

Università degli studi di Padova

Scuola di Ingegneria

Corso di Laurea in Ingegneria Biomedica

Tesi di laurea

**L'ingegneria tissutale
nella riparazione della cartilagine**

Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione

Dipartimento di Ingegneria Industriale

Laureanda: Alice Vettore

Relatore: Andrea Bagno

25 luglio 2013

Anno accademico 2012/2013

INDICE

| | |
|--|-----------|
| Abstract | 1 |
| Introduzione | 3 |
| Cap.1 La cartilagine | 5 |
| 1.1 Caratteristiche del tessuto | 5 |
| 1.2 I tipi di cartilagine | 6 |
| 1.2.1 La cartilagine elastica | 6 |
| 1.2.2 La fibrocartilagine | 7 |
| 1.2.3 La cartilagine ialina | 7 |
| 1.3 La cartilagine articolare | 9 |
| 1.3.1 Composizione della cartilagine articolare | 9 |
| 1.3.2 Struttura della cartilagine articolare | 14 |
| 1.3.3 Caratteristiche e proprietà meccaniche | 15 |
| Cap.2 Malattie degenerative della cartilagine e soluzioni chirurgiche | 17 |
| 2.1 Malattie | 17 |
| 2.1.1 Osteoartrite | 17 |
| 2.1.2 Artrite reumatoide | 20 |
| 2.2 Trattamenti chirurgici | 22 |
| 2.2.1 <i>Debridement</i> | 23 |
| 2.2.2 Tecniche di stimolazione del midollo osseo | 23 |
| 2.2.3 <i>Mosaicplasty</i> | 25 |
| 2.2.4 Allotrapianto osteocondrale | 27 |
| 2.2.5 Osteotomia | 28 |
| 2.2.6 Sostituzione totale o parziale dell'articolazione | 29 |
| 2.2.7 Trapianto autologo di condrociti | 29 |
| Cap.3 L'ingegneria tissutale applicata alla cartilagine | 31 |
| 3.1 Introduzione | 31 |
| 3.2 Cellule | 32 |
| 3.2.1 Condrociti | 33 |
| 3.2.2 Cellule staminali | 33 |
| 3.3 Scaffold | 37 |
| 3.3.1 Scaffold naturali | 38 |
| 3.3.2 Scaffold sintetici | 40 |

| | |
|---|-----------|
| 3.3.3 Configurazioni degli scaffold | 41 |
| 3.4 Stimoli | 43 |
| 3.4.1 Fattori di crescita | 43 |
| 3.4.2 Bioreattori | 47 |
| Cap.4 Valutazione della cartilagine ingegnerizzata | 55 |
| 4.1 Considerazioni biomeccaniche | 55 |
| 4.1.1 Test per determinare le proprietà del materiale | 56 |
| 4.1.2 Test tribologici | 59 |
| 4.1.3 Preparazione dei campioni | 60 |
| 4.2 Considerazioni biochimiche e istologiche | 60 |
| 4.2.1 Valutazione biochimica | 60 |
| 4.2.2 Valutazione istologica | 62 |
| 4.3 Test non distruttivi | 63 |
| 4.3.1 MRI | 63 |
| 4.3.2 Micro-CT | 64 |
| 4.3.3 Test meccanici non distruttivi | 64 |
| 4.3.4 Ultrasuoni | 64 |
| Conclusioni | 67 |
| Bibliografia | 69 |
| Sitografia | 71 |

ABSTRACT

Nei paesi più industrializzati le malattie degenerative che colpiscono la cartilagine articolare, come l'osteoartrite e l'artrite reumatoide, sono diventate sempre più frequenti comportando una serie di inconvenienti per le persone che ne sono affette. Negli anni si sono ricercate diverse soluzioni al fine di ridurre il dolore all'articolazione e migliorarne la mobilità ma nessuna tecnica si è dimostrata sufficientemente efficace nel riparare e prevenire la degradazione della cartilagine. Una svolta si è ottenuta con l'avvento di una nuova disciplina, la Tissue Engineering, che si propone come una valida alternativa alle tecniche tradizionali facendo uso di cellule autologhe, condrociti o cellule staminali, coltivate in determinati scaffold per ricostruire in vitro il tessuto cartilagineo. Molte ricerche sono state effettuate per favorire il più possibile la rigenerazione del tessuto studiando diversi biomateriali per la costruzione di scaffold, e passi in avanti sono stati fatti nel campo della stimolazione del costrutto indagando vari tipi di fattori di crescita e sviluppando bioreattori per la coltura dinamica delle cellule. Sono necessari ulteriori studi, però, nel campo della valutazione degli impianti in quanto non sono ancora presenti criteri ben definiti che mi dicano se un dato costrutto possiede determinate proprietà per poter essere utilizzato in vivo. L'ingegneria tissutale è quindi una possibile soluzione per curare lesioni alla cartilagine articolari ma ulteriori ricerche sono necessarie per l'applicazione clinica.

INTRODUZIONE

La sostituzione di organi danneggiati da malattie o traumi rappresenta uno dei problemi cruciali della medicina moderna; come conseguenza della crescente aspettativa di vita dei paesi più industrializzati, il bisogno di un trapianto d'organo è cresciuto [1,2]. Purtroppo questa procedura è molto limitata a causa dell'insufficienza di donatori e molti pazienti bisognosi di un organo muoiono nell'attesa [1,2].

Il numero limitato di donatori è solo uno dei problemi associati al trapianto d'organo: infatti anche in presenza dell'organo possono insorgere problemi di compatibilità che portano al rigetto nonostante i progressi fatti nel campo degli immunosoppressori.

In questo contesto, molte delle future speranze vengono riposte nel trapianto di cellule o tessuti [1]. Il trapianto di tessuto, spesso prelevato dallo stesso paziente, deve tenere in considerazione la limitata quantità di tessuto disponibile e oltretutto comporta procedure spesso complesse che possono portare all'insorgenza di dolori cronici nei siti di prelievo. Per ovviare a tale problema si può pensare di usare tessuti prelevati da altri essere umani o addirittura tessuti provenienti da animali. In entrambi i casi, però, si devono subire terapie a base di immunosoppressori per evitare la reazione di rigetto da parte del sistema immunitario: si tratta di terapie molto costose che possono portare all'assuefazione.

Tutti questi problemi hanno portato alla ricerca di una soluzione che potrebbe venire dall'ingegneria tissutale, un settore di ricerca emerso di recente all'interno della scienza dei biomateriali. Grazie a questa disciplina sono state studiate delle tecniche in grado di coltivare, a livello di laboratorio e a livello industriale, linee cellulari e tessuti con le caratteristiche del ricevente [1,2].

L'ingegneria tissutale è stata definita nel 1998 come *“una tecnica interdisciplinare che applica i principi e i metodi dell'ingegneria e delle scienze biologiche con l'obiettivo di comprendere le relazioni fondamentali tra struttura e funzione nei tessuti sani e malati dei mammiferi e di sviluppare sostituti biologici in grado di ripristinare, mantenere o migliorarne le funzioni”* [1,2]. La caratteristica innovativa dei costrutti ingegnerizzati, a differenza delle tradizionali tecniche di trapianto, è che, in caso di successo, si integrano con i tessuti del paziente e non richiedono costosi trattamenti farmacologici.

È possibile utilizzare anche combinazioni di materiali biologici e biomateriali per creare un sistema atto al ripristino o alla modifica della funzione di un tessuto o di un organo [1].

Un importante settore di ricerca dell'ingegneria tissutale riguarda lo studio dei materiali utilizzati che possono essere naturali o sintetici. Inoltre bisogna comprendere nel dettaglio i meccanismi che regolano la crescita e la differenziazione cellulare e le modalità attraverso cui i componenti della matrice extracellulare interagiscono con le funzioni cellulari per ricreare un tessuto il più simile possibile al tessuto di partenza [1]. La tecnologia inoltre si occupa della messa a punto dei sistemi per la coltivazione in vitro di cellule, stadio fondamentale nell'applicazione dell'ingegneria tissutale, progettando bioreattori che si occupano del nutrimento e della stimolazione dinamica delle cellule. La coltivazione in vitro, infatti, si propone di risolvere il problema della carenza di tessuti per il trapianto e al tempo stesso riduce al minimo la risposta immunitaria dopo l'impianto in quanto si utilizzano cellule provenienti dallo stesso soggetto a cui andrà in seguito applicato il tessuto ingegnerizzato.

Questo approccio offre opportunità d'impiego per una vasta gamma di situazioni e i costi relativi risultano molto inferiori rispetto all'impiego di organi da donatore [1]. Proprio per queste ragioni, l'ingegneria tissutale è stata studiata in vari ambiti e per i più disparati scopi, al fine di trovare una soluzione ottimale ai problemi della medicina moderna.

In questa tesi viene discussa l'applicazione dell'ingegneria tissutale nella riparazione della cartilagine articolare, tessuto che sembra molto semplice ma che possiede una struttura caratteristica difficile da riprodurre. Le moderne soluzioni disponibili per la cura dei difetti alla cartilagine, che implicano l'espianto di cartilagine sana dal paziente, la modellazione nella forma desiderata ed il reimpianto nella zona lesionata, non sono soddisfacenti a lungo termine e presentano diversi limiti come la scarsa disponibilità di cartilagine autologa per il trapianto e la difficoltà di modellare la delicata struttura tridimensionale, necessaria per una buona riuscita della protesi [1]. In alternativa, sono state impiegate protesi in metallo e in materiale polimerico sempre con limitato successo [1,2].

L'ingegneria tissutale si pone come alternativa valida rispetto a queste soluzioni cercando di superarne i limiti e di garantire al paziente elevata qualità di vita [1].

CAPITOLO 1 LA CARTILAGINE

1.1 CARATTERISTICHE DEL TESSUTO

Il tessuto cartilagineo rappresenta una forma specializzata di tessuto connettivo appartenente ai tessuti scheletrici o tessuti connettivi di sostegno dotato di specifiche proprietà meccaniche come la grande resistenza alla tensione, la flessibilità e l'elasticità [1]. Tale tessuto è costituito da cellule, dette condrociti, e da un'abbondante matrice extracellulare, composta da fibre di collagene o elastiche immerse in una matrice amorfa [3]. La matrice amorfa, a differenza della matrice dei tessuti connettivi propriamente detti, risulta solida e contiene al suo interno collagene, proteoglicani e piccole quantità di svariate glicoproteine [1,3].

I condrociti, le uniche cellule all'interno della cartilagine, sintetizzano e secernono la matrice extracellulare e sono accolti in cavità di quest'ultima denominate lacune. La cospicua consistenza della matrice extracellulare consente al tessuto di sopportare sollecitazioni meccaniche senza deformarsi in modo permanente [3]. Un'ulteriore funzione della cartilagine è di fornire sostegno ai tessuti molli [3]. Avendo una superficie liscia ed essendo capace di recuperare la sua forma, la cartilagine fornisce alle articolazioni una superficie ammortizzante atta agli scorrimenti, facilitando in tal modo i movimenti delle ossa [3,4]. Inoltre, la cartilagine è indispensabile per lo sviluppo e l'accrescimento delle ossa lunghe, sia prima che dopo la nascita.

La consistenza compatta, simile ad un gel, della cartilagine dipende da:

- i legami elettrostatici che si formano tra le fibre di collagene e le catene laterali glicosaminoglicaniche dei proteoglicani della matrice;
- i legami tra l'acqua di solvatazione e le catene glicosaminiche dotate di cariche negative [3].

Nei mammiferi la cartilagine forma l'abbozzo per la maggior parte delle ossa dello scheletro che successivamente verrà rimpiazzato dal tessuto osseo vero e proprio. Negli adulti la si può trovare in corrispondenza delle superfici articolari, nei dischi intervertebrali, nello scheletro del padiglione dell'orecchio esterno e inoltre partecipa alla formazione della trachea e dei bronchi [1,3].

Il tessuto risulta privo di vasi sanguigni e viene nutrito per mezzo della diffusione di sostanze nutritive dal tessuto connettivo adiacente o dal liquido sinoviale contenuto

nelle cavità articolari. I condrociti, come conseguenza dell'assenza di vasi, mostrano un'attività metabolica ridotta. Inoltre, nella cartilagine mancano anche i vasi linfatici e i nervi.

Il pericondrio è una guaina di tessuto connettivo denso che, in molti casi, ad esclusione della cartilagine articolare, circonda il tessuto cartilagineo, formando un'interfaccia fra la cartilagine ed il tessuto da essa sostenuto. Il pericondrio ospita i vasi sanguigni destinati a rifornire la cartilagine priva di vasi e contiene anche nervi e vasi linfatici [1,3,5].

1.2 I TIPI DI CARTILAGINE

Le variazioni nella combinazione dei componenti della matrice della cartilagine danno luogo a tre tipi di cartilagine adeguati alle necessità biomeccaniche locali: la cartilagine elastica, la fibrocartilagine e la cartilagine ialina.

1.2.1 La cartilagine elastica

La cartilagine elastica si ritrova principalmente nel padiglione auricolare, nelle pareti del meato acustico esterno, nelle tube auditive di Eustachio, nell'epiglottide e nelle cartilagini cuneiformi della laringe [3]. E' caratterizzata dalla presenza di pochi condrociti, una piccola concentrazione di proteoglicani ma contiene una trama abbondante di sottili fibre elastiche oltre alle fibrille di collagene di tipo II in grado di donarle una grande flessibilità (figura 1) [3,5]. La cartilagine elastica a fresco ha un colore giallastro provocato dalla presenza dell'elastina nelle fibre elastiche; inoltre è circondata dal pericondrio che ne garantisce nutrizione e crescita [3]. Questo tipo di cartilagine è meno vulnerabile rispetto ai cambiamenti degenerativi rispetto agli altri tipi.

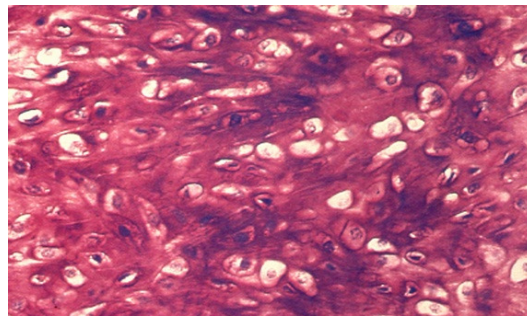


Figura 1: cartilagine elastica [32]

1.2.2 La fibrocartilagine

La fibrocartilagine si rinviene nei dischi intervertebrali, nelle inserzioni di alcuni ligamenti alle superfici cartilaginee delle ossa e nella sinfisi pubica [3,5]. La fibrocartilagine contiene condrociti, isolati o in gruppi isogeni, disposti in lunghe file separate da fibre di collagene grossolane (figura 2). La matrice contiene un gran numero di fibre di collagene di tipo I. In questo tipo di cartilagine le fibre di collagene o formano dei fasci irregolari interposti fra i gruppi di condrociti o si dispongono parallelamente alle colonne di cellule. Questo orientamento dipende dagli stimoli meccanici che agiscono sulla fibrocartilagine, poiché i fasci di collagene assumono una direzione parallela a quella delle forze applicate [3]. La cartilagine fibrosa è priva di un pericondrio identificabile.

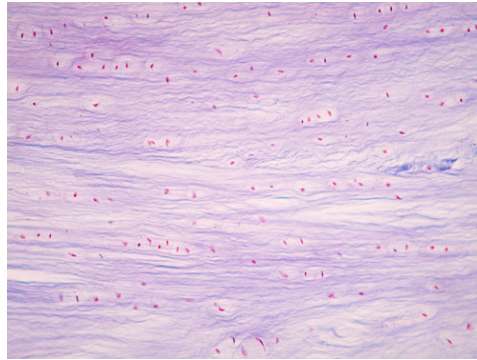


Figura 2: cartilagine fibrosa [32]

1.2.3 La cartilagine ialina

La cartilagine ialina è quella più diffusa nel corpo e a fresco risulta traslucida ed ha un colore bluastrastro con una superficie liscia [5]. Nell'embrione funge da scheletro temporaneo finché non è sostituita gradualmente dal tessuto osseo. Nei mammiferi adulti la cartilagine ialina è localizzata sulle superfici articolari delle articolazioni mobili, nelle pareti del naso, della laringe della trachea, dei bronchi, nelle terminazioni ventrali delle coste e nelle placche epifisarie, nelle quali è responsabile dell'accrescimento longitudinale delle ossa [3].

Il 40% del peso secco della cartilagine ialina è costituito da fibre di collagene incluse in un gel idratato, dotato di una certa consistenza e formato da proteoglicani e glicoproteine strutturali [3]. Contiene principalmente collagene di tipo II tuttavia sono spesso presenti piccole quantità di collagene di tipo IX, X e XI.

I proteoglicani della cartilagine contengono condroitin 4- solfato, condroitin 6-solfato e cheratan solfato legati covalentemente all'asse proteico centrale. Fino a 200 di questi proteoglicani si associano in modo non covalente con lunghe molecole di acido ialuronico, formando aggregati proteoglicanici che interagiscono con il collagene [3]. Un'altra componente importante nella matrice cartilaginea è la glicoproteina strutturale condronectina, una macromolecola che si lega specificatamente ai glicosamminoglicani ed al collagene di tipo II mediando l'adesione dei condrociti alla matrice extracellulare. Eccetto che a livello delle cartilagini articolari, tutte le cartilagini ialine sono rivestite da uno strato di tessuto connettivo denso, il pericondrio, che è indispensabile per l'accrescimento ed il mantenimento della cartilagine (figura 3) [3]. Esso è ricco di fibre di collagene di tipo I e contiene numerosi fibroblasti. Le cellule contenute nel suo strato più interno sono condroblasti e si differenziano facilmente in condrociti.

Alla periferia della cartilagine ialina i condrociti giovani hanno una forma ellittica mentre nelle regioni più profonde i condrociti assumono una forma tondeggiante e possono apparire in gruppi detti isogeni, comprendenti fino a 8 cellule derivate dalle divisioni mitotiche di un singolo condrocita. Poiché la cartilagine è priva di vasi sanguigni, i condrociti respirano in una bassa tensione di ossigeno. I condrociti della cartilagine ialina metabolizzano il glucosio principalmente per glicolisi anaerobica, il cui prodotto finale è l'acido lattico. Le sostanze nutritive provenienti dal sangue arrivano ai condrociti situati nelle zone più interne attraverso diffusione, i meccanismi coinvolti comprendono la diffusione ed il trasporto d'acqua e dei soluti promossi dall'azione di pompaggio dovuta alla compressione e decompressione intermittenti della cartilagine; per questa ragione lo spessore massimo della cartilagine è limitato [3].

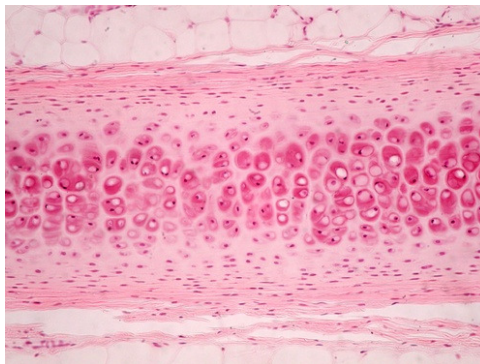


Figura 3: cartilagine ialina in cui si riconoscono bene i condrociti all'interno delle lacune e il pericondrio[33]

Istogenesi e accrescimento

La cartilagine deriva dal mesenchima. La prima modificazione osservata consiste nell'assunzione di una forma sferica da parte delle cellule mesenchimali, che retraggono i loro prolungamenti citoplasmatici, si moltiplicano rapidamente e formano agglomerati densi di condroblasti. Le cellule formate da questa differenziazione diretta delle cellule mesenchimali, dette ora condroblasti, possiedono un citoplasma ricco di ribosomi. Inizia quindi la sintesi e la deposizione della matrice che separa i condroblasti gli uni dagli altri. Durante lo sviluppo la differenziazione inizia al centro e si propaga verso la periferia, pertanto le cellule a sede centrale possiedono già le caratteristiche dei condrociti quando le cellule a sede periferica sono ancora dei condroblasti [3]. Il mesenchima superficiale invece dà origine al pericondrio.

L'accrescimento della cartilagine avviene mediante due processi: accrescimento interstiziale, dovuto alla divisione mitotica di condrociti preesistenti e accrescimento per apposizione, dovuto alla differenziazione delle cellule del pericondrio [3]. In entrambi i casi la sintesi della matrice contribuisce alla crescita della cartilagine.

L'accrescimento interstiziale si verifica soltanto durante le fasi precoci della formazione della cartilagine, quando provoca un aumento della massa del tessuto facendo espandere la matrice cartilaginea dall'interno. La crescita interstiziale avviene però nella cartilagine articolare dove, in assenza del pericondrio, le cellule e la matrice prossime alle superfici articolari in caso di erosione devono essere rimpiazzate dall'interno. La cartilagine danneggiata si rigenera con difficoltà, eccetto nei bambini, e spesso in modo incompleto, grazie all'azione del pericondrio. Nelle aree con danni più estesi però il pericondrio, al posto di formare nuova cartilagine, dà origine ad una cicatrice di tessuto connettivo denso.

1.3 LA CARTILAGINE ARTICOLARE

1.3.1 Composizione della cartilagine articolare

La cartilagine articolare rappresenta una variante di tessuto connettivo, le cui principali funzioni sono di ammortizzare e distribuire il carico e di permettere contemporaneamente lo scorrimento delle superfici articolari [4].

Si tratta di una cartilagine ialina, d'aspetto traslucido, a superficie liscia, di colore bianco madreperlaceo, con spessore variabile in rapporto al carico articolare cui è

normalmente sottoposta. Lo spessore, per esempio, in un normale ginocchio di un adulto è di 1,5-3 mm (figura 4) [6].

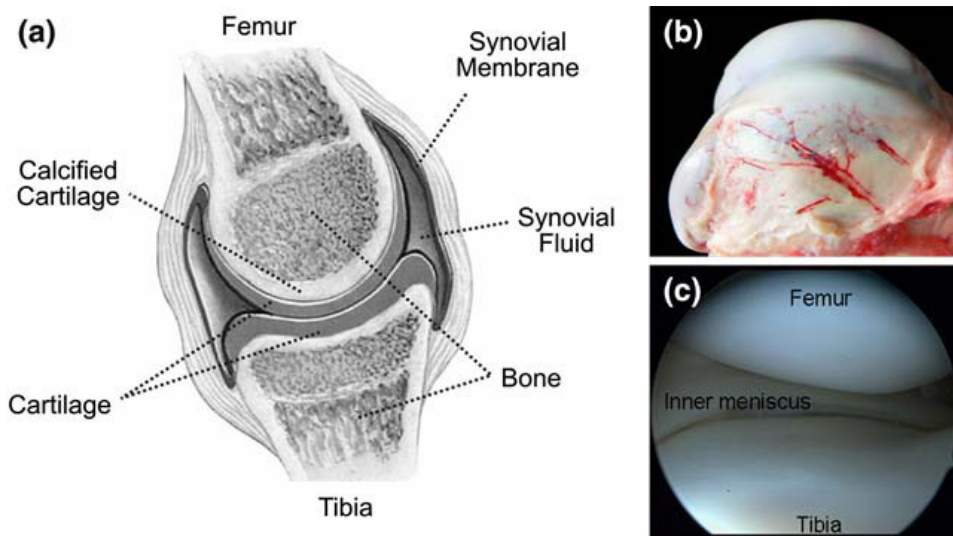


Figura 4 : (a) articolazione del ginocchio,(b) condile femorale di un'articolazione aperta, (c) artroscopia di un ginocchio sano [5]

Risulta composta da due fasi, una solida e una liquida. Generalmente il 60-80% del peso totale a secco è costituito dalla parte liquida che contribuisce alle caratteristiche proprietà di questo tessuto mentre il restante 20-40% è costituito dalla parte solida [6]. Tale tessuto possiede la più bassa densità volumetrica cellulare rispetto ad ogni altro tessuto nel corpo: i condrociti, l'unica componente cellulare presente, costituiscono infatti l'1% del volume totale del tessuto mentre il rimanente 99% è costituito da una complessa matrice extracellulare [5].

I condrociti non contribuiscono direttamente alle proprietà meccaniche del tessuto ma possono recepire i diversi stimoli meccanici e rispondere all'interno del proprio microambiente. Come negli altri tipi di cartilagine, le cellule cartilaginee sono incapsulate in cavità, isolate o in aggregati, e non possono migrare [6]. I condrociti sono le cellule responsabili della sintesi dei costituenti cartilaginei, di cui inoltre regolano la disposizione tridimensionale e il turnover. Normalmente ovoidali, con diametro di 10 micron, i condrociti presentano numerose protrusioni irregolari che rivestono una duplice funzione: definire un sistema di ancoraggio meccanico aspecifico e costituire canali preferenziali per l'escrezione di prodotti metabolici [4].

I condrociti possiedono talora un ciglio: il ruolo sembrerebbe quello di analizzatore dell'ambiente extracellulare, fornendo informazioni sulle variazioni qualitative della matrice pericellulare e permettendo così al condrocita di provvedere, attraverso la biosintesi, al ripristino delle condizioni ottimali [4].

Possiedono un grande reticolo endoplasmatico e un apparato di Golgi molto sviluppato per permettere le attività di sintesi proteica. I condrociti si ritrovano più numerosi e attivi nella cartilagine fetale e giovanile e nello stato intermedio; inoltre, le cellule dei diversi strati presentano processi sintetici e catabolici qualitativamente e quantitativamente diversi e sembrano anche rispondere diversamente alle influenze ormonali e ai mediatori. Ogni condrocita può essere considerato come un'unità metabolica funzionale della cartilagine, responsabile della sintesi e del mantenimento della matrice circostante. In condizioni fisiologiche un complesso meccanismo omeostatico regola i processi anabolici e catabolici del condrocita. Tale rigido controllo sembra essere il risultato di una produzione bilanciata di citochine anaboliche e cataboliche, in modo tale che la produzione dei costituenti della matrice sia in equilibrio con la degradazione.

La matrice extracellulare della cartilagine articolare consiste per il 60-85% di acqua ed elettroliti disciolti mentre la parte solida per il 10-30% di collagene e per il 3-10% di proteoglicani e glicoproteine [5]. La matrice e la sua azione reciproca con il liquido interstiziale giocano un ruolo fondamentale nella biomeccanica della cartilagine [6].

Al suo interno si può trovare una grande varietà di tipi di collagene (II, VI, IX, X e XI) che contribuisce in modo fondamentale alle proprietà meccaniche della cartilagine articolare. Il 90% circa del collagene cartilagineo è di tipo II e costituisce una rete fibrillare tridimensionale di aggregati molecolari a forma di funi intrecciate [4]. Ogni molecola di collagene di tipo II è costituita da tre catene polipeptidiche identiche alfa, avvolte a spirale; ciascuna catena alfa è a sua volta ripiegata a formare un'elica sinistrorsa. Ogni catena alfa è costituita da circa 1000 amminoacidi disposti regolarmente secondo la formula (x-y-Gly) (figura 5). Ogni terzo amminoacido è rappresentato dalla glicina, mentre x e y sono per la maggior parte prolina e idrossiprolina, amminoacidi ciclici che danno rigidità alla catena, limitandone la rotazione [4,5]. Un altro amminoacido caratteristico e di notevole importanza funzionale è l'idrossilisina che concorre a promuovere la formazione di legami tra collagene e

proteoglicani. Idrossilisina e idrossiprolina sono amminoacidi tipici del collagene per cui la loro escrezione può rappresentare un utile indice del turnover cartilagineo.

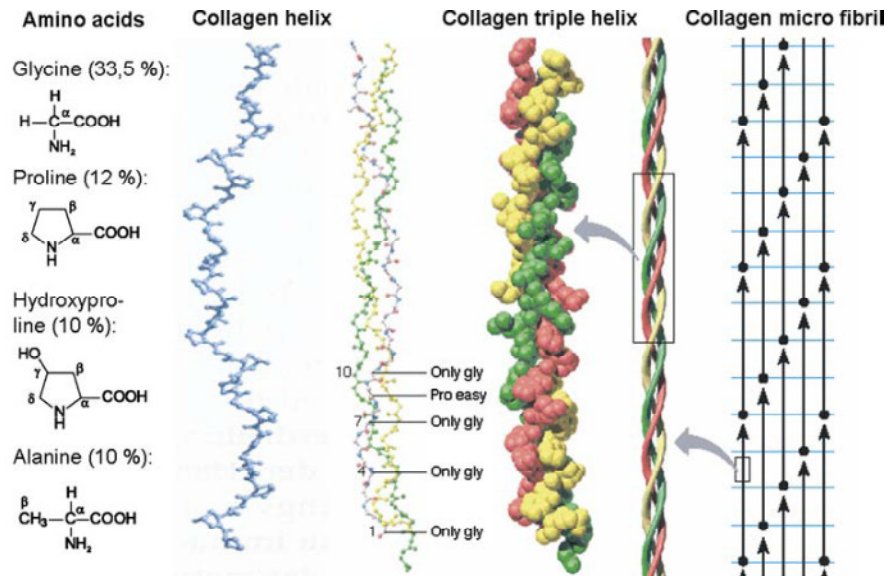


Figura 5: struttura del collagene dagli amminoacidi isolati alle micro fibrille [5]

Il collagene di tipo IX interagisce con il collagene di tipo II ed è preferenzialmente situato all'intersezione tra le fibrille, funzionando come una molecola di raccordo di notevole importanza nel determinare le proprietà biomeccaniche della cartilagine articolare.

Il collagene di tipo X, sintetizzato solo dai condrociti ipertrofici, si ritrova soprattutto a livello della cartilagine calcificata; quello di tipo XI è presente all'interno delle fibrille di tipo II e probabilmente ne regola lo spessore; quello di tipo VI è ampiamente distribuito nella rete pericondrocitaria. L'organizzazione molecolare della rete collagene, le cui fibre sono disposte con diverso orientamento spaziale a seconda delle linee di forza delle sollecitazioni meccaniche, consente l'ancoraggio della cartilagine all'osso e conferisce al tessuto resistenza alle forze di trazione e di taglio [4].

I proteoglicani presenti maggiormente nella cartilagine si ritrovano in forma di aggregati, chiamati aggregani, che consistono in una proteina centrale cui si lega covalentemente un numero elevato di catene laterali di glicosaminoglicani quali il condroitin-solfato e il cheratin-solfato (figura 6). Nella maggior parte degli aggregani le catene di cheratin-solfato si ritrovano nelle vicinanze della molecola di acido ialuronico mentre le catene di condroitinsolfato sono più distanziate da quest'ultima.

La distribuzione di questi due glicosaminoglicani varia molto tra gli individui anche a causa di differenze genetiche. La struttura è stabilizzata dalla connessione tra aggreganti e acido ialuronico formando complessi macromolecolari di proteoglicani [6]. Questi macroaggregati presentano una fitta rete di cariche elettronegative che, per reciproca repulsione, conferiscono rigidità al sistema e consentono di legare elevate quantità d'acqua, che viene ceduta sotto carico e riassunta al termine della compressione, permettendo alla cartilagine di resistere a deformazioni reversibili. Per tale motivo la capacità della cartilagine articolare di sopportare la forza peso è direttamente proporzionale ai livelli di proteoglicani.

L'idratazione dei proteoglicani è tuttavia rigidamente limitata dalla rete tridimensionale di fibrille di collagene nella quale sono immerse tali strutture.

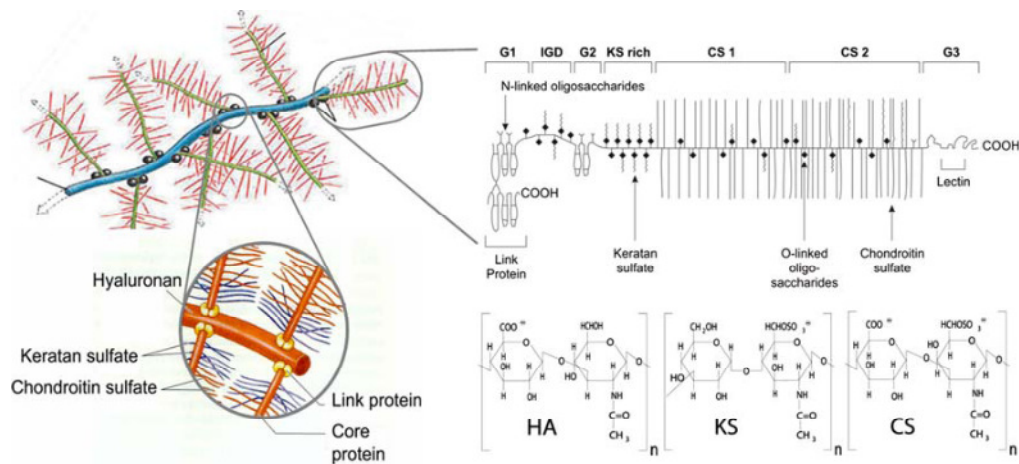


Figura 6: struttura degli aggreganti presenti nella matrice cartilaginea [5]

La cartilagine articolare contiene anche proteoglicani di dimensioni minori come il biglicano, la decorina e la fibromodulina [6]. Studi recenti hanno dimostrato, nelle fasi precoci dell'osteoartrosi, un'abnorme e incontrollata espressione dei proteoglicani minori come tentativo, peraltro inadeguato, di risposta riparativa tissutale [4].

La cartilagine inoltre contiene numerose proteine di matrice tra cui una particolare menzione merita la COMP (proteina oligomerica della matrice cartilaginea) che sembra avere un ruolo fondamentale per la formazione e la struttura della stessa cartilagine articolare [4]. Durante l'artrosi si è riscontrata una maggiore quantità di questa proteina nel sangue e nel liquido sinoviale [5].

Nella matrice extracellulare che circonda i condrociti si possono distinguere tre diverse regioni distinguibili in base alla composizione biochimica, alla funzione e all'aspetto [5].

La matrice pericellulare ricopre la superficie di ogni condrocita con uno strato sottile, possiede un alto contenuto di proteoglicani e acido ialuronico ma una scarsa componente di collagene fibrillare [4]. La matrice capsulare o territoriale è composta invece da un fitto intreccio di fibre collagene che avvolgono i condrociti, isolati o in gruppi, costituendo il "condrone", struttura a forma di canestro dotata di notevole plasticità e deformabilità [4]. La matrice interterritoriale costituisce la maggior parte del volume della cartilagine e conferisce al tessuto le sue caratteristiche funzionali.

Le matrici pericellulare e territoriale servono ad avvolgere le cellule dalla matrice interterritoriale, per proteggerle da un possibile danno dovuto al carico applicato e per trasmettere i segnali meccanici alle cellule.

1.3.2 Struttura della cartilagine articolare

In rapporto alla distribuzione dei condrociti, alla disposizione spaziale delle fibre di collagene e alle componenti della matrice, nella cartilagine articolare si possono distinguere quattro differenti zone (figura 7). Dalla zona superficiale alla zona più interna il numero di condrociti diminuisce mentre le dimensioni e l'attività metabolica risultano aumentate [5].

La zona superficiale costituisce solo il 10-20% della profondità della cartilagine articolare ma presenta la più alta densità cellulare all'interno del tessuto [6]. Le fibre di collagene in questa zona sono le più fini ma quelle più densamente organizzate e formano una lamina che ricopre l'articolazione. I condrociti di questa zona possiedono una forma affusolata e sono disposti parallelamente alla superficie inoltre risultano ricoperti da un film sottile di liquido sinoviale chiamato *lamina splendens*. Grazie a questa struttura la superficie riesce a resistere alla forza di taglio e alla frizione[7].

Nello strato più interno si trova la zona intermedia che è la più estesa e quella con la concentrazione di proteoglicani più elevata. Le cellule di questa zona possiedono una forma rotonda e sono metabolicamente attive a differenza di quelle presenti nella superficie [6,7]. Le fibre di collagene invece passano da un orientamento parallelo alla superficie ad un orientamento casuale.

Lo strato profondo possiede le fibre di collagene con il più grande diametro disposte in direzione perpendicolare alla superficie; esse sono inserite nel *tidemark*, la zona che separa lo strato profondo dalla zona calcificata. I condrociti sono disposti in colonne parallelamente alle fibre di collagene e presentano un'attività metabolica dieci volte maggiore rispetto alle cellule della superficie seppur possedendo solo il doppio dell'area di quest'ultime [5]. L'ultima zona è costituita dalla cartilagine calcificata dove la cartilagine risulta ancorata all'osso subcondrale. Essa contiene solo una piccola quantità di condrociti inerti ed è l'unica zona che contiene collagene di tipo X che favorisce la mineralizzazione della cartilagine e ne assicura l'integrità.

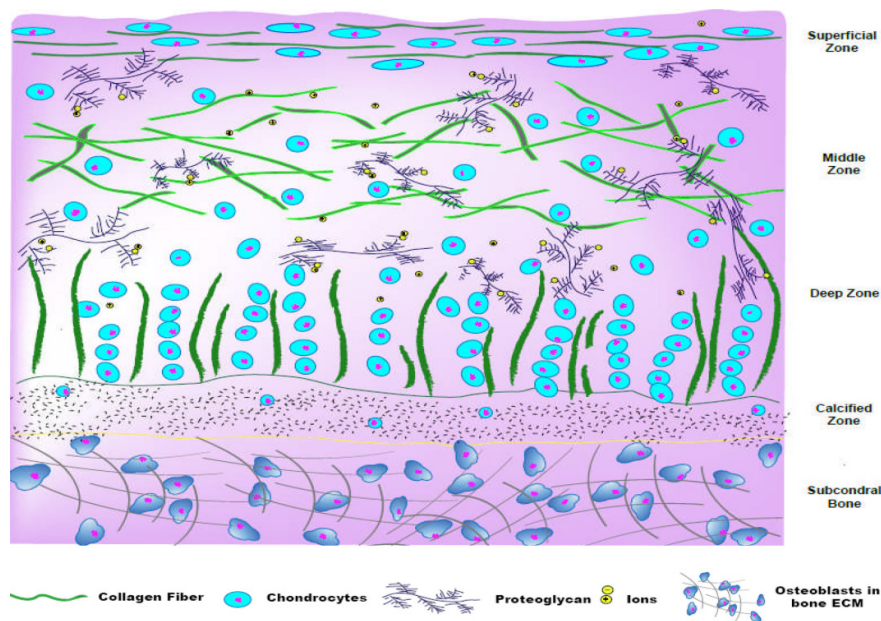


Figura 7 : struttura della cartilagine articolare dalla zona superficiale a quella calcificata [6]

1.3.3 Caratteristiche e proprietà meccaniche

Le specifiche caratteristiche viscoelastiche della cartilagine articolare sono dovute alla sua nano-architettura molecolare e alla organizzazione particolare di ogni zona. L'assenza di vasi sanguigni e linfatici, di fibre nervose e membrane basali, la rende unica tra i tessuti connettivi dell'organismo. La nutrizione è assicurata principalmente dal liquido sinoviale mediante diffusione e secondariamente, per gli strati più profondi, dai vasi provenienti dal sottostante osso subcondrale [4]. La cartilagine articolare assorbe con efficienza le pressioni meccaniche cui molte articolazioni sono soggette.

Le molecole di proteoglicani, che si rinvengono isolate od aggregate in un reticolo, trattengono grandi quantità di acqua. Questi componenti della matrice, ricchi di glicosaminoglicani idrofilici, funzionano come una molla [3]. Quando si applica una pressione, l'acqua è spremuta fuori dalla matrice cartilaginea al liquido sinoviale. Quando l'acqua è espulsa, entra in gioco un altro meccanismo che contribuisce alla resilienza della cartilagine; si tratta della repulsione elettrostatica reciproca tra i gruppi carbossilici e solforici, dotati di cariche negative, presenti nelle molecole di glicosaminoglicani [3]. Queste cariche sono anche responsabili della separazione delle diramazioni dei glicosaminoglicani, con la conseguente creazione di spazi che saranno occupati dall'acqua. Quando la pressione cessa, l'acqua è di nuovo attratta negli interstizi fra le diramazioni dei glicosaminoglicani.

Questi spostamenti dell'acqua sono provocati dall'uso delle articolazioni. Essi sono essenziali per il nutrimento della cartilagine e per facilitare gli scambi di ossigeno, di anidride carbonica e di altre molecole fra il liquido sinoviale e la cartilagine articolare. La mancanza del pericondrio nella cartilagine articolare comporta una più debole capacità di auto-riparazione [5]. Il pericondrio infatti contiene delle cellule precursori dei fibroblasti in grado di migrare nelle ferite dove si circondano di matrice e rimpiazzano il tessuto.

La cartilagine articolare inoltre rappresenta un tessuto altamente idratato con una struttura composta che possiede una rigidità in compressione relativamente bassa ($E = 0,1-2 \text{ MPa}$), un coefficiente di Poisson (ν) di 0,2 e un coefficiente di permeabilità pari a $k=5 \times 10^{-15} \text{ m}^4/\text{Ns}$ [8]. Inoltre, insieme con il liquido sinoviale, la cartilagine possiede coefficiente di frizione pari a 0,008 [8].

CAPITOLO 2

MALATTIE DEGENERATIVE DELLA CARTILAGINE E SOLUZIONI CHIRURGICHE

La cartilagine articolare presenta una capacità limitata di autorigenerazione e proprio per questo la sua degradazione, in seguito ad eventi traumatici o a malattie degenerative croniche come l'osteoartrite o l'artrite reumatoide, rappresenta uno dei maggiori problemi legati alla salute soprattutto negli stati industrializzati in cui l'aspettativa di vita è molto alta [5,8,9]. Attualmente più di 40 milioni di cittadini americani, circa il 15% della popolazione presente in USA, soffre di artrite ed è stimato che entro il 2020 si arriverà a 60 milioni [5]. L'artrite è il termine per un gruppo di disturbi che sono caratterizzati dall'infiammazione di una o più articolazioni e comporta dolore, rigidità dell'articolazione e difficoltà di movimento, riducendo di molto la qualità della vita dei soggetti che ne soffrono [5,8]. Le conseguenze socio-economiche dell'artrite e la spesa che comporta per la cura sanitaria sono notevoli [5,10]. Tra le molte diagnosi di artrite le più diffuse sono l'osteoartrite e l'artrite reumatoide.

2.1 MALATTIE

2.1.1 Osteoartrite

L'osteoartrite è una malattia articolare cronica caratterizzata da lesioni degenerative e produttive a carico della cartilagine delle articolazioni diartrodiali [4]. Queste sono articolazioni mobili e sono formate da cartilagine, membrana e liquido sinoviale, tutte strutture che, insieme all'osso subcondrale, possono essere coinvolte dall'osteoartrite.

L'osteoartrite rappresenta senza dubbio l'artropatia più frequente nella popolazione e in Italia ne sarebbero affette 11 396 000 persone con una prevalenza maggiore nel sesso femminile (24,4%) rispetto al maschile (15,5%) [4].

Vi sono diversi fattori di rischio come l'età, i fattori meccanici, l'ereditarietà, l'obesità e l'infiammazione.

Età

Il ruolo dell'invecchiamento emerge dalla constatazione dell'aumento di frequenza della

malattia con l'avanzare dell'età [4]. Tuttavia l'analisi dei rapporti fra i due eventi non è così semplice e oltretutto l'invecchiamento non risulta di per sé causa dell'osteoartrite [4]. In particolare, prendendo in considerazione la cartilagine articolare, si osserva che le modificazioni indotte dall'invecchiamento sono spesso diverse e di segno opposto rispetto a quelle dell'osteoartrite.[4] Sul piano biochimico infatti nella cartilagine senile sono diminuiti il contenuto d'acqua, il rapporto condroitin-4-solfato/condroitin-6-solfato e le dimensioni dei monomeri dei proteoglicani mentre tutti questi parametri sono aumentati nella cartilagine artrosica [4]. Nonostante queste considerazioni, si può ammettere che le modificazioni della cartilagine con il passare dell'età comportino una perdita di elasticità e resistenza alle sollecitazioni e favoriscano l'azione lesiva di altri fattori.

Fattori Meccanici

La responsabilità degli agenti meccanici è stata ripetutamente dimostrata negli animali, ma anche nell'uomo, nel quale possono essere suddivisi nei seguenti tipi: malformazioni o malposizioni articolari, instabilità articolare, attività professionali o sportive e traumi [4].

Ereditarietà

Va sempre di più affermandosi il concetto di predisposizione ereditaria che può essere responsabile dell'osteoartrosi sia direttamente che indirettamente. In quest'ultimo caso sono in causa alcune malattie ereditarie che, compromettendo il metabolismo e la funzione articolare, possono generare alcuni tipi di osteoartrosi [4].

Obesità

Tra i fattori di rischio "modificabili", l'obesità è senza alcun dubbio il più rilevante per lo sviluppo dell'osteoartrosi del ginocchio in entrambi i sessi; invece qualche dubbio resta sul suo ruolo nel determinare l'osteoartrosi dell'anca, della quale però influenza il tipo di evoluzione aggravandola [4].

Infiammazione

Il ruolo dell'infiammazione è oggi molto valorizzato sia per la capacità di causare l'osteoartrosi sia per l'influenza sulla sua progressione.

L'alterazione di base dovuta all'osteoartrite comporta una perdita di quantità e di integrità dei proteoglicani, che a sua volta causa una minore resistenza meccanica. Nel frattempo le fibre di collagene si frantumano e così la protezione dei condrociti diventa

inefficace, per cui le cellule mostrano segni di sofferenza che progressivamente portano alla necrosi [4].

La cartilagine può essere considerata il tessuto bersaglio del processo artrosico, in quanto a suo carico si manifestano sia i danni iniziali sia le alterazioni più vistose durante la progressione della malattia (figura 8). Le lesioni possono essere di tipo progressivo o di tipo produttivo. Le prime si sviluppano nelle sedi di contatto con il capo articolare

contrapposto, dove si verifica il maggiore carico.

Macroscopicamente negli stadi iniziali si riscontra una perdita di levigatezza, mentre nelle lesioni più avanzate si nota una lacerazione profonda della cartilagine ben delimitata che scopre l'osso subcondrale, il quale risulta rosso e irregolare, con presenza di piccole aree di tessuto fibroso o fibrocartilagineo [4]. Attorno all'ulcerazione si riscontra una zona di cartilagine erosa, giallastra o grigiastra [4].

Le lesioni di tipo produttivo si instaurano in modo precoce nelle sedi marginali non sottoposte a carico. Esse consistono nella produzione di cartilagine, con successiva ossificazione e danno luogo alla formazione di osteofiti [4]. Al microscopio ottico l'erosione cartilaginea è formata da fessure che dalla superficie vanno verso la profondità, dando luogo a un aspetto fibrillare della cartilagine [4]. Si arriva fino allo strato calcificato, mettendo a nudo l'osso e, nei casi più gravi, formazioni cistiche possono raggiungere la zona midollare [4]. Nello strato superficiale i condrociti vanno incontro a necrosi e così le lacune risultano vuote, mentre negli strati più profondi le lacune contengono raggruppamenti di 15-20 condrociti, probabilmente in seguito ad un tentativo di risposta riparativa [4]. Al microscopio elettronico le immagini più interessanti riguardano i condrociti che negli strati intermedi e profondi mostrano segni di iperattività, con numerosi prolungamenti, nucleo voluminoso e reticolo endoplasmatico ben sviluppato [4].

Il dolore è il sintomo principale dell'osteoartrosi. Esso è definito di tipo meccanico, in quanto viene risvegliato con il movimento e si calma con il riposo [4]. Generalmente manca il dolore notturno mentre il dolore diurno raggiunge picchi acuti solo in particolari situazioni [4]. La rigidità mattutina, dovuta all'inattività, è di breve durata (5-10 minuti) senza superare la mezz'ora [4].

La limitazione funzionale è progressiva e talvolta può comparire solo negli stadi più avanzati, specialmente quando sono interessati movimenti generalmente poco eseguiti.

Fra i più evidenti segni vi è l'aumento di volume dell'articolazione. La tumefazione è generalmente dura ed in genere è dovuta alla presenza degli osteofiti, alla riduzione dello spazio articolare e alle alterazioni posturali. Caratteristico segno dell'osteoartrosi è il crepitio, che si avverte durante il movimento [4]. Esso è dovuto all'irregolarità delle superfici articolari, tra loro ravvicinate e probabilmente poco lubrificate.

Anche se esistono provvedimenti terapeutici più indicati per certi tipi di osteoartrite rispetto ad altri, le linee terapeutiche di carattere generale sono comuni e possono riassumersi in cure fisiche e riabilitative, trattamenti farmacologici e chirurgici [4]. A questi va aggiunto il riposo, molto utile ma difficile da mantenere per lungo tempo senza rischio di effetti negativi.

Il francese Lequesne ha opportunamente classificato i farmaci adoperati nell' artrosi in tre categorie: i farmaci ad azione sintomatica rapida, di cui fanno parte gli analgesici, i FANS (analgesici non steroidei), i farmaci antiartrosici sintomatici ad azione lenta così denominati perché agiscono sui sintomi dell'artrosi lentamente, ma continuano la loro efficacia anche dopo qualche mese dalla sospensione e infine i farmaci condroprotettori ovvero capaci di prevenire, ritardare o riparare le lesioni agendo sulla componente strutturale [4].

2.1.2 Artrite reumatoide

L'artrite reumatoide è una malattia infiammatoria cronica che colpisce prevalentemente le articolazioni diartrodiali, anche se potenzialmente può coinvolgere ogni parte dell'organismo. A livello articolare il processo infiammatorio ha carattere erosivo [4].

L'artrite reumatoide è diffusa in tutto il mondo e la prevalenza della malattia è compresa tra lo 0,3 e il 2% della popolazione [4]. Le femmine sono più colpite dei maschi, con un rapporto di 4 a 1. L'esordio della malattia può avvenire a qualsiasi età, ma è più frequente tra i 40 e i 60 anni [4].

L'eziopatogenesi non è ancora ben nota ma l'ipotesi più plausibile prevede che la malattia si sviluppi quando in un individuo geneticamente predisposto agisce un antigene scatenante. Tale fatto determinerebbe un'attivazione del sistema immunitario che porterebbe allo sviluppo di un processo infiammatorio acuto e successivamente al suo mantenimento e alla sua cronicizzazione [4].

La membrana sinoviale è il principale bersaglio di questa infiammazione reagendo con un aumento di volume e la successiva formazione del panno sinoviale.

Quest'ultimo invade la cartilagine articolare e ne provoca l'erosione e la graduale degradazione (figura 8) [4]. Questo processo si estende all'osso e l'infiammazione arriva ad interessare tutti i tessuti che circondano l'articolazione provocandone in modo graduale la distruzione con conseguente dolore e instabilità. Le prime erosioni cartilaginee compaiono alla periferia, a differenza di quanto si verifica nell'osteoartrosi in cui le zone soggette a carico sono quelle più interessate, e sono dovute all'azione di enzimi proteolitici prodotti dal panno sinoviale e che con l'andare del tempo portano alla completa distruzione del tessuto cartilagineo [4].

È una malattia a decorso ciclico con fasi acute che si alternano a periodi di remissione della malattia. Una caratteristica è l'anemia, la febbre, la debolezza muscolare oltre al dolore articolare caratterizzato da tumefazione e da rigidità articolare [4]. A differenza dell'osteoartrite, la rigidità articolare mattutina è di lunga durata (fino a 2-3 ore).

La terapia è complessa ma gli obiettivi sono: abolire o attenuare l'infiammazione articolare e il dolore conseguente da essa, rallentare la progressione della malattia, preservare e recuperare la funzione articolare, prevenire o limitare lo sviluppo delle deformità articolari. In ogni caso la terapia coinvolge vari ambiti come la terapia farmacologica, la terapia fisica e riabilitativa ed infine la terapia chirurgica.

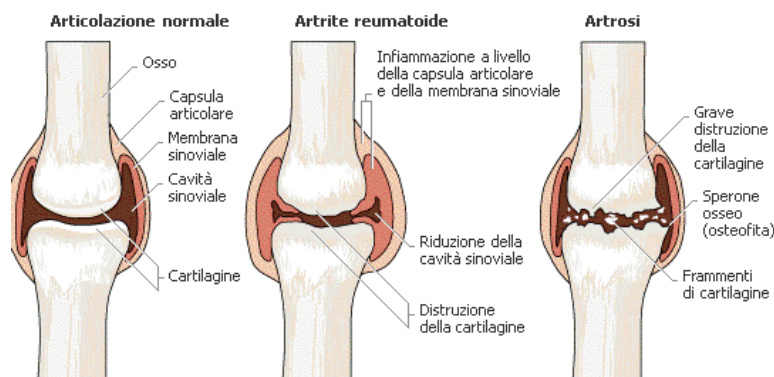


Figura 8: effetti dell' artrite reumatoide e dell' osteoartrosi sulle articolazioni[34]

In aggiunta a queste malattie, la cartilagine articolare può riportare dei danni a causa di traumi e soprattutto nell'ambito sportivo si può incorrere nella degenerazione del tessuto stesso.

Le lesioni a carico della cartilagine possono essere classificate in due categorie: la prima categoria comprende le microlesioni, cioè le lesioni che non arrivano fino all'osso sub condrale e interessano solo superficialmente il tessuto, mentre la seconda categoria è rappresentata dalle ferite che si spingono fino all'osso e quindi per la totale profondità della cartilagine [5,6,7].

Le lesioni a profondità parziale rendono inaccessibile la zona del danno al sangue e alle cellule progenitrici presenti nell'osso e proprio per questo non si riscontra la formazione di una capsula fibrotica e non vi è la presenza di meccanismi di auto-riparazione [6]. Le cellule in questo caso vanno incontro a necrosi e dopo circa tre giorni i condrociti adiacenti alla zona danneggiata cominciano a proliferare e a produrre matrice extracellulare, come indicato dal temporaneo aumento di sintesi di collagene di tipo II nelle cellule [5,6]. Nonostante questo tentativo da parte dei condrociti, essi risultano troppo pochi per riuscire a riparare il danno e oltretutto cessano la propria attività prima che il tessuto sia guarito, comportando un danno persistente che può portare alla degenerazione del tessuto [6].

Nel caso di ferite che arrivano all'osso, il danno è riparato dalle cellule staminali del mesenchima originate dal midollo osseo che invadono il sito danneggiato e lo rimpiazzano con tessuto fibrocartilagineo inferiore rispetto alla cartilagine articolare [5]. In dettaglio, una ferita profonda dà accesso al supporto vascolare e di conseguenza vi è sanguinamento e il sito è riempito con un coagulo di fibrina. Durante la prima settimana le cellule staminali mesenchimali derivanti dal midollo osseo migrano nel coagulo e iniziano la riparazione. Nelle settimane successive le cellule si differenziano in condrociti, come indicato dall'enorme sintesi di proteoglicani, e si arriva alla formazione di un tessuto simile alla cartilagine ialina. Osservazioni dopo lungo tempo, esaminando sia dal punto di vista funzionale che istologico il tessuto formato, rivelano la presenza di una fibrocartilagine con proprietà meccaniche inadeguate [5].

Oltre a questi metodi che avvengono in modo naturale nell'organismo, un grande numero di metodi è stato pensato per curare la cartilagine articolare ma solo alcuni vengono usati regolarmente nella realtà clinica[11] .

2.2 Trattamenti chirurgici

L'approccio chirurgico in caso di lesioni alla cartilagine è indicato per difetti che rimangono sistematici nonostante la terapia farmacologica [12].

Per scegliere quale sia l'approccio più adeguato nelle diverse situazioni bisogna tenere conto di diversi fattori

- eziologia
- gli obiettivi specifici di ogni paziente
- l'età del paziente
- indice di massa corporea
- il livello di attività fisica
- la grandezza e la localizzazione del danno

Di seguito sono riportati i metodi chirurgici attualmente in uso.

2.2.1 Debridement

La tecnica di *debridement* è stata originariamente descritta da Magnuson e si riferisce ad un termine ampio che comprende diverse azioni quali la levigatura della lesione e la successiva rimozione di ogni detrito presente nel sito per permettere alle forze di taglio di agire sulla cartilagine sana e non più su quella danneggiata [7, 12]. In questo modo non si riesce ad indurre un'azione di riparazione sulla cartilagine ma si mira al sollievo temporaneo dei sintomi e del disturbo funzionale [12].

Grazie al lavaggio è possibile rimuovere i detriti degenerativi della cartilagine articolare, gli enzimi proteolitici e i mediatori dell'infiammazione. Non è raccomandata come unica soluzione in quanto non impedisce la progressione della degenerazione della cartilagine ma è molto spesso il primo stadio per le tecniche di stimolazione del midollo osseo [12,13].

2.2.2 Tecniche di stimolazione del midollo osseo

Appartengono a questa categoria due differenti tecniche: il "*Pridie drilling*" e la microfrattura. Queste procedure costituiscono le tecniche più comunemente usate per le lesioni sintomatiche più piccole (fino a 4 cm²) [14]. Esse sono tecnicamente semplici, e i costi relativi sono minori rispetto all'impiego di altri trattamenti [14].

In entrambe le procedure si attua la perforazione dell'osso subcondrale per richiamare le cellule staminali mesenchimali dal midollo osseo al sito danneggiato; si arriva così alla formazione di un tessuto molto simile alla cartilagine ialina ma meccanicamente inferiore [12,14].

Il tessuto formatosi grazie alla differenziazione delle cellule staminali risulta un tessuto fibrocartilagineo, contenente varie quantità di collagene di tipo I, di tipo II e di tipo III,

non adatto ai carichi a cui è sottoposta normalmente la cartilagine articolare [14]. Inoltre la concentrazione di cellule staminali del mesenchima non è molto alta e decresce con l'età, anche per questo i risultati migliori si ritrovano nei casi di pazienti attivi giovani [12,14].

L'aspetto critico di queste procedure consiste nella formazione di un coagulo stabile di sangue che ricopra completamente la zona danneggiata: tale aspetto infatti è strettamente correlato con il successo o l'insuccesso della pratica chirurgica.

La tecnica di *Pridie drilling* prende il nome dal chirurgo ortopedico che per primo ne propose l'impiego e consiste nella perforazione dell'osso subcondrale in seguito all'applicazione del debridement [14].

La tecnica di microfrattura, invece, è quella attualmente più usata per la sua semplicità e per la sua velocità. Costituisce una variazione della tecnica di Pridie e il suo successo risiede nel creare dei contorni stabili perpendicolari di cartilagine sana attorno al difetto e successivamente nel realizzare molteplici fratture che arrivano fino all'osso, separate da 3 o 4 mm, attraverso l'uso di un punteruolo per artroscopia (figura 9) [7].

Il difetto viene così riempito con il cosiddetto "super coagulo", un ambiente favorevole alla differenziazione delle cellule staminali [7]. Durante la procedura è importante mantenere l'integrità della lamina subcondrale e il protocollo riabilitativo prevede l'applicazione di movimento passivo subito dopo l'operazione e la conseguente protezione dal sovraccarico di peso [7]. I vantaggi della microfrattura rispetto alla tecnica di "Pridie drilling" consistono nell'evitare il surriscaldamento dell'osso subcondrale, con conseguente necrosi termale delle cellule, e nella possibilità di creare una superficie più rugosa, che favorisce l'adesione del tessuto formatosi [7,15].

La microfrattura, essendo una procedura artroscopia praticabile in un day hospital, è il trattamento più diffuso tra gli sportivi e uno studio condotto dalla nazionale di football ha rilevato che il 76% dei giocatori che si erano sottoposti a tale procedura sono tornati a giocare entro la stagione successiva [7].

Nonostante questi vantaggi, questa tecnica presenta risultati variabili a seconda dei pazienti: i pazienti più giovani e quelli con un danno minore sono quelli che presentano i migliori risultati dal punto di vista clinico[6].

Sono state descritte diverse aggiunte alle procedure di stimolazione del midollo osseo al fine di migliorarne i risultati [14]. Hoemann e altri hanno dimostrato la stabilizzazione

del coagulo di sangue con l'aggiunta di chitosina, un polimero trombogenico e adesivo, che ha favorito il riempimento del difetto e ne ha migliorato l'organizzazione cellulare e la composizione biochimica in un modello ovino [14]. Inoltre sono stati studiati diversi fattori di crescita per aumentare la qualità del tessuto in formazione con risultati soddisfacenti [14]. Recentemente è stata valutata l'aggiunta di acido ialuronico alla procedura di microfrattura in alcuni conigli bianchi della Nuova Zelanda e si è riscontrato un migliore riempimento della lesione e istologicamente si è potuto notare un tessuto più simile alla cartilagine ialina [14]. Purtroppo però non sono state ancora testate aggiunte alle tecniche di stimolazione del midollo osseo nei trials clinici e quindi la loro efficacia non è stata ancora provata [14].

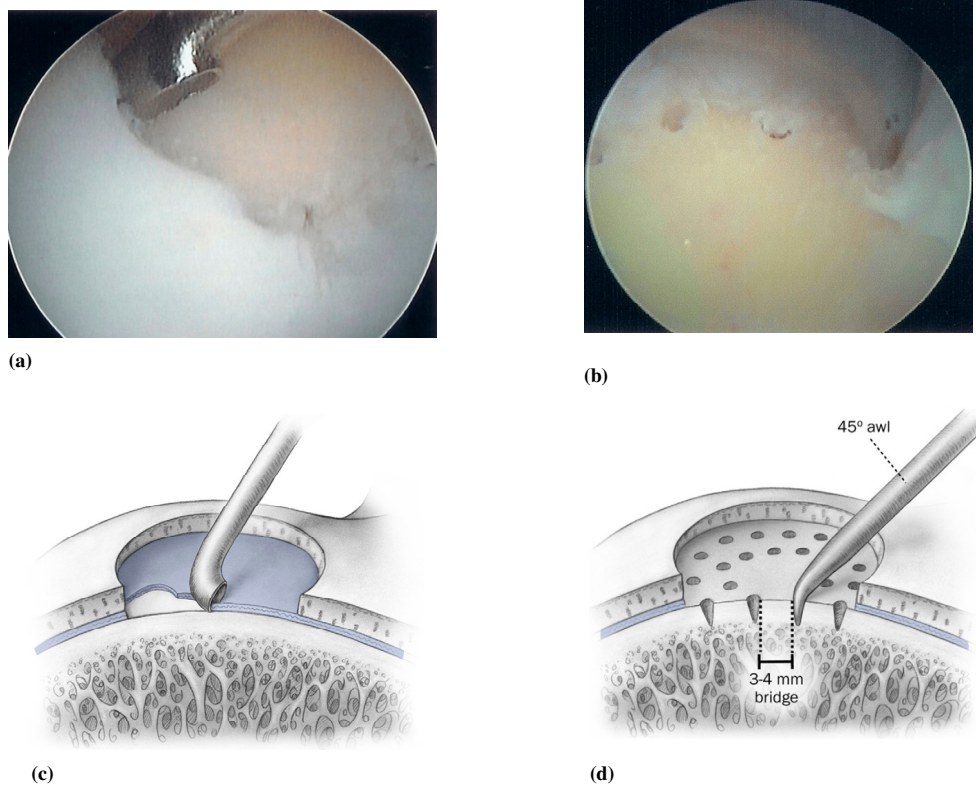


Figura 9: tecnica di microfrattura per la stimolazione del midollo osseo, (a) e (c) preparazione della zona interessata tramite debridement, (b) e (d) perforazione dell' osso in vari punti per consentire l' arrivo delle cellule mesenchimali [14]

2.2.3 Mosaicplasty

La tecnica di *mosaicplasty* è stata descritta per la prima volta nel 1993 e da allora è stata largamente impiegata per trattare danni condrali e osteocondrali [7]. La procedura consiste nel prelevare molteplici tasselli osteocondrali a forma cilindrica situati in zone

non soggette a grandi carichi e trasferirli nella zona danneggiata per ricostruire una superficie durevole e resistente (figura 10)[14].

Solitamente i cilindri sono prelevati nella periferia di entrambi i condili femorali a livello dell'articolazione patellofemorale e introdotti nel difetto quasi a creare un "mosaico", da qui il nome [7,13]. Differenti misure di tasselli vengono prelevati al fine di riempire il più possibile la ferita e di diminuire la morbidità del sito donatore [13]. La tecnica originale consisteva in una procedura aperta; con i progressi che sono stati fatti nel campo degli strumenti e delle tecniche chirurgiche ora è possibile effettuare l'operazione anche in artroscopia in DH [7].

Grazie all'uso di questa procedura si possono ottenere numerosi vantaggi come la disponibilità di sostituire la cartilagine danneggiata con cartilagine articolare matura e sana, un periodo di riabilitazione relativamente breve e la possibilità di effettuare l'operazione in un unico stadio [13,14].

Contemporaneamente, però, questo metodo mostra diverse limitazioni che potrebbero influire sulla riuscita della procedura. Uno dei maggiori problemi è la morbidità del sito donatore, e proprio per questo si raccomanda la procedura soltanto per le lesioni fino ai 4 cm²[13]; inoltre vi è una limitata disponibilità di innesti per il prelievo.

Problemi possono derivare dalle differenze tra il sito donatore e il sito danneggiato dal punto di vista dell'orientazione, della profondità e delle proprietà meccaniche [14]. In aggiunta i possibili "spazi morti" compresi tra i vari tasselli possono influire sull'integrazione dei cilindri al tessuto compromettendo la qualità dell'impianto; spesso infatti tali lacune vengono riempite con fibrocartilagine [14]. Ulteriori problemi derivano dalla mancata integrazione laterale tra i tasselli e la cartilagine nativa e che può permettere al liquido sinoviale di arrivare all'osso con conseguente formazione di cisti [13].

La guarigione del sito donatore attraverso un processo naturale si conclude con la formazione di osso spugnoso ricoperto da uno strato di fibrocartilagine; tuttavia, maggiore è la grandezza del sito donatore maggiore è la sua morbidità [14].

Per ovviare a tale circostanza sono stati studiati diversi materiali biocompatibili che riempissero il sito donatore e ne prevenissero la morbidità [14]. A tale scopo sono stati impiegati materiali quali l'idrossiapatite, le fibre di carbonio, il collagene e il policaprolattone [14].

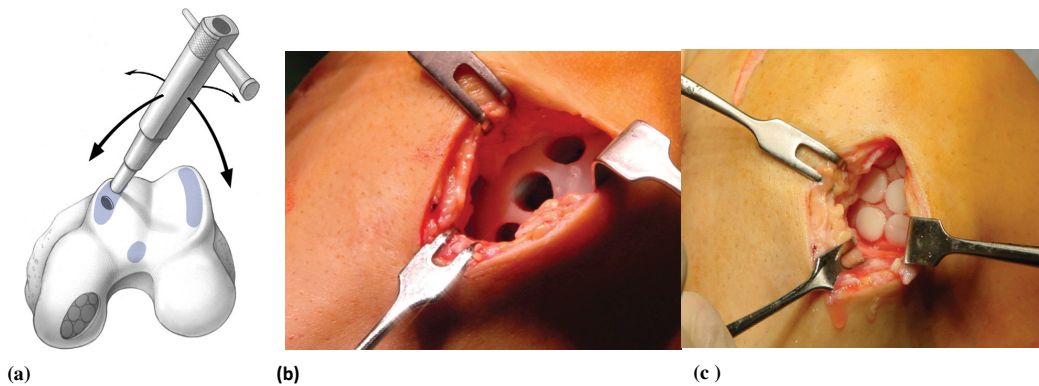


Figura 10: tecnica di *mosaicplasty*, (a) strumento utilizzato durante la procedura, (b) sito donatore, (c) innesto [14]

2.2.4 Allotrapianto osteocondrale

L'allotrapianto osteocondrale è una procedura che consiste nel trapianto di un innesto di cartilagine articolare e del suo sottostante osso subcondrale proveniente da un cadavere nel sito danneggiato del paziente (figura 11) [14]. La misura, la profondità e la posizione della lesione sono tutti fattori critici per il ritaglio dell'innesto [14].

I principali vantaggi nell'uso di questa procedura sono la possibilità di conferire alla superficie dell'innesto una particolare forma, l'immediato trapianto di cartilagine articolare matura in una singola operazione, l'opportunità di poter rimpiazzare grandi difetti e il superamento del maggior limite imposto dalla mosaicplasty, cioè la morbidity del tessuto donatore [14]. Inoltre risulta possibile ricoprire in modo completo la lesione evitando la formazione di spazi che comprometterebbero la stabilità dell'impianto. Purtroppo però il numero di innesti disponibili è limitato e la procedura comporta un costo elevato. Altri svantaggi sono costituiti dal possibile rigetto indotto dall'introduzione di un materiale estraneo o semplicemente l'incompleta integrazione con il tessuto circostante [14].

Gli innesti che vengono usati per questo metodo possono essere di vario tipo: ci sono gli innesti a freddo (o recenti), gli innesti criopreservati e quelli congelati. Gli innesti freschi sono i più utilizzati in quanto con le altre tecniche di conservazione si è notato che vi è una diminuita vitalità dei condrociti [14].

Non è ancora stata stabilita una soglia della vitalità necessaria affinché ci sia successo clinico ma l'attività dei condrociti è critica per mantenere la matrice extracellulare nelle condizioni ottimali e risulta un fattore attraverso cui misurare la sopravvivenza dell'innesto a lungo termine [14].

Tradizionalmente gli innesti venivano prelevati e poi depositati in una soluzione di Ringer a 4° C e infine trapiantati entro una settimana. Recentemente però si è passati a depositare gli innesti in un mezzo di cultura, ottenendo migliori risultati per quanto riguarda la vitalità dei condrociti a distanza di due settimane [14].

Le proprietà della matrice e la vitalità dei condrociti sono stati valutati e si è dimostrato che le caratteristiche biomeccaniche della matrice si sono preservate mentre la densità dei condrociti e la loro attività metabolica risultano diminuiti [14]. Gli innesti congelati, portati alla temperatura di -80° C, riducono al minimo le reazioni di rigetto e le possibili trasmissioni di malattie ma nello stesso distruggono l'attività dei condrociti con conseguenze non ottimali nel loro utilizzo [14].

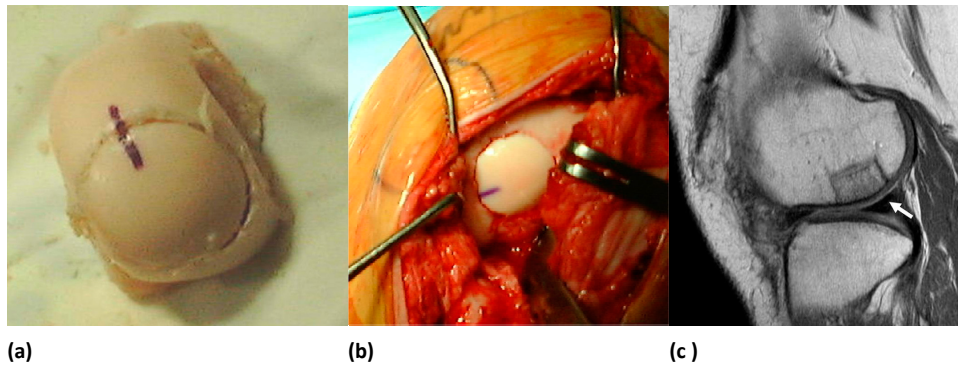


Figura 11: allotrapianto di un foglio osteocondrale, (a) foglio per l'impianto, (b) innesto trapiantato, (c) risonanza magnetica dopo 24 mesi dall'operazione [14]

2.2.5 Osteotomia

L'osteotomia è indicata per pazienti con osteoartrite uni-compartmentale e consiste nella sezione chirurgica di un segmento osseo al fine di cambiare l'asse di un arto per ottenere una situazione meccanica più favorevole [12]. Attraverso tale procedura si ridistribuisce il carico dell'articolazione riducendo al minimo il carico applicato alla superficie della cartilagine e interrompendo così la sua degradazione [7].

Sono stati riportati una riduzione del dolore e un incremento di funzionalità nel 90% dei casi dopo una corretta scelta dei pazienti [12].

I soggetti ideali sono giovani (meno di 50 anni), con legamenti stabili, senza un alto grado di cattivo allineamento e un ottimo indice di massa corporea [12].

2.2.6 Sostituzione totale o parziale dell' articolazione

Per le lesioni più grandi e nel caso di osteoartrite avanzata le tecniche precedentemente descritte non sono sufficienti per ristabilire un tessuto meccanicamente stabile in grado di sopportare i carichi ciclici a cui sono sottoposte le articolazioni. In queste situazioni si attua il rimpiazzo totale o parziale dell'articolazione per aiutare il paziente a ristabilire le normali funzioni [6]. Un impianto artificiale viene quindi usato come sostituto dell'articolazione. Tale tecnica è sempre più richiesta e il mercato degli impianti per la sostituzione totale del ginocchio o dell'anca è in continua crescita [6].

Tuttavia questa tecnica può andare incontro a diversi problemi come l'infezione, l'osteolisi, il consumo e la rottura dell'impianto [6,8]. Inoltre gli impianti di ultima generazione presentano un periodo di vita limitato e spesso sono necessari interventi di revisione che comportano per il paziente dolore e costi elevati [6].

2.2.7 Trapianto autologo di condrociti

La tecnica ACI (Autologous Chondrocyte Implantation) è stata descritta per la prima volta nel 1994 e si presenta come una tecnica innovativa per la riparazione delle lesioni più estese della cartilagine [14]. Originariamente la procedura implicava il prelievo, tramite biopsia, di tessuto cartilagineo non sottoposto a carico, la separazione enzimatica dei condrociti presenti nella cartilagine e il successivo trapianto, dopo 2-8 settimane, delle cellule coltivate in vitro ricoperte da un foglietto di periostio (figura 12) [9,12]. Il vantaggio nell'uso di questa tecnica consiste soprattutto nel poter riparare il difetto con cartilagine ialina e non con cartilagine fibrosa, presupponendo una migliore funzionalità a lungo termine e una migliore longevità del tessuto [14].

Si riscontrano però diversi svantaggi come:

- la distribuzione spaziale non uniforme dei condrociti e la mancanza di stabilità meccanica iniziale [16];
- il bisogno di suturare il foglio di pericondrio alla cartilagine sana circostante che impedisce l'uso della tecnica per difetti piccoli [16];
- la necessità di subire due interventi e un lungo periodo di riabilitazione [6];
- la possibile ipertrofia a cui possono andare incontro i condrociti [9];
- il limite riscontrato nella riparazione delle lesioni osteoartritiche in quanto vi è la necessità che l'impianto sia circondato da un ambiente favorevole alla formazione di nuovo tessuto, non in via di degradazione per l'osteoartrosi [17];

· la limitata disponibilità di condrociti all'aumentare dell'età [6].

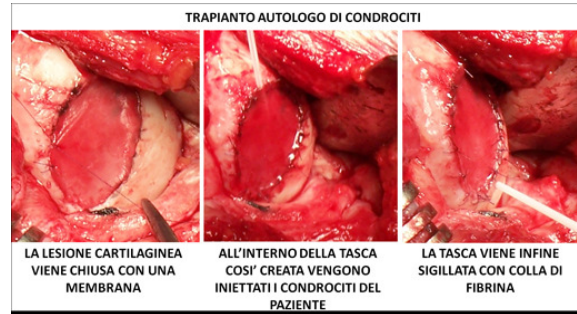


Figura 12: trapianto autologo di condrociti [35]

Nel corso degli anni si è allora cercato di migliorare tale tecnica e si sono proposte diverse soluzioni. Per prima cosa si è cercato un sostituto al foglio di periostio e si sono trovati risultati soddisfacenti con l'uso del collagene che riduce la necessità di una seconda operazione [9].

Le più recenti tecnologie hanno invece proposto l'uso di scaffold o matrici su cui coltivare i condrociti prelevati; in tal modo si riesce ad evitare la morbidità del sito donatore ed inoltre si previene la dedifferenziazione dei condrociti durante la coltura [14]. Diversi sono i vantaggi di questa innovativa procedura: infatti lo scaffold può fungere da barriera proteggendo l'innesto dai fibroblasti che possono causare la formazione di tessuto fibrotico attorno all'innesto; inoltre la procedura non comporta la sutura del foglio di periostio, consentendo di procedere per via artroscopica e così diminuire la complessità e la durata dell'intervento [9]. L'introduzione di scaffold tridimensionali ha permesso la riproduzione della matrice extracellulare nell'innesto, consentendo di avere un supporto per il tessuto in formazione che verrà via via degradato con il corso del tempo. Sono stati spesso introdotti fattori di crescita nello scaffold per favorire il processo di integrazione tra tessuto e innesto e per velocizzare il processo di formazione di nuovo tessuto. Per ovviare ai problemi persistenti nell'uso di questa tecnica, come il numero limitato di condrociti presenti e la loro possibile dedifferenziazione durante la coltura in vitro, si sta studiando l'uso delle cellule staminali al posto dei condrociti seminati in scaffold tridimensionali. Questa tecnica rappresenta il più chiaro esempio di applicazione dell'ingegneria tissutale nella cura delle lesioni della cartilagine.

CAPITOLO 3

L'INGEGNERIA TISSUTALE APPLICATA ALLA CARTILAGINE

3.1 INTRODUZIONE

La grande varietà di cause che possono portare alla degradazione della cartilagine ha condotto allo studio di rimedi efficaci per curarne la comparsa o prevenirla.

Malattie, come l'osteoartrite, molto diffuse tra la popolazione hanno portato al centro dell'attenzione clinica i problemi correlati alle lesioni a livello della cartilagine articolare e, nel corso degli anni, sono state proposte diverse procedure chirurgiche come terapie riparative. Si è potuto riscontrare che nessuna delle soluzioni finora adottate risulta ottimale nel trattamento delle lesioni cartilaginee e i risultati a lungo termine sono stati valutati non sufficientemente soddisfacenti.

L'affiorare di una nuova disciplina, come l'ingegneria tissutale, ha dato grande speranza nell'ambito scientifico e si è pensato di usare proprio i principi di tale disciplina al fine di trattare le lesioni della cartilagine. Insieme alla pelle, la cartilagine è stata uno dei tessuti che per primi si sono studiati in questo ambito a causa della sua apparente semplicità; tuttavia il tessuto cartilagineo possiede una particolare struttura e una particolare composizione che è difficile da riprodurre in laboratorio.

La più grande motivazione per cui si sono riposte tante speranze nell'uso del Tissue Engineering nella riparazione della cartilagine danneggiata consiste nella sua incapacità di autoriparazione, conseguente all'assenza di vasi sanguigni, di vasi linfatici e di nervi. L'ingegneria tissutale offre un'alternativa alle tecniche attualmente in uso ed i suoi principi consistono nell'uso di cellule autologhe per la formazione di tessuto in vitro [18,19].

Nel caso specifico della cartilagine sono stati proposti diversi metodi di formazione di nuovo tessuto attraverso l'uso di cellule proprie del tessuto cartilagineo, i condrociti, oppure attraverso l'uso di cellule staminali [19]. Inizialmente era stato considerato solo l'impianto delle cellule coltivate in vitro ma con gli anni è stato introdotto un nuovo

metodo che permette la cultura delle cellule su un materiale biodegradabile, denominato scaffold, che funge da struttura portante per la crescita del tessuto.

Molti studi sono stati effettuati sui biomateriali che possono fungere da scaffold e inoltre molto si è fatto per migliorare l'ambiente di coltura delle cellule attraverso la messa a punto di specifici bioreattori [20,21]. I passaggi fondamentali dell'ingegneria tissutale si possono riassumere in tre punti (figura 13):

- Prelievo di cellule
- Produzione di uno scaffold
- Condizionamento biochimico e meccanico attraverso l'uso di fattori di crescita e l'uso di bioreattori

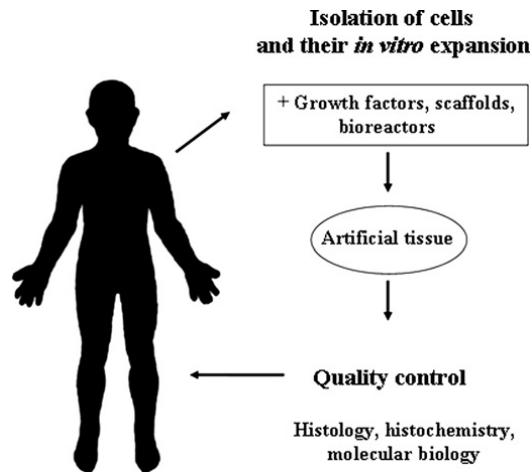


Figura 13: principi della tissue engineering [20]

3.2 CELLULE

L'ideale fonte di cellule per la cartilagine ingegnerizzata è quella che può essere isolata e successivamente espansa facilmente, in grado di sintetizzare i componenti specifici della matrice extracellulare presente nella cartilagine come i proteoglicani e il collagene di tipo II. Le cellule più studiate per il loro potenziale nell'ingegneria tissutale sono i condrociti e le cellule staminali [18].

3.2.1 Condrociti

I condrociti, l'unico tipo cellulare presente nella cartilagine, costituiscono una scelta ovvia per l'impiego nell'ingegneria tissutale.

Essi sono responsabili della produzione della matrice extracellulare presente nel tessuto cartilagineo e sono stati largamente studiati al fine di utilizzarli come fonte cellulare per la coltivazione in vitro nei costrutti ingegnerizzati[18].

Purtroppo la disponibilità di condrociti è limitata e non può soddisfare l'alta richiesta per la rigenerazione della cartilagine articolare[6]. Nonostante i metodi impiegati per espandere il numero di condrociti durante la coltura in vitro, le cellule possono andare incontro a dedifferenziazione, caratterizzata da una diminuzione di sintesi dei proteoglicani, un calo del contenuto di collagene di tipo II e, contemporaneamente, da un aumento di espressione di collagene di tipo I con conseguenze dal punto di vista biomeccanico non ottimali[18]. Oltretutto è da tenere in considerazione l'età del paziente in quanto è stato riscontrato che i condrociti provenienti da pazienti giovani proliferano più in fretta di quelli derivanti dai pazienti più anziani, che sono metabolicamente meno attivi[18].

Un ulteriore svantaggio è rappresentato dal possibile danno a cui può andare incontro il sito donatore da cui è stata prelevata la cartilagine, con conseguente disfunzione dell'articolazione.

Per ovviare ad alcuni dei problemi incontrati con l'uso di condrociti autologhi si sono utilizzate altre fonti per le cellule, come gli animali o i cadaveri[6]. Tuttavia questi condrociti possono indurre una risposta immunitaria da parte dell'organismo con possibile rigetto; sono quindi necessari ulteriori studi in questo ambito[6]. Al fine di formare in modo efficiente differenti grandezze di tessuto cartilagineo con proprietà meccaniche adatte sono stati introdotti diversi scaffold, che serviranno da ambiente di coltura per i condrociti, trattati con fattori di crescita che verranno approfonditi in seguito.

3.2.2 Cellule staminali

A causa dei problemi riscontrati nell'uso dei condrociti, sono state studiate fonti alternative. Le caratteristiche fondamentali che si ricercano sono la facile accessibilità, la grande disponibilità e la capacità di differenziarsi in condrociti [6]. Tutte queste

proprietà sembrano essere possedute dalle cellule staminali come le cellule staminali adulte mesenchimali e le cellule staminali embrionali [6]. Le cellule staminali sono capaci di dividersi in coltura per tempi indefiniti e di differenziarsi generando cellule specializzate[1].

Le proprietà specifiche di ogni cellula staminale possono essere riassunte nei seguenti punti:

- Non è una cellula differenziata
- Si può dividere senza limitazioni
- Nel momento in cui si divide, ciascuna cellula figlia può scegliere tra il rimanere cellula staminale o seguire un processo che porta alla specializzazione

Esistono diversi tipi di cellule staminali: le totipotenti, dotate di capacità illimitate in quanto la loro differenziazione può portare alla formazione di tutti i tessuti sia dell'embrione che extra-embrionali; unipotenti, che sono in grado di differenziarsi in un unico tipo cellulare; multi potenti, incluse le cellule adulte staminali, che sono capaci di differenziarsi in diversi tipi cellulari ma correlati; pluripotenti, simili alle totipotenti ma non sono in grado di dare origine all'embrione.[1,6]

Nel caso specifico della riparazione della cartilagine danneggiata sono stati studiati due diversi tipi di cellule staminali: le cellule staminali mesenchimali presenti nell'adulto e le cellule staminali embrionali.

Cellule staminali mesenchimali

Le cellule staminali mesenchimali sono state largamente studiate nella medicina rigenerativa di piccoli o grandi difetti della cartilagine grazie alla loro presenza in varie parti del corpo[6]. Questo tipo di cellule staminali si può infatti ritrovare nel midollo osseo, nel tessuto adiposo, nel sinovio, nel muscolo scheletrico e nella pelle, ma si sono riscontrate differenze, in dipendenza della differente fonte, nelle proprietà possedute[6, 22].Le cellule attualmente più utilizzate sono quelli derivanti dal midollo osseo per la facilità con cui possono essere prelevate e per il loro potenziale condrogenico; esse infatti proliferano più velocemente, come le cellule del sinovio, rispetto alle cellule prelevate da altre zone[6,22].

Per quanto riguarda la capacità di differenziarsi in una specifica linea cellulare, le cellule provenienti dal sinovio mostrano la più grande abilità di condrogenesi mentre le

cellule del mesenchima presentano una più alta percentuale di differenziazione osteogenica [22].

Diversi studi in vivo hanno inoltre dimostrato che le cellule derivanti dal midollo osseo sono in grado di produrre un tessuto più simile alla cartilagine ialina rispetto, per esempio, alle cellule del tessuto adiposo[22]. Le cellule staminali del mesenchima possiedono la capacità di proliferare in grande numero senza perdere il proprio fenotipo e non inducono una risposta immunogenica come accade nel caso di allotrapianti; inoltre possono essere prelevate attraverso procedure abbastanza semplici da molti tessuti rendendo minimo il danno al sito donatore e riducendo il dolore a carico del paziente[6].

Molti metodi sono stati studiati per favorire la condrogenesi delle cellule staminali e si sono riscontrati effetti favorevoli attraverso l'uso di fattori di crescita e l'applicazione di stimoli meccanici [6]. Nonostante studi in vitro abbiano dimostrato un minor potenziale condrogenico per le cellule staminali del tessuto adiposo, esse scatenano ancora molto interesse soprattutto per la loro abbondanza e per la facilità con cui possono essere procurate [6]. L'operazione tramite cui possono essere prelevate è minimamente invasiva e non procura dolore al paziente, evitando danni a livello della zona di prelievo[6].

E' importante notare che molti degli studi sull'applicazione delle cellule staminali mesenchimali sono ancora allo stato preclinico e, nonostante l'impiego di tale tecnica in molti modelli animali, i dati sull'applicazione clinica sono ancora pochi[6,22]. Uno studio svolto su due pazienti, una donna di 24 anni e un uomo di 45 anni che soffrivano di dolore al ginocchio e che non potevano camminare normalmente, ha rivelato l'efficacia di questa tecnica[22]. Le cellule staminali mesenchimali sono state incorporate in un gel di collagene che, ricoperto con un foglio di periostio, è stato applicato nella zona danneggiata della rotula. Dopo 6 mesi dall'operazione il dolore era scomparso e la camminata dei pazienti era decisamente migliorata [22]. Questi miglioramenti si sono mantenuti per lungo tempo, in un caso 5 anni e 9 mesi e nell'altro caso 4 anni[22] . Un caso è stato riportato sull'applicazione di cellule staminali del mesenchima ad un atleta di 31 anni che presentava una lesione totale della cartilagine nel ginocchio destro di grandezza 20-30 mm² [22]. Dopo 7 mesi dall'intervento il difetto risultava sostituito da un tessuto molto simile alla cartilagine ialina e addirittura dopo un

anno l'atleta aveva ripreso la propria attività sportiva al livello praticato in precedenza senza l'insorgere di complicazioni[22].

Nonostante i successi rilevati, la tecnica presenta alcune limitazioni che devono essere tenute in considerazione. Il più grande limite risiede nel fatto che l'accumulo di matrice con questo metodo e le conseguenti proprietà meccaniche dei costrutti sono inferiori rispetto al tessuto formatosi con l'uso di condrociti autologhi[18]. Una possibile spiegazione può essere l'aumento di espressione di collagene X durante la coltura in vitro che è un indicatore ipertrofico; infatti alcuni articoli hanno riportato che la presenza di geni collegati all'ipertrofia può indurre alla calcificazione dell'impianto e alla morte cellulare[18]. In aggiunta si è potuto riscontrare che l'età del paziente costituisce un importante fattore nella riuscita dell'intervento. Pazienti giovani e attivi presentano migliori risultati grazie alla maggiore capacità di proliferazione delle proprie cellule[22].

Si può quindi notare che maggiore lavoro occorre per migliorare le tecniche di utilizzo delle cellule mesenchimali ma esse costituiscono una valida alternativa all'uso dei condrociti.

Cellule staminali embrionali

Le cellule staminali embrionali, possedendo una capacità proliferativa quasi illimitata e la possibilità di differenziarsi in qualunque tipo cellulare del corpo, costituiscono dei candidati ideali per l'uso nella medicina rigenerativa[6,22]. Per questo motivo è stato investigato il loro potenziale per la riparazione di lesioni cartilaginee ma l'ostacolo più grande sembra essere l'induzione della condrogenesi nelle stesse cellule[22].

Sono stati studiati diversi fattori di crescita per indurre la condrogenesi e inoltre si sono valutati vari tipi di ambiente ideale per la loro coltura. Sono stati proposti metodi che non facevano l'uso di scaffold, come quello proposto da Koay che ha adottato un nuovo approccio in cui per prima cosa vengono differenziate le cellule staminali in un ambiente con determinate caratteristiche chimiche e poi vengono assemblate in costrutti di neocartilagine [6]. La differenziazione condrogenica è stata prevalentemente studiata a livello animale ma ultimamente l'attenzione si è spostata verso le cellule embrionali dell'uomo e le loro possibili applicazioni[22].

I trials clinici che implicano l'uso di cellule derivanti dalle cellule staminali embrionali sono appena stati approvati e l'FDA ha approvato la fase uno del trial clinico in cui

cellule neurali derivate dalle cellule embrionali vengono usate per la rigenerazione del midollo spinale, rendendo possibile l'utilizzo di queste cellule per trattare altri tipi di danni[22]. Tuttavia, prima che l'utilizzo delle cellule staminali embrionali divenga ampio, ci sono diversi aspetti che devono essere migliorati.

Per prima cosa non sono ancora stati ottenuti condrociti puri in vitro o in vivo attraverso l'uso di queste cellule e inoltre bisogna riuscire a prevenire l'ipertrofia e la calcificazione dei condrociti derivanti dalla coltura in vitro[22]. La possibilità di differenziazione in un qualsiasi tipo cellulare delle cellule può presentare anche un lato negativo, in quanto non riuscendo a controllare a pieno la differenziazione cellulare, si può arrivare alla formazione di teratomi[6,22].

Con l'uso di cellule staminali embrionali di tipo animale si deve far fronte anche al possibile rigetto e alla trasmissione di patogeni animali[6]. Sono quindi necessari ulteriori studi in merito all'applicazione di questo tipo di cellule, che deve anche fare i conti con questioni di tipo etico[22].

3.3 SCAFFOLD

Il ruolo principale degli scaffold usati nelle applicazioni di ingegneria tissutale per la riparazione della cartilagine consiste nel costituire una struttura confortevole che induca le cellule alla formazione di nuova matrice extracellulare e contemporaneamente funga lei stessa da matrice fino a quando il tessuto non si sarà formato. [18] Uno scaffold ideale per l'ingegneria tissutale deve possedere le seguenti caratteristiche:

- essere biocompatibile in modo da minimizzare la risposta del tessuto circostante
- essere biodegradabile ma in modo controllato senza rilasciare prodotti tossici all'interno dell'organismo
- possedere una porosità adeguata che permetta la diffusione dei nutrienti e dei prodotti di scarico
- fungere da supporto alla proliferazione e alla differenziazione delle cellule e inoltre permettere la formazione della matrice extracellulare
- essere in grado di fissarsi e di integrarsi con il tessuto circostante
- fungere da sostegno meccanico al costruito;

- possedere le adeguate proprietà meccaniche per sopportare la crescita di nuovo tessuto sotto il carico a cui è naturalmente sottoposto

Per rispondere a tutte queste esigenze sono stati studiati diversi tipi di biomateriali che possono essere suddivisi in due categorie: i polimeri naturali e i polimeri sintetici.

3.3.1 Scaffold naturali

I biomateriali naturali sono quelli più largamente usati per la costruzione di scaffold impiegati nella rigenerazione della cartilagine grazie alla loro biocompatibilità per l'attaccamento delle cellule e della loro differenziazione[6]. In particolare, tra questi si possono trovare il collagene, l'acido ialuronico, l'agarosio, l'alginato, il chitosano e la fibrina [23].

Il collagene è presente nelle proteine componenti la matrice extracellulare dei tessuti connettivi e ne conferisce la speciale forza e flessibilità. Esso viene ampiamente usato grazie al suo contributo all'adesione cellulare, alla proliferazione e alla differenziazione[6]. Il collagene può essere trasformato in gel fisicamente, tramite ultravioletti o calore, o chimicamente, tramite glutaraldeide o formaldeide[23]. È stato riscontrato che i condrociti coltivati all'interno di gel di collagene mantengono il loro fenotipo e la produzione di glicosaminoglicani almeno per 6 settimane[20]. Non solo i gel ma anche le matrici di collagene e le membrane stimolano le cellule a produrre nuovo collagene e a preservare il proprio fenotipo (figura 14)[20].



Figura 14: membrana di collagene a doppio strato con collagene di tipo I e III [9]

Le proprietà chimiche, meccaniche e biologiche rendono possibile il controllo della sua degradazione, aspetto molto importante per la sua applicazione nella Tissue Engineering[20]. Il problema legato alla sua antigenicità è stato risolto attraverso la rimozione enzimatica dei telopeptidi dalla sua molecola, consentendone il suo utilizzo a livello clinico[20].

L'acido ialuronico, un glicosaminoglicano non solfato presente nella matrice extracellulare della cartilagine articolare, è stato usato come supporto per la crescita di condrociti o per stimolare la condrogenesi delle cellule staminali del mesenchima[6]. Date le sue caratteristiche, come la biocompatibilità e la biodegradabilità, si presenta come un materiale ideale per la formazione di scaffold ad uso clinico[20]. Grigol *et al.* hanno dimostrato che condrociti coltivati in scaffold di acido ialuronico portano alla formazione di costrutti con un alto contenuto di collagene di tipo II e di aggrecani e un basso contenuto di collagene di tipo I[20]. Inoltre recentemente è stato dimostrato che l'acido ialuronico crea un ambiente in cui i condrociti diminuiscono la presenza di fattori catalitici e l'apoptosi[20]. Grazie a queste osservazioni l'acido ialuronico si presenta come possibile fattore per la prevenzione delle lesioni della cartilagine e può portare benefici nel trattamento dell'osteoartrite al primo stadio [20]. La sua applicazione richiede inoltre una procedura minimamente invasiva grazie al suo possibile uso come materiale iniettabile[6].

L'agarosio e l'alginate sono polisaccaridi derivati dalle alghe e vengono usati come scaffold 3D per incapsulare le cellule per l'ingegneria tissutale[6].

Il gel di agarosio (figura 15) si può ottenere attraverso il cambio di temperatura mentre una matrice di alginate può essere formata attraverso legame ionico in presenza di calcio. Entrambi questi scaffold hanno esibito eccellente citocompatibilità per la crescita delle cellule ma la loro lenta degradazione e la difficoltà nel modificare la vita dello scaffold potrebbero compromettere la loro applicazione clinica[6].



Figura 15: hydrogel scaffold di agarosio in cubetti [28]

La fibrina è una proteina coinvolta nella coagulazione del sangue ed è formata attraverso la polimerizzazione del fibrinogeno in presenza della trombina attorno alla ferita [23]. La sua biocompatibilità e la sua biodegradabilità ne fanno un biopolimero allettante ed inoltre un vantaggio è costituito dalla possibilità di iniettarla insieme ai fattori di crescita[23]. Non solo le sue proprietà meccaniche possono essere controllate attraverso la composizione fibrinogeno/trombina ma anche il suo grado di degradazione può essere modificato attraverso l'uso dell'aprotinina che induce una fibrolisi più lenta[23].

3.3.2 Scaffold sintetici

I polimeri sintetici sono ora al centro dell'attenzione degli scienziati grazie alla facilità con cui possono essere fabbricati, alla semplicità con cui possono essere modificati chimicamente, all'alta versatilità, alle loro proprietà meccaniche adeguate e infine al possibile controllo della loro degradazione[6].

I più diffusi polimeri sintetici sono tre: l'acido polilattico(PLA), l'acido poliglicolico(PGA) e il loro copolimero(PGLA) e la loro applicazione clinica è stata provata dall'FDA già nel 1990[6]. Essi possono essere fabbricati in matrici 3D attraverso tecnologie tessili, lisciviazione del particolato e tecniche di stampa[6]. Gli scaffold prodotti possiedono una porosità controllabile e una superficie favorevole all'attaccamento delle cellule, alla loro proliferazione e differenziazione[6].

L'acido poliglicolico è un polimero termoplastico biodegradabile ed è il più semplice poliesteri lineare alifatico[20]. Può essere preparato a partire dall'acido glicolico attraverso una policondensazione ed è stato largamente usato per la produzione di scaffold per la riparazione della cartilagine perché possiede un alto grado di degradazione, un'alta porosità, un'elevata crescita cellulare e mantiene le funzioni dei condrociti simili a quelle riscontrate nella cartilagine ialina[23]. Inoltre è stato dimostrato che il PGA aumenta la sintesi di proteoglicani paragonandolo agli scaffold di collagene[6].

L'acido polilattico è un polimero biodegradabile che può essere formato a partire dall'acido lattico. Il PLA è stato studiato per le applicazioni nell'ingegneria tissutale della cartilagine grazie alla grande proliferazione di condrociti e alla produzione di

glicosaminoglicani osservata ma la crescita delle cellule e la sintesi della matrice è risultata minore rispetto all'uso dell'acido poliglicolico (figura 16)[23].

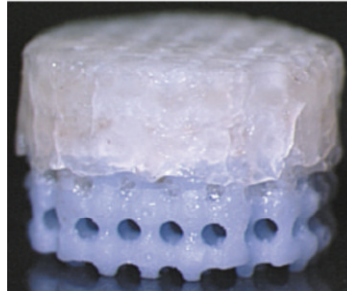


Figura 16: scaffold bistrato composta da PLA e collagene [29]

Il PLA possiede un degradazione più lenta rispetto al PGA e viene quindi usato per le applicazioni che richiedono un più duraturo supporto meccanico della matrice[6].

La combinazione dei precedenti polimeri è stata inoltre studiata per sfruttare al meglio le caratteristiche specifiche di ciascuno dei due polimeri. Il PGLA possiede un'elevata biocompatibilità, abilità di degradarsi in unità di monomeri, un grande range di proprietà meccaniche e una degradazione controllabile in base alle proporzioni dei due polimeri[6]. Si è potuto riscontrare che il PLGA risulta adatto per la condrogenesi delle cellule staminali del tessuto adiposo ed inoltre scaffold di PLGA sono stati trattati con diversi fattori di crescita per migliorare la differenziazione condrogenica delle cellule staminali del midollo osseo[6].

Sono stati studiati anche altri polimeri come il policaprolattone(PLC) e il glicole polietilenico (PEG). Il PEG è un polietere che è stato largamente usato nella Tissue Engineering grazie alle sue proprietà idrofiliche e la sua biocompatibilità[23]. Anche se non è biodegradabile, un peso molecolare non elevato può essere espulso dal metabolismo nel corpo senza controindicazioni[23]. Si è riscontrato che il PEG supporta l'attaccamento e la proliferazione delle cellule coltivate e gli idrogel formati con questo polimero replicano l'ambiente naturale, inducendo la condrogenesi delle cellule staminali[20].

3.3.3 Configurazioni degli scaffold

La configurazione degli scaffold definisce la forma che prenderà il tessuto che si formerà intorno e quindi risulta un fattore molto importante che deve essere tenuto in

considerazione per l'applicazione clinica. La maggior parte dei tessuti umani si estende per le tre dimensioni e perciò una struttura tridimensionale mimerebbe la loro struttura in modo ideale [23]. L'obiettivo che si vuole raggiungere è il conseguimento di una struttura il più possibile simile al tessuto nativo che ne imiti le funzioni e che possieda proprietà simili. A tale scopo sono state proposte diverse configurazioni per gli scaffold che saranno elencate di seguito.

Scaffold tridimensionali

Gli scaffold tridimensionali sono richiesti nella Tissue Engineering per la loro proprietà di favorire l'attaccamento delle cellule e la conseguente formazione di tessuto sia in vitro che in vivo. Nel caso specifico della cartilagine, una struttura tridimensionale serve a prevenire la dedifferenziazione dei condrociti che spesso avviene nel caso di colture in sistemi bidimensionali.

Sono state sviluppate diverse tecniche per la fabbricazione degli scaffold tridimensionali con un'alta porosità e una grande area superficiale come le tecnologie tessili, la colata di solvente, la lisciviazione del particolato, la laminazione della membrana, la modellatura attraverso fusione e la stampa tridimensionale[23].

Inoltre gli scaffold tridimensionali possono fungere da vettori per il rilascio dei fattori di crescita che possono essere rilasciati in una maniera controllata e possono indurre la condrogenesi delle cellule finché non sono completamente degradati [23]. Caratteristiche importanti per i costrutti tridimensionali sono la loro porosità e la grandezza dei pori in essi presenti; infatti tali caratteristiche influenzano la migrazione delle cellule e la diffusione di ossigeno, nutrienti e prodotti di scarico[18]. Per esempio, un rilascio disomogeneo di ossigeno dalla superficie fino al centro nei costrutti in cui sono coltivate le cellule può portare alla morte delle cellule presenti nella regione centrale ma non in quella periferica[18]. Inoltre un materiale poroso può favorire l'integrazione dell'impianto con il tessuto circostante contribuendo ad una maggiore stabilità meccanica all'interfaccia[18]. La porosità e la permeabilità hanno inoltre un grande effetto sulla proliferazione dei condrociti e si stima che la grandezza dei pori ottimale sia tra 100 e i 500 micron [18].

Idrogel

Negli idrogel i condrociti non vengono attaccati alla superficie dello scaffold ma vengono incapsulati in vista del fatto che la morfologia dello scaffold deve contribuire

al mantenimento del fenotipo condrogenico senza portare alla dedifferenziazione [23]. Il complesso cellule-idrogel può venire impiantato nella zona danneggiata solo dopo aver creato dei legami trasversali per formare una specifica forma in vitro [23].

Nonostante la grande applicazione degli idrogel, la rapida diffusione dei fattori di crescita contenuti in essi può essere un problema.; generalmente infatti i fattori di crescita sono piccole molecole che riescono facilmente a penetrare il network dell'idrogel da uscire troppo rapidamente per stimolare le cellule [23]. Per ovviare a tale problema vengono introdotte nell'idrogel micro particelle a loro volta contenenti i fattori di crescita[23].

Scaffold nanostrutturati

I nanomateriali possiedono proprietà eccellenti per stimolare la crescita di condrociti e guidare la rigenerazione del tessuto poiché la cartilagine ha dimensioni dell'ordine di grandezza dei nanometri. Lo studio di questi materiali è ancora prematura ma si sta cercando il modo di fabbricare nano materiali per la produzione di scaffold che contengano al loro interno le cellule per la riparazione della cartilagine[6]. Matrici con pori dell'ordine dei nanometri possono essere fabbricate via elettroforatura, lisciviazione del particolato, incisione chimica e separazione di fase[6]. Nelle applicazioni alla cartilagine, vi è stato molto interesse per gli scaffold nanostrutturati fabbricati attraverso elettroforatura. Si è riscontrata l'efficacia di tale tecnica nell'applicazione a polimeri sia naturali che sintetici[6].

3.4 STIMOLI

3.4.1 Fattori di crescita

I fattori di crescita sono molecole biologicamente attive prodotte dal corpo che possono stimolare la divisione, la crescita e la differenziazione cellulare [24]. Nella cartilagine articolare numerosi fattori di crescita lavorano insieme per regolare lo sviluppo e l'omeostasi del tessuto cartilagineo durante la vita e l'uso di questi fattori risulta pertanto promettente per la rigenerazione della cartilagine [24]. Numerosi fattori di crescita inducono i condrociti a sintetizzare proteoglicani, aggregani e collagene di tipo II, favoriscono la condrogenesi delle cellule staminali e inoltre diminuiscono gli effetti catabolici delle citochine.

TGF- β

Quattro tipi di isoforme della famiglia dei fattori di crescita TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 e BMP) che coinvolgono il fenotipo dei condrociti sono stati ritrovati nella cartilagine articolare[23]. Le diverse isoforme possono essere attivate attraverso il calore o in condizioni di acidità e non solo incrementano la sintesi dei proteoglicani ma anche prevengono la degradazione della matrice extracellulare, inibendo l'MMP e attivando il TIMP[23]. Queste isoforme svolgono un importante ruolo nella differenziazione dei condrociti e possono oltretutto partecipare alla formazione dell'osso[23].

Il TGF- β 1 si può trovare nelle zone più ipertrofiche e proliferative, e la maggior parte risulta situata nelle zone mineralizzate[23]. Il TGF- β 1 aumenta l'attività di sintesi dei condrociti e diminuisce l'attività catabolica del IL-1(interleuchina-1); è inoltre stato dimostrato in molti studi che aumenta la condrogenesi delle cellule staminali[24]. Purtroppo però, alcuni studi condotti su topi e conigli hanno mostrato degli effetti deleteri nell'uso del TGF- β 1 come la stimolazione della proliferazione sinoviale e la fibrosi, il richiamo dei leucociti nel rivestimento sinoviale e l'induzione alla formazione di osteofiti[24].

L'isoforma TGF- β 3 è stata individuata in tutte le zone della cartilagine e gioca un ruolo importante nella maturazione condrogenica[23]. La sua efficacia è stata studiata in vitro in modelli animali come i conigli[24].

IGF

IGFs sono polipeptidi con una sequenza molto simile a quella della proinsulina che permette alle cellule di comunicare con il loro ambiente fisiologico attraverso un sistema complesso composto da due recettori superficiali(IGF1R e IGF2R), due leganti/ligandi (IGF-I e IGF-II) e una famiglia di sei proteine leganti IGF(IGFBP 1-6)[23].

IGF-I svolge un ruolo fondamentale nella promozione della proliferazione cellulare e nell'inibizione della morte cellulare; in particolare, nel caso della cartilagine, IGF-I è espresso durante la crescita della cartilagine, nella cartilagine matura e nel liquido sinoviale[23]. IGF-I influenza la differenziazione in condrociti e la proliferazione nelle cellule staminali mesenchimali ed embrionali e promuove la sintesi di collagene di tipo II e di proteoglicani[23]. La tesi che il fattore IGF-I sia necessario per mantenere

l'integrità della cartilagine articolare è supportata da uno studio in vivo in cui topi con una insufficienza cronica di IGF-I hanno sviluppato lesioni a livello della cartilagine[24]. Nei modelli animali, l'uso di IGF-I ha favorito la riparazione di grandi lesioni della cartilagine e hanno protetto la membrana sinoviale da una infiammazione cronica[24]. Tuttavia l'effetto di questo fattore decresce con l'età e in presenza di osteoartrite[24].

Il fattore IGF-II mostra un ruolo simile a quello di IGF-I ma ha effetti minori[23].

FGF

Nell'uomo sono stati identificati 22 tipi di fattori appartenenti alla famiglia FGF ma solo due sono stati studiati per il loro ruolo nell'omeostasi della cartilagine (FGF-2 e FGF-18)[23,24].

Nella cartilagine il fattore FGF-2 si ritrova in abbondanza nella matrice pericellulare [24]. Si è notato che il fattore FGF-2 inibisce la differenziazione terminale dei condrociti e la loro calcificazione in quanto la sua applicazione ha eliminato la diminuzione della sintesi dei proteoglicani che avviene nelle ultime fasi della condrogenesi[23]. Sotto l'azione di un carico il fattore si ritrova legato ai recettori presenti nella superficie delle cellule e attiva così una reazione anabolica che porta alla diminuzione dell'attività dell'aggrecanase ma nessun apparente cambiamento nel contenuto di proteoglicani[24]. Studi hanno dimostrato che l'uso di questo fattore ha dei risvolti negativi, per esempio la sua somministrazione intra-articolare ha provocato infiammazione e produzione osteofita [24]. Si è potuto inoltre notare che solo in caso di limitate dosi si riscontrano effetti benefici nel suo uso mentre dosi elevate comportano diversi svantaggi[24]. In seguito alle possibili conseguenze deleterie di questo fattore di crescita la sua somministrazione è molto discutibile.

Riguardo al fattore FGF-18 vi è meno letteratura ma appare più promettente del FGF-2 e suscita diversi effetti anabolici sui condrociti[24]. In un modello di ratto, la sua somministrazione intra-articolare ha diminuito la grandezza del difetto con un conseguente aumento di spessore della cartilagine ma l'aumento di spessore si è trasferito anche al liquido sinoviale[24]. Il ruolo del fattore FGF-18 nella riparazione delle lesioni cartilaginee deve ancora essere ben definito.

BMP

I fattori BMP sono conosciuti per indurre la formazione di cartilagine e di osso. Nel primo stadio della condrogenesi i BMPs favoriscono l'interazione delle cellule e sono inoltre necessari per la formazione della condensazione precondrogenica e per la differenziazione dei condrociti[23]. Inoltre i fattori BMP possono attivare i promotori del collagene di tipo X e dunque incrementano l'espressione dei marker specifici dei condrociti come il collagene di tipo X[23].

I fattori più rilevanti risultano due, il BMP-2 e il BMP-7. Studi in vitro hanno dimostrato che BMP-2 stimola la sintesi di matrice extracellulare e in più riesce ad invertire la dedifferenziazione dei condrociti, aumentando la sintesi di collagene di tipo II[24]. Gli effetti del BMP-2 sulle cellule staminali mesenchimali sono simili a quelli del fattore TGF- β 1, si ha quindi un incremento della produzione di matrice extracellulare e una diminuzione del contenuto di collagene di tipo I [24]. In un modello di topo in cui la degradazione della cartilagine era indotta dall'interleuchina-1(IL-1), il fattore BMP-2 ha favorito il turnover della matrice come evidenziato dall'aumento della degradazione degli aggregati, dall'aumento del contenuto di collagene di tipo II e dell'espressione di aggregati [24]. Un aumento del turnover della matrice dovrebbe indicare una risposta riparativa dopo una lesione alla cartilagine, ma non è ancora chiaro come un aumento di attività cataboliche, quali la degradazione degli aggregati, possa essere di beneficio nella riparazione della cartilagine[24].

Come altri fattori di crescita anabolici, il fattore BMP-7 stimola la sintesi della matrice e attenua l'attività catabolica di numerose citochine[24]. Tuttavia, a differenza degli altri fattori di crescita, questi effetti risultano indipendenti rispetto all'età o alla presenza di osteoartrite[24]. Il BMP-7 è sintetizzato dai condrociti e la sua espressione genica decresce con l'età e con la degradazione della cartilagine, tuttavia la cartilagine danneggiata è ancora in grado di rispondere ai segnali anabolici mandati dall'BMP-7 [24]. In studi animali il fattore BMP-7 si è dimostrato efficace nella riparazione delle lesioni della cartilagine e ha riscontrato effetti positivi anche nel trattamento dell'osteoartrite; è quindi una promessa nell'ingegneria tissutale della cartilagine.

PDGF

PDGF è una proteina glicolitica rilasciata dalle piastrine, che stimola la crescita delle cellule di origine mesenchimale come i tessuti vascolari e i tessuti connettivi.

PDGF consiste di due catene peptidiche legate attraverso ponti disolfuro e può essere espresso come omodimero (PDGF-AA o PDGF-BB) o come etero dimero (PDGF-AB) [23]. Questo fattore di crescita favorisce la riparazione e la rigenerazione del tessuto stimolando le cellule mesenchimali a differenziarsi in fibroblasti, osteoblasti e condrociti [23]. Date queste proprietà PDGF viene quindi studiato per l'applicazione nella Tissue Engineering.

È chiaro che è necessaria una moltitudine di fattori di crescita per arrivare alla formazione di cartilagine ialina durante la riparazione di una lesione cartilaginea ed è per questo che molto spesso si studiano gli effetti derivanti da una combinazione di diversi fattori di crescita al fine di trovare la combinazione più adeguata per la rigenerazione della cartilagine. Diversi fattori di crescita sono in grado di lavorare sinergicamente per accrescere la sintesi di matrice extracellulare e a tale scopo sono state studiate combinazioni del fattore BMP-7 con il fattore IGF-I e la combinazione di IGF-I e FGF-2.

3.4.2 Bioreattori

I bioreattori svolgono un ruolo importante nella Tissue Engineering e il loro utilizzo è sempre più vasto. Costituiscono infatti dei dispositivi in cui i processi biochimici possono essere altamente controllati, trasmettendo precisi stimoli alle cellule, sia di tipo chimico che meccanico. Le condizioni ambientali possono quindi essere monitorate, automatizzate e severamente controllate (pH, temperatura, pressione, apporto di nutrienti). Attraverso l'uso dei bioreattori si cerca di imitare le condizioni presenti nell'organismo in modo da favorire il più possibile la crescita cellulare e in seguito quella tessutale.

Le cellule rispondono agli stimoli meccanici trasmessi dai bioreattori portando ad una produzione più veloce di matrice extracellulare che risulta essere più omogenea rispetto all'applicazione di una coltura statica.

Un'ulteriore applicazione dei bioreattori è nella stimolazione della differenziazione cellulare. Molto spesso, infatti, la stimolazione meccanica viene usata per incoraggiare le cellule staminali a differenziarsi in uno specifico tipo cellulare. Inoltre i bioreattori possono essere impiegati per migliorare la distribuzione spaziale delle cellule. Una distribuzione cellulare eterogenea è il maggiore ostacolo per la formazione di tessuti in quanto molto spesso, con lo sviluppo del tessuto, la diffusione dei nutrienti al centro

diventa sempre più difficoltosa portando alla morte cellulare delle cellule presenti nel cuore del costruito. I bioreattori vengono quindi utilizzati per superare questo limite, inducendo una formazione tessutale omogenea. In generale le funzioni di un bioreattore si possono riassumere in cinque punti:

- Provvedere ad una distribuzione spaziale uniforme delle cellule
- Mantenere la concentrazione desiderata di gas e nutrienti nel mezzo di coltura
- Facilitare il trasporto di massa al tessuto
- Esporre il costruito a stimoli fisici e biochimici
- Fornire informazioni sulla formazione del tessuto.

In particolare, nel caso della cartilagine, i bioreattori cercano di riprodurre i carichi meccanici a cui è solitamente sottoposta nell'organismo. Gli scaffold in cui sono state coltivate le cellule, condrociti o cellule staminali, sono introdotti in tali dispositivi per favorire la produzione di nuovo tessuto funzionale da essere usato come rimpiazzo per il tessuto danneggiato[5]. I vari bioreattori possono essere classificati in base al principale tipo di stress applicato. Se non è diversamente indicato, l'ambiente di coltura si trova ad una temperatura di 37°C , un tasso di umidità del 90-100% e una fase gassosa comprendente il 20% di ossigeno e il 5% di anidride carbonica [5].

Sistemi che applicano la forza di taglio

La deformazione dinamica dovuta all'applicazione di forze di taglio si è dimostrato stimolare la sintesi proteoglicani e collagene[25]. Si è potuto notare che l'aumento di sintesi del collagene risulta molto superiore rispetto all'aumento relativo dei proteoglicani, cosa che non accade nel caso di carico compressivo. I costrutti esposti alla forza di taglio presentano inoltre un modulo di equilibrio e una resistenza maggiore.

Ci sono diversi metodi per generare le forze di taglio ma il più semplice comporta la coltivazione, in condizioni statiche o sotto stress di taglio in uno scuotitore orbitale, delle piastre di Petri in cui il costruito è fissato all'interno [5].

Un secondo approccio per studiare l'effetto delle forze di taglio è la coltura in una fiasca rotante o in un recipiente con una barra magnetica (figura 17) [5]. A tale scopo il costruito formato da cellule e polimero può essere fissato all'interno del recipiente o i condrociti possono essere coltivati in microscaffold; in quest'ultimo caso si può inoltre

scegliere se usare uno scaffold solido o poroso e di conseguenza si potrà applicare la forza di taglio a tutte le cellule o solo a quelle presenti sulla superficie [5]. L'uso delle fiasche rotanti permette di diffondere l'ossigeno e i nutrienti all'interno del mezzo di coltura inducendo la crescita di tessuto non solo nella superficie dello scaffold. Grazie alla presenza della fiasca rotante è possibile creare un flusso turbolento del mezzo di coltura sulla superficie dello scaffold creando uno stress di taglio che favorisce la crescita tessutale.

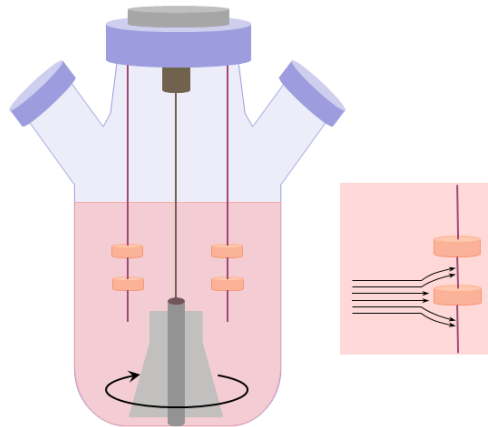


Figura 17: bioreattori a fiasca rotante(spinner flask)[36]

I metodi precedentemente descritti sono stati largamente usati da diversi gruppi ma nel tempo è sopraggiunto anche un nuovo metodo. Recentemente sono stati infatti usati reattori dotati di contenitori rotanti in grado di applicare forze di taglio (figura 18) [5]. In questo metodo i costrutti possono muoversi liberamente all'interno del mezzo di coltura ed il reattore, di policarbonato, possiede una forma cilindrica con un diametro di 5.75 cm ed un volume di 110 ml [5]. Ruota attorno al proprio asse centrale ad una velocità di 15-30 giri al minuto per mantenere il costrutto in sospensione.

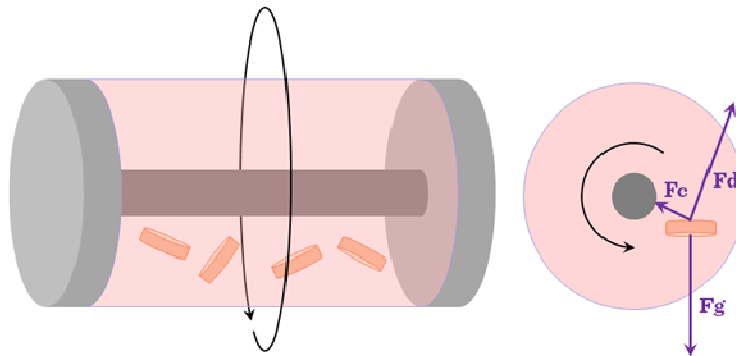


Figura 18: bioreattore a parete rotante [36]

Il flusso laminare che si viene a creare è un modo efficiente per ridurre le limitazioni di diffusione dei nutrienti permettendo di creare un minore stress di taglio per i costrutti rispetto alle fiasche rotanti. Per evitare perdita di mezzo di coltura il recipiente è completamente chiuso e non vi è nessuna porta. Una miscela di gas con il 10 % di anidride carbonica viene fornita attraverso un cilindro incavato ricoperto con una membrana di silicone permeabile al gas. Dopo aver coltivato i condrociti in scaffold porosi al 97% per 8 settimane, si osservò una maggiore formazione di tessuto nei recipienti rotanti, caratterizzato da un maggior contenuto di glicosaminoglicani e collagene. Inoltre anche le proprietà meccaniche si dimostrarono superiori[26].

Sistemi per la perfusione

Nei sistemi per la perfusione le cellule vengono incorporate in una matrice polimerica o addirittura incapsulate in essa al fine di prevenire il loro distacco per effetto del flusso del mezzo di coltura [5]. Spesso la matrice viene a sua volta incorporata in una capsula di agarosio e tutto il costrutto viene successivamente coltivato in un reattore cilindrico di vetro riempito con il mezzo di coltura [5]. La perfusione avviene attraverso un recipiente per tutta la grandezza del reattore con una velocità di flusso di 0.016 ml/min [5]. L'operazione viene effettuata all'interno di un incubatore standard e inoltre vi è la presenza di filtri sterili nel serbatoio per permettere uno scambio di gas con l'atmosfera circostante. Studi sono stati effettuati in questo sistema e la coltivazione di condrociti umani in matrici di collagene e di PGA/PLA hanno fornito buoni risultati.

È stato creato un ulteriore sistema molto simile a quello precedentemente descritto ma che possiede una differenza fondamentale, vi è la presenza di un ciclo chiuso del mezzo di coltura (figura 19) [5].

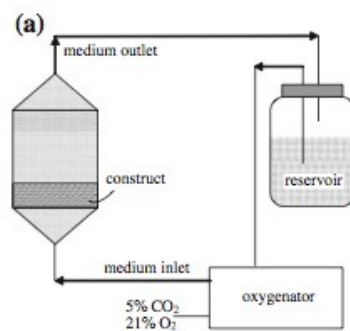


Figura 19: bioreattore a perfusione[37]

In questo caso il volume reale per la coltura è rappresentato dall' interno di una colonna cilindrica, larga 1 cm e lunga 10 cm. La colonna viene riempita con diversi costrutti e l'interno viene perfuso da un serbatoio con una velocità di flusso di 330 ml/min [5]. Attraverso questo sistema sono stati effettuati studi sull'effetto della perfusione nei condrociti bovini coltivati in matrici di PGA.

Sistemi per l'applicazione della pressione idrostatica

Quando la cartilagine viene caricata, c'è un'iniziale resistenza al flusso del fluido che comporta la formazione della pressione idrostatica all'interno del tessuto. Diversi studi hanno dimostrato l'effetto benefico della pressione idrostatica consistente in un aumento di sintesi di aggrecani e collagene[25]. La pressione idrostatica è stata quindi largamente usata come uno stimolo per l'aumento dell'attività metabolica nei condrociti[27]. Inoltre la pressione idrostatica si è dimostrata uno strumento utile per proteggere i condrociti soggetti ad uno stimolo infiammatorio ed è stata anche utilizzata per far differenziare le cellule staminali in un fenotipo condrogenico.

In generale si possono usare due diversi metodi per applicare la pressione idrostatica ai costrutti ed entrambi mostrano vantaggi e svantaggi [27]. Nel primo metodo la pressione idrostatica è applicata comprimendo una fase gassosa che trasmette il carico alle cellule attraverso il mezzo di coltura [27]. Questo metodo però presenta dei limiti in quanto pressurizzando la fase gassosa si può alterare la concentrazione del gas all'interno del mezzo di coltura; infatti Hansen *et al.* hanno osservato una diminuzione di 0,36 nel pH del mezzo dopo 10 ore di applicazione di pressione idrostatica [27]. Un vantaggio nell'uso di questo metodo è rappresentato dalla possibilità di alterare in modo controllato la pressione parziale all'interno del mezzo, similmente a come accade dopo l'applicazione di una pressione idrostatica a differenti livelli di ossigeno [27].

Il metodo alternativo, meno complicato, consiste nell' applicare la compressione solo alla fase fluida che limita qualunque cambiamento nella solubilità del gas all'interno della camera [27]. In questo caso si connette, attraverso un tubo di gomma, la camera riempita completamente di fluido ad un pistone che a sua volta risulta collegato ad una pressa idraulica controllata da un computer [27]. (figura 20) Entrambi i metodi richiedono un controllo di temperatura che viene ottenuto ponendo la camera all'interno

di una vasca piena d'acqua per mantenere la coltura ad una temperatura di 37 gradi[27]. È possibile eseguire gli esperimenti usando molteplici bioreattori per aumentare il numero degli studi ma, nonostante sia vantaggioso, ci possono essere variazioni nelle condizioni di pressione applicate tra i diversi strumenti.

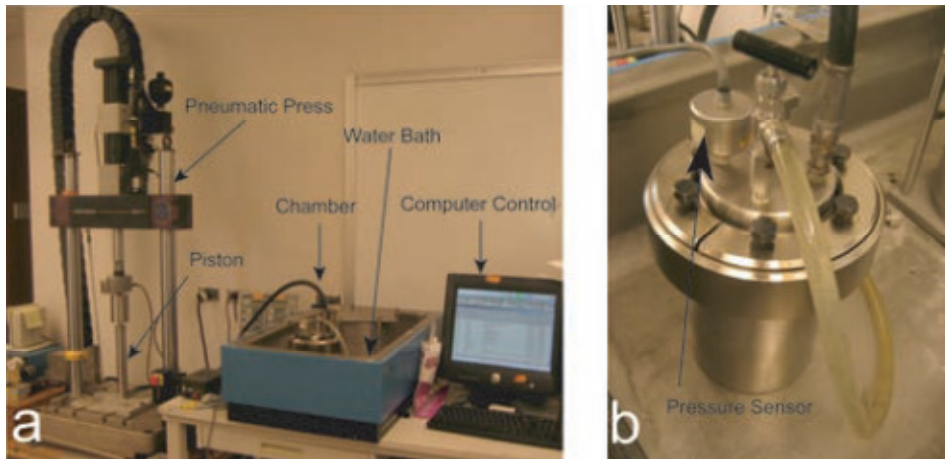


Figura 20: (a)bioreattore per l' applicazione di perfusione,(b) camera in ci viene applicata la pressione idrostatica [27]

Sistemi per l'applicazione della compressione

È stato dimostrato che il carico compressivo applicato agli espianti di cartilagine può modulare la vitalità dei condrociti, l'espressione genica e la biosintesi di varie molecole componenti la matrice extracellulare. Numerosi studi hanno usato i protocolli per la compressione dinamica ed hanno dimostrato numerosi benefici nella sintesi della matrice extracellulare. Utilizzando un sistema di gel di agarosio e condrociti, Buschmann *et al.* Hanno riscontrato che il carico dinamico ha incrementato la sintesi di proteoglicani del 6-25% e la sintesi di proteine del 10-35%, in dipendenza dal tempo di coltura a cui sono state sottoposte le cellule prima del carico e alla frequenza di applicazione[25]. La compressione dinamica può inoltre incidere positivamente sulla dedifferenziazione dei condrociti e si è potuto dimostrare che condrociti canini dedifferenziati coltivati in scaffold di collagene di tipo II hanno incrementato la propria sintesi di proteoglicani e proteine in seguito all'applicazione di compressione dinamica. Si sono potuti osservare anche miglioramenti nella differenziazione condrogenica delle cellule staminali in seguito all'applicazione di una forza di compressione.

Grazie a tutti questi vantaggi sono stati studiati diversi tipi di bioreattori in grado di applicare un carico compressivo ai costrutti ingegnerizzati per favorire la crescita

tessutale. Ci sono due differenti metodi per l'applicazione della compressione, uno statico e uno dinamico [5].

Per applicare una compressione statica si può applicare una forza di compressione monoassiale alle colture di cartilagine, ponendo i costrutti nella superficie inferiore delle culture, montando gli inserti e sopra il coperchio e infine applicando una massa ben definita al di sopra di questo [5]. L'inserto può così trasmettere il carico compressivo ai costrutti.

La compressione dinamica può venire applicata attraverso un dispositivo dotato di due piastre che permette di coltivare contemporaneamente 12 costrutti. Dodici puntoni perpendicolari sono posti in ogni piastra così da poter bloccare i costrutti tra due punti opposti quando lo strumento è assemblato [5]. La grandezza della forza di compressione è una funzione della distanza tra le due piastre. I costrutti sono immersi in un mezzo ma sopra alle culture c'è uno spazio che permette il ricambio di gas [5]. Attraverso questo dispositivo possono essere applicate pressioni, continue o intermittenti, fino a 0,77 MPa [5]. E' possibile inoltre l'applicazione di forze di compressione attraverso l'uso di una sola piastra metallica dotata di piastre compressive per ogni singolo costrutto (figura 21). Uno sviluppo di tale dispositivo si è raggiunto con l'attuazione di cicli di compressione. Bacchette compressive guidate da un attuatore con micrometri integrati sono state introdotte in modo da poter localizzare i campioni in modo preciso e poter riscontare deformazioni dell'ordine dei sub-micrometri [5]. Inoltre è stata aumentata la grandezza dello strumento per permettere la coltura di 24 campioni parallelamente; ma ciò ha costituito l'impossibilità di porre lo strumento in una incubatrice standard e ha portato all'aggiunta di ulteriori dispositivi. Sono stati aggiunti strumenti per lo scambio di calore e il controllo della temperatura ed inoltre l'aggiunta di un compressore ha permesso il rilascio di una miscela di gas sterile [5]. Grazie a questi dispositivi sono stati coltivati e stimolati, sotto un vasto range di carichi, diversi scaffold con i condrociti incorporati. Chowdhury *et al.* hanno studiato gli effetti della compressione, continua od intermittente, in condrociti bovini incorporati in un gel di agarosio usando vari cicli di compressione dinamica [5].

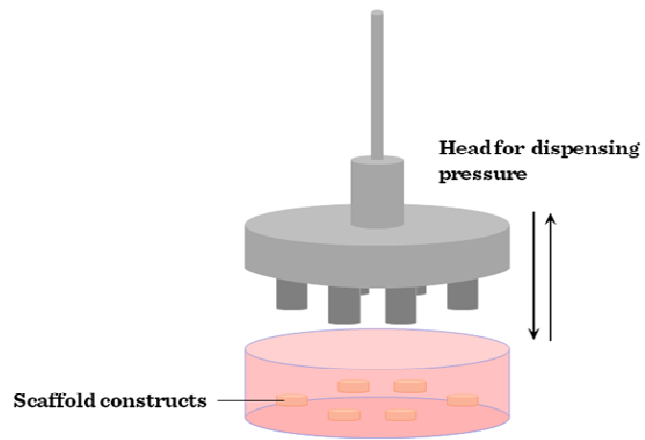


Figura 21: bioreattore per l'applicazione della compressione [36]

CAPITOLO 4

VALUTAZIONE DELLA CARTILAGINE INGEGNERIZZATA

Attualmente non esistono criteri formali per affermare se uno specifico costrutto ingegnerizzato è pronto per l'impianto e tale fatto costituisce una lacuna significativa nel processo che porta dalla coltivazione in vitro all'applicazione in vivo [11].

Il rilascio di criteri dovrebbe certificare che specifiche proprietà del tessuto hanno raggiunto un certo livello e dovrebbe portare alla predizione della possibilità di successo dell'impianto nei pazienti. La valutazione del tessuto cartilagineo può però servire a comprendere più in dettaglio le specifiche caratteristiche che deve possedere il costrutto affinché sia applicabile clinicamente [11].

4.1 CONSIDERAZIONI BIOMECCANICHE

La cartilagine ingegnerizzata, una volta posta nell'articolazione, deve essere in grado di sopportare una grande serie di carichi, soprattutto forze di compressione e di taglio.

Il carico compressivo è tipicamente dalle due alle quattro volte il peso corporeo nella normale camminata ma può essere molto superiore nel caso di altre attività. Il carico durante la camminata è stato stimato essere nella fascia 6-25 MPa, nella fascia 50-210 MPa durante la corsa e nella fascia 140-250 MPa durante i salti [11].

La forza di taglio, invece, è supposta essere circa tre volte minore del carico compressivo nelle articolazioni normali. È inverosimile che un solo metodo di valutazione meccanica dia una visione completa della funzionalità della cartilagine e per questo motivo i metodi che sono stati usati per determinare le proprietà della cartilagine normale e di quella patologica sono stati anche usati per comparare la cartilagine nativa e quella ingegnerizzata [11].

La maggior parte dei metodi usati per la valutazione meccanica può essere diviso in due categorie: la prima categoria comprende i metodi per determinare le proprietà del materiale mentre la seconda categoria comprende i metodi che forniscono un'indicazione della performance del costrutto sotto condizioni molto simili rispetto a quelle che si ritrovano all'interno dell'organismo [11].

Le proprietà rilevanti del materiale sono definite da modelli di comportamento meccanico. Nonostante siano stati usati modelli elastici e viscoelastici per descrivere la cartilagine, la teoria bifasica è diventata quella maggiormente usata per descrivere il comportamento dinamico della cartilagine [11]. Questa teoria descrive la cartilagine come un mix tra parte solida e liquida. Nella forma più comune il solido è modellato come un materiale elastico isotropo e il fluido è modellato come incomprimibile [11]. L'interazione tra la parte solida e la parte liquida dà luogo ad un comportamento dipendente dal tempo e governa il trasporto del carico e la deformazione. Test per valutare le proprietà meccaniche sono stati sviluppati insieme alle tecniche di analisi del modello che sono usate per estrarre le proprietà dello stesso modello[11].

4.1.1 Test per determinare proprietà del materiale

Compressione

Nei test per l'applicazione di una compressione confinata un campione di forma cilindrica è posto in una camera e caricato per tutta la sua superficie circolare attraverso un filtro poroso [11]. In questa configurazione l'unica componente di spostamento della cartilagine è nella stessa direzione della compressione e il flusso risulta perpendicolare alla faccia circolare del campione(figura 22)[11]. Questo test può essere effettuato sotto carico costante o sotto spostamento costante. In tale modo possono essere determinate la rigidità della matrice e la permeabilità adattando le previsioni del modello alle misure ottenute.

Nei test per la compressione illimitata il campione è posto tra due piastre metalliche mentre la sua superficie cilindrica è lasciata libera[11]. In questa configurazione la compressione è applicata perpendicolarmente alla faccia circolare del campione ma questo risulta deformato in direzione verticale e radiale(figura 22) [11]. Il flusso del fluido è solo nella direzione radiale. In entrambi questi test il tempo per raggiungere l'equilibrio è all'incirca di 100 secondi [11]. La permeabilità e il modulo di Young possono essere ricavati applicando il modello bifasico ai dati sperimentali ottenuti[11].

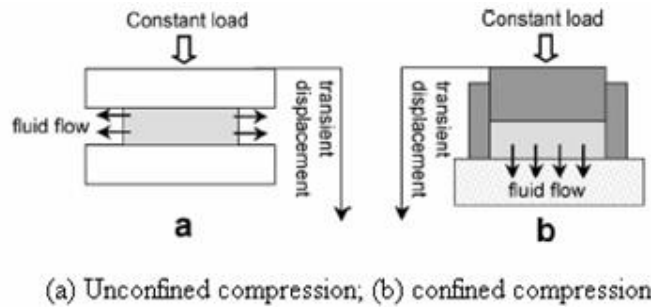


Figura 22: test per l'applicazione di compressione in confinata (a) e confinata (b) [30]

Indentazione

In questi test una piccola porzione della superficie del campione è soggetta a carico attraverso un indentatore, tipicamente di diametro dai 9 agli 1,5 mm (figura 23)[11]. In questo modo il tessuto viene sottoposto ad uno stato più complesso di carico rispetto alla semplice compressione [11]. Normalmente questo tipo di test viene effettuato sotto carico costante e dura finchè non è raggiunto uno stato di equilibrio [11].

Un vantaggio di questa tecnica consiste nel poter effettuare l'operazione anche in situ. La curvatura dell'articolazione non ha effetti sui risultati del test di indentazione ma pone delle limitazioni al diametro dello strumento che deve essere utilizzato [11]. Il diametro dell'indentatore usato per un coniglio, che possiede un raggio di curvatura relativamente piccolo, deve essere più piccolo rispetto a quello utilizzato per articolazioni più grandi [11]. Strumenti con un diametro più grande richiedono però un più grande spostamento per essere completamente in contatto con la cartilagine e spostamenti più grandi invalidano il modello lineare che è stato usato per dati. Usando l'analisi basata sul modello bifasico possono essere dedotte proprietà della matrice solida e la permeabilità [11].

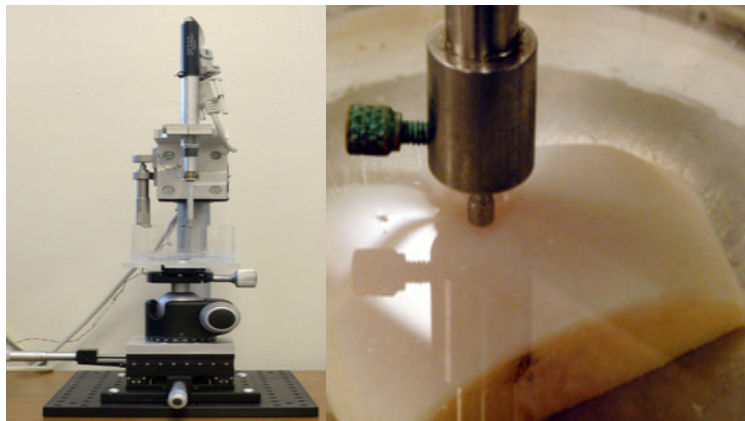


Figura 23: test di indentazione, (a) strumento, (b) campione sottoposto al test [38]

Forza di taglio

Capire il comportamento del tessuto sottoposto ad una forza di taglio risulta fondamentale per valutare la cartilagine ingegnerizzata poiché, nell' organismo, il movimento dell' articolazione comporta una deformazione di taglio [11].

Teoricamente attraverso questi test può essere determinato il comportamento intrinseco delle componenti della matrice e si è potuto dimostrare che quest'ultima ha un comportamento viscoelastico. Il comportamento viscoelastico della matrice è stato caratterizzato usando misurazioni transitorie e dinamiche; nel primo caso possono essere usate per determinare la funzione di rilassamento mentre nel secondo caso per determinare il modulo complesso e la perdita angolare [11]. Il modulo di equilibrio del taglio è nella fascia 0,1-0,4 MPa, il modulo dinamico nella fascia 0,2-2 MPa e l'angolo δ 9-15 gradi [11].

Un problema che si riscontra in questi test è il fissaggio del campione, solitamente vengono usati due differenti metodi, o si blocca il campione tra superfici porose o lo si incolla alla superficie di una piastra metallica attraverso il cianoacrilato [11].

Tensione

I test per valutare la tensione sono tipicamente effettuati sotto deformazione costante o sotto carico costante e quando sono effettuati su campioni nativi, essi sono allineati in modo che la tensione venga applicata parallelamente o perpendicolarmente alla linea di divisione dei campioni nella superficie articolare [11]. Attualmente non sono stati effettuati test per valutare la cartilagine in tutta la sua profondità in tensione in quanto il confine con l'osso subcondrale, che necessita di essere rimosso per questi test, rimane ancora indistinto [11].

Risultati hanno dimostrato che le proprietà di trazione della cartilagine sono dipendenti dalla profondità dalla superficie articolare e dall'orientazione relativa delle linee di divisione [11]. Le proprietà della cartilagine nativa e di quella ingegnerizzata possono essere comparate a diversi livelli. Utilizzando test in cui viene mantenuta costante la deformazione possono essere comparate la forza e la rigidità in funzione della profondità mentre nei test con carico costante possono essere comparate le fasi iniziali e finali di scorrimento [11]. Spesso ci si aspetta che la forza e la rigidità della cartilagine ingegnerizzata sia minore come conseguenza del contenuto minore di collagene [11].

Proprietà dipendenti dalla profondità

La maggiore limitazione dei precedenti test è la considerazione dei valori medi lungo tutta la profondità dei campioni. È sicuramente necessario che la cartilagine prodotta in laboratorio possieda proprietà medie simili a quelle possedute dalla cartilagine nativa ma non si è sicuri che questo basti a garantirne la funzionalità.

La cartilagine articolare possiede infatti proprietà chimiche e meccaniche che sono funzioni della profondità rispetto alla superficie articolare e tale comportamento dovrebbe essere tenuto in considerazione nelle valutazioni del comportamento della cartilagine ingegnerizzata. Molto spesso si riscontrano limiti del trasporto di massa nei costrutti ingegnerizzati in quanto la parte superficiale risulta più sviluppata e attiva metabolicamente rispetto alla parte centrale, cosa che non accade assolutamente nella cartilagine nativa.

Un approccio per valutare le proprietà dipendenti dalla profondità è quello di tagliare molteplici sezioni lungo lo spessore della cartilagine e testare ognuna di esse [11]. Molto spesso però i risultati tendono ad essere meno accurati a mano a mano che lo spessore dei campioni diminuisce. Un altro approccio include metodi per le misurazioni acustiche e ottiche [11]. Attraverso l'uso di marker si può infatti tracciare una mappa dei campi di affaticamento locale che possono permettere, ad esempio, la misurazione della rigidità alla compressione e al taglio [11].

4.1.2 Test tribologici

Una delle caratteristiche più notevoli della cartilagine nativa è rappresentata dal suo basso consumo e dalla sua resistenza all'uso. La valutazione tribologica della cartilagine ingegnerizzata può provvedere ad una misura migliore dell'abilità del costrutto di funzionare in vivo rispetto alla valutazione meccanica [11].

Si è potuto osservare, attraverso test tribologici, che il costrutto ingegnerizzato è più facilmente danneggiato dall'azione combinata di compressione e forza di taglio rispetto alla cartilagine nativa ma tale aspetto non può essere dedotto dalla valutazione meccanica del campione [11]. Si è notato inoltre un aumento di attrito con il tempo, che è caratteristico della lubrificazione nel modello bifasico in cui la forza compressiva è indotta nella matrice dalla pressione del fluido interstiziale. Un ruolo importante viene quindi svolto dalla lubrificazione ed è per questo che il costrutto ingegnerizzato

necessita di una fonte che preveda alla sua lubrificazione affinché duri nel tempo [11]. Poiché la produzione di molecole che prevedono a tale scopo nella cartilagine nativa avviene in presenza della forza di taglio sarà necessario provvedere all'applicazione di questa stessa forza al costrutto ingegnerizzato durante il suo sviluppo [11].

4.1.3 Preparazione dei campioni

In tutti questi test la preparazione dei campioni rappresenta un processo importante e anche molto lungo [11]. Test per la compressione, per la forza di taglio e quelli tribologici usano tipicamente campioni cilindrici con facce parallele e circolari che possono essere ottenute attraverso l'uso di un perforatore da biopsia [11]. Molto spesso per ottenere facce parallele si ricorre all'uso di un microtomo. Nei test di indentazione invece è richiesta una preparazione minima dei campioni [11].

4.2 CONSIDERAZIONI BIOCHIMICHE E ISTOLOGICHE

In aggiunta alla valutazione meccanica, può essere significativa la valutazione del costrutto dal punto di vista biochimico ed istologico. La valutazione biochimica permette la valutazione della composizione chimica del costrutto considerando però il tessuto in modo omogeneo senza tenere conto delle differenze locali in dipendenza della profondità, in tal modo si ottengono dei valori medi che riguardano l'intero tessuto [11]. Nel caso della valutazione istologica è invece possibile un'analisi più localizzata che tiene in considerazione delle diversità tra le varie zone della cartilagine [11].

4.2.1 Valutazione biochimica

La composizione biochimica della cartilagine è molto complessa ed è stata descritta precedentemente, per la sua valutazione si può però considerare un livello generale della sua composizione dividendola in tre principali componenti: acqua, contenuto minerale e sostanze organiche [11]. Anche se la cartilagine varia le proprie caratteristiche in base alla profondità, in questa valutazione non si terranno in considerazione queste differenze ma si guarderà solo il contenuto medio di tali componenti nel tessuto.

Per determinare il contenuto di acqua, che dovrebbe aggirarsi intorno all' 80%, si può valutare la differenza di peso che si riscontra tra un campione fresco e un campione dopo il suo congelamento [11].

La stima del contenuto di acqua è un'utile metodo per confrontare la cartilagine nativa e quella ingegnerizzata, in quanto il contenuto d'acqua contribuisce in modo rilevante alle proprietà meccaniche del tessuto. Un alto contributo d'acqua determina un aumento della permeabilità ma anche una minore compattezza [11].

Il contenuto minerale, soprattutto sali di calcio, è all'incirca valutato essere il 5 % per la cartilagine articolare anche se nella zona calcifica adiacente all' osso può arrivare al 30 % [11]. Per valutarne la quantità nel campione si possono usare metodi distruttivi incenerendolo oppure attraverso prove colorimetriche del calcio [11].

Per quanto riguarda il contenuto organico esso può essere suddiviso in diverse componenti: le cellule, i glicosaminoglicani e le proteine.

In letteratura sono stati proposti diversi valori per la densità cellulare che variano molto a seconda della specie e della locazione nella fascia 14000-330000 cellule/mm³ [11].

Vi sono diversi metodi per valutare il numero di cellule presenti nel tessuto; si può applicare la classica istomorfometria in un dato volume oppure, per essere più accurati, si possono utilizzare i principi della stereologia che assicura informazioni sulla distribuzione regionale ma richiede più tempo [11]. Inoltre colori basici possono essere utilizzati per determinare la vitalità delle cellule e la loro distribuzione all'interno del tessuto [11]. Una stima del volume cellulare può essere inoltre ottenuta attraverso la misurazione del contenuto del DNA. In questa tecnica distruttiva il tessuto è digerito dalla papaina e il contenuto totale del DNA viene misurato attraverso il metodo di *dye-binding* [11].

La presenza dei glicosaminoglicani nella matrice extracellulare contribuisce notevolmente alle caratteristiche meccaniche del tessuto cartilagineo e per questo è utile confrontare il contenuto dei GAGs nella cartilagine ialina e in quella ingegnerizzata. Il metodo che può essere utilizzato per determinare il contenuto di GAGs nei lisati della cartilagine nativa e di quella ingegnerizzata è il metodo del *dye-binding* [11].

Attraverso questo metodo è possibile quantificare spettroscopicamente la quantità di glicosaminoglicani solfati calcolando lo spostamento indotto nello spettro di assorbimento [11]. Il metodo di dye-binding consente di quantificare il contenuto dei

glicosaminoglicani solfatati ma non il contenuto di acido ialuronico che risulta non solfato [11]. Nei lisati è purtroppo persa l'informazione spaziale ma tale limite può essere superato e i glicosaminoglicani possono essere localizzati istochimicamente.

L'analisi proteica ha rilevato più di 200 tipi di proteine presenti nella matrice extracellulare della cartilagine, la cui presenza varia localmente [11]. Ciò deve essere tenuto in considerazione quando si valuta la cartilagine ingegnerizzata perché oltre a verificare la presenza delle stesse proteine bisogna cercare di riprodurre il più possibile la loro distribuzione [11]. La proteina più importante presente nella cartilagine è il collagene, soprattutto di tipo II, e molto spesso proprio questo componente è presente in quantità minori rispetto alla cartilagine nativa comportando svantaggi dal punto di vista meccanico [11].

4.2.2 Valutazione istologica

La valutazione istologica, soprattutto dopo l'impianto, costituisce una tecnica indispensabile per valutare la qualità del costrutto ingegnerizzato.

Possono essere usate tecniche standard di istologia che permettono di valutare il tessuto anche localmente consentendo di osservare le differenze presenti tra le varie zone. Attraverso tali tecniche si è potuto osservare il deposito dei glicosaminoglicani nel tessuto e inoltre si sono ricevute informazioni sull'anisotropia del tessuto [11].

Grazie all'applicazione dell'immunocitochimica che fa uso di anticorpi marcati si è ottenuta una migliore identificazione e localizzazione di proteine specifiche [11].

I protocolli di colorazione provvedono ad una valutazione soggettiva della qualità del tessuto e, per questo, sono stati introdotti sistemi per l'attribuzione di un punteggio che assegnano valori numerici alle varie combinazioni di valutazioni della morfologia cellulare, della colorazione della matrice, della regolarità della superficie, dell'integrità strutturale e altre caratteristiche [11]. I sistemi di punti sono in uso da quando Collins e McElligot hanno sviluppato una classificazione macroscopica della cartilagine osteoartritica nel 1949 e Mankin ha sviluppato il sistema di punti istopatologico e istochimico nel 1971 (HHGS). Comunemente i sistemi utilizzati per la valutazione della cartilagine ingegnerizzata sono il sistema di O'Driscoll e il sistema di Bern mentre il sistema per la cartilagine osteoartritica rimane il sistema HHGS [11].

4.3 TEST NON DISTRUTTIVI

Negli ultimi anni sono stati effettuati molti passi in avanti nella produzione di un costrutto ingegnerizzato in grado di sostituire la cartilagine nativa ma purtroppo mancano ancora criteri di rilascio per l'impianto che predicano il successo in vivo [11]. Impiantare un costrutto inadeguato nell'articolazione, dove verrà sottoposto a continui carichi, può avere conseguenze catastrofiche.

Finora sono stati descritti metodi per la valutazione biochimica e meccanica dell'impianto ma i test necessari implicano la distruzione dell'impianto e quindi l'impossibilità di impiantarli nell'organismo. Per queste ragioni solitamente la cartilagine ingegnerizzata non viene valutata prima dell'operazione chirurgica, creando un grande bisogno di metodi per la valutazione del costrutto che non siano distruttivi. La cartilagine può essere caratterizzata in modo non distruttivo in diversi modi, come la risonanza magnetica per Imaging, le tecniche di tomografia micro computerizzata, test meccanici non distruttivi e gli ultrasuoni [11].

4.3.1 MRI

La risonanza magnetica per Imaging può essere usata per valutare lo spessore della cartilagine in vivo, applicazione utile per la valutazione della cartilagine impiantata [11]. Il contenuto dei glicosaminoglicani nella cartilagine può essere ricavato nella risonanza magnetica per imaging attraverso diverse misurazioni dipendenti dal tempo dopo la somministrazione del mezzo di contrasto, in questo caso gadolinio (figura 24). Gli ioni mobili di gadolinio infatti si distribuiscono intorno ai glicosaminoglicani per rifletterne il contenuto locale in quanto possiedono carica negativa. Questa tecnica è stata utilizzata per la cartilagine nativa e quella ingegnerizzata [11].

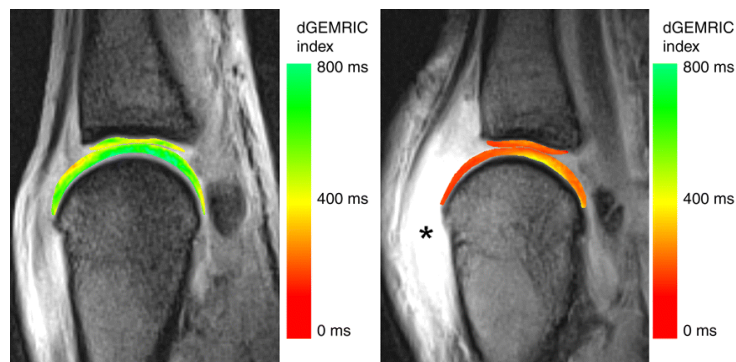


Figura 24: risonanza magnetica per imaging con l'uso di gadolinio, (a) paziente sano, (b) paziente che presenta segni di artrite reumatoide, * sinovite [39]

4.3.2 Micro-CT

Il segnale emesso dalla cartilagine nel caso della tomografia micro computerizzata è debole poiché il tessuto cartilagineo non attenua molto bene i raggi X [11]. Un miglioramento di questa tecnica è stato ottenuto utilizzando una sonda di gadolinio che ha mostrato risultati promettenti per gli espianti di cartilagine e quindi si propone come alternativa per i campioni ingegnerizzati [11].

4.3.3 Test meccanici non distruttivi

I metodi che sono stati studiati per la valutazione in vivo degli impianti possono essere anche applicati ai costrutti ingegnerizzati. Molto spesso questi test sono basati sull'indentazione, sono effettuati tramite via artroscopica e sono realizzati sotto condizioni sterili, aspetto molto importante per la Tissue Engineering [11].

Le proprietà di indentazione sono dedotte dalla conoscenza della profondità di indentazione e della forza applicata [11]. La profondità è controllata dalla forma dell'estremità della sonda mentre la forza può essere misurata attraverso una cella di carico che è integrata nello strumento stesso [11].

Questi metodi però sono più indicati per un controllo veloce che per la formulazione di criteri finali poiché non sono in grado di rivelare le disomogeneità presenti all'interno del tessuto [11].

4.3.4 Ultrasuoni

Gli ultrasuoni sono stati utilizzati per valutare le proprietà della cartilagine nativa, di quella danneggiata e di quella ingegnerizzata. Sono state collegate alcune proprietà acustiche alla cartilagine sana e, per esempio, gli indici di attenuazione, di riflessione e rugosità sono stati associati alla qualità della cartilagine [11].

L'analisi delle onde è stata sfruttata per dedurre le caratteristiche della cartilagine utilizzando il segnale riflesso (figura 25) [11]. Gli ultrasuoni sono stati anche adoperati in combinazione con i test meccanici per effettuare misurazioni delle proprietà meccaniche [11]. I modelli di propagazione delle onde hanno stabilito relazioni meccaniche tra la velocità del suono, la densità e la rigidità del materiale, così da permettere la stima di queste proprietà sperimentalmente [11].

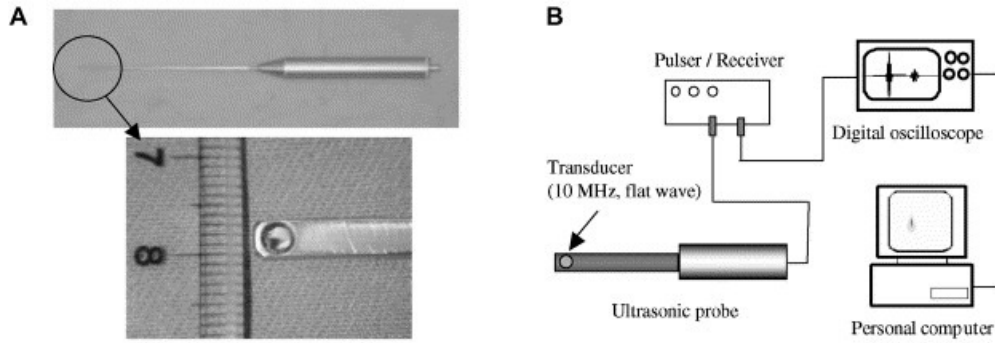


Figura 25: valutazione acustica della cartilagine, (a) sonda ultrasonica, (b) illustrazione schematica del sistema di valutazione [31]

Molti metodi sono stati quindi sviluppati per valutare le caratteristiche meccaniche, chimiche e biologiche della cartilagine nativa ma essi possono essere utilizzati anche per la valutazione della cartilagine ingegnerizzata. Nonostante la presenza di questi metodi non sono ancora chiare quali sono le proprietà necessarie al successo clinico. Progressi devono quindi essere effettuati in questo ambito per poter disporre di criteri in grado di prevedere il successo dell'impianto in modo da poter sviluppare test specifici non distruttivi.

CONCLUSIONI

Le lesioni alla cartilagine articolare, dovute a malattie degenerative o a traumi, rappresentano un problema attuale per un numero consistente di persone e per questo sono state proposte diverse tecniche riparative al fine di ripristinare le normali funzioni delle articolazioni coinvolte.

Le tecniche proposte prima dell'avvento dell'ingegneria tissutale hanno permesso una riduzione del dolore per il paziente ma hanno anche portato alla formazione di un tessuto cartilagineo più simile alla fibrocartilagine, che possiede proprietà meccaniche inferiori alla cartilagine articolare e che può portare, con il passare del tempo, ad una successiva degradazione. Per ottenere migliori risultati a lungo termine è stata proposta l'applicazione dell'ingegneria tissutale che sembra possedere alcune caratteristiche allettanti per la riparazione della cartilagine.

Molti passi in avanti sono stati fatti in questo ambito e diversi metodi sono stati proposti per la produzione del costrutto ingegnerizzato. Si sono valutati diversi tipi di biomateriali al fine di trovare quello più adatto alla specifica applicazione ma la variabilità tra i diversi pazienti può costituire un fattore critico in questo campo. Nonostante, infatti, si siano fatti progressi nella produzione in vitro di tessuto, l'applicazione dell'ingegneria tissutale comporta anche degli aspetti critici. La scelta delle cellule per la ricostruzione del tessuto è uno di questi aspetti in quanto sia i condrociti che le cellule staminali hanno le loro controindicazioni. La direzione attuale è quella di favorire il più possibile la condrogenesi delle cellule staminali per poter disporre di una sorgente cellulare molto più ampia rispetto ai condrociti e diminuire il più possibile i danni provocati al paziente. Inoltre la produzione di scaffold con una determinata architettura richiede l'impiego di tecniche molto lente, costose e spesso non standardizzate. Tali aspetti non sono da sottovalutare nell'applicazione clinica e per questo ci si potrebbe chiedere: si ha bisogno veramente dell'ingegneria tissutale per la riparazione di lesioni cartilaginee?

Di certo non è possibile affermare che l'applicazione di cartilagine ingegnerizzata è controproducente poiché ha mostrato effetti molto positivi in molti modelli animali. Purtroppo però gli studi clinici sono ancora troppo pochi per poter affermare la sicura efficacia di questi metodi e sono necessarie ulteriori trials clinici a lungo termine per determinarne i risultati.

Affinchè la cartilagine ingegnerizzata divenga una routine clinica c'è bisogno, inoltre, di poter disporre di criteri ben definiti in grado di valutare il costrutto ingegnerizzato prima della sua applicazione e che possa predire i suoi effetti sul paziente. L'ingegneria tissutale è quindi un'alternativa a procedure quali la microfrattura o il *mosaicplasty* ma ulteriori sviluppi sono necessari per la sua applicazione clinica, cercando di limitare i costi relativi e il tempo che richiede.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Di Bello C. , *“Biomateriali introduzione allo studio dei materiali per uso biomedico”*, Patron , Bologna 2004
- [2] J.L. Olson, A. Atala, J.J. Yoo, *“Tissue Engineering : current strategies and future directions”* , Chonnam Med J (2011), 47:1-13
- [3] Junqueira L. C., Carneiro J., *“Compendio di istologia”*, Piccini, Padova 2006
- [4] Todesco S., Gambari P.F., *“Malattie reumatiche”*, McGraw-Hill, Milano 2002
- [5] Schulz R.M., Bader A., *“ Cartilage tissue engineering and bioreactor systems for the cultivation and stimulation of chondrocytes”*, Eur Biophys J (2007), 36:539-568
- [6] Zhang L., Hu J., Athanasiou K.A., *“The role of tissue engineering in articular cartilage repair and regeneration”*, Crit Rev Biomed Eng. (2009), 37(1-2):1-57
- [7] Bhosale A.M., Richardson J.B., *“Articular cartilage: structure, injuries and review of management”*, British Medical Bulletin (2008), 87: 77-95
- [8] Swieszkowski W., Saey Tuan B.H., Kurzydłowski K.J., Hutmacher D.W., *“Repair and regeneration of osteochondral defects in the articular joints”* , Biomolecular Engineering (2007), 24: 489-495
- [9] Iwasa J., Engebretsen L., Shima Y., Ochi M., *“ Clinical application of scaffolds for cartilage tissue engineering”* , Knee Surg. Sports Traumatol. Arthroscop. (2009), 17:561-577
- [10] Chan D.D., Neu C.P., *“Probing articular cartilage damage and disease by quantitative magnetic resonance imaging”*, Royal Society Publishing (2012), 10:1-11
- [11] Mansour J.M., J.F. Welter, *“Multimodal evaluation of tissue-engineered cartilage”*, J Med Biol Eng. (2013), 33(1): 1-16
- [12] Madry H., Grun U.W., Knutsen G., *“Cartilage repair and joint preservation”*, Deutsche Arzteblatt International (2011), 180(40):669-77
- [13] Smith G.D., Knutsen G., Richardson J.B., *“A clinical review of cartilage repair techniques”*, British Editorial Society of Bone and Joint Surgery (2005), 87-B :445-449
- [14] Bedi A., Feeley B.T., Williams R.J., *“Management of articular cartilage defects of the knee”* , J Bone Joint Surg Am. (2010), 92:994-1009
- [15] Farr J., Cole B., Dhawan A., Kercher J., Sherman S., *“Clinical cartilage restoration”*, Clinic Orthop Relat Res (2011), 469:2696-2705

- [16] Ringe J., Sittinger M., "Tissue engineering in the rheumatic disease", Arthritis Research and Therapy (2009), 11:211-222
- [17] Johnstone B., Alini M., Cucchiari M., Dodge G.R., Eglin D., Guilak F., Madry H., Mata A., Mauk R.L, Semino C.E., Stoddart M.J., "Tissue engineering for articular cartilage repair- the state of art", European Cells and Materials (2013), 25: 248-267
- [18] Kock L., Van Donkelaar C.C., Ito K., "Tissue Engineering of functional articular cartilage: the current status", Cell Tissue Res (2012), 347: 613-627
- [19] Mahmoudifar N., Doran P.M., " Chondrogenesis and cartilage tissue engineering: the longer road to technology development" , Tends in Biotechnology (2012), 30:166-176
- [20] Danisovic L., Varga I., Zamborsky R., Bohmer D., " Tissue engineering of articular cartilage: cells, scaffold and stimulating factors", Experimental Biology and Medicine (2012), 237:10-17
- [21] Peltarri K., Wixmerten A., Martin I., "Do we really need cartilage tissue engineering?", Swiss Med Wikly (2009), 139(41-42):602-609
- [22] Jiang Y.Z., Zhang S.F., Qi Y.Y., Wang L.L., Ouyiang H.W., "Cell transplantation for articular cartilage Defects: principles of past, present and future practice", Cell Transplantation (2011), 20:593-607
- [23] Lee S-H, Shin H., "Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in boe and cartilage tissue engineering", Advanced Drug Delivery Reviews (2007),59:339-359
- [24] L.A. Fortier, J.U. Barker, E.J. Strauss, T.M. McCarrel,B.J. Cole, "the role of growth factor" ,Clinic Orthop Relat Res 2011, 469:2706-2715
- [25] Lee C., Grad S., Wimmer M., Alini M., Chapter 1:" Topics in tissue engineering", Eds. N. Ashammakhi and R.L. Reis, 2006
- [26] Partap S., Plunkett N.A., O'Brien F.J., chapter 16: " Tissue Engineering", Edited by Daniel Eberli, 2010
- [27] Elder B.D., Athanasiou K.A., "Hydrostatic pressure in articular cartilage tissue engineering: from chondrocytes to tissue regeneration" ,Tissue Engineering (2009),15(1):44-53
- [28] Kholes S.S, Mason S.S., Adams A.P., Berg R.J. , Blank J., Gibson F., Righetti J. , "Ultrasonic wave propagation assessment of native cartilage explants and hydrogel scaffolds for tissue engineering", Int J Biomed Eng Technol (2012),10(3):296-307

[29] Moutos F.T., Guilak F., “ *Composite scaffolds for cartilage tissue engineering*”, *Biorheology* (2008), 45(3-4):501-512

[30] Boschetti F., Pennati G., Gervaso F., Penetti G.M., Dubini G., “*Biochemical properties of human articular cartilage under compressive loads*”, *Biorheology* (2004), 41(3-4):159-166

[31] Hattori K., Takakura Y., Ishimura M., Habata T., Vematsu K., Ikeuch K., “*Quantitative arthroscopic ultrasound evaluation of living human cartilage*”, *Clin Biomed* (2004), 19(2):213-216

SITOGRAFIA

[32] www.medicinapertutti.altervista.org/argomento/cartilagine-elastica

[33] www.atlanteistologia.unito.it/page.asp?xsl=tavole&xml=connettivi.Cartilagine&tavola=cartial20x

[34] www.conoscereperdecidere.blogspot.it/2012/10/artrosi-e-artriti-differenze-e-rimedi.html

[35] www.ortopedicitonno.it/patologia/lesioncartilaginee-focali/

[36] www.tankonyutar.hu/hu/tartalom/tamop425/0011_1A_3D_en_book/ch01s03.html

[37] www.umasswiki.com/wiki/Bioreactors_for_Tissue_Engineering_by_Varun_Chalupadi

[38] www.me.udel.edu/research_groups/lu/research.htm

[39] www.radiology.rsna.org/content/257/2/441.figures-only