

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
CAMPUS DI CESENA DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA
DELL'ENERGIA ELETTRICA E DELL'INFORMAZIONE
"GUGLIELMO MARCONI"

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**ANALISI DELLE PROPRIETÀ MECCANICHE E
VALUTAZIONE DELLA BIOCOMPATIBILITÀ DI
SCAFFOLD A BASE DI POLIACRILATO
INGEGNERIZZATI PER IL TRATTAMENTO DI
LESIONI DA OSTEOARTRITE DELLA
CARTILAGINE**

Elaborato in:

FONDAMENTI DI INGEGNERIA DEI TESSUTI BIOLOGICI LM

Relatore:

Prof. Emanuele D. Giordano

Presentata da:

Davide Brandini

Anno Accademico 2019/2020

INDICE

CAPITOLO 1 - INTRODUZIONE	4
1.1 IL TESSUTO CARTILAGINEO	4
1.2 ACCENNI ALL'OSTEOARTROSI	12
1.3 TRATTAMENTO TERAPEUTICO	17
<i>1.3.1 APPROCCIO CONSERVATIVO</i>	18
<i>1.3.2 IMPIANTO DI PROTESI</i>	18
<i>1.3.3 OSTEOTOMIA</i>	20
<i>1.3.4 TECNICA DELLA MICROFRATTURA</i>	21
<i>1.3.5 IMPIANTO DI CONDROCITI AUTOLOGHI (ACI)</i>	22
<i>1.3.6 IMPIANTO DI SCAFFOLD ORGANICI CON CARICA CELLULARE (MACI)</i>	24
<i>1.3.7 PROSPETTIVE TERAPEUTICHE OFFERTE DALL'INGEGNERIA DEI TESSUTI</i>	26
CAPITOLO 2 - ANALISI DELLE PROPRIETÀ MECCANICHE E VALUTAZIONE DELLA BIOCOMPATIBILITÀ DI SCAFFOLD A BASE DI POLIACRILATO INGEGNERIZZATI	29
2.1 PROTOCOLLO DI REALIZZAZIONE DELLO SCAFFOLD .	30
2.2 CARATTERIZZAZIONE MECCANICA	36
2.3 STUDI SULLA CAPACITÀ DI SOSTENERE LA CRESCITA E LA FUNZIONE CELLULARE IN VITRO	42

2.4 DESCRIZIONE DEI RISULTATI A SEGUITO DELL'IMPIANTO IN VIVO	49
<i>2.4.1 IMMUNOCOMPETENTE (CD-1)</i>	50
<i>2.4.2 IMMUNODEFICIENTE (NSG)</i>	52
CAPITOLO 3 – CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE	56
CAPITOLO 4 – APPENDICE – MATERIALI E METODI	58
BIBLIOGRAFIA	62

CAPITOLO 1 - INTRODUZIONE

1.1 IL TESSUTO CARTILAGINEO

La cartilagine è un tessuto connettivo di sostegno appartenente al gruppo dei tessuti di origine mesenchimale, è caratterizzata da cellule che sintetizzano e rilasciano un cospicuo volume di matrice extracellulare. Questo materiale è così abbondante che le cellule ne risultano ampiamente separate ed esso determina, più di quanto non derivi dalle stesse cellule, le caratteristiche e proprietà del tessuto cartilagineo. La matrice extracellulare della cartilagine può essere suddivisa in due componenti: quella amorfa e la fibrillare. La prima, denominata sostanza fondamentale o gel idrofilico, è composta da complessi molecolari altamente idratibili, in grado di sopportare assai bene forze di tipo compressivo; la seconda risulta costituita da macromolecole organizzate in strutture sopramolecolari filamentose, in grado di resistere alla trazione e responsabili dell'architettura plastica finale.

La componente cellulare, che sintetizza la matrice extracellulare e ne garantisce il ricambio, è composta a sua volta da una componente autoctona, o delle cellule fisse, e una componente cellulare non autoctona, o delle cellule migranti. La prima è costituita da cellule che traggono la loro origine nel connettivo e che ne controllano la sua omeostasi, svolgono importanti funzioni di difesa da agenti patogeni; la seconda non origina nel connettivo, ma in questi migra andando a potenziare l'azione di difesa delle popolazioni cellulari autoctone.

La matrice extracellulare dei tessuti connettivi è la sede di una stretta interazione tra proteine fibrose incluse in gel acquoso di glicosaminoglicani e proteoglicani. Le proteine fibrose sono rappresentate principalmente da collagene ed elastina, ma troviamo anche fibronectina, laminina, entactina, nidogeno, condronectina e osteonectina; le molecole di collagene si associano a formare fibrille e fibre con spiccate caratteristiche meccaniche (resistenza alla trazione, elasticità); le altre sono glicoproteine fibrose che si organizzano a rete trattenendo acqua all'interno delle maglie della stessa. La fase acquosa della matrice consente la diffusione di metaboliti dal sangue alle cellule e di sostanze di rifiuto dalle cellule al sangue.

La componente amorfa si può considerare come un sistema colloidale formato da una fase disperdente acquosa e da una dispersa, costituita da una miscela di proteoglicani, formati da

catene di glicosaminoglicani legati a un *core* proteico, glicoproteine strutturali e non strutturali, enzimi e sali minerali.

I glicosaminoglicani (GAG) sono i composti chimici più importanti della componente amorfa, alla quale conferiscono gran parte delle sue proprietà metaboliche e funzionali. Tra essi troviamo l'acido ialuronico e il condroitin-4 e -6-solfato, il più diffuso nella componente amorfa, caratteristico per essere un eccellente lubrificante e molecola antiurto.

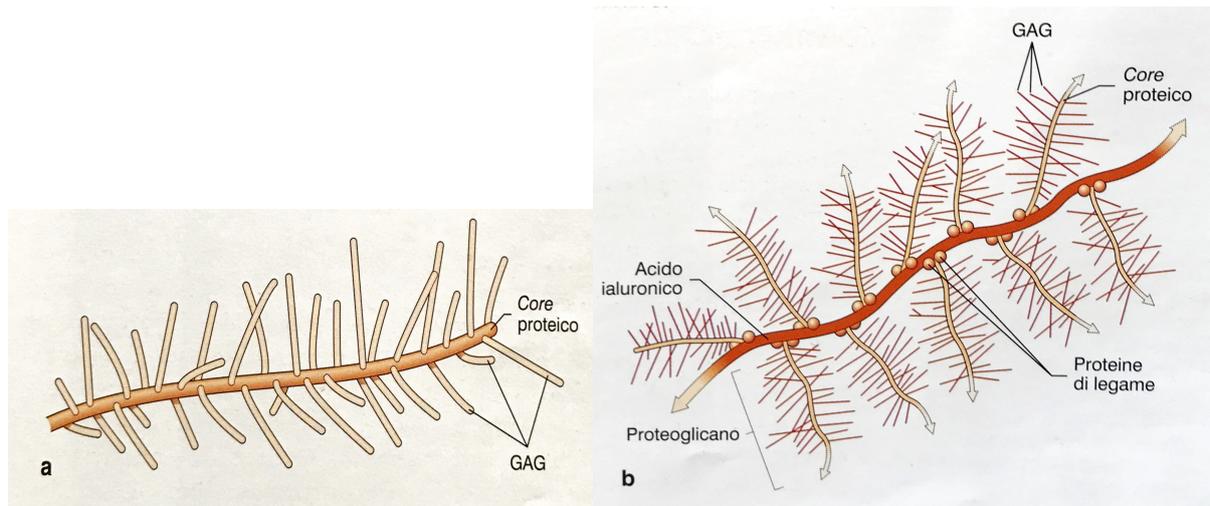


Figura 1. (a): modello tridimensionale di proteoglicano formato da diverse catene di GAG che si legano a un core proteico; (b) Aggregato di proteoglicani (aggregano) le cui subunità sono inserite ai lati opposti di un lungo filamento di acido ialuronico mediante proteine di collegamento (Colombo et al, 2014).

I proteoglicani sono molecole gigantesche, (centinaia di migliaia di dalton) e sono costituiti da una componente proteica (circa 5%) e da GAG (circa 90-95%) (Figura 1a), che interagiscono tra loro formando reticoli gelatinosi, cioè strutture aggrovigliate tridimensionali estremamente idrofile, nelle cui maglie restano legate molecole d'acqua. Infatti i GAG, a causa della loro natura acida, si dissociano esponendo numerosissimi gruppi anionici liberi che, essendo idrofili, legano altrettanto numerose molecole d'acqua. In questo modo l'acqua viene ripartita per tutta la componente amorfa, regolando così gli scambi osmotici con le popolazioni cellulari confinanti. Grazie alle caratteristiche molecolari dei proteoglicani, la rete che ne risulta funziona come un filtro molecolare, che impedisce il passaggio di alcune molecole e facilita selettivamente la diffusione di altre. Si costituisce così un eccellente sistema barriera capace di bloccare il transito a molecole dal peso molecolare compreso fra 40 e 180 kDa. Le loro funzioni

sono associate a proprietà chimico-fisiche come il trasporto di elettroliti e di acqua, la permeabilità e i fenomeni osmotici indispensabili al mantenimento di un buon microambiente. Gli aggregati sono macromolecole gigantesche formate da un *core* di acido ialuronico al quale si legano, grazie all'ausilio di proteine leganti accessorie e mediante legami ionici, le componenti proteiche di numerosi proteoglicani (Figura 1b). Gli aggregati a loro volta interagiscono con le fibre di collagene, stabilizzandone l'organizzazione tridimensionale. Nella cartilagine il risultato di questa impalcatura biologica è quello di costituire domini idratati incompressibili, adatti a svolgere compiti strutturali.

L'ultima famiglia di macromolecole che appartengono alla componente amorfa della matrice extracellulare è individuata dalle glicoproteine, presenti in misura assai inferiore rispetto ai proteoglicani, che sono molecole nella quali prevale la componente proteica (circa 80-90%) rispetto a quella glucidica (10-15%); nella cartilagine le glicoproteine hanno un ruolo importante non solo nell'interazione tra cellule adulte o embrionali contigue e nell'adesione delle cellule al loro substrato, ma anche nel fungere da raccordo fra il complesso di molecole della matrice extracellulare e le popolazioni cellulari in essa accolte, essendo così in grado di conferire resistenza alla cartilagine e a consentirle un'azione antidiffusiva.

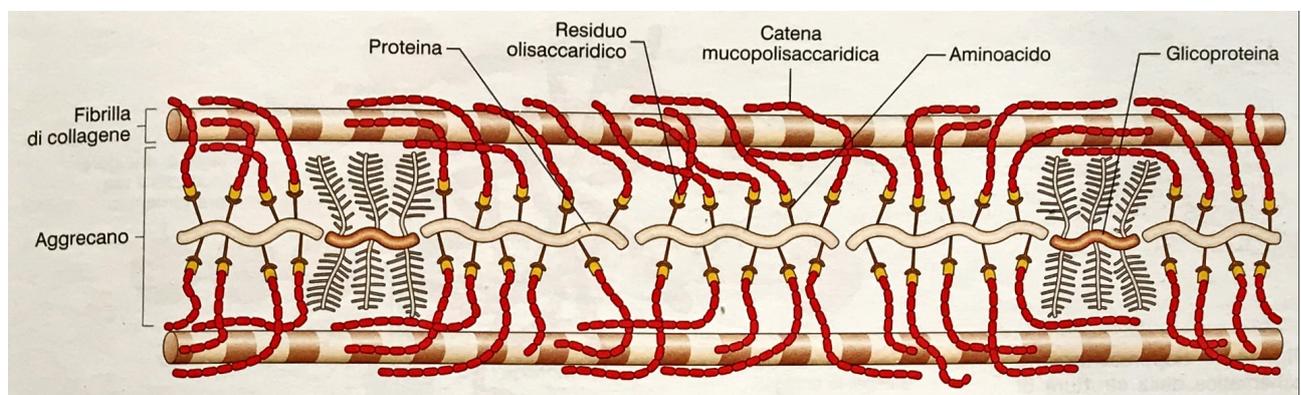


Figura 2. Rappresentazione dell'organizzazione macromolecolare di alcuni costituenti della componente amorfa della cartilagine e dei loro rapporti con la componente fibrillare (collagene) (Colombo et al, 2014).

La componente fibrillare è costituita da macromolecole proteiche quali collagene ed elastina. Il collagene è la proteina più abbondante nell'organismo, esso forma fibre extracellulari con praticamente tutti i tessuti. Ha una struttura gerarchica: a un primo livello troviamo la semplice catena peptidica (elica sinistrorsa), tre catene peptidiche formano il tropocollagene (elica

destrorsa), il tropocollagene si organizza in fibrille e le fibrille in fibre. Esistono diversi tipi di collagene, i quali vanno a caratterizzare il tipo di cartilagine, in particolare quella ialina, l'elastica e la fibrosa.

La cartilagine fibrosa è caratterizzata dalla presenza nella matrice extracellulare di una notevole quantità di collagene di tipo I che rende il tessuto più compatto e meno suscettibile a deformazioni, formando fasci ben visibili a occhio nudo; la matrice extracellulare è caratterizzata da una scarsa presenza della componente amorfa; la cartilagine fibrosa si trova nei dischi intervertebrali, dove costituisce l'anello fibroso che riveste il nucleo polposo, nella sinfisi pubica, nei labbri glenoideo e acetabolare e nei dischi e menischi intrarticolari. Le fibre di collagene hanno un andamento variabile a seconda della sede: costituiscono fasci intrecciati in varie zone della sinfisi pubica, mentre nell'anello fibroso sono orientate in fasci che formano lamelle concentriche intorno al nucleo polposo. In entrambi i casi si possono osservare zone nelle quali si nota una graduale transizione tra la cartilagine ialina, delimitante la superficie ossea, e la cartilagine fibrosa. Osservando le cellule si nota che esse sono rotondeggianti, contenute in una lacuna delimitata da una sottile capsula basofila per la presenza di proteoglicani, isolate o, più sporadicamente, raggruppate in gruppi isogeni, spesso disposti in file parallele.

La cartilagine elastica si caratterizza per la presenza di grandi quantità di elastina associata a fibre di collagene di tipo II, che le conferiscono elasticità e flessibilità, formando fibre molto sottili; all'analisi al microscopio ottico si può notare che la sua organizzazione è molto simile a quella della cartilagine ialina, anche se, in varie sedi, la sostanza intercellulare è presente in minore quantità e i condrociti si ritrovano, pertanto, più ravvicinati tra loro. Questi ultimi presentano spesso un grosso vacuolo al loro interno, che spinge il nucleo ed il citoplasma alla periferia della cellula, che assume la caratteristica forma di anello con castone. Utilizzando metodiche di indagine istologica, atte a evidenziare l'elastina, è possibile notare la presenza di una rete tridimensionale di fibre che permea tutta la matrice intercellulare e che si presentano più spesse e più abbondanti nella porzione centrale e più sottili in quella periferica. La cartilagine elastica è ampiamente presente nell'orecchio esterno, nell'epiglottide e in alcune aree cartilaginee della laringe.

Nella cartilagine ialina troviamo in grandi quantità il collagene di tipo II formato da fibrille molto sottili che presentano 3 filamenti identici, il collagene conferisce alle strutture

cartilaginee la capacità di resistere molto bene alla trazione e dona elasticità ai tessuti. La presenza di collagene di tipo I caratterizza il tessuto cartilagineo per una spiccata tendenza fibrotica, più compatta e meno suscettibile a deformazioni, e può essere indice di invecchiamento della cartilagine. Osservata al microscopio ottico la cartilagine elastica è caratterizzata dalla presenza di una componente amorfa abbondante, ricca di glicoproteine e soprattutto di proteoglicani; dispersi nella sostanza intercellulare si trovano i condrociti avvolti da una capsula basofila. Poiché la cartilagine è un connettivo non vascolarizzato, il nucleo cartilagineo è delimitato da un connettivo fibroso con funzione trofica e condrogenica, il pericondrio. Siccome la nutrizione delle sue cellule è limitata dalla distanza che le sostanze nutritive e l'ossigeno devono percorrere per raggiungere i condrociti, la cartilagine non assume mai un grande spessore. La cartilagine si origina durante le prime settimane di vita intrauterina da cellule mesenchimali che successivamente acquistano specificamente tutte le caratteristiche di cellule secernenti (esteso reticolo endoplasmatico rugoso e apparato di Golgi) differenziandosi in condroblasti. Queste cellule iniziano la produzione di matrice cartilaginea (proteoglicani e collagene di tipo II). Inoltre, poiché i proteoglicani hanno una consistenza gelatinosa e la loro diffusione è lenta, le cellule rimangono imprigionate all'interno di lacune scavate e incapsulate nella matrice stessa, venendosi così a costituire la capsula basofila delle cellule cartilaginee ormai mature che prendono il nome di condrociti; questi hanno perso le loro caratteristiche di cellule secernenti e hanno assunto quelle di cellule quiescenti. Nella zona centrale della cartilagine i condrociti hanno forma prevalentemente rotondeggiante con citoplasma meno basofilo rispetto ai condroblasti e presentano un vacuolo centrale ricco di materiale paraplasma e di glicogeno. I condroblasti, e in alcuni casi i condrociti, possono aumentare di numero dividendosi per mitosi una o più volte costituendo gruppi di tre-cinque cellule in media all'interno della stessa capsula: essendo la matrice cartilaginea poco fluida, a causa della presenza di proteoglicani che si trovano allo stato colloidale di gel, le cellule, pur separandosi completamente fra loro, non si allontanano, rimanendo ravvicinate lungo la superficie di divisione e costituendo quindi i cosiddetti gruppi isogeni o cloni cellulari. Nella zona della cartilagine circostante (zona intermedia), i condrociti appaiono sempre rotondeggianti, ma non sono raccolti in gruppi isogeni. Nella zona più esterna (zona tangenziale), a ridosso del pericondrio, le cellule, più abbondanti rispetto alla matrice, diventano via via appiattite, diradandosi quindi nel pericondrio. La diversa distribuzione delle cellule nel tessuto cartilagineo incide notevolmente sulla distribuzione dei proteoglicani secreti, quindi sulla basofilia; a prova di tale affermazioni si faccia riferimento alle tecniche istologiche e istochimiche (metacromasia e colorazione con Alcian blu) atte a evidenziare tali molecole

nelle diverse zone della matrice; così la basofilia è massima nella zona immediatamente vicina alle cellule, la cosiddetta *capsula*; diminuisce pur rimanendo elevata, nelle zone di matrice vicine alle cellule, in particolare nelle *aree territoriali interne*; diminuisce sensibilmente fino ad annullarsi nelle aree distanti dalle cellule, le cosiddette *aree territoriali esterne* (o *interterritoriali*) (Figura 3).

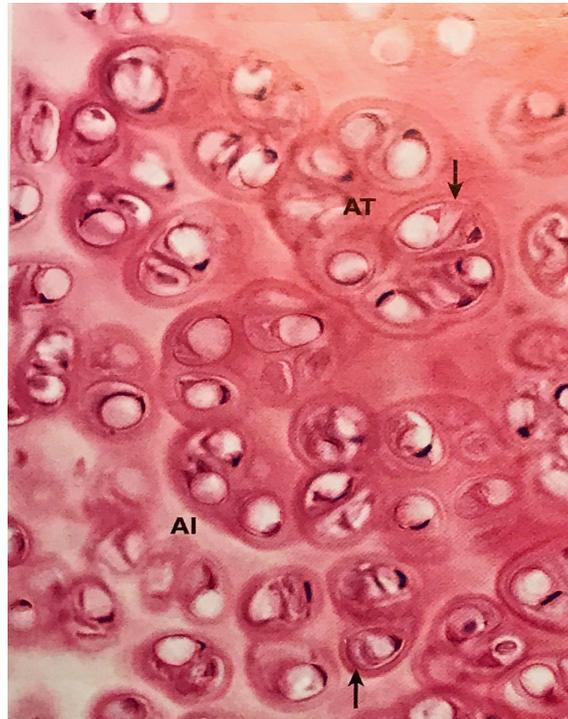


Figura 3. Immagine raffigurante la distribuzione non uniforme dei vari componenti, così come indicato dalle diverse tonalità di colore. Le zone a predominanza di proteoglicani sono la capsula (frecce) e le aree territoriali (AT), nelle quali la matrice si presenta basofila; le zone ricche di proteine basiche e collagene sono le aree territoriali (AT), nella quali si nota una certa acidità. Colorazione: ematossilina-eosina (Colombo et al, 2014).

Al microscopio ottico, in preparati fissati e colorati con metodiche tradizionali (ematossilina-eosina, Alzan-Mallory) lo spazio tra i vari condrociti appare privo della componente fibrillare; questo perché le fibre del collagene non sono raggruppate in fasci e presentano lo stesso indice di rifrazione della componente amorfa, cosicché le due porzioni non possono essere visivamente separate.

Poiché la componente fibrillare non può essere osservata al microscopio ottico, la matrice extracellulare appare astrutturata e ciò consente di classificarla agevolmente come cartilagine ialina. Tuttavia, l'impiego di metodiche appropriate, come l'estrazione preventiva dei

proteoglicani (con l'uso di tripsina o alcali diluiti) e l'uso del microscopio a luce polarizzata, consente l'osservazione delle fibre di collagene anche al microscopio ottico.

Utilizzando invece la microscopia elettronica è possibile conoscere precisamente l'andamento delle fibre di collagene che non sono organizzate in fasci e non hanno la tipica trama di quelle presenti nel tessuto connettivo propriamente detto, o ne sono addirittura prive. Inoltre, esse presentano un diametro variabile in base alla zona della cartilagine considerata: nella zona più periferica hanno un diametro minore (15-30 nm) e formano una rete tridimensionale lassa, mentre nella zona centrale il loro diametro aumenta (circa 45 nm) e le si trova orientate in maniera da poter resistere alle pressioni o alle trazioni che la cartilagine può ricevere.

La cartilagine ialina impegnata nel rivestimento delle superfici scheletriche, in sede delle articolazioni mobili, è detta cartilagine articolare; essa è sprovvista di pericondrio, pertanto la sua funzione trofica, di nutrimento ed eliminazione delle sostanze di scarto, è imputata al liquido sinoviale che la bagna. Il liquido sinoviale è un filtrato plasmatico contenente acido ialuronico, che agisce come lubrificante viscoso e fornisce nutrimento alla cartilagine ialina articolare. La morfologia e la distribuzione dei condrociti variano in dipendenza della loro posizione, determinando la formazione di strati diversi talora chiaramente evidenziabili; così, nello strato delimitante la cavità articolare, detto *strato tangenziale*, i condrociti sono allungati e disposti con l'asse maggiore parallelo alla superficie libera; nello *strato intermedio*, essi hanno una forma globosa e nello strato più interno detto *strato radiale*, sono riuniti in gruppi isogeni paralleli, orientati perpendicolarmente alla superficie. Le principali differenze rispetto alle altre tipologie di cartilagine riguardano la distribuzione delle fibre di collagene organizzate in modo da formare un intreccio tridimensionale collegato ai proteoglicani. La cartilagine articolare, grazie alla sua componente intercellulare, consente, quindi, alle articolazioni di sopportare pressioni meccaniche provenienti da varie direzioni; inoltre, grazie alla sua superficie liscia e al liquido sinoviale, i movimenti articolari avvengono senza frizioni.

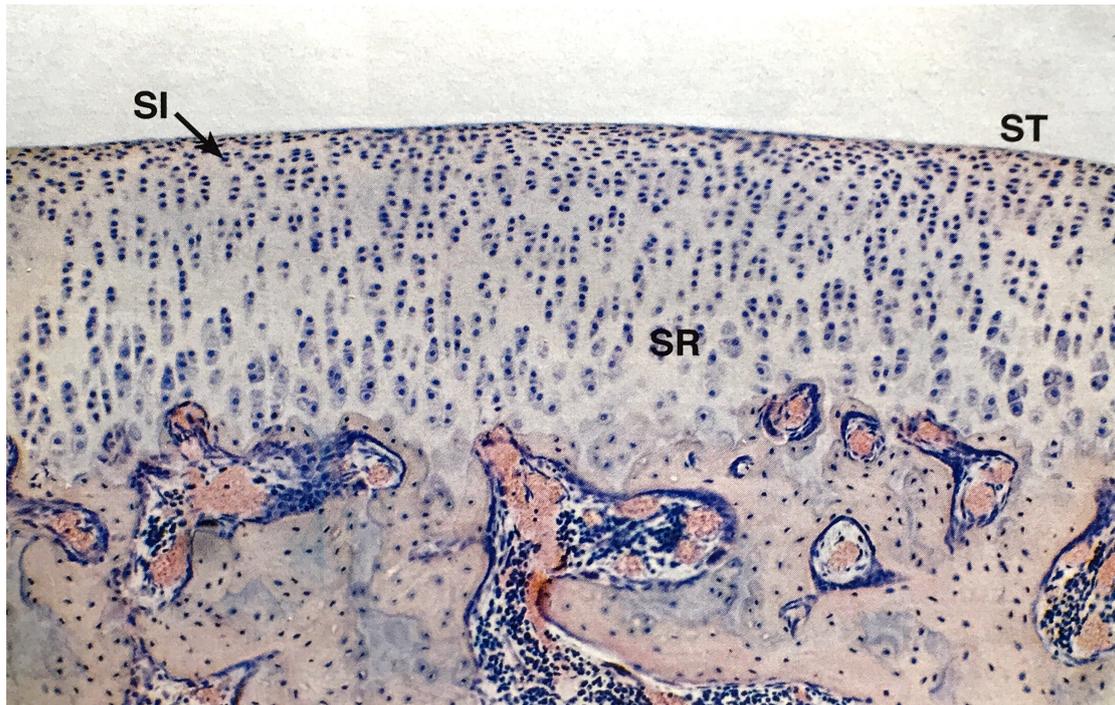


Figura 4. Cartilagine ialina articolare. Si noti la mancanza del pericondrio e la disposizione caratteristica dei condrociti nei vari strati che la compongono: strato tangenziali (ST), intermedio (SI) e radiale (SR). Colorazione: ematossilina-eosina (Colombo et al, 2014).

Dall'analisi istologica e strutturale del tessuto cartilagineo, riportata sopra, è facile individuare le sue funzioni principali: esso interviene in primo luogo nella riduzione dello sfregamento articolare, evitando il contatto tra le superfici ossee, e dunque la loro possibile usura superficiale, e mantenendo i tessuti limitrofi (ossei e legamentosi) intatti e in buona salute; fornisce un rivestimento ottimale, ampliando la superficie di contatto e di interazione tra i vari segmenti corporei in favore della stabilità articolare; dal punto di vista meccanico permette una ridistribuzione dei carichi, in particolare quelli verticali (statici-posturali, dinamici-di movimento) funzionale al mantenimento di un corretto assetto scheletrico. È interessante notare come nel tessuto cartilagineo articolare la componente fibrillare si disponga seguendo direzioni differenti in base alla profondità (Figura 5): a un primo livello, quello più esterno, le fibre appaiono parallele alla superficie articolare, condividendo i carichi; a un livello di media profondità le fibre incominciano ad apparire sempre più casualmente distribuite, rendendo il tessuto maggiormente incline a un comportamento isotropo; a un livello più profondo le fibre di collagene appaiono perpendicolari alla superficie articolare; infine nello strato più interno si trova la cartilagine mineralizzata nella quale le fibre di collagene appaiono robuste e collegate al tessuto osseo.

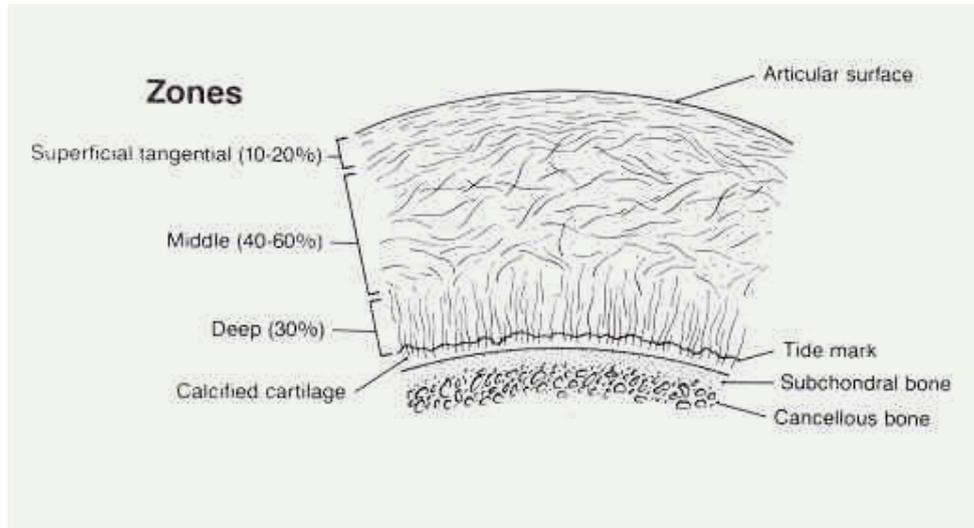


Figura 5. Distribuzione delle fibre di collagene nella cartilagine articolare.

Questa disposizione costituisce un'ingegnerizzazione naturale del tessuto cartilagineo, in quanto dimostra complessivamente buone caratteristiche meccaniche per tutte le direzioni di carico.

1.2 ACCENNI ALL'OSTEOARTROSI

La cartilagine sollecitata da stimoli esterni è in grado di rimodellarsi. In particolare le forze meccaniche inducono una deformazione della matrice extracellulare, le tensioni generate vengono captate dai condrociti i quali presentano diverse proteine recettoriali quali meccanocettori, canali voltaggio-dipendenti e chemiocettori in grado di captare alterazioni provenienti dalla matrice. La deformazione dei condrociti produce una risposta cellulare che ha come effetto la modificazione dell'ambiente pericellulare attraverso l'aumento della concentrazione dei proteoglicani, e variazioni della concentrazione ionica e del pH. L'aumento dei proteoglicani nella matrice si traduce in un aumento di gruppi anionici liberi che, essendo idrofili, legano ulteriori molecole d'acqua permettendo un incremento netto della componente amorfa in termini di volume e la conseguente risposta meccanica alla sollecitazione iniziale. Si induce in questo modo un rimodellamento della matrice extracellulare.

Tuttavia nelle zone maggiormente sollecitate, come ad esempio in prossimità delle articolazioni dove le strutture ossee sono ricoperte da cartilagine ialina articolare, si possono determinare lesioni della cartilagine. L'assenza di apporto sanguigno, drenaggio linfatico e innervazione, è una condizione determinante nella possibilità di insorgenza di patologie di tipo degenerativo. L'acqua (70%) e i proteoglicani (8%) forniscono alla cartilagine ialina la capacità di resistere alla compressione e svolgono un ruolo importante nel ridurre l'attrito. I condrociti sintetizzano la matrice e ne degradano enzimaticamente le diverse componenti. I condrociti secernono gli enzimi digestivi in forme inattive e arricchiscono la matrice di enzimi inibitori. Le malattie che distruggono la cartilagine articolare agiscono attivando gli enzimi catabolici, riducendo la produzione degli inibitori; in tal modo viene accelerato il tasso di degradazione della matrice. Citochine come l'Interleukina-1 (IL-1) e il Fattore di Necrosi Tumorale (TNF), che provengono da condrociti, sinoviociti, fibroblasti e cellule infiammatorie, innescano il processo di degradazione. La distruzione della cartilagine articolare, messa in atto da cellule di quel distretto, è un importante meccanismo in molte patologie articolari.

Possiamo classificare i danni alla cartilagine in base alla profondità della lesione subita utilizzando lo standard International Cartilage Repair Society (ICRS):

- lesione di grado 0 (normale);
- lesione di grado 1 (quasi normale): generalmente superficiale, può essere caratterizzata da lievi rientranze, fessure superficiali e crepe;
- lesione di grado 2 (anormale): caratterizzata da un'estensione della lesione inferiore al 50% dello spessore della cartilagine;
- lesione di grado 3 (molto anormale): i danni alla cartilagine si estendono oltre al 50% dello spessore, possono raggiungere lo strato della cartilagine calcificata fermandosi in prossimità dell'osso subcondrale formando vescicole e gravi processi infiammatori;
- lesione di grado 4 (gravemente anormale): la lesione interessa anche l'osso subcondrale.

L'osteoartrosi, osteoartrite (OA), o artropatia degenerativa, è caratterizzata dalla degenerazione della cartilagine che provoca il cedimento strutturale e funzionale delle articolazioni sinoviali. È la più comune patologia articolare. Sebbene il termine indichi una patologia infiammatoria, essa è considerata una patologia intrinseca della cartilagine, nella quale i condrociti rispondono a stress biochimici e meccanici che portano alla degradazione della matrice.

Nella grande maggioranza dei casi, l'OA compare insidiosamente, senza apparente causa iniziale, come un fenomeno legato all'invecchiamento (*artrosi idiopatica o primaria*). In questi casi la malattia è oligoarticolare (colpisce poche articolazioni), ma può anche essere generalizzata. Nel 5% circa dei casi, l'OA compare nei soggetti più giovani che presentano condizioni predisponenti, per esempio deformità articolare, un precedente danno articolare o una malattia sistemica di base che mette a rischio le articolazioni, come diabete, ocronosi, emocromatosi o marcata obesità. In questo contesto la malattia è detta OA *secondaria*. Il sesso ha una certa influenza nella distribuzione. Nelle donne sono in genere più colpite le ginocchia e le mani, mentre negli uomini l'anca.

Le lesioni dell'OA derivano dalla degenerazione della cartilagine articolare e dalla sua riparazione disorganizzata. Sebbene storicamente OA fosse considerata un processo inevitabile di usura e degenerazione, questa definizione è riduttiva, dato che la malattia implica effettivamente dei cambiamenti patologici complessi nei condrociti e nella matrice.

Le modifiche a carico dei condrociti possono essere suddivise in tre fasi: (1) danno ai condrociti, legato a fattori genetici e biochimici; (2) OA precoce, nella quali i condrociti proliferano e secernono mediatori dell'infiammazione, collagene, proteoglicani e proteasi che interagiscono per rimodellare la matrice cartilaginea e avviare le alterazioni infiammatorie secondarie nella membrana sinoviale e nell'osso subcondrale; (3) OA tardiva, nella quale il danno ripetuto e l'infiammazione cronica portano a: scomparsa dei condrociti, marcata perdita di cartilagine ed estese alterazioni dell'osso subcondrale. Ogni componente extracellulare della cartilagine articolare può essere potenzialmente colpito dall'OA. Il collagene di tipo II è degradato dalle metalloproteasi della matrice (enzimi che necessitano di ioni zinco come cofattori e possono degradare localmente la matrice extracellulare permettendo alle cellule di attraversarla). Sebbene i condrociti sintetizzino e secernano continuamente proteoglicani durante la progressione della malattia, la degradazione alla fine supera la sintesi e la composizione dei proteoglicani si modifica. Le cellule infiammatorie sono poche, ma vengono coinvolti nell'OA le citochine e i fattori diffusibili associati ad altre condizioni infiammatorie, in particolare il Fattore di Crescita Tissutale (TGF β , che induce le metalloproteasi della matrice), il TNF, prostaglandine e ossido nitrico.

Influenze ambientali e genetiche contribuiscono alla patogenesi dell'OA. I principali fattori ambientali riguardano l'invecchiamento e lo stress biomeccanico. L'associazione con l'invecchiamento è evidente; la prevalenza dell'OA aumenta esponenzialmente oltre i 50 anni e circa il 40% delle persone di età superiore ai 70 anni ne è affetto. Gli studi su famiglie e gemelli hanno suggerito che il rischio di OA dipende da diversi geni, ciascuno con il suo piccolo

effetto. Gli studi dei geni candidati e gli studi di associazione sull'intero genoma mostrano che l'OA è geneticamente eterogenea: non ci sono sequenze del genoma indice della malattia ma esse variano da individuo a individuo.

Nelle prime fasi dell'OA, i condrociti proliferano e formano aggregati (i cosiddetti cloni). Nello stesso tempo il contenuto di acqua della matrice aumenta, mentre la concentrazione di proteoglicani diminuisce. Nello strato superficiale, la normale disposizione orizzontale delle fibre di collagene di tipo II viene interrotta e aumentano le fessure e le brecce sulla superficie articolare che assume aspetto granulare, di consistenza molle. Inoltre, i condrociti muoiono e frammenti di cartilagine a tutto spessore si distaccano. I frammenti di cartilagine e di osso subcondrale distaccatisi cadono nell'articolazione, formando i corpi mobili. L'osso subcondrale esposto diviene la nuova superficie articolare e l'attrito con la superficie opposta leviga e lucida l'osso esposto, conferendogli l'aspetto di avorio levigato (osso eburneo).



Figura 6. Superficie articolare eburnea che espone l'osso subcondrale (1), cisti subcondrale (2) e cartilagine articolare residua (3) (Kumar, 2015).

Si hanno quindi indurimento e sclerosi (ispessimento osseo irreversibile) dell'osso spongioso sottostante. Sono comuni piccole fratture dell'osso articolare e gli spazi vuoti creati dalle fratture consentono al liquido sinoviale di penetrare nelle regioni subcondrali con un meccanismo a valvola a senso unico. Il liquido così raccolto aumenta di volume, andando a costituire cisti a parete fibrosa. Si formano osteofiti (escrescenze ossee) a forma di fungo sui margini della superficie articolare e questi sono ricoperti da fibrocartilagine e cartilagine ialina, che ossificano gradualmente. La membrana sinoviale è in genere lievemente congesta e fibrotica e può contenere rare cellule dell'infiammazione cronica.

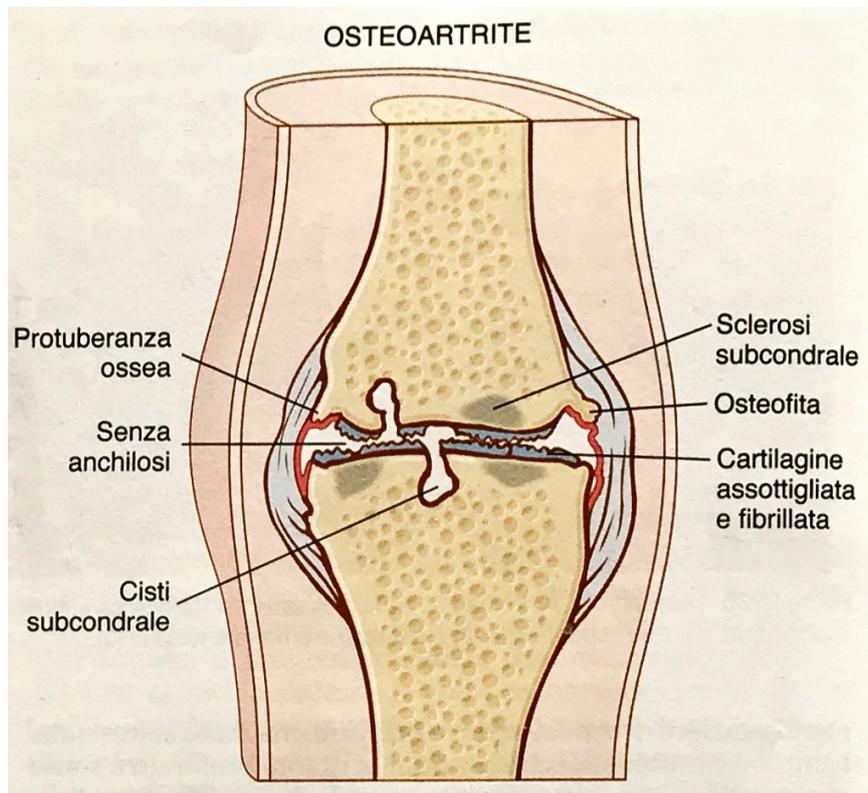


Figura 7. Aspetti morfologici dell'OA (Kumar, 2015).

L'OA è caratterizzata generalmente da asintomaticità fino ai 50 anni. Se un paziente giovane ha evidenti manifestazioni di artrosi, è bene ricercare una causa sottostante. I sintomi caratteristici comprendono: dolore profondo e sordo che peggiora con il movimento articolare, rigidità mattutina, scrosci articolari e limitazioni dell'ampiezza del movimento. La presenza di osteofiti nei forami intervertebrali determina la compressione delle radici nervose cervicali e lombari, con dolore radicolare, spasmo muscolare, atrofia muscolare e deficit neurologici. Tipicamente sono colpite solo una o poche articolazioni, le più frequentemente colpite sono le ginocchia, le vertebre lombari inferiori e cervicali, le articolazioni interfalangee prossimali e distali delle dita, le prime articolazioni carpometacarpali e le prime tarsometatarsali. Polsi, gomiti e spalle sono generalmente risparmiati.

Con il tempo si possono verificare deformità articolari, ma a differenza dell'artrite reumatoide non si avrà la fusione articolare. Il livello di gravità della malattia rilevata radiograficamente non correla bene il dolore e la disabilità. Al momento non si dispone di adeguati mezzi di prevenzione per l'OA primaria e non esiste un modo efficace di arrestare la sua progressione definitivamente.

1.3 TRATTAMENTO TERAPEUTICO

Nel caso di lesioni acute o croniche della cartilagine è possibile intervenire tenendo conto: della causa scatenante e della gravità della lesione nonché dalla sua estensione, da parametri propri del paziente (come età e presenza di ulteriori patologie) e ovviamente in relazione alla sede della zona lesionata.

Le lesioni cartilaginee sono molto difficili da trattare a causa del limitato potenziale intrinseco di guarigione del tessuto, dovuto sia alla mancanza di vascolarizzazione, sistema linfatico e nervoso, sia alla presenza di poche cellule specializzate in grado di promuovere la rigenerazione. Per tali ragioni le lesioni cartilaginee determinano l'alterazione irreversibile dell'anatomia del tessuto e della sua funzionalità e, se non trattate correttamente, possono condurre a una degenerazione di tipo artrosico. È importante tenere presente la tipologia di cartilagine sulla quale si intende operare in quanto, dal punto di vista biologico, la cartilagine ialina articolare si differenzia dalle altre per l'assenza del pericondrio, che viene sostituito dal liquido sinoviale. Il pericondrio che avvolge la cartilagine ha infatti la funzione di provvedere al nutrimento della cartilagine (funzione trofica) e svolge un ruolo importante nel suo accrescimento. Lo strato più interno del pericondrio mantiene la capacità condrogenica, continuando a produrre cellule che si differenziano in condroblasti e poi in condrociti, cosicché l'accrescimento della cartilagine procede dalla periferia verso il centro (accrescimento per apposizione). Un altro tipo di accrescimento che può osservare in tutte le cartilagini, compresa quella articolare, è dovuto al fatto che i condrociti, pur racchiusi all'interno della capsula, possono ancora dividersi una o più volte, determinando la formazione di cloni cellulari (accrescimento interstiziale). Proprio per l'assenza dell'accrescimento per apposizione, la cartilagine articolare è la più soggetta a lesioni degenerative che necessitano di essere diagnosticate e curate.

Nelle lesioni alla cartilagine di un'articolazione, l'approccio terapeutico può essere conservativo, se l'infortunio è molto lieve, oppure chirurgico, se l'infortunio è moderato-grave.

1.3.1 APPROCCIO CONSERVATIVO

L'approccio conservativo è caratterizzato dalla non invasività: generalmente le lesioni trattate sono superficiali. I trattamenti non chirurgici, come può essere il riposo, la dieta, il controllo del peso ed esercizi mirati di fisioterapia e riabilitazione, contribuiscono al controllo della sintomatologia e, al potenziamento delle capacità funzionali del soggetto, pur non fornendo un rimedio a lungo termine. Pertanto, in presenza di un danno cartilagineo il più delle volte si ricorre a interventi chirurgici. Ulteriori cure non invasive possono consistere nell'utilizzare infiltrazioni di acido ialuronico, indicate particolarmente per il trattamento dell'osteoartrite come cura per alleviare la sintomatologia, e l'assunzione di antinfiammatori non steroidei.

1.3.2 IMPIANTO DI PROTESI

In seguito a traumi importanti o a patologie degenerative che possono coinvolgere cartilagine e tessuti circostanti (osseo, connettivo) se vi è la perdita completa della funzionalità articolare, o comunque danni evidenti che possono compromettere la stabilità di altre articolazioni e impedire il movimento, esiste la possibilità di sostituire l'articolazione colpita con protesi, selettivamente progettate per far fronte alla necessità del paziente e soprattutto ponderate in base al tipo e all'intensità dell'attività svolta. Questo tipo di approccio per il trattamento di danni cartilaginei generalmente viene impiegato quando la lesione è particolarmente grave e l'intera capsula articolare è coinvolta.

Il trattamento che si utilizza nella progettazione di una protesi è di tipo *patient specific*, cioè persegue un criterio progettuale che tenga conto di parametri antropometrici, quindi geometrico-strutturali, del paziente, e funzionali legati all'attività che viene svolta. Per esempio, considerando lesioni che necessitano una protesi d'anca, si procede con sostituti basati su tecnologia e richiedenti tipologia di impianto differenti nel caso nel quale il paziente coinvolto sia un adolescente o un anziano, uno sportivo o un sedentario. Si cercherà comunque di puntare su un processo di osteointegrazione, impiantando protesi non cementate e realizzando la superficie di contatto il più estesa possibile. Per farlo è necessario un solco femorale ben calibrato e opportuno alla geometria della protesi, per evitare moti relativi tra l'impianto e il femore che produrrebbero l'infossamento della protesi. Inoltre non devono essere presenti punti di non contatto nei quali non verrebbero trasmesse le sollecitazioni e con un fenomeno di riassorbimento osseo e tensioni molto elevate nei punti di contatto residui, che potrebbero

portare nel corso del tempo allo snervamento del tessuto. Nel caso di protesi non cementate, riveste un ruolo fondamentale l'utilizzo di una buona rifinitura superficiale dello stelo, che può essere rugosa per aumentare l'attrito e quindi l'adesione all'osso oppure presentare pori o fori che permettono all'osso di svilupparsi all'interno, ancorando lo stelo al tessuto circostante. Infine, un'altra tipologia di lavorazione superficiale consiste nel deposito di uno strato di idrossiapatite, un biomateriale bioattivo che tende spontaneamente a formare legami con l'osso che lo ricopre. L'idrossiapatite artificiale è formata da un fitto reticolo di grani cristallini di forma rotondeggiante rispetto al profilo aghiforme dei grani di quella naturalmente presente nell'osso; essa viene riconosciuta dal tessuto osseo e va incontro a un processo di penetrazione nel tessuto organico.

Nel caso di un soggetto anziano coinvolto in lesioni gravi alla cartilagine e all'articolazione coxo-femorale, che conduca uno stile di vita per lo più sedentario, o con patologie di tipo osteoporotico, la terapia attualmente praticabile prevede l'utilizzo di protesi cementate. In particolare tramite raspa chirurgica viene realizzato un solco più esteso, rispetto al caso di quelle non cementate, per consentire l'inserimento del cemento ortopedico. Questo è formato da monomeri di MMA (metil-metacrilato) con l'aggiunta di radicali liberi che per addizione polimerica consentono di ottenere il PMMA (poli-metil-metacrilato). In questo caso, per permettere una maggiore zona di contatto favorendo una normale distribuzione dei carichi e massima trasmissione alle strutture ossee sottostanti, la scelta della protesi ricade su modelli aventi uno stelo liscio, in grado di essere perfettamente ancorato ed inserito nella fessura contenente il cemento ortopedico. Talvolta il PMMA viene arricchito con molecole radiopache di BaSO₄ (solfato di bario): in questo modo viene garantita la possibilità di monitorare lo stato dell'articolazione nel tempo e soprattutto se l'intervento è riuscito a fornire il giusto assetto al paziente, permettendogli di compiere gli adeguati movimenti articolari e rispettando i gradi di libertà e di vincolo propri dell'articolazione coxo-femorale.

L'invasività associata all'innesto e all'eventuale rimozione costituiscono un rischio non trascurabile in fase di scelta della terapia da utilizzare. Sebbene la sostituzione in toto di un'articolazione permetta un miglioramento delle condizioni articolari nel lungo periodo, è possibile che si verifichino fenomeni di corrosione, con consumo della superficie e un conseguente aumento delle tensioni generate nella struttura che più facilmente porteranno a un cedimento per fatica. Inoltre i materiali utilizzati nell'interfaccia tra la testina e *liner*, sono i più soggetti all'usura e al distaccamento particellare; i detriti formati contribuiscono a una possibile erosione e aumento degli attriti al punto tale da compromettere la stabilità della struttura. Altri possibili inconvenienti associati all'artroplastica possono riguardare, nel caso delle protesi

cementate, la polimerizzazione del cemento ortopedico per l'ancoraggio, una reazione che libera calore, raggiungendo i 42°C con rischio di necrosi dei tessuti limitrofi. I cementi acrilici, inoltre tendono spontaneamente a decomporsi riducendo progressivamente la propria capacità coesiva; in caso di sostituzione di una protesi di questo genere l'intervento sarebbe traumatico.

1.3.3 OSTEOTOMIA

Attre terapie chirurgiche, che si diversificano dall'artroplastica, utilizzate per il trattamento di lesioni alla cartilagine possono essere per esempio la cosiddetta *pulizia dell'articolazione* o osteotomia. Particolarmente indicata quando la lesione della cartilagine ne altera significativamente la morfologia, il tessuto lesionato può manifestare bordi taglienti e asperità. L'intervento è associato all'artroscopia, servendosi di uno strumento (artroscopio) dotato di telecamera e fonte luminosa, inserito mediante piccole incisioni in prossimità dell'articolazione, è possibile effettuare operazioni di levigatura o rimozione delle imperfezioni sviluppate dalla cartilagine articolare a seguito dell'infortunio. In caso di OA può essere una tecnica molto utile per eliminare gli osteofiti o trattare le zone che presentano anchilosi fibrosa/ossea.

1.3.4 TECNICA DELLA MICROFRATTURA

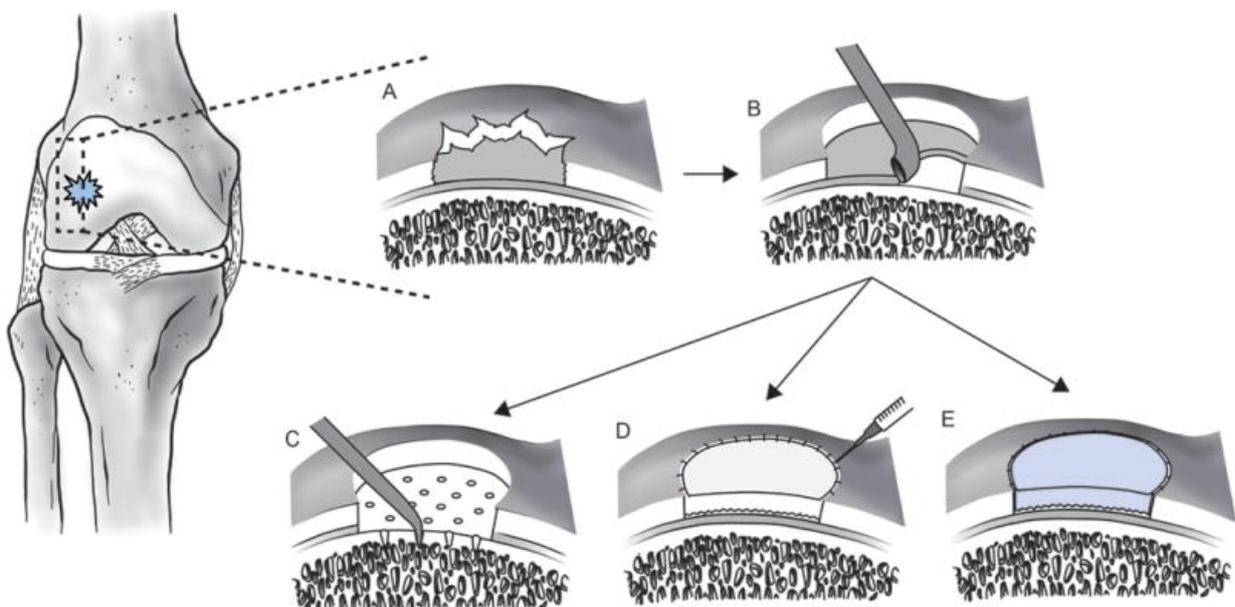


Figura 8. *Tecniche di rigenerazione della cartilagine: (A) lesione condrale a tutto spessore; (B) pulizia e levigatura dell'osso e del connettivo circostante; (C) microfrattura; (D) autologous chondrocyte implantation (ACI); (E) matrix-assisted autologous chondrocyte implantation (MACI) (Makris et al, 2014).*

Un'altra importante terapia chirurgica è rappresentata dalla tecnica della microfrattura. Questo intervento ha in linea generale lo scopo di indurre la rigenerazione del tessuto tramite la stimolazione dell'osso subcondrale e la migrazione delle cellule pluripotenti, in particolare le cellule staminali mesenchimali, contenute nel midollo osseo al fine di determinare la formazione di tessuto riparativo nella zona della lesione. Tali tecniche portano a un miglioramento in termini di riduzione del dolore e di incremento della motilità, ma conducono alla formazione di tessuto di tipo fibroso che conferisce una minore resistenza meccanica. La tecnica di microfrattura consiste nell'effettuare una lesione focalizzata dell'osso subcondrale a tutto spessore raggiungendo l'osso corticale compatto (Figura 8A); servendosi di una raspa è opportuno levigare e smussare il tessuto osseo, assottigliandolo nella zona precedentemente lesionata (Figura 8B). Inoltre si pratica il rimodellamento del tessuto cartilagineo e connettivo circostante per garantire margini sani e stabili, favorendo così l'integrazione tra il tessuto ospite e il tessuto neoformato. Tramite l'utilizzo di un punteruolo a 45° vengono creati dei canali (Figura 8C), distanziati 3-4 mm e profondi 3-4 mm, per penetrare l'osso subcondrale, in particolare lo strato più esterno corticale, raggiungendo il tessuto trabecolare spugnoso. In questo modo le cellule staminali mesenchimali (CSM) contenute nel midollo osseo, sono in grado di migrare nella depressione cartilaginea che è stata opportunamente creata e nel tempo assumere le caratteristiche di cellule progenitrici, specializzandosi in seguito in condrociti, in grado di secernere matrice. Tuttavia la tecnica della microfrattura porta alla formazione di fibrocartilagine, in quanto la matrice è ricca di collagene di tipo I, andando ad incidere notevolmente sulla rigidità complessiva del tessuto; l'effetto ottenuto si ripercuote significativamente sulla biomeccanica e biochimica della cartilagine che appare inferiore rispetto a quella ialina articolare. Uno studio, effettuato su più pazienti sottoposti a questo genere di terapia, ha evidenziato la mancanza di robustezza meccanica fornita dalla cartilagine ialina, nella zona che presenta il nuovo tessuto originato da cellule staminali. Una maggiore vulnerabilità alle tensioni durante il movimento e in genere il deterioramento del neo tessuto si manifesta dopo 18-24 mesi dall'intervento chirurgico, facendo riferimento alla standardizzazione dell'ICRS (P.C. Kreuz et al, 2006). Tale deterioramento è particolarmente evidente nel trattamento di lesioni di grandi dimensioni. Inoltre, a causa della penetrazione dell'osso subcondrale, gli osteofiti intralesionali si sviluppano nel 20-50% dei casi e il fenomeno

del rimodellamento osseo, che fa seguito alle sollecitazioni impresse per realizzare il solco, determina la formazione di asperità o escrescenze ossee. Per realizzare questo tipo di intervento è necessario conoscere parametri specifici sulla base dei quali seguire le opportune operazioni. Tali fattori possono essere dimensione, profondità e posizione della lesione, nonché età e indice di massa corporea (IMC). Sebbene la FDA e molti clinici considerino ancora la microfrattura come il *gold standard* per la riparazione della cartilagine, studi prospettici comparativi mostrano che questa tecnica potrebbe ritardare la degenerazione della cartilagine solo nel breve termine; generalmente a distanza di più di 5 anni dall'intervento chirurgico, ci si può aspettare un fallimento del trattamento indipendentemente dalle dimensioni della lesione. Dunque, sebbene questo approccio sia frequentemente impiegato in tutto il mondo, i suoi difetti hanno spinto verso la realizzazione di ulteriori soluzioni di intervento alle lesioni condrali.

1.3.5 IMPIANTO DI CONDROCITI AUTOLOGHI (ACI)

Una terapia emergente è rappresentata dall'impianto di condrociti autologhi (ACI). La strategia terapeutica consiste nel prelievo artroscopico di tessuto cartilagineo sano per l'intero spessore da una zona di non carico dell'articolazione attraverso una *punch biopsy*. Quest'ultima si effettua con una lama circolare, dal diametro che oscilla da 1 a 8 mm; la lama, che è attaccata ad uno strumento a forma di penna, è ruotata attraverso l'epidermide, il derma e il grasso sottocutaneo producendo un *core* cilindrico di tessuto. La popolazione di condrociti prelevata viene successivamente espansa in vitro producendo fino a circa 50 milioni di cellule. Durante una seconda operazione si pratica un solco focalizzato in prossimità della regione da trattare, raggiungendo lo strato dell'osso subcondrale (Figura 8A). In seguito si attua la levigatura della lesione (Figura 8B), conferendole margini omogeni, sani e stabili per l'integrazione tra il tessuto ospite e quello neofornato. I condrociti vengono impiantati nel difetto della cartilagine precedentemente lavorata ricoperti da un lembo periostale oppure mescolati a una soluzione contenente collagene di tipo I o III (Figura 8D), per ricostruire anche dal punto di vista meccanico il comportamento del tessuto cartilagineo originale. Il collagene di tipo III utilizzato serve per dare maggior tonicità alla struttura reticolare ed è in grado di copolimerizzarsi con il collagene di tipo I.

Questa tecnica ha due vantaggi principali: l'uso delle cellule del paziente evita potenziali complicazioni immunitarie o infezioni virali da trapianto di cellule allogeniche o materiali

estranei; e al contrario dell'impianto osteocondrale autologo, la piccola biopsia minimizza le complicanze per il prelievo di condrociti.

Gli esiti clinici e funzionali nell'utilizzo dell'ACI sono stati confermati da diversi studi con monitoraggio nell'arco di 10 anni, e le evidenze sperimentali suggeriscono che questa terapia risulta essere un trattamento sicuro ed efficace per lesioni cartilaginee del ginocchio di dimensioni superiori a 4 cm² (*T. Minas et al, 2014*). Altri test clinici dimostrano che la combinazione della terapia che sfrutta l'impianto di condrociti autologhi unita all'osteotomia (intervento osseo per modificare l'assetto) possono essere una via percorribile in termini di benefici ottenuti. Le evidenze sperimentali suggeriscono risultati superiori nell'ACI rispetto al trapianto osteocondrale autologo (mosaicoplastica) a distanza di 10 anni dall'intervento, e anche confrontando la terapia con la microfrattura si notano importanti benefici nel trattamento di lesioni con estensione superiore a 3 cm². Per quando riguarda ferite di dimensione ridotta, il trattamento risulta fornire gli stessi risultati comprovati radiograficamente sebbene l'ACI consenta una migliore riparazione strutturale. L'impianto di condrociti autologhi presenta alcuni principali inconvenienti tra i quali: un doppio intervento chirurgico per estrarre e poi immettere i condrociti; un lungo periodo di recupero che va dai 6 ai 12 mesi, per garantire la maturazione dei neo tessuti; una rilevante complessità. Un altro importante problema è dato dall'ipertrofia del lembo periostale utilizzato come copertura dell'incavo formato. Pertanto, approcci alternativi utilizzano matrici artificiali come membrane suine costituite da miscele di collagene di tipo I e III o impalcature di acido ialuronico. Tuttavia questi materiali alloigenici possono frequentemente dare origine a risposte immunitarie e infiammatorie piuttosto importanti. Inoltre i condrociti in coltura vanno incontro a "de-differenziazione", processo per il quale, le cellule specializzate in un determinato compito perdono la loro funzione ma svolgono compiti più generalizzati, andando ad assumere l'aspetto e il ruolo di fibrocondrociti. Alcuni studi dimostrano tuttavia che essi possano "re-differenziare" cioè specializzarsi nuovamente ed esprimere marcatori condrocitici dopo essere stati reintrodotti in un sistema di coltura 3D in vitro. Nel complesso, l'ACI si è dimostrata una terapia benefica per il trattamento dei difetti della cartilagine, ma sono necessarie ulteriori ricerche per sviluppare matrici biomeccanicamente stabili, per ottenere una maturazione più rapida del neo tessuto e una migliore integrazione con il tessuto ospite.

1.3.6 IMPIANTO DI SCAFFOLD ORGANICI CON CARICA CELLULARE (MACI)

La mancanza di un materiale di supporto per favorire la sintesi e l'organizzazione delle matrici potrebbe, in parte, spiegare la variabilità dei risultati tra le popolazioni di pazienti trattati con tecniche di impianto di condrociti. Studi *ex vivo* hanno dimostrato che il successo della rigenerazione della cartilagine dipende sia dal tasso di proliferazione dei condrociti, sia dalla capacità di differenziazione delle cellule staminali all'interno di una matrice 3D, cioè una struttura che funge da supporto cellulare per mantenere e supportare le caratteristiche cruciali del tessuto. Altre terapie, prendendo come esempio l'ACI, si sono concentrate sullo sviluppo di approcci basati su scaffold, in grado di fungere da microambiente favorevole per la deposizione dei condrociti che andrà poi collocato nella zona lesionata. Gli approcci basati sull'utilizzo di scaffold presentano importanti vantaggi rispetto alle altre tecniche. In particolare si rilevano un migliore riempimento della lesione e maggiore controllo di aderenza ai margini; una procedura di impianto meno impegnativa; un tempo di recupero postoperatorio più breve a causa della maggiore stabilità dell'innesto. Inoltre, poiché i condrociti sono coltivati in un ambiente 3D, sono meno inclini alla de-differenziazione e quindi producono una cartilagine più simile a quella ialina, sostituendo sia strutturalmente sia funzionalmente la cartilagine originale. MACI è una pratica terapeutica ampiamente utilizzata in ambito clinico che consiste nell'impianto di condrociti autologhi a bordo di un supporto simile alla matrice extracellulare. In maniera analoga alla procedura ACI, il paziente viene sottoposto a due interventi chirurgici, il primo per prelevare il tessuto autologo dal quale vengono estratti i condrociti che una volta isolati vengono espansi *in vitro* per tre giorni e poi depositati su una membrana riassorbibile di collagene misto porcino (tipo I e III) prima di essere impiantati. La membrana è specificatamente ingegnerizzata per promuovere sia l'infiltrazione e l'ancoraggio dei condrociti allo scaffold sia la lubrificazione del tessuto impiantato. Per deporre la bio-struttura si esegue un'artrotomia esponendo la lesione (Figura 8A) e levigando i margini (Figura 8B) per consentire un'integrazione ottimale tra il tessuto ospite e il tessuto appena depositato, dopodiché la matrice viene impiantata e fissata mediante colla di fibrina con il lato cellulare rivolto verso l'osso subcondrale esposto e il lato lubrificante verso la cavità articolare (Figura 8E).

Sebbene l'utilizzo della tecnica MACI abbia fornito esiti molto promettenti, la superiorità di tale tecnica nei confronti delle ulteriori procedure esistenti non è stata scientificamente dimostrata e approvata. Uno dei pochi studi clinici prospettici randomizzati per valutare il MACI ha trovato esiti clinici, artroscopici e istologici paragonabili tra pazienti trattati con MACI o trattati con ACI; tuttavia, il gruppo trattato con MACI ha avuto un tasso più basso di

ipertrofia dell'innesto. Altri studi hanno dimostrato che la procedura MACI non si discosta dalla tecnica ACI, considerando il punteggio attribuito secondo la scala dell'International Knee Documentation Committee (IKDC), i punteggi del compito Tegner (metodo standardizzato per valutare il lavoro o le attività sportive) o della Short Form - 36 (indagine che valuta lo stato di salute e determina il rapporto costo efficacia di un trattamento nelle analisi di economia sanitaria) per pazienti che sono stati sottoposti 24 mesi prima all'ACI o MACI. Tuttavia i punteggi di funzionalità del ginocchio di Lysholm e Guillquist (protocolli che valutano i risultati post chirurgia, in particolare i sintomi di instabilità) hanno mostrato una migliore efficacia della tecnica ACI rispetto a MACI (*F. Zeifang et al, 2010*).

Uno studio separato ha riscontrato migliori risultati ottenuti tramite MACI rispetto alla terapia per microfrattura, per pazienti con lesioni cartilaginee di grandi dimensioni ($> 4 \text{ cm}^2$) a distanza di due anni dopo l'intervento chirurgico. Complessivamente, gli studi riportati hanno riscontrato che MACI ha avuto esiti funzionali simili, se non superiori, sia all'ACI sia alla microfrattura. Sebbene MACI sia tecnicamente attraente in termini di riproducibilità, sicurezza, semplicità chirurgica, riduzione dell'invasività e del tempo intraoperatorio, le spese della nuova terapia richiedono ulteriori indagini. Sono inoltre necessari ampi studi prospettici randomizzati con lunghi periodi di monitoraggio per identificare criteri clinici, indicazioni e controindicazioni al fine di ottimizzare le prestazioni di questa tecnica.

Un'altra tecnica utilizzata per il trattamento di lesione della cartilagine, si basa su scaffold biodegradabili 3D a base di acido ialuronico. Similmente alle matrici derivate dal collagene, l'impalcatura a base di acido ialuronico ha lo scopo di promuovere e mantenere il fenotipo condrocitico e la sintesi di collagene di tipo II durante la coltura in vitro, nonché dopo l'impianto. Sebbene studi ex vivo abbiano riferito che il tasso di degradazione di questi materiali possa essere adattato per abbinarsi al tasso di sintesi della matrice extracellulare (ECM) da parte delle cellule per favorire l'integrazione con il sito lesionato, questo risultato non è stato confermato nel lungo termine dagli studi clinici.

I risultati ottenuti con questo tipo di terapia sono promettenti: generalmente, la cartilagine ialina inizia a svilupparsi dopo un anno dall'impianto e sono stati segnalati risultati di miglioramento della qualità della vita e della salute dell'articolazione 3 anni dopo (*E. Kon et al, 2011*). Sebbene tra le terapie attualmente utilizzate l'intervento MACI a base di acido ialuronico fornisca i risultati clinici migliori, tuttavia esso registra tempi di recupero di almeno un anno prima di

poter effettivamente ottenere, attraverso una riabilitazione costante, un adattamento soddisfacente che consenta al paziente di poter svolgere le normali attività.

Ovviamente, la moltitudine di casi clinici e la diversità nel tipo di lesione e dell'articolazione interessata rappresentano parametri che indirizzeranno la scelta terapeutica verso una soluzione piuttosto che un'altra, al fine di poter trattare specificatamente ciascun paziente con l'opportuna terapia in relazione al danno subito.

1.3.7 PROSPETTIVE TERAPEUTICHE OFFERTE DALL'INGEGNERIA DEI TESSUTI

Le terapie attuali, precedentemente riportate e discusse nel merito, necessitano di importanti considerazioni preliminari, mirate ad analizzare le problematiche dei dispositivi e le tecniche attualmente utilizzate, per comprenderne al meglio i punti di criticità e soprattutto assicurarsi che la valutazione del successo dell'intervento, oltre a tenere conto dei risultati riportati nel breve, medio e lungo periodo, sia giustamente ponderata in termini di condizione patologica recidivante e stress operatorio per il paziente. La possibilità di incorrere in lesione del tessuto cartilagineo importanti con cronicità della sintomatologia, possono richiedere più volte l'utilizzo della stessa terapia, proprio per questo motivo la ricerca scientifica si sposta sempre più verso tecnologie non invasive e con il minor tasso di rischio per il paziente. Una soluzione ottimale, in grado di perseguire e rispondere positivamente alle esigenze elencate, è individuata dall'utilizzo di tessuti ingegnerizzati, in grado di rispondere in maniera completa su diversi fronti, sia dal punto di vista biologico-strutturale per la presenza di una componente cellulare appositamente selezionata e prelevata da tessuto vivente, sia dal punto di vista fisiologico-funzionale, cioè vantando la presenza di biomateriali come polimeri e molecole biologicamente attive in grado di garantire un micro ambiente ottimale all'integrazione. I tessuti ingegnerizzati rispettano la biocompatibilità, il parametro più stringente che si riferisce al grado di ospitalità del materiale nel tessuto vivente. Un materiale è biocompatibile se rispetta le specifiche formali, cioè viene realizzato in osservanza delle dimensioni del tessuto che va a sostituire, quindi in caso di lesione della cartilagine non deve alterare la sua forma biologica ma si occupa solamente di sostituire ciò che non c'è più. Inoltre il neo tessuto deve assolvere alla funzione dell'elemento sostituito senza modificarne in alcun modo la sua fisiologia. Infine deve esserne garantita la

biologia, cioè presentare caratteristiche chimiche e fisiche simili alla cartilagine senza alterarle nel tempo.

L'utilizzo di tessuti ingegnerizzati rappresenta una risorsa potenzialmente vantaggiosa in termini di efficacia della cura per il trattamento delle lesioni cartilaginee come è possibile osservare dagli ottimi risultati ottenuti dai nuovi metodi descritti precedentemente come l'ACI e il MACI. La terapia attuale, riassumendo, prevede l'utilizzo di matrici 3D di collagene suino di tipo I e III oppure di acido ialuronico, che sono utilizzate per coltivare in vitro i condrociti autologhi, per poi provvedere all'impianto dello scaffold carico di cellule nel sito lesionato. Gli svantaggi più consistenti, nel procedere con questo tipo di cura, riguardano da un lato, il riassorbimento della matrice carica di cellule che nel giro di pochi giorni va in contro a un processo di biodegradazione, ottenendo dunque gli stessi risultati sia in caso di impianto con scaffold sia di soli condrociti senza un supporto; dall'altro, l'utilizzo di molecole biologiche di origine animale può determinare importanti reazioni immunitarie avverse. In questo scenario, l'ingegneria tissutale ha sperimentato nuovi materiali, prodotti in laboratorio, come i polimeri sintetici biorassorbibili in grado di ridurre drasticamente il problema immunologico, tra questi troviamo l'acido polilattico (PLA), l'acido poliglicolico (PGA) e il policaprolattone (PCL). Tuttavia sia i polimeri sintetici che i polimeri naturali di origine animale (collagene e acido ialuronico) dimostrano tassi marcatamente diversi del processo di degradazione/rimodellamento dello scaffold rispetto ai normali processi subiti dalla matrice extracellulare cartilaginea, non permettendo a pieno una buona biocompatibilità e integrazione con l'ambiente circostante, perché la velocità di scomparsa elevata quando impiantati nell'organismo, non consente allo scaffold di svolgere correttamente il proprio lavoro. L'approccio tecnologico è orientato verso la progettazione di scaffold biocompatibili e a bioassorbimento lento, in grado così di favorire la proliferazione cellulare, l'adesione dei condrociti al substrato sintetico e la loro stimolazione a sintetizzare nuova matrice extracellulare per favorire un'efficace rigenerazione dei tessuti in vivo. Nello specifico è stato dimostrato che i poliuretani e poliacrilati presentino un buon potenziale clinico nel trattamento delle lesioni osteocondrali. I poliuretani sono particolarmente adatti per riprodurre tessuti molli e duri, inclusa la cartilagine, per una spiccata elasticità. I poliacrilati invece tendono a indurre la condrogenesi delle cellule staminali mesenchimali, anche in assenza di fattori di induzione condrogenica, questo significa che i biomateriali a base di poliacrilati costituiscono un terreno ottimale per lo sviluppo e la crescita delle cellule cartilaginee andando a simulare l'ambiente biologico; inoltre sono materiali lavorabili facilmente al fine di avere una porosità controllata.

Le catene polimeriche generalmente vengono lavorate e mescolate a una soluzione acquosa; si formano facilmente legami idrogeno e si ottiene un materiale colloidale, l'idrogel. Esso rappresenta un'ottima scelta per essere impiegato come matrice 3D a supporto dei condrociti e nel trattamento delle lesioni cartilaginee in quanto è possibile ingegnerizzare il neo tessuto, al fine di fargli assumere un comportamento meccanico simile alla cartilagine; mantenendo lo stesso grado di rigidità, deformabilità e lubrificazione proprio del tessuto originale. Le strutture idrogel possono essere facilmente manipolate e portate ad assumere la forma complementare alla depressione cartilaginea formata nella cavità articolare, in questo modo si riesce a preservare la struttura articolare e le cellule a bordo possono liberarsi per rigenerare la lesione in maniera più efficace rispetto al solo trapianto di condrociti sprovvisti di scaffold; l'aggiunta di esteri all'idrogel consente di donare al materiale una tendenza strutturale di tipo reticolare, favorendo una lenta degradazione una volta impiantato.

Tra i biomateriali polimerici utilizzati per la realizzazione di idrogel impiantabili per il trattamento di lesioni osteocondrali il poli(metilmetacrilato-co-acido metacrilico) rappresenta una scelta innovativa. In particolare nel prossimo capitolo verrà trattato in esteso l'aspetto legato alle sue proprietà come materiale e come potenziale substrato per adesione e proliferazione di condrociti nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti della cartilagine.

CAPITOLO 2 - ANALISI DELLE PROPRIETÀ MECCANICHE E VALUTAZIONE DELLA BIOCOMPATIBILITÀ DI SCAFFOLD A BASE DI POLIACRILATO INGEGNERIZZATI

Di seguito verrà presentato un caso (*Jiménez et al, 2019*) di realizzazione di uno scaffold corredato da una valutazione delle sue proprietà ai fini del suo impiego come sostituto impiantabile.

Il materiale che è stato utilizzato è il poli(metilmetacrilato-co-acido metacrilico), un polimero di origine sintetica, ovvero una macromolecola formata da lunghe catene carbonio-carbonio nella quale si individuano due monomeri differenti, che si ripetono in maniera casuale senza ordine preciso, il metilmetacrilato (MMA) e l'acido metacrilico (MAA), rispettivamente con cardinalità n e m . La struttura del polimero è di tipo ramificato, presenta infatti lunghe catene primarie contenenti legami covalenti, alle quali sono covalentemente legate catene secondarie più corte ricche di gruppi carbonile (carbonio che forma un doppio legame con l'ossigeno) e gruppi ossidrilici (presenza di gruppi OH). Il gruppo carbonile è polare data l'elevata elettronegatività: si forma infatti una nube carica negativamente presso l'ossigeno e una zona positiva presso il carbonio. Questo consente la formazione di legami deboli con altre catene secondarie del polimero contenenti il gruppo ossidrilico. La presenza di legami deboli tra le catene secondarie di molecole differenti consente alla struttura realizzata in poli(metilmetacrilato-co-acido metacrilico) di essere dotata di buona deformabilità, le catene polimeriche possono scorrere l'una sull'altra rompendo i vecchi legami e formandone dei nuovi, conferendo al materiale un comportamento di tipo visco-elastico. La presenza dell'acido metacrilico consente al copolimero la capacità di essere solubile in mezzi acquosi e una maggiore tendenza a formare legami con altri substrati, attraverso la creazione di ponti a idrogeno; per questo motivo il materiale si presta bene come costituente di idrogel impiantabili per il trattamento di lesioni cartilaginee che necessitano di un ancoraggio ottimale al tessuto biologico ospitante. L'altro monomero che costituisce il copolimero, il metilmetacrilato, è un estere ottenuto dalla reazione dell'acido metacrilico combinato al metanolo.

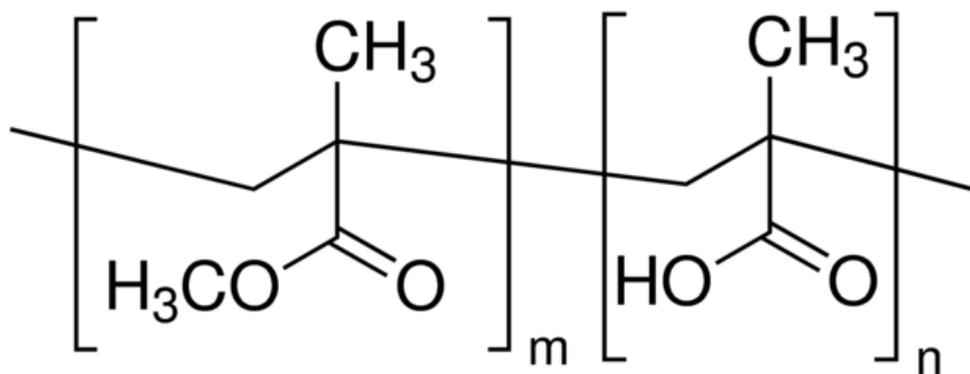


Figura 9. Formula chimica del poli(metilmetacrilato-co-acido metacrilico).

2.1 PROTOCOLLO DI REALIZZAZIONE DELLO SCAFFOLD

Il protocollo di realizzazione della matrice ha previsto inizialmente l'isolamento e la crescita di condrociti umani. La cartilagine articolare è stata ottenuta da pazienti affetti da AO al ginocchio, durante un intervento di sostituzione del giunto, prelevandola dal lato femorale della superficie articolare, in una zona appositamente selezionata per rappresentare un compartimento non soggetto a carichi: dal condilo laterale in caso di paziente con ginocchio varo e dal condilo mediale in caso di ginocchio valgo. Nessuno dei pazienti aveva una storia di artrite infiammatoria o artrite indotta da cristalli e per questo studio è stata utilizzata solo la cartilagine che macroscopicamente sembrava relativamente normale. I campioni raccolti durante l'artroplastica articolare sono stati immersi in mezzo di coltura DMEM (Sigma) con penicillina-streptomicina all'1%. La cartilagine prelevata è stata quindi mantenuta per una notte in una soluzione allo 0.08% di collagenasi IV a 37 °C in mescolamento. La collagenasi provvede alla disgregazione dei legami peptidici presenti nel collagene, distruggendo la matrice extracellulare. Le cellule sono quindi state centrifugate e risciacquate con un tampone per rimuovere la collagenasi, e successivamente depositate in un matraccio contenente il terreno di coltura DMEM arricchito con siero fetale bovino (FBS) al 20%, per favorire l'apporto di fattori di crescita, ormoni, chelanti e sostanze detossificanti che inducono la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule in coltura; in aggiunta sono stati aggiunti 5 mL di ITS (Insulin-Transferin-Selenium) all'1%. L'insulina favorisce l'assorbimento di glucosio e aminoacidi, la lipogenesi, il trasporto intracellulare e la sintesi di proteine e acidi nucleici, la transferrina è un

trasportatore di ferro e contribuisce a ridurre i livelli tossici di radicali di ossigeno e perossido, il selenio invece è usato come antiossidante nel mezzo di cultura. Inoltre si sono aggiunti 100 U/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomina e la coltura è stata mantenuta a 37 °C in un ambiente umido con atmosfera al 5% di CO₂. Trascorse 24 ore, il mezzo di coltura precedente è stato sostituito con uno nuovo arricchito con FBS al 10%.

Per consentire uno screening in parallelo dei biopolimeri considerati in relazione alle loro capacità di supporto cellulare sono stati realizzati dei microarray polimerici. In una prima fase si è realizzata una libreria polimerica, preparata sulla base di una scala che segue il peso delle singole molecole; tutti i membri sono stati interamente caratterizzati: attraverso la cromatografia a permeazione di gel (GPC) che consente la separazione fisica dei materiali polimerici una volta fatti passare in una colonna di gel poroso, il soluto subisce un rallentamento proporzionale alle dimensioni delle particelle e alle dimensioni dei pori; poi sfruttando la calorimetria differenziale a scansione (DSC) è stato possibile classificare i materiali per il loro comportamento termico, basandosi sulla misura della differenza di flusso termico tra il campione in esame e uno di riferimento; e infine attraverso la misura degli angoli di contatto andando a valutare la bagnabilità dei diversi polimeri. 380 membri di una libreria di poliacrilati/acrilammidi (PA) e poliuretani (PU), precedentemente sintetizzata, sono stati depositati su vetrini trattati con aminoalchilsilano e rivestiti con. Prima di essere stampato in un formato di tipo microarray, ciascun membro della libreria è stato sciolto in un solvente non volatile l'1-metil-2-pirrolidinone (NMP). Il rivestimento con agarosio è stato realizzato manualmente per immersione in agarosio di tipo I-B (1% w/v in acqua distillata a 65 °C), e successivamente rimosso manualmente. Successivamente, i vetrini sono stati asciugati durante la notte a temperatura ambiente in una stanza priva di polvere. I polimeri per la stampa a contatto sono stati preparati sciogliendo 10 mg di polimero in 1 mL di solvente non volatile N-metil-2-pirrolidinone. I microarrays polimerici sono stati quindi fabbricati mediante stampa a contatto (Q-Array Mini microarrayer) con 32 pin solidi aQu (K2785, Genetix) utilizzando le soluzioni polimeriche poste in 384 micropiastre in polipropilene (X7020, Genetix). I 380 membri delle librerie polimeriche sono stati stampati seguendo un modello a quattro replicati, con 1 campo singolo di 32 x 48 spots contenente 4 aree di controllo (vuote). Le condizioni di stampa erano le seguenti: 5 timbri per spot, 200 m di tempo di affondamento e 10 ms di tempo di stampa. La dimensione tipica dello spot era di 300–320 µm di diametro con una distanza di inclinazione di 560 µm (asse y) e 750 µm (asse x), consentendo di stampare fino a 1520

campioni su un vetrino standard da 25 x 75 mm. Una volta stampati, i vetrini sono stati asciugati sottovuoto (12 ore a 42 °C/200 mbar) e sterilizzati mediante esposizione ai raggi UV per 20 minuti prima di essere utilizzati.

Per effettuare lo screening della libreria polimerica le cellule, contenute in 5 mL di mezzo di coltura precedentemente trattato (DMEM, FBS 10%, penicillina-streptomina 1%, ITS 1%), sono state seminate (3×10^5 cellule/well) in un microarray polimerico contenente: i 380 polimeri (PU e PA) più 4 pozzetti di controllo, quadruplicati, per un totale di 1536 pozzetti contenenti ciascuno un polimero. Trascorse 72 ore di coltura, è stata valutata l'adesione dei condrociti ai vari polimeri contando il numero di nuclei in ciascun pozzetto attraverso colorazione DAPI e CTG.

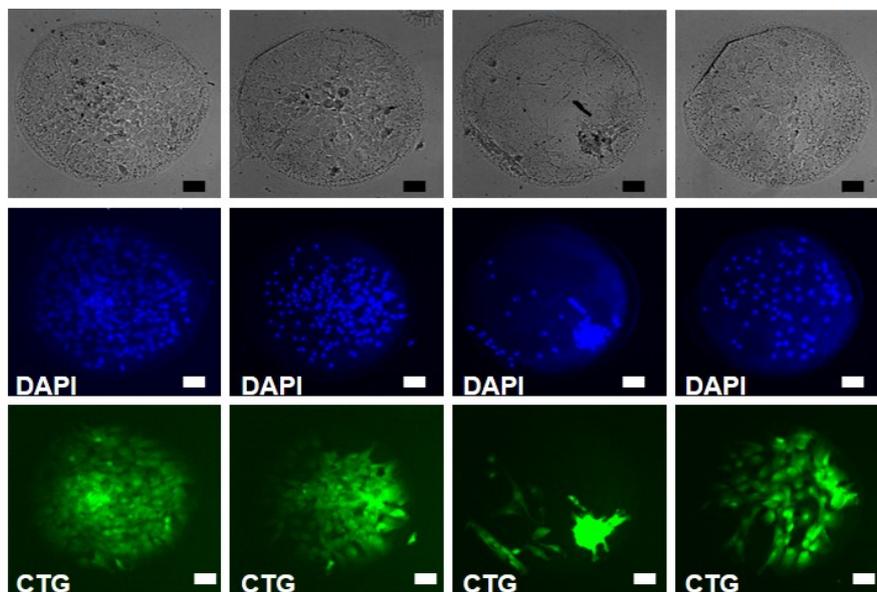


Figura 10. *Analisi di vitalità e attaccamento cellulare nello screening dei microarray polimerici: DAPI è un tracciante organico fluorescente che lega fortemente regioni del DNA ricche di sequenze A-T utile per valutare l'adesione dei condrociti; CTG è un tracciante cellulare verde indice di vitalità cellulare e biocompatibilità dei polimeri (Jiménez et al, 2019).*

Tra tutti i polimeri ne vengono selezionati 10 in termini di efficienza nel formare legami con le cellule e mantenere un adeguato livello di adesione.

Polymer	Average of cell number per spot	% of cells per spot
PA167	136	100
PU153	131	96
PA204	123	91
PA234	108	79
PA391	95	70
PA202	79	58
PA410	78	58
PA309	47	35
PA520	43	32
PA460	39	29

Figura 11. Migliori 10 polimeri scelti dai microarray polimerici in base al numero di condrociti presenti in ciascun pozzetto (Jiménez et al, 2019).

Successivamente sono stati eseguiti studi su più larga scala per replicare le condizioni di microambiente in uno più vasto. 250 μ L di ogni polimero in soluzione (2% w/v in acido acetico) sono stati depositati in piastre a 12 pozzetti e lasciati asciugare tutta la notte in cappa a temperatura ambiente. Le piastre, ricoperte dai polimeri sono state successivamente esposte a raggi UV per 30 minuti e lavate due volte (per 5 minuti a lavaggio) con PBS (tampone fosfato salino) prima degli studi cellulari.

Infine in ciascuna piastra, precedentemente rivestita con i polimeri sono state depositate le cellule (3×10^4 cell/well). Trascorsi 10 giorni in coltura, le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 4% per 20 minuti e colorate con blu di toluidina e rosso alizarina. A questo punto sui 10 polimeri selezionati precedentemente nello studio mediante microarray è stata eseguita un'analisi in microscopia ottica, per valutare la loro abilità nel mantenimento del fenotipo dei condrociti e della proliferazione cellulare in coltura a lungo termine.

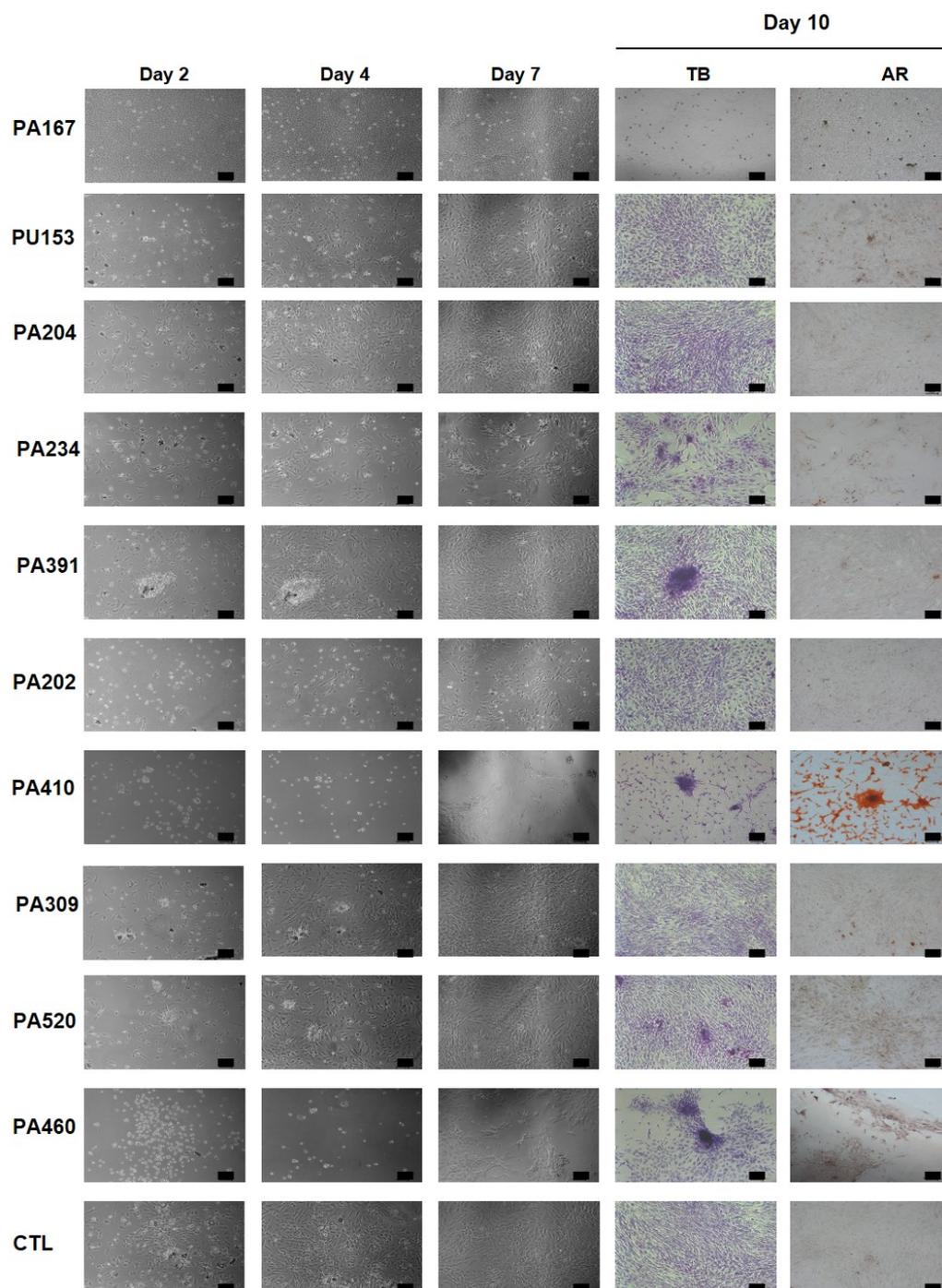


Figura 12. Immagini rappresentative della proliferazione cellulare e del mantenimento delle proprietà condrogeniche dei condrociti sottoposti a colorazione con TB (blu di toluidina) e AR (rosso alizarina) (Jiménez et al, 2019).

La colorazione con blu di toluidina, indice della presenza di glicosaminoglicani (GAG), è risultata limitata nei campioni PU153, PA202 e PA309, e assente nel caso del polimero di PA167. Per questo motivo tali polimeri sono stati esclusi dagli studi successivi. Il rosso

alizarina si deposita in presenza di cellule con un fenotipo simile agli osteoblasti, perciò quando presente spesso vi sono depositi di calcio; il polimero PA410 è stato dunque scartato perché conferirebbe eccessiva rigidità allo scaffold. I polimeri rimanenti (PA204, PA234, PA391, PA520) hanno dimostrato le migliori capacità nel legare e sostenere la crescita della frazione cellulare. All'ispezione dei vetrini (Figura 12) il campione PA204 dimostra una migliore distribuzione della matrice extracellulare (TB), la componente di calcio è assente (AR) e inoltre presenta il maggior numero di cellule vive (Figura 11). Quindi il PA204 viene selezionato come costituente dell'idrogel in favore del suo potenziale di sostituzione del tessuto cartilagineo.

Alla combinazione dei monomeri del PA204 (90% di MMA-metilmetacrilato, 10% di MAA-acido metacrilico) è stato quindi aggiunto 1-metil-2-pirrolidone (NMP), utilizzato come solvente polimerico per favorire la polimerizzazione e tetrametiletilendiammina (TEMED).

La TEMED catalizza la decomposizione dello ione persolfato con produzione del corrispondente radicale libero. Quest'ultimo a sua volta attacca i doppi legami permettendone la polimerizzazione in forma di gel trasparente.

Si è quindi aggiunto glicole polietilenico (PEG)(PM=3000Da) e polietilenico diacrilato (PEGDA) (PM=700Da), tutti i reagenti sono stati mescolati in siringhe apposite per 1 minuto, e aggiungendo perisolfato di ammonio (APS), il precursore redox, e si è ottenuta la sintesi dell'idrogel polimerico. La miscela contenuta nelle siringhe è stata mantenuta a 37°C per una notte, l'idrogel è stato lavato 3 volte con etanolo (30 minuti) e 4 volte con PBS (tampone) per rimuovere il materiale che non ha partecipato alla reazione e successivamente posto in soluzione acquosa. Per ottenere scaffold liofilizzati si è proceduto con il congelamento dell'idrogel nel ghiaccio secco per 5 minuti, mantenendolo quindi per una notte in un congelatore a -80 °C e infine portandolo a -45 °C alla pressione di 1 mbar tramite crioesiccamento, favorendo il processo di sublimazione e la conseguentemente rimozione del ghiaccio mantenendo inalterata la struttura e limitando il suo deterioramento.

Infine, sia l'idrogel liofilizzato sia quello non liofilizzato, sono stati tagliati in due dischi da 2 mm e sterilizzati per 30 minuti con etanolo al 70% (v/v) per poi essere risciacquati 3 volte in PBS ed esposti per 15 minuti ai raggi UV.

Arrivati a questo punto, l'idrogel è stato immerso in un mezzo di coltura con un'aliquota di condrociti (2×10^5 cellule/ μL) pipettata su ogni provino e incubata a 37°C per 4 ore per permettere un adeguato grado di adesione cellulare. Gli scaffolds recanti a bordo le cellule sono stati trasferiti in 24 nuovi pozzetti di coltura con 1 ml di terreno. Tutti i campioni sono quindi stati incubati per 48 ore in un ambiente con il 5% di CO₂ a 37 °C per 48 ore o 21 giorni. Il

terreno di coltura è stato sostituito ogni 2 giorni e l'idrogel è stato processato (come sopra) per ulteriori analisi. Il protocollo di realizzazione dello scaffold si è concluso con la valutazione delle proprietà del materiale, quali micro e macro struttura e porosità, attraverso un'analisi in micro-tomografia computerizzata.

2.2 CARATTERIZZAZIONE MECCANICA

La realizzazione di scaffold a base di copolimero PMMA-co-MAA, conferisce alla struttura importanti caratteristiche meccaniche che emulano il comportamento della cartilagine. Possiamo infatti notare un'analogia nella composizione del tessuto biologico a quella del tessuto sostituito: la cartilagine infatti presenta una struttura organizzata in fibre di collagene, formate dai legami peptidici forti tra i singoli amminoacidi, in aggiunta troviamo le molecole di proteoglicani che collegano, debolmente tra loro, le diverse fibre di collagene; il copolimero d'altro canto presenta una microstruttura simile per la presenza di lunghe catene principali, formate da legami covalenti carbonio-carbonio, tenute insieme reciprocamente da legami a idrogeno che si formano tra i gruppi $-COOH$ e $-CO$, rispettivamente dell'acido metacrilico e del metilmetacrilato. È proprio da tale analogia strutturale che derivano proprietà meccaniche simili.

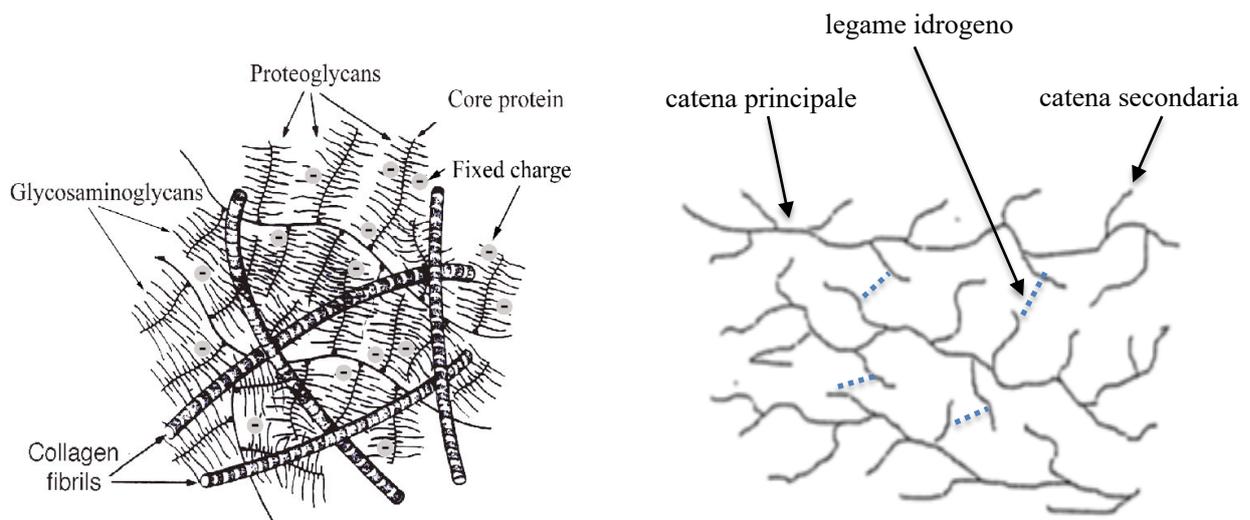


Figura 13. Confronto tra la struttura della cartilagine e quella del copolimero PMMA-co-MAA (Pietrabissa et al, 1996).

Lo scaffold, una volta impiantato, lavora a una temperatura di esercizio di 37°C circa, maggiore della temperatura di transizione vetrosa (T_g), al di sotto della quale il polimero assumerebbe comportamento elasto-fragile apparendo come materiale vetroso, ma inferiore alla temperatura di rammollimento (T_r), oltre la quale il polimero sarebbe liquido. Ne consegue un materiale gommoso, dal comportamento viscoelastico, di tipo non reversibile, infatti alla rimozione del carico, lo scaffold non ritorna nelle condizioni iniziali, e di tipo non istantaneo in quanto a seguito di compressione, esso non si deforma istantaneamente ma in maniera prolungata nel tempo, esisteranno dunque più grafici che caratterizzano la viscoelasticità della struttura impiantabile.

Il copolimero, infatti, cambia il proprio comportamento in funzione della velocità con la quale viene sollecitato (ϵ : deformazione, t : tempo):

$$d\epsilon/dt$$

per carichi istantanei, tale valore aumenta, modificando il grafico σ - ϵ (σ : tensione) che si impenna, indice di comportamento fragile; mentre sottoponendo il polimero a deformazioni prolungate nel tempo si osserva una curva con andamento duttile.

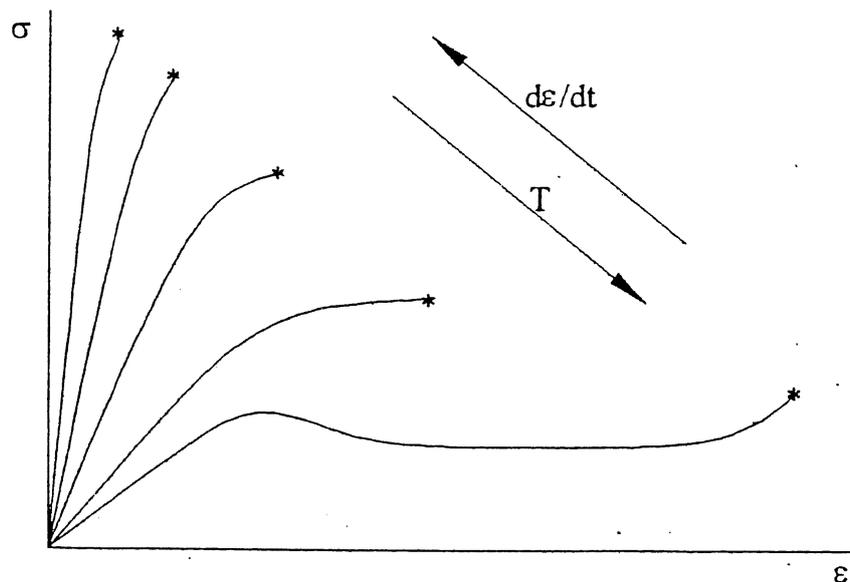


Figura 14. Andamento del diagramma σ - ϵ al variare della velocità di deformazione ($d\epsilon/dt$) e della temperatura (T). (Pietrabissa et al, 1996).

Possiamo considerare il comportamento meccanico dello scaffold in seguito a compressione una via di mezzo tra il comportamento prevalentemente liquido, per il quale il materiale non ha memoria di forma e tende a mantenere il nuovo stato raggiunto e un comportamento prevalentemente solido, per il quale il materiale tende a ritornare alla forma originaria.

Esistono altri due aspetti che caratterizzano il neo tessuto in PMMA-co-MAA: il creep e il rilassamento. Il primo, presente in forma piuttosto lieve, consente allo scaffold, quando soggetto a carichi costanti, di deformarsi costantemente nel tempo ($d\varepsilon/dt = \text{costante}$) fintanto che è presente la sollecitazione.

Il rilassamento invece si verifica quando allo scaffold viene imposta una deformazione costante, questo induce la rottura dei legami a idrogeno con conseguente scorrimento delle catene principali e la formazione di nuovi legami. Questo processo avviene fintanto che il materiale è deformato, perciò si assiste a un rimodellamento dello scaffold che porta al cambiamento della microstruttura interna con l'effetto di aumentare il numero di legami utili e ridurre le tensioni generate. Il fenomeno di rimodellamento appena descritto è analogo a quello subito dalla cartilagine articolare in presenza di carichi.

Tramite osservazioni al microscopio elettronico (ESEM) e tramite micro-tomografia computerizzata (micro-CT) dell'idrogel, è possibile notare una microstruttura interconnessa che forma una struttura fibrillare densa. L'idrogel è dotato di elevata porosità, superiore nel caso liofilizzato, nel quale la percentuale di porosità si aggira sul 91%, con una dimensione media dei pori di $51\mu\text{m}$ e spessore trabecolare di $15\mu\text{m}$. Nel caso di idrogel non liofilizzato si ha una diminuzione della porosità che si aggira attorno all'81%, una minore dimensione dei singoli pori, pari a $21\mu\text{m}$ e uno spessore trabecolare di $9\mu\text{m}$.

Se da un lato l'elevata porosità e l'interconnessione tra i diversi pori favorisce l'apporto nutrizionale, la diffusione dei gas e la rimozione delle sostanze di scarto, dall'altro diversi studi (*Stenhamre et al, 2011*) dimostrano che pori più piccoli, di dimensioni contenute tra $20\mu\text{m}$ e $150\mu\text{m}$, favoriscono il fissaggio della matrice extracellulare neo formata e rallentino la diffusione di cellule e la loro infiltrazione nello scaffold, rimanendo così per lo più nel bordo e ritardando complessivamente il suo deterioramento (*Naeem et al, 2019*).

La spiccata porosità dello scaffold consente di introdurre la conduttività idraulica (K), un parametro che misura come il fluido si muove attraverso gli interstizi. Il movimento del fluido

è guidato dal gradiente di pressione idrostatica ed è controllato dalla composizione e dalla struttura della matrice extracellulare, infatti secondo la legge di Darcy:

$$K = q/\Delta p$$

(q: flusso di fluido, Δp : gradiente di pressione idrostatica);

La conduttività idraulica rappresenta un parametro che dipende: dalla permeabilità del mezzo poroso, quindi dal grado di porosità dello scaffold; dal coefficiente di viscosità della matrice extracellulare quindi dalla sua composizione, in particolare rivestono un ruolo fondamentale i proteoglicani che grazie ai GAG legano molecole d'acqua variando lo stato di idratazione; infine è direttamente proporzionale all'area dello scaffold attraverso la quale passa il fluido, e inversamente proporzionale alla lunghezza per la quale sussiste il gradiente di pressione idrostatica.

Lo scaffold poroso, una volta impiantato, rimane confinato all'interno della capsula articolare, perciò quando soggetto a sollecitazioni, l'aumento della pressione idrostatica permette al flusso di fluire verso il tessuto circostante lubrificando l'articolazione.

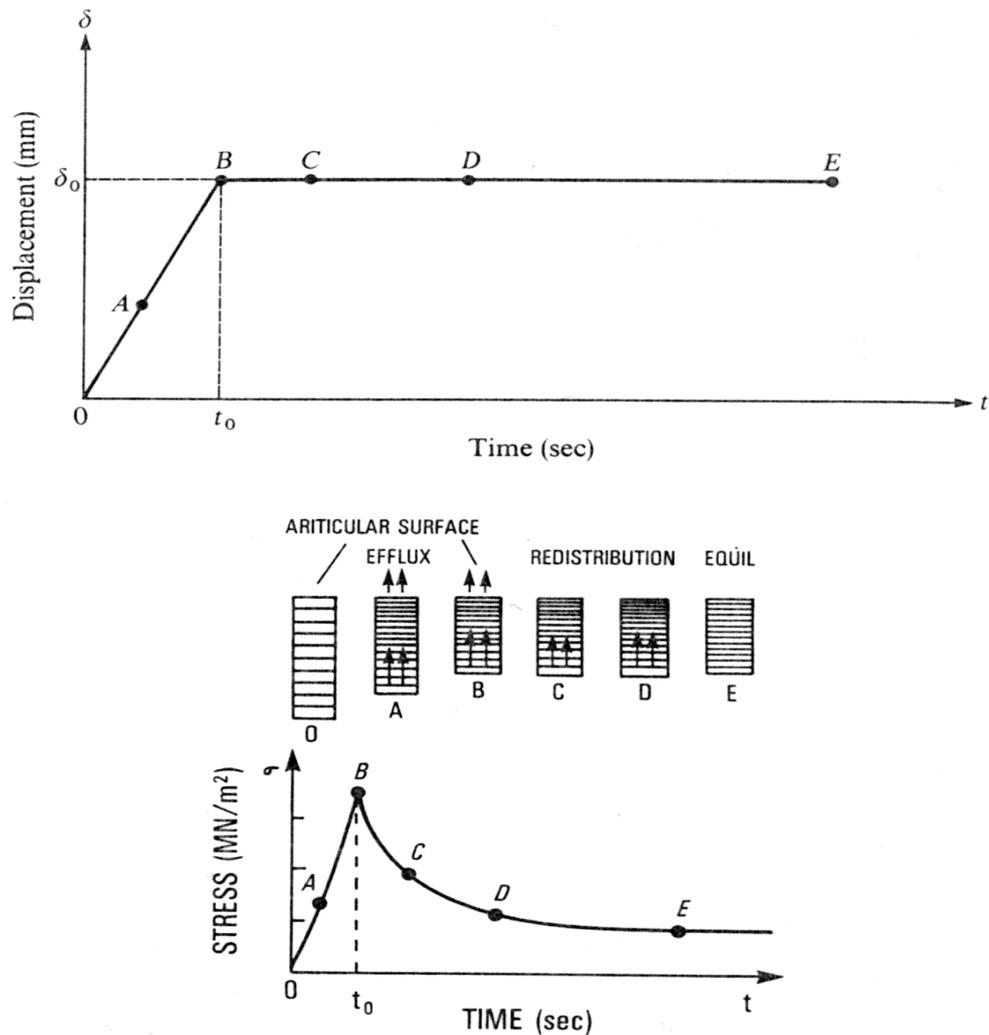


Figura 15. Rappresentazione del fenomeno di rilassamento in un tessuto poroso (Mow et al, 1980).

Facendo riferimento in alto (Figura 15), dal primo diagramma possiamo osservare l'andamento della deformazione imposta, nel diagramma centrale invece la ridistribuzione dei carichi con compressione del tessuto ed efflusso, in basso, invece, è rappresentato l'andamento della tensione decrescente a seguito del fenomeno di rilassamento.

- A: per permettere la deformazione del tessuto, il fluido è forzato verso l'esterno attraverso la porosità dello scaffold;
- B: a causa dei bassi valori della conduttività idraulica sono necessari grandi carichi per comprimere la struttura;
- C: raggiunto il picco di tensione, si ha una ridistribuzione dei fluidi all'interno dello scaffold per dissipare il gradiente di pressione idrostatica; nella figura centrale le linee

orizzontali rappresentano il campo di tensione di compressione che risulta più intenso nella porzione rivolta verso la superficie articolare; mentre le frecce indicano la velocità del fluido;

- D: in seguito alla redistribuzione dei fluidi e quindi dei carichi, si raggiunge una situazione di equilibrio in cui si arresta l'efflusso.

In seguito alle sollecitazioni meccaniche, l'elevata porosità dello scaffold permette la fuoriuscita della matrice extracellulare in esso contenuta, favorendo il normale processo di trasduzione elettromeccanica che avviene normalmente nel tessuto cartilagineo intatto. Facendo riferimento alla struttura cartilaginea (Figura 13), essa è schematizzabile come un reticolo carico in equilibrio con una soluzione elettrolitica. I glicosaminoglicani contenuti nella matrice, grazie alla loro natura acida, si dissociano mettendo in evidenza un elevato numero di anioni. Queste cariche negative rimangono ancorate ai proteoglicani, mentre la componente amorfa, che le circonda, è ricca di controioni liberi. A seguito della compressione meccanica si ha il fenomeno dello Streaming Potential: all'efflusso di liquidi verso i tessuti circostanti si aggiunge il flusso ionico, dato dalle particelle libere non vincolate. Si crea dunque una differenza di potenziale all'interno del tessuto cartilagineo, il segnale bioelettrico può quindi alterare il potenziale di membrana dei condrociti che provvederanno al rimodellamento della cartilagine articolare, attraverso una conseguente secrezione di matrice extracellulare.

Sono stati eseguiti diversi test meccanici sui due tipi di scaffold (liofilizzato e non-liofilizzato). È possibile notare come il modulo elastico (E), indice del grado deformabilità di un materiale sottoposto a carichi, diminuisce nei materiali che presentano maggiori elementi porogeni e una superiore idratazione. La rigidità dell'idrogel liofilizzato raggiunge i 14 KPa quando la deformazione è compresa tra il 10-15 %, similmente l'idrogel non liofilizzato, presentando pori di dimensione ridotta ma in maggior numero rispetto al caso precedente e con spessore trabecolare altrettanto inferiore, quando soggetto alla stessa deformazione il modulo elastico raggiunge quasi i 10 KPa.

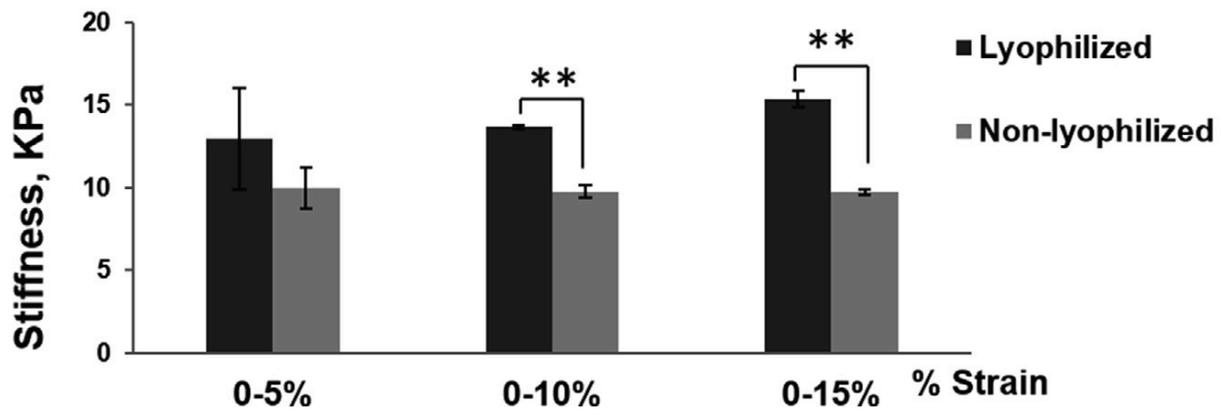


Figura 16. Rappresentazione dell'andamento del modulo elastico in funzione del range di deformazione per scaffold liofilizzati e non liofilizzati (Jiménez et al, 2019).

Il modulo elastico di entrambe le tipologie di scaffold si presta bene al mantenimento del bilancio omeostatico del catabolismo e anabolismo nei condrociti.

Sono stati eseguiti ulteriori test per analizzare la variazione delle proprietà meccaniche nel tempo a seguito della possibile degradazione dell'idrogel, tuttavia dopo 8 settimane in cui gli scaffold vengono mantenuti in acqua, non si registrano variazioni di E che possono in un qualche modo indurre cambiamenti nel comportamento dei condrociti.

2.3 STUDI SULLA CAPACITÀ DI SOSTENERE LA CRESCITA E LA FUNZIONE CELLULARE IN VITRO

Una volta che il polimero PA204 (PMMA-co-MAA) è stato selezionato, sono stati eseguiti diversi studi in vitro, per analizzare e confrontare il suo potenziale biologico nella realizzazione di scaffold.

Diversi test mettono a confronto, scaffold impiantabili, realizzati interamente in PCL con strutture in PLC che vantano un rivestimento in PA204.

Il policaprolattone rappresenta il *gold standard* nell'ingegneria tissutale, ufficialmente approvato dalla FDA per impiego all'interno del corpo umano e ampiamente utilizzato nel trattamento di danni cartilaginei.

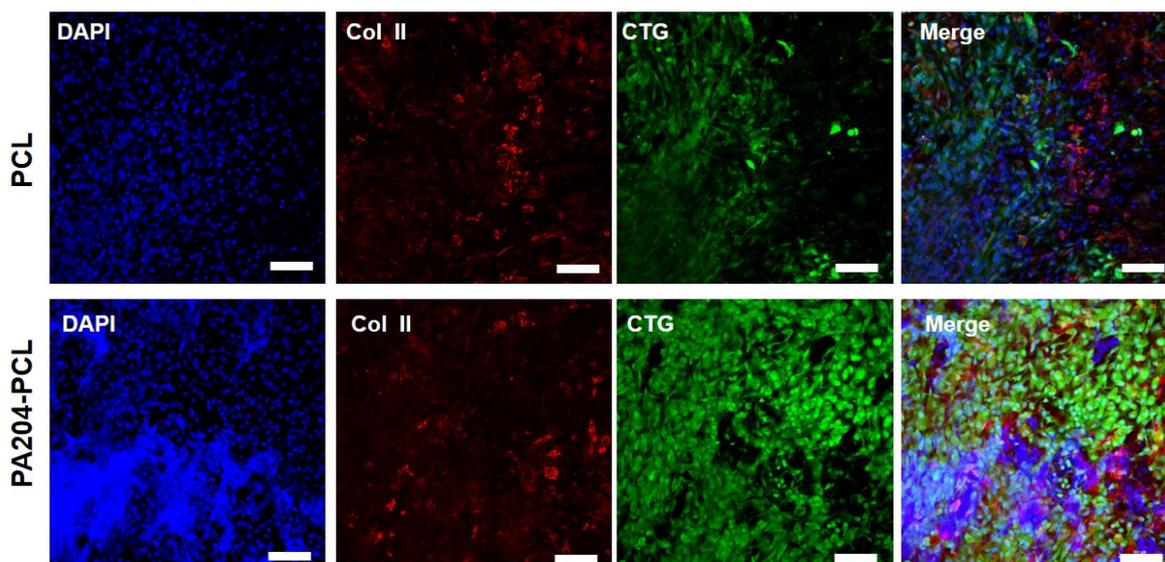


Figura 17. Vitalità cellulare ed espressione di marker condrogenitici trascorsi 21 giorni di coltivazione dei condrociti in scaffold realizzati in PCL e PA204-PCL; traccianti utilizzati: DAPI, Col II e CTG. Scala = 100 µm (Jiménez et al, 2019).

Facendo riferimento in alto (Figura 17), i risultati dei test sulla vitalità cellulare dimostrano che il nuovo metodo di rivestimento con il copolimero PA204 risulta essere non citotossico, e si evidenzia un aumento della proliferazione cellulare.

Nelle immagini con colorazione DAPI, è possibile notare una forte fluorescenza nel caso di scaffold PA204-PCL, indice di una buona attività replicativa e adesione cellulare alla struttura. Il tracciante CTG permette di osservare una distribuzione cellulare omogenea, e un'intensa attività metabolica dei condrociti.

Mentre per quanto riguarda l'espressione del collagene di tipo II (Col II), non sono state riscontrate importanti differenze.

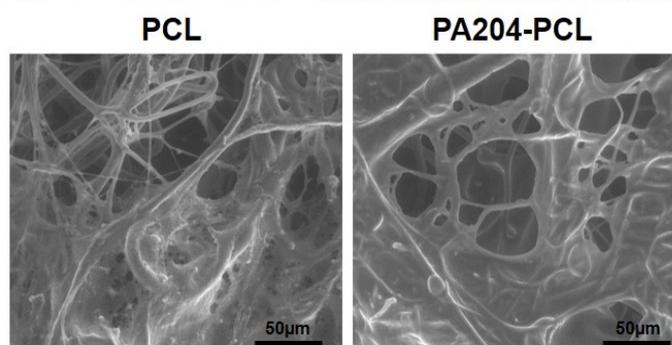


Figura 18. Immagine al microscopio elettronico a scansione ambientale (ESEM) di condrociti coltivati per 21 giorni su scaffold in PCL e PA204-PCL. Scala = 50 µm (Jiménez et al, 2019).

Dai test effettuati al microscopio elettronico (ESEM) (Figura 18), si evidenzia la microstruttura ordinata dello scaffold rivestito in PA204, dotato di una buona porosità e interconnessione tra i vari distretti del tessuto, ciò consente la normale secrezione della matrice extracellulare, da parte dei condrociti, e la sua dispersione su tutta la superficie interna. Nel caso di scaffold realizzato in solo PCL si può notare la struttura fibrosa e meno omogenea delle trabecole polimeriche interne, esse infatti possono limitare la buona diffusione dei materiali biologici e l'infiltrazione cellulare.

Successivamente sono stati eseguiti ulteriori esperimenti in vitro, per analizzare l'incidenza del parametro porosità sulle funzioni cellulari dei condrociti.

Durante il processo di polimerizzazione del PA204 sono stati aggiunti materiali porogeni come il glicole polietilenico (PEG) e agenti cross-linker quali il PEG-diacrilato (PEGDA) per favorire l'interconnessione. Nel corso della reazione, il PEG e l'acqua inducono la formazione di precipitato che aumenta la porosità, con formazione di pori di dimensione piuttosto ridotta. All'interno della struttura si vengono a formare dei canali microfluidici che permettono la diffusione di macromolecole e ioni, il trasporto di sostanze nutritive e l'espulsione delle sostanze di rifiuto. Nel tessuto cartilagineo intatto, non troviamo vascolarizzazione perciò tutte le operazioni descritte precedentemente, associate a fenomeni di trasporto, sono intese come un flusso lento di sostanza amorfa, le cui componenti seguono gradienti di tipo elettro-chimici; allo stesso modo i canali microfluidici del tessuto ingegnerizzato consentono questo tipo di trasporto.

La porosità è controllata da 3 fattori: PEG, acqua e liofilizzazione. Per testare l'idrogel polimerico è necessario agire su ciascuno dei parametri per comprenderne al meglio gli effetti sulle popolazioni cellulari.

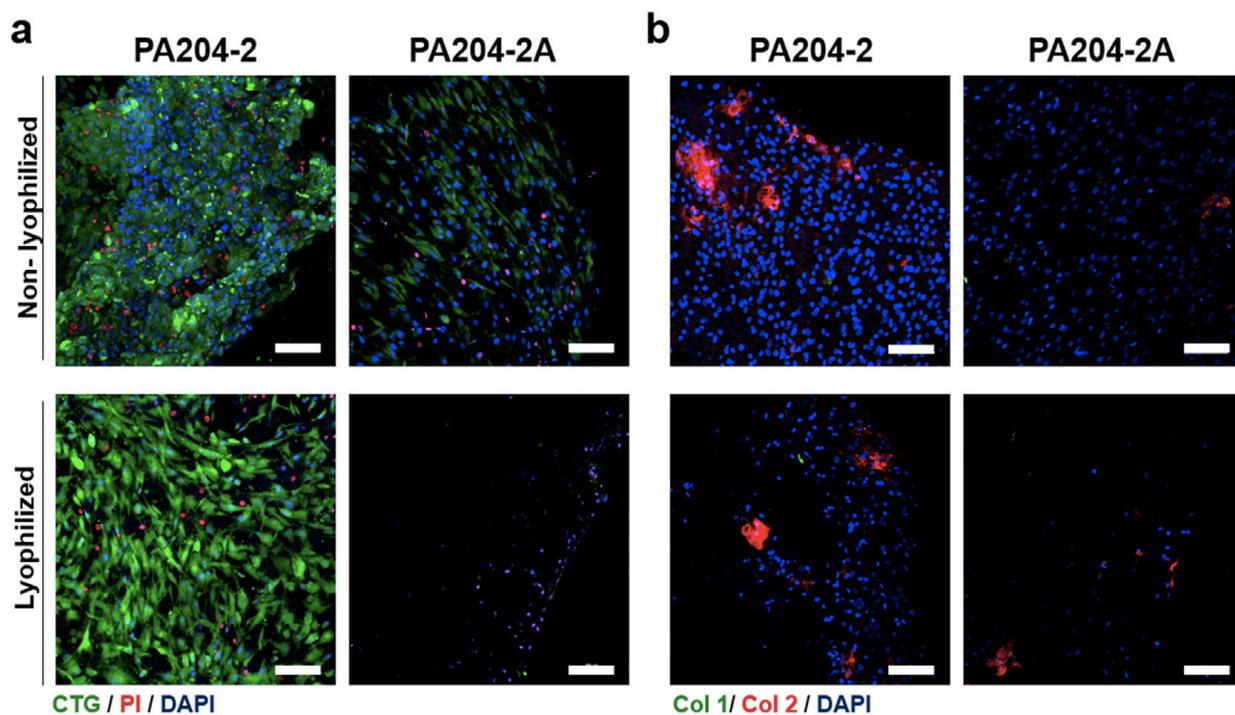


Figura 19. Immagini al microscopio ottico confocale di condrociti coltivati in idrogel 3D per 21 giorni in idrogel PA204-2 e PA204-2A: (a) colorazioni CTG, PI, DAPI; (b) colorazione del collagene di tipo I (verde) e di tipo II (rosso). Scala = 100 μ m (Jiménez et al, 2019).

In merito, sono stati realizzate due tipologie di idrogel con diverse concentrazioni di acqua e porogeni, il PA204-2 (2% PEG, 20% acqua) e il PA204-2A (4% PEG, 30% acqua).

Facendo riferimento alla figura (Figura 19a), si può notare che entrambi gli idrogel nelle rispettive varianti liofilizzate e non, sono stati in grado di mantenere la vitalità cellulare: per gli idrogel in PA204-2 L, PA204-2 NL e PA204-2A NL la frazione di cellule vive è stata pari al 98-99% mentre nel caso del PA204-2A L si aggirava attorno al 60%. La componente cellulare viva è individuata dalla colorazione verde (CTG) mentre le cellule morte sono evidenziate in rosso dallo ioduro di propidio (PI).

Si può notare dalla figura (Figura 19a) che il processo di liofilizzazione nel caso del polimero PA204-2, contenente l'agente porogeno (PEG) in minori quantità, portava a un aumento della colorazione verde quindi a un migliore ancoraggio delle cellule all'interno dell'idrogel; al contrario, nel caso del materiale PA204-2A, già sufficientemente poroso, il processo di liofilizzazione portava a eccesso di porosità, impedendo così ai condrociti di legarsi a bordo dello scaffold.

Ulteriori analisi al microscopio ottico (Figura 19b) hanno dimostrato che l'idrogel in PA204-2 è stato in grado di produrre notevoli quantità di matrice extracellulare con elevata espressione

di collagene di tipo II (in rosso) e quasi totale assenza del collagene fibrotico di tipo I (verde), al contrario nel PA204-2A non sono presenti adeguati livelli di marker cellulari, indice di una scarsa attività secretoria.

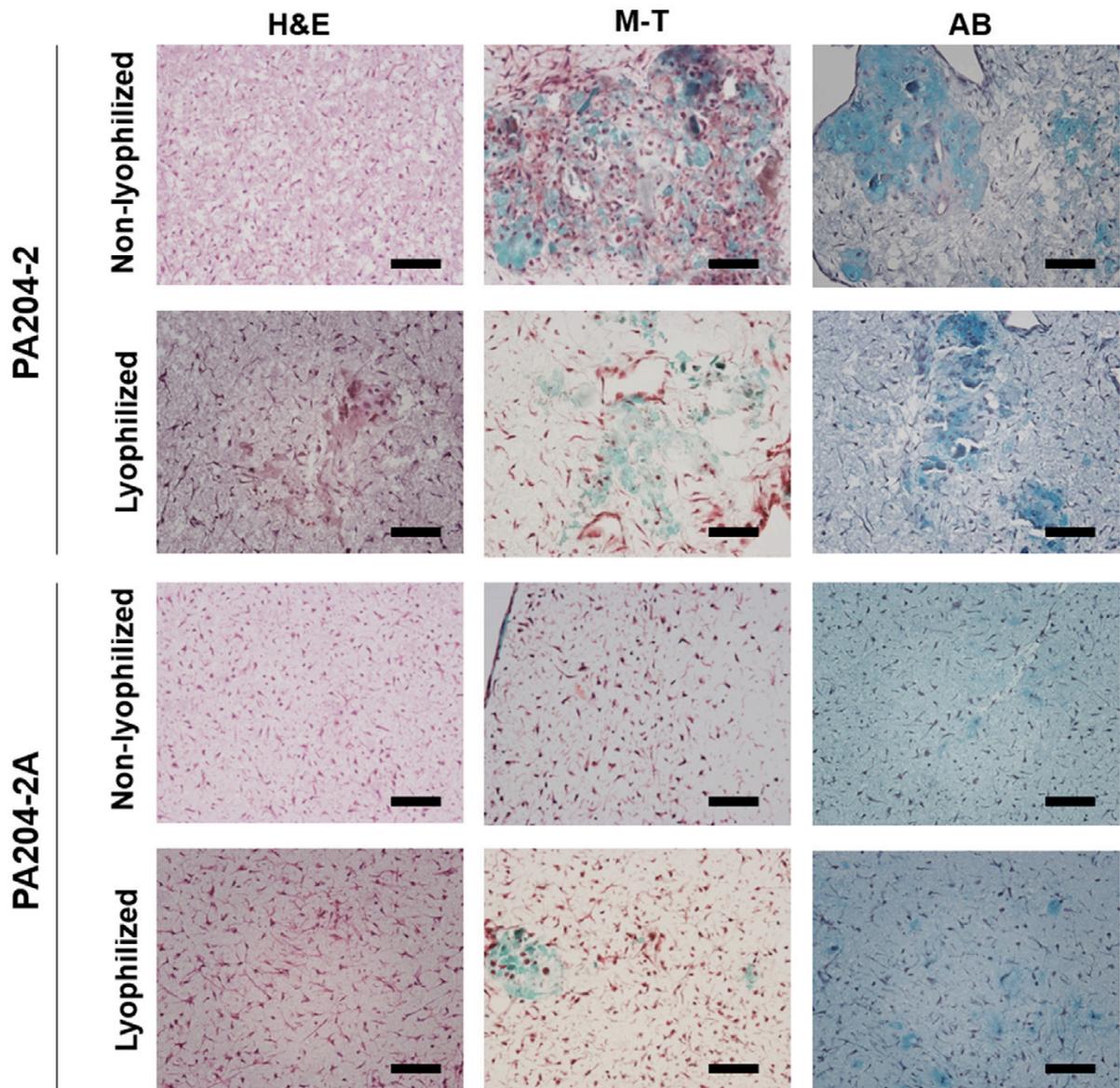


Figura 20. Analisi istologica di idrogel in PA204-2 e in PA204-2A dopo 21 giorni di coltura; colorazioni: H&E (ematossilina e eosina), M-T (Massons trichrome) e AB (Alcian blue). Scala = 100 μ m (Jiménez et al, 2019).

Irisultati ottenuti dalle analisi istologiche (Figura 20), hanno confermato la presenza di fattori di produzione nella matrice extracellulare della cartilagine.

Osservando la colorazione H&E si è notata una buona penetrazione delle cellule in tutti i campioni, rappresentata dalla tipica colorazione rosea del citoplasma; tuttavia nel caso di

idrogel realizzato in PA204-2 è stato evidente il maggior numero di compartimenti (DNA, RNA, Reticolo Endoplasmatico Rugoso) colorati in viola dall'ematossilina. L'elevata densità di tali elementi è indice di una buona integrazione tra le popolazioni cellulari e il neo tessuto ospite.

La colorazione M-T (Massons-trichrome) permette di distinguere la sostanza amorfa che circonda le cellule: in verde sono rappresentate le fibre di collagene, visibilmente presenti nell'idrogel in PA204-2, in rosa il citoplasma e in marrone scuro i nuclei cellulari. Infine nell'ultimo test è stato utilizzato il colorante AB (Alcian blue), che è in grado di legare i polianioni tissutali come i proteoglicani contenenti GAG. Anche in questo caso la struttura in PA204-2 ha evidenziato i migliori risultati. L'idrogel realizzato in PA204-2A è stato dunque escluso da ulteriori studi per una presenza inferiore di markers condrogenetici.

Dalle analisi effettuate in PCR real-time ricaviamo i seguenti dati (Figura 21):

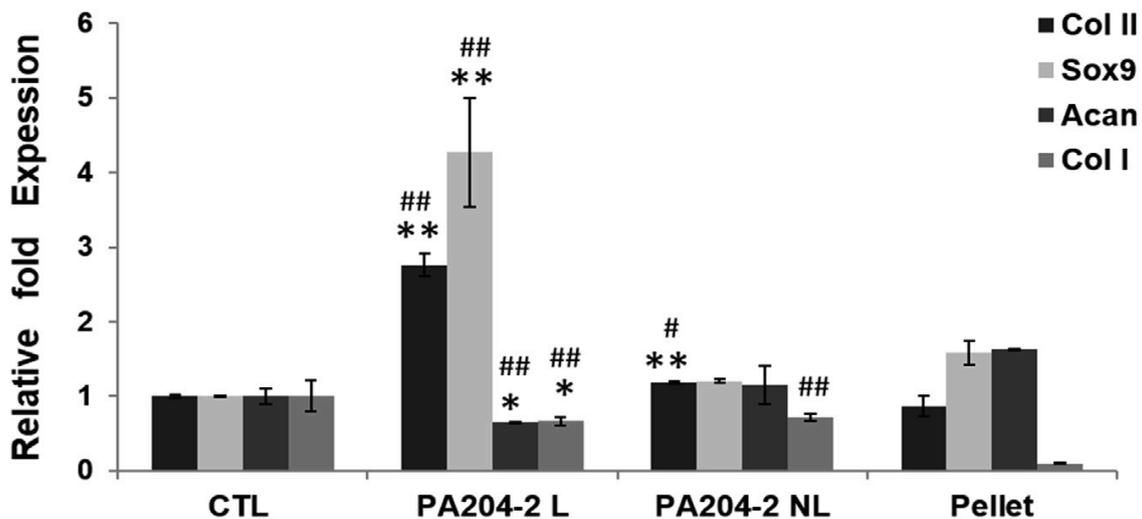


Figura 21. Analisi in PCR quantitativa real-time di markers condrogenetici. Le espressioni dei geni sono normalizzate con i valori della coltivazione di condrociti per 21 giorni in un mezzo di coltura standard (CTL). I condrociti coltivati in un sistema a pellet (materiale compatto che resta sul fondo a seguito di centrifugazione cellulare) per 21 giorni sono utilizzati come controllo del sistema di coltura 3D (Jiménez et al, 2019).

Markers condrogenetici:

- Col II: collagene di tipo II, cioè la tipologia di collagene più diffusa nella cartilagine ialina articolare;

- Sox9: proteina appartenente al complesso HMG-box, impiegato nell'attacco al DNA in fase di replicazione o trascrizione, agisce favorendo il processo di differenziazione condrogenetica;
- Acan: aggreganti, macromolecole formate da più proteoglicani, si legano al collagene, vengono prodotti e rilasciati dai condrociti;
- Col I: collagene di tipo I, rappresenta la tipologia di collagene fibroso generalmente assente nella cartilagine articolare.

Dal grafico in figura (Figura 14) si nota chiaramente un netto aumento dei marker condrogenici (Col II e Sox9) e una diminuzione del fenotipo fibroso (Col I) nell'idrogel liofilizzato se paragonato agli altri 3 casi (idrogel non liofilizzato, CTL e Pellet).

Il campione di condrociti, coltivato nel mezzo di coltura standard (CTL), è importante per comprendere se è avvenuta la produzione di matrice extracellulare e quantificare la concentrazione dei vari markers. Confrontando i risultati dell'idrogel in PA204-2 liofilizzato rispetto al CTL è possibile affermare che scaffold realizzati con tale polimero stimolino la produzione di nuova cartilagine.

Il campione in pellet, invece, viene impiegato come riferimento, per confrontare la crescita dei condrociti con un sistema 3D che non utilizza polimeri ma solo materiale biologico ottenuto direttamente dalle cellule. Anche in questo caso, le analisi in PCR confermano un netto incremento dei due markers (Col II e Sox9) nell'idrogel in PA204-2 liofilizzato, perciò il suddetto polimero è dotato di elevata bioattività.

Per quanto riguarda l'idrogel in PA204-2 non liofilizzato, si può notare una modesta produzione di Col II e Sox9 rispetto ai campioni coltivati in CTL e un aumento del marker fibrotico (Col I) rispetto alla coltivazione in Pellet. Perciò scaffold realizzati con questo tipo di polimero, tendono ad avere un buon grado di integrazione tissutale ma sono caratterizzati da bioinerzia, limitandosi alla sola sostituzione della cartilagine senza provvedere efficacemente alla sua sintesi.

Infine, per completare le opportune valutazioni sul fenotipo dei condrociti coltivati nelle due varianti liofilizzata e non liofilizzata dell'idrogel polimerico, si riportano di seguito (Figura 22) due grafici: il primo mostra la frazione di GAG (glicosaminoglicani) presente nella matrice e il secondo l'andamento della replicazione cellulare nel tempo.

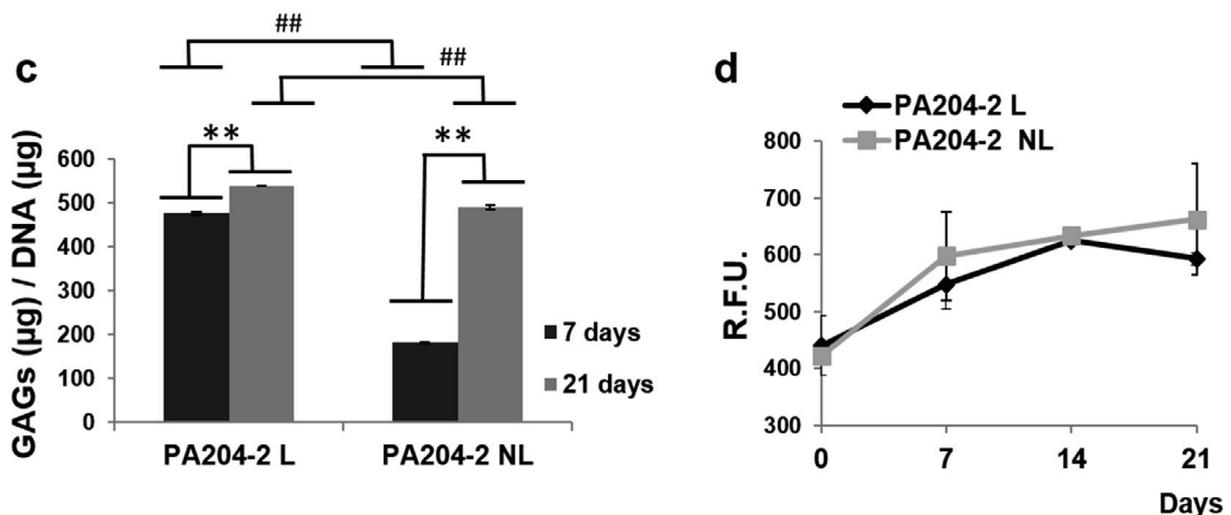


Figura 22. *Analisi del fenotipo dei condrociti: (a) Misura del contenuto di GAG; (b) Proliferazione e attività metabolica esaminate attraverso test con Alamar blu. (Jiménez et al, 2019).*

I GAG prodotti dai condrociti durante la coltura in vitro, vengono disciolti da enzimi proteolitici e successivamente quantificati attraverso spettrofotometro, preceduto da colorazione con l'1,9-Dimetilmetilene Blu. Trascorsi i 21 giorni di coltura, entrambi gli idrogel dimostrano un significativo aumento. Il valore massimo viene riscontrato nel caso di idrogel liofilizzato che mantiene sin dalla prima settimana quantità molto elevate di GAG (Figura 22a). L'idrogel in PA204-2 liofilizzato si è dimostrato una scelta vantaggiosa per sostenere il mantenimento del fenotipo dei condrociti dimostrando la composizione della matrice extracellulare simile a quella della cartilagine naturale.

I risultati ottenuti con i test all'Alamar blu (Figura 22b) dimostrano che la proliferazione dei condrociti è costante e simile in entrambi gli idrogel, con un significativo incremento del numero di cellule ai 21 giorni, perciò il processo di liofilizzazione non incide sull'adesione e sul metabolismo cellulare.

2.4 DESCRIZIONE DEI RISULTATI A SEGUITO DELL'IMPIANTO IN VIVO

Infine si è proceduto con la verifica dei risultati precedentemente ottenuti in condizioni di sperimentazione in vivo. La biocompatibilità, dell'idrogel liofilizzato e non liofilizzato, è stata

testata in un modello di topo, per questo vengono eseguiti due esperimenti, il primo effettuato su un topo immunocompetente (CD-1) e il secondo su un topo immunodeficiente (NSG). Entrambi vengono mantenuti in sistemi microventilati per eliminare eventuali agenti patogeni, sottoposti a 12 ore di luce seguite da 12 ore di buio, con cibo e acqua presente in base alla necessità. Dopo 3-4 settimane si è estratto lo scaffold.

2.4.1 IMMUNOCOMPETENTE (CD-1)

Per il primo test viene scelto un topo immunocompetente per testare la biocompatibilità dell'idrogel senza carica cellulare. In questo modo i risultati ottenuti saranno focalizzati esclusivamente alla componente ingegneristica ovvero sul copolimero PA204-2, così da poter analizzare la reazione post trapianto e l'integrazione del neo tessuto.

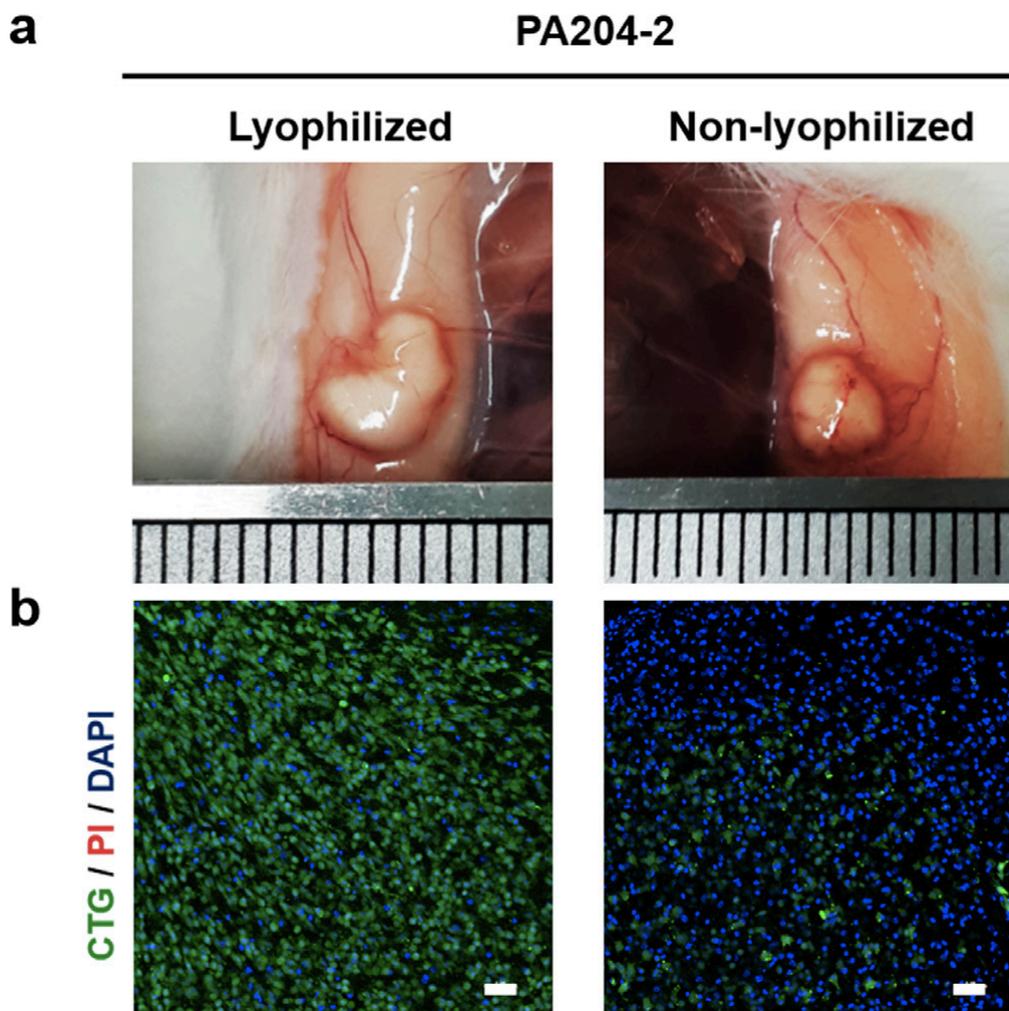


Figura 23. Biocompatibilità in vivo di idrogels in PA204-2: (a) Immagine di idrogels dopo l'impianto nel topo CD-1, e integrazione con il tessuto circostante dopo 3 settimane; (b) Immagini al microscopio ottico confocale di idrogels prelevato dal topo e fissato con CTG e PI. Scala = 100 μm (Jiménez et al, 2019).

Trascorse 3 settimane dall'impianto dello scaffold nel tessuto sottocutaneo del topo (CD-1), l'idrogel è stato prelevato e analizzato, mostrando una buona integrazione nel tessuto ospite, circondato su tutta la superficie da uno strato di tessuto connettivo. Lo scaffold ha mantenuto la sua forma e integrità, senza alcun segno di edema o risposta immunitaria. È possibile osservare dalla figura (Figura 23a) che nel caso di idrogel realizzato in PA204-2 liofilizzato si ha una migliore unione al tessuto sottocutaneo e lo scaffold appare circondato da uno strato più spesso di tessuto connettivo. L'idrogel non liofilizzato evidenzia un maggior numero di vasi che possono far pensare a un principio di infiammazione.

Dalle analisi con i traccianti CTG e PI è possibile mappare rispettivamente, il numero di cellule metabolicamente attive e quelle morte (Figura 23b). Le analisi in fluorescenza mostrano la forte proliferazione cellulare e la profonda colonizzazione dell'idrogel estesa a tutta la superficie, con una vitalità cellulare pari al 100%.

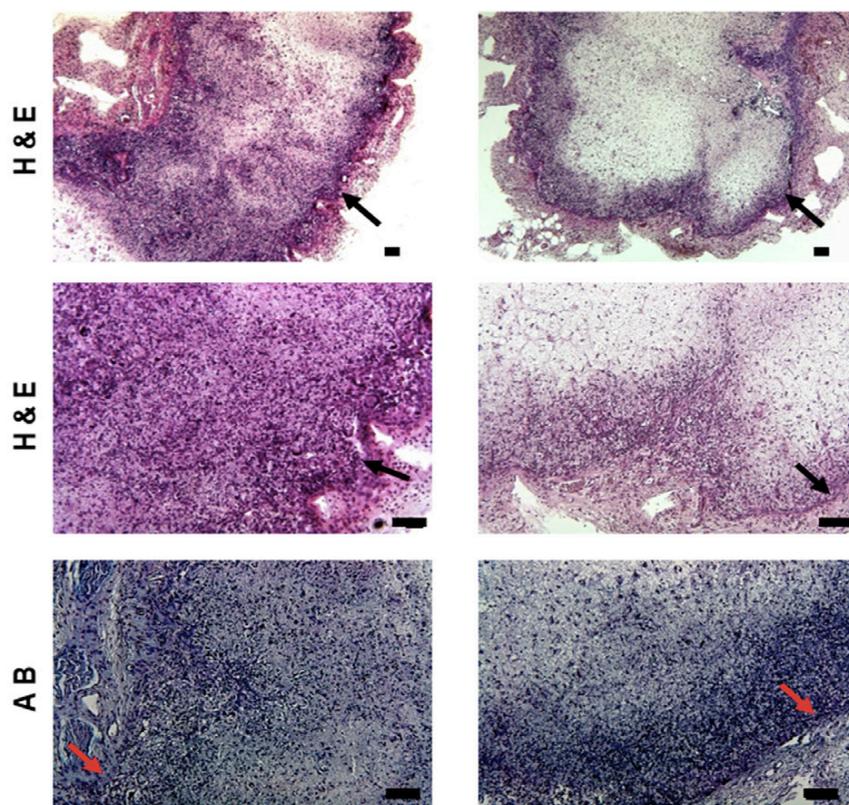


Figura 24. Indagini istologiche di una sezione di idrogel attraverso colorazione ematossilina e eosina (H&E), Alcian blue (AB). Scala = 100 μm (Jiménez et al, 2019).

Le analisi istologiche rivelano che l'idrogel liofilizzato possiede cellule in grado di secernere un quantitativo maggiore di matrice extracellulare. Le frecce in figura (Figura 24) indicano i punti di interfaccia tra il tessuto connettivo e l'idrogel: la linea di separazione tra le due componenti è poco evidente nel caso di scaffold liofilizzato. Nella colorazione AB si raggiunge quasi l'omogeneità, cioè i proteoglicani prodotti dalle cellule del topo migrate nello scaffold, mostrano un fenotipo uguale a quello dei proteoglicani prodotti dal tessuto connettivo circostante.

2.4.2 IMMUNODEFICIENTE (NSG)

Nella seconda parte della sperimentazione in vivo vengono isolati i condrociti umani, coltivati e incapsulati nell'idrogel per 21 giorni. Successivamente viene trapiantato lo scaffold nel tessuto sottocutaneo del topo immunodeficiente (NSG) e prelevato 4 settimane dopo per ulteriori analisi.

L'utilizzo di idrogel carico di cellule serve per esaminare la composizione della matrice extracellulare.

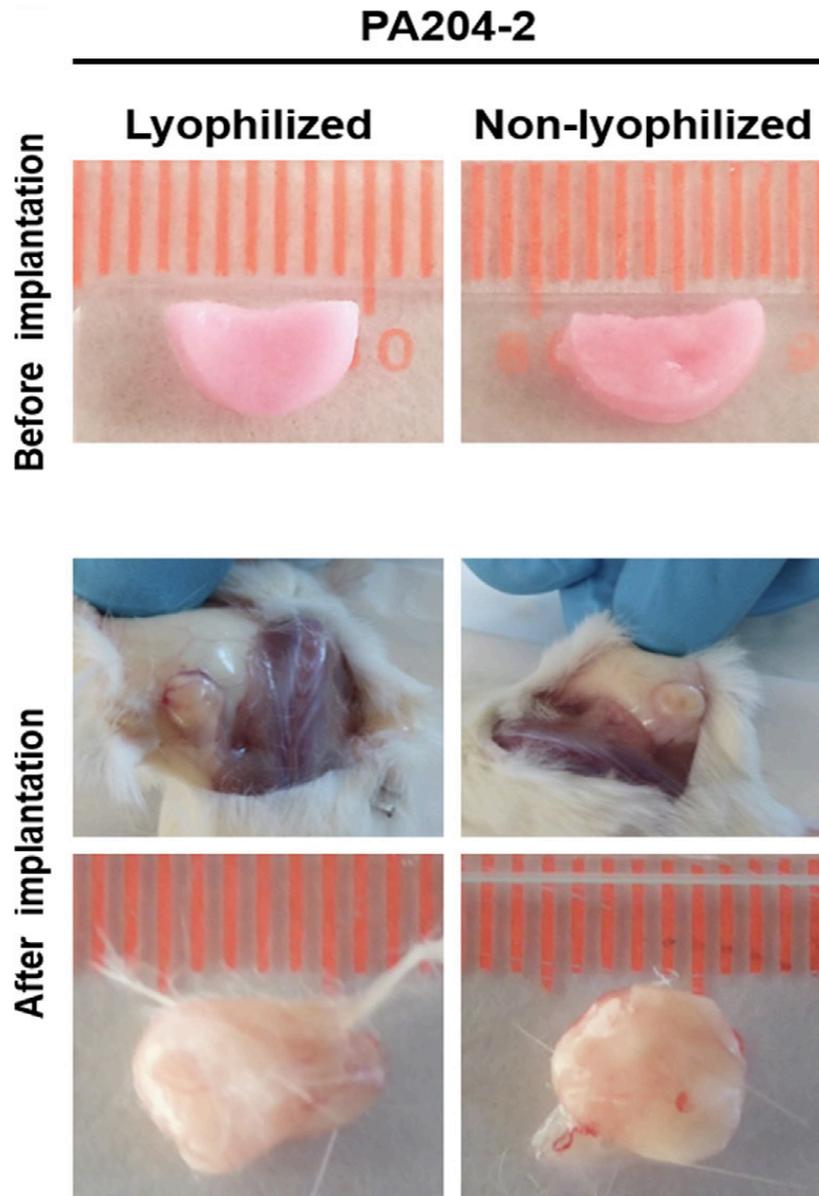


Figura 25. Immagine rappresentativa degli idrogels prima e dopo l'impianto nel topo immunodeficiente (NSG) (Jiménez et al, 2019).

L'idrogel ha dimostrato di essere stato ben accettato dal tessuto ospite (Figura 25), si è notato infatti un notevole incremento della dimensione dello scaffold dopo l'impianto, nettamente superiore alle dimensioni iniziali, e un aumento della vitalità cellulare pari al 99% nel caso liofilizzato e al 94% se l'idrogel non subisce liofilizzazione. I risultati mostrano, in ogni caso, elevata biocompatibilità e integrazione da parte di entrambi i tipi di idrogel in PA204-2, evidenziando la formazione di neo tessuto sullo scaffold impiantato.

Sono infine state effettuate ulteriori analisi (non riportate) di tipo istologico (H&E, AB, MT) e indagini al microscopio ottico a scansione (CTG, PI) che riportano la presenza di una struttura interna ben organizzata, con condrociti isolati in lacune e una matrice extracellulare formata da fibre di collagene e proteoglicani: tutti gli elementi tipici del tessuto cartilagineo originale.

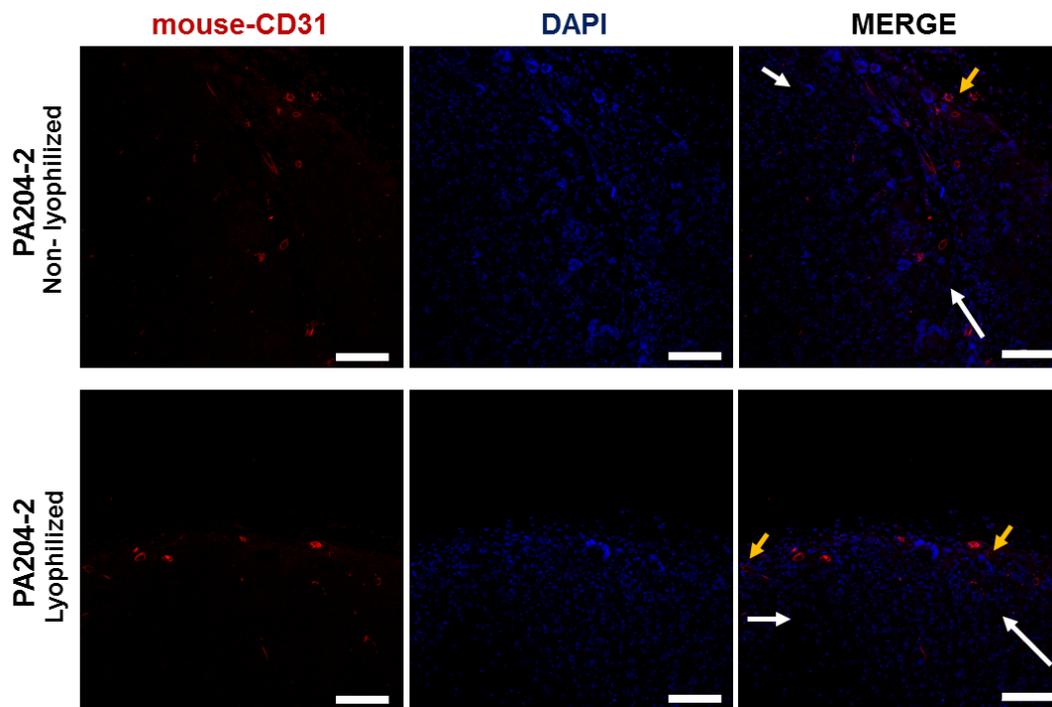


Figura 26. Immagine al microscopio confocale a scansione laser riportante la colorazione dei vasi sanguigni dopo l'impianto in vivo. Scala = 100 μ m. (Jiménez et al, 2019).

Le indagini in immunofluorescenza hanno permesso di individuare la presenza di vasi sanguigni. Nella figura (Figura 26), le frecce bianche indicano i punti di legame tra l'idrogel e il tessuto connettivo. Le frecce gialle, invece, indicano il legame con l'anticorpo CD31 del topo, evidenziando piccoli vasi nel tessuto circostante. Non è stato riscontrato alcun legame con anticorpi CD31 all'interno dell'idrogel, data l'assenza di vascolarizzazione. I risultati descritti dall'immunofluorescenza confermano l'accentuata biocompatibilità e la capacità biosostitutiva dello scaffold.

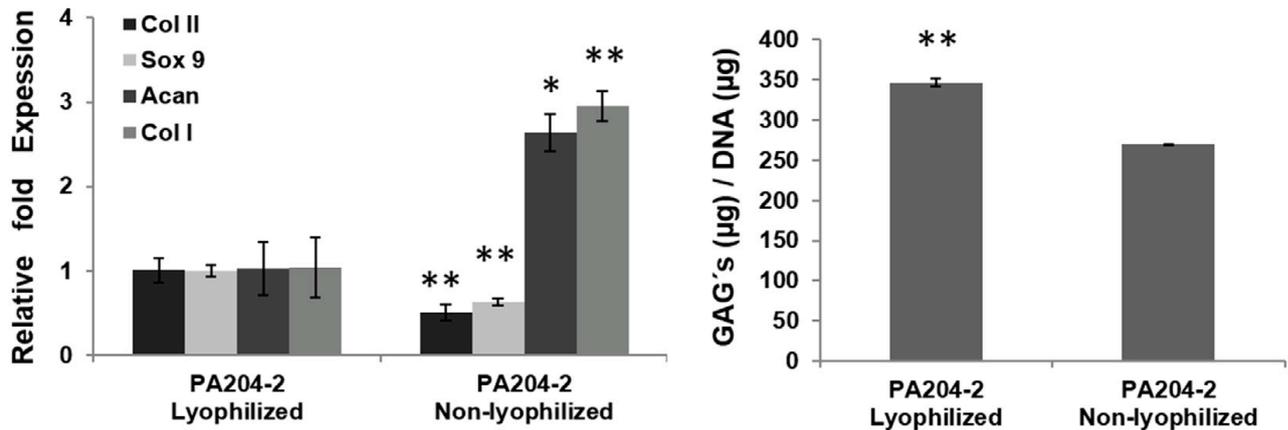


Figura 27. Immagine dei risultati ottenuti mediante PCR (Jiménez et al, 2019).

Le analisi dell'espressione genica (Figura 27) mostrano un aumento dei markers condrogenetici (Col II e Sox9) e dei glicosaminoglicani (GAG) nell'idrogel liofilizzato in confronto a quello non liofilizzato. Quest'ultimo, se da un lato mostra il triplo della concentrazione del marker fibrotico (Col I), dall'altro possiede valori superiori del mRNA che codifica per gli aggreganti (Acan).

In entrambi gli idrogel si ottiene un neo tessuto valido: nel caso di PA204-2 L più morbido, per la presenza di collagene di tipo II ed idrofilico, per l'elevato numero di GAG che intrappolano le molecole d'acqua; invece nel PA204-2 NL il materiale biologico neo formato sarà compatto (elevato Acan) e rigido (elevato Col I).

In definitiva, entrambe le varianti ricavate dal PA204-2 mostrano una buona integrazione in vivo, sebbene l'idrogel liofilizzato dimostra di avere un maggiore potenziale nel generare un tessuto simile alla cartilagine ialina articolare.

CAPITOLO 3 - CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Le problematiche legate a lesioni della cartilagine come l'OA, rappresentano la prima patologia cronica per incidenza in Italia, considerando l'aumento della prospettiva di vita delle persone, i danni all'apparato locomotorio costituiscono un deficit spesso invalidante che comporta la riduzione dell'attività sportiva e del movimento in generale. Da queste limitazioni, oltre a compromettere l'assetto corporeo e provocare danni ad altri tessuti limitrofi come l'osso e la muscolatura, ne conseguono problematiche assai più gravi, associate a uno stile di vita costretto alla sedentarietà, come le patologie cardiovascolari (1° causa di morte in Italia).

Occorre dunque prestare molta attenzione alla salute e cura di tali patologie. La scienza si è evoluta nel corso degli anni, mettendo a frutto le conoscenze maturate nell'ambito dell'ingegneria tissutale. Le cure originariamente utilizzate erano focalizzate alla sostituzione totale dell'articolazione mediante protesi, con annesse problematiche quali corrosione, rottura, rigetto e sostituzione, che avrebbero potuto portare ad ulteriori interventi molto invasivi. Attualmente, si cerca principalmente di sostituire il tessuto cartilagineo danneggiato intervenendo mediante trapianto di scaffold 3D. Questi ultimi, generalmente vengono realizzati con collagene suino o acido ialuronico come mezzo di coltivazione dei condrociti, tecnica che soffre per la discreta possibilità di reazioni immunitarie ed anche per la scarsa durabilità del materiale biologico utilizzato. Manca, dunque, una ricerca approfondita sul materiale da impiegare per supportare al meglio la crescita dei condrociti e che sia dotato di una struttura in grado di mantenersi intatta all'interno del paziente per un tempo consono alla guarigione.

Grazie allo studio condotto da *Jiménez et al. (2019)* è stato individuato il copolimero PA204-2 poli (metilmetacrilato-co-acido metacrilico), utilizzato, insieme ad opportuni cross-linker (PEGDA) e porogeni (PEG), per la realizzazione di idrogel (liofilizzato e non liofilizzato). Il PA204-2 crea la nicchia appropriata per la crescita dei condrociti e il mantenimento del loro fenotipo in colture a lungo termine.

I test in vivo sono stati effettuati sul modello animale dei topi, i risultati mostrano: il fenotipo dei condrociti ben differenziato da quello delle altre cellule, intensa proliferazione cellulare e buona secrezione di matrice extracellulare simile a quella della cartilagine articolare. Il polimero PA204-2 liofilizzato può quindi essere un ottimo candidato per la rigenerazione del tessuto cartilagineo, superando le limitazioni imposte dal corrente approccio basato su scaffold.

L'impiego di tale metodologia non è ancora stato approvato. Sarebbero necessari ulteriori studi del comportamento dell'idrogel carico di cellule su un organismo immunocompetente. Nel manoscritto di Jiménez et al. (2019) le sperimentazioni in vivo sono state fatte su topi immunocompetenti, trapiantando il solo idrogel sprovvisto di cellule, per testarne la biocompatibilità, e su topi immunodeficienti, trapiantando l'idrogel e i condrociti, per valutare la composizione della matrice extracellulare neo secreta. Tuttavia non essendo possibile trapiantare lo scaffold carico di cellule umane, in un topo immunocompetente, a seguito di uno scontato fallimento dovuto a reazione immunitaria; sarebbe opportuno testare la terapia completa (idrogel e cellule) su animali con sistema immunitario più simile a quello umano (suino). In questo modo la conoscenza sulla biocompatibilità sarebbe più prossima ad una futura sperimentazione della suddetta terapia sull'uomo.

CAPITOLO 4 - APPENDICE - MATERIALI E METODI

PROVA A COMPRESSIONE

Nello studio di Jiménez è stata eseguita una prova a compressione monotona a velocità costante (10 $\mu\text{m/s}$) a temperatura costante (37°C) tramite reometro (DHR-2, TA Instruments) per caratterizzare le proprietà meccaniche dell'idrogel realizzato in poli (metilmetacrilato-co-acido metacrilico).

Per prima cosa, servendosi di un calibro, è stata misurata la geometria del provino: larghezza, lunghezza e spessore. Successivamente è stato posizionato nella cella di carico del reometro a piatti piani paralleli, che sono stati precedentemente sabbiati per evitare l'artefatto da scivolamento che potrebbe introdurre errore in fase di misurazione ed anche nell'elaborazione dati. Tramite software: è stata impostata la velocità di scorrimento del braccio principale che andrà ad insistere sul provino e sono stati inseriti i dati geometrici dello scaffold per consentire il calcolo delle tensioni (σ) e delle deformazioni (ϵ), date in funzione delle rispettive variabili sforzo normale (N) e spostamento (L). Nel corso dell'esperimento sono stati campionamenti i valori di tensione e deformazione, i quali sono stati utilizzati per tracciare il diagramma $\sigma - \epsilon$. Attraverso uno studio di ottimizzazione si è ricercata la retta che meglio approssima i dati sperimentali relativi al comportamento elastico, e dal calcolo della pendenza di tale retta ne è stato ricavato il modulo elastico (E) caratteristico dell'idrogel in PMMA-MAA.

ANALISI AL MICROSCOPIO OTTICO A SCANSIONE AMBIENTALE (ESEM)

Le indagini svolte con ESEM sono state precedute da un'accurata preparazione dei campioni analizzati. I provini sono stati fissati mediante glutaraldeide al 2% per 4 ore a 4°C e successivamente sono stati risciacquati con acido dimetilarsinico (DMAA). Le osservazioni fatte al microscopio iniziano a una pressione 5.7 torr. A questa pressione era presente una fase liquida di acqua nel campione e l'umidità relativa raggiungeva il 100%. Successivamente la pressione del vapore è stata diminuita lentamente fino a 2.5 torr finché la superficie del campione diventò visibile e la temperatura mantenuta a -10°C. Venne impostata la tensione di accelerazione a 15 kV, sono state ottenute immagini a buona risoluzione usando una corrente a

fascio ridotto e una distanza di lavoro da 5.5 a 6.9 mm. L'ESEM utilizzato in questo lavoro è un Quanta 400 (FEI) situato presso il Centro di Strumentazione Scientifica dell'Università di Granada.

TEST SULLA VITALITÀ CELLULARE

La vitalità dei condrociti coltivati nell'idrogel è stata determinata usando marcatori quali Cell Tracker Green (CTG) e ioduro di propidio (PI) che si legano rispettivamente alle cellule vive e a quelle morte.

Inizialmente i campioni sono stati lavati due volte con PBS (tampone fosfato salino) e incubati per 15 minuti a 37°C con CTG (Invitrogen) e 25 µg/mL di PI. Successivamente i campioni vengono rilavati due volte con PBS, fissati con paraformaldeide (PFA) al 4% nel PBS per 20 minuti a temperatura ambiente e colorati con DAPI. Le immagini sono state acquisite tramite microscopio confocale (Nikon Eclipse Ti-E A1, USA) e analizzate utilizzando il software NIS-Elements. La vitalità cellulare è stata quantificata usando il software ImageJ (v 1.43, NIH) contando le cellule macchiate in rosso (PI) e in verde (CTG).

IMMUNOFLUORESCENZA

Per colorazioni tramite immunofluorescenza i campioni sono stati fissati con paraformaldeide (PFA) al 4% nel PBS per 20 minuti a temperatura ambiente. Per la colorazione intracellulare, i campioni sono stati resi permeabili con Triton X-100 allo 0.1% per 15 minuti. Successivamente sono stati sezionati i tessuti che si vogliono analizzare e sono stati mantenuti per 1 ora a temperatura ambiente con albumina di siero bovino (BSA) al 5%, siero fetale bovino nel PBS e successivamente incubato con Col I (sequenza di DNA che codifica per il collagene di tipo I) (SC25974, St. Cruz) e Col II (sequenza di DNA che codifica per il collagene di tipo II) (SC52658, St. Cruz) e con l'anticorpo CD31 umano / topo (Monoclonal Mouse Anti-Human CD31, Endothelial Cell) per tutta la notte a 4°C.

Il giorno seguente, i campioni sono stati lavati tre volte con PBS e incubati con l'appropriato anticorpo secondario (Santa Cruz) per 1 ora a temperatura ambiente, successivamente vengono

lavati per altre tre volte con PBS e poi uniti al mezzo di coltura e al colorante DAPI. Le immagini sono state acquisite dal microscopio confocale (Nikon Eclipse Ti-E A1, USA) e analizzate usando NIS-Elements software.

ANALISI ISTOLOGICHE

Inizialmente i campioni sono stati immersi in paraformaldeide al 4% unita a tampone fosfato salino (PBS) al 0.1 M per 4 ore a 4°C, poi sono stati lavati nel PBS al 0.1 M e integrati con paraffina nel processatore di tessuti automatico (TP1020, Leica, Germany). I blocchetti di paraffina sono stati tagliati in sezioni di 4 µm per la colorazione. L'osservazione al microscopio ottico e l'acquisizione di immagini digitali, è stata effettuata con un microscopio invertito (Nikon H550s). Alcian blu rivela la presenza di GAG (blu) e quindi anche di proteoglicani, mentre il Masson-trichrome mostra la presenza delle fibre di collagene (verde). Ematossilina-eosina consente di individuare i condrociti ben isolati in lacune andando a legare con porzioni di DNA o RNA.

ANALISI IN PCR REAL-TIME

Per questo tipo di analisi è stato necessario isolare anticipatamente l'RNA utilizzando TriReagent (Sigma), in seguito i filamenti di RNA sono stati retrotrascritti in DNA utilizzando il kit Reverse Transcription System mix (Promega). L'esperimento in PCR real-time è stato eseguito utilizzando il Master mix SYBR-Green (Promega), contenete precursori ed enzimi, in accordo con il protocollo fornito dal produttore. Le reazioni in PCR sono state eseguite in questo modo: inizialmente si è effettuata una denaturazione iniziale a 95°C per 2 minuti, successivamente si è proceduto con 40 cicli in sono state alternate temperature di 95°C per 5 s a temperature di 60°C per 30 s e infine è stato effettuato sui campioni un ciclo di dissociazione di 60 – 95 °C. I livelli di espressione genica sono stati normalizzati ai valori della gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) e sono mostrati come variazione relativa rispetto al valore del campione di controllo (calibratore). L'esperimento su tutti i campioni è stato eseguito tre volte per ciascun gene.

ANALISI DEL DNA E DEI GLICOSAMINOGLICANI (GAG)

Inizialmente gli idrogels sono stati trattati con pepsina (1 mg/mL in una soluzione di acido acetico allo 0.5 M e NaCl allo 0.4 M) (Sigma) per 5 giorni a 4°C e successivamente con l'enzima elastasi (1 mg/mL in una soluzione contenete tampone tris salino (TBS) a pH 8) (Serva Electrophoresis) per 3 giorni a 4°C. In seguito i campioni sono stati centrifugati a 10000 giri/minuto per 10 minuti, e poi conservati a -20°C fino a quando non sono stati analizzati per ricercare il contenuto di DNA e di GAG. Il contenuto totale di GAG è stato misurato dall'assorbanza dei campioni utilizzando un test spettrofotometrico in 1,9-Dimetilmetilene Blu (DMMB) a 570 nm (Titertek multiscan colorimeter, Flow Laboratories) e condroitin solfato come standard di riferimento. Invece il contenuto di DNA in ogni campione è stato misurato utilizzando uno spettrofluorimetro per mezzo di tracciante DAPI a 460 nm (Synergy HT, BIO-TEK).

TEST CON ALAMAR BLU

L'esperimento con Alamar blu è stato utilizzato come indice di misura per la determinazione della vitalità cellulare sugli idrogels. La crescita dei condrociti è stata analizzata in diversi momenti: 0, 7, 14 e 21 giorni. La preparazione dei campioni è avvenuta attraverso incubazione con una soluzione di 10 µL di Alamar blu per ogni 100 µL di mezzo di coltura per 3 ore. A questo punto l'intensità della fluorescenza è stata misurata ad una lunghezza d'onda di eccitazione di 530 nm e di emissione a 590 nm (Synergy HT, BIO-TEK).

BIBLIOGRAFIA

- S. Bacci, A. Canapa, A.M. Cimini, C. Cioni, M. Colasanti, R. Colombo, C. Della Giovampaola, P. Deri, D. Ferri, R. Gornati, G.E. Liquori, C. Luparello, R. Nano, G. Odierna, E. Olmo, E. Ottaviani, G.C. Panzica, F. Rosati, A. R. Rossi, G. L. Sciola, F. Sinatra, *Biologia. Cellula e Tessuti*, Milano, Edi.Ermes, 2014;
- G. Jiménez, S. Venkateswaran, E. López-Ruiz, M. Perán, S. Pernagallo, J. J. Díaz-Monchón, R. F. Canadas, C. Antich, J. M. Oliveira, A Callanan, R. Wallace, R. L. Reis, E. Montañez, E. Carrillo, M. Bradley, J. A. Marchal, “*A soft 3D polyacrylate hydrogel recapitulates the cartilage niche and allows growth-factor free tissue engineering of human articular cartilage*”, *Acta Biomaterialia* 90 (2019) 146–156;
- E. Kon, G. Filardo, M. Berruto, F. Benazzo, G. Zanon, S. Della Villa, M. Marcacci, *Articular cartilage treatment in high-level male soccer players: a prospective comparative study of arthroscopic second-generation autologous chondrocyte implantation versus microfracture*, *Am J Sports Med.* 2011 Dec; 39(12):2549-57;
- P.C. Kreuz, M.R. Steinwachs, C. Erggelet, S.J. Krause, G. Konrad, M. Uhl, N. Südkamp, *Osteoarthritis Cartilage. Results after microfracture of full-thickness chondral defects in different compartments in the knee*, 2006 Nov; 14(11):1119-25;
- V. Kumar, A. K. Abbas, J. C. Aster, “*Le basi patologiche delle malattie. Malattie degli organi e apparati*”, Lavis (TN), Edra LSWR, 2015;
- E.A. Makris, A.H. Gomoll, K.N. Malizos, J.C. Hu, K.A. “*Athanasίου, Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage*”, *Nat. Rev. Rheumatol.* 11 (2014) 21–34;
- T. Minas, A. Von Keudell, T. Bryant, *The John Insall Award: A minimum 10-year outcome study of autologous chondrocyte implantation*, Gomoll AH *Clin Orthop Relat Res.* 2014 Jan, 472(1):41-51;
- C. Naeem, M. Mozafari, F. Sefat, “*Scaffolds for lung tissue engineering, Biomaterials*”, 2019, 427-448;
- R. Pietrabissa, “*Biomateriali per protesi e organi artificiali*”, Pàtron, 1996;
- H. Stenhamre, U. Nannmark, A. Lindahl, P. Gatenholm, M. Brittberg, *Influence of pore size on the redifferentiation potential of human articular chondrocytes in poly(urethane urea) scaffolds*, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 5 (2011) 578–588;

- T.Q. Trinh, J.D. Harris, R.A. D.C. Siston, Flanigan, *Improved outcomes with combined autologous chondrocyte implantation and patellofemoral osteotomy versus isolated autologous chondrocyte implantation*, *Arthroscopy*. 2013 Mar; 29(3):566-74;
- F. Zeifang, et al. *Autologous chondrocyte implantation using the original periosteum-cover technique versus matrix-associated autologous chondrocyte implantation: a randomized clinical trial*. *Am J Sports Med*. 2010, 38:924–933.