

Università degli studi di Padova



Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione

Corso di laurea in Ingegneria Biomedica

Tesi

**L'Acido ialuronico nella
progettazione di Scaffold per
Cute Ingegnerizzata nella
guarigione delle ferite**

Laureando: Francesco Di Vietro

Relatore: Dott. Andrea Bagno

30 / 03 / 2012

A.A. 2011 / 2012

Indice:

0	Abstract	pag. 5
1	Introduzione	pag. 6
1.1	Il ruolo e la presenza dell'acido ialuronico nell'organismo	pag. 7
1.2	Fonti biologiche dell'HA	pag. 8
2	Applicazioni biomediche dell'acido ialuronico e dei suoi derivati	pag. 11
2.1	Oftalmologia	pag. 11
2.2	Ortopedia e reumatologia	pag. 12
2.3	Otorinolaringoiatria	pag. 12
2.4	Farmacologia e sistemi di rilascio del farmaco	pag. 13
2.5	Ringiovanimento cutaneo e chirurgia plastica	pag. 13
2.6	Chirurgia e guarigione delle ferite	pag. 14
3	Cute Ingegnerizzata	pag. 15
3.1	Classificazioni	pag. 16
3.1.1	Equivalenti epidermici	pag. 17
3.1.2	Equivalenti cutanei	pag. 17
3.1.3	Compositi Sostitutivi	pag. 18
3.2	Veicolazione alla rigenerazione della Matrice Extra-Cellulare come meccanismo per la guarigione di ferite in assenza di cicatrici	pag. 19
4	Scaffold	pag. 21
4.1	Requisiti e tecniche di generazione di uno scaffold	pag. 21
4.1.1	Aspetti Strutturali	pag. 22
4.1.2	Proprietà Meccaniche	pag. 23
4.1.2.1	Considerazioni preliminari di Biomeccanica	pag. 24
4.1.2.2	Proprietà delle pelle umana	pag. 26
4.1.2.3	Proprietà Biomeccaniche dei sostituti cutanei	pag. 27
4.1.3	Processi di fabbricazione degli Scaffolds	pag. 28

4.2	Elettrospinning di una matrice nanofibrosa HA-Collagene	pag. 29
4.2.1	Materiali e metodi	pag. 30
4.2.1.1	Preparazione della matrice	pag. 30
4.2.1.2	Coltura cellulare sulla matrice	pag. 30
4.2.1.3	Test e analisi statistiche	pag. 31
4.2.2	Risultati	pag. 31
4.2.2.1	Caratterizzazione dei prodotti elettrofilati	pag. 31
4.2.2.2	Attaccamento cellulare, vitalità cellulare ed espressione genica	pag. 33
4.2.3	Discussione dello studio effettuato	pag. 35
5	Applicazione di cute autologa ingegnerizzata	pag. 38
5.1	Materiali e metodi	pag. 38
5.1.1	Isolamento, coltura cellulare e Biomateriale	pag. 38
5.2	Risultati	pag. 39
5.2.1	Valutazione delle colture di cheratinociti, melanociti e fibroblasti	pag. 39
5.2.2	Preparazione della pelle sostitutiva autologa	pag. 39
5.3	Discussione	pag. 42
6	Modello Matematico per la guarigione delle ferite	pag. 43
6.1	Materiali e metodi	pag. 43
6.2	Risultati	pag. 45
6.2.1	Simulazione del protocollo di trattamento	pag. 45
6.2.2	Simulazione d'applicazione dei componenti in modo individuale	pag. 47
6.3	Discussioni	pag. 50
6.4	Appendice	pag. 51
7	Conclusioni	pag. 55
8	Bibliografia	pag. 57

0. Abstract

In questo lavoro è presentata una panoramica sull'Acido Ialuronico (HA), analizzandone la composizione chimica, la sua presenza e il suo ruolo all'interno dell'organismo, le fonti biologiche di produzione, le applicazioni biomediche nelle varie aree cliniche. In seguito si entrerà nel dettaglio dell'utilizzo dell'acido ialuronico nella: produzione di scaffolds per la cute ingegnerizzata, in particolar modo si esamineranno il metodo dell'elettrospinning, le modalità d'impiego all'interno delle matrici per veicolare la guarigione cutanea, e la modellazione matematica della guarigione delle ferite. In particolar, si cercherà di comprendere meglio i meccanismi di interazione tra le varie componenti biologiche che partecipano al processo di guarigione della cute applicando il modello matematico a due protocolli di trattamento di pelle ingegnerizzata attualmente disponibili in commercio, Apligraf™ e Dermagraft™.

1. Introduzione

Scoperto nel corpo vitreo nel 1934 e poi sintetizzato nel 1964, l'Acido ialuronico (HA) consiste di una unità di base di due zuccheri, acido glucuronico e N-acetilglucosamina, polimerizzato in macromolecole di grandi dimensioni di oltre 30,000 unità ripetute. Ha una massa molecolare altamente lineare, composta da polisaccaridi naturali alternando (1 → 4)-β legato ai residui di D-glucuronico e (1 → 3)- β legato ai residui di N-acetil-D-glucosamina (Fig. 1).

L' HA appartiene ad un gruppo di sostanze conosciuto come glicosaminoglicani (GAGs), tra cui è la più semplice da un punto di vista strutturale in quanto è l'unica non covalentemente associata ad una proteina del centro, non sintetizzata nel Golgi, e l'unica non solfata. La massa molare può raggiungere un peso massimo di 10^7 Da. E' quindi uno dei più grandi componenti della Matrice Extra-Cellulare (ECM), la cui struttura appare identica in tutti i piani di organizzazione e in specie diverse.

La molecola, altamente idrosolubile, in soluzione acquosa produce un gel (Fig.2) che si comporta sia come lubrificante che come assorbente d' acqua, presentando proprietà igroscopiche e omeostatiche. L' elevata solubilità dell'acido ialuronico si è dimostrata problematica nello sviluppo di polimeri per l'ingegneria tissutale: un foglio posto in una piccola quantità di acqua si liquefa. Tale peculiarità può essere utile in alcuni settori, come la chirurgia ortopedica, ma non per altri, come l'ingegneria tissutale in cui è richiesta una maggiore stabilità strutturale, necessaria nella stabilizzazione chimica. La viscosità del gel prodotto sembra più dipendere da una serie di proprietà tra cui la lunghezza delle catene (e per estensione il grado di entanglement), cross-linking, pH e modificatori chimici , e molto meno dalla sua concentrazione assoluta, com'è interessante notare. Il solito metodo di stabilizzazione dell'HA è l'esterificazione, ossia la reazione di preparazione di un estere partendo da un alcol (generalmente alcol benzilico) e un acido. Cross-linking ed esterificazione, infatti, evitano infiltrazioni di acqua, riducendo la sua solubilità. In sostanza, questi legami del polimero, in misura variabile, portano a molecole con differente grado di solubilità.

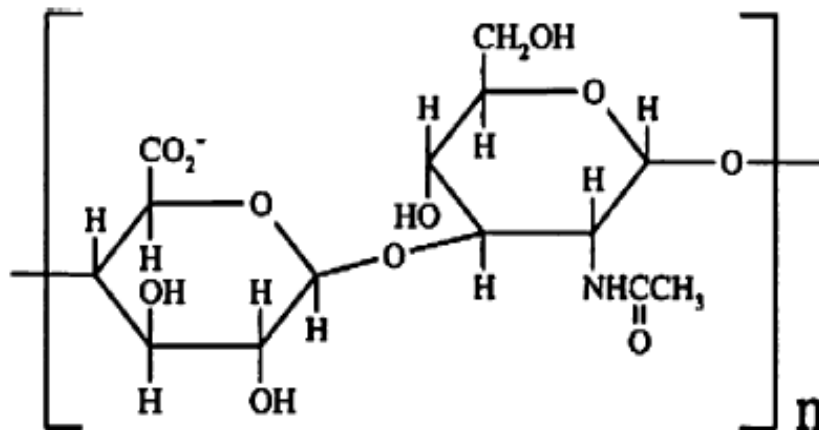


Fig. 1 Struttura di unità disaccaridiche ripetute dell'acido ialuronico



Fig. 2 Foglio di acido ialuronico ad un'estremità del quale è stata applicata dell'acqua.

1.1. Il ruolo e la presenza dell' acido ialuronico nell'organismo

L'acido ialuronico è presente principalmente nelle ECM e nella matrice pericellulare, anche se recentemente è stata dimostrata la sua presenza anche all'interno delle cellule. Nel corpo umano, il più alto contenuto di HA si trova nel liquido sinoviale, nel cordone ombelicale, e nell'occhio vitreo. Quasi la metà dell'HA del corpo umano è presente nella pelle, in particolare nello spazio intracellulare, dove si possono raggiungere i 2,5 g/l.

Oltre a fungere da matrice, in cui sono inserite le cellule, l'HA svolge nella pelle una

serie di altre importanti funzioni: l'HA può immobilizzare l'acqua nei tessuti e quindi modificarne il volume dermico e la comprimibilità, può influenzare la proliferazione cellulare, la differenziazione, e la riparazione dei tessuti. Svolge inoltre il ruolo di "spazzino" di radicali liberi generati dai raggi ultravioletti della luce solare.

Nella cartilagine, nonostante il suo contenuto relativamente basso, l'HA diviene un importante elemento strutturale della matrice, costituendo un centro di aggregazione per l'aggrecano, un grande proteoglicano condroitin-solfato che mantiene il suo assemblaggio macromolecolare nella matrice grazie a specifiche interazioni HA-proteina.

Nel liquido sinoviale, l'elevata concentrazione dell'alta massa molare di HA fornisce la lubrificazione necessaria per l'articolazione e serve come ammortizzatore, riducendo così l'attrito delle ossa nei movimenti e diminuendo l'usura del giunto.

Lo studio di proteine HA-leganti e specifici recettori [1] ha rivelato che l'HA può svolgere ruoli importanti anche in embriogenesi, trasduzione del segnale e motilità cellulare, ed è associato all'invasività del cancro e alle metastasi [2].

I polimeri di HA hanno ampie e spesso opposte funzioni biologiche secondo le dimensioni della molecola. Polimeri a matrice di grandi dimensioni di HA sono spazio-riempitivi, anti-angiogenici, e immunosoppressivi, mentre polimeri di dimensioni intermedie che comprendono 25-50 disaccaridi sono infiammatori, immunostimolanti, e molto angiogenici. I più piccoli oligosaccaridi sono antiapoptotici e inducono le proteine da shock termico [3](ciclo uterino).

1.2. Fonti biologiche dell'HA

L'acido ialuronico è un essenziale componente funzionale di quasi tutti i tessuti, negli organismi dei vertebrati. Così, vari tessuti animali - ad esempio, la cresta del gallo, la pelle di squalo, i bulbi oculari bovini - sono stati utilizzati come fonti di isolamento e produzione di HA ad alta massa molare (Tabella 1). Negli animali l'HA si forma sulla superficie cellulare dei fibroblasti per estrusione nella ECM in stretta associazione con un recettore dedicato, CD-44. E' generalmente presente in un complesso collegato ad altri biopolimeri, e per ottenere un composto puro devono essere applicate, in ordine, diverse procedure di separazione, come la digestione

proteasica, la precipitazione di coppie di ioni di HA (come, ad esempio, la cetilpiridinio cloruro), ultrafiltrazione a membrana, precipitazione senza solvente di HA e/o liofilizzazione. La massa molare media di preparati di HA “estratti” dai tessuti animali disponibili in commercio è collocata in gran parte in un range che va da alcune centinaia di migliaia di Da fino a circa 2.5 MDa.

Anche se sono stati coinvolti nelle fasi iniziali di produzione i tessuti animali, soprattutto le creste del gallo, come materiali utilizzabili clinicamente approvati dalla Food and Drug Administration (FDA), per esempio, in chirurgia oculare, l' HA secreto da microrganismi come certi ceppi attenuati di *Streptococcus zooepidemicus*, *S. equi*, ecc è attualmente offerto da molte aziende fino a diverse tonnellate all'anno. Alcuni di questi preparati fermentativi soddisfano la domanda sulla massa molare nella gamma di diversi MDA. Tuttavia una più ampia applicazione di HA prodotto mediante fermentazione nella pratica clinica è ostacolato da diversi fattori, quali il rischio di mutazioni dei ceppi batterici e una possibile co-produzione di tossine, pirogeni, immunogeni, ecc. Inoltre tutti i prodotti di HA ottenuti dalla cresta del gallo portano obbligatoriamente avvertenze per coloro che sono allergici ai prodotti aviarii. Per questo, al momento si stanno cercando fonti alternative per la produzione di HA.

Tissue or body fluid	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Remarks
Rooster comb	7500	The animal tissue with by far the highest HA content
Human umbilical cord	4100	Contains primarily HA with a relatively high molar mass
Human joint (synovial) fluid	1400-3600	The volume of the synovial fluid increases under inflammatory conditions. This leads to a decreased HA concentration
Bovine nasal cartilage	1200	Often used as a cartilage model in experimental studies.
Human vitreous body	140-340	HA concentration increases upon the maturation of this tissue
Human dermis	200-500	Suggested as a “rejuvenating” agent in cosmetic dermatology
Human epidermis	100	HA concentration is much higher around the cells that synthesize HA
Rabbit brain	65	HA is supposed to reduce the probability of occurrence of brain tumors
Rabbit heart	27	HA is a major constituent in the pathological matrix that occludes the artery in coronary restenosis
Human thoracic lymph	0.2-50	The low molar mass of this HA is explained by the preferential uptake of the larger molecules by the liver endothelial cells
Human urine	0.1-0.3	Urine is also an important source of hyaluronidase
Human serum	0.01-0.1	HA concentrations increase in serum from elderly people as well as in patients with rheumatoid arthritis and liver cirrhosis

Tabella 1 Presenza di HA nei diversi tessuti animali e relativo contenuto

Uno dei candidati maggiori è un ceppo batterico geneticamente modificato, *Bacillus subtilis*, che esprimendo il gene *hasA* da *Streptococcus equisimilis* è in grado di codificare l'enzima per la sintesi. Il gene *hasA* insieme con uno o più geni codifica gli enzimi coinvolti nella sintesi dell'UDP (UDP-precursor sugars), che è necessario per la sintesi dell'HA. Tale ceppo ingegnerizzato è stato quindi abilitato per la produzione di HA con una massa molare nel range di 1MDa. Il vantaggio di usare *B. subtilis* è che è facilmente coltivabile su larga scala e non produce eso- o endotossine, e molti prodotti fabbricati da questo microrganismo hanno ricevuto una designazione GRAS (generalmente riconosciuto come sicuro). Inoltre, *B. subtilis* non produce ialuronidasi che possono degradare l' HA sintetizzato. Allo stato attuale, microbi che producono HA sono stati approvati per il trattamento di ferite superficiali, e per l'utilizzo nell'industria cosmetica. E' però spesso trascurato il fatto che campioni di HA, sia fermentativo che estrattivo, possano contenere alcuni contaminanti. Una piccola quantità di proteine, per esempio nei campioni HA estrattivi, di solito proviene dalle cosiddette proteine di collegamento. La loro presenza può compromettere la non immunogenicità, necessaria nei preparati di HA. Quindi devono essere attentamente esaminati non solo gli onnipresenti batteri o muffe, ma anche la presenza di sostanze inquinanti (proteine, cationi metallici, ecc.) per la loro capacità di degradare la catena dell'HA.

2. Applicazioni biomediche dell'acido ialuronico e dei suoi derivati

Le aree di applicazioni cliniche dell' HA e dei suoi derivati sono stati classificate come segue:

1. visco-chirurgiche: per proteggere i tessuti delicati durante le manipolazioni chirurgiche, come nella chirurgia oftalmica
2. visco-aumento: per riempire e potenziare spazi tissutali, come nella pelle e nei tessuti vocali e della faringe
3. visco-separazione: per separare la superficie del tessuto connettivo traumatizzata da interventi chirurgici o lesioni, al fine di prevenire aderenze e formazione di cicatrici eccessive
4. visco-supplementazione: per sostituire o integrare fluidi dei tessuti, come la sostituzione di liquido sinoviale
5. visco-protezione: per proteggere superfici tissutali sane, ferite o danneggiate dalla disidratazione o dagli agenti ambientali nocivi, e promuoverne la guarigione.

2.1. Oftalmologia

L'acido ialuronico è la componente maggiore del corpo vitreo e acqueo degli occhi ed è quindi la chiave macromolecolare in oftalmologia. Grazie alle sue proprietà viscoelastiche è utilizzato in numerosi interventi chirurgici. Il suo maggior uso è la sostituzione del corpo vitreo perso durante gli interventi di cataratta o applicazioni di lenti. L'HA è stato utilizzato anche topicamente per il trattamento della sindrome dell'occhio secco, della sindrome Sjogren ed è stata sperimentata con successo l'applicazione topica di un gel di HA come vettore di antibiotici per l'occhio; il gel evita lacrime che lavano via il farmaco e permette un rilascio più prolungato.

Studi più recenti, basati sulle proprietà reologiche di materiali puri e loro *blends*, hanno concluso che una nuova combinazione di ialuronato di sodio e hydroxyprometil cellulosa chiamata VISC26, soddisfa ottimamente le richieste per l'uso della chirurgia oftalmica.

2.2. Ortopedia e reumatologia

La seconda maggior applicazione dell'HA è la visco-supplementazione nelle articolazioni affette da artrite. Le articolazioni quando sono danneggiate o colpite da artrite diventano rigide e doloranti. L' artrite reumatoide è classificata come una malattia infiammatoria sistemica, in cui dolori del giunto/i sono spesso accompagnati da alterazioni degenerative negli organi aggiuntivi, come polmoni, cuore e vasi sanguigni. Si stima che oltre il 10% di tutte le persone di età superiore ai 55 anni siano affetti da osteoartrite. Nelle fasi acute, un elevato numero di neutrofili si accumula nel liquido sinoviale del paziente. Queste cellule alterano l'omeostasi ossidativa ed i loro prodotti, in particolare le specie reattive dell'ossigeno, modificano/distruggono la struttura di giunzione a tal punto che non è più funzionale. I tessuti alterati sono riconosciuti come "estranei", e poi reazioni autoimmuni promuovono la malattia e rendono l'artrite reumatoide una malattia sistemica.

La somministrazione intra-articolare di HA migliora i sintomi dell'osteoartrite nei pazienti e ha pochi effetti collaterali. Studi approfonditi indicano che è improbabile che i benefici del trattamento con HA possano essere attribuiti solo alla rigenerazione del lubrificante e alle proprietà viscoelastiche del liquido sinoviale, ma suggeriscono che è più plausibile che la terapia di HA ha effetto biologico sulla progressione dell'artrosi.

2.3. Otorinolaringoiatria

L'influenza dell'HA nelle corde vocali implica diverse funzioni tra cui viscosità del tessuto, fluidità, osmosi, assorbimento degli urti, guarigione di ferite e riempimento dello spazio. Queste funzioni sono particolarmente importanti nelle corde vocali per i costanti traumi causati da azioni vibratorie di fonazione e perché influenzano direttamente lo spessore e la viscosità della piega vocale.

Tuttavia, un grave inconveniente che si incontra nell'utilizzo di HA come bioimpianto di una lamina propria, per il trattamento dei disturbi della piega vocale, è che il suo tempo di permanenza all'interno delle corde vocali è breve. Sono state implementate varie strategie chimiche, enzimatiche e meccaniche di cross-linking per prolungare la

residenza dell'HA nelle corde vocali arrivando a notare che fanghi di un reticolato di HA iniettati nelle corde vocali permettono la permanenza del materiale anche dopo un anno senza produrre alcuna reazione infiammatoria.

2.4. Farmacologia e sistemi di rilascio del farmaco

Recentemente il focus degli studi sull'acido ialuronico si è spostato sui suoi derivati, impiegati come dispositivi di rilascio del farmaco, con scoperte che suggeriscono una serie di molecole che potrebbero essere utilizzate per preparazioni di gel per il trasporto del farmaco. Queste molecole, partner dell'HA, sono principalmente l'isopropilacrilammide, l'acido poliacrilico, miscele di acido alginico/idrossi metil cellulosa, e la cellulosa. Grazie alla combinazione di questi materiali possono essere raggiunte, in modo sicuro, variazioni nella farmacocinetica con proprietà biofisiche marcatamente differenti.

L'HA può essere coniugato direttamente ai farmaci o utilizzato per preparare microcapsule per ottimizzare il rilascio. E' anche utilizzato per migliorare la biocompatibilità delle microsfele di chitosano utilizzate sotto forma di capsule di rilascio del farmaco. Inoltre, microsfele di HA sono utilizzate per il rilascio di DNA plasmidico e anticorpi monoclonali nel trasferimento di geni e nel targeting site-specific.

2.5. Ringiovanimento cutaneo e chirurgia plastica

L' HA al giorno d'oggi è fortemente impiegato come filler delle linee del volto, delle rughe del viso o delle cicatrici depresse. La sua popolarità è in crescente aumento dal 2004, quando per la prima volta furono somministrati 45000 trattamenti da chirurghi membri dell'American Society of Plastic Surgeons (ASPS). Basti pensare che entro l'anno successivo ci fu un aumento di dieci volte. Attualmente, preparati iniettabili a base di HA leggermente cross-linkato, sono comunemente usati rispetto ai prodotti a base di collagene o tossina botulinica in quanto sono più efficaci nel mantenere le correzioni cosmetiche. A differenza dei filler a base di collagene, quelli

di HA sono estremamente elastici, offrendo la flessibilità richiesta dagli spazi in cui vengono iniettati ed inoltre sono anche più durevoli.

La logica alla base dell'utilizzo di HA per il ringiovanimento cutaneo non deriva solo della sua perdita con l'invecchiamento, in quanto le proporzioni di HA nella pelle normale sembra che non cambino dal feto alla vecchiaia. L'HA viene quindi utilizzato allo scopo di aumentarne forzatamente il contenuto nei tessuti. Infatti dopo l'iniezione la molecola è in eccesso rispetto ai livelli naturali e, essendo biodegradabile, viene "cancellata" da sistemi locali omeostatici, ma grazie alle sue proprietà reologiche, l'HA mantiene acqua (e quindi volume) fino alla fine di questo processo. Clinicamente l'aumento sembra scorrere bene fino a quando la concentrazione di HA scende sotto un livello critico in cui diminuisce rapidamente. A questo punto può quindi essere eseguita un'ulteriore iniezione con buoni risultati. In tutto ciò però bisogna anche rilevare che si è osservato, in maniera non rara (12% dei casi), un eritema transitorio e un lieve gonfiore. Altre complicazioni documentate includono un ascesso sterile. La reazione del tessuto delicato, stressato da molte iniezioni può, a volte, essere così profonda da suscitare una reazione di risposta infiammatoria e una serie di stati che variano da ipersensibilità semplice, a angioedema con titoli positivi di immunoglobuline G ed E anti-HA.

Non c'è da stupirsi se l'HA è stato testato come riempitivo per protesi al seno, anche se non ha guadagnato l'accettazione diffusa in questo senso. Questo può essere dovuto al costo di produzione di grandi volumi di HA di livello medico, che rendono gli impianti costosi e quindi proibitivi.

2.6. Chirurgia e guarigione delle ferite

L'impiego dell'acido ialuronico in questo settore è all'apice della sua sperimentazione nell'ingegneria dei tessuti. Preparati ad alto peso molecolare di HA, applicati per via topica, promuovono la guarigione delle ferite normali, croniche e ulcerose. Questo argomento quindi verrà trattato in maggior dettaglio nel seguito.

3. Cute Ingegnerizzata

Nel 1975 Rheinwald e Green [4] hanno descritto il successo della prima coltura di cheratinociti umani, che prometteva un'era di produzione della pelle praticamente illimitata consegnando agli annali della storia un innesto cutaneo di "metà spessore" (split-thickness). La sperimentazione si è scontrata con la dura realtà quando dall'analisi dei risultati sono stati evidenziati: velocità di crescita eccezionalmente bassa per i cheratinociti, fragilità e formazione di vesciche quando i fogli di cheratinociti sono stati applicati alla ferita. Successivamente è stato aumentato il numero di cheratinociti, ma in misura pericolosa per un innesto cutaneo. Tuttavia da questi esperimenti si è potuta apprezzare la necessità di una componente dermica all'interno del costrutto di ricambio, un concetto poi confermato nel 1993.

Sono trascorsi quindi circa 37 anni dalla prima descrizione della coltura di cheratinociti umani e circa 30 anni dal primo analogo dermale e nel frattempo sono stati scoperti numerosi mediatori di infiammazione che modulano la guarigione della ferita. Queste scoperte hanno alimentato lo sviluppo dei biomateriali per una varietà di applicazioni.

Il tessuto ingegnerizzato richiede usualmente una matrice extra-cellulare (ECM) artificiale per lasciar spazio all'infiltrazione di cellule circostanti. Per la generazione di una ECM artificiale sono trattate contemporaneamente sia sostanze naturali che sintetiche. Esempi di materiali naturali sono polipeptidi, idrossiapatite, acido ialuronico, glicosaminoglicani (GAGs), fibronectina, collagene, chitosano e alginati. Per la loro abbondante presenza nella pelle e per il loro riconoscimento da parte dei recettori cellulari di superficie, questi materiali naturali mostrano bassa tossicità e minima risposta infiammatoria. Comunque, conoscendo la loro origine xenogenica, contengono un rischio intrinseco per la trasmissione di virus animali [5]. Esempi di materiali sintetici completamente biodegradabili comprendono l'adico poliglicolico, polilattico, polilattico-co-glicolico, policaprolattone (PCL), mentre il poliuretano (PUR) rappresenta una sostanza non degradabile frequentemente utilizzata.

Un grave inconveniente dei materiali sintetici è la mancanza di riconoscimento dei segnali cellulari. Un approccio che consente il ripopolamento e la rigenerazione di una nuova matrice naturale consisteva nell'incorporazione nelle biomatrici di peptidi di adesione ad es. utilizzando sequenze RGD (Arg-Gly-Asp). Una matrice

“intelligente” è fornita di biomateriali o “impalcature” strutturali (scaffolds) in grado di dirigere la differenziazione cellulare e il metabolismo, accelerando quindi la rigenerazione dei tessuti. Per esempio questo può essere realizzato attraverso l'integrazione nello scaffold di idrogel glico-polietilenico (PEG). Il PEG funge da piattaforma strutturale inerte grazie alla sua idrofilicità e resistenza all'assorbimento proteico. Il gel può essere modificato con l'aggiunta di punti di ancoraggio cellulare come peptidi RGD-contenenti o domini di rete funzionale collegati a una struttura di acido ialuronico. Inoltre, il grado di degradabilità da proteasi può essere influenzato dal collegamento di oligopeptidi proteasi-sensibili.

La proliferazione e la differenziazione nella zona ferita sono funzioni cellulari fondamentali controllate e promosse grazie ai fattori di crescita. Gli sforzi dell'ingegneria tissutale si sono concentrati sulla costituzione di scaffolds arricchiti con fattori di crescita, come il fattore di crescita dei fibroblasti, fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF), fattore di crescita insulino-simile (IGF) e fattore di crescita piastrino-derivato (PDGF). In questo modo viene aumentata la bioattività di un polimero di struttura e il processo di guarigione è notevolmente accelerato [6, 7]. Quindi la sfida consiste nell'identificazione dei fattori e citochine necessarie secondo la condizione della ferita.

3.1. Classificazioni

Vi sono attualmente sul mercato molti tessuti cellulari ingegnerizzati sostituti della pelle che possono essere classificati e distinti in base alle loro origini: xenogenico (da altre specie), allogenico (da un individuo geneticamente non identico ma della stessa specie), autologo (dal paziente stesso), e innesti singenici (da un individuo geneticamente identico come nel caso di gemelli monozigoti). Trapianti di pelle xenogenica portano il rischio intrinseco del trasferimento di malattie da prioni o retrovirus suini (nel caso di trapianti con cellule suino-derivati). E' assolutamente necessario in quest'ultimo caso che la proteina di membrana (alfa-GAL) venga rimossa dalla pelle finale prodotta. I trapianti allogenici offrono la possibilità di costrutti di grandi dimensioni e di crio-conservazione, per lo più con risultati comparabili rispetto alla vitalità o efficacia degli allotrapianti. Inoltre, essi consentono

ripetute applicazioni. Tuttavia, i cheratinociti in questi trapianti vengono sostituiti in poche settimane dalle cellule che vanno a ripopolare il trapianto allogenico per ricostituire il derma e talvolta non riescono a produrre un risultato soddisfacente in ferite con perdite di sostanza a tutto spessore (full-thickness).

I sostituti cutanei prodotti possono ulteriormente essere distinti in base alle diverse componenti dermiche che vanno a sostituire, vi sono [8]:

- (1) equivalenti epidermici
- (2) equivalenti cutanei
- (3) sostituti compositi

3.1.1. Equivalenti epidermici

Gli innesti epidermici sono costituiti da cheratinociti che vengono differenziati in vitro costruendo uno strato epidermico stratificato. Possono essere combinati con altri substrati biocompatibili come: collagene bovino o acido ialuronico, materiali umani naturali acellulari o materiali suini, reti di nylon o di poliglactina. Il primo autotrapianto epidermico coltivato commercializzato fu Epicel®. Un altro prodotto epidermico è rappresentato da EpiDex® che è prodotto da cellule autologhe della radice della guaina esterna (ORS) dei follicoli dei capelli per il trattamento delle ulcere venose croniche. Per migliorare la stabilità meccanica alcuni sostituti cutanei epidermici sono combinati con un polimero di superficie di cloruro di polivinile polimerizzato al plasma, come Altrika®, o con una membrana di acido ialuronico forata, come Laserskin®. Un'altra strategia di gestione viene adottata da BioSeed-S®, dove cheratinociti autologhi sono propagati in vitro e poi sospesi in un gel fibrino simile adesivo.

Il risultato clinico dei trapianti epidermici non è sempre soddisfacente, il che può essere parzialmente spiegato dall'assenza di un componente dermale e di un adeguato supporto di cheratinociti indifferenziati.

3.1.2. Equivalenti cutanei

Lo sviluppo di sostituti cutanei nell'ingegneria dei tessuti si è evoluto da semplici colture di fogli autologhi epidermici a costrutti cutanei più complessi a doppio strato.

La componente cellulare dermica è composta da fibroblasti autologhi cutanei o da fibroblasti allogenici del prepuzio neonatale, in quanto sono più sensibili ai mitogeni rispetto alle cellule adulte. Lo scaffold per le cellule è costituito principalmente da materiali biocompatibili e biodegradabili, come derivati dell'acido ialuronico esterificato con acido benzilico come Hyaff-11®, oppure acido poliglicolico o poliglactina come Dermagraft®. Quest'ultimo rappresenta uno dei prodotti bioingegnerizzati di più successo: è una coltura di fibroblasti dermali allogenici di derivazione umano-neonatale, coltivati su un'impalcatura biodegradabile; è in grado di produrre fattori di crescita diversi, per stimolare l'angiogenesi, l'espansione di tessuti e la riepitelizzazione dal bordo della ferita, anche dopo la crioconservazione e lo scongelamento. Questo sembra essere particolarmente vantaggioso nelle ulcere del piede di pazienti diabetici come mostrano diversi studi. Inoltre Dermagraft® si è rivelato anche il più sicuro ed efficace nel trapianto per ustioni.

3.1.3. Compositi Sostitutivi

Compositi equivalenti di pelle sono costituiti dalle cellule epidermiche che crescono su fibroblasti contenenti sostituti dermici. Loro hanno manifestato di riuscire a fornire benefici nei casi di ulcere croniche, perché il componente dermale aggiuntivo riduce la contrazione della ferita, offre una migliore stabilità meccanica e riduce il tempo necessario per l'auto-assemblaggio del tessuto di granulazione dello stesso ospite. D'altra parte, sostituti dermici a base di collagene promuovono la differenziazione terminale e l'apoptosi dei fibroblasti come anche dei cheratinociti [5], e l'alta densità dei vettori di fibrina ha effetti antimigratori e ne compromettere la sopravvivenza. Esempi di compositi sostitutivi sono PermaDerm®, OrCel® e Apligraf®. Quest'ultimo è un prodotto di trapianto allogenico dermo-epidermico, costituito da cheratinociti coltivati e uno strato dermico di fibroblasti su un collagene di tipo I-matrix. Poiché non contiene cellule presentanti l'antigene è ideato per essere immunologicamente inerte. È stato approvato per il trattamento delle ulcere venose e diabetiche.

Gli svantaggi principali di sostituti dermo-epidermici sono la difficoltà tecnica di produzione, la richiesta di molto tempo tra le due fasi di produzione e la tempestività clinica di utilizzo. Ciò porta al fallimento a causa di un ritardo di vascolarizzazione del letto della ferita o a causa dei loro componenti di origine xenogenica.

3.2. Veicolazione alla rigenerazione della Matrice Extra-Cellulare come meccanismo per la guarigione di ferite in assenza di cicatrici

Uno dei fattori chiave per ricostituire la matrice di supporto presso le sedi di formazione di cicatrici è la deposizione di collagene da parte dei fibroblasti ed è la natura di questa deposizione che in gran parte determina la qualità della cicatrice [9]. Dal momento che il collagene forma il più grande singolo componente della Matrice Extra-Cellulare (ECM), è comprensibile che questo è stato il focus per i primi ricercatori. Il primo collagene stabile è stato sviluppato da Bell nel 1980 [10]. Essendovi una tale abbondanza in natura di questo materiale, il metodo più semplice di produzione di collagene è l'estrazione dai tessuti animali, soprattutto bovini. E' però importante rilevare che la composizione chimica del collagene è *specie-specifico*, cioè il collagene umano è biologicamente diverso da quello bovino e suino: per l' iniezione, possono essere richiesti i test allergologici, che spiegano il recente declino come filler iniettabile.

L'acido ialuronico rappresenta una parte più piccola della ECM, ma ha il vantaggio significativo di conservazione strutturale, indipendentemente dalla fonte, ed è quindi non allergenico. La catena lunga dell'HA sembra stimolare la proliferazione dei fibroblasti anche se impedisce adesioni nelle regioni periferiche dei nervi, e diminuisce la produzione totale di collagene cicatriziale da parte dei fibroblasti dermali in età adulta, ma non fetale. Paradossalmente, la ialuronidasi provoca un aumento di cicatrici, mentre un aumento persistente dei livelli di HA riduce la contrazione dei fibroblasti. Inoltre, la proliferazione dei fibroblasti, stimolata dall'HA, può essere influenzata da una serie di fattori di crescita e i prodotti degradati dell'HA sono pro-angiogenici; questo effetto è però limitato a frammenti tra i 4 e i 25 disaccaridi di lunghezza. Inoltre livelli elevati di HA trovati nelle ferite in età adulta cadono dopo la fase proliferativa iniziale, ma rimangono elevati nelle ferite del feto nel corso della maturazione; l'HA non sembra essere degradato nell'ambiente fetale probabilmente a causa degli effetti reologici. Allo stesso tempo, ferite fetali precoci dimostrano meno CD-44 e meno espressione del recettore di motilità per acido-mediato ialuronico (RHAMM) che nelle ferite in età adulta.

In sintesi, sembra che i livelli persistentemente elevati di HA macromolecolari

possono limitare la fibrosi nelle ferite fetali, mentre nella ferita fenotipica adulta l'aumento di prodotti di degradazione è associato alla formazione della cicatrice dermica [9].

Si analizza adesso nel dettaglio la produzione di scaffold di acido ialuronico per la coltura cellulare, come quest'ultima viene effettuata a partire da cellule autologhe e si mette in evidenza un modello matematico di guarigione delle ferite per spiegare le interazioni che vi possono essere tra l'attività cellulare fisiologica e il biomateriale, nel caso specifico acido ialuronico, per migliorare la guarigione della ferita.

4. Scaffold

La proliferazione e differenziazione delle cellule sono criticamente dipendenti dall'adesione cellula-matrice. E' ampiamente accettato che l'adesione e la maggior parte delle attività cellulari, tra cui la diffusione, migrazione, la proliferazione, espressione genica, visualizzazione dell'antigene di superficie e funzione citoscheletrale, sono sensibili alla topografia e alla composizione molecolare della matrice e alle proprietà meccaniche del substrato. Gli studi sono quindi mirati a ottimizzare le prestazioni delle cellule in coltura, progettando nanostrutture sintetiche con topografia simile all'ambiente fisiologico.

4.1. Requisiti e tecniche di generazione di uno scaffold

Numerose strategie usate nell'ingegneria tissutale dipendono dall'impiego di uno scaffold. Infatti grazie alle tecniche di coltura cellulare sono necessarie poche cellule provenienti da un donatore per creare gli impianti. Le cellule isolate non possono creare tessuti, in quanto richiedono degli ambienti specifici per la corretta crescita: per questo motivo è necessaria la presenza di materiali specifici di supporto che svolgono il ruolo di "impalcature" per permettere la crescita dei tessuti, tali supporti prendono appunto il nome di scaffold.

La ECM nativa è una struttura porosa e nano-fibrosa, e gli scaffold ingegnerizzati fungono da matrice extracellulare sintetica, organizzando le cellule in un'architettura tridimensionale e rilasciando sostanze stimolanti, che dirigono la crescita e la formazione del tessuto desiderato; hanno dunque un'importanza cruciale per la corretta creazione degli impianti.

Nella progettazione degli scaffold per l'ingegneria tissutale bisogna tener conto di diversi requisiti: deve possedere le proprietà meccaniche appropriate, in modo da fornire le giuste sollecitazioni meccaniche al tessuto in formazione, devono essere in grado di riprodurre la stessa porosità e permeabilità del tessuto che si vuole sostituire per permettere il rilascio delle sostanze nutritive e di altri composti in grado di fornire opportuni stimoli alle cellule, e per permettere una corretta adesione

cellulare.

Uno dei fattori più importanti nella formazione degli scaffold è il materiale utilizzato per produrli; in base al tipo di tessuto da ricreare e alle sue applicazioni specifiche, si dovranno utilizzare materiali differenti. La caratteristica principale dei materiali da utilizzare sono la biocompatibilità, in modo da non provocare una risposta indesiderata dell'organismo all'impianto, e la biodegradabilità, in modo da essere riassorbiti simultaneamente alla crescita cellulare per essere quindi gradualmente sostituiti dai nuovi tessuti, in un tempo di degradazione ragionevole, senza rilasciare prodotti tossici per l'organismo.

4.1.1. Aspetti Strutturali

Dal punto di vista dell'ingegneria dei materiali, i tessuti sono considerati come dei sistemi multifase o compositi cellulari. Questi compositi possono essere considerati come costituiti in tre strutture principali:

- le cellule che sono organizzate in vere e proprie unità funzionali
- la matrice extra-cellulare
- la struttura dello scaffold

Per ciò che concerne quest'ultima è ormai consolidato il fatto che essa contribuisca significativamente allo sviluppo di specifiche funzioni biologiche nei tessuti, in quanto fornisce le giuste condizioni nutrizionali e le appropriate organizzazioni spaziali per la crescita cellulare. E' stato dimostrato che la rigenerazione di specifici tessuti aiutata da materiali sintetici è dipendente dalla porosità della struttura tridimensionale di supporto, cercando un giusto compromesso tra la grandezza dei pori e la dimensione delle cellule del tessuto in esame. Un'area ampia favorisce l'adesione cellulare e la crescita, di conseguenza è necessario un ampio volume dei pori per contenere e trasportare una massa cellulare sufficiente a consentire la riparazione tissutale. Materiali altamente porosi sono preferibili per la facile diffusione di nutrienti verso le cellule e l'altrettanto facile diffusione delle sostanze di scarto dall'impianto. Il rapporto area/volume dei materiali porosi dipende dalla densità e dal diametro medio dei pori. Inoltre il diametro delle cellule in sospensione impone la grandezza minima dei pori, che varia in base al tipo di cellula. Un'altra considerazione fondamentale deve essere fatta sulla continuità dei pori all'interno della matrice sintetica. Il trasporto dei materiali e la migrazione cellulare saranno infatti inibiti se i pori non sono

interconnessi, anche se la porosità della matrice è alta. Il trasporto di massa è una delle sfide più significative nell'ingegneria tissutale. Il trapianto su larga scala è al momento inibito da inadeguatezza del trasporto di nutrienti. Accade infatti che le cellule poste ad una distanza eccessiva dal flusso sanguigno sono metabolicamente inattive a causa della bassa tensione di ossigeno.

Un' ulteriore questione è la variazione della struttura dei pori nel corso del tempo in vivo. Se le matrici sono biodegradabili, come nel caso di PLA e PGA, la grandezza media dei pori aumenterà e si creeranno degli ostacoli all'interno della struttura. Se la matrice non si degrada, si ridurrà l'effettiva ampiezza dei pori a causa di fenomeni che possono realizzarsi in vivo come l'occupazione dei pori da parte di tessuti fibrosi. Oltre alla grandezza dei pori e la porosità anche la forma può interferire con la crescita interna dei tessuti. La forte adesione e diffusione cellulare favoriscono la proliferazione mentre per alcune specifiche funzioni cellulari è richiesta una morfologia arrotondata. Così uno scaffold polimerico deve agire come un substrato adatto a mantenere funzioni differenziate senza impedire la proliferazione.

4.1.2. Proprietà Meccaniche

Lo scaffold deve avere la resistenza meccanica necessaria per mantenere la sua struttura anche dopo l'impianto, in particolare nel caso di ricostruzioni di tessuti che supportano un carico, come ossa e cartilagine. La biostabilità di molti impianti dipende da fattori come resistenza, elasticità, assorbimento all'interfaccia dei materiali e degradazione chimica. Un'altra caratteristica richiesta è la lavorabilità dei biomateriali specie quando la forma dell'organo riparato o del tessuto rigenerato ha un'influenza critica sulla sua attività. Lo scaffold deve quindi poter essere trattato in modo da acquistare una varietà di configurazioni.

Sembra opportuno affrontare una serie di problemi sulle proprietà meccaniche prima di un approccio oggettivo e coerente sia per la progettazione che per il collaudo dei sostituti cutanei che possono essere considerati [11] nel dettaglio:

I come le proprietà dei sostituti cutanei imitano quelle della pelle naturale, al momento dell'applicazione clinica?

II dopo un periodo di crescita cellulare e di rimodellamento, sarebbero

probabilmente più appropriate proprietà meccaniche più vicine a quelle della pelle naturale? Se è così, devono essere identificate quelle variabili che influenzano i cambiamenti delle proprietà meccaniche durante l'invasione cellulare e il rimodellamento.

III Devono essere identificate quelle proprietà meccaniche della pella sostituita come l'elasticità, la fragilità, la rigidezza, la viscosità, la viscoelasticità.

IV Più pragmaticamente, quali modalità di misurazione dovrebbero essere impiegate per queste proprietà? La semplice estensione o compressione per ottenere un modulo di Young in corpo privo di movimento è abbastanza esaustivo, o si deve ricorrere a metodi reologici quali cono-piastra o piastra-piastra oscillante?

V Se si vogliono confrontare le proprietà meccaniche dei sostituti cutanei con quelle della pelle nativa, come dovrebbe essere misurata la seconda? Si dovrebbero usare i valori prodotti in vivo o ex vivo, misurare i campioni della pelle a tutto spessore o metà, e se viene effettuata una misurazione in vivo, come si fa a sapere quanto tessuto sottostante contribuisce ai valori ottenuti?

VI Dati ottenuti da test in vivo su un sito della pelle, quanto sono rappresentativi in altre parti del corpo.

Nel seguito si cerca di dare una risposta a questi quesiti che nell'applicazione diventano esigenze.

4.1.2.1. Considerazioni preliminari di Biomeccanica

La pelle mostra proprietà viscoelastiche (VE): il comportamento viscoelastico implica che l'energia utilizzata per deformare un materiale è in parte conservata (elasticità) e in parte dissipata (viscosità). Nella pelle, i componenti che esprimono un comportamento meccanico elastico appartengono principalmente alle proteine come il collagene e l'elastina, mentre i componenti viscosi appartenerebbero all'acqua e alle macromolecole altamente idratate come GAGs. Tali materiali in genere mostrano un

comportamento dipendente dal tempo, e quindi dovrebbero essere testati in modo dinamico. La modellazione di tale materiale è tradizionalmente fatta da una combinazione di molle e ammortizzatori, con le molle che modellano componenti elastici e gli ammortizzatori che modellano componenti viscosi (tempo-dipendenti). Così, per esempio, una molla e un ammortizzatore in serie (elemento di Maxwell) sarà il modello di un materiale viscoelastico che mostra un set permanente, mentre una molla e un ammortizzatore in parallelo (elemento di Voight) mostrano un comportamento "di scorrimento". Una combinazione di elementi di Maxwell e di Voight, (Modello Standard Linear Solid, SLSM), è di solito considerata come migliore descrizione del comportamento dei sostituti cutanei e della pelle (Fig. 3a).

In letteratura ci sono molti rapporti di analisi statica sui sostituti cutanei e sulla pelle, dove però viene applicato uno stress ad un campione e misurata la tensione risultante, ottenendo così il modulo di Young. Tuttavia, il SLSM suggerisce che il risultato può variare, a seconda della velocità con cui viene applicata la sollecitazione. Questo è il motivo per cui il test dovrebbe essere fatto in modo dinamico, per non trascurare l'aspetto tempo-dipendente. Sono stati impiegati due principali approcci. In primo luogo, viene applicato al campione uno stress istantaneo, e successivamente si registra nel corso del tempo la tensione. Questo può essere poi anche esteso eliminando lo stress istantaneo e registrando solo il rilassamento nel corso del tempo. Questo dà una cosiddetta curva di deformazione (Fig. 3b) o equivalente a seconda della geometria del sistema di test utilizzato. In secondo luogo, il materiale può essere sottoposto ad una sollecitazione sinusoidale oscillante di piccola ampiezza, e la tensione risultante può essere misurata sia attraverso l'ampiezza che attraverso il ritardo di fase della tensione di uscita rispetto alla tensione di ingresso. Un materiale perfettamente elastico dovrebbe mostrare un ritardo di fase di 0° , un materiale perfettamente viscoso mostrerà un ritardo di fase a 90° , e un materiale VE una via di mezzo (Fig. 3c). I moduli caratteristici derivati da questo tipo di test sono il modulo di *storage* (una misura di elasticità dinamica) G' , e il modulo di perdita (una misura della viscosità dinamica) G'' . Entrambi questi approcci sono fondamentali per studiare correttamente sia la pelle e che i sostituti cutanei.

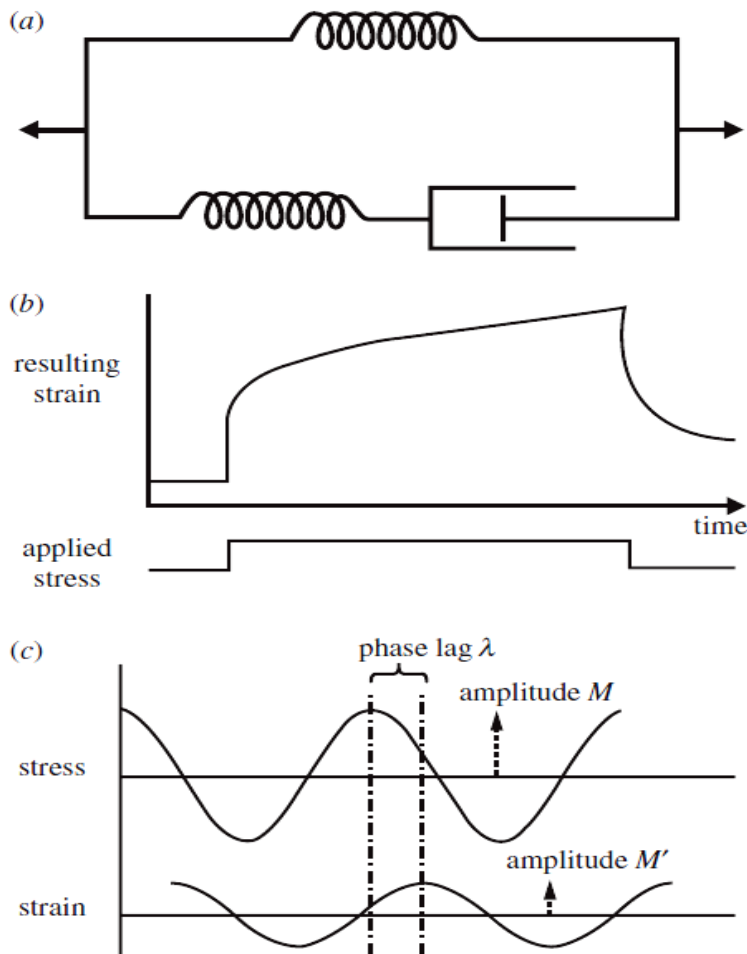


Fig. 3 Proprietà Biomeccaniche usate per caratterizzare le proprietà biomeccaniche della pelle, (a) The Linear Standard Solid Model, (b) tipica curva di creep, (c) la base dei tests oscillatori, dove G' e G'' si possono ottenere da M/M' , rapporto d'ampiezza, e λ è lo sfasamento.

4.1.2.2. Proprietà delle pelle umana

Bisogna sottolineare la fondamentale distinzione tra le misurazioni effettuate in vivo, che possono essere confuse dai contributi dei tessuti più profondi, e quelle effettuate in vitro, in cui i tests possono essere effettuati solo un numero limitato di volte per ogni campione. Inoltre si deve tenere presente che la pelle è anisotropa, in particolare intorno alle articolazioni, e quindi misurazioni lungo un asse potrebbero essere molto diverse da quelle fatte lungo un asse ortogonale; non solo questa anisotropia è una proprietà dominante, ma varia da persona a persona. Già nel 1970 si è osservata l'importanza della biomeccanica della pelle in chirurgia plastica, affermando che le tensioni nella pelle devono essere ben allineate per garantire che le successive cicatrici siano limitate e poco visibili.

Il principio delle viscoelasticità della pelle, già accennato sopra, diviene

fondamentale, in quanto le misurazioni delle proprietà meccaniche della pelle devono tener conto del fattore tempo, e se si cerca una semplice curva sforzo-deformazione, o un ciclo di isteresi, ciò deve essere fatto molto lentamente in modo che gli elementi dipendenti dal tempo abbiano il tempo di rilassarsi durante lo stiramento, la compressione o il taglio. Forse, è ancora più importante dire che la misurazione della tensione di rottura, può anche essere tempo-dipendente; studi più approfonditi e fatti tenendo presente le proprietà fin ora descritte per ottenere valori della resistenza alla trazione della pelle, misurata con un carico uniassiale in vitro, hanno una media di 21 N/mm² in un bambino, contraddicendo i valori precedenti che avevano una media di 17 N/mm² in una persona anziana. Il modulo di elasticità di rottura ha una media di 70 N/mm² in un bambino, in calo di 60 N/mm² negli anziani. Inoltre, la media della deformazione a rottura è indicata come il 75% al momento della nascita in calo al 60% negli anziani.

Di recente, sono stati fatti notevoli progressi nella modellazione delle proprietà viscoelastiche della pelle, per esempio è stato sviluppato un modello con solo quattro parametri da Khatyr et al. che descrive bene il comportamento della pelle, e sono stati identificati da Kvistedal & Nielsen i parametri dei materiali più importanti che dovrebbero essere considerati nella modellazione della pelle. Di particolare interesse sono i risultati di Holt et al. se si considera l'interfaccia dei biomateriali con la pelle nativa. Hanno scoperto che l'epidermide contribuisce alla rigidità ed elasticità, mentre il derma è molto più viscoelastico, suggerendo quindi che la pelle è meccanicamente un sistema a due fasi. Questa scoperta ha posto seri problemi e quindi nuovi traguardi da raggiungere per la progettazione di sostituti cutanei che si interfacciano ad un letto di ferita.

4.1.2.3. Proprietà Biomeccaniche dei sostituti cutanei

Le indagini sulle caratteristiche biomeccaniche dei sostituti cutanei si sono occupate principalmente di chiarire sia le proprietà della matrice bioingegnerizzata prodotta, che di tentare di seguire i cambiamenti delle proprietà nella matrice non appena questa viene popolata con le cellule e inizia successivamente a degradarsi.

Per ciò che concerne il primo aspetto, un interessante approccio nella modellazione di una matrice è dato da una descrizione dei solidi cellulari, trattando la matrice come una schiuma, costituita da una rete interconnessa di montanti. Tale modellazione è

utile quando la crescita interna delle cellule nel materiale avviene da parte di cellule come i fibroblasti. Inoltre, questo modello ha suggerito che le proprietà meccaniche della matrice sono indipendenti dalla dimensione dei pori, ma che una reticolazione covalente di post-produzione aumenta notevolmente la rigidità.

Nel tentativo di migliorare le proprietà meccaniche dei sostituti cutanei a livello di carico, diversi studiosi hanno tentato di introdurre polimeri sintetici in matrici polimeriche naturali come il collagene. È interessante notare uno studio in cui si è aggiunta quantità crescente di policaprolattone (PCL) ad uno scaffold elettrofilato di collagene, per dimostrare che aumentando i rapporti di PCL, aumenta la rigidità del materiale, rendendolo più facile da gestire per il chirurgo. Tuttavia, dopo la crescita dei cheratinociti e dei fibroblasti umani negli scaffolds, le proprietà meccaniche non erano significativamente differenti, o erano addirittura peggiori di quelle del collagene. Questo suggerisce che è fondamentale, nella progettazione di cute ingegnerizzata, l'indagine delle proprietà meccaniche di matrici di tessuto ingegnerizzato, sia prima che durante l'introduzione di componenti cellulari.

Entrando nel merito del secondo aspetto, la stima delle variazioni delle proprietà meccaniche dei sostituti cutanei dopo la popolazione cellulare è stata oggetto di una serie di recenti studi. Per esempio, Saddiq et al. hanno misurato la resistenza ultima a trazione e la rigidità di quattro matrici di gel di collagene prima e dopo la crescita di fibroblasti di topo 3T3 e fibroblasti primari umani nella matrice. Le matrici utilizzate sono state collagene, collagene-GAG, collagene reticolato con carbodiimmide e putrescina, e collagene-GAG reticolato con carbodiimmide e putrescina. Mentre l'aggiunta di GAG e cross-linkers aumentato sia la resistenza ultima a trazione che la rigidità iniziale, dopo 6 giorni di crescita dei fibroblasti (di entrambi i tipi) nelle matrici, questi valori sono crollati. Forse, ancora più sorprendentemente, i valori dove questi parametri cadono appaiono indipendenti dal trattamento del gel originale, senza offrire alcuna protezione dalla degradazione della matrice.

4.1.3. Processi di fabbricazione degli Scaffolds

Gli Scaffold porosi possono essere costruiti utilizzando una varietà di metodi, includendo preparazioni intrecciate e non intrecciate partendo da fibre arrotolate, particelle polimeriche sinterizzate. I polimeri usati nelle applicazioni di ingegneria

tissutale, come in molte applicazioni industriali sono spesso distribuiti in forma di pellet solidi. Questa forma nella maggior parte dei casi non è adatta agli utilizzi dell'ingegneria tissutale. La scelta della tecnica corretta da utilizzare per la creazione di scaffold è molto importante: la fabbricazione può alterare significativamente le proprietà dell'impianto e le sue caratteristiche di degradazione.

Tra i diversi metodi di produzione degli scaffold, quali Separazione di Fase, Solvent Casting and Particulate Leaching, Membrane Lamination, Melt Molding e Processi ad Alta Pressione sembra opportuno analizzare con maggior dettaglio, in quanto è più funzionale per i casi che sono stati posti in esame, il metodo dell'Elettrospinning, più efficace per la produzione di fibre ultra-sottili con diametri che vanno dal submicron a pochi nanometri.

4.2. Elettrospinning di una matrice nanofibrosa HA-Collagene

Le matrici fibrose elettrofilate presentano alcune caratteristiche speciali, come una zona ad alta superficie specifica, elevate porzioni, una zona ad alta porosità superficiale e la presenza sulle fibre di strutture porose molto piccole. Ancora più importante, la struttura topologica dei prodotti elettrofilati può mimare la ECM e migliorare sia la migrazione che la proliferazione cellulare. Pertanto, i materiali fibrosi elettrofilati sono particolarmente adatti per le applicazioni biomediche.

In numerosi studi di elettrofilatura del collagene è stato usato l'1,1,1,3,3,3-esafuoro-2-propanolo (HFIP) come solvente ma la solubilità dell'HA nel HFIP purtroppo è risultata molto bassa. Inoltre, è stato molto difficile eseguire l'elettrospinning di soluzioni acquose di HA. Si ritiene che l'alta viscosità e la tensione superficiale delle soluzioni acquose di HA siano i fattori chiave che ostacolano il processo di elettrofilatura. Quindi è di cruciale importanza trovare un sistema di solvente idoneo all'elettrospinning di nanofibre di HA.

Verrà riportato qui in seguito uno studio [12] sul metodo dell'elettrospinning per valutare la sua reale applicazione ed efficacia nell'ambito della costruzione di scaffold di HA. Il fine ultimo dello studio è di ottenere una soluzione omogenea con viscosità adatta per consentire la produzione di una matrice nanofibrosa elettrofilata. LA matrice HA-collagene nanofibrosa è stata successivamente analizzata mediante

microscopia a fluorescenza e microscopia elettronica a scansione (SEM).

Si analizzano ora nel dettaglio le fasi di preparazione e i riscontri ottenuti dalle diverse indagini sperimentali e test sulle variazioni delle concentrazioni dei materiali impiegati.

4.2.1. Materiali e metodi

4.2.1.1. Preparazione della matrice

Per assicurare l'evaporazione completa del solvente, i solventi impiegati sono stati una miscela di acido formico (FA) e HFIP. E' stata dissolta in questo solvente misto della polvere di collagene in concentrazione dell'8% (w/v). Sono state poi aggiunte al collagene nella soluzione mista FA-HFIP diverse concentrazioni di HA e sciolte utilizzando un agitatore fino a quando la soluzione è diventata chiara. Per il processo di elettrospinning la soluzione polimerica è stata collocata in una siringa graduata da 5 ml con un ago avente punta di diametro di 0.96 mm. La siringa è stata collegata a una pompa che ha fornito una portata stabile della soluzione di 2,54 ml/h . Per applicare una tensione di elettrospinning di 23 kV all'ago è stato utilizzato un alimentatore ad alta tensione; la punta-collettore è stata fissata a 10 cm di distanza. Per fungere da controllo, le nanofibre di collagene puro sono state inoltre realizzate (come descritto in precedenza) mediante elettrospinning con HFIP. Successivamente la matrice nanofibrosa elettrofilata è stata rivestita d'oro e visualizzata mediante SEM ad una tensione di accelerazione di 15 keV. La forma dei pori delle matrici elettrofilate era poligonale. Le dimensioni dei pori sono state determinate misurando le aree dei pori. Le medie e le deviazioni standard delle aree dei pori sono state calcolate da almeno tre micrografie SEM.

4.2.1.2. Coltura cellulare sulla matrice

Poiché la matrice nanofibrosa di HA-collagene elettrofilato si scioglie facilmente in un mezzo acquoso, è stato necessario reticolarla prima dell'incubazione cellulare.

Le matrici elettrofilate sono state collocate in 24 piatti di coltura tissutale contenenti fibroblasti umani del prepuzio in sospensione (2×10^5 cellule/ml) con Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) con l'aggiunta di siero fetale bovino al 10% in volume, 100 U ml^{-1} di penicillina e $100 \text{ } \mu\text{ml}^{-1}$ di streptomicina. I piatti sono stati incubati a 37° C in atmosfera umidificata al 5% di CO_2 e il terreno di coltura è stato

cambiato una volta ogni 3 giorni.

4.2.1.3. Test e analisi statistiche

Le colture delle matrici elettrofilate seminate con cellule sono state raccolte dopo 8 ore e nei giorni 2, 4 e 6. La vitalità cellulare è stata misurata utilizzando il test MTT. Nella seconda giornata della coltura le cellule sulle matrici sono state colorate con F-actina. Per ogni condizione sperimentale, sono state scelte a caso almeno 50 fibre/pori per misurare i diametri delle fibre e le dimensioni dei pori. Le analisi della vitalità cellulare e dell'espressione genica sono state eseguite in triplicato e per ogni esperimento i risultati sono stati espressi come: media \pm DS per $n=3$. L'analisi della vitalità cellulare e dell'espressione genica è stata effettuata mediante il test non-parametrico di Kruskal-Wallis. Qualora vi fosse stato un valore significativo per $P < 0,05$ allora sarebbero stati condotti i test individuali di Mann-Whitney per indagare le differenze tra i gruppi. Le differenze a $P < 0,05$ sono state considerate statisticamente significative.

4.2.2. Risultati

4.2.2.1. Caratterizzazione dei prodotti elettrofilati

Si è scoperto che una miscela di HFIP/FA (70/30 vol.%) è un solvente adatto in cui sciogliere l'HA-collagene, e che quindi nano fibre di HA-collagene potrebbero esser fabbricate con successo (Fig. 4). Indipendentemente da quali condizioni sono state applicate, il prodotto sintetico è stato una matrice tridimensionale di "tessuto non tessuto" nanofibrosa di HA-collagene con pori interconnessi e con nanofibre con un diametro medio di 200 nm (Tabella 2). Il diametro della fibra della matrice di solo collagene era di 94 ± 19 nm e i diametri delle fibre delle matrici erano di 201 ± 107 , 211 ± 78 , 212 ± 50 e 197 ± 68 nm per 0,5 HA-8Col, 1HA-8Col, 1.5HA-8Col e 2HA-8Col, rispettivamente. L'analisi statistica ha dimostrato che i diametri delle matrici di HA-collagene sono significativamente differenti rispetto alle matrici di solo collagene ($P < 0,05$). La media delle dimensioni dei pori è risultata $2,40 \pm 1,27 \mu\text{m}^2$ per la matrice di solo collagene, $14,33 \pm 11,90 \mu\text{m}^2$ per 0,5 HA-8Col, $13,35 \pm 12,59 \mu\text{m}^2$ per 1HA-8Col, $19,72 \pm 11,45 \mu\text{m}^2$ per 1.5HA-8Col e $8,58 \pm 7,13 \mu\text{m}^2$ per 2HA-8Col. L'analisi statistica ha quindi dimostrato che le dimensioni dei pori delle matrici di HA-collagene erano significativamente differenti rispetto a una matrice di solo collagene.

E' importante notare che nonostante l'HA può essere sciolto con successo in una miscela di HFIP/FA, una soluzione pura di HA non è in grado di generare una matrice nanofibrosa attraverso elettrofilatura, ma si formano solo sfere sul collettore della siringa (Fig. 4a).

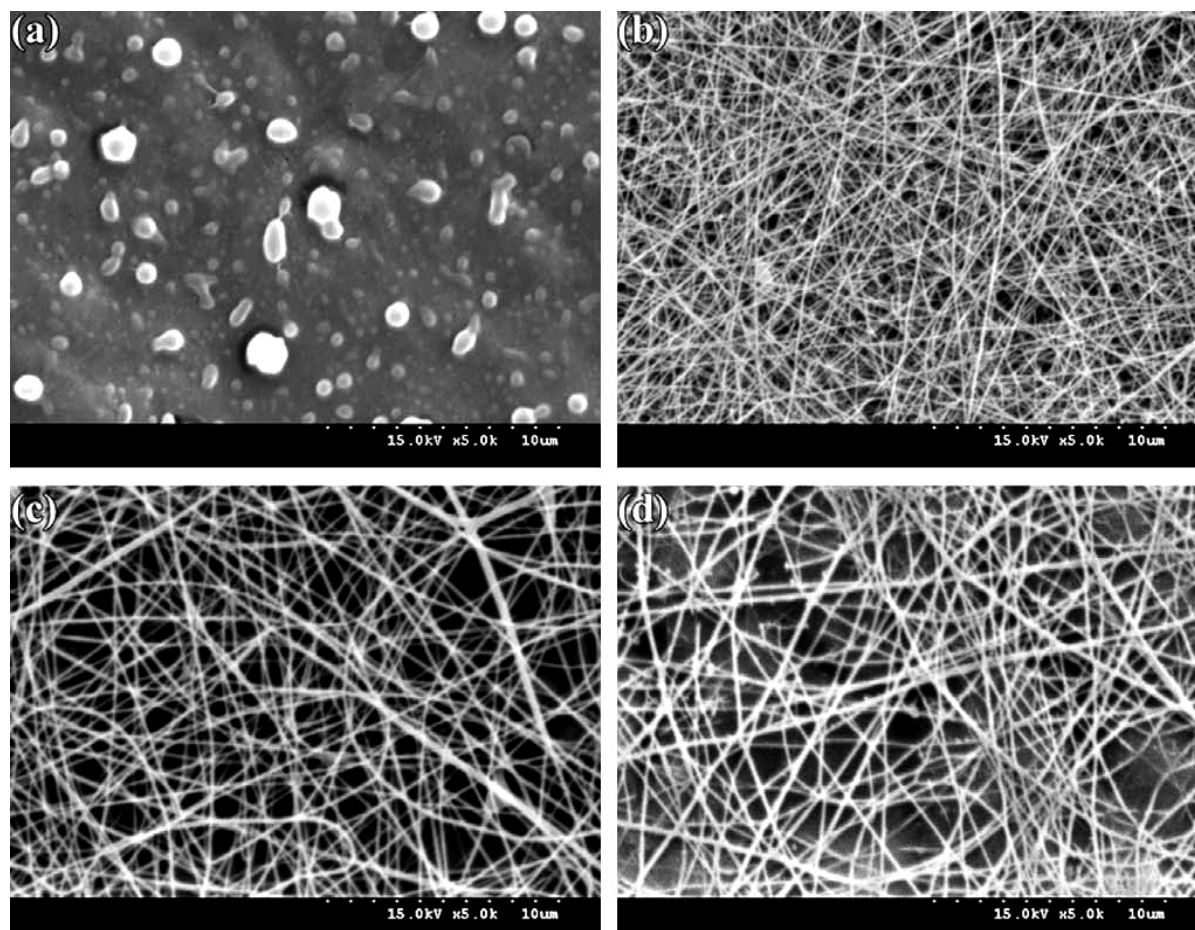


Fig. 4 Immagine SEM di (a) HA, (b) collagene, (c) 1HA-8Col e (d) 2HA-8Col ad un ingrandimento di 5000x.

Notation	Collagen concentration (g ml ⁻¹)	Hyaluronate concentration (g ml ⁻¹)	Average diameter ±SD (nm) (quartile 1, quartile 3)	Average pore area ±SD (μm ²) (quartile 1, quartile 3)
Collagen	8	0	94.1 ± 19.4 (78.3, 111.3)	2.40 ± 1.27 (1.65, 2.37)
0.5HA-8Col	8	0.5	201.3 ± 107.4 (101.3, 249.7)	14.33 ± 11.90 (4.46, 20.28)
1HA-8Col	8	1	211.0 ± 78.1 (151.6, 257.4)	13.35 ± 12.59 (5.98, 23.71)
1.5HA-8Col	8	1.5	212.6 ± 49.9 (174.8, 233.9)	19.72 ± 11.45 (12.93, 27.58)
2HA-8Col	8	2	197.1 ± 67.6 (147.7, 238.5)	8.58 ± 7.13 (4.16, 10.93)

Tabella 2 Notazione simbolica, media dei diametri e area dei pori delle nanofibre di HA-collagene. Al fine di verificare che le nanofibre sono costituite realmente da collagene e HA,

collagene coniugato con FITC e HA coniugato con rodamina, sono state osservate al microscopio a fluorescenza (Fig. 5). La figura 5 mostra con evidenza che l'HA potrebbe essere co-elettrofilato con il collagene per formare una matrice complessa nanofibrosa.

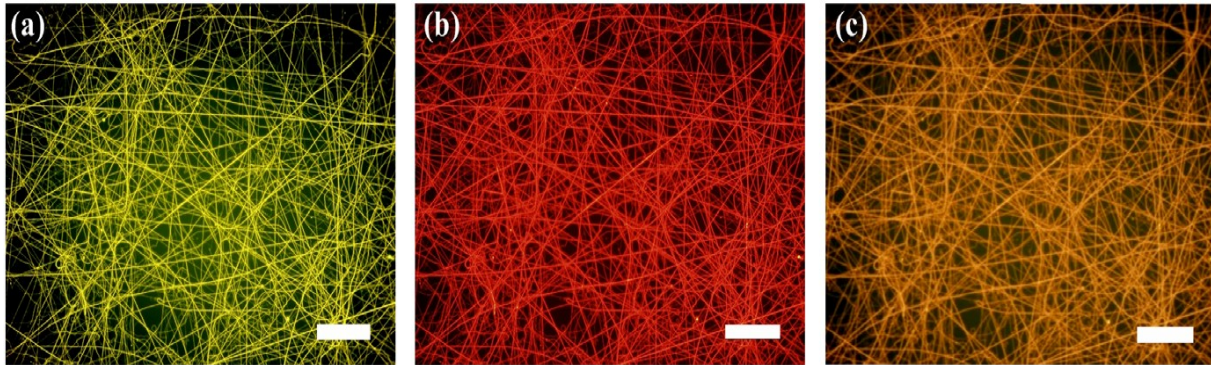


Fig. 5 Microscopio a fluorescenza di collagene coniugato con FITC e rodamina coniugata con HA in nanofibre di 1HA.8Col. (a) FITC, (b)rodamina, (c) FITC e rodamina sovrapposte. Scale bar 2mm.

4.2.2.2. *Caratterizzazione dei prodotti elettrofilati*

Per verificare gli effetti sulla morfologia delle cellule dovuti alla variazione del rapporto peso HA/collagene della matrice nanofibrosa sono state incubate le cellule di fibroblasti del prepuzio in matrici con diversi rapporti di peso di HA e collagene. Le morfologie complessive delle cellule di fibroblasti del prepuzio che hanno aderito alle diverse matrici sono state esaminate utilizzando sia la microscopia di fase che attraverso colorazione del citoscheletro di actina con FITC-falloidina e visualizzazione al microscopio a fluorescenza (Fig. 6 e Fig. 7). Dopo 8 h dalla semina solo alcune cellule in più sono state viste aderire alla matrice nanofibrosa contenente HA piuttosto che alla pura matrice di solo collagene (Fig. 6a-e). La normale diffusione cellulare è avvenuta il giorno 2 sulla matrice 0,5HA-8Col, ma non su 1HA-8Col e 1.5HA-8Col (Fig. 6 f-j). Come mostra la Fig. 6, il giorno 2 le cellule mostravano una morfologia a forma di fuso, anche se alcune cellule hanno iniziato a sviluppare estensioni bipolare sulla matrice 1.5HA-8Col (Fig. 7e), e hanno mostrato una buona diffusione e sviluppata morfologia bipolare sulla matrice di solo collagene e sulle matrici 0,5 HA-8Col e 1HA-8Col (Fig. 7c e d). Il giorno 6 le cellule erano cresciute fino a confluenza e avevano sviluppato una morfologia bipolare su tutte le matrici. La vitalità delle cellule sulle varie matrici è stata quantificata nei giorni 2, 4 e 6 usando saggi MTT (Fig. 8). Non ci sono state differenze significative nella vitalità

cellulare tra i diversi tipi di matrici nei giorni 2, 4 e 6.

Per analizzare i livelli di espressione dei geni MMP1, TIMP1, CD44 e β -actina è stato utilizzato l'RT-PCR (Fig. 9). Fibroblasti in coltura su matrici 0,5HA-8Col e 1HA-8Col hanno mostrato un'espressione significativamente più alta del gene MMP1 rispetto a quelli cresciuti sia sul collagene che su matrice 1,5HA-8Col. Inoltre, il giorno 7 c'era un'espressione significativamente più bassa di entrambi i TIMP1 e CD44 nelle cellule di fibroblasti che hanno aderito alla matrice 1.5HA-8Col rispetto a quelli che hanno aderito alle altre matrici nanofibrose HA-collagene.

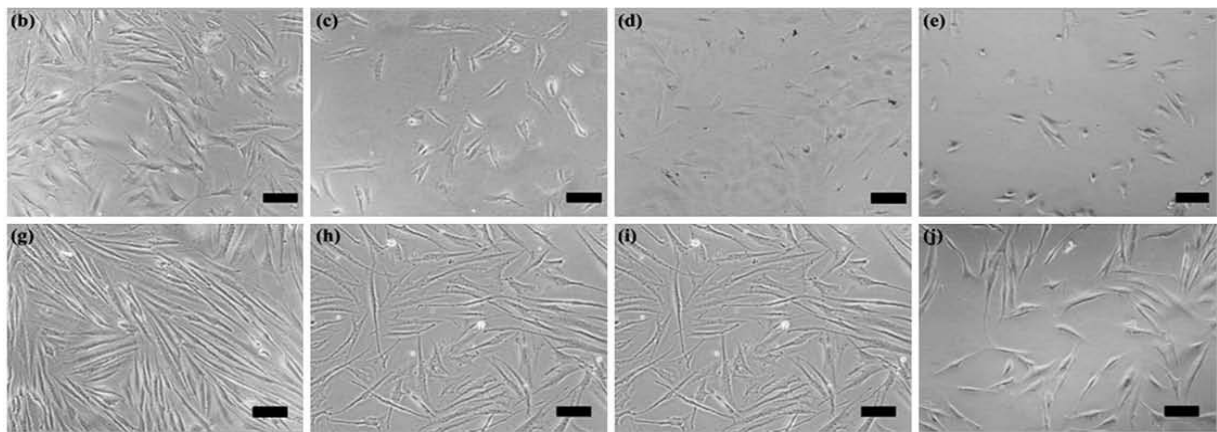


Fig. 6 Morfologia delle cellule di fibroblasti in coltura su (b, g) nanofibre di collagene, (c, h) 0.5HA-8Col, (d, i) 1HA-8Col, (e, j) 1.5HA-8Col. (b-e) dopo 8 h, (g-j) dopo 2 giorni dopo l'incubazione. Scale bar 200 μ m

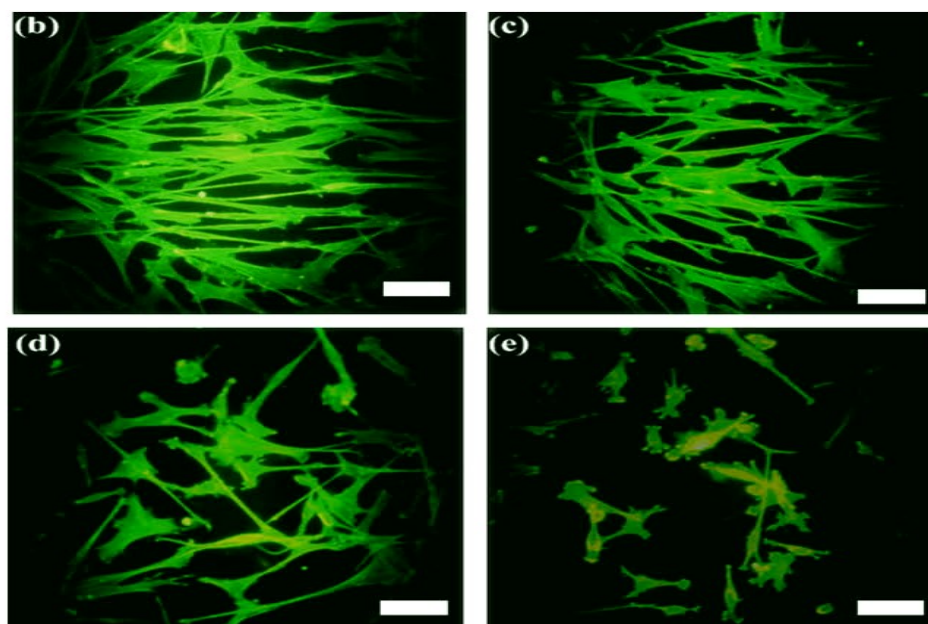


Fig. 7 Cellule colorate a fluorescenza con F-actina 2 giorni dopo l'incubazione su (b) collagene, (c) 0.5HA-8Col, (d) 1HA-8Col, (e) 1.5HA-8Col. Scale bar 200 μ m.

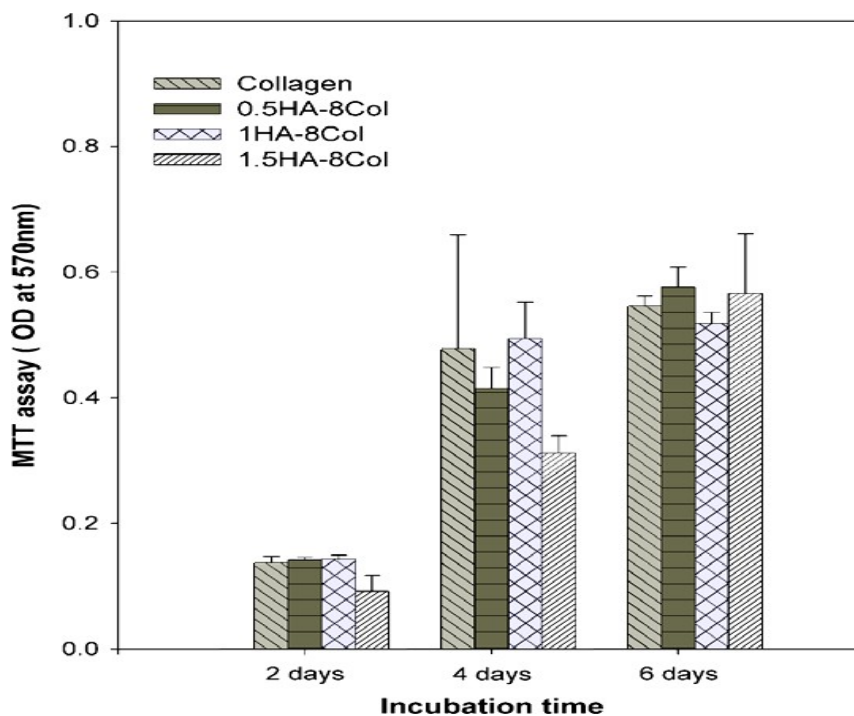


Fig. 8 Vitalità delle cellule di fibroblasti del prepuzio sulle matrici dopo 6 giorni di coltura.

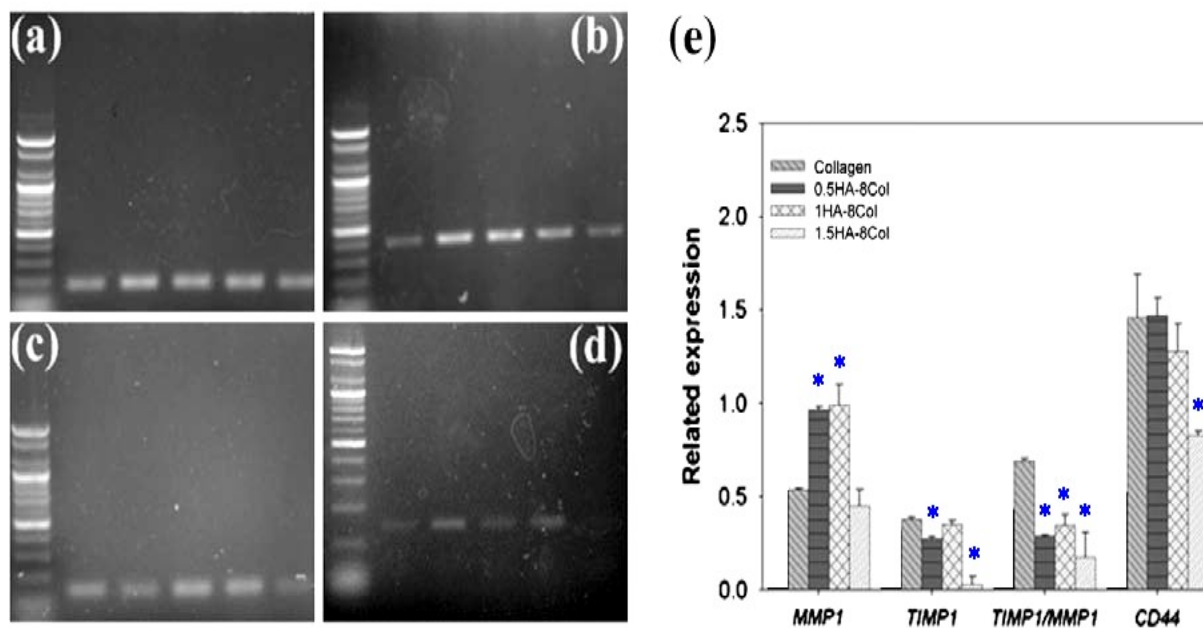


Fig. 9 Analisi RT-PCR dell'espressione dei geni sulle cellule di fibroblasti per le matrici dopo 7 giorni di coltura. (a) β -Actina, (b) CD44, (c) MMP1, (d) TIMP1. (e) L'intensità di banda per ogni gene è stata semi quantificata dopo normalizzazione a quella della β -Actina. * Differenze staticamente significative comparate con il collagene ($P < 0.05$)

4.2.3. Discussione dello studio effettuato

L'elettrospinning è un metodo con cui generare nanofibre. Durante la procedura il

solvente svolge due ruoli fondamentali: il primo è di disciogliere le molecole polimeriche per formare un jet elettrificato; il secondo ruolo è di portare le molecole polimeriche solvate verso il collettore, il quale consente una rapida vaporizzazione delle molecole di solvente e il loro allontanamento dalle fibre polimeriche. Quindi, per un elettrospinning di successo, è necessario selezionare un adeguato sistema di solventi. Attualmente il sistema più diffuso per l'elettrospinning sia di collagene puro che di collagene e polimeri sintetici, è costituito da miscele fluoroalcoliche volatili, come HFIP o TFE. Tuttavia, le caratteristiche elettriche dell'HA, polianionico, e la sua elevata viscosità nelle soluzioni acquose, portano a dire che è difficile da elettrofilare [13].

E' anche noto che, a causa dei suoi effetti sulla viscosità della soluzione, la concentrazione di polimero in soluzione è un fattore chiave che determina il diametro delle nanofibre, che aumenta proporzionalmente alle concentrazioni di soluzione polimerica. Tuttavia, poiché l'HA utilizzato nell'esperimento è in forma di sale, aumentando la concentrazione di HA si ottiene una maggiore densità di carica sulla superficie del getto, che potrebbe indurre maggiori forze elettrostatiche e portare alla formazione di fibre di diametro inferiore. Nel presente studio i diametri delle fibre di HA-collagene erano nel range 50-400 nm: questo ha coinciso con le dimensioni delle fibre di collagene che si trovano nella ECM naturale. Inoltre, i risultati hanno mostrato una crescente dimensione dei pori, con l'aggiunta di HA al collagene ($P < 0,05$), a causa di una relazione tra la viscosità aumentata in soluzione e la catena polimerica. Detto ciò, bisogna tener presente che ci sono differenze fondamentali nei processi di guarigione della pelle dei mammiferi adulti e fetali. A differenza delle ferite cutanee negli adulti, le ferite fetali all'inizio sono prive di cicatrici. Precedenti ricerche hanno stabilito che sia durante l'embriogenesi che durante la rigenerazione delle prime ferite fetali, l'HA è abbondante all'interno della ECM. Quindi, l'HA ha dimostrato di influenzare l'adesione cellulare alla matrice di collagene. Inoltre, la concentrazione di HA è un fattore importante che influenza il comportamento delle cellule. Le stesse ricerche [14] hanno permesso di osservare che basse concentrazioni di HA sembra stimolino la proliferazione dei fibroblasti e la produzione di collagene quando viene aggiunto a colture di cellule. In uno studio Huang-Lee ha riportato una riduzione della contrazione del gel quando è stata aggiunta un'elevata concentrazione ($> 1 \text{ ml mg}^{-1}$) di HA a metà coltura. Liu ha scoperto che concentrazioni di HA superiori allo 0,1% potrebbero inibire l'adesione cellulare e la proliferazione. Le integrine $\alpha 1\beta 1$ e $\alpha 2\beta 1$

sono in grado di fornire l'ancoraggio necessario per la contrazione della ferita. Mariappan ha riportato che le interazioni elettrostatiche tra HA e i domini integrino-leganti possono impedire il legame integrino-mediato al collagene. Attraverso questo studio è stato chiarito il comportamento dei fibroblasti dovuto agli effetti della variazione della concentrazione di HA nella matrice nanofibrosa di HA-collagene. Di fondamentale importanza è il recettore di superficie cellulare dell'HA, CD44. La maggior parte delle cellule, inclusi i fibroblasti esprimono il CD44. Song [15] ha mostrato che mentre i livelli di CD44 della pelle ferita del feto sono significativamente inferiori a quelli della pelle sana del feto, la concentrazione di CD44 nella pelle ferita adulta è significativamente più alta rispetto alla pelle in buona salute. Da ciò si deduce che la diminuita espressione di CD44 si tradurrà in una ferita senza cicatrici. I risultati di questo studio hanno rivelato che c'è stata una riduzione dell'espressione di CD44 mRNA da cellule di fibroblasti del prepuzio coltivate su matrice nanofibrosa con l'aumentare della concentrazione di HA fino all'1,5%, e suggeriscono che la matrice nanofibrosa 1.5HA-8Col è ottimale come scaffold per la rigenerazione della pelle senza ferite.

5. Applicazione di cute autologa ingegnerizzata

Ora si analizza un metodo clinico [16] per l'applicazione in vivo di una nuova pelle equivalente che ospita cheratinociti e melanociti nel vano epidermico e fibroblasti nel derma. Questo innesto è progettato per valorizzare una corretta organizzazione spaziale dei differenti vani cellulari in una rete ben orchestrata, al fine di facilitare anche la deposizione di matrice extra-cellulare di origine autologa. L'utilizzo di questo sostituto della pelle è in grado di dare risultati simili rispetto all'innesto a metà spessore, pur richiedendo siti donatori più piccoli, ed elimina significativamente il rischio di melanoma, in quanto i melanociti contenuti all'interno del vano epidermico sono stati indagati attraverso mutazioni considerate marcatori prognostici di trasformazione del melanoma. Inoltre accelera i tempi di ricovero e convalescenza.

5.1. Materiali e metodi

5.1.1. *Isolamento, coltura cellulare e biomateriale*

Prelevata dall'inguine destro del paziente una biopsia della pelle di circa 2,5 cm², questa è stata trasferita in un piatto Petri e disinfettata mediante immersione in soluzione con 75% di etanolo per 30 s. Il grasso sottocutaneo e il derma profondo sono stati asportati dalla biopsia, e il tessuto restante è stato tagliato in piccoli pezzi. Tutti i frammenti sono stati trasferiti in una provetta da centrifuga contenente 0,25% di tripsina e incubati a 37° C per 10 minuti in incubatore al 5% di CO₂. I frammenti epidermici sono stati pipettati fino a disintegrazione in una sospensione a singola cellula. Le cellule sono state poi contate, seminate in due piatti da 35 mm (1x 10⁶ cellule/piatto) coltivate in Keratinocyte Serum-Free Medium. I melanociti eventualmente presenti tra le colture primarie di cheratinociti sono stati in seguito isolati con blanda tripsinizzazione, e la purezza delle colture è stata ulteriormente valutata mediante immunofluorescenza con marcatori specifici di cheratinociti e melanociti. I frammenti ottenuti dalla stessa biopsia sono stati incubati a 37° C per 1,5 ore in una soluzione pre-riscaldata di collagenasi sterile (625 U/ml). Successivamente, i frammenti sono stati pipettati fino a disintegrazione in una sospensione a singola cellula. Le cellule sono state contate, seminate a 1 x 10⁵

cellule/cm² in palloncini da 75 cm² e mantenute in DMEM contenente 10% di Siero Fetale Bovino (FBS).

Per valutare la purezza delle colture di cheratinociti e melanociti, le cellule sono state analizzate attraverso l'espressione di marcatori specifici mediante immunofluorescenza. In breve, le cellule coltivate in vetrini su piastre da 24 pozzetti sono state fissate in PBS al 4% di paraformaldeide per 30 minuti a 25° C; a ciò è seguito un trattamento con 0,1 M di glicina in PBS per 20 minuti a 25° C e con 0,1% di Triton X-100 in PBS per altri 5 minuti a 25° C per consentirne la permeabilizzazione.

Il biomateriale utilizzato nel presente studio è derivato dall'esterificazione totale di acido ialuronico con alcol benzilico, il cui nome commerciale è Hyaff 11®. Il dispositivo è prodotto da Fidia Advanced Biopolymer Srl (Abano Terme, Italia). Lo scaffold è stato configurato come *non-woven mesh* (NWM) di 20 µm di spessore delle fibre.

5.2. Risultati

5.2.1. *Valutazione delle colture di cheratinociti, melanociti e fibroblasti*

Dalle analisi effettuate sulle colture con microscopia a contrasto di fase, i cheratinociti sono apparsi in forma poligonale e possedevano un grande rapporto tra nucleo e citoplasma (Fig. 10a), i melanociti hanno mostrato una morfologia dendritica o una forma sottile del fuso (Fig. 10b) mentre i fibroblasti mostrano una caratteristica forma allungata e sono raggruppati insieme (Fig. 10c).

Nelle colture di cheratinociti, tutte le cellule sono risultate positive per l'espressione di citocheratine (Fig. 11a), mentre nelle colture dei melanociti tutte le cellule erano positive per tirosinasi (Fig. 11b). Si è quindi creata una co-coltura di cheratinociti e melanociti su palloni di coltura rivestiti di collagene, con un rapporto di semina di 20:1. Le co-culture sono state poi analizzate mediante immunofluorescenza con anticorpi anti-tirosinasi per verificare la percentuale dei melanociti presenti (Fig. 11c).

5.2.2. *Preparazione della pelle sostitutiva autologa*

Per stabilire il sostituto della pelle si è ricostruita una coltura organotipica con un'architettura tridimensionale dermale-epidermale umana utilizzando le colture di

fibroblasti e le co-culture di cheratinociti-melanociti, ottenute dalla biopsia del paziente. Al fine di avere un prodotto contenente uno strato superiore di cheratinociti stratificati, ben differenziati, interno a una struttura dei fibroblasti, come il derma, le cellule sono state propagate per passaggi successivi e poi seminate in vitro all'interno di un tessuto biodegradabile costituito dal NWM di Hyaff 11®. Questo biomateriale è servito come scaffold di supporto per entrambe le colture di fibroblasti e cheratinociti-melanociti. La configurazione del costruito è stata progettata per mantenere la polarità e per consentire una produzione fattibile e riproducibile del sostituto cutaneo. Dopo 16 giorni, i costrutti tridimensionali sono stati portati in sala operatoria in condizioni asettiche.

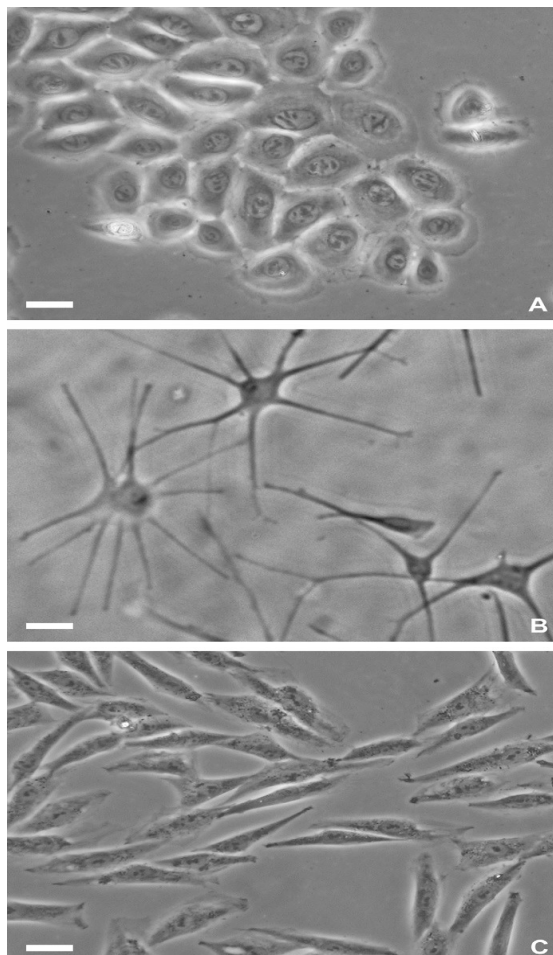


Fig. 10 Caratteristiche delle colture di (a) cheratinociti, (b) melanociti, (c) fibroblasti. Scale bar 5µm

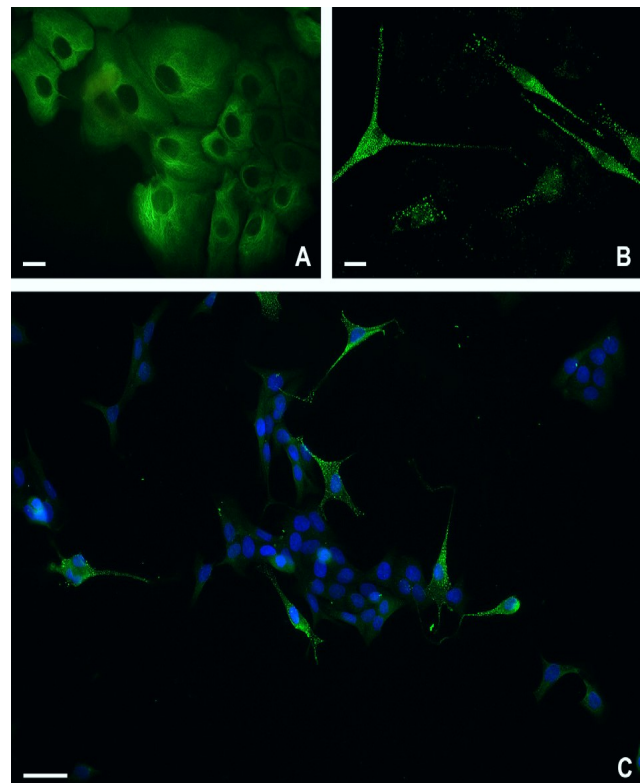


Fig. 11 Espressione dei marcatori per (a) cheratinociti, (b) melanociti, (c) co-cultura. Scale bar 5µm

5.3. Discussione

Nella pelle, l'epidermide subisce un processo di continua e complessa differenziazione che non è strettamente autonomo ma è legato al tessuto connettivo sottostante. Nella pelle sana, l'equilibrio tra proliferazione e perdita cellulare è precisamente mantenuto; pertanto la pelle sostitutiva deve essere in grado di ricreare questo delicato equilibrio in vitro, interagendo con un complesso sistema in vivo. L'acido ialuronico svolge un essenziale ruolo nel mantenimento della normale struttura della matrice extra-cellulare.

Il primo tentativo di ricostruire, in vitro, una pelle autologa bioingegnerizzata sulla base di uno scaffold di acido ialuronico esterificato è avvenuto nel 1998, ed oggi i dispositivi più adatti per la coltura cellulare sono quelli fatti con i derivati esterificati di acido ialuronico, disponibili in commercio come Hyaff 11®, nella configurazione tridimensionale del *non-woven mesh*. Questo biomateriale è completamente biodegradabile, immunologicamente inerte, e non suscita l'attivazione del complemento.

Lo sviluppo di equivalenti di pelle umana su uno scaffold di HA è di particolare importanza, dato che le precedenti colture di cheratinociti contenenti idrogel di collagene hanno dimostrato di avere alcuni difetti, come ad esempio la sopravvivenza limitata, scarsa resistenza alla contrazione, ancoraggio difettoso dell'epidermide alla matrice di collagene, e la mancanza di un supporto dermale. Hyaff 11® evita molti degli svantaggi incontrati in precedenza con scaffold di collagene; ciò è mostrato da diverse caratteristiche: una buona aderenza delle cellule anche in assenza di qualsiasi rivestimento, una struttura tridimensionale che fornisce la stabilità meccanica e la maneggevolezza, permettendo quindi una più ampia applicazione clinica, ed una migliore resistenza alla contrazione rispetto ai materiali a base di collagene. Inoltre, gli scaffold a tre dimensioni Hyaff 11® hanno dimostrato di sostenere la crescita e la differenziazione dei fibroblasti, cheratinociti e condrociti. Infatti, sette giorni dopo l'intervento chirurgico, quando è stata rimossa la medicazione, la zona ri-epitelizzata è stata di circa il 70%, raggiungendo il 90% dopo 14 giorni dall'intervento chirurgico. Entro i 10 giorni, la nuova pelle ri-epitelizzata ha mostrato un iniziale indurimento a partire dal bordo della ferita. Dopo sei mesi, l'organizzazione cellulare ottenuta dalla pelle trapiantata era accettabile; la cicatrice mostra alcune aree ipertrofiche e appare moderatamente eritematosa, soprattutto a

livello delle aree di flessione-estensione presso il legamento dell'arto superiore. A un anno dal controllo è avvenuto il completamento della guarigione e il campione di pelle mostra una regolare struttura epiteliale multistratificata con il normale sviluppo e processo di rigenerazione. La pelle ha mostrato anche un tessuto connettivo fissato nel derma; la cicatrice non è stata dolorosa spontaneamente o alla palpazione. Il tessuto innestato ha fornito una copertura per le strutture profonde, con una buona proprietà meccanica.

Però occorre rilevare che gli innesti di pelle bioingegnerizzata mancano di importanti annessi e strutture epiteliali accessorie, come ghiandole sudoripare, ghiandole sebacee e peli, con ripercussioni negative sulla lubrificazione della pelle e di scambio termico. Inoltre, modelli sperimentali in vitro sembrano suggerire che le vie di trasporto passivo attraverso la pelle proveniente da colture epidermali bioingegnerizzate potrebbero essere diverse da quelle con pelle naturale. Infatti, mentre le aree di trasporto della pelle naturale sono limitate allo spazio extracellulare, le colture epidermiche sembrano seguire percorsi sia extracellulari che intracellulari.

6. Modello Matematico per la guarigione delle ferite

Sembra opportuno ora esporre un modello matematico che sia in grado di interpretare la guarigione delle ferite e allo stesso tempo analizzare il comportamento fisiologico nelle ferite normali e diabetiche. Il modello preso in esame [17] si concentra sull'effetto di aggiungere due terapie sostitutive di pelle ingegnerizzata, attualmente disponibili in commercio: Apligraf™ e Dermagraft™.

Entrando nel dettaglio, il modello simula il processo di guarigione delle ferite, a partire dai macrofagi infiammatori e di riparazione. Queste cellule producono fattori di crescita come il Fattore di Crescita Piastrino-Derivato (PDGF) e il Fattore di Crescita Trasformante beta (TGF- β), che poi attrae altre cellule come fibroblasti e cheratinociti al sito della ferita. I fibroblasti a loro volta producono i componenti della matrice extra-cellulare come il collagene e l'acido ialuronico per formare il tessuto di granulazione e quindi favorire la riparazione delle ferite. Attraverso l'utilizzo di questo modello, che si concentra sulle interazioni tra fattori di crescita, popolazioni di cellule e componenti della ECM, si è in grado di studiare il processo di guarigione della ferita come non si potrebbe fare sperimentalmente in laboratorio o in clinica, e quindi ottenere una maggiore comprensione delle dinamiche di guarigione delle ferite croniche. Nel contesto suddetto, vi è l'ulteriore possibilità di indagare gli effetti dell'aggiunta di trattamenti singoli e multicomponente per ulcere diabetiche.

6.1. Materiali e metodi

Le equazioni del modello sono differenziali ordinarie e sono state ricavate appositamente con un approccio *in forma conservativa* (Appendice A). Le equazioni per i macrofagi infiammatori, per i macrofagi di riparazione e popolazione di fibroblasti sono state determinati utilizzando il seguente modello cinetico:

$$\begin{aligned} & \text{Tasso di variazione della popolazione di cellule} \\ & = \text{migrazione cellulare} + \text{mitosi cellulare} - \text{morte cellulare.} \end{aligned}$$

Similmente le equazioni per TGF- β , PDGF, collagene e ialuronato sono state determinate usando

$$\begin{aligned} & \text{Tasso di variazione chimico} \\ & = \text{produzione chimica} - \text{decadimento chimico.} \end{aligned}$$

Queste equazioni sono state poi utilizzate per derivare le equazioni specifiche per ognuna delle variabili (Appendice A). Il presente modello è un'estensione di un altro [18], che ha indagato il comportamento di tre componenti: i macrofagi infiammatori, macrofagi di riparazione, e TGF- β . Il modello iniziale ha mostrato che le lesioni diabetiche hanno un più alto livello di TGF- β rispetto alle ferite normali, e che i macrofagi persistono più a lungo nelle ferite diabetiche che nelle ferite normali. In questo modello esteso si aggiungono le equazioni per il PDGF, la densità del collagene, la concentrazione di acido ialuronico e i fibroblasti. Inoltre vengono incorporate una serie di interazioni a cascata nel processo di guarigione della ferita.

I monociti migrano verso la ferita in risposta al TGF- β , dove si differenziano in macrofagi. Il fenotipo di questi macrofagi dipende dal profilo chimico nella ferita. L'1,3- β -glucano, che viene assorbito nel corpo dal cibo, incoraggia la formazione dei macrofagi infiammatori. Al contrario, l'acido ialuronico favorisce la differenziazione nei macrofagi di riparazione; l'acido ialuronico è prodotto dai fibroblasti nel corso della guarigione della ferita. I macrofagi producono fattori di crescita, tra cui il TGF- β e PDGF. Il primo stimola ulteriormente la migrazione dei macrofagi nella ferita come discusso sopra. Il PDGF attrae i fibroblasti alla ferita, e induce anche mitosi dei fibroblasti a bassi livelli. I fibroblasti, inoltre, producono TGF- β , anche se non nelle stesse quantità dei macrofagi. Infine, la sintesi di collagene da parte dei fibroblasti è indotta da TGF- β .

Analizzata la struttura del modello si deve indagare se la modellazione di queste diverse componenti del processo di guarigione delle ferite, e le loro reciproche interazioni permettono di analizzare dettagliatamente se i trattamenti in esame (Apligraf™ e Dermagraft™) incoraggiano attivamente la ferita a guarire.

6.2. Risultati

6.2.1. *Simulazione del protocollo di trattamento*

Dalla simulazione del tipico protocollo per ciascuno dei trattamenti si osservano i seguenti risultati:

- in una ferita normale, le popolazioni dei macrofagi hanno un primo picco intorno ai 3-7 giorni e muoiono, lasciando una bassissima densità di macrofagi nella ferita (Fig. 12). La popolazione dei fibroblasti poi ha picchi di circa 5-10 giorni e, infine, ritorna ai livelli che si trovano nella pelle intatta normale (Fig. 13). Il collagene è sintetizzato dai fibroblasti e raggiunge la densità della normale cute integra dopo circa 21 giorni dall'inizio della ferita. Picchi di concentrazione di acido ialuronico si hanno circa nello stesso momento della popolazione di fibroblasti e poi torna al valore della pelle normale integra. I livelli di TGF- β e PDGF all'interno della ferita sono alti inizialmente ma raggiungono velocemente gli stati stabili ;
- al contrario, in simulazioni di una ferita diabetica non trattata, le popolazioni dei macrofagi persistono a lungo, e la popolazione dei macrofagi infiammatori è significativamente più elevata rispetto alla popolazione dei macrofagi di riparazione. Tale incremento e la persistenza del numero di macrofagi significano che si osservano nella ferita grandi quantità di TGF- β e PDGF. La popolazione dei fibroblasti non ha lo stesso grande picco osservato nella normale guarigione delle ferite, e il numero di fibroblasti all'interno della ferita è notevolmente inferiore rispetto alla normale ferita. Di conseguenza, l'accumulo di collagene è molto più basso e anche dopo 200 giorni vi è meno collagene nella ferita di quello che sarebbe stato trovato in condizioni normali e cicatrizzate. La quantità di acido ialuronico nella ferita diabetica è inoltre significativamente più bassa rispetto alla normale ferita, e in effetti molto inferiore rispetto a quella che di solito si trova nella cute normale. Questo porta a una guarigione ridotta come a un minor numero di monociti differenziati in macrofagi di riparazione, e quindi la distribuzione fenotipica dei macrofagi viene interrotta.
- ferite diabetiche con guarigione indotta da uno dei trattamenti presentano caratteristiche simili alle normali ferite. Si verifica un picco nella popolazione

dei fibroblasti, così come un picco della concentrazione di acido ialuronico. Le popolazioni dei macrofagi si riducono in numero, e le ingenti somme di fattori di crescita scendono a livelli osservati nelle ferite normali. Tuttavia, sebbene la popolazione dei macrofagi si riduce quasi a zero, la popolazione dei fibroblasti si deposita ad una densità inferiore a quella che si trova nella normale cute integra.

E' importante sottolineare che le punte del trattamento viste nelle figure ci sono perché l'applicazione del trattamento è modellata come un processo di rilascio istantaneo, piuttosto che come un processo di rilascio graduale.

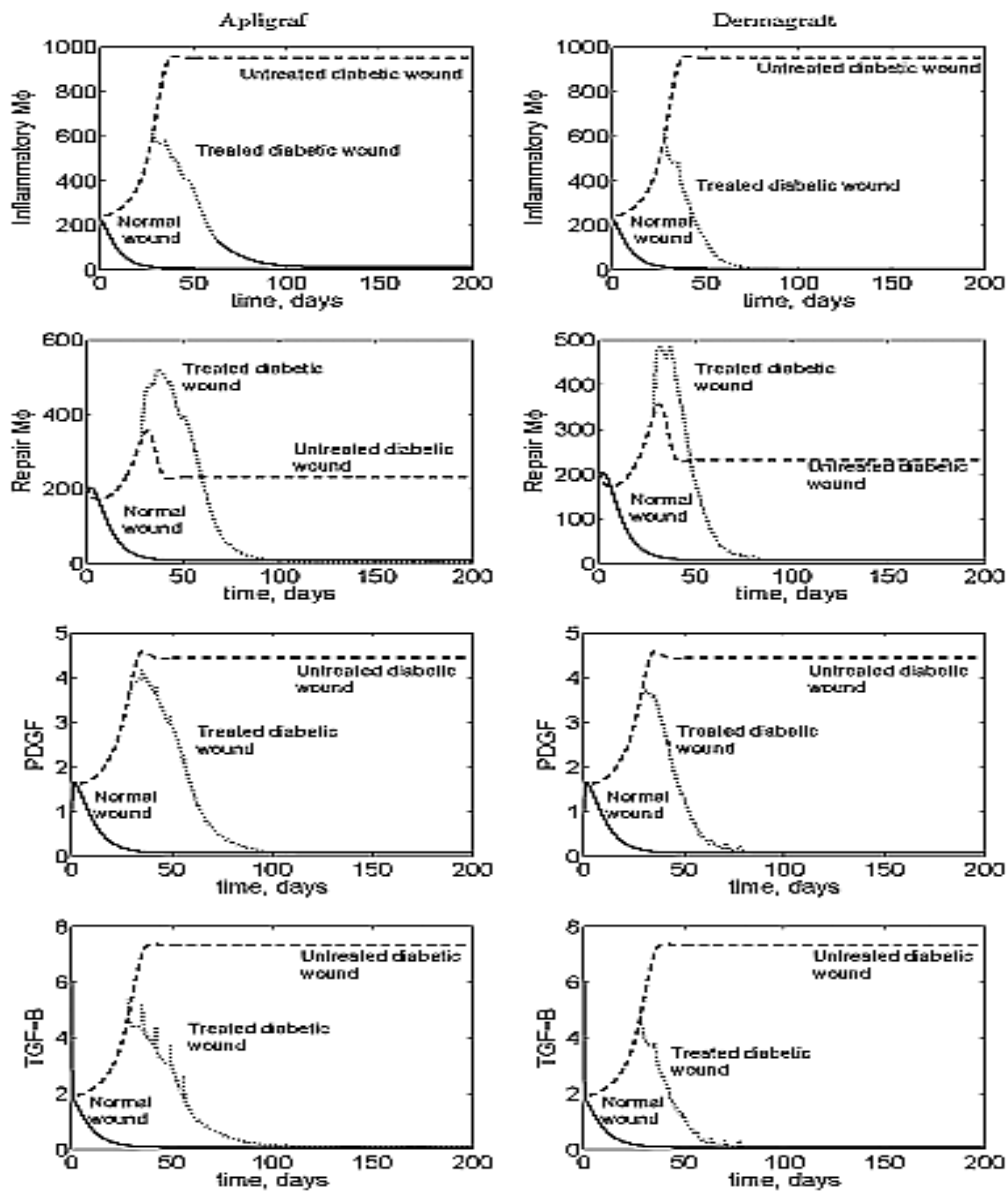


Fig. 12 Simulazione numerica del modello che mostra i profili, di ferita (—) normale, (- -) diabetica non trattata, (· ·) diabetica trattata, di macrofagi infiammatori e di riparazione, PDGF e TGF- β per mm^3 di ferita con Apligraf (colonna 1) e Dermagraft (colonna 2). Apligraf è stato aggiunto alla ferita nei giorni 28, 35, 42, 49 e 56; Dermagraft nei giorni 8, 35, 42, 49, 56, 63, 70 e 77, come da protocollo.

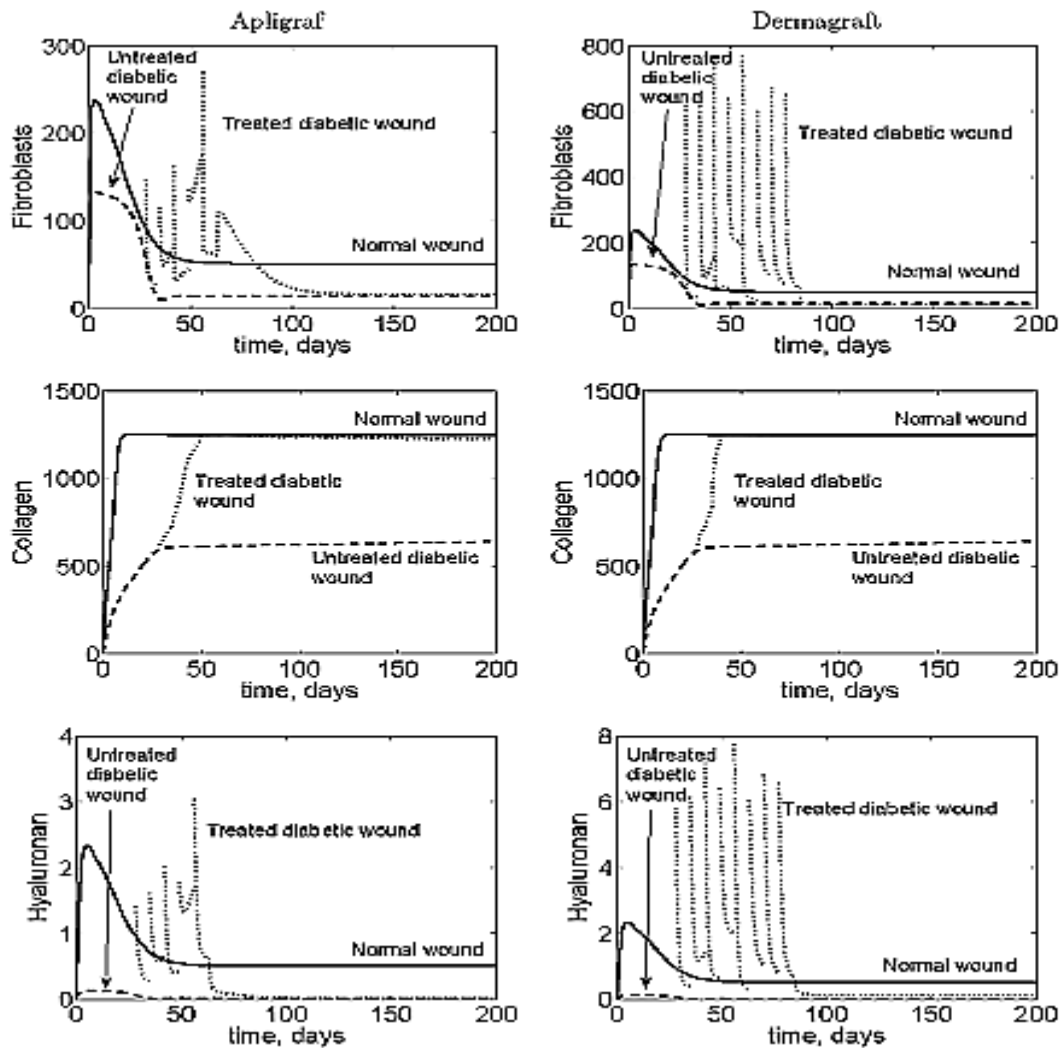


Fig. 13 Simulazione numerica del modello che mostra i profili, di ferita (—) normale, (- -) diabetica non trattata, (. .) diabetica trattata, di fibroblasti, collagene e HA per mm³ di ferita con Apligraf (colonna 1) e Dermagraft (colonna 2). Apligraf è stato aggiunto alla ferita nei giorni 28, 35, 42, 49 e 56; Dermagraft nei giorni 8, 35, 42, 49, 56, 63, 70 e 77, come da protocollo.

6.2.2. Simulazione d'applicazione dei componenti in modo individuale

Per determinare se i componenti di questi trattamenti di guarigione delle ferite agiscono da soli o in sinergia, il modello è stato usato per simulare l'aggiunta di componenti singoli alla ferita. Sono stati usati i protocolli di trattamento standard, ma simulata l'aggiunta di solo una delle componenti del trattamento, piuttosto che di tutte. Il riscontro dei risultati ha mostrato che (Fig. 14, Fig. 15) l'aggiunta di TGF- β da solo alla ferita non favorisce la guarigione, lo stesso vale per il collagene, cioè non si verifica la chiusura della ferita. L'applicazione di PDGF da solo alla ferita in quantità che normalmente si trovano nelle ferite non induce la guarigione, ma si verifica la

guarigione quando sono utilizzati grandi quantità di PDGF. L'aggiunta di acido ialuronico da solo in grandi quantità incoraggia la guarigione delle ferite; più HA significa che più monociti si differenziano in macrofagi di riparazione e meno monociti diventano macrofagi infiammatori, rispondendo così allo squilibrio fenotipico visto nella ferita diabetica non trattata. L'aggiunta di fibroblasti da soli alla ferita anche induce la guarigione. Un maggior numero di fibroblasti significa che la sintesi di acido ialuronico è aumentata e questo corregge lo squilibrio fenotipico dei macrofagi come descritto sopra.

Le figure 14 e 15 mostrano che i componenti non agiscono in sinergia per indurre la guarigione delle ferite. La prima colonna mostra l'effetto dell'aggiunta di collagene, TGF- β e PDGF alla ferita, la seconda mostra l'effetto dell'aggiunta di solo acido ialuronico, e la terza mostra l'effetto dell'aggiunta di soli fibroblasti.

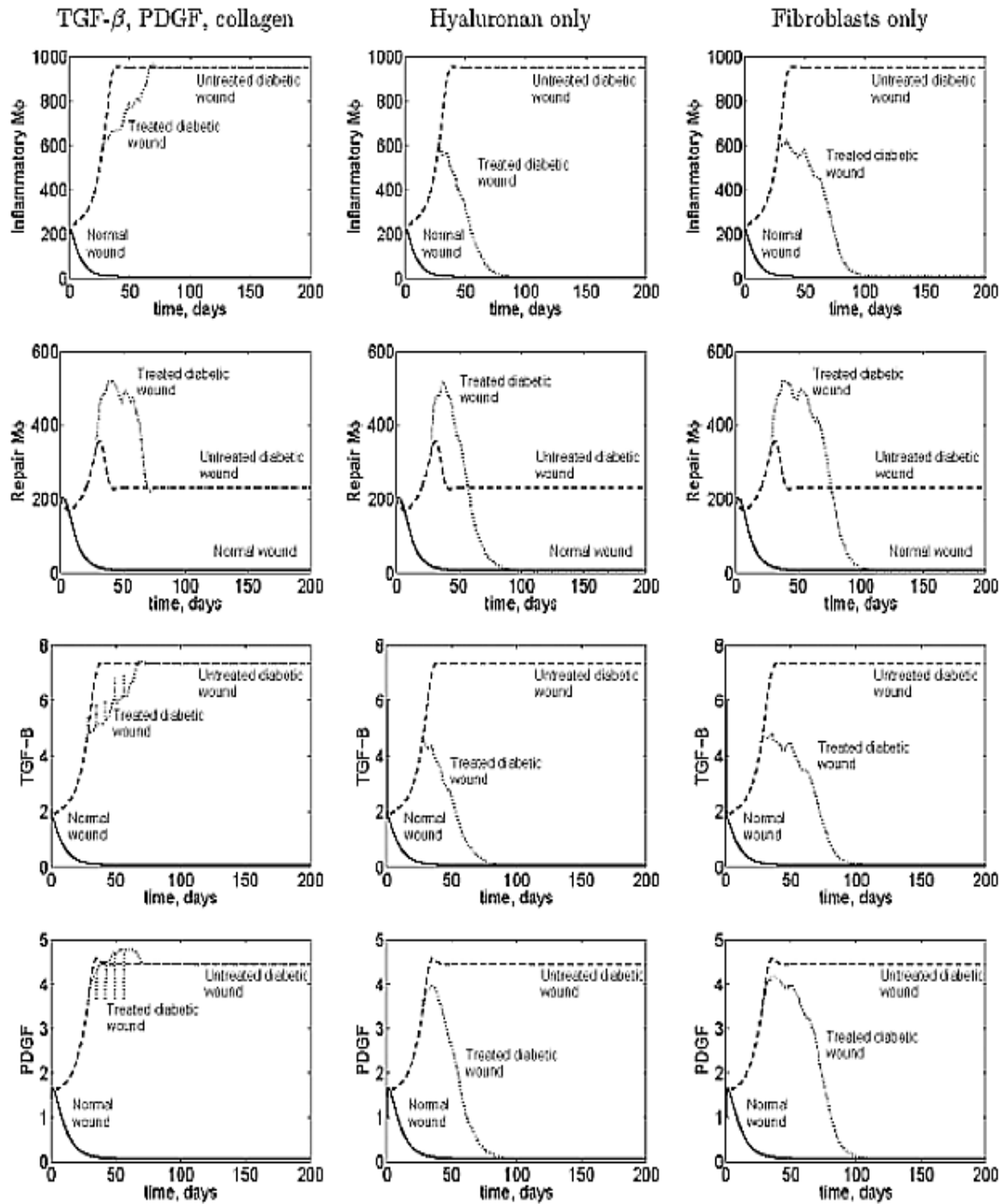


Fig. 14 Simulazione numerica del modello che mostra i profili di di ferita (—) normale, (- -) diabetica non trattata, (. .) diabetica trattata, di macrofagi infiammatori, macrofagi di riparazione, TGF- β e PDGF per mm^3 di ferita. La prima colonna mostra che l'aggiunta di collagene, TGF- β e PDGF alla ferita diabetica non induce la guarigione, mentre la seconda e la terza colonna mostrano che la guarigione può essere indotta se vengono aggiunti singolarmente l'HA o i fibroblasti.

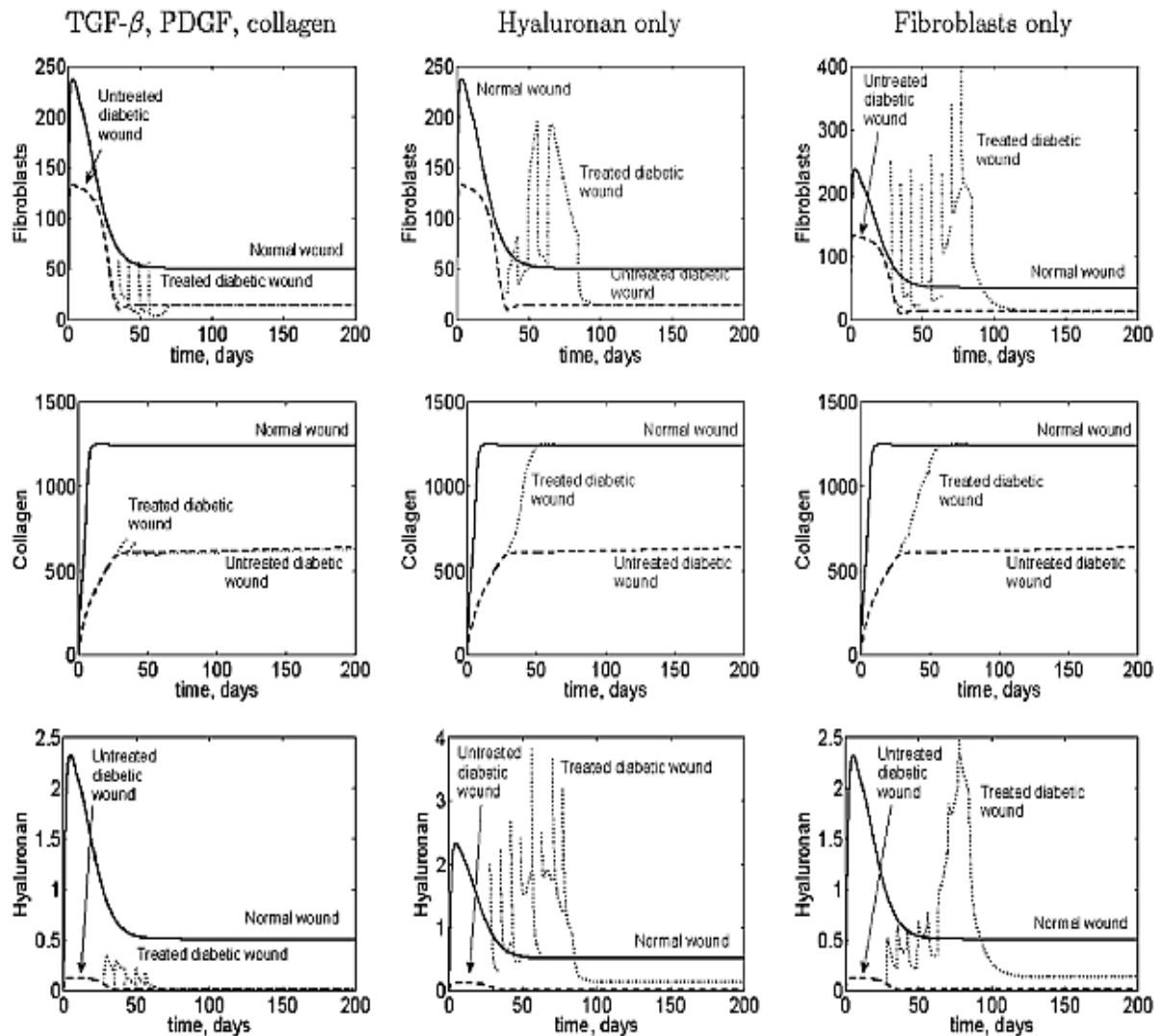


Fig. 15 Simulazione numerica del modello che mostra i profili di di ferita (—) normale, (- -) diabetica non trattata, (. .) diabetica trattata, di fibroblasti, collagene e HA per mm³ di ferita. La prima colonna mostra che l'aggiunta di collagene, TGF-β e PDGF alla ferita diabetica non induce la guarigione, mentre la seconda e la terza colonna mostrano che la guarigione può essere indotta se vengono aggiunti singolarmente o l'HA o i fibroblasti.

6.3. Discussioni

Sulla base di questi risultati, si può prevedere che sarebbero necessari per un trattamento efficace solo i componenti di acido ialuronico o di fibroblasti di Apligraf™ e Dermagraft™. Bisogna altresì aggiungere che ci sono pochi dati disponibili per la misurazione dei fattori di crescita, componenti della ECM, e popolazioni di cellule all'interno di una guarigione delle ferite diabetiche. Una ragione è che una volta che

una ferita diabetica sembra guarita, soprattutto se la guarigione si è rivelata difficile in passato, i medici possono essere riluttanti a prelevare campioni per l'esame istologico perché si rischierebbe di perturbare il processo di guarigione. I valori numerici per tutti i componenti possono quindi essere classificati come migliori stime piuttosto che esatti.

Ci sono limiti evidenti nel modello in esame: modella solo alcune delle cellule, dei fattori di crescita e delle componenti della ECM presenti nel processo di guarigione delle ferite, e non fa alcuna distinzione tra isoforme del collagene, TGF- β e PDGF. Il modello è stato mantenuto il più semplice possibile al fine di descrivere il comportamento di fondo della guarigione nelle ferite diabetiche.

6.4. Appendice

In questa appendice, si descrivono le equazioni del modello e i valori dei parametri utilizzati. Una equazione differenziale si dice posta in forma conservativa se i coefficienti delle sue derivate sono costanti o, se variabili, non compaiono esplicitamente nell'equazione. Ogni equazione dà il tasso di variazione della variabile e delle sue parti costitutive. Le variabili utilizzate nel modello sono i macrofagi infiammatori (Φ_I , cellule/mm³), macrofagi di riparazione (Φ_R , cellule/mm³), TGF- β (T , pg/mm³), PDGF (P , pg/mm³), dei fibroblasti (F , cellule/mm³), collagene (C , μ g/mm³) e acido ialuronico (H , μ g/mm³).

Inflammatory macrophages

$$\frac{d\Phi_I}{dt} = \overbrace{\alpha K(T)}^{\text{migration}} + \overbrace{k_1 k_2 \Phi_I (1 - k_3(\Phi_I + \Phi_R) - k_5 F - k_6 C)}^{\text{mitosis with crowding effect}} - \underbrace{d_1 \Phi_I}_{\text{death}}$$

Repair macrophages

$$\frac{d\Phi_R}{dt} = \overbrace{(1 - \alpha)K(T)}^{\text{migration}} + \overbrace{k_1 k_2 \Phi_R (1 - k_3(\Phi_1 + \Phi_R) - k_5 F - k_6 C)}^{\text{mitosis with crowding effect}} - \overbrace{d_1 \Phi_R}^{\text{death}}.$$

TGF- β

$$\frac{dT}{dt} = \overbrace{k_4 \Phi_1 + k_7 F}^{\text{production of TGF-}\beta} - \overbrace{d_2 T}^{\text{decay of TGF-}\beta}.$$

PDGF

$$\frac{dP}{dt} = \overbrace{k_8(\Phi_1 + \Phi_R)k_9 F}^{\text{production of PDGF}} - \overbrace{d_3 P}^{\text{decay of PDGF}}.$$

Fibroblasts

$$\frac{dF}{dt} = \overbrace{M(P)}^{\text{migration}} + \overbrace{k_{10} F (1 - k_3(\Phi_1 + \Phi_R) - k_5 F - k_6 C)}^{\text{mitosis with crowding effect}} - \overbrace{d_4 F}^{\text{death}}.$$

Collagen

$$\frac{dC}{dt} = \overbrace{k_{11} F f(T) g(C)}^{\text{production induced by TGF-}\beta \text{ with collagen crowding}} - \overbrace{d_5 FC}^{\text{remodeling}}.$$

Hyaluronan

$$\frac{dH}{dt} = \overbrace{k_{12} F}^{\text{production}} - \overbrace{d_6 H}^{\text{decay}},$$

α rappresenta la costante di proporzionalità dei monociti che migrano verso la ferita e che si differenziano in macrofagi infiammatori: $\alpha = -0.197 \log_{10} H + 0.4407$. La funzione logaritmica è stata usata come una forma quantitativa adattata per α (H) in base all'andamento della curva ottenuta riportando i valori dei dati per la pelle normale e Apligraf™ ($H = 2.5$, $\alpha = 0.5$), pelle diabetica ($H = 0.015$, $\alpha = 0.8$), e Dermagraf™ ($H = 80$, $\alpha = 0.07$).

$K(T)$ è una funzione cubica di T che rappresenta la migrazione dei monociti verso la ferita in risposta al TGF- β (basato sui dati di Waugh e Sherratt1), $M(P)$ è una funzione cubica di P che rappresenta la migrazione dei fibroblasti verso la ferita in

risposta al PDGF (basato sui dati di Facchiano et al.), $f(T)$ è una funzione cubica di T che rappresenta la sintesi fibroblastica di collagene in risposta al TGF- β (basato sui dati di Roberts et al.), e $g(C)$ è una funzione cubica di C che rappresenta l'effetto dell'aumento della densità di collagene sulla sua sintesi da parte dei fibroblasti (basato sui dati di Grotendorst et al.). Queste funzioni sono mostrate qualitativamente nella figura 16.

I valori dei parametri utilizzati nelle simulazioni sono mostrati nella Tabella 3. Mentre molti dei valori dei parametri sono disponibili da lavori precedenti o studi pubblicati, alcuni dei parametri sono stati calcolati. In questi casi, la fonte di dati utilizzati per calcolare i valori dei parametri è inclusa, come sono di esempio i metodi di calcolo.

Di seguito si riportano i calcoli dei parametri dei quali non può essere trovato nessun valore pubblicato. Ad esempio, il tasso di decadimento del PDGF, d_2 è calcolato utilizzando il dato di emivita, che è circa di 240 minuti. d_2 può essere determinato da

$$d_2 = \frac{\ln 2}{T^{1/2}} = \frac{\ln 2}{0.167} = 4 \text{ day}^{-1}.$$

Le densità massime inverse sono semplicemente l'inverso della densità massima, per esempio, la densità dei fibroblasti massima è di circa 400 cellule/mm³, in modo che la densità massima inversa dei fibroblasti, k_5 è ottenuta da:

$$k_5 = \frac{1}{400} = 0.0025 \text{ mm}^3/\text{cells}.$$

Il tasso di crescita può essere determinato raddoppiando i dati temporali della popolazione. Ad esempio, il tasso di crescita dei macrofagi, k_2 può essere determinato raddoppiando il tempo di popolazione, che è circa 1 giorno. k_2 è pertanto:

$$k_2 = \frac{\ln 2}{1} = 0.693 \text{ day}^{-1}$$

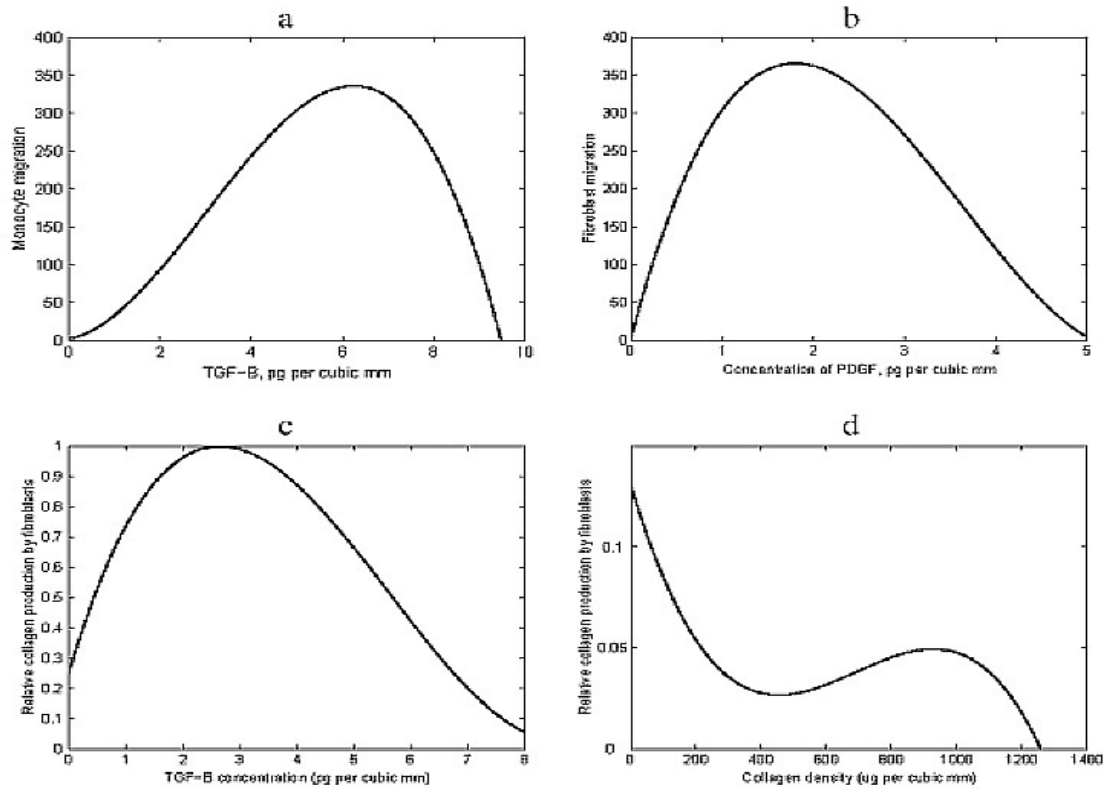


Fig. 16 Forma qualitativa delle funzioni utilizzate nelle simulazioni (A) $K(T)$, che rappresenta la migrazione dei monociti in risposta al TGF- β , (B) $M(P)$, rappresenta la migrazione dei fibroblasti al sito di ferita in risposta al PDGF, (C) $f(T)$, che rappresenta la sintesi di collagene da parte dei fibroblasti in risposta a TGF- β , e (D) $g(C)$, rappresenta l'effetto che la densità di collagene nella ferita ha sulla sua produzione da parte dei fibroblasti.

Parameter description	Symbol	Value	Units	References
% of macrophages undergoing mitosis	k_1	0.05	—	Miyasaki and colleagues ^{41,42}
Macrophage growth rate	k_2	0.693	day ⁻¹	Calculated ⁴²
Inverse maximal macrophage density	k_3	0.002	(cells/mm ³) ⁻¹	Calculated ⁴³
Macrophage TGF- β production rate	k_4	0.07	pg/cells/day	Cobbold and Sherratt ⁹
Inverse maximal fibroblast density	k_5	0.0025	(cells/mm ³) ⁻¹	Calculated ⁹
Inverse maximal collagen density	k_6	0.0004	(μ g/mm ³) ⁻¹	Calculated ^{8,44}
Fibroblast TGF- β production rate	k_7	0.004	pg/cells/day	Huang et al. ⁴⁵
Macrophage PDGF production rate	k_8	0.015	pg/cells/day	Badgett et al. ⁴⁶
Fibroblast PDGF production rate	k_9	0.0015	pg/cells/day	Baker et al. ³¹
Fibroblast growth rate	k_{10}	0.924	day ⁻¹	Hehenberger et al. ¹⁰
Fibroblast collagen production rate (diabetic)	k_{11}	5	μ g/cells/day	Raghow et al. ¹⁶
Fibroblast collagen production rate (normal)	k_{11}	20	μ g/cells/day	Ignotz and Massague ¹⁵
Fibroblast HA synthesis rate (diabetic)	k_{12}	0.001	μ g/cells/day	Edward et al. ⁴⁷
Fibroblast HA synthesis rate (normal)	k_{12}	0.01	μ g/cells/day	Edward et al. ⁴⁷
Macrophage removal rate	d_1	0.2	day ⁻¹	Calculated ³⁴
TGF- β decay rate	d_2	9.1	day ⁻¹	Cobbold and Sherratt ⁹
PDGF decay rate	d_3	4.0	day ⁻¹	Calculated ⁴⁸
Fibroblast death rate (diabetic)	d_4	2.5	day ⁻¹	Darbyvet al. ¹³
Fibroblast death rate (normal)	d_4	1.0	day ⁻¹	Darbyvet al. ¹³
Rate of collagen remodelling by fibroblasts	d_5	1.5×10^{-5}	day ⁻¹	Cobbold and Sherratt ⁹
Hyaluronan decay rate	d_6	0.7	day ⁻¹	Tammi and Tammi ⁴⁹

Tabella 3 Valori dei parametri del modello

8. Conclusioni

Prodotti di ingegneria tissutale attualmente disponibili per la sostituzione della pelle, compresi i costrutti del derma e dell'epidermide, anche se non perfetti, occupano una specifica nicchia all'interno di un approccio complesso per il trattamento di ferite estese con perdite di sostanza a tutto spessore, migliorando la sopravvivenza dei pazienti e la loro qualità di vita dopo una lesione. Tali prodotti però sono destinati solo a limitati e specifici ruoli nel processo di guarigione delle ferite. Prevalentemente, servono come medicazioni biologicamente attive temporanee, come trasportatori di citochine e molecole necessarie per la guarigione delle ferite, mentre la pelle del paziente si rigenera.

Il consenso generale esprime l'idea che i prodotti ingegnerizzati, al livello attuale, non possono sostituire completamente la pelle danneggiata. Ci sono molte sfide da affrontare da parte dei bioingegneri per lo sviluppo di questi prodotti e la ricerca di nuove frontiere che dovrebbero essere prese in considerazione come i tessuti ingegnerizzati derivati da cellule vive e lo studio delle cellule staminali.

Prodotti attualmente disponibili per la sostituzione della pelle possono sostituire solo in parte la funzione di barriera protettiva della pelle, ma le altre funzioni, tra cui il tatto e la sensazione di temperatura, l'escrezione, la sudorazione, la termoregolazione, la protezione dai raggi ultravioletti, la funzione di sintesi, per non parlare dell'estetica, sono abbastanza ridotte o addirittura non affatto presenti nella cute ingegnerizzata. L'obiettivo fondamentale è di creare un sostituto funzionale della pelle con la combinazione simultanea di diversi tipi di cellule della pelle, tra cui cheratinociti, melanociti, fibroblasti e cellule endoteliali. Alla base di tutto ciò vi è la necessità di strutturare uno scaffold che sia in grado di ottimizzare la proliferazione delle cellule dopo il trapianto: l'acido ialuronico rappresenta, al momento, il biomateriale migliore per la produzione di queste matrici sostitutive. Un altro approccio per funzionalizzare ulteriormente gli scaffolds è l'aggiunta di molecole di segnalazione per la regolazione delle interazioni cellula-cellula e cellula-matrice e per accelerare la biointegrazione.

L'HA quindi è un componente fondamentale in questo settore ma non è l'unico e neanche la soluzione a tutti i problemi. In questo approfondimento si sono messi in evidenza i traguardi raggiunti nello studio dell'HA e le tecniche acquisite nella fabbricazione di scaffold, ma allo stesso tempo si è cercato di sottolineare che ci

sono ancora innumerevoli limiti da superare, che sicuramente nel corso degli anni verranno raggiunti.

9. Bibliografia

1. Tammi M I, Day A J, Turley E A. *Hyaluronan and homeostasis: a balancing act*. J Biol Chem 2002; **277**:4581–4784.
2. Kogan G, Solte's L, Stern R, Schiller J, Mendichi R. *Hyaluronic acid: its function and degradation in in vivo systems*.(vol 35, Bioactive natural products, Part D) 2006.
3. Xu H, Ito T, Tawada A, Maeda H, Yamanokuchi H, Isahara K, Yoshida K, Uchiyama Y, Asari A. *Effect of hyaluronan oligosaccharides on the expression of heat shock protein 72*. J Biol Chem 2002; **277**:17308–17314.
4. Rheinwald J G, Green H. *Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells*. Cell 1975; **6**:331–43.
5. Clark R A, Ghosh K, Tonnesen M G. *Tissue engineering for cutaneous wounds*. J Invest Dermatol 2007; **127**: 1018–1029.
6. Davidson J M. *First-class delivery: getting growth factors to their destination*. J Invest Dermatol 2008; **128**: 1360–1362.
7. Branski L K, Pereira C T, Herndon D N, Jeschke M G. *Gene therapy in wound healing: present status and future directions*. Gene Ther 2007; **14**: 1–10.
8. Dieckmann C, Renner R, Milkova L and Simon J C. *Regenerative medicine in dermatology: biomaterials, tissue engineering, stem cells, gene transfer and beyond*. Experimental Dermatology 2010; **19**: 697–706.
9. Price R D, Berry M G, Navsaria H A. *Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence*. Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery 2007; **60**: 1110–1119.
10. Bell E, Ivarsson B, Merrill C. *Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro*. Proc Natl Acad Sci USA 1979; **76**:1274–8.
11. Shevchenko R V, James S L, James S E. *A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction*. J. R. Soc. Interface 2010; **7**: 229–258.
12. Hsu F Y, Hung Y S, Liou H M, Shen C H. *Electrospun hyaluronate–collagen nanofibrous matrix and the effects of varying the concentration of hyaluronate on the characteristics of foreskin fibroblast cells*. Acta Biomaterialia 2010; **6**:2140–2147.
13. Kim T G, Chung H J, Park T G. *Macroporous and nanofibrous hyaluronic acid/collagen hybrid scaffold fabricated by concurrent electrospinning and deposition/leaching of salt particles*. Acta Biomater 2008; **4**:1611–9.
14. Nawrat P, Surazyski A, Karna E, Paka J A. *The effect of hyaluronic acid on interleukin-1-induced deregulation of collagen metabolism in cultured human skin fibroblasts*. Pharmacol Res 2005; **51**:473–7.

15. Song HF, Chai JK, Lin ZH, Liu NF, Chen ML, Zhao YZ, et al. *Expression of hyaluronic acid and its receptor in the process of wound healing in different skin tissues and its significance*. Zhonghua Yi Xue Za Zhi 2003; **83**:1070–4.
16. Scuderi N, Onesti M G, Bistoni G, Ceccarelli S, Rotolo S, Angeloni A, Marchese C. *The clinical application of autologous bioengineered skin based on a hyaluronic acid scaffold*. Biomaterials 2008; **29**:1620–1629.
17. Waugh H V, Sherratt J A. *Modeling the effects of treating diabetic wounds with engineered skin substitutes*. Wound Rep. Reg. 2007; **15**:556–565.
18. Waugh H V, Sherratt J A. *Macrophage dynamics in diabetic wound healing*. Bull Math Biol 2006; **68**:197–207.

