILE IN BAGOUT.....	37
FIGURA 3-4: ESEMPIO DI POMPA PERISTALTICA	39
FIGURA 4-1: FASI DEL PROCESSO DI LAVORAZIONE DEL TESSUTO	42
FIGURA 4-2: LA CANALIZZAZIONE APPLICATA AI TESSUTI. "D" È LA DISTANZA TRA I CENTRI DEI FORI, MENTRE "ANG" È L'ANGOLO FORMATO RISPETTO ALLA SUPERFICIE (CORRISPONDE A 60° RISPETTO ALLA VERTICALE).....	43
FIGURA 4-3: PIANO INCLINATO SU CUI APPOGGIA IL TESSUTO CARTILAGINEO, PER CREARE I CANALI ANGOLATI	43
FIGURA 4-4: I PUNTI IN NERO VENGONO ESEGUITI SOLAMENTE DAL TURN 1, QUELLI ROSSI DAL TURN 2.....	44
FIGURA 4-5: DISTANZE FORI SUCCESSIVI NELLA PRIMA FASE	46
FIGURA 4-6: SIMULAZIONE TRIDIMENSIONALE DELLA LAVORAZIONE A CANALI INTRECCIATI	46
FIGURA 4-7: DISTANZA FORI SUCCESSIVI NELLA SPERIMENTAZIONE CON CANALI INTRECCIATI; IN NERO SECONDO L'ANGOLAZIONE 60° IN ROSSO SECONDO L'ANGOLAZIONE -60°	47
FIGURA 4-8: VISIONE IN SEZIONE DEL MECCANISMO DI SEMINA	50
FIGURA 4-9: PROVE CON POMPA PERISTALTICA: (1) CONTROLLER DELLA POMPA PERISTALTICA; (2) SPUGNA CHE SIMULA IL CAMPIONE DI TESSUTO E POGGIATO SOPRA LA RETE DI SOSTEGNO; (3) MASCHERA CHE INCANALA IL TERRENO DI COLTURA. ..	50
FIGURA 5-1: IMMAGINI AL SEM DEI CANALI	55
FIGURA 5-2: ESAMI ISTOLOGICI SULLA CARTILAGINE LAVORATA	55
FIGURA 5-3: TESSUTO CARTILAGINEO NATURALE, DOPO LAVORAZIONE CON CANALI INCROCIATI	56

FIGURA 5-4: PROVE SU POMPA PERISTALTICA, ANDAMENTO TEMPI RISUCCHIO IN FUNZIONE DELL'ACQUA NEL SERBATOIO	57
FIGURA 5-5: PROVE SU POMPA PERISTALTICA, PORTATA IN FUNZIONE DELL'ACQUA NEL SERBATOIO	58
FIGURA 5-6: SCHEMA DI FUNZIONAMENTO DI UNA POMPA ROTATIVA; (A) IL GAS VIENE ASPIRATO DALLA CAMERA DA VUOTO; (B) IL GAS VIENE COMPRESSO; (C)IL GAS VIENE ESPULSO TRAMITE LA VALVOLA	60
FIGURA 6-1: IL DISPOSITIVO DI RIGENERAZIONE TESSUTALE REXONAGE	64

1. INTRODUZIONE

Il miglioramento della qualità della vita e del benessere aumenta le aspettative di vita della popolazione, ma inevitabilmente apre nuove problematiche legate alle malattie e ai problemi tipici dell'avanzare dell'età. In particolare le malattie che invalidano e compromettono la quotidianità dei pazienti sono quelle che colpiscono le articolazioni. Vengono, infatti, considerate malattie sociali e comportano un grave peso socio-economico.

Le cure attuali non rispondono in maniera adeguata alle problematiche che tali malattie comportano nella vita sociale, ed è necessario sviluppare nuove tecniche di maggiore efficacia che mirino non tanto al miglioramento delle condizioni del paziente ma alla cura dalla malattia. L'obiettivo che ci poniamo in questo progetto di ricerca, infatti, è quello di creare un tessuto che sostituisca quello danneggiato e sia simile strutturalmente e biologicamente a quello originale.

In particolare il nostro scopo è quello di ricreare tessuto cartilagineo *in vitro*, essendo proprio la cartilagine il tessuto colpito dalle malattie o traumi articolari, che ha scarse proprietà rigenerative e di autoriparazione. Per ricostruire il tessuto è stato usato uno scaffold di origine naturale, ed è stato trattato utilizzando un robot di precisione e la tecnologia innovativa del bisturi a Risonanza Quantica Molecolare. Sono stati creati dei canali nei quali vengono successivamente inserite cellule staminali adulte autologhe, ossia provenienti dal paziente stesso, che grazie alla loro attività biologica producono nuovo tessuto. Tessuto e cellule sono quindi assolutamente compatibili e non presentano problemi di rigetto in quanto la provenienza è totalmente autologa.

Questa nuova tecnica è una grande innovazione rispetto alle attuali tecniche, ed il suo successo rappresenta una vera svolta, che va a ripercuotersi positivamente sulla situazione socio-economica della società. Più in generale questa tecnica può estendersi anche ad altri tessuti umani, ed in futuro anche ad interi organi.

2. INGEGNERIA TISSUTALE PER LA CARTILAGINE

2.1. LA CARTILAGINE

Il tessuto più colpito dalle malattie o traumi ai danni delle articolazioni è la cartilagine, in particolare la *cartilagine ialina*.

La *cartilagine ialina* (colore bianco/bluastro) è la più diffusa (rispetto agli altri tipi, elastica e fibrosa), e costituisce lo scheletro del feto, prima della calcificazione. Inoltre durante lo sviluppo, è presente tra epifisi e diafisi, e successivamente si calcifica a sviluppo completo. Nell'adulto si trova praticamente soltanto nelle articolazioni ed in altri pochi punti come le cartilagini costali, nasali e tracheali.

La cartilagine articolare è costituita da cellule detti condrociti, ed è una lamina sottile, priva di pericondrio¹, molto levigata, inoltre è soffice, compressibile, estendibile e deformabile; grazie a queste sue proprietà funziona da cuscinetto ammortizzatore che salvaguarda i rapporti articolari e permette il movimento.

Queste caratteristiche sono date dalla particolare composizione chimica della sostanza fondamentale prodotta dalle cellule cartilaginee (condroblasti) che restano in maniera inattiva inglobati in nicchie attorno alla matrice extracellulare trasformandosi in condrociti (condroblasti quando sono inattivi). Il tessuto cartilagineo è quindi formato da cellule e sostanza fondamentale. Quest'ultima è formata da acqua (65-80%), fibre di collagene (50% del peso a secco), proteoglicani (25-40% del peso a secco), acido ialuronico e glicoproteine.

La parte liquida ha la capacità di assorbire i carichi anche applicati velocemente (traumi) dando una certa deformazione elastica, la parte solida invece ne aumenta la resistenza. Queste due fasi interagiscono per garantire un cinematismo senza attrito che protegge le superfici articolari. Con l'avanzare dell'età lo strato interno si mineralizza e si riducono proteoglicani e acqua, con conseguente diminuzione delle proprietà meccaniche.

¹ Pericondrio: lamina di tessuto connettivo fibroso che riveste gli altri tipi di cartilagine

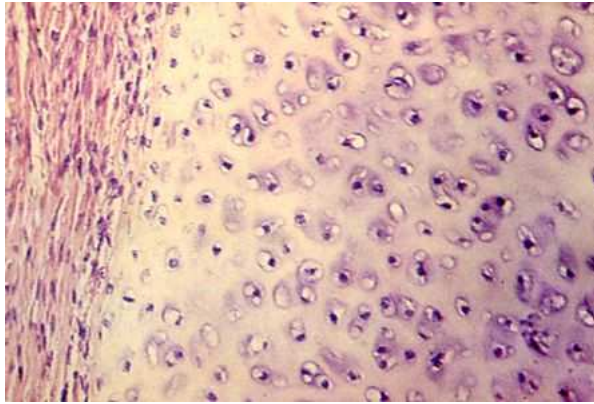


Figura 2-1: Immagine al microscopio di tessuto cartilagineo

La funzione delle fibre di collagene è di formare un intreccio per sostenere i proteoglicani, i quali sono responsabili dell'opposizione alle sollecitazioni. Infatti, la reversibilità delle deformazioni della cartilagine sottoposta a compressione dipende dalla capacità dei proteoglicani di legarsi all'acqua. Poiché con l'età si riduce la percentuale sia di proteoglicani che di acqua, alcune deformazioni dovute a compressione divengono irreversibili.

Come anticipato precedentemente la cartilagine è formata solamente da cellule e matrice extracellulare, perciò, non è innervata né vascolarizzata, ed il nutrimento dei condrociti avviene per diffusione dal liquido sinoviale², ed in parte dai vasi dall'osso subcondrale. Questo processo essendo lento e meno efficace della circolazione sanguigna è uno dei motivi che fanno sì che la cartilagine sia un tessuto con scarse capacità rigenerative.

² Liquido sinoviale: liquido presente nella cavità articolare che ha anche la funzione di lubrificare le articolazioni

2.1.1. Patologie che colpiscono la cartilagine, le malattie reumatiche

Per malattie reumatiche si intendono quelle malattie che colpiscono l'apparato muscolo scheletrico, possono interessare ossa, articolazioni e muscoli, ma anche organi interni quali ad esempio il cuore ed i polmoni. In questo studio ci occuperemo solamente delle articolazioni, ovvero le parti del corpo decisamente più colpite.

Le articolazioni sono zone che connettono due o più capi ossei tra loro, e in particolare nelle articolazioni mobili consentono anche il movimento relativo tra essi secondo certe direzioni. Per evitare fenomeni degenerativi dovuti all'usura, nella maggior parte dei casi si tratta di un contatto non diretto ma mediato da tessuto fibroso o cartilagineo e/o da liquido.

Essendo la cartilagine la componente articolare più colpita dalle malattie reumatiche, per le conseguenze che queste malattie hanno, possiamo definirle senza dubbio malattie che riguardano direttamente il tessuto cartilagineo.

Sebbene esistano più di 100 malattie reumatiche, anche molto diverse tra loro sia per sintomi che per conseguenze, tutte sono accomunate da un impegno articolare, doloroso e con capacità funzionale ridotta. Queste malattie hanno solitamente un andamento cronico, e possono essere di tipo degenerativo (l'artrosi), infiammatorio (l'artrite) o dismetabolico, cioè legate a disturbi metabolici (acido urico, diabete, obesità, ecc.). La maggior parte delle malattie reumatiche si manifestano negli anziani, ma anche adulti e bambini possono soffrirne (fino a 18 anni l'1%, da 19 a 60 anni il 18%, oltre 60 anni l'81% del totale delle malattie) [1].

Le cause sono sconosciute, o meglio, a differenza di altre malattie dell'età moderna, queste sono nate con l'uomo.

Sono state fatte solamente delle ipotesi sulle cause, e sono stati trovati dei fattori di rischio che aumenterebbero la probabilità di essere colpiti, in particolare il fumo, la dieta, l'attività fisica, fattori climatici come l'umidità e la temperatura. In generale però, sono malattie difficili da prevenire direttamente. E' possibile effettuare una prevenzione secondaria, la cui caratteristica fondamentale è la diagnosi precoce, grazie alla quale, con terapie farmacologiche, più del 50% dei malati raggiungono una remissione stabile della malattia.

Le malattie reumatiche più diffuse e che colpiscono gran parte della popolazione mondiale sono quindi l'artrite e l'artrosi:

- L'**artrite** (dal greco *artro-ite*: infiammazione dell'arto) non sta ad indicare una sola malattia, ma il processo infiammatorio che la caratterizza, e dal quale deriva il serio danno articolare. E' una malattia infiammatoria, cronica, e si possono avere *monoartriti* (una sola articolazione colpita), *oligoartriti* (poche articolazioni colpite) oppure *poliartriti* (più articolazioni colpite). Le conseguenze principali sono l'erosione ossea, la riduzione (fino alla scomparsa) della cartilagine articolare e versamenti. Ne esistono diverse forme: reumatoide, psoriasica, infettiva, reattiva, da microcristalli; ma la più frequente e studiata è l'artrite reumatoide. Questa malattia, che colpisce in Italia 300.000 persone, il 75% delle quali donne, è una poliartrite cronica autoimmune, a decorso progressivo, che causa quindi un'alterazione del sistema immunitario che fa comparire risposte immuni contro l'organismo stesso, in questo caso ai danni delle articolazioni. Provoca un'infiammazione dolorosa in una o più articolazioni, spesso in quelle piccole ed in maniera simmetrica (entrambe le mani, le spalle ecc). La terapia farmacologica attuale mira a contrastare il dolore (analgesici, antinfiammatori) e ad impedire la progressione delle lesioni articolari (farmaci in grado di interferire con l'azione autoimmune).

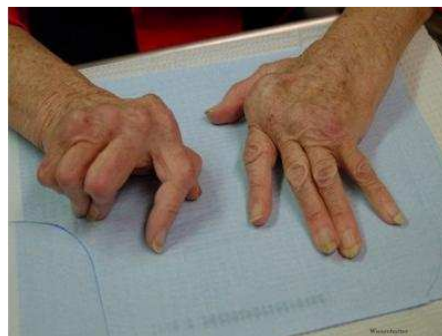


Figura 2-2: Una manifestazione dell'artrite reumatoide

- L'**artrosi** (dal greco *artro-osi*: degenerazione dell'arto), detta anche osteoartrosi, è la continua lacerazione della cartilagine articolare, e quindi le lesioni più rilevanti di questa malattia reumatica sono proprio a livello della cartilagine, con un interessamento secondario dell'osso subcondrale. Colpisce in Italia quasi 4 milioni di persone ed è anch'essa ad evoluzione cronica, e può colpire tutte le articolazioni.

Si possono distinguere due tipi di artrosi: quella primaria, legata soprattutto all'invecchiamento (può sorgere anche in età adulta o raramente in età infantile, ma la grande maggioranza, l'80% circa, dei malati di artrosi sono persone oltre i 60 anni) ed una secondaria, legata a traumi o a stress ripetuti. Le conseguenze sono dunque un danno "meccanico", con una limitazione funzionale dell'articolazione, che è uno stato di difficoltà nel compiere i movimenti, ed è proporzionale al danno cartilagineo. Le terapie attuali prevedono cure a breve termine, cioè controllo del dolore (farmacologica), e a lungo termine, cioè l'arresto o il rallentamento della malattia [1].

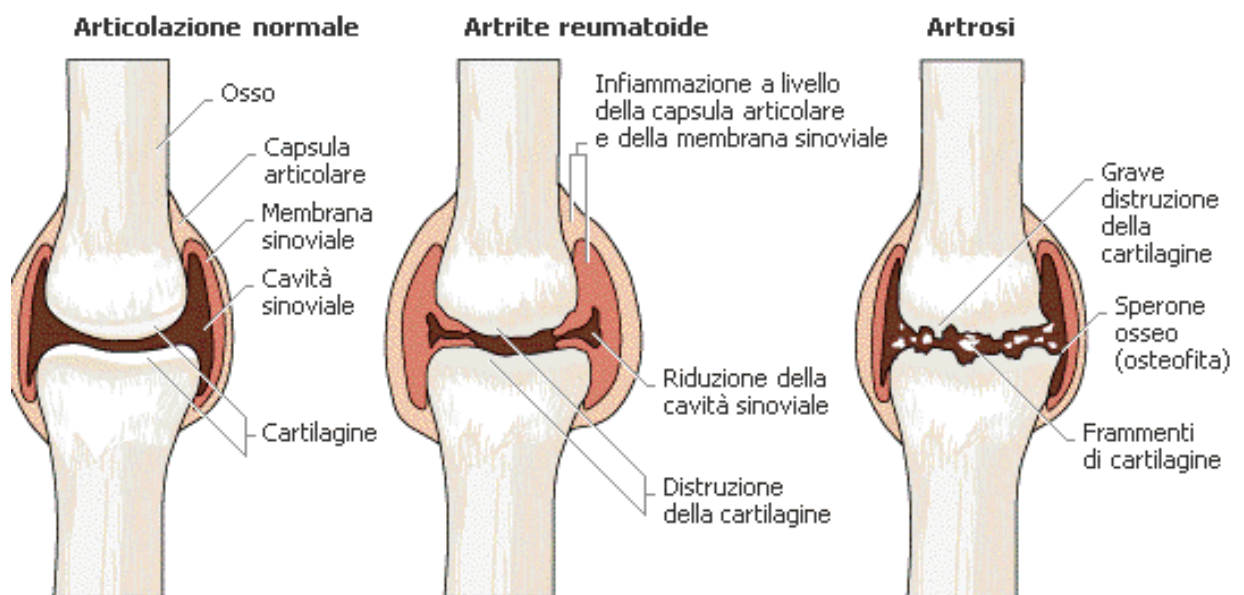


Figura 2-3: principali conseguenze delle malattie reumatiche a livello articolare

I danni alla cartilagine non sono solo causati da malattie vere e proprie, ma anche da eventi come fratture, semplici traumi, od un'attività fisica che sollecita troppo o nel modo sbagliato le articolazioni, come la ripetizione di un gesto atletico non corretto, causato da errore o dalla ricerca della massima prestazione.

Altre cause possono essere degli squilibri muscolari tra muscoli flessori ed estensori, l'allenamento non corretto con carichi non bilanciati, l'errata periodizzazione o periodi di recupero insufficienti, ed infine l'uso di materiali e attrezzi non idonei, come il materiale di piste e palestre troppo rigidi o troppo elastici, i terreni dei campi di gioco non adatti, gli attrezzi non adeguati in assoluto o relativamente alla morfologia dell'atleta.

Ad esempio la *condropatia rotulea*, che interessa lo strato di cartilagine dietro la rotula, abbastanza frequente nello sportivo, può portare ad artrosi al ginocchio, ed è causata da eccessive sollecitazioni a cui è sottoposto o da un trauma acuto. Le articolazioni sono, infatti, insieme ai muscoli, le parti del corpo più sollecitate, e spesso in malo modo o per tempi troppo lunghi, andando incontro ad una progressiva degenerazione. Questo potrebbe portare a problemi articolari non solo durante il periodo di attività, ma le conseguenze potrebbero manifestarsi anche molti anni dopo con l'artrosi.

Un'alternativa alle terapie farmacologiche arriva dai nuovi studi dell'Ingegneria Tissutale, che consentirebbero guarigioni complete e tempi di recupero veloci, fattori fondamentali per lo sport professionistico e non solo; benessere fisico quotidiano del malato, recupero delle attività e dei movimenti che con la malattia erano stati compromessi.

2.1.2. Impatto socio-economico

Rispetto ad alcune gravi malattie mortali, a decorso veloce, quelle reumatiche sono spesso sottovalutate, e poco considerate, visto il loro decorso lungo, la difficile diagnosi prematura visti i sintomi lievi che non allarmano le persone e al fatto che non sono quasi mai malattie “direttamente” fatali.

Vedremo però che in realtà, queste patologie hanno un peso socio-economico tra i più considerevoli, che le rende importanti quanto quelle più gravi e più temute, tanto che il decennio attuale è stato dichiarato il "*Bone and joint decade*" (“Decennio dell’osso e della Cartilagine”) da parte dell'*Organizzazione Mondiale della Sanità* (OMS). Le malattie muscolo scheletriche, infatti, sono la causa più comune di dolore severo, disabilità e assenza temporanea dal lavoro tra i paesi avanzati e si stima che nei paesi occidentali consumino fino al 3% del prodotto interno lordo [2].

Le malattie reumatiche (non solo quelle croniche degenerative, ma anche quelle acute e traumatiche) sono molto frequenti, ben il 10% della popolazione italiana è affetto da un “reumatismo” dovuto a malattia vera e propria o a traumi, per questo possono essere considerate malattie sociali. Il 50% delle forme più severe di malattie reumatiche porta ad invalidità permanente dopo 10 anni, e la conseguenza di questo è che il 27% delle pensioni di invalidità erogate in Italia riguardano queste malattie, al secondo posto dopo le malattie cardiovascolari [2].

L’impatto economico che deriva dalle malattie reumatiche può essere considerato secondo costi diretti ed indiretti: i costi diretti sono quelli sostenuti direttamente per la cura della malattia, quindi comprendono le visite specialistiche, gli esami radiologici, i ricoveri, i farmaci, ecc.; mentre quelli indiretti rappresentano il “costo sociale” supportato dal sistema previdenziale italiano a causa della perdita di giornate di lavoro (vedi Tabella 2-1).

Per le malattie reumatiche croniche, in Italia, la spesa totale supera i 4 miliardi di euro all’anno (1,739 miliardi di euro solo per la perdita di produttività). Circa 734 mila dei 5 milioni di persone che in totale soffrono di malattie reumatiche. In particolare, ad esempio, l’artrite reumatoide (che colpisce in soprattutto persone tra i 30 e i 50, 75% delle quali donne) è responsabile di oltre 13 milioni di giornate di assenza dal lavoro, con costi diretti di circa 1,4 miliardi di euro ed indiretti di 981 milioni euro, mentre la

spondiloartrite (che rappresenta un gruppo di malattie reumatiche croniche infiammatorie) provoca 10 milioni di giornate di assenza con costi diretti ed indiretti rispettivamente di 950 e 758 milioni di euro [3].

L'artrosi invece (la malattia più comune), che colpisce 4 milioni di persone in Italia, provoca costi totali (compresi quelli sostenuti dai pazienti) di 6,5 miliardi di euro annui.

Negli Stati Uniti solo per gli interventi di protesi (100 mila al ginocchio, 50 mila d'anca all'anno) la spesa è di 1,8 miliardi di dollari [3].

Ci sono anche dei costi che potrebbero essere definiti intangibili, visto che calcolarne l'effettivo valore non è possibile, e sono soprattutto rappresentati dall'abbassamento della qualità della vita al quale è costretta la persona malata e la sua famiglia in generale [1].

COSTI DIRETTI
Costi sanitari:
• visite mediche (generali e/o specialistiche)
• interventi chirurgici
• visite di pronto soccorso
• utilizzo dei servizi di riabilitazione (fisioterapisti, terapisti, assistenti sociali, etc)
• farmaci (prescritti o non prescritti)
• diagnosi e/o procedure terapeutiche (immagini, test di laboratorio)
• dispositivi medici
Costi di degenza:
• ricoveri per sintomi acuti che non richiedono interventi chirurgici
• ricoveri per sintomi acuti che richiedono interventi chirurgici
• ricoveri per servizi di assistenza in generale (riabilitazione, assistenza a domicilio)
• ricoveri per sintomi non acuti
Costi personali:
• spese di trasporto
• perdita di tempo libero
• perdita di tempo lavorativo
Altri costi direttamente legati alla patologia:
• adattamenti "ambientali", ristrutturazione dell'abitazione
• apparecchiature medicali
• assistenza a casa da parte dei familiari

COSTI INDIRETTI
Cambiamento del modo di vivere:
<ul style="list-style-type: none"> • spostamento in una casa di cura o di riposo • necessità di servizi di assistenza domiciliare
Costi relativi all'occupazione:
<ul style="list-style-type: none"> • perdita di produzione (sociale) e perdita di produttività per malati e accompagnatori • pensioni di invalidità • perdita di opportunità (occasioni perdute per se stessi o per la famiglia, o restrizioni) • perdita dello stipendio
COSTI INTANGIBILI
Deterioramento della qualità della vita, del paziente, della famiglia, rapporto con gli amici, i cambiamenti di abitudini di vita, le restrizioni, le inibizioni

Tabella 2-1: categorie dei costi delle malattie reumatiche

È necessario tener presente che i costi indiretti aumentano in modo esponenziale con l'aggravarsi della malattia rispetto a quelli diretti, quindi diventa fondamentale la diagnosi e la terapia precoce, ma sarebbe di importantissimo trovare un'alternativa che consenta non solo di arrestare il progresso della malattia ma curarla completamente; ciò significherebbe azzerare i costi indiretti.

Gli obiettivi che si pone l'ingegneria dei tessuti, riguardano la sostituzione dei tessuti umani danneggiati (in questo caso da patologie, o traumi) con nuovo tessuto ingegnerizzato, sintetico o naturale, con le stesse caratteristiche morfologiche e le stesse proprietà meccaniche e funzionali del tessuto originale. Un successo di queste tecniche permetterebbe, nel caso delle malattie reumatiche, sia di curare pazienti in stadi avanzati della malattia, che pazienti con i primi sintomi, mediante la sostituzione della cartilagine lesa che abbiamo visto essere il tessuto decisamente più colpito da queste malattie. Questo permetterebbe una guarigione totale, ed un risparmio notevole per il sistema previdenziale e sanitario, nonché un miglioramento della qualità della vita del paziente malato.

L'impatto socio-economico riguardante queste diffuse patologie ovviamente non riguarda solamente l'Italia, ma è un problema di spessore mondiale. Esistono, infatti, moltissime associazioni internazionali che si occupano delle malattie reumatiche, con gli obiettivi di informare e prevenire. Il Dottor *Ho Youn Kim*, presidente dell'APLAR (*Asia-Pacific League of Associations for Rheumatology*) disse: "In tempi di incertezza

economica e di invecchiamento della popolazione, i paesi non possono permettersi di avere persone con malattie croniche che non lavorano e pesano sul bilancio dello stato” [4].

Uno studio svolto dall’organizzazione mondiale della sanità definisce tre livelli sull’onere dell’artrite reumatoide: costi diretti, indiretti e psicologici.

Negli Stati Uniti, una recensione ha rilevato che mediamente il costo diretto annuale medico associato all’AR (*Artrite Reumatoide*) è di 5,72 mila dollari per paziente, dei quali il costo maggiore è dovuto ai ricoveri ospedalieri.

Inoltre secondo uno studio sui costi socio-economici (2003), artrite e altre patologie reumatiche sono costate 127,8 milioni di dollari (80,8 miliardi dollari in spese per l’assistenza medica e 47 miliardi di dollari in mancati guadagni). Tale costo totale nazionale è stato l’1,2% del PIL statunitense. Nel 2003, il totale dei costi diretti imputabili all’artrite sono stati 80,8 miliardi dollari, ed i costi diretti medi per persona di 1,752 mila dollari. Le cure ambulatoriali rappresentano il più alto costo diretto per persona (914 dollari), seguite da pronto soccorso e servizi ospedalieri (352 dollari), prescrizioni (338 dollari) e altri costi (146 dollari). La media dei guadagni persi è di circa 1,59 mila dollari a persona [4].

Per quanto riguarda l’area Asia-Pacifico i costi sono altrettanto alti. Ad esempio:

- In Corea, l’onere economico dell’AR è stimato in 624,9 milioni di dollari, equivalente allo 0,11% del PIL;
- In Cina, Giappone e Taiwan l’AR colpisce lo 0,3% della popolazione di ogni paese, rispettivamente 4 milioni, 380 mila e 6.900 persone;
- In Australia l’artrite costa 24 miliardi di dollari all’anno in costi ospedalieri, perdita di giornate lavorative e anni trascorsi con disabilità;
- In Thailandia il costo medio sociale dell’AR è stimato in 2,682 mila dollari, il 41,4% del reddito medio annuale del paziente. Costi diretti ed indiretti sono stimati rispettivamente in 2135 e 547 dollari all’anno per paziente;
- In Malesia, l’AR colpisce circa lo 0,5% degli adulti di età comprese tra i 25 e 50 anni [4].

Negli ultimi anni i costi per l'artrite sono aumentati, e tale aumento è destinato a continuare a causa dell'invecchiamento della popolazione, dell'aumento dell'obesità e dell'inattività fisica. Questi dati segnalano la necessità di una più ampia attuazione di interventi sanitari efficaci.

I costi indiretti dovuti alla malattia (perdita di produttività a carico del singolo, della sua famiglia, della società e del datore di lavoro) e alla mortalità (il valore attuale della produzione persa a causa di morte prematura) sono anch'essi sostanziali. Infatti, la perdita di produttività dovuta a disabilità tra le persone con AR è significativamente superiore rispetto alla popolazione in generale. La ricerca ha dimostrato che due terzi delle persone affette da AR perde in media 39 giorni lavorativi ogni anno. Inoltre, altri studi hanno dimostrato che quasi un quarto dei pazienti ha una diminuzione del reddito.

Il solo trattamento dei sintomi dell'AR può ridurre la durata della vita di una persona di circa 10-12 anni. Senza un adeguato trattamento le persone con AR affrontano una lunga battaglia per tutta la vita con la malattia, che provoca seri danni alle articolazioni e disabilità.

Non ci sono solo i costi e quindi un onere economico pesante, ma anche problemi legati direttamente alla persona e a chi le sta intorno, problemi che possono essere definiti sociali. In primo luogo quelli che riguardano il posto di lavoro, dei quali si è già detto dal punto di vista previdenziale, ma non bisogna sottovalutare quello psicologico.

Dall'indagine dell'*Osservatorio Sanità e Salute*, per quanto riguarda l'artrite reumatoide in Italia circa il 40% dei pazienti deve ridurre il lavoro, il 32% va in pensione, il 10% lascia addirittura il lavoro, un altro 10% chiede il prepensionamento, e l'8% deve cambiare lavoro; tutto questo significa ovviamente che in tutti i casi, c'è un cambiamento nello stile di vita, non volontario ma dovuto alla malattia [5].

Psicologicamente 8 malati su 10 temono l'evoluzione della malattia verso la disabilità, ed il 40-54% (maschi-femmine) attraversa periodi di depressione. Il 25-29% (maschi-femmine) si sente un peso per gli altri, ed il 25% si vergogna per i segni che lascia esternamente la malattia. Soprattutto con l'avanzare dell'età, si interrompono le attività extralavorative, mentre si ha un impatto negativo per la relazione di coppia in

particolare tra i 44 e 74 anni. Per quanto riguarda le coppie più giovani si ha purtroppo una rinuncia del desiderio di paternità/maternità, nel 23% dei malati sotto i 44 anni [5].

Per una buona parte dei casi, si ha una difficoltà nello svolgere le semplici attività quotidiane, come portare la borsa della spesa o aprire bottiglie o altre confezioni alimentari (dove circa il 50-60% dei casi trova un'alta difficoltà, il restante una difficoltà medio-bassa), aprire rubinetti (24% con alta difficoltà, 34% media, 40% bassa) e addirittura premere i tasti di telefono e telecomando (9% con alta difficoltà, 24% media, 65% bassa). Sommato a tutto questo, c'è la difficoltà di accedere ad un centro di cura, e questo vale per l'80% dei malati, soprattutto per motivi di lontananza (un terzo dei pazienti hanno difficoltà ad accedere al servizio) o per mancanza del servizio, liste di attesa troppo lunghe e per qualcuno la mancanza di informazione [5].

2.1.3. Terapie attuali contro le malattie reumatiche

Le terapie attualmente adottate per contrastare le malattie o problemi cartilaginei, possono essere distinte in:

- **farmacologiche**, che riguardano quindi la somministrazione di farmaci per interrompere la malattia o alleviare il dolore;
- **chirurgiche**, che prevedono appunto interventi chirurgici di vario tipo;
- **non invasive** come laser e tecar, e trapianto di condrociti autologhi.

Le cure farmacologiche, consistono nella somministrazione di farmaci che rallentano e tentano di bloccare la malattia, ma la maggior parte servono soprattutto al controllo del dolore.

Fanno parte di questi ultimi i *fans*, che definiscono un gruppo eterogeneo di farmaci caratterizzati da proprietà antinfiammatorie, analgesiche, antipiretiche. Un'altra

tipologia sono invece i corticosteroidi³, che vengono somministrati con un'infiltrazione locale (intraarticolare), e hanno un effetto potente sui sintomi causati dall'infiammazione delle strutture sinoviali. Tuttavia il ruolo di queste sostanze rimane controverso.

Tali farmaci come detto si limitano a ridurre il dolore, non modificano il decorso della malattia e non prevencono la comparsa di lesioni articolari, anzi, c'è il rischio che nascondano i sintomi facendo ritardare la diagnosi corretta. A questi farmaci, quindi, solitamente sono affiancati farmaci detti “di fondo” (*DMARDs*⁴), molecole in grado di modificare l'andamento della malattia. I DMARD sono attualmente in prima linea per il trattamento dell'artrite reumatoide in particolare.

Nei pazienti trattati con DMARD è stata soppressa l'attività della malattia e ridotto il danno articolare, tuttavia i DMARD (e il *methotrexate*⁵) non sono stati in grado di impedire completamente il graduale deterioramento [3].

Da qualche anno sono disponibili i farmaci biologici (modificatori della risposta biologica), che sono molecole ottenute dall'ingegneria genetica, che neutralizzano alcune proteine che favoriscono l'infiammazione, e sono quindi gli unici in grado di indurre una remissione della malattia. Con lo sviluppo di questi agenti biologici la remissione (completa soppressione dell'attività della malattia, senza nessun peggioramento del danno) è ora un obiettivo terapeutico per una buona percentuale di pazienti. Questi agenti possono sopprimere l'attività della malattia direttamente e rallentare o arrestare la progressione del danno articolare, prevenendo un peggioramento della qualità della vita. Quest'ultimi sono distribuiti solo dagli ospedali ai pazienti in cui le altre terapie hanno fallito, però solo il 7% delle persone che ne avrebbero bisogno riesce ad accedervi, per motivi di lontananza dai centri che li distribuiscono o mancanza di informazioni [3].

³ *Corticosteroidi*: sono un gruppo di ormoni (classe degli steroidi), prodotti dalla corteccia delle ghiandole surrenali e sono coinvolti in una varietà di meccanismi fisiologici, inclusi quelli che regolano l'infiammazione, il sistema immunitario, il metabolismo dei carboidrati, delle proteine ed il livello di elettroliti nel sangue.

⁴ *Disease-Modifying Antirheumatic Drugs* (Farmaci antireumatici modificanti la malattia) sono una categoria di farmaci impiegati nell'artrite reumatoide per rallentare la progressione della malattia

⁵ *Methotrexate*: è un acido, che fa da antagonista della sintesi dell'acido folico che influenza la risposta immunitaria dell'individuo, viene utilizzato nel trattamento di alcune neoplasie e patologie autoimmuni.

Le terapie chirurgiche per le lesioni cartilaginee, provocate dalle malattie reumatiche o semplicemente da traumi, possono essere pulizie cartilaginee (*shaver*) o abrasione artroplastica, che danno buoni risultati ma permettono solo di ottenere formazioni di neotessuto fibrocartilagineo (pseudocicatriziale) con proprietà morfologiche diverse dalla cartilagine ialina “originale”. Le artroprotesi, invece, hanno grande efficacia ma vengono applicate solo quando altre terapie hanno fallito, e quando il proseguo della malattia potrebbe portare a disabilità.

In effetti, nonostante il rischio operatorio sia molto diminuito e le protesi abbiano una durata di più di 15 anni, si preferisce valutare attentamente se è il caso di procedere con un intervento del genere.

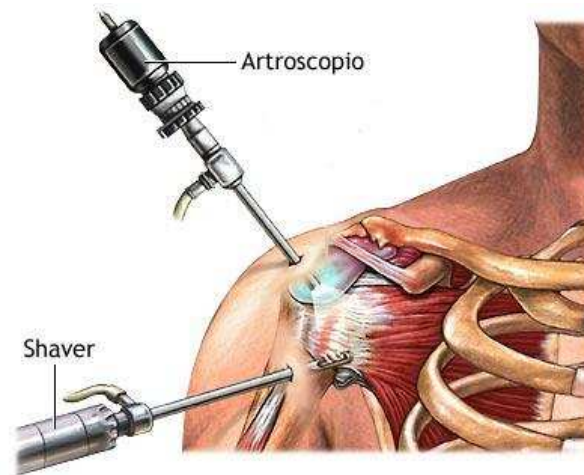


Figura 2-4: *Shaver* alla spalla

Più in dettaglio gli interventi di pulizia o lavaggio con rimozione dei detriti, sono interventi che non inducono la riparazione, ma sono diretti al sollievo temporaneo dei sintomi e del disturbo funzionale associato alla lesione. Il beneficio del lavaggio è dovuto alla rimozione dei detriti degenerativi, degli enzimi proteolitici e dei mediatori dell'infiammazione.

La microfrattura invece è una tecnica che consiste nel penetrare e rompere l'osso sottostante la cartilagine lesa, in modo da stimolare il midollo osseo e la riparazione, visto che le parti più profonde della cartilagine sono più propense all'autoriparazione.

L'osteotomia consiste invece nel tagliare e spostare una parte di osso, al fine di traslare le forze pressorie da una parte all'altra; si ricorre a questa procedura quando l'artrosi del ginocchio coinvolge un solo versante quindi si sposta l'asse del ginocchio spostando così anche le forze pressorie che agivano sulla parte usurata, riducendo il dolore.

Per quanto riguarda le terapie non invasive, quelle che usano l'energia, si usano la *tecarterapia* e la *laserterapia*.

La *tecarterapia* mira all'attivazione dei naturali processi riparativi ed antinfiammatori nei tessuti, questo grazie al richiamo delle cariche elettriche dell'organismo, sfruttando l'effetto condensatore: un elettrodo è collegato ad un generatore ed il secondo conduttore è rappresentato dal tessuto biologico. Nella zona da trattare si ha un flusso di cariche con attivazione metabolica e un effetto termico endogeno, con aumento del metabolismo e quindi una velocizzazione della riparazione (che però avviene con formazione di fibrocartilagine anziché cartilagine originale) e l'aumento della circolazione ematica.

La *laserterapia* invece fornisce ai tessuti energia elettromagnetica. Mediante il laser è possibile focalizzare un'energia molto alta in zone precise di tessuto, ed ha anch'esso un effetto biostimolante ed eutrofico⁶ nei tessuti danneggiati. Il limite di questa tecnica è la scarsa penetrazione nei tessuti, quindi gli effetti terapeutici sono limitati a tessuti superficiali.

⁶ *Eutrofico*: migliora le condizioni di nutrizione dei tessuti



Figura 2-5: laserterapia nelle applicazioni su traumi sportivi

Il trapianto di condrociti autologhi (con metodo di *Peterson & Brittemberg* [6]) prevede un prelievo di cartilagine sana da coltivare in laboratorio, e una volta espansa tale coltura viene trapiantata nell'articolazione malata, per poi procedere alla riabilitazione. Di norma, ad esempio per la cartilagine, la procedura si articola come segue: il chirurgo estrae alcuni condrociti da regioni articolari sane del paziente, li stimola a riprodursi e li inietta nella sede della lesione. In questo modo si è in grado di ricostruire cartilagine ialina anziché fibrocartilagine, come per tutte le altre tecniche viste in precedenza, ma sebbene sembri una soluzione migliore, ha molti svantaggi, e non sempre può essere eseguita.

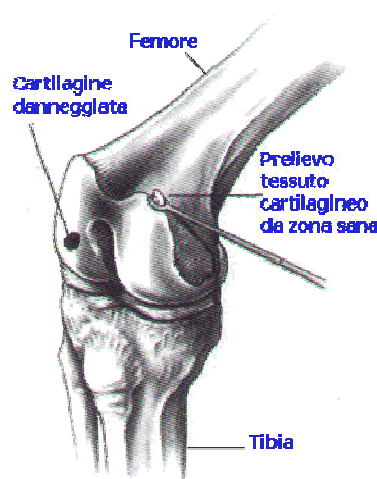


Figura 2-6: prelievo di tessuto cartilagineo da coltivare *in vitro* per poi essere impiantato nuovamente

In primo luogo non si può applicare in pazienti artrosici, o con malattie metaboliche, sistemiche, infettive e reumatiche in generale, perché si andrebbe a prelevare cartilagine già malata; altro inconveniente di questa tecnica è che si deve staccare un pezzo di cartilagine da un'articolazione sana, e sebbene la quantità sia tale da non provocare scompensi, si tratta comunque di un danno nei confronti dell'articolazione "donatrice". Il trapianto di condrociti autologhi inoltre prevede due interventi chirurgici, cosa non desiderabile, e una fase di espansione di un mese in laboratorio, che fanno sì che questo intervento sia costoso per l'ospedale [7].

Tutte queste attuali tecniche, quando applicate danno dei buoni risultati, ma quasi sempre gli effetti sono una riduzione del dolore, e in caso di riparazione, si ha solamente la formazione di tessuto cicatriziale (fibrocartilagineo) che non ha le stesse proprietà, e quindi in tutti questi casi non si ha mai una completa guarigione. Il punto fondamentale che differenzia le cure attuali con quella in oggetto nella nostra ricerca è appunto la guarigione completa, con la formazione di un tessuto simile all'originale sia dal punto di vista morfologico e sia dal punto di vista funzionale, e non il semplice alleviamento dei sintomi o la formazione di tessuto cicatriziale, che non consentono di poter definire guarito il paziente.

L'Ingegneria Tissutale applicata al nostro progetto di ricerca, consente di sviluppare una procedura chirurgica innovativa che permette la rigenerazione cartilaginea in un unico tempo chirurgico, grazie al reimpianto di cellule mesenchimali (da aspirato midollare) autologhe veicolate da scaffold.

2.2. INGEGNERIA TISSUTALE

L'*Ingegneria Tissutale* è una disciplina che applica i metodi dell'ingegneria alla ricostruzione o sviluppo in laboratorio di tessuti biologici che ripristinino la funzione del tessuto originale.

All'inizio di questo nuovo campo interdisciplinare, i primi biomateriali erano costruiti in due dimensioni, e non erano biodegradabili, cioè sostituivano il tessuto biologico

con uno artificiale, che restava per sempre (o comunque doveva essere sostituito dopo un certo tempo) nel paziente.

Al contrario i biomateriali di nuova generazione sono caratterizzati da una struttura tridimensionale porosa, che promuove l'attecchimento, la crescita e la differenziazione delle cellule all'interno del materiale. Inoltre essendo biodegradabile si ha una graduale rimozione e sostituzione del biomateriale con tessuto biologico rigenerato e funzionante. I primi sostituti dei tessuti biologici erano quindi solamente sostituti meccanici, o di riempimento, mentre gli attuali mirano ad essere tessuti vivi, in grado di essere biologicamente attivi, anche all'interno del corpo del paziente.

Più nel dettaglio la ricostruzione si attua seminando le cellule su strutture, dette scaffold, di opportuni materiali e la coltivazione avviene in appositi bioreattori che portano alla produzione di nuovo tessuto. Questo processo consiste nell'isolare le cellule da una sorgente nativa, ed espanderle in vitro, in modo da avere a disposizione numerose cellule, che vengono successivamente seminate nello scaffold. L'impianto viene innestato nel paziente nella zona dove è presente il difetto condrale.

Lo scaffold non è solamente un mezzo che veicola le cellule all'interno dell'organismo, ma è una parte attiva del processo di rigenerazione, in quanto entra a far parte a tutti gli effetti del tessuto, venendo assorbito in esso. Inoltre esso partecipa attivamente allo scambio di informazioni e di nutrienti tra le cellule e tra cellule e ambiente esterno [8]. È stato dimostrato che la porosità rappresenta un fattore importante nella risposta cellulare, controlla la crescita e influenza la differenziazione [9]. La porosità è caratterizzata da 3 parametri:

- il *volume libero*: volume non occupato dal materiale, che da esperimenti fatti ha dato risposte infiammatorie piccole con impianti che presentavano un volume libero inferiore al 10%;
- il *grado di interconnessione tra i pori*: permette alle sostanze nutritive di arrivare alle cellule, e quindi in qualche modo misura la capacità dello scaffold di far nutrire le cellule;
- la *dimensione dei pori*: valore che dovrebbe essere all'incirca di 250-500 μm di diametro (in uno studio fatto appositamente per il tessuto cartilagineo) [9].

Lo scaffold deve avere dei particolari requisiti per potersi “ambientare” all’interno dell’organismo, ma soprattutto deve avere delle proprietà uguali, o comunque molto simili a quelle del tessuto originale. Per quanto riguarda le caratteristiche macroscopiche, lo scaffold deve avere proprietà meccaniche simili al tessuto (forze, tensioni, deformazioni, elasticità), mentre microscopicamente deve avere una porosità (miglior rapporto superficie/volume possibile) e un’interconnessione adeguate. La produzione di componenti extracellulari è inoltre influenzata positivamente dall’impiego di fattori di crescita.

Gli scaffold possono essere artificiali o naturali: quelli naturali, prelevati da donatore *autologo*⁷, *omologo*⁸ o *xenologo*⁹, sono senza dubbio i migliori, essendo biocompatibili e avendo proprietà simili a quelli umani. Quelli artificiali hanno il vantaggio di essere riproducibili in grandi quantità ed in modo abbastanza facile, ma non essendo naturali, hanno delle difficoltà ad integrarsi con il tessuto ospite, per quanto biocompatibili.

In generale, la cartilagine artificiale presenta una minore resistenza meccanica e si presta solo a poche indicazioni mediche. Lo sviluppo di materiali di supporto e di matrici idonee ha aperto la strada alla creazione di strutture cartilaginee stabili e dalla forma desiderata.

Nel nostro studio, ci sono dei miglioramenti rispetto alla procedura attuale, in quanto lo scaffold è naturale, e in quanto non vengono usati condroblasti, ma cellule staminali adulte prelevate da midollo osseo. Le tecniche attuali prevedono invece la coltivazione di cellule cartilaginee *in vitro* ma possono presentare svantaggi in caso di difetto congenito, e per una minore propensione a riprodursi e a produrre sostanza fondamentale.

L’Ingegneria Tissutale è una disciplina in fase di sviluppo, e rappresenta senza dubbio un vantaggio rispetto alle tecniche attuali, visto che si ha una maggiore efficacia rispetto a protesi od operazioni di vario tipo, ed in futuro, l’aumento della domanda di trapianti potrà essere in parte soddisfatta da tessuti creati in vitro.

⁷ Donatore *autologo*: il ricevente è lo stesso donatore

⁸ Donatore *omologo*: il donatore appartiene alla stessa specie del ricevente

⁹ Donatore *xenologo*: il donatore appartiene ad una specie diversa dal ricevente

Visto l'incremento della popolazione anziana con malattie degenerative del sistema scheletrico, la richiesta di strategie terapeutiche biologiche è in espansione. In tale campo, lo sviluppo dell'ingegneria dei tessuti e della bioingegneria apre nuove prospettive per la ricostruzione biologica dei tessuti dell'apparato locomotore. Una frontiera più innovativa del "semplice" trapianto di condrociti è rappresentata dalla possibilità di utilizzare cellule staminali mesenchimali adulte.

La cartilagine non manifesta alcune capacità rigenerative, per le lesioni superficiali, mentre per quelle profonde (che coinvolgono cioè l'osso subcondrale) la riparazione è solo parziale con formazione di fibrocartilagine (che ha proprietà inferiori rispetto all'originale).

La semplicità della struttura della cartilagine, permette di isolare la componente cellulare da quella extracellulare; tuttavia la coltivazione *in vitro* non appare semplice. Molto importante è la scelta del substrato sul quale coltivare le cellule: in una coltura monostrato queste aderiscono alla superficie ma la proliferazione si arresta per mancanza di adesione o per raggiungimento della confluenza, in quanto le cellule subiscono l'inibizione da contatto (meccanismo attraverso il quale cellule normali cessano di crescere in coltura quando entrano in contatto l'una con l'altra). La coltura monostrato causa anche la perdita dell'originario fenotipo, in particolare le cellule diventano fibroblasti. Una soddisfacente crescita cartilaginea non può quindi prescindere dall'impiego di substrati tridimensionali. L'oggetto del nostro studio, in effetti, è una semina di cellule staminali su tessuto naturale e tridimensionale, sul quale viene creata una rete di canali intrecciati, che permette un inserimento in profondità delle cellule e una diffusione delle stesse lungo l'intero spessore.

In particolare la cartilagine usata come scaffold è di maiale, e in una fase successiva alla lavorazione il tessuto viene decellularizzato, cioè vengono tolte tutte le componenti cellulari. Il processo di decellularizzazione viene fatto usando un detergente, che causa denaturazione delle proteine, facendo sì che di un tessuto biologico rimanga soltanto la struttura, cioè la matrice cellulare. Una volta eseguita questa fase il tessuto è pronto per essere "seminato" con nuove cellule, cioè le staminali, nel nostro caso quelle mesenchimali. In questo modo si ha a disposizione un

tessuto naturale, ma che non contiene tracce di DNA del “donatore”, evitando così il grave problema del rigetto che provocherebbe la rimozione dell’impianto.

L’Ingegneria Tissutale potrebbe risolvere i problemi quali la riparazione o la rigenerazione di tessuti danneggiati, mediante realizzazione *in vitro* di tessuto che presenti le proprietà della cartilagine ialina, che una volta impiantata *in vivo* possa ripristinare la normale struttura e funzione cartilaginea. Inoltre la cartilagine rappresenta un ottimo candidato in quanto il suo trofismo non è dipendente dal flusso ematico (che avviene attraverso il liquido sinoviale e poi attraverso la matrice extracellulare per diffusione), e l’innervazione non appare necessaria.

2.3. CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI

E’ da molto tempo che si è a conoscenza che alcuni animali hanno la capacità di rigenerare parti del loro corpo. Da poco invece è noto che anche l’uomo ha questa capacità, infatti, è capace di rigenerare alcuni tessuti ad esempio sangue e pelle. Questo grazie alle cellule staminali, scoperte negli anni ’50, quando esperimenti sul midollo osseo hanno provato l’esistenza di queste cellule nel nostro organismo, e hanno permesso quindi per la prima volta di rigenerare un tessuto (il midollo osseo per l’appunto) grazie all’impianto di cellule sane, sfruttando la loro capacità di differenziarsi. La scoperta delle staminali ha dato il via a quella che è definita medicina rigenerativa, che si pone l’obiettivo di riparare lesioni ai tessuti, rigenerandoli.

Le staminali sono cellule indifferenziate che ad ogni divisione, danno origine ad un’altra cellula staminale, ed una maggiormente differenziata. Con questa divisione asimmetrica viene mantenuto costante il numero di cellule staminali, mentre le cellule maggiormente differenziate, dividendosi ulteriormente, daranno origine ad un numero importante di cellule mature che compongono i tessuti.

Le cellule staminali si distinguono in:

- *totipotent*: sono capaci di trasformarsi in qualsiasi tipo di tessuto;

- *pluripotenti*: si trasformano solo in alcuni tipi di tessuti;
- *multipotenti*: sono in grado di specializzarsi unicamente in alcuni tipi di cellule;
- *unipotenti*: possono dar luogo soltanto ad un tipo cellulare.

La caratteristica delle cellule staminali è di mantenere invariata la loro capacità di riprodursi, cosa che potrebbero fare in maniera praticamente illimitata, ma in realtà esse sono normalmente quiescenti e solo di rado entrano in mitosi.

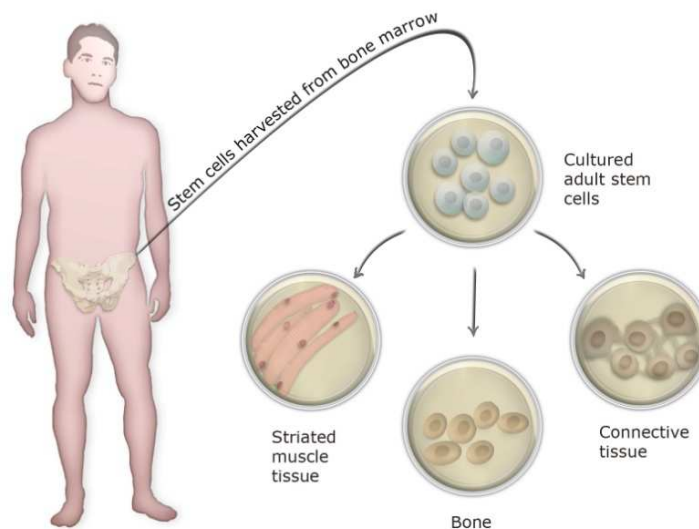


Figura 2-7: cellule mesenchimali da stroma midollare

Le cellule di nostro interesse come detto sono le staminali mesenchimali. Il mesenchima è il tessuto connettivo embrionale ed ha origine dal distacco delle cellule dai foglietti embrionali. Dal mesenchima hanno origine moltissimi tessuti umani, ad esempio il sangue, i tessuti connettivi propriamente detti (lasso, mucoso maturo, denso o compatto, ecc.), il tessuto osseo, il tessuto cartilagineo e molti altri.

Le cellule staminali mesenchimali appartengono alla categoria delle staminali adulte, cioè quelle che si trovano in un organismo sviluppato, e sono una popolazione cellulare pluripotente. Le cellule staminali mesenchimali furono inizialmente isolate nello stroma midollare (fibre e reticoli cellulari che racchiudono la struttura) e successivamente identificate in vari altri tessuti.

Queste cellule sono reperibili in molti organi e servono a rigenerare le cellule che muoiono. In passato si pensava che fossero presenti solo in certi tessuti (sangue ed

epitelio che sono più soggetti al ricambio cellulare), mentre successivamente si è scoperto che queste cellule potrebbero essere presenti in tutti i tessuti, anche se in molti di essi risulta complesso selezionarle, perché sono rare e disposte in nicchie circondate da moltissime altre cellule differenziate.

Un'altra scoperta che ha ribaltato una convinzione su queste cellule è il fenomeno della plasticità, secondo il quale le cellule non danno luogo solo a cellule del tessuto in cui risiedono, ma ad esempio le cellule del sangue possono in particolari condizioni dar luogo a cellule scheletriche, muscolari ecc.

Le cellule staminali mesenchimali pur essendo delle staminali adulte hanno delle caratteristiche molto simili a quelle delle cellule staminali embrionali col vantaggio di non avere le implicazioni etiche di queste ultime. Esse, infatti, se opportunamente stimolate, durante la loro cultura *in vitro* o addirittura nell'organismo in cui sono state trapiantate, possono specializzarsi in tessuti molto diversi tra loro e dal loro tessuto di origine. Per questa loro caratteristica di "pluripotenzialità" il loro utilizzo è molto promettente per curare molte malattie che hanno un carattere degenerativo (come l'artrosi) e autoimmuni (come l'artrite).

Visto che l'obiettivo è utilizzare cellule autologhe, ovvero del soggetto stesso, per una ricostruzione biologica di un tessuto, si può pensare di utilizzare per l'espansione delle cellule fattori di crescita autologhi. Questi fattori possono essere contenuti nel siero del soggetto a cui vengono prelevate le cellule o nelle sue piastrine. Inoltre i fattori di crescita autologhi hanno costi contenuti e con buoni margini di sicurezza.

Per quanto riguarda le piastrine i fattori di crescita autologhi vengono secreti dai *granuli alfa*¹⁰ o una volta indotta la loro aggregazione, o per la rottura delle loro membrane plasmatiche mediante shock termico. La concentrazione dei fattori di crescita è incrementabile, prima della loro stessa estrazione, con metodologie semplici per l'ottenimento di *Plasma Ricco in Piastrine* (PRP).

Recenti ricerche hanno studiato la sequenza di eventi cellulari e molecolari della condrogenesi umana *in vitro*. Lo studio ha dimostrato la possibilità di differenziare le

¹⁰ *Granuli alfa*: granuli di secrezione all'interno delle piastrine (cellule di sangue). Le proteine secrete da questi granuli svolgono funzioni importanti come: coagulazione, infiammazione, difesa antimicrobica, guarigione delle ferite, angiogenesi (formazione di nuovi vasi sanguigni).

cellule mesenchimali dello stroma umano in condrociti verificando l'espressione genica delle cellule mature.

La possibilità di ottenere del tessuto cartilagineo *in vitro* da stroma midollare è vantaggioso in quanto le cellule stromali possono essere moltiplicate in coltura per almeno due settimane consentendo la preparazione di una membrana con una cellularità sufficiente. Questo approccio presenta inoltre il vantaggio di poter conservare le cellule mesenchimali del paziente per eventuali ulteriori interventi.

2.3.1. Semina e coltivazione cellulare

La semina e successiva coltura cellulare è la fase nella quale le cellule vengono inserite nello scaffold, e grazie a condizioni ambientali favorevoli ed alla somministrazione di particolari molecole, vengono stimolate a riprodursi e a produrre matrice extracellulare di un particolare tessuto, nel nostro caso cartilagine.

A monte di questo processo c'è però un'altra fase di coltura, cioè quella delle sole cellule staminali, prelevate solitamente dal midollo osseo della cresta iliaca, per farle aumentare di numero. Infatti, le cellule prelevate sono molto poche, non sufficienti quindi per riempire uno scaffold; questa fase di espansione dura qualche settimana, e si ha poi una quantità sufficiente per poter procedere con la semina.

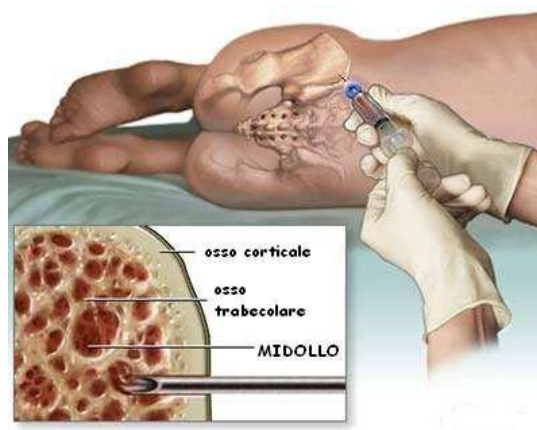


Figura 2-8: prelievo midollo osseo da cresta iliaca

Al di fuori del corpo (*ex-vivo*), le cellule staminali mesenchimali mantengono una buona capacità proliferativa e sono capaci di aderire a superfici quali vetro e plastica,

che vengono comunemente utilizzate per la cultura delle cellule in laboratorio. Il metodo utilizzato per espandere deve essere sicuro, efficace, facile da ottenere e poco costoso. Per ottenere un'espansione cellulare è necessario non solo "alimentare" le cellule, ma anche fornire loro dei segnali che le inducano a moltiplicarsi.

Nella pratica di laboratorio questo stimolo si traduce nell'esporre le cellule a delle proteine generalmente classificate come fattori di crescita. Questi fattori di crescita solitamente sono somministrati in concentrazioni note, esponendo le cellule a singole proteine, oppure, come avviene nella maggior parte dei casi, esponendo le cellule a svariati fattori di crescita a concentrazione non nota contenuti nel siero.

Una fase fondamentale una volta seminate le cellule è l'attecchimento (risultato positivo singolo o collettivo di un'operazione di trapianto), che dipende dallo scaffold, dall'ambiente e dai fattori di crescita che vengono utilizzati. Senza dubbio il trapianto mediato da scaffold, soprattutto se naturale, è migliore rispetto al trapianto diretto delle cellule nella zona lesionata, sia per l'unico intervento chirurgico anziché i due nel trapianto diretto, sia perché quest'ultimo non è possibile in caso di malattia cartilaginea. L'impiego di questi, infatti, consente di migliorare l'attecchimento, la riproduzione cellulare, la differenziazione e di trattenere "fisicamente" le cellule nella zona da riparare dirigendo l'orientamento spaziale dei componenti della matrice.

3. STRUMENTAZIONE UTILIZZATA

3.1. IL BISTURI A RISONANZA QUANTICA MOLECOLARE *VESALIUS*[®]

Il bisturi *VESALIUS*[®], prodotto e brevettato da Telea Engineering Electronic, utilizza il principio della *Risonanza Quantica Molecolare*, grazie a campi elettrici ad elevata frequenza, con varie onde combinate in modo particolare. L'energia viene trasferita, da una sorgente ad un utilizzatore, per quanti di energia, il quale valore energetico dipende dalla frequenza della sorgente. Quando questa energia colpisce il tessuto umano (o più in generale un qualsiasi materiale) gli effetti dipendono dalla relazione che c'è tra l'energia del quanto e l'energia di legame delle molecole colpite. In particolare se queste due energie sono diverse si ha una vibrazione della molecola (aumenta l'energia cinetica), che causa l'aumento della temperatura, ed il legame non si rompe, mentre se sono uguali, tutta l'energia viene utilizzata per rompere il legame, senza avere un aumento di energia cinetica e quindi di temperatura. Il taglio avviene quindi per rottura diretta dei legami molecolari, e non per il riscaldamento generato dalla corrente, che può bruciare il tessuto. Infatti, il taglio è a "freddo", non superando i 50°C.

Tale effetto risulta essere molto vantaggioso nel nostro caso, perché come detto un normale elettrobisturi brucerebbe il tessuto rendendolo inefficace dal punto di vista sia meccanico che biologico.



Figura 3-1: *VESALIUS*[®] MCN, il modello utilizzato per la sperimentazione

3.2. IL ROBOT YAMAHA

Il robot utilizzato per creare i canali, molto preciso nei movimenti, (Yamaha RCX) è molto efficiente per quanto riguarda il tipo di lavorazione che deve essere fatta. È dotato di due rotaie per muoversi in orizzontale in due direzioni perpendicolari (assi x e y), ed un braccio che può muoversi in verticale (asse z). La massima precisione ottenibile, cioè l'errore di ripetibilità sui tre assi, è di circa $10\mu\text{m}$, che per i nostri scopi è accettabile.

Il robot deve essere programmato tramite un apposito controller, dal quale si inseriscono anche le variabili richieste per ogni lavorazione. Il linguaggio di programmazione è ad alto livello, di tipo BASIC, e facilita la programmazione e l'automazione dei movimenti che il robot deve fare.

Nell'asse verticale viene posizionato il manipolo collegato al bisturi, dove poi sarà montato l'ago.

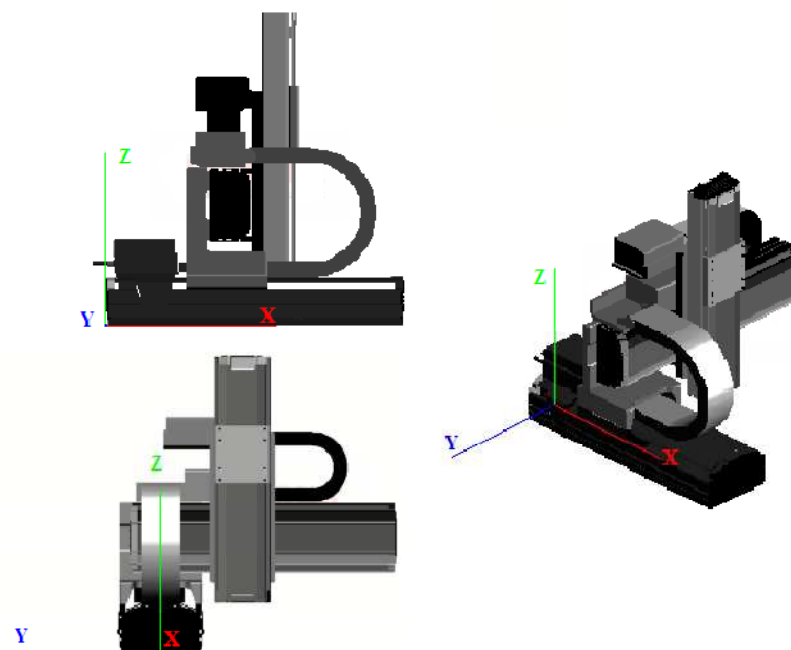


Figura 3-2: Il robot utilizzato per la sperimentazione. L'ago collegato al bisturi è applicato nella colonna verticale, che si muove lungo l'asse Z.

3.3. CAPPA STERILE

La cappa sterile è l'ambiente di lavoro per la lavorazione dei tessuti, che appunto deve avvenire in ambiente sterile, e senza possibilità di contaminazioni dall'esterno. Il robot lavora quindi all'interno della cappa ed anche tutta la fase di preparazione del tessuto avviene all'interno di essa in modo da evitare contaminazioni.

Nella maggior parte delle attività di laboratorio, la lavorazione di certe sostanze o materiali, può dar origine a gas pericolosi, oppure c'è la necessità che questi materiali non vengano contaminati dall'esterno. E' necessario dunque, svolgere queste operazioni in una cappa di sicurezza biologica appropriata che agisce come barriera tra l'ambiente esterno ed interno.

Le cappe si differenziano in classi (I, II, III) in base alla loro efficacia, che dipende dal flusso dell'aria, dalla capacità di contenimento, dall'integrità dei filtri HEPA¹¹ e, nel caso di cappe certe cappe (come quelle di classe I e II) anche dalla loro posizione geografica, ovvero la distanza da zone di frequente passaggio di persone, dagli impianti di areazione, da porte e da finestre.

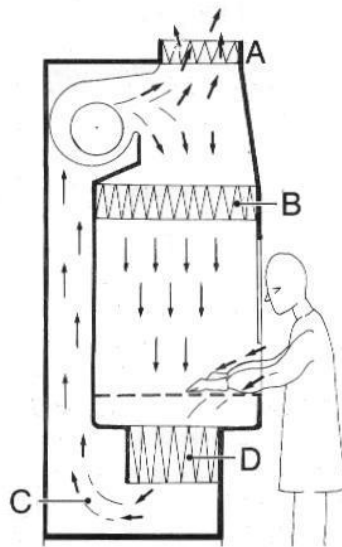


Figura 3-3: (A) filtro HEPA di espulsione dell'aria; (B) filtro HEPA dell'aria di ricircolo; (C) zona a rischio facilmente raggiungibile per la decontaminazione; (D) filtro HEPA sostituibile in bagout.

¹¹ *High Efficiency Particulate Air filter* (filtro d'aria particolato ad alta efficienza), è un sistema di filtrazione ad alta efficienza di gas (o fluidi). I filtri HEPA presentano un'efficienza di filtrazione compresa tra l'85% (H10) e il 99,995% (H14) e vengono classificati in base all'efficienza di filtrazione delle particelle di 0.3 μm . Sono composti da foglietti filtranti di microfibre assemblati in più strati, separati da setti in alluminio. I foglietti filtranti in microfibre hanno il compito di bloccare le particelle solide inquinanti presenti nella corrente fluida da trattare.

La cappa da noi utilizzata è una *TELSAR di classe IIA*¹², come quella di Figura 3-3. Questo tipo di cappa è ventilata e aperta frontalmente, ed è progettata per la protezione dell'operatore, dei prodotti al suo interno e dell'ambiente esterno.

Il flusso d'aria all'ingresso avviene tramite l'apertura frontale, e viene filtrato subito dopo, insieme al flusso proveniente dall'interno della cappa. Dopo la risalita tramite la parete posteriore, il flusso d'aria viene nuovamente filtrato, sia che venga espulso, sia che torni all'interno della cappa.

Il flusso che torna all'interno dell'ambiente di lavoro è laminare e verticale, in modo da non investire l'operatore.

Lavorando in una cappa sterile, una parte di contaminazione dovuta all'ambiente circostante viene ridotta. L'inquinamento delle colture da parte dell'ambiente esterno è però ancora la maggiore causa di contaminazione.

Per questo anche lavorando sotto cappa, una cosa fondamentale è l'ambiente, in generale la stanza, dove si opera, che deve essere pulita e disinfettata. Oltre a questo, un altro aspetto fondamentale è la cura dell'operatore, che deve indossare guanti, mascherine (soprattutto in caso di sostanze pericolose) e camici puliti. Anche gli strumenti di lavoro, ovviamente, devono essere sterilizzati ed aperti solamente all'interno della cappa.

3.4. POMPA PERISTALTICA

La pompa peristaltica è un apparecchio che applica il principio della peristalsi, in base al quale la prevalenza al fluido trattato viene impressa da una strozzatura che scorre lungo il tubo. Il funzionamento prevede dei rulli, che strozzano il tubo e provocano l'avanzamento del fluido. Il tubo deve essere resistente ed elastico, tornando alla

¹² classe IIA: si intende una cappa che ha il 70% di ricircolo di aria all'interno della cabina ed il 30% nel locale. Possono essere usate per agenti biologici che presentino un rischio basso o moderato.

posizione naturale dopo essere stato deformato dal rullo. E' proprio il ritorno alla posizione originale che provoca il risucchio. La pompa peristaltica è una pompa "pulsante", in quanto la portata non è costante sul singolo giro. Per ridurre il fenomeno della pulsazione si adotta, solitamente, un numero maggiore di rulli, con conseguente riduzione della portata, oppure vengono impiegati compensatori di forma e dimensione opportuna che assorbono il "picco della pulsazione", fino ad ottenere una portata costante.

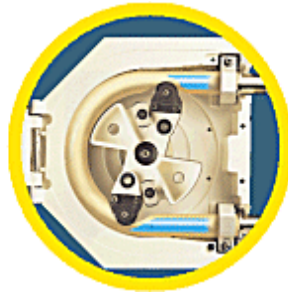


Figura 3-4: esempio di pompa peristaltica

La pompa peristaltica viene utilizzata in tutti quei processi dove esiste l'esigenza di non far venire in contatto fluido trattato con i componenti della pompa, per esempio in caso di fluidi nocivi o corrosivi, per evitare contaminazioni, o in caso di sospensioni per evitare la rottura di parti solide all'interno del fluido nel contatto con le parti meccaniche di una pompa normale. Questo tipo di pompa consente di tarare con precisione la portata e di mantenerla costante. Queste caratteristiche la rendono ideale laddove precisione sui dosaggi e ripetibilità della misura sono requisiti indispensabili come nei laboratori chimici, nella bioricerca.

4. PROTOCOLLO DI SPERIMENTAZIONE

Il tessuto biologico deve essere lavorato per consentire nella fase di semina un migliore ingresso delle cellule in esso e di conseguenza un miglior attecchimento. La lavorazione consiste nel creare una serie di canali all'interno del tessuto, inclinati e incrociati fra di loro, per permettere la comunicazione tra le cellule che saranno inserite successivamente grazie all'azione di una pompa peristaltica.

Come precedentemente anticipato, è di fondamentale importanza che il substrato naturale o artificiale, sia tridimensionale, dato che prove fatte con substrati bidimensionali non hanno dato buoni risultati, visto il mancato attecchimento delle cellule. Lo scaffold tridimensionale lavorato con la nostra tecnica consente alle cellule di essere inserite all'interno, e quindi non si presenta il rischio che vengano “spazzate via” nelle fasi successive di coltivazione *in vitro* e successivo impianto *in vivo*.

Le cellule devono quindi essere inserite all'interno dello scaffold, e per raggiungere tale obiettivo il tessuto viene trattato creando dei canali incrociati al suo interno, in modo da favorire anche la comunicazione tra le cellule e il loro spostamento interno una volta inserite. Negli scaffold artificiali si ha il vantaggio della facilità della lavorazione in tre dimensioni e della riproducibilità, ma da un punto di vista biologico, sono nettamente migliori quelli di origine naturale.

La difficoltà è quella di trovare un metodo di lavorazione dei tessuti naturali, ed un metodo per inserire le cellule senza danneggiarle.

Un metodo già sviluppato precedentemente per la lavorazione del tessuto esofageo prevede di forare il tessuto con un bisturi a Risonanza Quantica Molecolare, il *VESALIUS*[®], comandato da un robot ad alta precisione in grado di fare migliaia di fori, ed un piano inclinato, in modo da creare dei canali che si incrociano tra di loro secondo determinate angolazioni [10].

Si rende necessario questo strumento perché forando in maniera meccanica, si è visto come il tessuto tenda a collassare, perché la separazione dei tessuti non è netta.

Con un normale elettrobisturi invece il tessuto viene bruciato, perché la temperatura di funzionamento è di qualche centinaia di gradi, e questo compromette l'attecchimento

delle cellule, in quanto l'ambiente (scaffold) non risulta idoneo alla loro sopravvivenza.

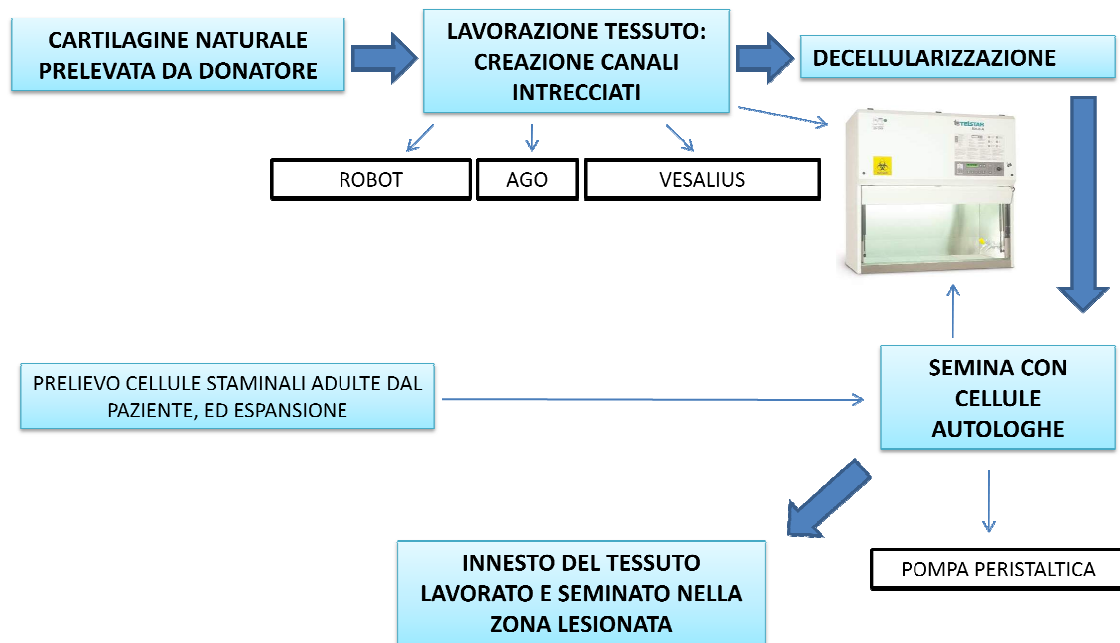


Figura 4-1: fasi del processo di lavorazione del tessuto

4.1. DEFINIZIONE DEI PARAMETRI DI LAVORAZIONE

In questa prima fase di sperimentazione è stato programmato il robot in modo da ottenere la canalizzazione finale voluta. La canalizzazione prevista viene fatta con 2 tipi di canali, inclinati rispettivamente a 60° e -60° rispetto alla verticale, disposti in file parallele, alternandoli in modo da farli incrociare, come si vede in **Figura 4-2**.

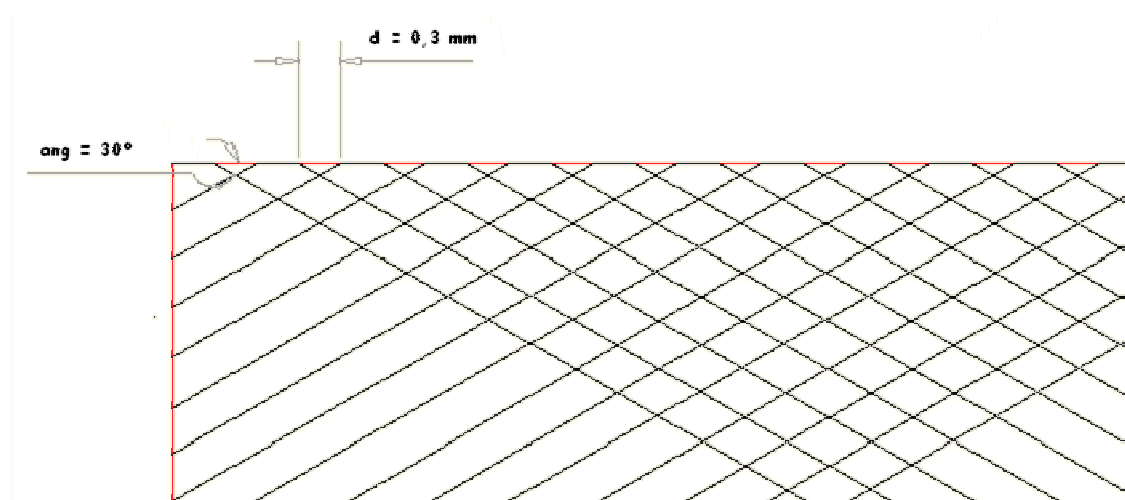


Figura 4-2: La canalizzazione applicata ai tessuti. "d" è la distanza tra i centri dei fori, mentre "ang" è l'angolo formato rispetto alla superficie (corrisponde a 60° rispetto alla verticale)

Il robot può muoversi solamente nelle tre direzioni principali (fig. 3-2), ovvero non può fare movimenti secondo una certa angolazione. Si è adottato quindi un piano inclinato dove appoggiare il tessuto, con l'angolazione voluta. Il programma del robot è stato adeguato a questa situazione per tenere conto dell'angolazione mantenendo la distanza dai fori costante anche variando l'inclinazione.



Figura 4-3: piano inclinato su cui appoggia il tessuto cartilagineo, per creare i canali angolati

L'algoritmo creato (DEMO20), prevede una lavorazione iniziale in cui vengono fatti tutti i fori secondo un'angolazione, e poi tutti quelli secondo l'altra, in modo da girare il piano inclinato una sola volta. Abbiamo quindi sviluppato l'algoritmo per la

creazione di canali angolati a $+60^\circ$ (TURN 1) e a -60° (TURN 2), come descritto in Figura 4-4.

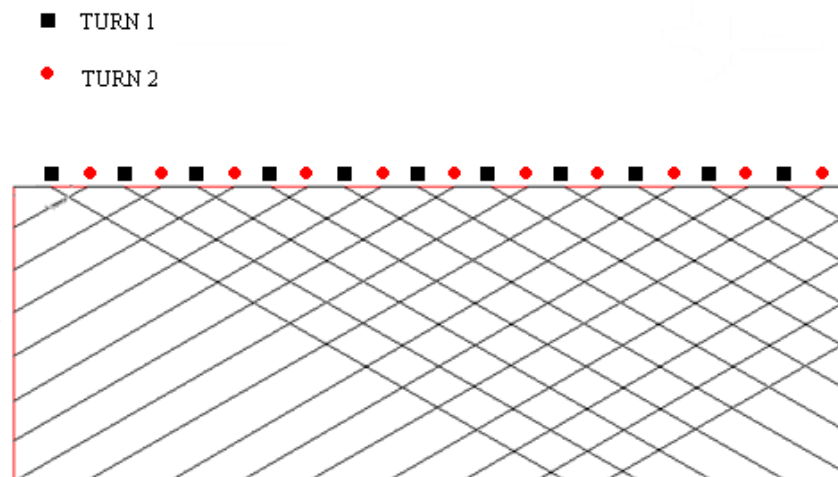


Figura 4-4: i punti in nero vengono eseguiti solamente dal turn 1, quelli rossi dal turn 2

Per una verifica della qualità dei fori, il tessuto è stato lavorato secondo un'unica inclinazione ($+60^\circ$).

Prima di eseguire il programma che effettua la lavorazione, è stato elaborato un algoritmo (DEMO18) per impostare le coordinate iniziali, e cioè il punto dove è stato effettuato il primo foro. Questo programma salva le coordinate del punto iniziale, che poi vengono utilizzate dall'algoritmo di lavorazione come punto di partenza. Queste coordinate vengono scelte posizionando manualmente il robot nel punto in cui vogliamo iniziare la lavorazione.

Altre variabili da dare in input all'algoritmo sono le dimensioni della matrice e la risoluzione (distanza tra i centri di fori successivi), dalle quali l'algoritmo calcola il numero di fori da effettuare lungo x ed y (NX ed NY), e la profondità di discesa dell'ago, che deve essere pari allo spessore del tessuto.

Durante la lavorazione è necessario tener conto degli errori dovuti al robot o al tessuto non perfettamente fissato al piano, bisogna perciò verificare prima di eseguire ogni TURN la correttezza del punto iniziale.

I fori vengono creati grazie ad un ago, collegato al bisturi, e attaccato verticalmente al robot. Lo strumento è stato impostato in modalità taglio monopolare. Essendo in modalità monopolare, il tessuto è stato fissato sopra ad una piastra neutra collegata a

sua volta al bisturi, per chiudere il circuito. La piastra deve aderire bene a tutta la superficie del tessuto, in modo da evitare bruciature, oppure il blocco della macchina se non arriva il segnale di ritorno, eseguendo così il foro meccanicamente.

<i>Matrice lavorata</i>	X = 20mm Y = 15mm Z = 3mm
<i>Diametro ago</i>	150 μ m
<i>Materiale ago</i>	Acciaio inox
<i>Velocità robot</i>	5%
<i>Potenza VESALIUS</i>	8
<i>Risoluzione</i>	600 μ m
<i>Distanza tangenti</i>	450 μ m
<i>Numero fori</i>	1650
<i>Fori/area</i>	550 fori/cm ²
<i>Durata lavorazione</i>	90 min

Tabella 4-1: Parametri impostati per la lavorazione

La velocità del robot è in percentuale rispetto alla massima consentita, ed è la velocità interpolata riferita ai movimenti di tutti gli assi. Con una velocità troppo elevata si ha il rischio di rompere dell'ago e di danneggiare il tessuto, poiché i legami molecolari non fanno a tempo ad essere rotti per risonanza quantica ma si rompono prima meccanicamente per l'azione dell'ago, mentre una velocità troppo bassa espone il tessuto per troppo tempo all'azione del bisturi e rischia di bruciarsi. La velocità è stata il 5% di quella massima, ottimale per praticare una foratura perfetta del tessuto.

La profondità di penetrazione dell'ago viene scelta in modo che il tessuto venga attraversato completamente. Purtroppo data l'irregolarità del tessuto questo non è sempre ottenibile, e ci saranno quindi canali che non raggiungono la profondità del tessuto.

La risoluzione deve essere maggiore del diametro dell'ago usato altrimenti i fori adiacenti vengono fatti in maniera sovrapposta. Tale parametro viene scelto in modo tale da avere almeno 100 μ m di spazio tra le tangenti di 2 buchi adiacenti.

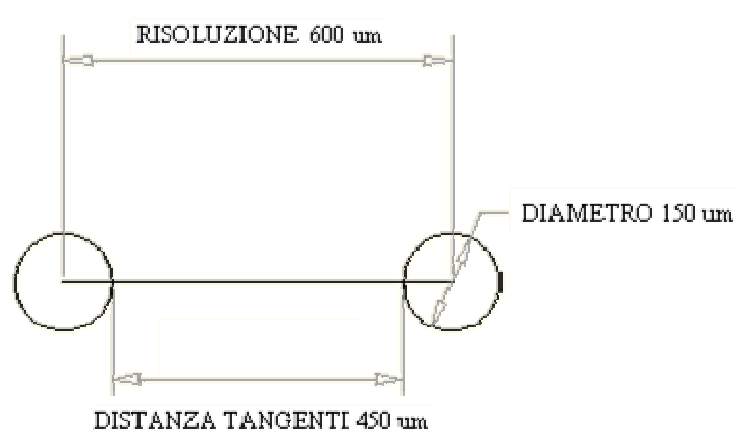


Figura 4-5: distanze fori successivi nella prima fase

4.2. SPERIMENTAZIONE CON CANALI INTRECCIATI

In questa fase il tessuto è stato lavorato secondo il metodo definitivo che era stato previsto, e cioè con due tipi di canali, alternandoli in modo da avere una rete di canali intrecciati. Visti i buoni risultati della sperimentazione precedente, sono stati utilizzati gli stessi parametri e lo stesso algoritmo del robot, questa volta svolgendo entrambi i TURN.

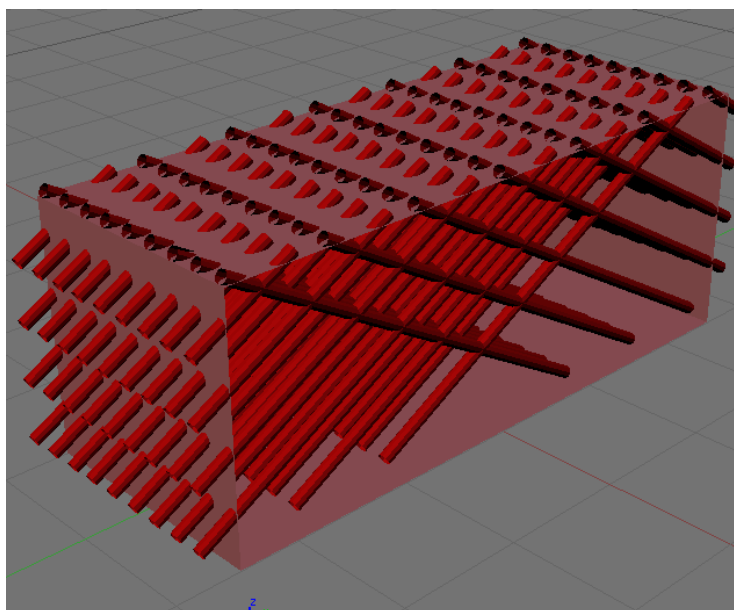


Figura 4-6: Simulazione tridimensionale della lavorazione a canali intrecciati

Rispetto alla precedente sperimentazione dunque i fori sono il doppio e la distanza tra i centri dei fori successivi dimezzata, visto che i canali del secondo TURN vanno ad inserirsi esattamente tra i canali del primo, a meno di errori che potrebbero comparire durante la lavorazione.

<i>Matrice lavorata</i>	X = 20mm Y = 15mm Z = 3mm
<i>Diametro ago</i>	150 μ m
<i>Materiale ago</i>	Acciaio inox
<i>Velocità robot</i>	5%
<i>Potenza VESALIUS</i>	8
<i>Risoluzione</i>	300 μ m
<i>Distanza tangenti</i>	150 μ m
<i>Numero fori</i>	3300
<i>Fori/area</i>	1100 fori/cm ²
<i>Durata lavorazione</i>	200 min

Tabella 4-2: parametri impostati per la lavorazione

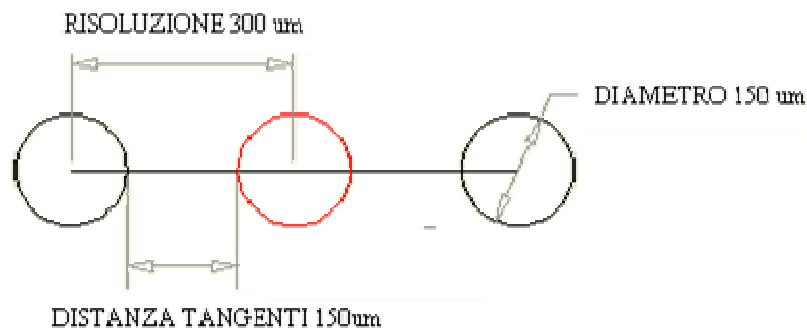


Figura 4-7: distanza fori successivi nella sperimentazione con canali intrecciati; in nero secondo l'angolazione 60° in rosso secondo l'angolazione -60°

Durante la lavorazione è importante irrorare continuamente il tessuto con soluzione fisiologica, in modo che resti ben idratato, e migliorare anche l'entrata e uscita dell'ago, che dovrà fare migliaia di fori. Inoltre è necessario un controllo visivo mentre vengono effettuati i fori, per verificare che non ci siano rotture dell'ago, spostamenti del tessuto o altri problemi che necessitano l'interruzione della

lavorazione per non compromettere il risultato finale. In ogni caso il programma può essere interrotto e fatto ripartire dallo stesso punto in qualsiasi momento.

La potenza del bisturi a risonanza quantica molecolare, in modalità taglio, è stata impostata ad 8, che con misure di potenza effettuate alimentando un'impedenza di 400Ω corrisponde a circa 5W. Verosimilmente però l'impedenza del tessuto potrebbe essere minore, considerata anche l'idratazione continua con soluzione salina allo 0,9%, e quindi la potenza in realtà è maggiore.

Il robot, e tutto il processo di lavorazione sono stati svolti all'interno di una cappa sterile per garantire la sterilità, ed evitare contaminazione batteriche che potrebbero digerire la struttura della matrice e quindi sfavorire l'attecchimento cellulare successivo.

4.2.1. Decellularizzazione dello scaffold

Il processo di decellularizzazione serve ad ottenere una matrice acellulare, cioè priva di residui genetici, evitando così problemi di rigetto dovuti ai diversi codici genetici dello scaffold e dell'ambiente vivente dove verrà impiantato.

Dopo la lavorazione della cartilagine si procede con il processo di decellularizzazione nel quale il tessuto viene messo per una settimana in un bagno di EDTA¹³ sodico, per rimuovere i sali di calcio che ostacolerebbero la permeazione dei solventi per la decellularizzazione. La formazione di Sali di calcio avviene dopo qualche giorno successivo all'asportazione.

Per ottenere la matrice acellulare si devono eseguire più cicli. Il numero di cicli varia a seconda del tipo di tessuto (per la cartilagine anche fino a 16 cicli).

Ogni ciclo del processo di decellularizzazione prevede che il tessuto venga immerso in PBS contenente l'1% di AF per un lavaggio preliminare e successivamente venga trattato, secondo il metodo di *Meezan et al.*, con:

¹³ EDTA: acido etilendiamminotetracetico è uno degli anticoagulanti più frequentemente usato ed è reperibile sottoforma di sali di sodio o di potassio. Come altri anticoagulanti esplica la sua azione sequestrando lo ione calcio, indispensabile per il processo di coagulazione, e formando con esso composti insolubili. Risulta pertanto un anticoagulante irreversibile del calcio.

- Acqua MilliQ autoclavata contenente AF in rapporto 10:1 per 72 ore a 4., per ottenere l'osmolisi cellulare;
- Soluzione al 4% di deossicolato di sodio (Sigma) in acqua MilliQ per 4 ore sotto agitazione, a temperatura ambiente. Essendo un detergente tensioattivo disgrega la componente lipidica delle membrane cellulari;
- Lavaggio in PBS;
- 2000kU di deossiribonucleasi I (DNAsi, Sigma) in soluzione di NaCl 1M (Sigma), per 3 ore sotto agitazione a temperatura ambiente al fine di distruggere gli acidi nucleici che si liberano;
- Lavaggio in PBS.

La matrice acellulare viene poi conservata in PBS con aggiunta di AF a 4°C, fino al momento del suo utilizzo. Il PBS (*Phosphate buffered saline*), ossia tampone fosfato salino, è una soluzione, comunemente usata nei laboratori di biologia e biochimica, e che contiene cloruro di sodio, sodio fosfato e potassio fosfato. Il tampone aiuta a mantenere costante il pH. La concentrazione salina combacia con quella del corpo umano (cioè è isotonica). Il PBS ha molti usi soprattutto perché è isotonico e non tossico per le cellule, infatti è anche usato come soluzione di lavaggio per le cellule [10].

4.3. TESTING DEL PROTOTIPO PER LA POMPA PERISTALTICA

Il nuovo sistema progettato da utilizzare per la semina cellulare è formato da una pompa peristaltica, e da un supporto in acciaio formato da un serbatoio, sopra al quale viene posta una lamina forata, su cui poggia il tessuto. Per incanalare il terreno di coltura sono state progettate diverse maschere delle dimensioni dell'area del tessuto lavorato.

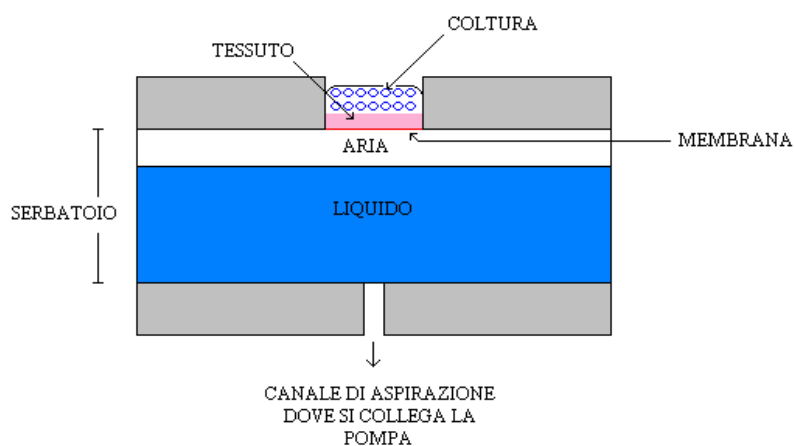


Figura 4-8: visione in sezione del meccanismo di semina

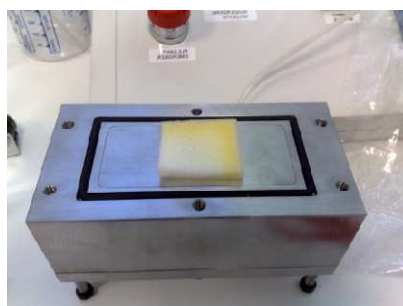
La pompa è collegata in modo da aspirare l'acqua dal serbatoio sottostante, creando una depressione tale da far scendere gradualmente il gel di coltura. Questa condizione è garantita dal fatto che la struttura è stata progettata per creare il vuoto al di sotto del campione.

Le prove primarie di simulazione con la pompa vengono eseguite con una spugna, di dimensioni simili al tessuto biologico. La spugna viene poi fissata con la maschera. La pompa da noi utilizzata è regolabile tramite un controller che gestisce la velocità di aspirazione, analogicamente dall'1% al 100%.

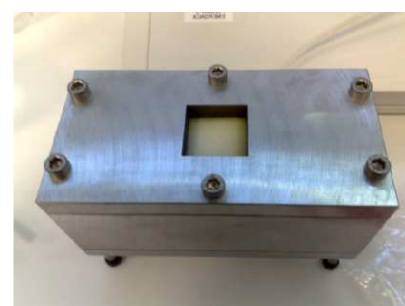
Con questo esperimento si cercano parametri di portata della pompa paragonabili a quelli che verosimilmente verranno utilizzati nella semina.



(1)



(2)



(3)

Figura 4-9: Prove con pompa peristaltica: (1) controller della pompa peristaltica; (2) spugna che simula il campione di tessuto e poggiato sopra la rete di sostegno; (3) maschera che incanala il terreno di coltura.

L'esperimento consiste nel simulare l'azione della pompa durante la semina, facendo passare attraverso il campione 50 ml di acqua, con diversi volumi di acqua sottostante, e analizzando i tempi di risucchio. Per alcune misure è stata eseguita solo la prova con marcia 1 e velocità minima (misura eseguita 2 volte), visto che verosimilmente sarà questa la combinazione da usare, poiché garantisce le portate minori rispetto a tutte le altre possibilità.

Di seguito sono riportati i risultati delle prove effettuate:

- Acqua nel serbatoio: 165 ml
- Acqua soprastante: 50 ml

	Tempo [s]	Portata [ml/min]	Tempo [s]	Portata [ml/min]
<i>Velocità [%]</i>	<i>Marcia 1</i>		<i>Marcia 2</i>	
1	1631	1,83	605	4,95
50	260	11,53	88	34,09
100	163	18,40	54	55,55

- Acqua nel serbatoio: 150ml
- Acqua soprastante: 50 ml

	Tempo [s]	Portata [ml/min]	Tempo [s]	Portata [ml/min]
<i>Velocità [%]</i>	<i>Marcia 1</i>		<i>Marcia 2</i>	
1	1650	1,81	757	3,96
50	308	9,74	92	32,60
100	187	16,04	52	57,69

- Acqua nel serbatoio: 125 ml
- Acqua soprastante: 50 ml

	Tempo [s]	Portata [ml/min]	Tempo [s]	Portata [ml/min]
<i>Velocità [%]</i>	<i>Marcia 1</i>		<i>Marcia 2</i>	
1	1807	1,66	672	4,46
50	337	8,90	86	34,88
100	179	16,75	51	58,82

Acqua nel serbatoio: 100 ml

Acqua soprastante: 50 ml

	Tempo [s]	Portata [ml/min]	Tempo [s]	Portata [ml/min]
<i>Velocità [%]</i>	<i>Marcia 1</i>		<i>Marcia 2</i>	
1	1739	1,72	637	4,70
50	316	9,49	88	34,09
100	178	16,85	53	56,60

Acqua nel serbatoio: 75 ml

Acqua soprastante: 50 ml

	Tempo [s]	Portata [ml/min]
<i>Velocità [%]</i>	<i>Marcia 1</i>	
1	1703	1,76

Acqua nel serbatoio: 50 ml

Acqua soprastante: 50 ml

	Tempo [s]	Portata [ml/min]
<i>Velocità [%]</i>	<i>Marcia 1</i>	
1	1724	1,74

Acqua nel serbatoio: 25 ml

Acqua soprastante: 50 ml

	Tempo [s]	Portata [ml/min]
<i>Velocità [%]</i>	<i>Marcia 1</i>	
1	1982	1,51

Acqua nel serbatoio: 0 ml

Acqua soprastante: 50 ml

	Tempo [s]	Portata [ml/min]
<i>Velocità [%]</i>	<i>Marcia 1</i>	
1	1773	1,69

5. RISULTATI

5.1. ANALISI DELLE MATRICI CARTILAGINEE

Per verificare la qualità della lavorazione, i campioni sono stati analizzati con il microscopio elettronico a scansione (SEM) e con esami istologici. Le analisi riguardano il tessuto lavorato con una sola angolazione..

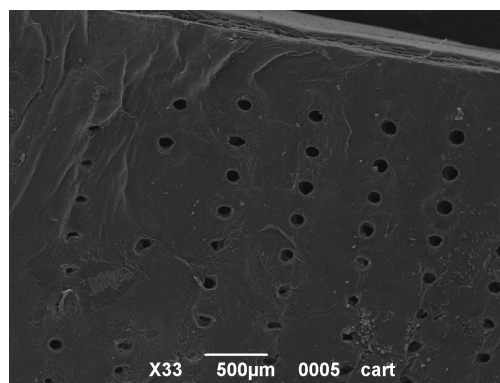


Figura 5-1: Immagini al SEM dei canali

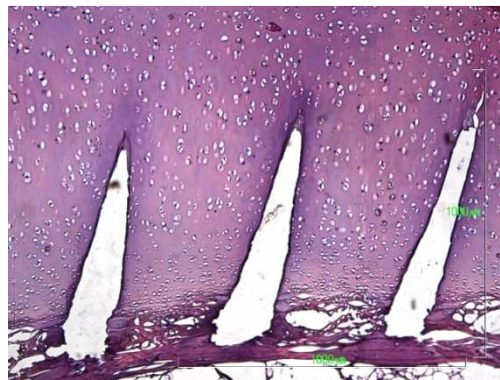


Figura 5-2: Esami istologici sulla cartilagine lavorata

Le analisi fatte mostrano i canali in modo chiaro, e si può notare la precisione del robot, le file parallele, infatti, sono chiaramente distinguibili, le distanze sono state rispettate e sono costanti (Figura 5-1). I bordi dei canali sono ben delineati ed il foro d'ingresso è preciso, e “stabile” cioè non collassa come succederebbe con una semplice foratura meccanica (Figura 5-2). Il tessuto adiacente ai fori, è in perfette condizioni, questo grazie all'utilizzo del *VESALIUS*[®] che non brucia il tessuto ma

effettua un taglio a freddo. Se avessimo utilizzato un normale elettrobisturi le necrosi causate dall'innalzamento della temperatura avrebbero compromesso la struttura dello scaffold. Questi risultati confermano anche la correttezza del livello di potenza scelto, che sarà usato anche nelle prossime prove.

Nella lavorazione del tessuto con i canali incrociati, come si può vedere in Figura 5-3, i fori sono precisi ed il tessuto è in ottime condizioni.



Figura 5-3: tessuto cartilagineo naturale, dopo lavorazione con canali incrociati

Il tessuto lavorato è stato portato al *Dipartimento di Scienze Farmaceutiche* dell'Università degli studi di Padova, nel laboratorio della *Prof.ssa Conconi* per subire i cicli di decellularizzazione. Dal momento che è molto difficile e lungo il processo di decellularizzazione della cartilagine, non è stato ancora possibile analizzare l'immagine al SEM e istologica del campione.

Ci aspettiamo che l'ambiente così creato, sia ottimale per la semina, grazie ai canali intrecciati che fanno penetrare in tutto lo spessore le cellule, e per la sopravvivenza e la crescita cellulare grazie al tessuto completamente naturale e integro.

5.2. ANALISI DEI RISULTATI DI TESTING DEL PROTOTIPO DELLA POMPA PERISTALTICA

L'area del tessuto su cui dovranno essere seminate le cellule sarà di 225 mm^2 ($15 \times 15 \text{ mm}$), e la sospensione contenente le cellule di $500 \mu\text{l}$ (contenente circa un milione di cellule). La procedura per la semina prevede di inserire $100 \mu\text{l}$ ogni 20 minuti, quindi la portata di $5 \mu\text{l}/\text{min}$.

Dalle prove effettuate, i tempi di risucchio più alti (quindi portate più basse) si sono ottenuti con meno acqua nel serbatoio. Le differenze diminuiscono all'aumentare della velocità, diventando quasi costanti, come si vede nella **Figura 5-4** e nella **Figura 5-5**.

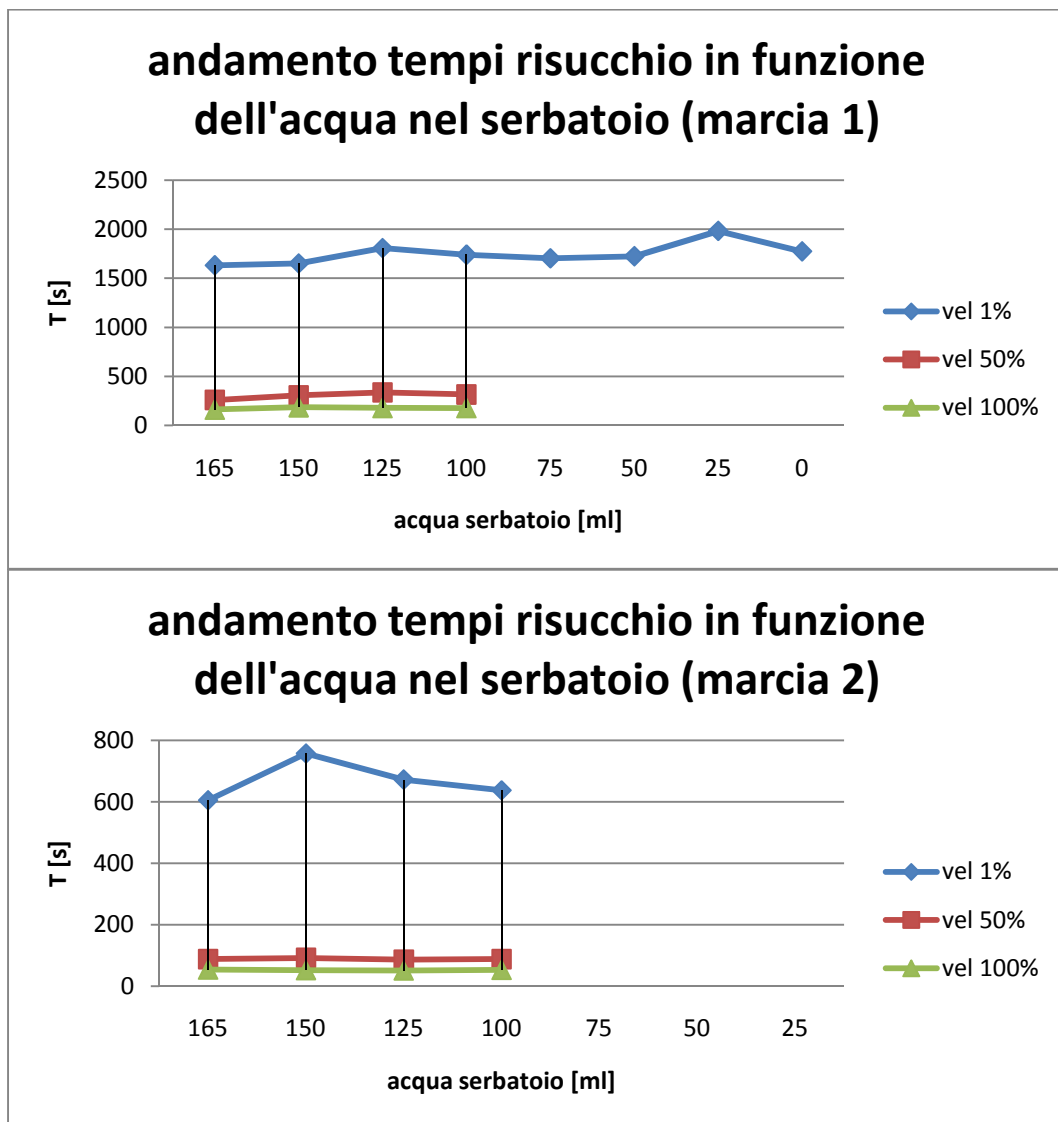


Figura 5-4: prove su pompa peristaltica, andamento tempi risucchio in funzione dell'acqua nel serbatoio

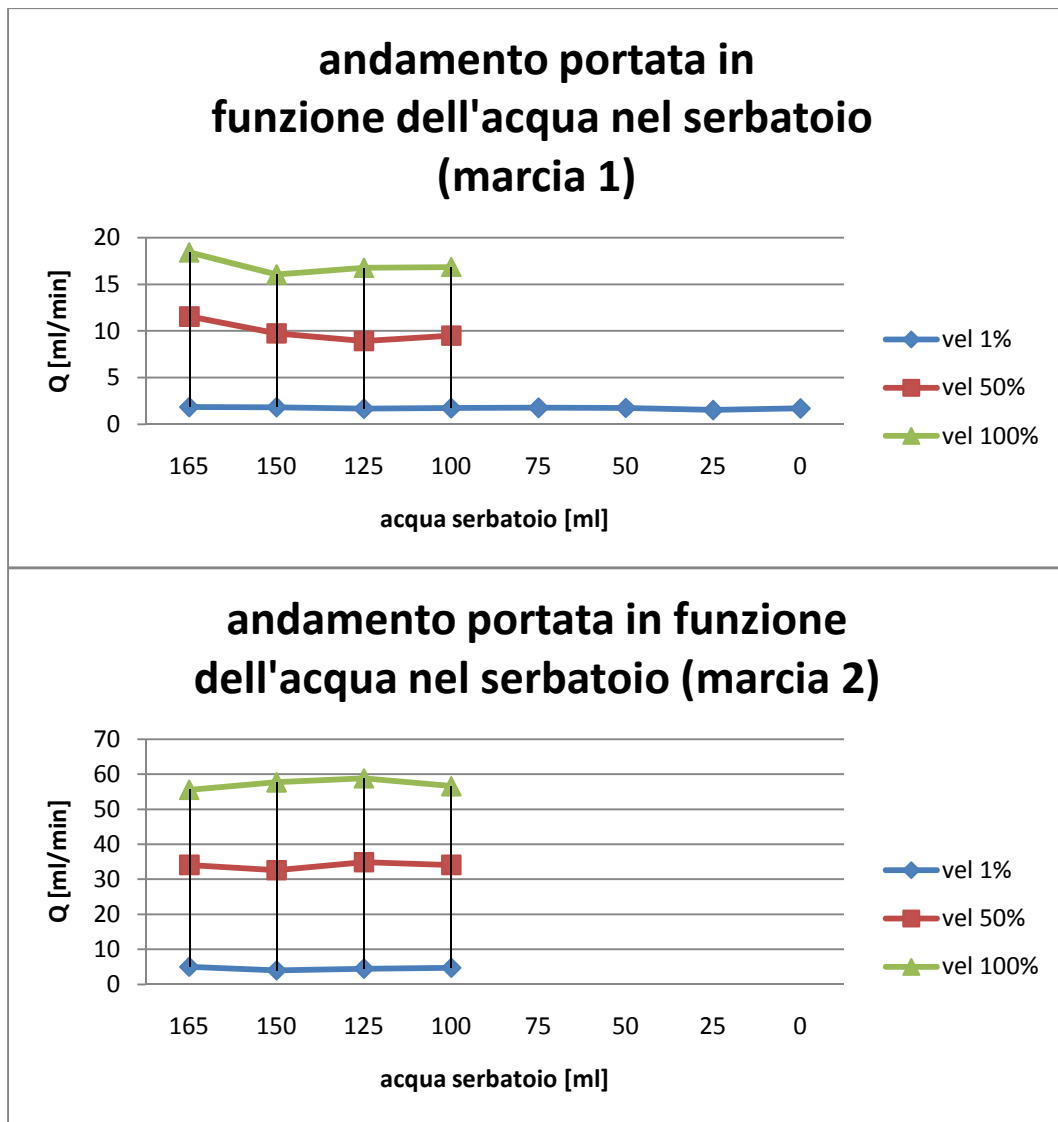


Figura 5-5: prove su pompa peristaltica, portata in funzione dell'acqua nel serbatoio

Considerando la velocità minima, i dati migliori che si ottengono sono una portata di circa **1,6 ml/min a serbatoio vuoto**, che percentualmente non si discosta di molto dal dato peggiore di circa **1,8 ml/min, a serbatoio pieno**. Per quanto riguarda le altre velocità le portate diventano troppo elevate, e sono sicuramente da scartare.

La pompa testata ha quindi una portata troppo elevata per un volumi piccoli di terreno di coltura utilizzati in laboratorio.

Queste prove sono state eseguite perché è di fondamentale importanza la portata con la quale viene risucchiato il liquido perché in base a questo si determina la depressione applicata, visto che una portata troppo alta causerebbe la rottura delle cellule.

La depressione applicata è proporzionale al volume di acqua risucchiato, e quindi dalla portata di aspirazione della pompa; come si vede dall'equazione di stato dei gas perfetti (approssimando come gas perfetto l'aria nel serbatoio):

$$pV = nRT$$

n : moli di gas;

R è la costante universale dei gas;

T : temperatura;

dove nRT sono delle costanti. Si nota che la pressione (p) è inversamente proporzionale al volume (V). Aumentando quindi il volume dove si trova l'aria, la pressione diminuisce, creando così la depressione con l'esterno.

Si ipotizza l'uso di altri strumenti per la creazione di questa depressione basandoci non più sul valore di portata ma sulla regolazione del vuoto dentro al serbatoio.

In particolare si è pensato all'utilizzo di una pompa a svuotamento o da vuoto.

Questo tipo di pompa funziona creando al proprio interno il vuoto, mediante lo spostamento di una parete, e creando quindi un effetto di risucchio dalla parte opposta, dove si posiziona lo scaffold. Il principio di funzionamento è simile a quello dei nostri polmoni, che allargandosi, creano il vuoto al loro interno richiamando l'aria dall'esterno.

Una pompa da vuoto è quindi un meccanismo attivo che aspira del gas a bassa pressione e nella maggior parte dei casi lo comprime ad una pressione maggiore espellendolo dalla sua uscita. In genere le pompe da vuoto hanno una velocità di aspirazione costante, caratteristica importante per i nostri obiettivi.

Anche questo tipo di pompa è usata comunemente nei processi in medicina che richiedono suzione, ed è quello che ci serve, visto che l'obiettivo è quello di risucchiare il gel contenente le cellule all'interno dello scaffold.

Quello che interessa di più per la fase di semina è la portata con cui il liquido contenente le cellule viene assorbito nel tessuto.

Esistono varie tipologie di pompe a vuoto, le più impiegate sono quelle rotative, infatti, il meccanismo più semplice per fare il vuoto consiste nello spostamento ciclico di una parete. In questo caso meccanicamente viene fatta espandere ciclicamente una cavità. In questa maniera il gas da aspirare affluisce dalla camera da vuoto, entra nella pompa da vuoto dove viene aspirato. Quindi la cavità viene sigillata ed il gas viene compresso. Infine il gas viene espulso verso l'atmosfera, come si può vedere nella **Figura 5-6**.

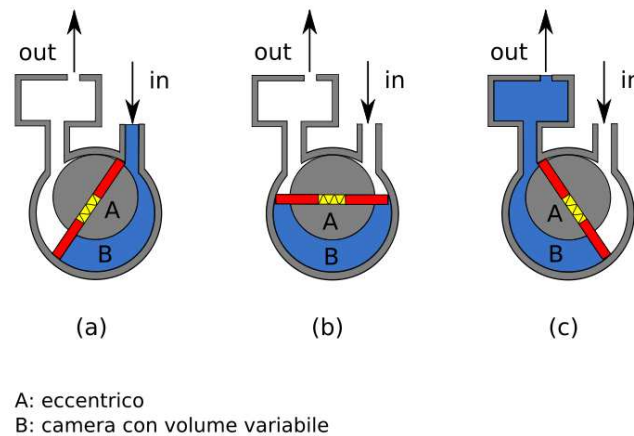


Figura 5-6: Schema di funzionamento di una pompa rotativa; (a) il gas viene aspirato dalla camera da vuoto; (b) il gas viene compresso; (c) il gas viene espulso tramite la valvola

La pompa, toglie aria dal serbatoio, per creare il vuoto, questo causa una depressione all'interno del serbatoio. Siccome un fluido si muove dai punti a pressione maggiore verso quelli a pressione minore, la sospensione tende a passare dalla pressione atmosferica a cui è sottoposta quando è sopra al tessuto, alla pressione più bassa del serbatoio. Queste due pressioni sono divise proprio dal tessuto, e la sospensione con le cellule quindi tende ad entrare nei canali del tessuto.

La pompa a vuoto ha una velocità di aspirazione costante, e quindi anche la portata è costante. Applicando la formula di *Poiseuille*:

$$Q=k*\Delta P$$

dove k è una costante che dipende dalle dimensioni in gioco e le caratteristiche dei fluidi, Si può vedere come la portata sia direttamente proporzionale alla differenza di pressione. Quindi la portata di risucchio del liquido cellulare dipenderà dalla differenza di pressione, la quale a sua volta dipenderà dalla portata di aspirazione della pompa, e quindi possiamo dire che le due portate a meno di errori, sono uguali.

Come abbiamo visto la portata che sarebbe ottimale per il nostro scopo deve essere minore di 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ e le pompe da vuoto in commercio possono arrivare anche a portate di qualche nl/min . Sembra dunque questa la soluzione per ottenere una bassa portata anziché il depotenziamento di una pompa peristaltica.

6. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

La fase di lavorazione del tessuto, quindi la creazione dei canali intrecciati, ha dato ottimi risultati dalle analisi effettuate, e sembra il modo migliore per inserire in tre dimensioni le cellule nello scaffold cartilagineo (Capitolo 5.1).

La lavorazione secondo doppia angolazione ha permesso di ottenere un tessuto permeabile e ha facilitato il processo di decellularizzazione, molto difficile nel caso della cartilagine. Altre sperimentazioni sono previste a breve con la semina di mesenchimali. Al momento la tecnica viene ampiamente studiata anche nel caso del tessuto esofageo, con la fase di semina e di verifica della sopravvivenza *in vitro*.

La fase di semina con l'azione della pompa peristaltica è ancora in fase di studio, visto che bisogna trovare la struttura e la strumentazione ottimale per inserire il terreno di coltura cellulare nello scaffold, perché sono stati ottenuti dalle prove risultati troppo elevati di portata e quindi non accettabili per i nostri scopi.

In caso di raggiungimento di questi obiettivi si avrebbe un miglioramento netto rispetto alle cure al giorno d'oggi possibili per i danni subiti dal tessuto cartilagineo, ma più in generale questa tecnica potrà essere applicata a moltissimi tessuti, potendo sostituire le parti danneggiate con nuovo tessuto naturale.

Tale innovazione potrà già essere applicata ad un caso clinico di nostro interesse: la creazione di tessuto osseo da scaffold cartilagineo. L'idea nasce dal caso clinico di una bambina, alla quale è stata rimossa gran parte della mandibola affetta da tumore. La ricostruzione della parte orizzontale dell'osso è stata in gran parte già ottenuta con altre tecniche di trazione e sollecitazione del tessuto mandibolare, mentre risulta al momento ancora difficile ricostruire l'ultimo tratto verticale. A breve partirà una sperimentazione clinica che vede la tecnica del nostro progetto di ricerca applicata al trattamento di un tessuto cartilagineo autologo (prelevato dall'arcata costale della bambina) e seminato successivamente con staminali autologhe mesenchimali, prelevate dal midollo osseo della paziente stessa. La differenziazione in osteoblasti sarà garantita dai particolari fattori di crescita che costituiranno il terreno di coltura.

Oltre al bisturi di nuova generazione, usato nella lavorazione del tessuto, un altro dispositivo medico prodotto da Telea sfrutta il principio della risonanza quantica molecolare (*REXON-AGE*[®]), per stimolare la rigenerazione dei tessuti. Tale dispositivo potrebbe risultare utile nel favorire la differenziazione cellulare e la stimolazione delle stesse.

Grazie all'azione di correnti ad alta frequenza e bassa intensità, stimola i tessuti, o meglio le cellule, in particolare le staminali, a riprodursi ed a produrre matrice extracellulare nuova. Rappresenta un'innovazione rispetto a dispositivi medici simili, e per il nostro scopo risulterebbe estremamente vantaggioso.



Figura 6-1: il dispositivo di rigenerazione tessutale REXON-age[®]

In conclusione questo mix tra scaffold naturale seminato con cellule mesenchimali autologhe, e stimolazione tramite REXON-Age[®] potrà essere una valida alternativa ai trapianti dei tessuti danneggiati, in particolare la creazione di cartilagine *in vitro* porterà notevoli vantaggi non solo al paziente stesso, ma all'intera società che ne risente delle conseguenze di questa patologia.

BIBLIOGRAFIA

- [1] M.T. Mauceri. "Conoscere le malattie reumatiche". ANMAR. 2004
- [2] S. Olafsson. "Social and personal costs of arthritis and rheumatic diseases". NRR. 2008.
- [3] *www.anmar-italia.it 2010*
- [4] "Asian countries cannot afford to ignore the cost of rheumatoid arthritis". APLAR. 2005.
- [5] A. Ridolfi. "Osservatorio sanità e salute". 2008.
- [6] Peterson L, Brittberg M, Kiviranta I, Akerlund EL, Lindhal A. "Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability". *Am J Sports Med*; 30: 2-12. 2002
- [7] B. Grigolo¹, L. Roseti¹, M. Fiorini¹, L. De Franceschi¹, A. Facchini. "Applicazioni dell'Ingegneria Tissutale: riparazione di lesioni cartilaginee con condrociti autologhi". *Reumatismo*; 54(4):364-371. 2009. 2002.
- [8] W.Albisetti, L. De Girolamo. "Tecniche di colture condrocitarie". Università studi di Milano.
- [9] B.Esposito. "*Scaffold per la rigenerazione del tessuto cartilagineo*". Tesi di dottorato di ricerca in ingegneria dei materiali e delle strutture biomateriali.
- [10] F.Meneghesso. "Sviluppo e integrazione di macchine per la preparazione di tessuti naturali decellularizzati, omologhi o eterologhi, e arricchimento con cellule staminali autologhe". Tesi di laurea in bioingegneria. 2009