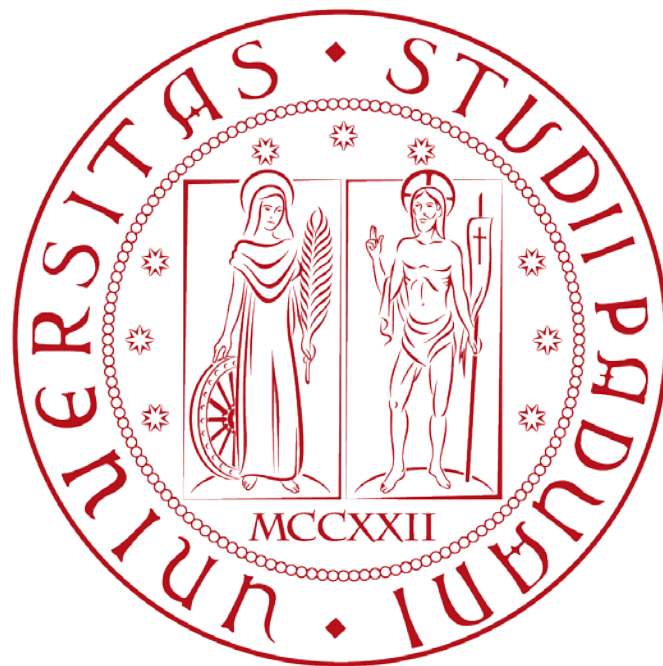


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

ANNO ACCADEMICO 2010-2011



TESI DI LAUREA

L'Ingegneria Tissutale Per La Produzione
Di Tessuto Tendineo e Legamentoso

Tissue Engineering: The Production Of
Tendon and Ligament Tissue

22 Febbraio 2011

Laureando: *Marco Monaro*

Relatore: *Andrea Bagno*

INDICE

ABSTRACT

CAPITOLO 1: FUNZIONE E STRUTTURA DEL TESSUTO TENDINEO E LEGAMENTOSO

1.1 COMPONENTI DEL TENDINE E DEL LEGAMENTO

- 1.1.1 Le Funzioni
- 1.1.2 Le Componenti Cellulari
- 1.1.3 La Matrice Extracellulare ECM

1.2 PROPRIETÀ MECCANICHE DEL TENDINE E DEL LEGAMENTO

CAPITOLO 2: PANORAMICA SULL'INGEGNERIA TISSUTALE DEI TENDINI E DEI LEGAMENTI

2.1 INNESTI BIOLOGICI, PROTESI ARTIFICIALI, INGEGNERIA TISSUTALE

2.2 CRITERI DI SUCCESSO DELL'INGEGNERIA TISSUTALE

- 2.2.1 Istologia e Immunoistochimica
- 2.2.2 Microscopia

CAPITOLO 3: LA PROGETTAZIONE DELLO SCAFFOLD

3.1 INFLUENZA DELLE CELLULE SULLO SCAFFOLD. CARATTERISTICHE MACROSCOPICHE

- 3.1.1 Proprietà meccaniche del materiale

3.2 INFLUENZA DELLO SCAFFOLD SULLE CELLULE - CARATTERISTICHE MICROSCOPICHE

- 3.2.1 La rigidità
- 3.2.2 L'architettura

3.3 TECNICHE DI FABBRICAZIONE DELLO SCAFFOLD

3.3.1 Solvent Casting Con Particolari Liscivazioni (Leaching)

3.3.2 Fibre Networking

3.3.3 Separazione Di Fase (In Combinazione Con Sublimazione Freeze Drying / Critical Point Drying)

3.3.4 Solid Freeform Fabrication (SFF)

CAPITOLO 4: STRATEGIE PER SPECIALIZZARE E MIGLIORARE GLI SCAFFOLD

4.1 L'IBRIDAZIONE CELLULARE

4.2 LA MODIFICA DELL'INTERFACCIA

4.3 IL TRATTAMENTO CON UN OPPORTUNO FATTORE DI CRESCITA

4.4 LA STIMOLAZIONE MECCANICA

4.5 GUIDA PER CONTATTO

CAPITOLO 5: MATERIALI PROPOSTI PER GLI SCAFFOLD DALLA INGEGNERIA TISSUTALE

5.1 POLIESTERI

5.1.1 Acido Poliglicolico (PGA)

5.1.2 Acido Polilattico (PLA)

5.1.3 Acido Polilattico co-glicolico (PLGA)

5.2 DERIVATI DEL COLLAGENE

5.1.2 Gel Di Collagene

5.3 POLISACCARIDI

5.3.1 Chitosano

CONCLUSIONI

ABSTRACT

Passando in rassegna le varie fasi che portano alla produzione di uno scaffold seminato di cellule specifiche, in questa tesi si intende presentare l'approccio proposto dall'ingegneria tissutale per la rigenerazione di tessuto tendineo e legamentoso.

Sono descritte innanzitutto le principali caratteristiche a livello micro e macroscopico di tendini e legamenti e sono riportate le tecniche per analizzare i nuovi costrutti che si realizzano durante il processo di fabbricazione.

Si passa poi ad approfondire quali siano i migliori approcci per un rapporto ottimale tra le cellule che devono ricomporre il tessuto lesionato e lo scaffold che deve supportarne la crescita riportando cinque strategie innovative tra le quali l'*ibridazione cellulare*, la *stimolazione meccanica* e l'utilizzo di *fattori di crescita*. Successivamente si prende in esame il comportamento di fibroblasti e fibroblasti dermali e degli scaffold prodotti attraverso poliesteri (PGA, PLA, PLGA), derivati del collagene (gel di collagene) e polisaccaridi (chitosano).

1. FUNZIONE E STRUTTURA DEL TESSUTO TENDINEO E LEGAMENTOSO

1.1 COMPONENTI DEL TENDINE E DEI LEGAMENTI

1.1.1 Le Funzioni

Sia i tendini che i legamenti sono caratterizzati da un tessuto connettivo composto da fasci di fibre di collagene tra loro, in genere, parallele.

Il tendine, (Figura 1.1), è formato da una parte esterna e una parte interna chiamata *aponeurosi*. La parte esterna del tendine connette propriamente il muscolo all'osso mentre l'aponeurosi è l'area di collegamento per le fibre del muscolo.

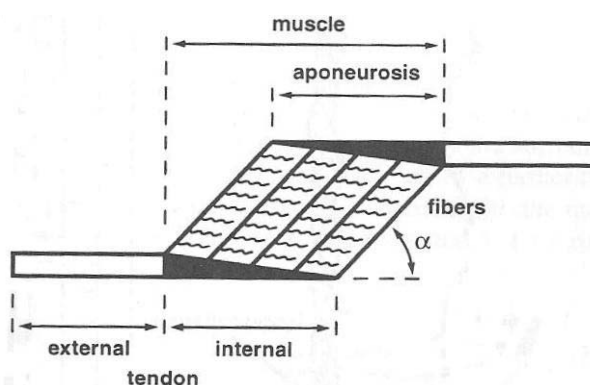


Figura 1.1 – Rappresentazione schematica del tendine

Il tendine permette la trasmissione delle forze prodotte dalla contrazione del muscolo all'osso, per produrre un movimento preciso dell'articolazione associata. (1)

Il legamento assicura la stabilità delle articolazioni, limitando il loro movimento. Entrambi i tessuti sono composti da una *componente cellulare* e da una *matrice extracellulare (ECM)*.

La componente cellulare comprende principalmente fibroblasti e un piccolo numero di altre cellule che provvedono alla protezione e all'omeostasi dell'ambiente cellulare come i linfociti, i macrofagi e i mastociti.

La ECM è principalmente composta da fibrille di collagene, proteoglicani (*PGs*), Glicosamminoglicani (*GAGs*) ed elastina.

Entrambi i tessuti, tendineo e legamentoso, sono avvolti da membrane o guaine sinoviali che hanno il compito di facilitarne e proteggere i movimenti.

Tendini e legamenti, pur svolgendo funzioni diverse, sono caratterizzati da caratteristiche comuni che portano ad affrontare il loro studio in modo coniugato.

1.1.2 Le Componenti Cellulari

Il principale tipo di cellule che si trova nel tessuto tendineo e legamentoso è il fibroblasto, detto anche tenocita (Figura 1.2).

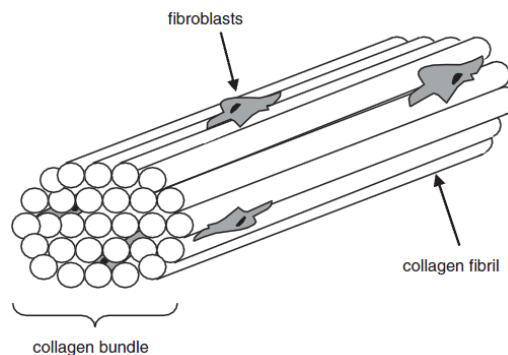


Figura 1.2 – Relazione tra fibroblasti e fibre di collagene

I fibroblasti sono cellule fusiformi, orientate lungo le fibre di collagene che non occupano un gran volume nel tessuto, ma sono responsabili della secrezione e del mantenimento dei componenti macromolecolari della ECM. Queste cellule danno inoltre un contributo importante all'organizzazione della matrice, in quanto il suo orientamento è influenzato dall'orientamento del loro citoscheletro.

Il relativo basso numero di fibroblasti, legato alla loro attività mitotica, porta a un relativo basso ricambio di tessuto e questo può spiegare perché molti tendini e legamenti possiedano una scarsa capacità di guarigione naturale.

1.1.3 La Matrice Extracellulare (ECM)

Nel corpo umano le cellule si trovano in un ambiente extracellulare da loro secreto che fornisce una sorta d'impalcatura a rete nella quale loro stesse si annidano. Le cellule sintetizzano le componenti della ECM per rispondere alle

loro necessità quindi nei diversi tessuti, la matrice ha diverse strutture e diverse funzioni.

La struttura dei tendini e dei legamenti è modulare.

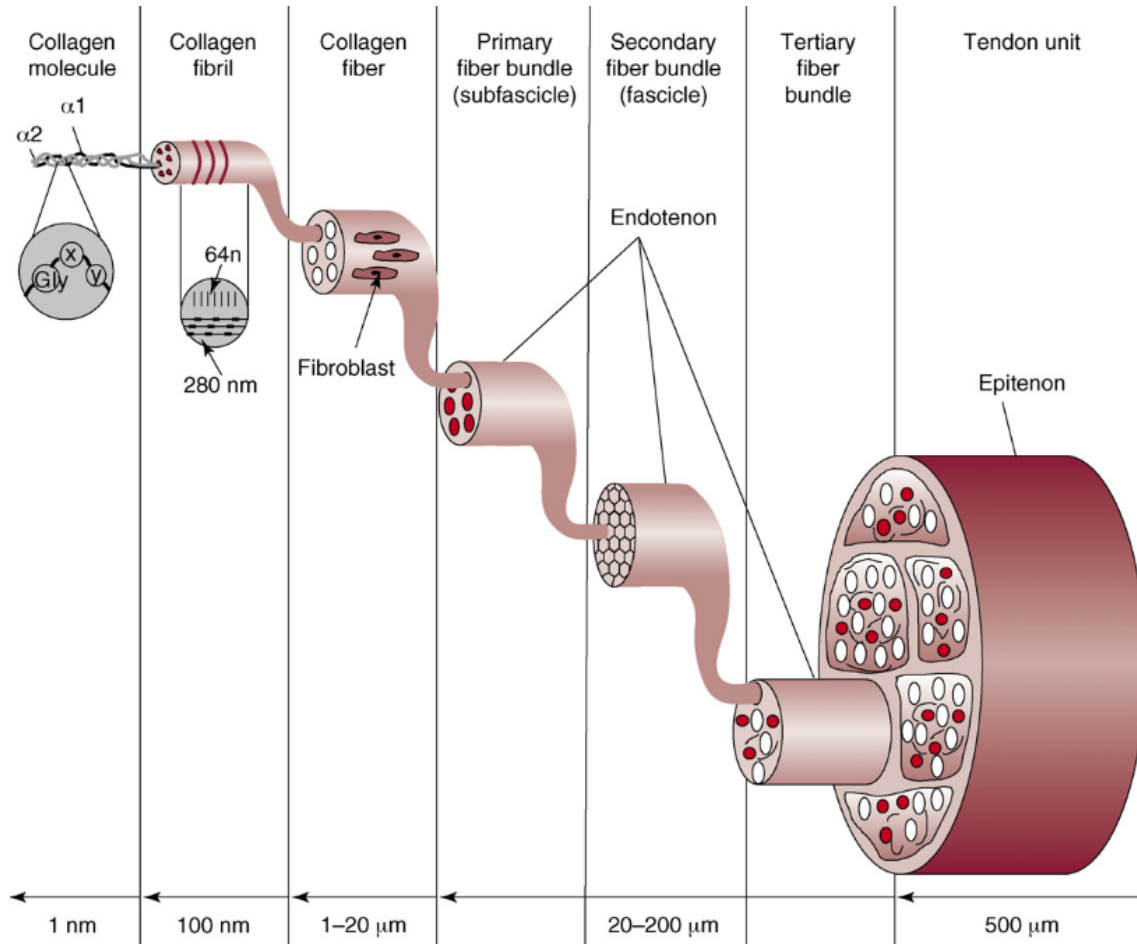


Figura 1.3 – La struttura modulare del tendine

Come riportato in (Figura 1.3) i tendini sono costituiti da fascicoli che possono raggiungere diametri di centinaia di μm e contenenti fibre caratterizzate a loro volta da fibrille di collagene che hanno un diametro variabile da 10 a 500nm ed una lunghezza di circa 100nm .

La maggior parte della ECM è formata dal *collagene* una proteina prettamente strutturale che rappresenta anche circa il 25% di tutte le proteine del corpo umano.

La capacità di fornire forza ai tessuti è una delle più importanti caratteristiche di questa proteina ed è direttamente correlata alla struttura della molecola stessa.

Il collagene è costituito da catene polipeptidiche, le catene α , strettamente intrecciate tra loro in modo da formare una superelica compatta. La struttura primaria delle singole catene è composta da oltre 1400 amminoacidi ed è caratterizzata dalla ripetizione di numerose triplette di sequenza: glicina, prolina, idrossiprolina (Gly-Pro-Hyp)_n. La particolare sequenza Pro-Hyp è responsabile della struttura secondaria della molecola che descrive la relazione spaziale della proteina dovuta alla repulsione sterica, quindi all'ingombro, tra le sequenze di prolina e idrossiprolina. Ogni singolo filamento assume poi una struttura terziaria elicoidale sinistrorsa che fornisce un'alta forza di trazione grazie alla loro rigidità e relativa inelasticità; tre filamenti si organizzano quindi in una superelica destrorsa che costituisce la struttura quaternaria del tropocollagene e la cui organizzazione e diametro modula la forza e la rigidità del tessuto.

La glicina essendo di piccole dimensioni si colloca all'interno della tripla elica mentre la prolina e l'idrossiprolina favoriscono l'avvolgimento a spirale delle catene.

I fattori di stabilizzazione delle molecole di collagene sono legati alle interazioni tra le tre eliche costituenti la superelica e sono rappresentati da legami ad idrogeno, da legami ionici o da reticolazioni intercatena, cosiddetti cross-link, che stabilizzano meccanicamente le fibre e aumentano la forza di trazione del tessuto. (2)

Dei 19 tipi di collagene individuati, tutti caratterizzati dalla presenza di triple eliche collegate tra loro in modi diversi, nei tendini e nei legamenti se ne osservano principalmente quattro tipi: il collagene di *tipo I*, di *tipo III*, di *tipo IV*, di *tipo XII*.

- Il collagene di tipo I è il più comune costituendo oltre il 90% dell'intero collagene; fa parte dei collagene di tipo fibrillare, ovvero che formano fibrille e la sua unità strutturale, *tropocollagene*, ha formula molecolare $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$; dopo essere state secrete nello spazio extracellulare, queste molecole di collagene si assemblano in fibrille di collagene visibili chiaramente al microscopio elettronico. Queste fibrille si aggregano spesso poi in fasci più grandi simili a cavi, le fibre di collagene, che hanno diametri di parecchi μm e sono visibili al microscopio ottico.

- Il collagene di tipo III fa sempre parte dei collagene che formano le fibrille e il suo tropocollagene ha una diversa formula molecolare rispetto a quello di tipo I: $[\alpha 1(III)]_3$
- Il collagene di tipo IV fa parte di quei collagene che formano reticoli. Le sue molecole, con struttura $[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV)$, si assemblano infatti in un reticolo che costituisce una parte principale della lamina basale, un sottile “tappeto” flessibile di materia extracellulare specializzata che separa le cellule tendinee o legamentose dal tessuto connettivo circostante.
- Il collagene di tipo XII è un collagene associato alle fibrille. Queste molecole, $[\alpha 1(XII)]_3$ decorano la superficie delle fibrille di collagene e si pensa che servano a collegare quest'ultime con gli altri componenti della matrice extracellulare.

Sempre all'interno della ECM sono presenti i *Glicosaminoglicani* (GAGs), carboidrati costituiti dalla ripetizione di un numero variabile di unità disaccaridi. Ci sono due tipi principali di GAGs: l'acido ialuronico e i GAGs ricchi di gruppi funzionali carichi. Quest'ultimi si possono dividere a loro volta in eparan solfato, condrotin solfato, dermatan solfato e keratan solfato. A differenza dell'acido ialuronico i GAGs con il gruppo funzionale possono subire solfatazione, sono ricchi di gruppo SO_3^- , hanno dimensioni molto minori essendo costituiti da un numero di disaccaridi tra le 20 e 200 unità e soprattutto si legano covalentemente a strutture proteiche per formare i proteoglicani. Quest'ultimi possono fungere da supporto ad un numero variabile di catene polisaccaridiche di GAGs. Mentre i PGs di grandi dimensioni hanno la funzione di occupare lo spazio fluido tra le fibrille limitando e prevenendo il loro collasso, i piccoli PGs, come la decorina che possiede una sola catena di GAGs, intervengono nell'organizzazione e nella disposizione delle fibrille di collagene.

I PGs legandosi alla superficie laterale delle fibrille, tra i gap esistenti tra le molecole di collagene consecutive, impediscono l'assemblamento di ulteriori

molecole di collagene sulla superficie. Così, regolano e dirigono le fasi della fibrillogenesi, determinando la struttura spaziale del tendine e del legamento.

È stato osservato che le fusioni tra fibrille avvengono contestualmente alla diminuzione della percentuale di proteoglicani.

Il proteoglicano più abbondante nel tessuto tendineo è la *decorina* che inibisce la formazione di larghe fibre di collagene permettendo al tessuto di adattarsi e compensare così la forza di trazione.

Un altro proteoglicano che si trova abbondantemente nelle aree in cui il tessuto è soggetto a forze di compressione è l'*aggrecano* che contribuisce a formare macromolecole gigantesche costituendo domini idratati incomprimibili adatti a compiti strutturali.

L'*elastina* è la proteina deputata a conferire elasticità alle strutture con le quali si coordina. La struttura proteica è caratterizzata dalla presenza di particolari sequenze d'aminoacidi molto ricche di glicina (*GLY*). Tale aminoacido per il ridotto ingombro sferico, conferisce enorme mobilità alla catena e la possibilità di adottare diverse configurazioni energeticamente equivalenti. La struttura primaria è caratterizzata dal fatto di non possedere una sequenza regolare d'aminoacidi. Le proprietà elastiche di questa proteina sono legate alle variazioni d'entropia; una forza esterna applicata sul tessuto elastico agisce aumentando l'ordine molecolare della struttura diminuendo così l'entropia, che invece aumenta se il carico applicato viene rimosso così da riportare l'elastina alla sua configurazione iniziale. La tendenza a tornare alla configurazione disordinata è responsabile del ritorno elastico del materiale. (4)

1.2 PROPRIETÀ MECCANICHE DEL TENDINE E DEL LEGAMENTO

Il ruolo primario del tendine è trasmettere la forza del suo muscolo associato all'osso, quindi deve essere relativamente rigido e forte quando sottoposto a tensione.

Il legamento deve invece trasferire il carico dall'osso lungo la direzione longitudinale del legamento stesso. (3)

Una tipica curva Stress-Strain (Tensione-Deformazione) per un tendine e un legamento è riportata rispettivamente in Figura 1.4A – 1.4B.

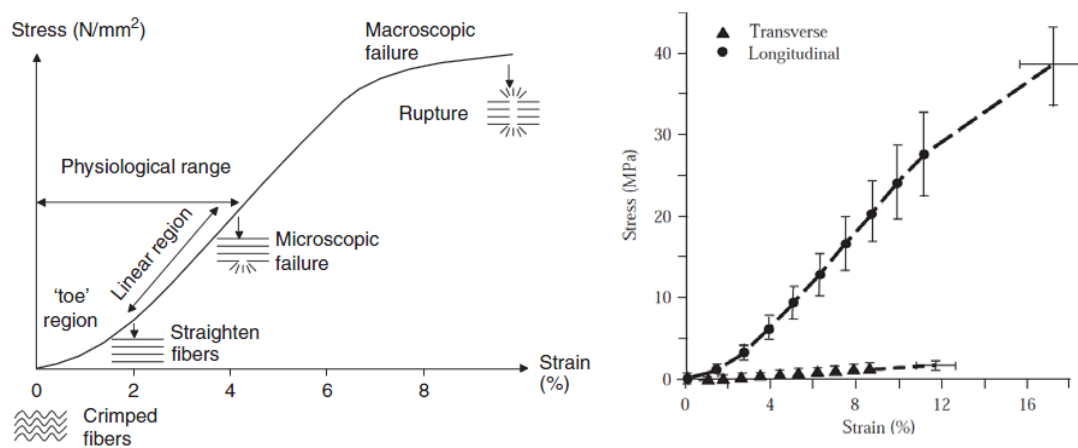


Figura 1.4 – A: Curva Tensione-Deformazione per il tendine. B: Curva Tensione-Deformazione per il legamento

Proprietà meccaniche come la rigidità alla trazione e il carico di rottura, sono determinate usando convenzionali macchine di test ingegneristici; le condizioni di prova influiscono molto sulle proprietà meccaniche che si vogliono ottenere e ogni test è finalizzato a ottenere solo certe informazioni dal materiale. Le prove che si effettuano sono (5):

- Prove uni-assiali: per caratterizzare il comportamento statico di tendini/legamenti (realizzati su provini con un alto rapporto lunghezza-larghezza).
- Prove bi-assiali: per ottenere informazioni sul comportamento del tessuto in due dimensioni (realizzati su provini con un basso rapporto tra lunghezza e larghezza).

- Prove a taglio: per avere informazioni sul comportamento multi-assiale dei tessuti.

Come si può osservare dai due grafici, il comportamento dei tendini e dei legamenti è molto simile.

Nella *toe region*, la regione iniziale del grafico che corrisponde ai valori di tensione e deformazione generati nei tendini e legamenti durante il loro normale funzionamento, all'aumentare della deformazione non si ha un aumento significativo di tensione; in questa fase le fibre e fibrille di collagene iniziano a srotolarsi lungo la direzione del carico applicato.

Alla fine della *toe region*, sia il tendine che il legamento diventano più rigidi poiché le fibre di collagene sono del tutto stirate e comincia una fase in cui il comportamento diviene lineare.

Qui il tendine è stirato tra minimo il 2% e massimo il 4% mentre il legamento tra circa il 4% e il 12%.

La pendenza di questa regione lineare dipende dal modulo di Young (d'elasticità) del tendine, che esprime la rigidità del materiale ad allungamento o ad accorciamento. Le fibre vengono quindi deformate lungo il loro asse. La deformazione in questa regione è reversibile, ovvero se nessuna tensione è più applicata il tendine, o il legamento, tornano al loro stato di riposo. Alla fine della zona lineare, oltre il 4% per il tendine oltre il 12% per il legamento, gli sforzi cominciano a non essere più sostenibili per il tessuto a causa del danneggiamento subito sia dalle fibrille di collagene che dai proteoglicani.

Con un ulteriore aumento della deformazione la lacerazione diviene macroscopica e un'ancora maggiore tensione porta alla rottura del tessuto, 70MPa per il tendine, 30MPa per il legamento.

La forma della curva è tale che l'area sottesa in particolare alla *toe region*, è molto piccola, quindi l'energia immagazzinata nel tessuto per stirarlo è bassa.

I valori del modulo elastico sono più bassi per i legamenti rispetto ai tendini. Variano a seconda del tipo, tra i 300 e 700 MPa i primi e tra i 650 e 1600 MPa i secondi. Oltre al modulo elastico più elevato il tendine ha uno sforzo a rottura maggiore. Tale comportamento è imputabile al fatto che i tendini hanno un

contenuto di collagene superiore a quello dei legamenti ed è proprio questa maggior quantità di matrice fibrosa a conferire maggiori proprietà meccaniche ai tendini.

2. PANORAMICA SULL'INGEGNERIA TISSUTALE DEI TENDINI E DEI LEGAMENTI

2.1 INNESTI BIOLOGICI, PROTESI ARTIFICIALI, INGEGNERIA TISSUTALE

Le lesioni che riguardano indifferentemente i tendini o i legamenti possono essere di due tipi: acute o croniche.

Le lesioni acute sono causate principalmente da traumi mentre le lesioni croniche sono suscitate dalla ripetizione di un carico meccanico con modulo inferiore alla soglia di rottura e alle corrispondenti risposte infiammatorie.

Entrambi i tessuti sono in grado di guarire da certe lesioni naturalmente, ma le loro condizioni originarie non sono ripristinabili a causa della diffusione di piccole cicatrici (*scar tissue*) nel sito della ferita che condizionano in modo importante le proprietà biomeccaniche rendendole inferiori a quelle del tendine o legamento non lesionato.

Il danno alla "competenza" meccanica è dovuto soprattutto alla composizione della ECM e al disallineamento delle fibre di collagene nelle zone cicatrizzate (6).

Per aumentare la qualità della riparazione dei tessuti, sono state sviluppate varie tecniche di riparazione chirurgica *ad hoc* attraverso l'uso di suture e di ancoraggi al tessuto molle. Tutto quello che è stato provato attraverso questi metodi non ha portato al raggiungimento delle capacità biomeccaniche del tessuto prima di lesionarsi.

Attualmente esistono terapie alternative per la loro riparazione come gli innesti biologici (*autografts*, *allografts* e *xenografts*), le protesi permanenti artificiali e l'ingegneria tissutale.

L'innesto ha alcuni difetti che ne limitano l'utilizzo: è utilizzabile solo in casi limitati, può danneggiare il sito che lo ospita, può provocare infezione o causare il rigetto del tessuto.

La protesi artificiale permanente ha bisogno di materiali duraturi e quasi sempre conduce ad un peggioramento della sua meccanica nel tempo.

L'Ingegneria Tissutale rappresenta il più promettente degli approcci per questo tipo di tessuti. Essa utilizza strategie ingegneristiche interdisciplinari e il suo obiettivo è favorire la piena rigenerazione del tendine/legamento, piuttosto che sostituirlo fisicamente con sostituti estranei al corpo parzialmente funzionanti. Prima di entrare nel dettaglio di questa relativamente nuova ma già molto importante materia di studio, riporto brevemente quali sono i mezzi a disposizione per l'analisi del tessuto da guarire.

2.2 CRITERI DI SUCCESSO DELL'INGEGNERIA TISSUTALE

Dato il grande numero d'approcci che si stanno studiando per produrre i "pezzi di ricambio" per i tendini/legamenti attraverso l'ingegneria tissutale, è necessaria un'attenta valutazione nella determinazione di quali approcci siano più favorevoli per una determinata applicazione. Nello stabilire le misure dei risultati, è importante tener presente che i criteri applicati saranno diversi a seconda che l'approccio miri a riparare o rigenerare il tessuto.

Riparare un tessuto non è come rigenerarlo.

La *riparazione* riguarda generalmente la formazione di tessuto che ha proprietà meccaniche e fisiche adeguate per ristabilirne la funzione da svolgere, ma non possiede più l'esatta struttura originaria.

Al contrario la *rigenerazione*, prevede la creazione di un tessuto ex novo, con una struttura identica a quella presente prima della lesione.

Sia per la riparazione che per la rigenerazione di tutti i tendini/legamenti del corpo, non esiste un singolo criterio di successo che indichi i giusti parametri da ottenere per arrivare al risultato ottimale.

Un metodo per valutare la riuscita del nuovo tessuto prodotto, è confrontare i suoi parametri biomeccanici, come le forze, le tensioni e le deformazioni con quelle presenti durante le normali funzioni giornaliere del tessuto normale.

Oltre a questi parametri biomeccanici, che approfondirò in seguito nei specifici casi, vengono prese in esame altre considerazioni di tipo biologico, anche se su quali di queste fare affidamento, non c'è tutt'ora tra gli studiosi, un comune accordo.

Il motivo di questa mancanza di generalità è che ciascun criterio dipende dal tipo di tendine o di legamento e dalla sua posizione all'interno del corpo e poiché la struttura e la funzione dei tessuti non sono costanti, non c'è uno standard da seguire.

Ci sono però varie tecniche comuni che definiscono i parametri biologici sui quali basarsi per iniziare a valutare le caratteristiche dello scaffold o del tessuto creato.

2.2.1 Istologia e Immunoistochimica

Sia l'istologia che l'immunoistochimica consentono di ottenere informazioni visive su un campione specifico.

L'istologia descrive gli aspetti morfologici e strutturali di base delle cellule e dei tessuti.

L'*esame istologico* inizia con una prima operazione detta *fissazione* con la quale si preserva la struttura della cellula dalle alterazioni dovute alla sua morte, trattandola chimicamente in modo tale da rendere le sue varie componenti insolubili. Dopo aver scelto i campioni da analizzare si procede alla seconda fase, la *processazione*, attraverso cui questi campioni vengono disidratati con solventi organici e trattati così da permettere la permeazione da parte della cera paraffina, la quale solidifica il tessuto permettendo il taglio di sottili sezioni che vengono poi a loro volta tagliate dal microtomo in sezioni di 2-3 μm di spessore e poste sui vetrini per l'analisi dopo essere state opportunamente colorate per mezzo di coloranti acidi e basici.

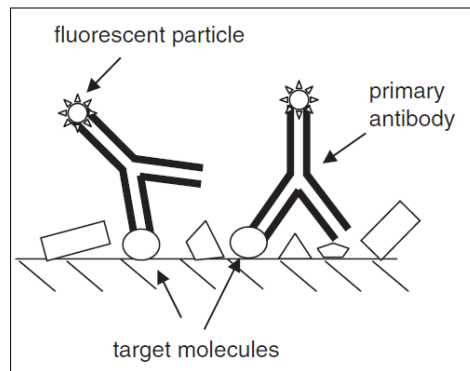
Assieme alla microscopia che è trattata più avanti, l'istologia è utilizzata per analizzare la struttura di una sezione di campione.

L'isotochimica utilizza tecniche atte alla localizzazione *in situ* di particolari molecole oltre che nelle cellule anche nelle componenti extracellulari dei tessuti.

In particolare l'immunoistochimica consente la localizzazione citochimica al microscopio a fluorescenza o elettronico, di antigeni che sono in genere proteine e polisaccaridi.

L'esame *immunoistochimico* può essere effettuato con due metodi, un diretto uno indiretto (7):

- nel primo, le sezioni di tessuto sono esposte all'anticorpo specifico di cui si vuole studiare la localizzazione, il quale si lega solo nei siti in cui è presente il suo antigene. Se l'anticorpo viene marcato con fluoresceina si forma un complesso antigene – anticorpo fluorescente rilevabile al microscopio a fluorescenza.



*Figura 2.1 – Esame immunoistochimico diretto.
L'anticorpo si lega all'antigene corrispondente.*

- nel metodo indiretto, usato più comunemente, l'antigene viene fatto reagire con l'anticorpo specifico non marcato detto anticorpo primario. Una volta formato, il complesso antigene – anticorpo viene fatto reagire con un altro anticorpo questa volta marcato, mirato contro l'anticorpo primario, (anticorpo secondario). Più coppie d'anticorpo secondario si possono legare all'anticorpo primario con il risultato di dare un segnale più intenso.

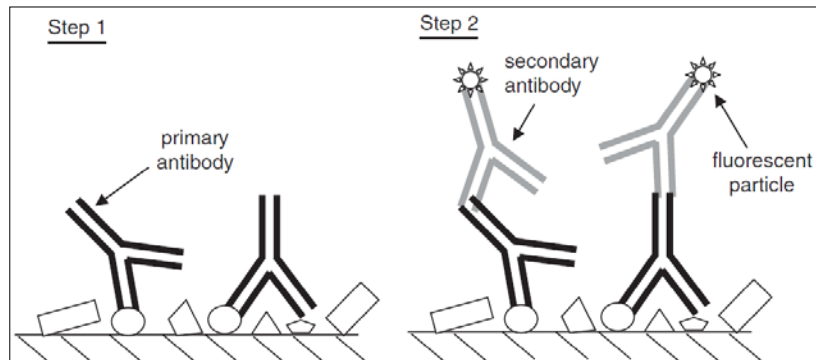


Figura 2.2 - Esame immunohistochemico indiretto. Composto da due passi, prima l'anticorpo si lega al suo antigene, poi un secondo anticorpo reso fluorescente si lega all'anticorpo primario.

Gli esami immunohistochemici sono utilizzati spesso per fare immagini istologiche e per quantificare il numero di proteine presenti nel campione.

2.2.2 La Microscopia

La microscopia è un'analisi fondamentale per la verifica visiva del campione man mano realizzato, in tutti i passaggi che portano alla fabbricazione del nuovo tessuto tendineo / legamentoso.

Lo strumento più semplice che può essere utilizzato per osservare un campione è il microscopio ottico composto, il quale usa un sistema accoppiato di due lenti per ingrandire l'immagine, è stato continuamente migliorato sin dagli anni '600 fino ad arrivare ai microscopi attuali che sono suoi lontanissimi parenti.

Nei secoli sono state rese disponibili tecnologie sempre più sofisticate per l'acquisizione delle immagini, che hanno potuto dare le informazioni necessarie agli studiosi per la formazione dei più recenti modelli tissutali.

Le due tecniche fondamentali per la verifica visiva delle idee dei ricercatori sono la microscopia confocale e la microscopia a scansione elettronica (4):

- *Microscopia Confocale:*

La risoluzione nei microscopi confocali è paragonabile a quella dei microscopi ottici; tuttavia questi possono focalizzare su piani orizzontali distinti nello spazio tridimensionale ottenendo così una risoluzione tridimensionale invece che bidimensionale.

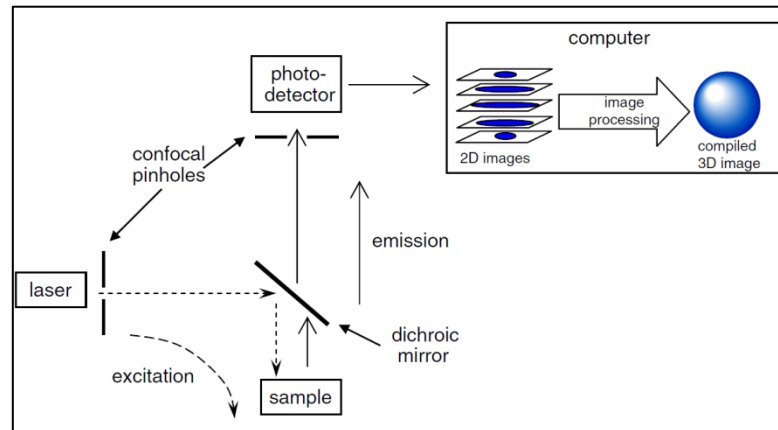


Figura 2.3 – Schema di funzionamento per il microscopio confocale

Come descritto dalla Figura 2.3, il laser emette una sorgente luminosa con una lunghezza d'onda corta e quindi con un'alta intensità. La sorgente passa attraverso uno specchio diroico, il quale filtra tutte le lunghezze d'onda minori di quella emessa dalla sorgente stessa ed eccita gli elettroni del campione (linea tratteggiata) i quali emettono una fluorescenza sufficiente per passarci attraverso (linea continua). Prima di arrivare al fotomoltiplicatore il raggio d'elettroni raggiunge un *pinhole*, un filtro che impedisce ad altre sorgenti luminose di arrivare al fotomoltiplicatore. La dimensione del pinhole può essere regolata per tarare al meglio lo strumento secondo le esigenze del caso. Le immagini che si ottengono in questa maniera sono 2D. Per creare l'immagine tridimensionale si utilizzano software per l'elaborazione d'immagini al computer.

- *Microscopia A Scansione Elettronica:*

L'altra apparecchiatura che viene comunemente usata per ottenere immagini di tendini e legamenti nell'ingegneria tissutale è il microscopio elettronico a scansione (SEM).

Nel SEM il pezzo di tessuto adeguatamente preparato, viene esplorato da un fascio molto sottile di elettroni detti primari, circa 5nm di diametro, che viene focalizzato su una piccola area e deflesso lungo traiettorie che formano un tracciato per righe esplorando tutta l'area del campione.

Gli elettroni secondari, che emergono dalla superficie dell'oggetto colpito dal raggio primario, vengono raccolti da un rivelatore; questo emette segnali che amplificati, modulano l'intensità del fascio di elettroni e l'ingrandimento finale dell'oggetto viene visualizzato su un computer.

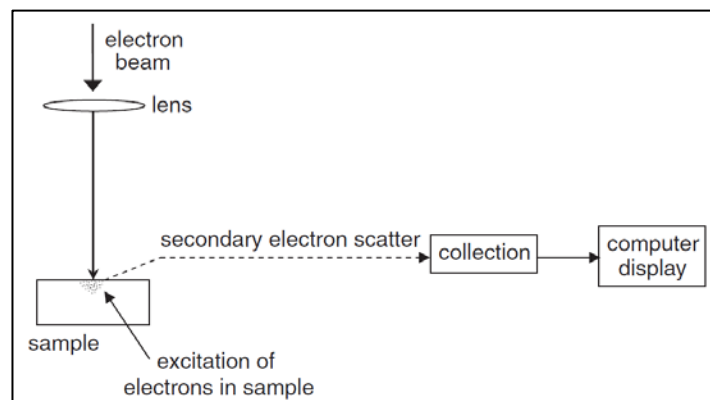


Figura 2.4 - Schema di funzionamento per il SEM

Tale microscopio consente di ottenere immagini tridimensionali con grandissime profondità di campo (fin ad alcuni μm). Il potere di risoluzione del microscopio elettronico a scansione è di circa 20 nm. Per mezzo di sorgenti elettroniche speciali (per esempio l'esaboruro di lantanio) si possono raggiungere risoluzioni più elevate (3nm). Queste sorgenti elettroniche permettono la microanalisi ai raggi X dell'emissione secondaria di elettroni, consentendo una valutazione non solo qualitativa ma anche quantitativa della distribuzione di alcuni elementi chimici di cui è costituito il campione.

3. LA PROGETTAZIONE DELLO SCAFFOLD

L'ingegneria tissutale è un campo di studio interdisciplinare che fonde le recenti e numerose ricerche di biologia cellulare e molecolare con gli studi aggiornati di ingegneria chimica, dei materiali e biomeccanica.

Un possibile approccio per la ricostruzione di un tessuto attraverso l'ingegneria tissutale è quello di impiantare le cellule in uno scaffold tridimensionale, che le fa crescere e proliferare in modo che sintetizzino matrice extracellulare e altre molecole biologiche, facilitando la formazione di nuovo tessuto perfettamente integrato nell'organismo.

Si crea dunque uno dei principali problemi e allo stesso tempo fonte di successo dello studio; la scelta e la fabbricazione dello scaffold.

Quest'ultimo può essere prima di tutto sintetico oppure naturale.

Lo scaffold sintetico offre la possibilità di controllare con molta precisione le sue proprietà meccaniche e il suo tasso di degradazione mentre uno scaffold naturale è molto più efficiente nel promuovere l'adesione e la proliferazione cellulare.

Numerosi studi, hanno coinvolto diverse tecniche di fabbricazione per una produzione dello scaffold finalizzato a sviluppare nuovi biomateriali per riuscire a fornire la migliore *forza meccanica, interconnettività e porosità*. Al contrario altri si sono concentrati sul più appropriato *tipo di cellula* per le varie applicazioni in questione, basandosi su scaffold già abbastanza ottimizzati per l'applicazione.

La scelta ideale sia dello scaffold che delle cellule da impiantare varia in relazione allo specifico tessuto che deve poi essere ingegnerizzato e di quanto è stato lesionato.

La relazione ciclica che risulta esserci tra le cellule e lo scaffold ha portato alla formulazione (*Figura 3.1*) di un ciclo a retroazione cellula -> scaffold -> cellula , influenzato sia dalla funzionalità stessa delle cellule sia complessivamente dalle proprietà dello scaffold (8).

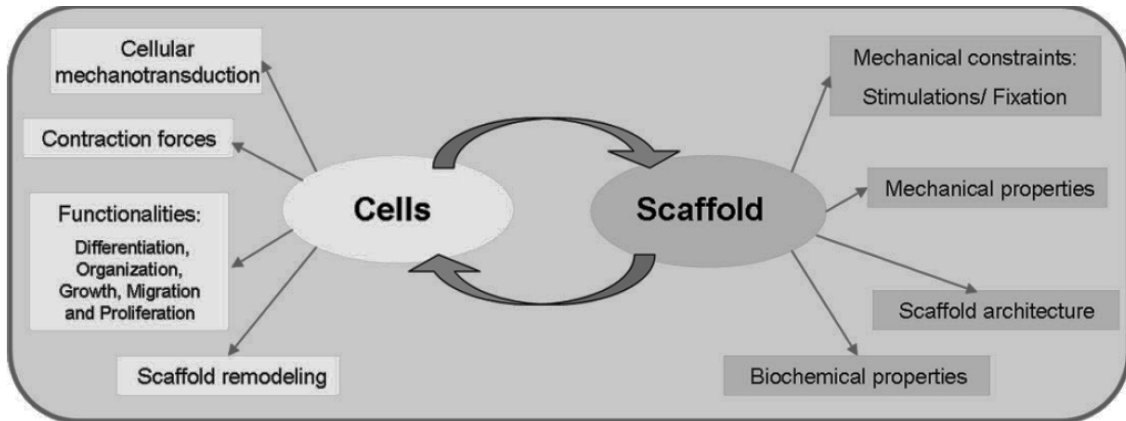


Figura 3.1 – L'interazione tra cellule e scaffold

3.1 INFLUENZA DELLE CELLULE SULLO SCAFFOLD. CARATTERISTICHE MACROSCOPICHE

3.1.1 Proprietà Meccaniche Del Materiale

I primi problemi da affrontare durante lo studio di uno scaffold adatto a supportare il nuovo tessuto, sono gli effetti meccanici indotti dalle cellule sul loro scaffold 3D associato; questi causano infatti la deformazione dello scaffold stesso.

In questo senso i ricercatori stanno cercando di capire quali siano le cellule che influiscono maggiormente nella deformazione e quali siano i metodi a disposizione per controllarle. Studi che riguardano il rimodellamento dei supporti indotto dalle cellule, sono basati di solito su scaffold fatti di gel di collagene. In particolare, E. Bell et al. (10), hanno condotto degli esperimenti in laboratorio esaminando e riportando la contrazione del gel di collagene, preparato su dischi di Petri, nel quale sono stati impiantati fibroblasti dermali umani. Per misurare i diametri dei reticoli di collagene, i dischi sono stati posizionati sopra una matrice trasparente rigata. I fibroblasti sono stati capaci di interagire con le fibrille di collagene producendo un loro arrangiamento più denso ed escludendo l'acqua durante il processo. Per un reticolo con componenti di diametro di 53mm, la massima contrazione è risultata in una riduzione dell'area del reticolo di 1/112 in 9 giorni (85%), (Figura 3.2).

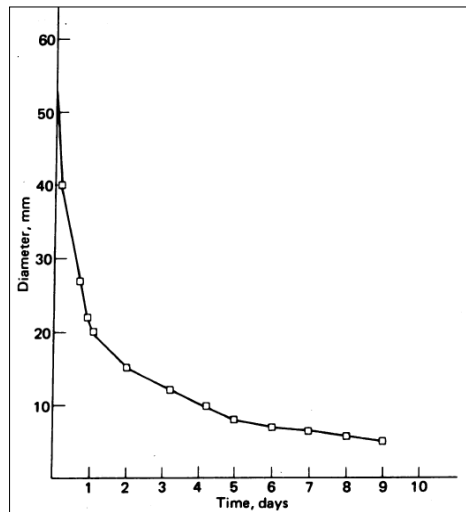


Figura 3.2 - Massima contrazione del reticolo

È importante considerare inoltre che già dopo sole 24 ore, l'area è diminuita di 1/7 rispetto a quella originaria. Una volta ridotto di 7-8mm, i bordi del disco hanno iniziato a deformarsi e perdere la loro forma circolare.

La velocità e l'estensione della contrazione del reticolo *in vitro*, può essere regolata variando le proteine contenute nel reticolo, il numero di cellule impiantate nel reticolo e eventualmente applicando inibitori in appropriate concentrazioni.

Nuovi studi condotti da Dado et.al. (8), hanno dato altri dati interessanti su come la riduzione dell'area dello scaffold è avviata dalle forze meccaniche esercitate dalle cellule seminate. Esaminando questa volta cinque differenti composizioni di materiali per lo scaffold, si è calcolata una diminuzione di circa il 60% dell'area originale già un giorno dopo la semina, per quelli composti da PLGA e PLGA+collagene.

Ponendo successivamente un device di supporto lungo i bordi dello scaffold per prevenire le sue deformazioni, forzandolo in questo modo a resistere alla forza generata dalle cellule, si è riusciti a mantenere le sue dimensioni originali.

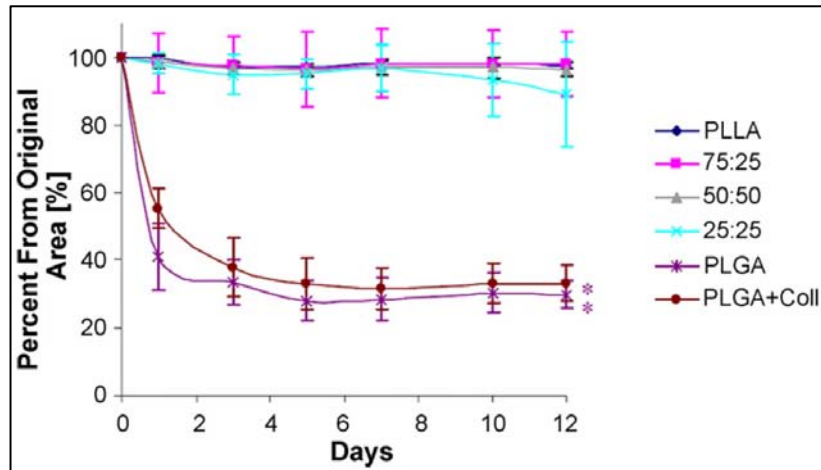


Figura 3.3 – Riduzione dell'area su 5 composizioni di materiali diverse

L'aver capito che le forze cellulari provocano effetti misurabili nel loro micro-ambiente dà luogo alla possibilità di migliorare le proprietà che devono avere gli scaffold ideali.

Per quantificare le forze generate dalle popolazioni di cellule all'interno di un ambiente 3D, sono stati divulgati diversi metodi che sono poi stati anche efficacemente utilizzati per migliorare la comprensione di processi biologici come la guarigione delle ferite.

Proprio in questo senso Eastwood et al.(13) hanno sviluppato la cosiddetta *CFM*, *Culture Force Monitor*, permettendo l'assestamento delle forze meccaniche attraverso una forza molto sensibile trasduttrice, che registra spostamenti di circa $10^{-6} m$.

In breve, la prima versione dello schema CFM, prevede il posizionamento della matrice di gel di collagene con le cellule già impiantate all'interno, su un disco di Petri e l'imposizione di una piccola tensione da parte di due barrette una fissa e una flessibile, quest'ultima che connette il campione attraverso un *wire frame* ad un estensimetro.

L'estensimetro fornisce lo spostamento dello scaffold rispetto alla sua posizione di zero e questa misura viene convertita in una forza. Le forze "rumorose" di background, generate dalle cellule del gel di collagene libere sono registrate e sottratte alla risposta totale specifica.

Viene poi generando un grafico d'uscita, come ad esempio quello riportato in *Figura 3.4*, che rappresenta l'andamento della forza generata da 10^6 fibroblasti incorporati all'interno di un gel di collagene, nel tempo. Da questa curva si ricava un dato significativo: un fibroblasto all'interno di una matrice di gel di collagene, genera una forza media di circa $0,1 nN$ dopo solo otto ore dalla semina.

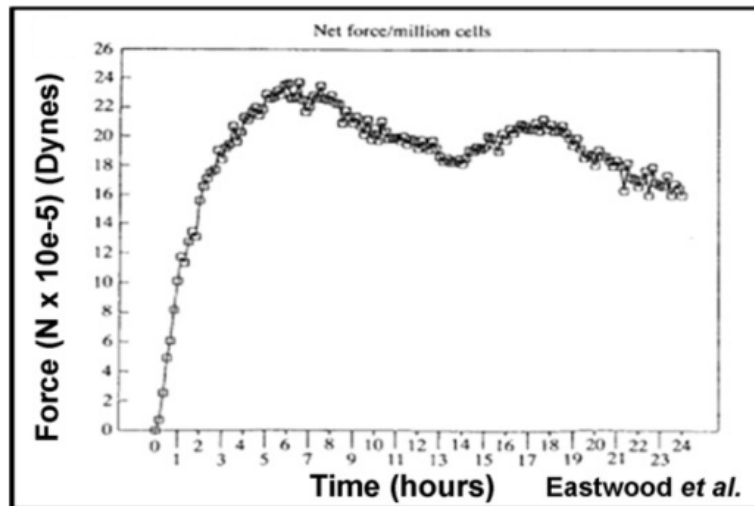


Figura 3.4 - Andamento della forza generata nel tempo da 10^6 fibroblasti all'interno di un gel di collagene

Grafici più avanzati del processo CFM sono stati elaborati da Freyman et al.(9) per determinare anche l'effetto della densità di fibroblasti sulla forza contrattile, in modo da poter comparare misure indipendenti fatte a diversi livelli selezionati di densità cellulare.

È stato possibile ricavare questi dati compiendo alcune modifiche al sistema descritto precedentemente, così da poter effettuare misurazioni con un rumore di fondo (background) molto limitato.

La modifica fatta, *Figura 3.5*, è stata quella di sorreggere la matrice a sinistra con un "clamp" (morsetto) fisso e a destra con un'altro "clamp" collegato direttamente alla trave a sbalzo, così da avere una misura più pulita convertendo la deflessione della trave misurata con l'estensimetro, in forza.

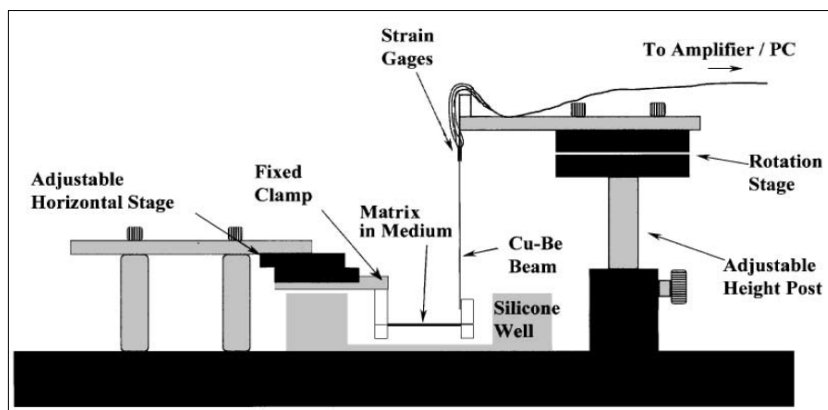


Figura 3.5 – Schema per il CFM

Attraverso questa nuova strumentazione i ricercatori sono riusciti a ricavare la curva che descrive la forza contrattile di fibroblasti impiantati all'interno di una matrice composta da collagene e GAGs, sia in funzione del tempo, sia in funzione della densità di fibroblasti, e quindi del numero di cellule che aderiscono alla matrice.

Il grafico ottenuto, *Figura 3.6*, dimostra come a tutte le densità cellulari, la forza contrattile aumenta dopo un ritardo iniziale dovuto alla minor forza momentanea delle cellule che stanno aderendo rispetto alle cellule libere all'interno della matrice e dopo circa 12h, arriva ad un valore costante asintotico; la pendenza media della curva forza-tempo rimane infatti a circa $3 \times 10^{-5} \text{ N/h}$, quindi ad un valore prossimo allo zero.

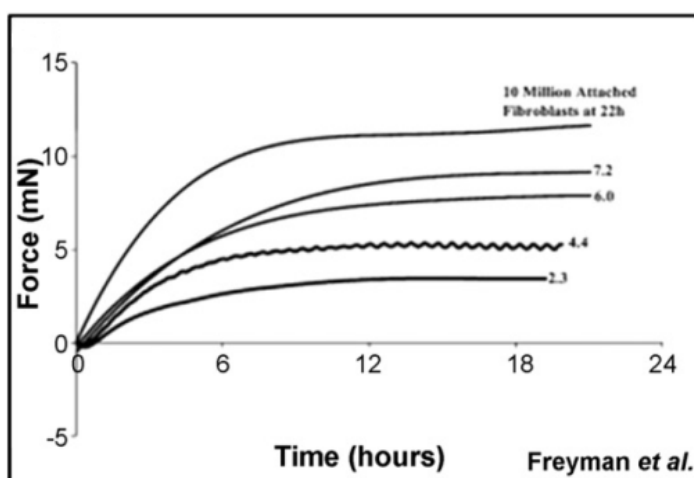


Figura 3.6 – Forza generata da diverse densità di popolazioni di fibroblasti nel gel di collagene.

Una più alta densità di fibroblasti impiantati all'interno della matrice, si traduce in un aumento della forza contrattile e quindi in un suo maggior valore asintotico. Il grafico di *Figura 3.6*, mostra inoltre come la forza asintotica sia linearmente proporzionale alla densità di fibroblasti aderenti alla matrice; in particolare il valore della pendenza della curva, 1 nN/fibroblasto , rappresenta la forza contrattile per cellula e può essere descritta come:

$$F_{asint} = N_{cell}F_{cell}$$

Una normalizzazione del comportamento della forza contrattile dovuta all'adesione cellulare funzione del tempo è data dalla relazione:

$$F = F_{asint}(1 - e^{-(t/\tau)})$$

I valori delle due costanti, F_a e τ sono state ottenute utilizzando un algoritmo, implementato in MATLAB, bastato sui dati ricavati durante l'esperimento.

Exponential curve fit parameters (τ , F_a)		
Total no. of attached cells in matrix ($\times 10^6$)	Time constant, τ (h)	Asymptotic value, F_a (mN)
2.3 ± 0.31	5 ± 1.3	3.7 ± 0.6
4.4 ± 0.21	4 ± 0.5	5.4 ± 1.4
6.0 ± 0.13	5 ± 0.4	8.1 ± 0.5
7.2 ± 0.05	7 ± 1.5	10 ± 1.9
10 ± 0.23	4 ± 0.5	12 ± 0.7

Figura 3.7- valori ottenuti in MATLAB per le due costanti.

Quello che si osserva è come i valori per τ , non si discostano molto da un suo valor medio ($5.2 \pm 0.5\text{h}$) e quindi le velocità con cui agiscono le forze generate possono essere considerate indipendenti dalla densità di fibroblasti.

Combinando le due equazioni precedenti i ricercatori ne hanno stabilito una migliore e più generale che relaziona tutti i parametri che agiscono durante questo processo d'influenza cellulare sulla matrice:

$$F(t, N_{cell}) = F_{cell}N_{cell}(1 - e^{-(t/\tau)})$$

Il risultato ottenuto è rappresentativo per la risposta media, di una popolazione cellulare con densità compresa tra 400 e 2000 cell/mm³.

Altri miglioramenti della rappresentazione *CFM* di Eastwood stanno portando a sviluppare sistemi più complessi ancora però in fase di studio come il *t - CFM* che dovrebbe permettere di esaminare la risposta delle cellule a vari stimoli meccanici mentre si sta seminando all'interno dei costrutti 3D.

Le tecniche descritte sopra dimostrano come le forze contrattili esercitate dalle cellule impiantate nelle matrici siano quantificabili.

Queste misure sono utili per conoscere l'influenza delle cellule che possono essere impiantate nei vari scaffold e quindi sceglierne il tipo e la giusta quantità. Inoltre stanno servendo come base per uno studio più approfondito del meccanismo delle forze contrattili da loro generato. Nell'ingegneria tissutale, stimare le forze meccaniche all'interno degli scaffold è difficile poiché queste possono cambiare l'architettura della matrice con prima conseguenza la variazione delle dimensioni dei pori. Queste modifiche portano a nuovi fenomeni di adesione o dissociazione delle cellule dalla matrice e quindi ad un loro diverso comportamento rispetto a quello previsto.

Le proprietà meccaniche dello scaffold determinano inoltre la sua resistenza all'usura e alla degradazione sia *in vitro* che *in vivo*.

Accoppiamenti appropriati tra tipi di cellule e proprietà degli scaffold sono d'obbligo per condurre al miglioramento delle tecniche d'ingegneria tissutale, al fine di fornire tessuti più robusti e con potenziali incrementi terapeutici.

I risultati descritti sopra mettono in evidenza l'importanza di capire oltre al contributo delle forze di trazione delle cellule e le conseguenti deformazioni del substrato anche l'influenza della rigidità della matrice sul tessuto ingegnerizzato finale.

3.2 INFLUENZA DELLO SCAFFOLD SULLE CELLULE. CARATTERISTICHE MICROSCOPICHE

L'interazione tra le cellule e il loro ambiente è influenzata dall'architettura della matrice e dalle sue proprietà meccaniche e biochimiche. L'influenza meccanica dello scaffold dipende infatti dalle sue proprietà strutturali, quali la rigidezza, la dimensione e il numero di pori, il tasso di degradazione e i materiali con i quali è composto.

3.2.1 La Rigidezza

La *rigidezza* dello scaffold è un parametro molto importante per lo sviluppo cellulare.

Essa è definita dal modulo di Young (E), ovvero la pendenza della classica curva tensione–deformazione, nella quale la tensione è la forza su unità d'area e la deformazione la normale deformazione indotta.

Gli effetti della rigidezza degli scaffold sulla proliferazione cellulare sono in fase di studio e interessanti risultati sono stati ottenuti da *Hadjipanayi et al.* (11).

Per riuscire a progettare al meglio tessuti connettivi ingegnerizzati basati su scaffold di collagene o gel di collagene è importante saper regolare la proliferazione cellulare sullo scaffold. Studi noti in letteratura ormai da tempo, hanno stabilito che un carico meccanico applicato alla matrice stimola la divisione cellulare, mentre la perdita di tensione meccanica, inibisce la proliferazione e induce all'apoptosi.

Il campo d'approcci per controllare efficacemente la rigidezza delle matrici include la manipolazione delle composizioni chimiche dello scaffold, la modifica dell'architettura dello scaffold, l'applicazione di una predeterminata deformazione e tecniche di compressione. L'equipe, ha usato proprio quest'ultima tecnica: i gel sono stati compattati da una combinazione di processi di compressione e assorbimento come mostrato in *Figura 3.8*.

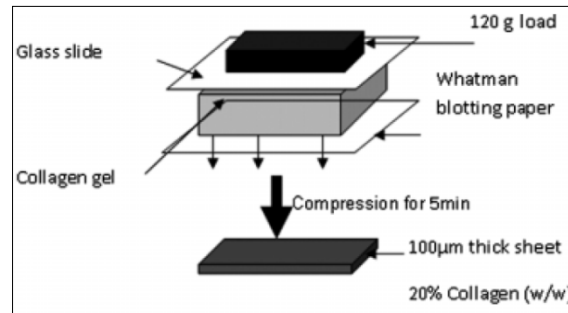


Figura 3.8 – Gel di collagene compressi con un carico applicato

Una fitta maglia inossidabile d'acciaio di $165 \mu\text{m}$ e uno strato di maglia di nylon sono stati posizionati su un doppio strato di carta assorbente Whatman. La matrice di collagene è stata posizionata sulla maglia di nylon, ricoperta con una seconda maglia di nylon e caricata con un blocchetto di metallo pesante 120 g per 5 minuti a temperatura ambiente, così da formare un foglio piano di collagene protetto da due maglie di nylon. Le matrici di collagene compresse sono state sfilate dalle maglie di nylon e messe in pozzi di coltura (culture wells) contenenti 5 ml di terreno di coltura completo. Per produrre matrici di collagene di un desiderato livello d'idratazione, e quindi di densità, i gel di collagene sono stati lasciati sotto la compressione dovuta al loro stesso peso (non è stato applicato nessun carico) sulla carta assorbente per un certo periodo di tempo dato dalla sua perdita di liquidi rispetto a una curva in funzione del tempo standard. Per una data percentuale di perdita dei fluidi, è possibile calcolare la percentuale di densità del collagene della matrice risultante.

Le proprietà meccaniche delle matrici di collagene compresse plasticamente, sono state rilevate attraverso un analizzatore dinamico meccanico. La relazione tra lo stress e lo strain è risultata lineare per tutti i campioni analizzati e quindi si è potuto calcolare il modulo di Young con la formula: $E = \left(\frac{F}{A}\right) \left(\frac{L}{\Delta L}\right)$ dove A è l'area della sezione indeformata, F è la forza, L è la lunghezza in deformata e ΔL è la variazione di lunghezza.

Lo studio effettuato ha dimostrato come i fibroblasti dermali umani (*HDF*) seminati all'interno delle matrici flottanti non hanno mostrato nessuna proliferazione nel tempo, ma i fibroblasti coltivati alla stessa densità iniziale e nelle stesse matrici ma attaccate (non più flottanti ma con la possibilità di sviluppare una tensione isometrica) dopo un periodo di ritardo hanno cominciato a proliferare come mostrato nel grafico di *Figura 3.9*:

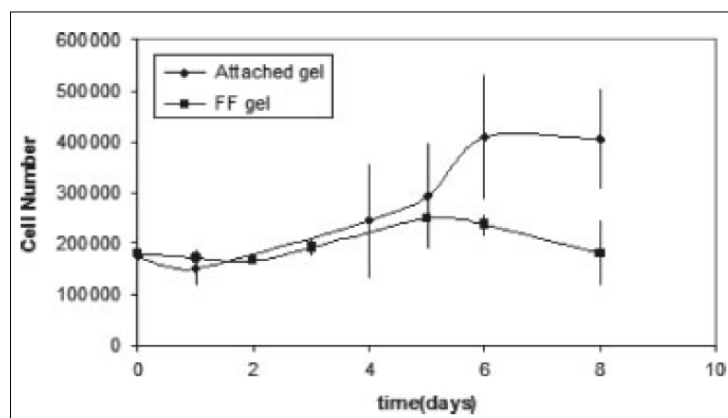


Figura 3.9 – Proliferazione dei fibroblasti in matrici flottanti e attaccate

Sono stati misurati successivamente i cambiamenti ai moduli di Young per i gel di collagene compressi a tre diversi livelli di perdita di fluidi, 50%, 75%, 99%. Questo processo ha prodotto matrici di collagene con 0.4%, 0.7% e 20% di densità del collagene rispettivamente. Analisi meccaniche dinamiche di queste matrici hanno stabilito che l'aumento della densità della matrice di collagene risulta più alta proporzionalmente alla rigidità della matrice.

La più grande proliferazione (87%) è stata osservata nelle matrici con lo 0,7% di collagene comparata con lo 0.4% che ha avuto un aumento del 25% di cellule dopo 2 giorni di coltura. Come si aspettavano i ricercatori inoltre, non c'è stata proliferazione nella matrice non compresse, 0,2%.

Un simile pattern di crescita è stato osservato anche dopo 6 giorni di coltura.

I risultati sono schematizzati in *Figura 3.10*:

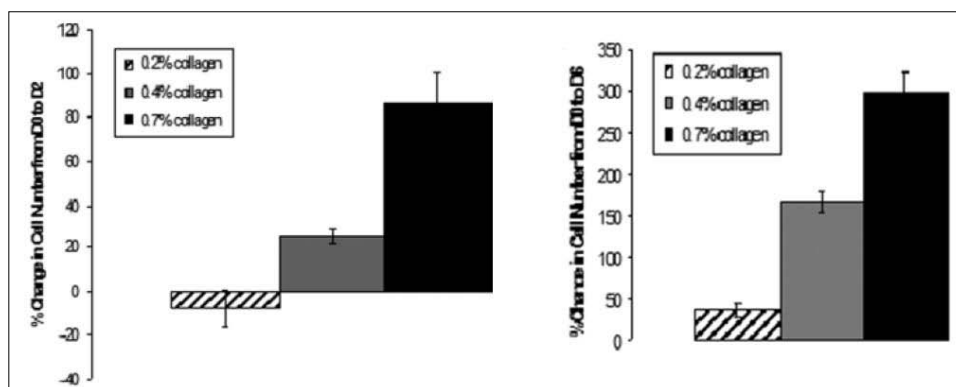


Figura 3.10 – Proliferazione dei fibroblasti in matrici di collagene a diverse densità

La proliferazione dei fibroblasti è direttamente regolata quindi dalla rigidità della matrice nella quale le cellule risiedono. Ancora una volta, questi risultati possono avere implicazioni importanti nel capire i meccanismi con i quali le ferite guariscono.

3.2.2 L'Architettura

Tranne che per alcuni settori dell'ingegneria tissutale come quelli della pelle, cartilagine, tendini e legamenti, che stanno ottenendo sempre più un ruolo maggiore nell'ambiente clinico, altri ambiti dell'ingegneria tissutale come quelli del fegato e dei reni sono ancora indietro a causa soprattutto della più complessa architettura che possiedono i tessuti, composti di molti tipi di cellule con diverse funzioni e abbondanti reti capillari che non sono ancora in grado di essere ben riprodotte.

Due delle più importanti caratteristiche che devono essere ben considerate durante la produzione dello scaffold riguardano i pori presenti su di esso. Il loro numero e la loro dimensione, quindi la lunghezza del loro diametro, sono caratteristiche determinanti per l'adesione e la proliferazione cellulare e controllare queste proprietà è una delle sfide maggiori che si stanno affrontando. Dipendendo dal metodo con il quale si è fabbricato lo scaffold una discussione in merito è riportata più avanti, infatti produrre semplicemente uno scaffold con un'alta porosità e seminare al suo interno il tipo di cellule

appropriato non è sufficiente a riprodurre le caratteristiche di un tessuto “normale”.

È noto come siano sempre molto interrelazionate, la struttura e la funzione del tessuto e proprio per questo non può essere studiato uno scaffold solo in quelle strutture che hanno una scala che varia da 0,1 a 1 *mm* ma è necessario uno studio all'interno delle specifiche forme macroscopiche (8):

- Le strutture su scala sub-cellulare (1-10 μm) servono a controllare l'ambiente cellulare.
- Le strutture su scala cellulare (10-100 μm) servono per controllare le interrelazioni cellula-cellula.
- Le strutture su scale sovra-cellulare (100-1000 μm) per costruire le unità funzionali essenziali del tessuto.

Il riconoscimento del ruolo significativo della geometria del substrato della matrice associata al comportamento delle cellule ha portato allo sviluppo di molte tecniche di produzione di scaffold 3D di geometria ben definita. Neppure uno di questi metodi permette però di progettare uno con una completa rete di pori d'interconnessione, una morfologia finemente regolabile e riproducibile, una microstruttura che varia nella matrice dello scaffold stesso, per riprodurre alla perfezione il tessuto naturale. Tuttavia alcune tecniche si stanno affinando e hanno mostrato le potenzialità per riprodurre uno scaffold multi-layer con un'architettura molto simile a quella dei tessuti reali.

3.3 TECNICHE DI FABBRICAZIONE DELLO SCAFFOLD

Le tecniche di fabbricazione degli scaffold possono essere suddivise in due grandi categorie.

La prima include strategie di lavorazione convenzionali che consentono la creazione di substrati tridimensionali biodegradabili ma che non sono in grado di offrire un alto livello di porosità. Le principali sono:

3.3.1 “Solvent Casting” Con Particolari Liscivazioni (Leaching)

La lisciviazione è un processo chimico attraverso il quale si separano dei componenti solubili da un solido attraverso dei solventi. Questa tecnica prevede l'aggiunta di Sali ad una soluzione polimerica e il successivo allontanamento del solvente mediante evaporazione. Successivamente, per fondere completamente i cristalli, si riscalda oltre la temperatura di fusione il composito ottenuto e si estrae l'acqua per eliminare le particelle di Sale rimaste e quindi formare i pori dello scaffold. La porosità e la dimensione dei pori dipendono dunque dal numero e dalla dimensione delle particelle di Sale presenti. Il processo anche se facile da eseguire, funziona solamente per strutture 3D molto sottili. Un altro problema sull'utilizzo di questa tecnica è quello dato dall'ampio uso di solventi, molti dei quali sono tossici e dai loro residui che ostacolano l'adesione e la proliferazione cellulare all'interno dello scaffold.

3.3.2 Fibre Networking

La fibre networking usa fibre biodegradabili per fabbricare scaffold attraverso tecnologie tessili. Le maglie che si producono in questi casi sono caratterizzate da una porosità definita dallo spazio interno agli anelli che si decidono di formare con gli appropriati intrecci di fibre e dalla distanza tra le varie fibre stesse. È possibile unire inoltre vari strati di maglie e in particolare una maglia è detta WOVEN se le fibre che la formano hanno una densità molto alta che non permette ulteriori intrecci e la formazione quindi di ulteriori anelli e quindi pori, NONWOVEN se la densità al contrario non è molto elevata e il poro di un anello può essere intrecciato da un filamento appartenente ad un altro strato.

In questo senso l'*electrospinning* è una tecnica molto utilizzata perché mira a trattare polimeri (macromolecole) biodegradabili e biocompatibili in modo da formare fibre con un diametro che varia a seconda delle necessità sulle scale dal micrometro al nanometro. Per iniziare la produzione di queste fibre, una soluzione di polimero è indotta all'interno di un capillare in modo da formare alla sua estremità una goccia di soluzione. Viene successivamente applicata un'alta tensione tra l'estremità e un bersaglio di raccolta a terra. Quando la forza del campo elettrico, (formato dalle cariche della corrente in movimento), vince la tensione superficiale della gocciolina, un getto di soluzione di polimero è schizza accelerando verso il bersaglio. Mentre il getto viaggia attraverso l'aria, il solvente evapora e sul bersaglio si forma un tessuto polimerico con maglie NONWOVEN.

3.3.3 Separazione Di Fase (In Combinazione Con Sublimazione Freeze Drying / Critical Point Drying)

Questa tecnica si basa sul principio fisico per il quale un sistema multicomponente omogeneo, può diventare termo-dinamicamente instabile e liberare, in ordine dalla minore alla maggiore, energia libera. Quest'ultima è utilizzata poi per formare i pori sullo scaffold.

Per la loro fabbricazione può essere usata una fase di separazione solido – liquido, indotta da basse temperature, per ottenere il congelamento del solvente e una fase “ricca in polimero”. Dopo aver rimosso il solvente, lo spazio (da lui) liberato forma i pori dello scaffold conservati attraverso tecniche di sublimazione.

Questa tecnica consente il controllo della porosità dello scaffold attraverso la variazione delle condizioni di separazione.

Le tecniche illustrate finora hanno come limite principale quello di non riuscire a controllare la struttura micro e macroscopica dello scaffold e più in particolare non riescono a programmare la dimensione e la distribuzione dei pori sulla loro superficie.

Molti articoli di ricerca attuali che studiano come migliorare l'efficacia e l'affidabilità dei substrati, pongono l'attenzione su alcune nuove tecniche che fanno uso di sistemi d'elaborazione automatica delle immagini:

3.3.4 Solid Freeform Fabrication (SFF)

Gli scaffold attuali, fabbricati attraverso le convenzionali tecniche, sono generalmente schiume (foams) di polimeri sintetici. I problemi di maggior rilevanza che si incontrano sono il non riconosciuto delle cellule delle superfici formate e cosa più importante l'impossibilità di migrare in genere a più di 550 μm dalla superficie.

La *Solid Freeform Fabrication* "SFF" utilizza strategie di lavorazione dei layers per creare oggetti fisici direttamente dai modelli generati dal computer. Un gran numero di tecniche e macchine SFF si stanno sempre più evolvendo e specializzando combinando Computer Assisted Design e Computer Assisted Fabrication. La maggior parte di questi sistemi, convertono le immagini tridimensionali ottenute attraverso Scanning 3D o attraverso la ricostruzione tridimensionale di immagini 2D ottenute con strumentazioni appropriate, come CT, MR, TAC e in questo modo si migliora notevolmente il disegno degli scaffold attuali controllando parametri come la dimensione, il numero e la distribuzione dei pori e incorporando se necessario anche un sistema vascolare artificiale, in modo tale da aumentare il trasporto d'ossigeno e nutrienti all'interno dello scaffold supportando la crescita cellulare nella regione d'interesse (12).

Sinteticamente, le tecnologie SFF coinvolgono la costruzione di oggetti 3D usando strategie di fabbricazione a layers. Il processo generale coinvolge la produzione di un modello generato dal computer attraverso software CAD.

Questo modello CAD è poi espresso in una serie di selezioni di layers incrociati. Il risultato è poi implementato nella macchina SFF che produce il modello fisico. Partendo dal basso e costruendo layers verso l'alto, ogni nuovo layer formato aderisce al precedente.

I dati ottenuti dalla *Computer Tomography "CT"* e dalle scansioni mediche della *Magnetic Resonance Imaging "MRI"* possono essere usati per creare un modello CAD personalizzato e di conseguenza la possibilità per lo scaffold di avere l'esatta forma esterna richiesta per correggere il sito del tessuto danneggiato.

Le tecnologie SFF più note utilizzate per la produzione degli scaffold sono:

- **Stampa Tridimensionale (3DP)**

Questa tecnica prevede l'utilizzo di tecnologia di stampa ink-jet con la quale si inietta un legante, lungo gli assi x e y, che compatta la polvere di polimero in accordo con i dati passati dal software CAD. Una volta completata questa operazione, il pistone, che si muove lungo l'asse z, viene fatto scendere e comprime il layer formato in modo che possa aderire ad esso il successivo. Queste operazioni proseguono fin quando non si ottiene la forma tridimensionale desiderata.

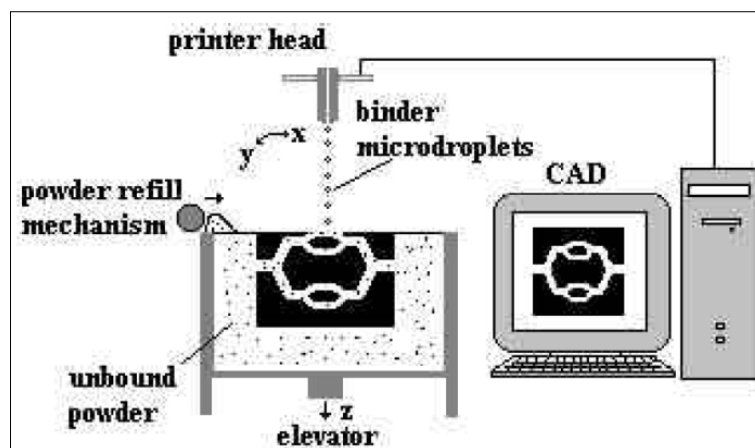


Figura 3.11 – Schema di principio per la stampa 3D (3DP)

- **Stereolitografia (SLA)**

Il processo coinvolge la selettiva polimerizzazione di un monomero liquido da un fascio di raggi ultravioletti. Il fascio UV è guidato lungo i raggi x e y sulla superficie del monomero liquido in accordo con i dati forniti dal sistema CAD. Dopo che il primo layer è stato costruito, l'elevatore tenendo premuto il modello si abbassa all'interno del recipiente in modo da permettere al polimero di coprire la superficie. Un "wiper arm" è poi spostato sopra il liquido per appiattare la superficie. Questa procedura è ripetuta fin quando il modello non viene completato.

Questo sistema richiede che strutture di supporto vengano aggiunte al modello, per prevenire ogni dall'abbassamento fino alla fine del tino riempito di liquido. Completata la procedura il modello viene sollevato, le strutture rimosse manualmente.

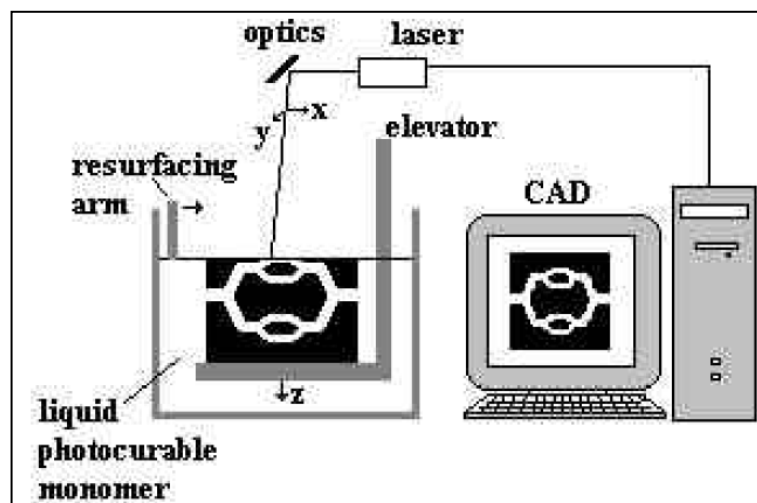


Figura 3.12 – Schema di principio per la stereo litografia (SLA)

- **Fused Deposition Modelling (FDM)**

Questa tecnica utilizza una punta mobile per estrudere una fibra di materiale polimerico dalla quale il modello fisico è poi costruito strato su strato. Il modello viene poi abbassato lungo l'asse z e la procedura viene ripetuta.

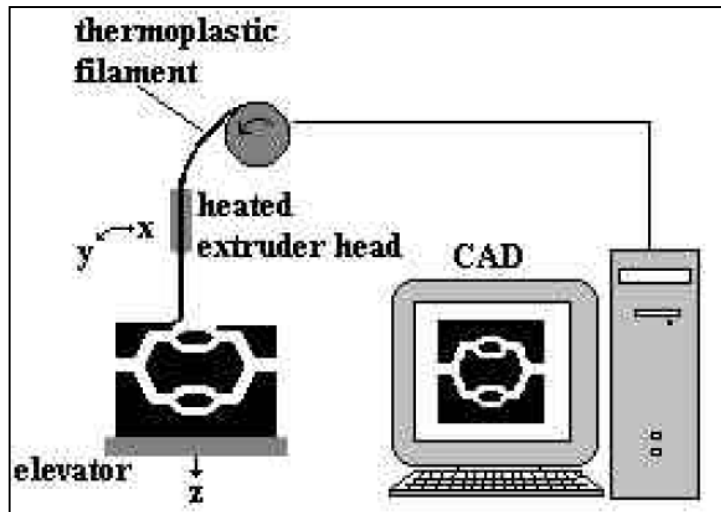


Figura 3.13 – Schema di principio per la stampa 3D (3DP)

- **Solid Freeform Fabrication Moulds (SFFM)**

Tutte le tecniche viste fino ad ora, mirano a produrre lo scaffold direttamente dal sistema SFF e infatti sono tutte tecniche dirette.

Un approccio diverso, *Figura 3.14*, è quello che prevede l'uso del sistema SFF per formare un modello negativo (*b*), *negative mould*, basato sul disegno dello scaffold (*a*). Successivamente un biomateriale o anche una combinazione di essi è fusa sul modello (*c*), il quale, una volta che il biomateriale si è assestato, viene dissolto per ottenere lo scaffold voluto (*c*), *Figura 3.14*.

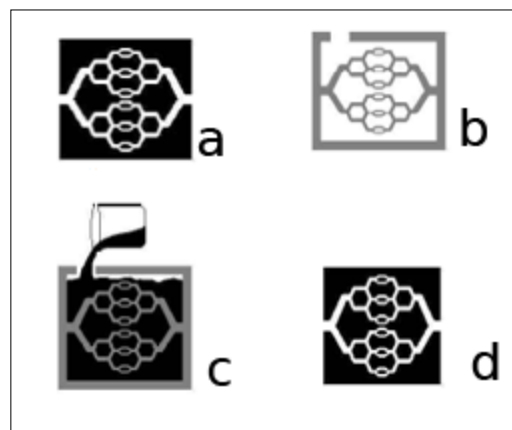


Figura 3.14 – La SFF indiretta

Gli scaffold per l'ingegneria tissutale fabbricati con tecnologie Solid Freeform Fabrication, hanno consentito di risolvere i problemi di crescita cellulare nelle zone in cui le sezioni di tessuto sono molto dense e interconnesse avendo la possibilità di controllare la fabbricazione della microstruttura interna che permette un maggior afflusso d'ossigeno e nutrienti all'interno dello scaffold. Molti sistemi sono stati usati per produrre scaffold con polimeri biodegradabili sintetici o naturali , bioceramiche o idrogel.

Il successo è tuttavia ancora limitato per il fatto che ogni tecnica SFF prevede dei requisiti specifici che sono di volta in volta diversi a seconda dei materiali utilizzati, come i parametri di viscosità, di solubilità, il punto di fusione e così via quindi ancora una volta i ricercatori fanno a priori delle scelte e seguono delle linee guida non standardizzate ma che con il passare del tempo e dell'esperienza risolveranno al meglio il problema della guarigione completa del tessuto, quanto meno quello tendineo, legamentoso, cartilagineo e, sperabilmente, osseo.

4. STRATEGIE PER SPECIALIZZARE E MIGLIORARE GLI SCAFFOLD

Gli scaffold proposti dall'ingegneria tissutale mirano a promuovere e supportare la rigenerazione di tendini e di legamenti ma migliorano la qualità della guarigione soprattutto se dopo la realizzazione, vengono applicate alcune strategie mirate a ottimizzare certe loro caratteristiche.

4.1. IBRIDAZIONE CELLULARE

Il concetto di ibridazione cellulare si basa sull'introduzione di un adeguato tipo di cellule all'interno dello scaffold in modo tale da migliorare la *riparazione* del tessuto danneggiato. Il pre-impianto di queste cellule comporta un miglioramento della composizione biochimica, della struttura istologica e delle proprietà biomeccaniche del tessuto riparato.

Per la riparazione dei tendini sono state utilizzate fino ad ora molti tipi di cellule tra le quali soprattutto:

- *Tenociti*, che essendo le cellule più presenti in questo tipo di tessuti, riescono ad apportare un notevole miglioramento delle capacità meccaniche degli scaffold anche se bisogna prestare attenzione alla loro raccolta. Riuscendo infatti a prelevare e innestare tenociti autologhi, si evitano eventuali problemi di rigetto ma si può recare danno al sito di donazione e quindi il loro utilizzo non è sempre possibile.
- *Fibroblasti dermali*, sono uno dei tipi di cellule più usate se viene applicata allo scaffold l'ibridazione cellulare perché sono facilmente prelevabili senza creare danni significativi al sito di prelievo. Le loro potenzialità sono molto simili a quelle ottenute attraverso l'impianto di tenociti e quindi migliorano la competenza meccanica dello scaffold sul quale vengono innestate.

- *Cellule staminali mesenchimali (MSCs)*, che sono cellule staminali multipotenti, ovvero capaci di differenziarsi in tipi diversi di cellule e nel caso specifico soprattutto in miociti e tenociti. Possono essere impiantate in vari tipi di scaffold, specie in quelli formati da gel di collagene e consentono miglioramenti notevoli sulle proprietà meccaniche e rigenerative del tessuto come illustra la *Figura 4.1*:

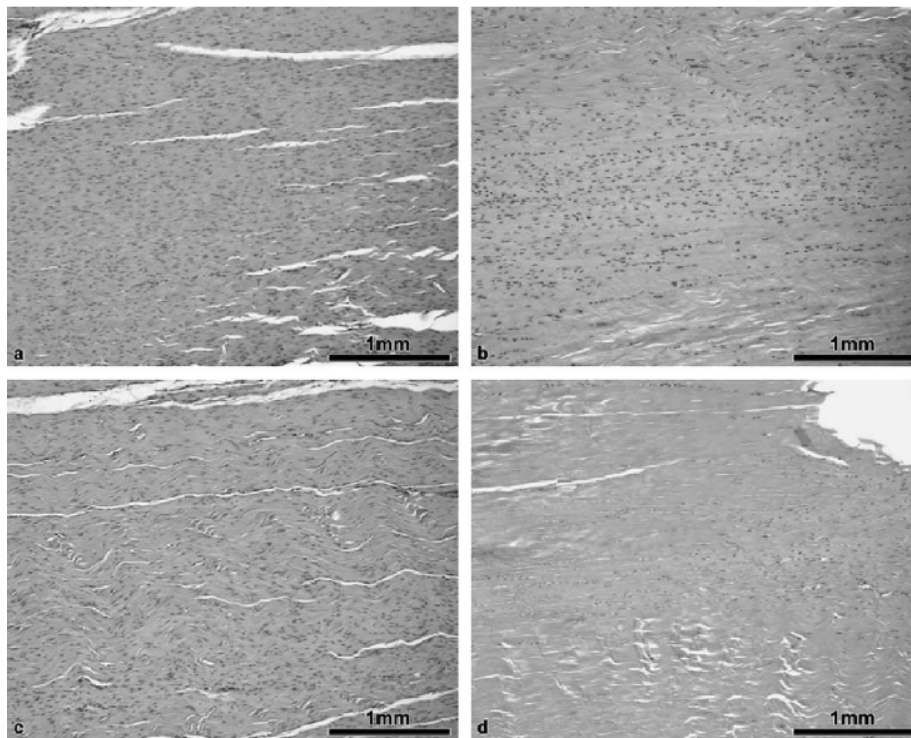


Figura 4.1 – Sezione longitudinale di tendine riparato attraverso uno scaffold di gel di collagene con innesto di MSCs (a,b) e senza l'innesto di MSCs (c,d).

4.2 MODIFICA DELL'INTERFACCIA

L'adesione delle cellule sullo scaffold è il passo iniziale ma anche quello cruciale dell'ingegneria tissutale legamentosa e tendinea.

Una buona tendogenesi infatti, richiede un gran numero di cellule che aderiscano allo scaffold, per proliferare e alla fine organizzare la matrice in un tendine funzionale.

L'adesione e la forza d'adesione delle cellule allo scaffold varia ed è mediata dai recettori presenti sulle superfici delle cellule. Fanno parte di questi le *integrine*, glicoproteine eterodimere di membrana le quali funzionano da recettori sia per le proteine della ECM (adesione cellula-matrice) sia per molte proteine della membrana cellulare (adesione cellula-cellula). Le integrine possono legarsi a corte sequenze di amminoacidi: uno dei legami più studiati è quello con la sequenza RGD, (Arg-Gly-Asp Arginina-Glicina-Acido Aspartico).

È stato dimostrato che un innesto diretto delle sequenze RGD sullo scaffold migliora molto l'adesione cellulare e questo può avvenire, come riportato da Tsuchiya et.al. (14), attraverso il rivestimento della sua superficie con proteine come il collagene, la vitronectina, la laminina, la fibronectina. Proprio quest'ultima è una di quelle che meglio si presta al legame con le integrine.

La fibronectina, *Figura 4.2*, è una proteina composta da due subunità molto grandi unite da legami disolfuro alle due estremità.

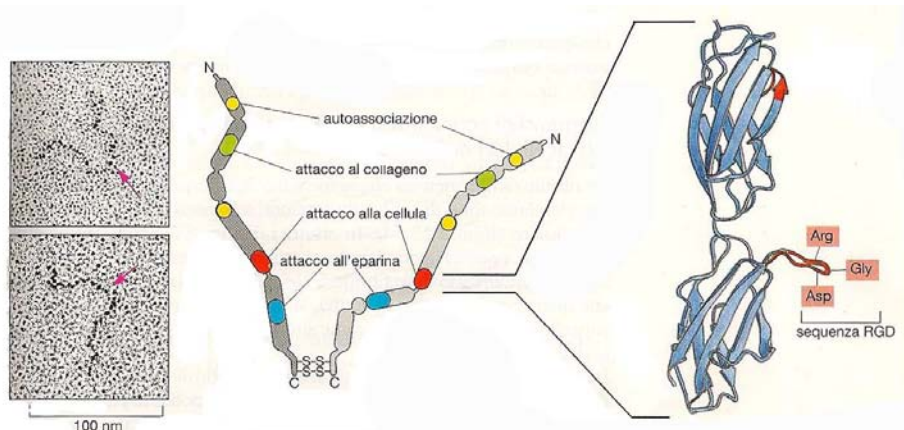


Figura 4.2 – La struttura della fibronectina. La sequenza RGD fa parte del sito d'attacco alla cellula.

Ciascuna subunità è ripiegata in una serie di domini funzionali distinti e separati e ogni dominio è composto a sua volta da moduli più piccoli ripetuti in serie. Il modulo principale si lega alle integrine e all'interno di questo, si trova appunto la sequenza tripeptidica specifica RGD.

Se i peptidi che si legano attraverso la sequenza RGD sono accoppiati sulla superficie solida dello scaffold, provocano l'adesione cellulare.

Le sequenze RGD sono riconosciute da molti recettori presenti sulla membrana delle cellule che devono aderire allo scaffold. In *Figura 4.3*, sono riportati i dati ricavati per l'adesione di cellule legamentose dopo aver praticato un innesto di varie proteine e come si vede, la Fibronectina provoca un notevole aumento del loro numero sullo scaffold.

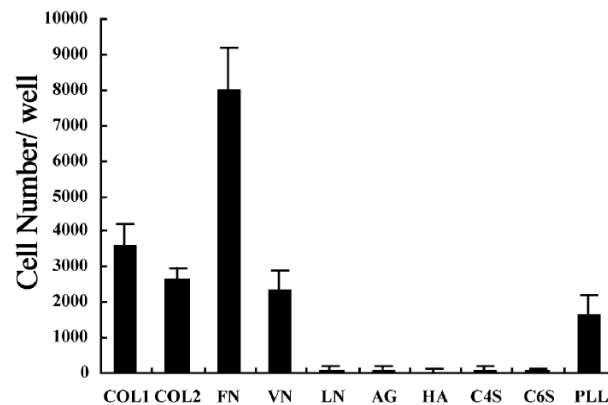


Figura 4.3 – Adesione cellulare dopo l'innesto nello scaffold di proteine come collagene, fibronectina, vitronectina e altre integrine.

4.3 FATTORI DI CRESCITA

I fattori di crescita sono un gruppo di proteine di origine naturale importanti per il regolamento di una grande varietà di risposte cellulari. Sono coinvolti in tutti i passi del processo di guarigione, stimolano la proliferazione e la differenziazione cellulare, la deposizione di ECM e la crescita del tessuto.

I fattori di crescita più studiati e considerati nell'ingegneria tissutale che si occupa di tendini e legamenti sono:

- **PDGF-BB** (*Platelet-Derived Growth Factor-BB*)
- **IGF-1** (*Insulin-like Growth Factor-1*)
- **bFGF** (*basic Fibroblasts Growth Factor*)

Per rendere l'idea di quanto possa influire l'innesto di queste proteine è significativo analizzare i dati raccolti da *Melinda Aliza Costa et.al.[15]*. Occupandosi in particolare dei tendini flessori della mano, i quali sono composti da 3 tipi di cellule provenienti dalla guaina sinoviale (S), dall'epitenon (E), e dall'endotenon (T), i ricercatori hanno studiato come ottimizzare la proliferazione dei tenociti attraverso l'integrazione della coltura cellulare effettuata prima con singoli fattori di crescita, poi attraverso due loro sinergismi.

I dati sono raccolti nei grafici seguenti:

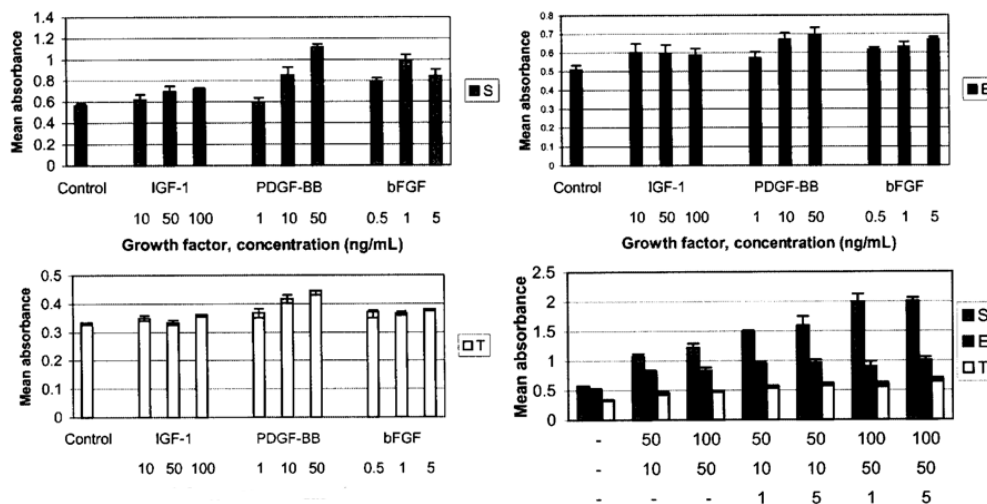


Figura 4.4 – Proliferazione di tenociti ricavata attraverso l'integrazione di fattori di crescita nella coltura cellulare.

La massima proliferazione cellulare si è ottenuta proprio con una combinazione data dai tre fattori di crescita *IGF-1+ PDGF-BB+ bFGF* in dose (100-50-5 ng/mL). Rispetto alla proliferazione che si sarebbe ottenuta normalmente, i valori sono notevolmente aumentati: dopo 72 ore si è stato registrato un più 251% per le cellule S, più 588% per le cellule E, più 101% per le cellule T.

Risulta chiaro quindi che predisporre nel processo di fabbricazione del nuovo tessuto, un'analisi per integrare nello scaffold opportune dosi di fattori di crescita, sia un potenziale aiuto nella riuscita della guarigione.

4.4 STIMOLAZIONE MECCANICA

I tenociti nel loro ambiente naturale sono continuamente soggetti a vari carichi meccanici esercitati dalla contrazione muscolare, dal movimento del corpo o da altre forze esterne.

Prima di essere impiantate, spesso le cellule subiscono un periodo di coltivazione in vitro, durante il quale sono sottoposte all'azione di sforzi meccanici. L'applicazione in particolare di forze cicliche esterne, ha un effetto notevole sulla funzionalità di queste cellule, influenzandole per quanto riguarda il metabolismo, la proliferazione, l'orientamento e la deposizione di matrice.

Moe et.al (6) hanno dimostrato come uno sforzo ciclico, influisca sulla morfologia cellulare principalmente in due maniere. Stimolando attraverso una forza ciclica il tessuto, i ricercatori hanno potuto dedurre quanto questa possa migliorare l'allineamento cellulare e cambiare la forma delle cellule stesse.

In particolare hanno realizzato i loro esperimenti su tessuto tendineo al quale hanno applicato una forza ciclica a diversa frequenza.

In *Figura 4.5*, sono riportati i campioni sotto l'influenza di un carico ciclico con picco di carico minimo a 0 N e massimo a 0.2 N, applicato per 4 giorni alla frequenza di 0.1 Hz (B), 1Hz (C) e in condizioni d'assenza di carico (A).

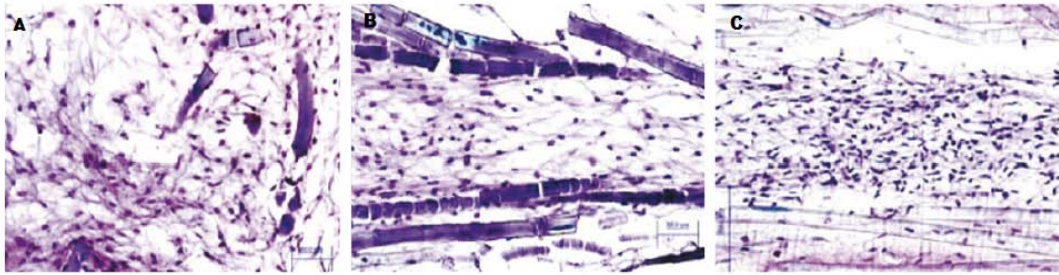


Figura 4.5 – Applicazione di un carico ciclico a 0Hz (A), 0.1Hz (B), 1Hz (C), su un campione di tessuto tendineo

La variazione di comportamento a livello microscopico risulta molto evidente. Le cellule da una forma poligonale passano ad una forma affusolata man mano che la forza aumenta di frequenza e mostrano una tendenza ad allinearsi nella direzione della forza assiale. Il campione B di *Figura 4.5* è quello che più assomiglia alle condizioni naturali di un tendine non lesionato.

La stimolazione meccanica è fondamentale per ottimizzare la riparazione del tessuto, infatti i valori di forza e deformazione massimi ottenuti in questo modo sono molto vicini ai valori che hanno i tendini normalmente.

La simulazione dell'ambiente biomeccanico del corpo che si cerca di riprodurre nei modelli *in vitro* serve ad avere una buona base per la successiva applicazione del modello *in vivo*.

4.5 GUIDA PER CONTATTO

Forse il più grande ostacolo che si presenta nel riuscire in un ottimo risultato nell'ingegneria tissutale riguardante i tendini e i legamenti, è il ripristino dopo la lesione dell'elevata organizzazione strutturale dell'ECM, che contribuisce a rendere uniche le proprietà biomeccaniche del tessuto.

Questa necessità richiede sia un allineamento assiale delle cellule sia un arrangiamento parallelo delle fibre di collagene.

È noto come i fibroblasti possano allinearsi e depositare ECM assialmente a delle guide formate preventivamente sulla superficie dello scaffold, come ad esempio *micro-grooves* (micro-scanalature) o *micro-channel* (micro-canali). Questo fenomeno denominato "guida di contatto", fornisce un mezzo per facilitare la crescita del tessuto all'interno della struttura ECM altamente organizzata, come quella presente nei tendini e nei legamenti.

Questa nuova tecnica sta già fornendo dei primi buoni risultati, come dimostrato dallo studio svolto da Lu et.al.(16) , che ha portato allo sviluppo di un tipo uno scaffold con un canale di fibra che contiene delle scanalature al proprio interno di 5-15 μm di profondità e 10 μm di larghezza. Dopo aver impiantato la matrice di PLA con fibroblasti, le cellule in 4 settimane sono proliferate all'interno delle scanalature guida e cosa fondamentale, hanno depositato proteine della ECM come collagene dentro le scanalature e parallelamente alla direzione della scanalatura.

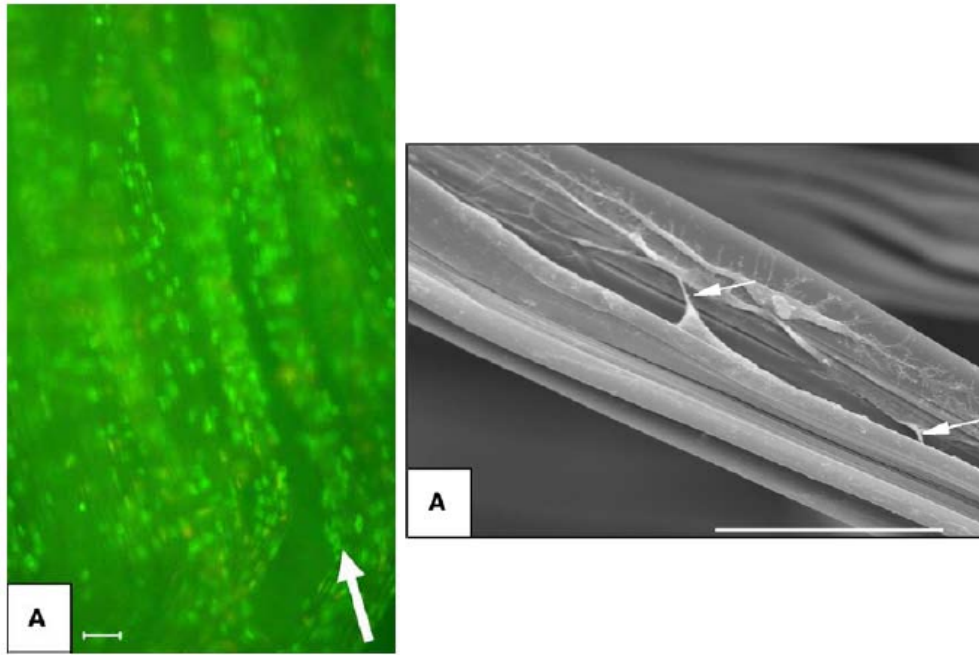


Figura 4.6 – Orientamento parallelo dei fibroblasti rispetto alle microscanalature.

Questo nuovo canale ha permesso il trasporto di nutrienti e di ossigeno fin dentro lo scaffold e quindi la possibilità di realizzare un'alta organizzazione del tessuto da rigenerare.

5. MATERIALI PROPOSTI PER GLI SCAFFOLD DALL'INGEGNERIA TISSUTALE

L'ingegneria tissutale riguardante i tendini e i legamenti, ha l'obiettivo di riparare le lesioni di questi tessuti *in situ* con l'integrazione ingegneristica di sostituti *viventi* dei loro omologhi originali *in vivo*.

A questo scopo, sono necessari materiali appropriati per la costruzione degli scaffold, e questi idealmente dovrebbero soddisfare i seguenti requisiti:

- Biodegradabilità con tasso di degradazione regolabile
- Biocompatibilità prima, durante e dopo la degradazione
- Proprietà meccaniche superiori al tessuto da riparare e mantenimento della forza meccanica durante il processo di rigenerazione tissutale
- Biofunzionalità: l'abilità di supportare la proliferazione e la differenziazione delle cellule, la secrezione di ECM, e la formazione tissutale.
- Processabilità: l'abilità di poter elaborare il materiale per formare i costrutti desiderati anche con complicate strutture e forme

Fino a dieci anni fa, le proprietà meccaniche del tessuto erano considerate il requisito primario che un materiale dovesse soddisfare per essere usato nella realizzazione di uno scaffold.

Tuttavia, per il fatto che l'ingegneria tissutale miri a rigenerare un tessuto funzionale e non a sostituire un tessuto danneggiato con per esempio protesi artificiali, non è in realtà strettamente necessario che lo scaffold abbia proprietà meccaniche molto simili al tendine o al legamento anzi, una forza meccanica relativamente superiore risulterebbe essere essenziale come caratteristica per assicurarsi che la struttura dello scaffold possa resistere durante tutto il periodo di guarigione.

Anche le interazioni tra il materiale con il quale lo scaffold è stato costruito e le cellule che vengono a contatto con esso sono come già detto, cruciali e proprio i materiali dovrebbero riuscire ad offrire una bio-funzionalità che stimoli le risposte rigenerative cellulari.

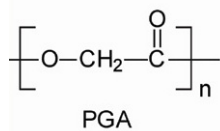
Idealmente lo scaffold non dovrebbe poi solo promuovere la proliferazione e la differenziazione delle cellule ma anche ripristinare la composizione naturale della ECM e la struttura istologica del tessuto.

Alla data sono stati ben studiati e utilizzati tre principali tipi di materiali per la produzione degli scaffold; poliesteri, derivati del collagene e polisaccaridi.

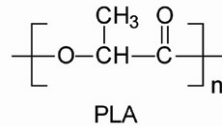
5.1 POLIESTERI

Il più grande numero di polimeri biodegradabili per le applicazioni d'ingegneria tissutale riguardante i tendini e i legamenti sono i poliesteri. I più comuni utilizzati per la produzione degli scaffold sono:

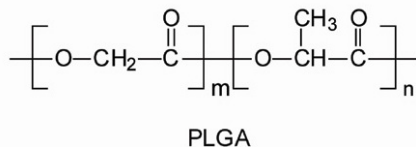
- Acido Poliglicolico (**PGA**)



- Acido Polilattico (**PLA**)



- Acido Polilattico co-glicolico (**PLGA**)



Questi polimeri attraggono molto l'attenzione perché i loro prodotti di degradazione, acido glicolico e lattico, sono metaboliti naturali normalmente presenti nel corpo umano e quindi sono altamente biocompatibili. A questo si aggiungono le loro buone proprietà meccaniche e la facilità di lavorazione.

A dispetto dei loro vantaggi, i poliesteri soffrono anche di alcune limitazioni che bisogna sempre ben considerare.

In primo luogo, i poli- α -idroesteri non supportano un alto livello di adesione cellulare, che è lo step iniziale e cruciale per un tessuto funzionale

ingegnerizzato. Questa limitazione può essere superata, modificando la superficie dello scaffold poliestere con agenti adesivi come la fibronectina, come già riportato nello scorso capitolo.

Secondo, malgrado i prodotti di degradazione di PGA, PLA e PLGA siano metaboliti naturali, essi sono pure acidi. La loro presenza in alte concentrazioni può pertanto dare origine a reazioni sintomatiche locali anche significative.

Quando le dimensioni degli scaffold sono piccole, l'accorrere di queste reazioni biologiche avverse è comunque molto ridotta; per questo in genere, i poliesteri sono i più adatti per riparare piccoli difetti o lesioni.

Pur appartenendo tutti al gruppo dei poli- α -idroesteri, PGA, PLA, PLGA hanno sia risposte cellulari ai materiali sia profili di degradazione individuale molto diversi tra loro.

Uno studio condotto da Lu et.al.(17) è molto significativo in questo senso. Questo gruppo di ricerca ha studiato come ottimizzare in vitro uno scaffold 3D per il legamento più soggetto a lesioni del ginocchio, che è il legamento crociato anteriore (ACL), focalizzando l'attenzione proprio sulla selezione del materiale e l'identificazione di un'appropriata composizione di polimeri basata sulla risposta cellulare ottenuta, sulla degradazione del costruito e sulle proprietà meccaniche associate.

Sono state considerate le tre composizioni di fibre poli- α -idroestere con diversi tassi di degradazione:

PGA (PolyGlycolic Acid)

PLLA (Poly-L-Lactide Acid)

PLAGA (PolyLActic-co-Glycolic Acid).

Dopo aver opportunamente definito le loro varie caratteristiche in termini d'architettura (diametro dei pori, porosità, area di superficie) e di proprietà meccaniche, sono stati prodotti 6 tipi di scaffold a 3 dei quali la superficie è stata rivestita con fibronectina per aumentare l'adesione cellulare. Dopo aver ottenuto i fibroblasti ACL, questi sono stati impiantati negli scaffold con densità 80.000 cellule/scaffold. In tabella sono riassunti i dati principali:

Polymer composition	Linear density (denier)	Braiding angle (°)	Surface area (cm ²)	Porosity (%)	Mode pore diameter (µm)	Median pore diameter (µm)
PGA (n = 3)	60	25±1	55±1	63±7	177±68	103±18
PLAGA (n = 7)	70	28±3	70±12	59±5	195±44	84±20
PLLA (n = 7)	70	28±3	64±9	54±8	226±23	103±20

Tabella 5.1 – Dati riassuntivi sugli scaffold fabbricati

Gli scaffold sono stati esaminati attraverso un'analisi al SEM e sia per quanto riguarda l'adesione cellulare, sia per quanto riguarda la crescita cellulare in funzione del tempo di coltura, i risultati sono riportati in *Figura 5.2,5.3,5.4*.

La prima, *Figura 5.2*, mostra come hanno aderito agli scaffold i fibroblasti ACL e l'effetto della fibronectina dopo un solo giorno di coltura.

La diffusione cellulare è stata osservata in tutti e tre gli scaffold esaminati indipendentemente dalla composizione polimerica e dal rivestimento di fibronectina. I fibroblasti si sono ben adeguati alla geometria degli scaffold composti da PLAGA e PLLA mentre solo sullo scaffold composto da PGA si sono formati ponti tra le varie fibre. Sullo scaffold rivestito di fibronectina e composto di PLLA (PLLA-Fn) si è verificato una aumento significativo dell'adesione cellulare.

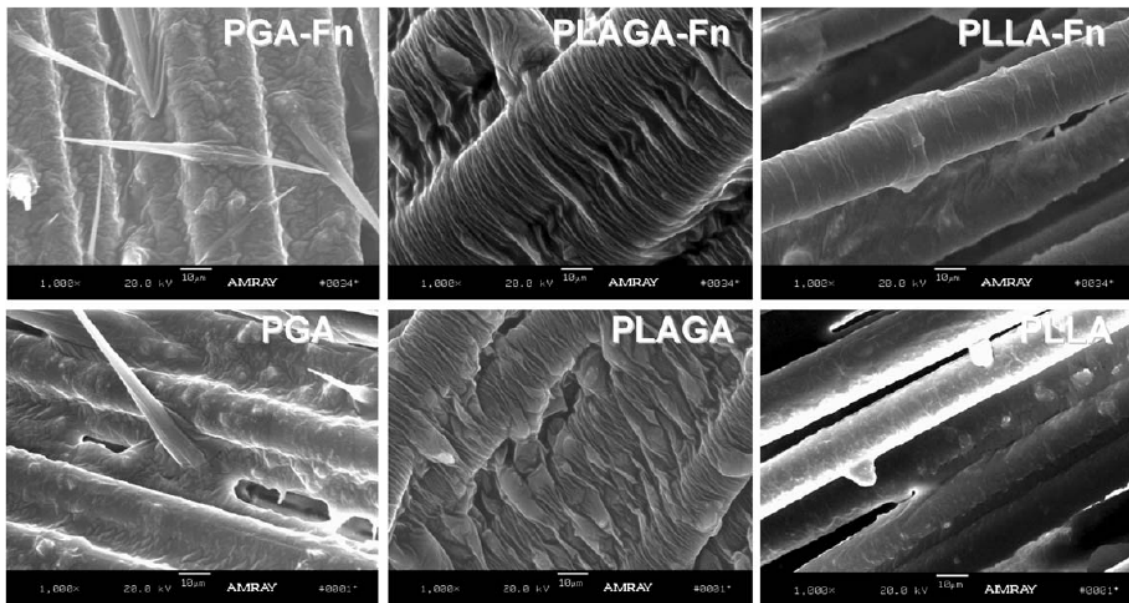


Figura 5.2 – Analisi degli scaffold al SEM dopo solo un giorno di coltura.

Dopo 7 giorni, *Figura 5.3*, su tutti gli scaffold esaminati è stata osservata un'estesa produzione di matrice con ponti formati tra le varie fibre. Le cellule cresciute sugli scaffold prerivestiti di fibronectina, hanno prodotto più matrice

rispetto a quelli senza e in particolare è lo scaffold PLLA-Fn ad averne prodotta in maggior quantità.

Per quanto riguarda lo scaffold PGA, la sua rapida degradazione in presenza delle cellule e del terreno di coltura è stata dannosa per la formazione della matrice, mostrando la frammentazione di molti filamenti.

Dopo una settimana, la degradazione dello scaffold PGA e PGA-Fn ha comportato la perdita di molte cellule e per tutta la matrice si sono formati larghi buchi; per gli scaffold rivestiti di fibronectina la crescita cellulare ha portato invece ad un aumento considerevole di matrice e quindi ad una integrità complessiva dello scaffold.

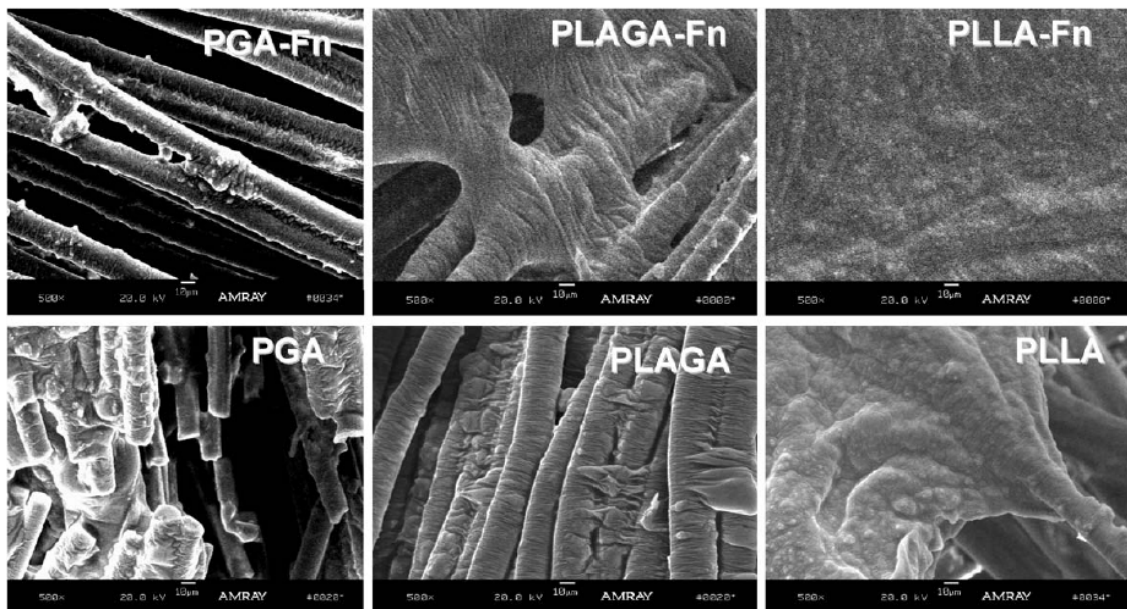


Tabella 5.3 – Analisi degli scaffold al SEM dopo una settimana di coltura.

Dopo 14 giorni, *Figura 5.4*, lo scaffold formato con il PGA si è notevolmente rovinato; la densità cellulare è risultata essere molto bassa e si sono formati ampi spazi vuoti causati dalla degradazione. Al contrario gli altri due scaffold, formati da PLAGA e PLLA hanno mantenuto una buona integrità complessiva e continuano a sostenere un'ampia area di matrice.

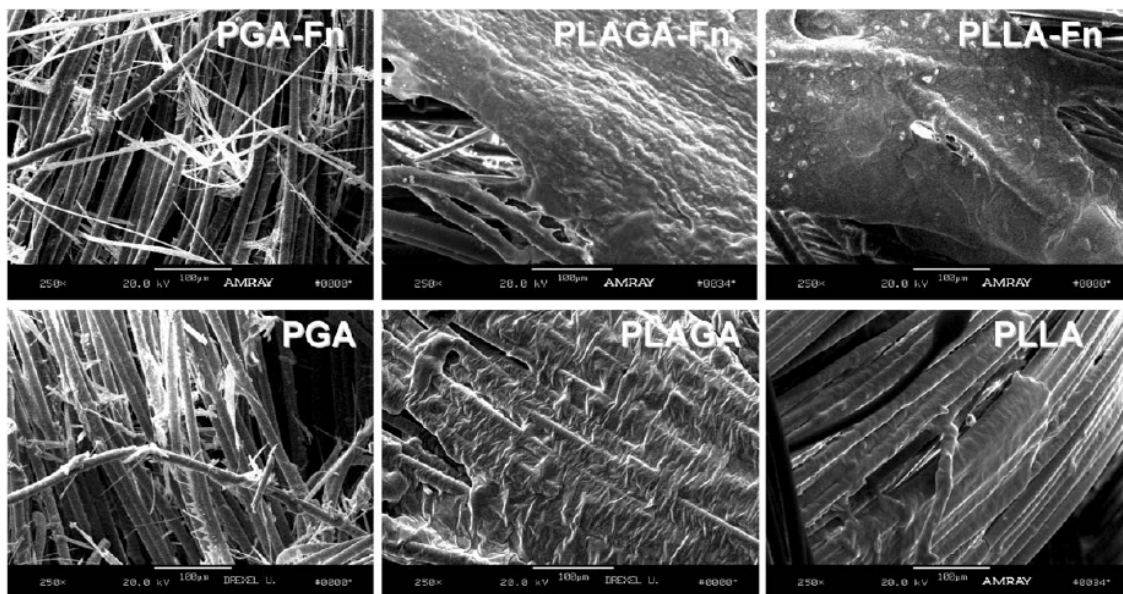


Tabella 5.4 – Analisi degli scaffold al SEM dopo 14 giorni di coltura.

È quindi risultato chiaro come la risposta delle cellule ad un determinato scaffold è dipendente dalla composizione polimerica con la quale gli scaffold sono stati fabbricati. L'assorbimento di fibronectina da parte del polimero degli scaffold ha aumentato come previsto l'efficienza dell'adesione cellulare e ha avuto un effetto positivo sulla produzione della matrice da parte delle cellule cresciute sugli scaffold composti da PLLA e PLAGA.

Basandosi sulla morfologia delle cellule attaccatesi, sulla proliferazione cellulare e soprattutto sulle proprietà meccaniche e di degradazione, lo scaffold PLLA è stato il materiale più adatto per l'ingegnerizzazione tissutale dell'ACL rispetto agli scaffold di PLAGA e di PGA, nonostante soprattutto il PGA possedesse inizialmente una maggior forza che è stata successivamente persa a causa della degradazione del substarto che ha portato alla distruzione della matrice e della sua integrità.

5.2 DERIVATI DEL COLLAGENE

Le ECM dei tendini e dei legamenti sono per lo più costituite da collagene di *tipo I*, quindi gli scaffold basati su derivati del collagene sono altamente biocompatibili con questi tipi di tessuti. Questi inoltre esibiscono una particolare biofunzionalità grazie alla quale supportano meglio l'adesione e la proliferazione cellulare rispetto ad altri materiali come i poliesteri.

Il gel di collagene non possiede un'alta resistenza agli sforzi meccanici, ciononostante è molto utilizzato per aumentare la qualità della riparazione del tendine o del legamento.

Le spugne di collagene esibiscono al contrario una migliore competenza meccanica e data la più alta efficienza per quanto riguarda la semina cellulare offerta dal gel, una combinazione dei due derivati rappresenta un compromesso promettente.

Uno studio condotto da Gentleman et.al.[18] prova in modo evidente come una combinazione di questi due derivati del collagene possa sostenere lo sviluppo di nuovo tessuto legamentoso, interessandosi in particolare del legamento crociato anteriore (ACL), uno dei legamenti più soggetto a traumi nelle popolazioni occidentali.

I ricercatori hanno esaminato in particolare le proprietà meccaniche e viscoelastiche degli scaffold composti da fibra di collagene insolubile nei quali è stato inserito gel di collagene seminato con fibroblasti.

È interessante prestare brevemente attenzione anche al processo di produzione degli scaffold, per capire quanto valga l'esperienza dell'equipe e lo studio dei particolari che contraddistinguono le applicazioni d'ingegneria tissutale; Gentleman et.al hanno fabbricato i loro in questo modo:

50 fibre di collagene sono state tagliate in 40mm di lunghi pezzi, posizionati in parallelo, e assicurati alle loro estremità con un nodo di sutura di seta per formare gli scaffold.

10 scaffold di fibre di collagene per ogni *time point* fissato, sono stati posizionati su due modelli (5 scaffold per modello) contenenti 8 canali di dimensioni

($3.18\text{cm} \times 0.318\text{cm} \times 0.318\text{cm}$ - L x W x H) e assicurati a una struttura che tiene lo scaffold in posizione, *Figura 5.5,A*.

Mentre sono assicurati al modello, gli scaffold sono stati sterilizzati per un'ora in *EXSPOR*, un acido lattico diluito con proprietà sterilizzanti, dopodiché posizionati in un disco di coltura, sciacquati due volte con PBS, una soluzione tampone salina e poi quattro volte con acqua distillata.

Una volta preparati gli scaffold bisogna preparare le cellule. In questo caso, fibroblasti di pelle di ratto sono stati ottenuti attraverso specifiche colture usate in laboratorio e al termine sono stati prodotti 5 ml di *soluzione di gel di collagene*.

Metà degli scaffold di fibre di collagene (25, 5 scaffold per ogni *time point*) sono stati designati come *gruppo sperimentale* e i singoli canali di ogni modello sono stati riempiti con le cellule provenienti dalla soluzione di gel di collagene prima formata.

Altri 5 modelli sono stati designati a *gruppo di controllo* e hanno ricevuto la stessa soluzione di gel di collagene senza l'aggiunta dei fibroblasti.

30 minuti dopo il *casting*, il modello è stato sommerso aggiungendo altro terreno di coltura alla coltura nel disco. 5 ore dopo il *casting*, lo scaffold di collagene e i compositi del gel di collagene sono stati rimossi dal modello ma mantenuti sulle montature, cosicché i compositi sono rimasti sospesi nel terreno di coltura e assicurati longitudinalmente sotto la tensione del loro stesso peso, *Figura 5.5,B*.

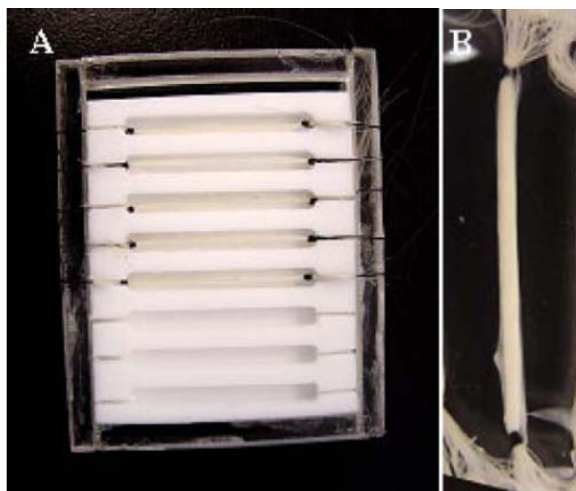


Figura 5.5 – A, gli scaffold riempiti di gel di collagene assicurati al modello. B, lo scaffold sotto la tensione del suo peso dopo 20 giorni di coltura.

Gli scaffold sono stati quindi coltivati per 0, 5, 10, 15 e 20 giorni, i *time point* prefissati, prima del test meccanico che dà le informazioni necessarie a capire se lo scaffold prodotto può essere utilizzato o meno.

Il risultato ottenuto dai ricercatori in questo caso, è stato molto soddisfacente, infatti tutti i campioni hanno dimostrato la caratteristica non lineare della curva tensione deformazione, tipica dei legamenti, Figura 5.6.

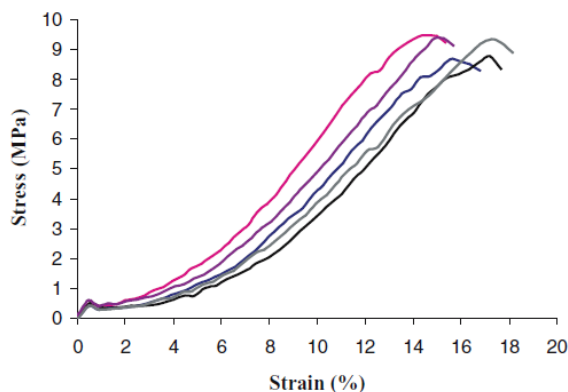


Figura 5.6 – Curva tensione deformazione ottenuta durante i test meccanici per gli scaffold di gel di collagene.

Aver ottenuto questo risultato è di particolare importanza perché un tessuto ingegnerizzato deve avere il comportamento meccanico più simile possibile al tessuto naturale.

Le analisi di microscopia hanno poi permesso di analizzare la disposizione e l'orientamento delle cellule nelle sezioni trasversali, Figura 5.7 A,C e longitudinali, Figura 5.7 B,D degli scaffold.

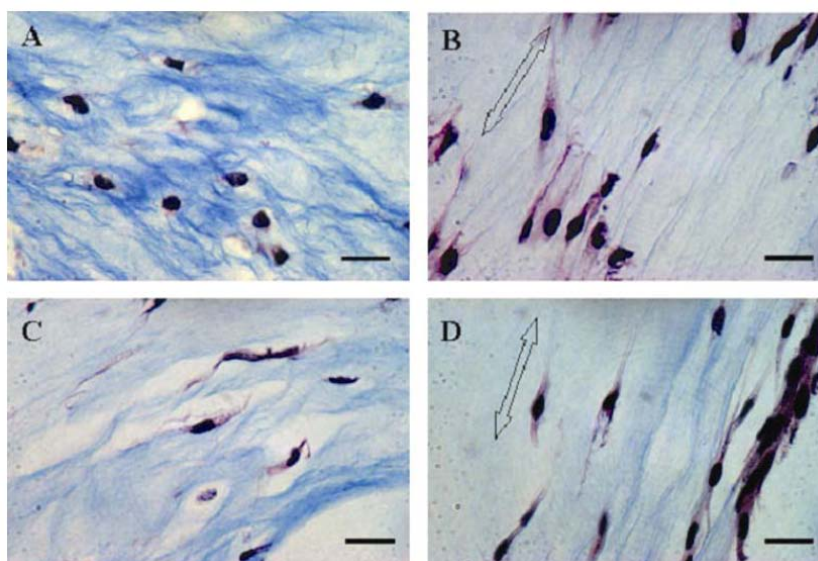


Figura 5.7 – Microscopia dello scaffold, dopo 10 giorni di coltura (A,B) e dopo 20 giorni di coltura (C,D). A e C sono sezioni trasversali. B e D sono sezioni longitudinali.

Lo studio ha dimostrato come l'utilizzo di questi materiali permetta di ottenere degli scaffold che mantengono le proprietà meccaniche e viscoelastiche proprie del legamento originale senza cali improvvisi per 20 giorni, e come le cellule proliferino nella giusta direzione al loro interno.

A dispetto delle sue ottime caratteristiche illustrate fino ad ora, il collagene soffre di alcune limitazioni da considerare:

- la sua processabilità è limitata, quindi una fine elaborazione e caratterizzazione della struttura dello scaffold risulta complicata
- la riproduzione precisa degli scaffold prodotti con derivati del collagene risulta difficile da effettuare
- la resistenza meccanica degli scaffold di derivati del collagene è molto inferiore degli altri materiali, come ad esempio i poliesteri. Questo comporta che è difficile per questi, resistere alle tensioni meccaniche nel corso del tempo quando sono impiantati *in vivo*.

I polimeri derivati naturalmente ad ogni modo, sono di particolare interesse essendo già componenti naturali di una struttura vivente e avendo grandi somiglianze chimiche e biologiche con i tessuti naturali.

5.3 POLISACCARIDI

I polisaccaridi sono stati sotto-utilizzati nell'ingegneria biomedica e hanno solo negli ultimi anni, attratto significativamente su di loro l'attenzione, come possibili biomateriali.

Tradizionalmente i polisaccaridi erano considerati come materiali adatti alla produzione di scaffold per la rigenerazione di tessuti densi. Per esempio, polisaccaridi come la chitina, il chitosano, l'alginato e l'agarosio sono stati utilizzati per fabbricare scaffold per cartilagine e ossa. Più recentemente tuttavia sono stati applicati anche nel campo dell'ingegnerizzazione dei tessuti molli e tra tutti il **chitosano** è stato considerato un interessante candidato in uno spettro molto ampio di applicazioni, tra cui proprio la rigenerazione di tendini e legamenti.

Il chitosano (19), un prodotto di de-acetilazione della chitina, è un polisaccaride lineare composto da D-glucosamina (l'unità deacetilata) e N-acetil-D-glucosamina (l'unità acetilata), legate tramite legami $\beta(1-4)$.

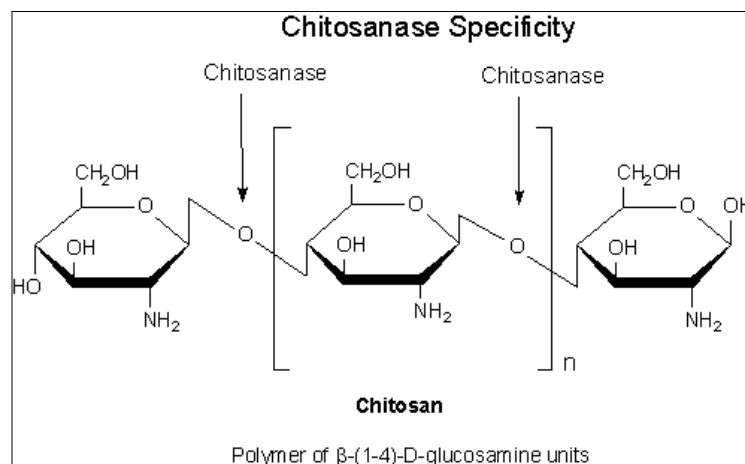


Figura 5.8 – La struttura molecolare del chitosano

Nella sua forma cristallina, il chitosano è normalmente insolubile in soluzioni acquose con pH maggiore di 7.0, ma lo è al contrario in soluzioni acide a pH minore di 6.0 grazie ai gruppi amminici protonati che facilitano la solubilità delle molecole.

In genere il chitosano ha tre tipi di gruppi funzionali reattivi. Uno è il gruppo amminico $-NH_2$, gli altri due sono entrambi i gruppi ossidrilici primario e secondario, $-OH$. Sono questi gruppi a permettere la modifica del chitosano per le specifiche applicazioni, oltre alla natura chimica della molecola stessa che consente di effettuare modifiche ioniche o covalenti che permettono di migliorare le proprietà meccaniche e biologiche.

Gli scaffold che utilizzano chitosano posseggono alcune proprietà molto utili per l'uso nell'ingegneria tissutale.

Prima di tutto, il chitosano può essere formato come strutture porose interconnesse attraverso soprattutto tecniche di congelamento e di liofilizzazione della soluzione di chitosano.

La struttura interconnessa porosa, *Figura 5.9*, è importante per far in modo che numerose cellule possano essere impiantate e possono migrare verso l'interno dello scaffold aumentando il loro numero e per fare in modo che arrivi un buon numero di nutrienti per la loro sopravvivenza.

Il controllo del numero di pori e della loro morfologia è fondamentale per controllare appieno il tasso di colonizzazione delle cellule e la loro organizzazione all'interno del tessuto ingegnerizzato.

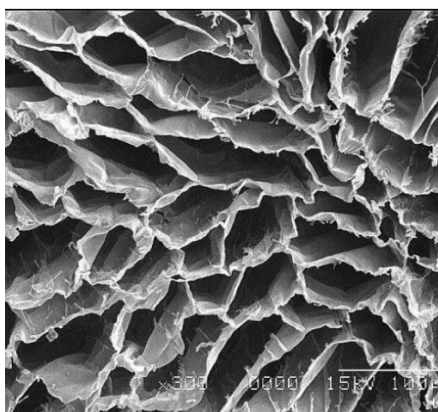


Figura 5.9 – la struttura altamente porosa di uno scaffold contenente chitosano

Inoltre, la natura cationica del chitosano permette di avere interazioni elettrostatiche pH-dipendenti con glicosaminoglicani (GAGs) e proteoglicani (PGs) distribuiti nel corpo e con altre specie cariche negativamente.

Grazie alla sua idrofilicità il chitosano dimostra delle ottime caratteristiche d'adesione e proliferazione cellulare.

Uno studio significativo in questo senso è stato condotto da Tokifumi et. Al.(20) i quali hanno messo alla prova la capacità d'adesione ai fibroblasti tendinei, di uno scaffold composto solamente da fibre di polimero alginato e di uno scaffold composto da fibre ibride di polimero alginato e chitosano.

Come ci si aspettava la presenza del chitosano ha fatto in modo che molte più cellule, quasi il 40% in più, rimanessero attaccate allo scaffold ibrido.

In Figura 5.10,B è riportato un grafico che descrive l'adesione ai vari scaffold utilizzati. Si può osservare come variare la quantità di chitosano del polimero ibrido non cambia quasi per nulla il valore d'adesione allo scaffold complessivo.

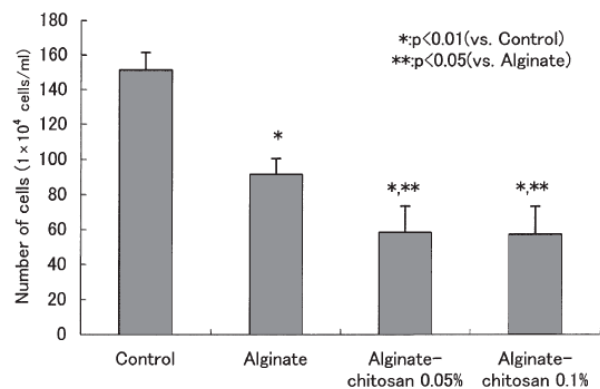


Figura 5.10 – A mostra l'adesione di un fibroblasto allo scaffold ibrido. B il numero di fibroblasti che non hanno aderito allo scaffold.

CONCLUSIONI

L'ambizioso obiettivo, ancora piuttosto lontano, che si propone l'ingegneria tissutale, è quello di coltivare tessuti e persino organi in laboratorio. In alcuni suoi rami, quelli riguardanti i tessuti molli come sono tendini e legamenti, i ricercatori sono arrivati tuttavia allo sviluppo di alcune tecniche che si stanno dimostrando sempre più efficaci nella guarigione e competitive rispetto alle altre terapie tradizionali.

Avendo per obiettivo la rigenerazione del tessuto lesionato, e quindi non la sostituzione con un dispositivo estraneo, l'ingegneria tissutale evita una serie di problemi rilevanti come quelli riguardanti il rigetto, il propagarsi di infezioni, il peggioramento con il passare del tempo della competenza meccanica, che sono i limiti principali delle terapie basate su l'innesto biologico, la protesi artificiale o la sutura chirurgica.

L'esperienza accumulata in questi anni sulla fabbricazione di scaffold biocompatibili e biodegradabili e sulla possibilità di seminare cellule autologhe o staminali, ha permesso di produrre tessuti tendinei e legamentosi con caratteristiche molto simili a quelle dei loro omologhi naturali.

Gli svantaggi che questa disciplina porta con sé nelle applicazioni cliniche sono dovuti al grande lavoro che sta dietro alla produzione di ogni scaffold; è necessaria infatti una appropriata struttura, sia micro che macroscopica, per far in modo che le cellule riescano a raggiungere tutte le sue parti e che riesca ad arrivare a loro il sufficiente nutrimento. Le cellule inoltre devono riuscire crescere e diffondersi in sufficiente quantità. La produzione del tessuto *ex novo* richiede anche diversi mesi, cioè un tempo molto lungo rispetto a quello per l'impianto di una protesi o di un innesto tradizionale.

Date le premesse e i primi risultati, investire sullo studio di questa disciplina può portare a importanti traguardi. Le terapie sulle lesioni di tendini e legamenti che prevedono l'ingegneria tissutale come tecnica di guarigione, alla data di oggi stanno cominciando ad affacciarsi sul panorama clinico, soprattutto negli Stati Uniti.

BIBLIOGRAFIA

- [1] James H. and Wang C., *Mechanobiology Of Tendon*, Journal of Biomechanics, 39, 1563–1582, 2006
- [2] Alberts B., *Biologia Molecolare Della Cellula*, Zanichelli, 2004
- [3] Nigg B.M. and Herzog W., *Biomechanics of the Musculo-skeletal System - Second Edition*, Wiley, 1999
- [4] Rosati P., Colombo R., Maraldi N., *Istologia*, Edi-Ermes, 2007
- [5] Di Bello C., *Biomateriali, introduzione allo studio dei materiali per uso biomedico*, Patron Editore, 2004
- [6] Liu Y. et. al., *Tendon tissue engineering using scaffold enhancing strategies*, Trends in Biotechnology, 26 (4), 201-209, 2006
- [7] Doroski D.M. et. al., *Techniques for biological characterization of tissue-engineered tendon and ligament*, Biomaterials, 28, 187-202, 2007
- [8] Dado D. et. al., *Cell–scaffold mechanical interplay within engineered tissue*, Seminars in Cell & Developmental Biology, 20, 656-664, 2009
- [9] Freyman T.M. et. al., *Fibroblast contraction of a collagen GAG matrix*, Biomaterials, 22, 2883-2891, 2001
- [10] Eugene Bell et. al., *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, 76, 1274-1278, 1979
- [11] Hadjipanayi E. et. al., *Close dependence of fibroblast proliferation on collagen scaffold matrix stiffness*, Journal Of Tissue Engineering And Regenerative Medicine, 3, 77-84, 2009
- [12] Sachlos E. and Czernuszka J.T., *Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds*, - European Cells and Materials 5, 29-40, 2003

- [13] Eastwood et. al., *Tensional Homeostasis in Dermal Fibroblasts Mechanical Responses to Mechanical Loading in Three-Dimensional Substrates*, Journal Of Cellular Physiology, 175, 323-332, 1998
- [14] Tsuchiya et. al., *Effects of cell adhesion molecules on adhesion of chondrocytes, ligament cells and mesenchymal stem cells*, Materials Science and Engineering, C17, 79-82, 2001
- [15] Melinda Aliza Costa et. al., *Tissue engineering of flexor tendons: optimization of tenocyte proliferation using growth factor supplementation*, Tissue Engineering, 12(7), 1937-1943, 2007
- [16] Lu et. al., *Novel capillary channel fiber scaffolds for guided tissue engineering*, Acta Biomaterialia, 1, 607-614, 2005
- [17] Lu et. al., *Anterior cruciate ligament regeneration using braided biodegradable scaffolds.. in vitro optimization studies*, Biomaterials, 26, 4805-4816, 2005
- [18] Gentleman et. al., *Development of Ligament-Like Structural Organization and Properties in cell-seeded collagen scaffolds in vitro*, Annals of Biomedical Engineering, 34(5), 726-736, 2006
- [19] In-Yong Kim et. al., *Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications*, Biotechnology Advances, 26, 1-21, 2008
- [20] Tokifumi et. al., *Alginate and chitosan polyion complex hybrid fibers for scaffolds in ligament and tendon tissue engineering*, Journal Of Orthopedic Science, 10, 302-307, 2005

