

MANTOVA CELL-FACTORY: UN MODELLO DI RIGENERAZIONE CUTANEA

S. Negri¹, N. Gasparato¹, C. Fila², N. Danese², S. Farinato¹, C. Bottoli¹, A. Bellomi¹¹Servizio di Anatomia Patologica, Azienda Ospedaliera "C. Poma", Mantova²Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, Azienda Ospedaliera "C. Poma", Mantova**Mantova cell factory: a model for skin regeneration**

Chronic wounds, including venous and arteriosclerotic leg ulcers, diabetic foot ulcers, decubitus and trauma-induced wounds, represent a major problem in our society. Because the incidence of chronic wounds is high, the socioeconomic impact is considerable. The problem increases as the average age of the population increases and so the research into wound healing is continuously on the move. The aim of our research was to develop an autologous skin substitute and to verify its efficacy in closing chronic ulcers that do not respond to the currently available wound-healing treatments (topical therapy, antibiotics, surgical cleansing, external compression).

Keratinocytes were obtained from the patients' foreskins. All medical procedures were undertaken with the approval of the ethics committee and with the patient's consent. In our survey we evaluated the possibility to grow autologous keratinocytes both with the "feeder-layer" method and on a type I collagen substrate.

Using the first method, we obtained a two-dimensional strip composed of a few layers of normally arranged keratinocytes; it was, however, very fragile and this may affect the efficacy in clinical use. When cells were grown on an appropriately treated type I collagen substrate, we obtained more layers of normally arranged keratinocytes which were also differentiated into basal, spinous, granular and keratin layers. In addition to keratinocyte reproduction, we obtained reproduction of melanocytes in the correct basal position.

The new skin substitute provides a new treatment option for chronic wounds that are refractory to conventional therapies. Adequate cytohistological and immunohistochemical analysis to evaluate the cells' correct morphology and phenotype is important in this technique. (G Ital Nefrol 2009; 26 (Suppl. S45): S69-73)

Conflict of interest: None

KEY WORDS:Collagen 1,
Autologous skin,
Immunochemistry,
Tissue-engineering,
Histology,
Chronic wounds**PAROLE CHIAVE:**Collagene I,
Cute autologa,
Immunoistochimica,
Ingegneria
tessutale,
Istologia,
Ulcere croniche✉ **Indirizzo dell'Autore:**Dr. Stefano Negri
Servizio di Anatomia Patologica
Azienda Ospedaliera "C. Poma"
Via Albertoni, 1
46100 Mantova
e-mail: STENE60@libero.it**INTRODUZIONE**

L'ingegneria tissutale ("Tissue Engineering", termine introdotto dalla fondazione *Washington National Science* nel *meeting* del 1987) è un'area multidisciplinare di ricerca che ha come scopo la rigenerazione di tessuti e organi danneggiati del nostro organismo, partendo dal presupposto che la quasi totalità delle cellule animali può essere coltivata in laboratorio (1).

Nel XX secolo i trapianti di tessuti (osso, muscolo e cute) e di organi (rene, fegato, polmone) sono stati

introdotti con successo nella pratica terapeutica grazie all'impiego di tecniche di anastomosi microvascolari e d'idonea terapia immunosoppressiva. Nonostante ciò, molti sono i problemi legati al trapianto di organi, tra i quali i più significativi sono:

- 1) scarsa disponibilità di tessuti e d'organi idonei al trapianto e conseguenti lunghi tempi di attesa;
- 2) necessità di sottoporre il paziente a terapia immunosoppressiva per tutta la vita con conseguenti deficit immunitari;
- 3) rischio di tromboembolia nel caso in cui vengano

utilizzati materiali sintetici (ad esempio per le valvole cardiache) e di emorragie conseguenti al trattamento anticoagulante;

- 4) necessità di sottoporre il paziente a più trapianti (ad esempio per rigetto tardivo o utilizzo in pazienti giovani di materiale sintetico non in grado di adeguarsi alla crescita corporea).

Il principio generale dell'ingegneria tessutale è quello di prelevare cellule staminali dallo stesso paziente bisognoso di trapianto, farle crescere e differenziare su un supporto in modo da produrre fedelmente e tridimensionalmente il tessuto o l'organo che deve essere sostituito; infine sottoporre il paziente al trapianto.

È molto importante che:

- 1) sia prodotta una grande quantità di cellule e di tessuto sufficiente per riparare il difetto;
- 2) sia garantita una giusta differenziazione cellulare in modo da mantenere un corretto fenotipo;
- 3) sia riprodotta una struttura tridimensionale identica al tessuto o organo da sostituire per garantire una corretta vascolarizzazione.

Le cellule adibite alle colture possono provenire da prelievi autologhi, omologhi o eterologhi. L'utilizzo delle cellule di origine omologa ed eterologa presenta il problema del rigetto e della sicurezza del campione; perciò è preferibile, quando possibile, utilizzare cellule di origine autologa.

Lo scopo di questa ricerca è di isolare cheratinociti umani e farli crescere in coltura in modo da formare lembi d'epidermide con caratteristiche morfofunzionali ed immuno-istochimiche molto vicine a quelle dell'epidermide normale. In un primo approccio è stata seguita la metodica "feeder-layer" ideata da Rheinwald e Green (2, 3). Questa tecnica presenta limiti che ne riducono la possibilità d'impiego: ridotto spessore dell'epidermide, fragilità, scarso attecchimento, lunghi tempi di coltura e soprattutto l'uso di enzimi nella fase di distacco delle lamine dalle piastre di coltura, con conseguente riduzione della vitalità cellulare.

Risulta quindi evidente la necessità di impiegare un supporto idoneo, da utilizzare come carrier per le cellule in coltura (ad esempio collagene o acido ialuronico) (4, 5).

MATERIALI E METODI

Colture di cheratinociti umani normali

I comuni terreni di coltura, quali il MEM (*minimal essential medium*) ed il DMEM (*Dulbecco modified eagle's medium*) contengono oltre a tamponi e a indicatori di pH, amminoacidi essenziali e non, sali inorganici, vitamine, basi azotate, glicidi, lipidi e richiedono di essere addizionati con quantità variabili di

siero animale di varia origine (ad esempio siero di vitello fetale). Il terreno di coltura deve essere sostituito ogni 2-5 giorni, secondo il consumo metabolico e della densità cellulare.

Alla coltura è spesso aggiunto un altro tipo cellulare che funge da supporto alla cellula da coltivare in modo da permettere di partire da densità di semina nettamente inferiore.

Nel caso di cheratinociti questa funzione è assolta dai fibroblasti 3T3 (una linea stabilizzata derivata da fibroblasti embrionali di topo di ceppo Swiss).

Le colture vengono mantenute in incubatori a temperatura (37 °C), umidità e 5% di CO₂. La sterilità è affidata all'impiego di terreni e di materiali sterili e a manipolazioni in ambiente controllato (cappa a flusso laminare).

I cheratinociti umani normali utilizzati per questa ricerca sono stati ottenuti da biopsie cutanee di pazienti sani d'età inferiore ai 20 anni, in quanto il numero di generazioni cellulari ottenibili in coltura è superiore rispetto alla cute di soggetti anziani.

In particolare abbiamo utilizzato la cute di prepuzio, poiché la resa delle colture ottenute da questa sede è particolarmente alta. Per ottenere un buon numero di cheratinociti attivamente proliferanti, la sospensione cellulare delle biopsie è stata dapprima seminata sui fibroblasti murini 3T3 trattati con mitomicina C (metodica "feeder-layer") e poi, raggiunta la subconfluenza, i cheratinociti sono stati riseminati su "feeder-layer" e su supporto di collagene tipo I.

Preparazione di una sospensione cellulare di cheratinociti

Le biopsie cutanee sono state dapprima liberate dal sottocutaneo e dal derma, poi trattate con antibiotici per una notte e infine ridotte a frammenti di circa 1 cm².

I lembi dermo-epidermici sono stati immersi in una soluzione di *dispase* allo 0.5% in una soluzione bilanciata di Hank per una notte a +4 °C. Questa proteasi neutra, agendo come una collagenasi di tipo IV, è in grado di separare l'epidermide dal derma a livello della lamina lucida e permette di ottenere dei lembi epidermici intatti e privi di contaminanti dermici. Dopo aver separato l'epidermide dal derma con l'aiuto di pinze, i lembi epidermici sono stati immersi per 20 minuti in una soluzione enzimatica costituita da tripsina 0.25% e EDTA 0.02% (agente chelante del calcio), dissociati completamente dall'agitazione meccanica finale per ulteriori 5 minuti. L'azione della tripsina è stata bloccata aggiungendo un volume uguale di terreno per coltura contenente siero di vitello fetale al 25%.

Infine la sospensione cellulare è stata filtrata con un

apposito filtro a porosità 100 µm per rimuovere i residui dei lembi epidermici non separati dalla tripsina (strato corneo, peli, ecc.) e gli aggregati cellulari.

Culture primarie di cheratinociti su fibroblasti 3T3

La sospensione di cheratinociti così ottenuta è stata utilizzata per una coltura primaria di cellule epidermiche coltivate su un substrato di fibroblasti 3T3, resi incapaci di dividersi trattandoli con mitomicina C. La loro funzione è quella di inibire la proliferazione dei fibroblasti umani contaminanti la sospensione di cellule epidermiche e, di "condizionare" il terreno facilitando la formazione delle colonie di cheratinociti e la proliferazione iniziale. Il terreno di coltura utilizzato è una miscela di: DMEM e Ham's F12 (3:1), addizionata del 10% di siero di vitello fetale, 4 mM di glutamina, 50 IU/mL di penicillina/streptomina e di numerosi fattori in grado di migliorare l'aderenza e la proliferazione cellulare (insulina 6 mg/mL, transferrina 5 mg/mL, adenina 0.18 mM, idrocortisone 0.4 mg/mL, triiodotironina 20 pM, tossina colerica 0.1 nM, EGF 10 ng/mL).

Le cellule vengono fatte crescere in incubatore a 37 °C con il 5% di CO₂ con cambio del terreno ogni 48 ore.

Formazione del lembo epidermico

Per i nostri esperimenti abbiamo preferito utilizzare colture di cheratinociti al secondo passaggio per evitare che le caratteristiche morfologiche e antigeniche delle cellule si modificassero stando a lungo in coltura. Per questo le colture primarie subconfluenti sono state lavate con il tampone PBS e trattate con EDTA 0.02% in PBS per togliere i fibroblasti residui; poi i cheratinociti sono stati trattati con tripsina 0.05%/EDTA 0.02% e riseminati su "feeder-layer".

Dopo circa 10 giorni la coltura secondaria viene distaccata enzimaticamente dal recipiente con dispase e fatta aderire su carta bibula. Si procede pertanto alla fissazione in formalina, inclusione in paraffina e all'esame istologico dopo opportune colorazioni.

Formazione del lembo epidermico con biomateriale di collagene

L'estrazione di cheratinociti avviene con lo stesso metodo utilizzato in precedenza. Alla confluenza dell'80% le cellule vengono staccate mediante tripsinizzazione dalla fiasca e seminate su supporto di collagene I (*Antema soft*, *Opocrin* S.p.A.). Quest'ultimo va opportunamente preparato, in quanto, prima della semina dei fibroblasti sulla lamina di collagene, è assolutamente necessario eliminare da esse tutto l'acido acetico.

Il giorno prima della semina dei fibroblasti la mem-

brana va pertanto lavata due volte con 3 mL di acqua sterile per 30 minuti e poi lasciata a bagno in 5 mL di acqua sterile a temperatura ambiente per una notte.

Il giorno dopo, previo controllo del PH dell'acqua (che deve essere neutro), la membrana va lavata tre volte per 15 minuti con 3 mL di PBS 1X e quindi incubata con 3 mL di DMEM completo per 5 minuti a 37 °C. A questo punto, dopo ulteriore controllo del PH del tampone, il film di collagene viene trasferito in piastre di coltura e lasciato in incubatore a 37 °C per circa 1 ora. Questo serve a far asciugare la membrana perché diventi supporto ideale per l'adesione dei 500000 fibroblasti mitomicinati. Dopo 24 ore vengono seminati i cheratinociti ad una densità di 1000000 cellule/cm². Il terreno viene cambiato ogni due giorni.

RISULTATI

Dopo 19 giorni dall'estrazione dei cheratinociti provenienti dalla biopsia cutanea e coltivate con metodica "feeder-layer", si ha la formazione di un lembo epidermico che si sottopone ad esame istologico per valutarne la morfologia.

Si possono notare (Fig. 1) alcune file di cellule che costituiscono gli strati basale, spinoso, granuloso e corneo (quest'ultimo poco rappresentato).

In questo studio sono stati presi in considerazione supporti per cellule epidermiche.

In particolare è stato utilizzato come supporto per le cellule epidermiche collagene di tipo I.

Il risultato ottenuto dopo 19 giorni è stato la formazione di un tessuto a crescita tridimensionale. All'esame istologico il frammento di cheratinociti e collagene, previa fissazione in formalina ed inclusione in paraffina, evidenzia la formazione di un epitelio differenziato e multistratificato molto simile a quello *in vivo* (Fig. 2), con presenza di melanociti basali (Fig. 3).

DISCUSSIONE

Le lamine di cheratinociti ottenute per espansione cellulare possono essere utilizzate sia nella terapia di estese perdite di sostanza cutanea (ustioni, ulcere, ferite post-traumatiche o chirurgiche, decubiti), sia per altre importanti patologie come per esempio la sindrome di Lyell e le malattie epidermolitiche congenite, al fine di favorire la riepitelizzazione delle lesioni (4).

Le principali indicazioni per l'impiego di cute da donatore sono le seguenti:

Perdita di sostanza chirurgiche:

- aree donatrici d'innesti autologhi;
- brecce operatorie da asportazione di nevi giganti;
- ricostruzione aree critiche del volto;

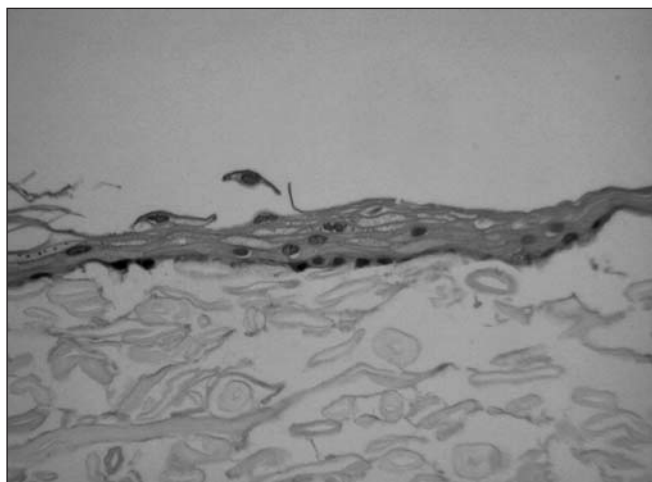


Fig. 1 - Ematossilina eosina 40 x.

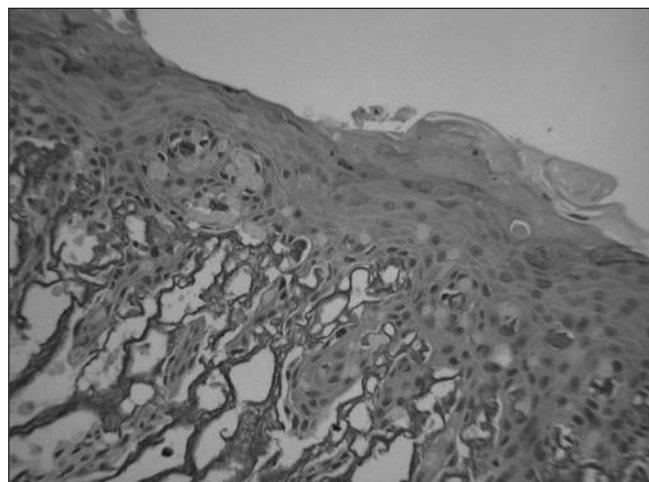


Fig. 2 - Ematossilina eosina 20 x.

- copertura temporanea dopo *laser-resurfacing* e dermoabrasione;
 - ricostruzione del setto nasale.
- Perdite di sostanza post-traumatiche:
- ustioni estese, parziali e a tutto spessore;
 - ustioni limitate, a tutto spessore, in sedi critiche (superfici plantari e palmari, volto);
 - ferite a tutto spessore (*scalping*, ferite lacero-contuse).

Perdita di sostanza patologiche:

- sindrome di Lyell;
- epidermolisi bollose congenite;
- ulcere flebopatiche;
- ulcere da decubito;
- ulcere diabetiche;
- ulcere trofiche in generale.

Nelle ustioni gravi o nelle ferite a tutto spessore le lamine d'epidermide ingegnerizzata possono essere utilizzate in associazione a innesti di cute omologa da donatore o tramite l'utilizzo dei sostituti dermici commerciali.

Questo tipo di trattamento consente di abbreviare i tempi di degenza e facilitare il recupero funzionale del paziente, con buoni risultati estetici.

Recentemente l'epidermide così ricostruita è stata impiegata con successo anche nella terapia della vitiligine (6), in quanto è possibile coltivare ed espandere in coltura sia i cheratinociti sia i melanociti del paziente e reimpiantarli successivamente al fine di ottenere la ripigmentazione delle aree acromiche.

L'ingegneria tissutale, inoltre, è in grado di offrire nuove opportunità per il trattamento del *photoaging*, grazie alla continua evoluzione nella ricerca sulle alterazioni indotte dal danno solare cronico e sui processi di riparazione tissutale.

Questo approccio terapeutico consente di ottenere eccellenti risultati in quanto riesce a combinare la

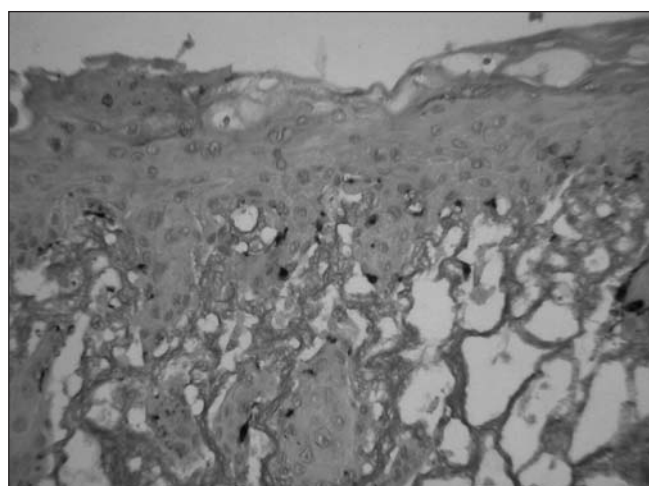


Fig. 3 - Immunoistochimica - Hmb45, evidenza i melanociti basali.

necessità di eliminare cellule che hanno subito un danno cumulativo (fotoesposizione cronica e invecchiamento cronologico) alla possibilità di apportare cellule non foto-danneggiate.

CONCLUSIONI

L'ingegneria tissutale rappresenta un importante e innovativo settore di sviluppo che ha come scopo la rigenerazione di tessuti ed organi danneggiati del nostro organismo. Essa punta alla soluzione di complessi problemi mediante l'interazione tra colture di cellule staminali mature e non, e supporti di materiale biologico e/o biosintetico.

Ciò richiede un approccio multidisciplinare con la collaborazione di medici, biologi, tecnici e industrie biotecnologiche.

Nel nostro studio abbiamo valutato la possibilità di

coltivare cheratinociti autologhi sia con metodo "feeder-layer" sia su substrato di collagene tipo I.

Abbiamo ottenuto nel primo caso un lembo bidimensionale costituito da pochi strati di cheratinociti normoconformati; tale lembo però ha dimostrato una certa fragilità che può inficiarne l'utilizzo clinico.

Nel secondo caso, cioè coltivando le cellule su substrato di collagene tipo I opportunamente trattato, abbiamo ottenuto più strati di cheratinociti normostrutturati e normodifferenziati in strato basale, spinoso, granuloso e corneo.

Assieme ai cheratinociti si riproducono anche i melanociti che si dispongono in corretta posizione basale.

Riteniamo che l'utilizzo di tali supporti per la crescita cellulare e, in particolare dei cheratinociti, rappresenti la soluzione ideale per i vari impieghi clinici (terapia d'ulcere, ustioni ed interventi di chirurgia ricostruttiva).

RIASSUNTO

Le ulcere croniche (ulcere arteriose e venose degli arti inferiori, quelle diabetiche, da decubito e post-traumatiche) rappresentano un importante problema nella nostra società, in quanto hanno una discreta incidenza sulla popolazione soprattutto anziana, persistono per un lungo periodo e pertanto hanno un grande impatto socio-economico. Scopo della nostra ricerca è di sviluppare un sostituto cutaneo autologo e di verificarne la sua efficienza

nella chiusura delle ulcere croniche che non rispondono alle terapie convenzionali (terapia topica, trattamento antibiotico, pulizia chirurgica, elastocompressione).

I cheratinociti vengono estratti da cute di prelievo di pazienti. Tutte le procedure sono state eseguite dopo approvazione del comitato etico e consenso del paziente. Nel nostro studio abbiamo valutato la possibilità di coltivare cheratinociti autologhi sia con metodo "feeder-layer", sia su substrato di collagene tipo I.

Abbiamo ottenuto nel primo caso un lembo bidimensionale costituito da pochi strati di cheratinociti normoconformati; tale lembo però ha dimostrato una certa fragilità che può inficiarne l'utilizzo clinico. Nel secondo caso, cioè coltivando le cellule su substrato di collagene tipo I opportunamente trattato, abbiamo ottenuto più strati di cheratinociti normostrutturati e normo differenziati in strato basale, spinoso, granuloso e corneo. Assieme ai cheratinociti si riproducono anche i melanociti che si dispongono in corretta posizione basale.

L'applicazione di questo nuovo sostituto cutaneo rappresenta una nuova terapia per la cura delle ulcere cutanee croniche resistenti alle terapie convenzionali. È anche necessario sottolineare l'importanza di studi cito-istologici e immunoistochimici per la valutazione della corretta morfologia cellulare e del fenotipo.

DICHIARAZIONE DI CONFLITTO DI INTERESSI

Gli Autori dichiarano di non avere conflitto di interessi

BIBLIOGRAFIA

1. Atala A, Lanza R. *Methods of Tissue Engineering*, San Diego, CA, USA: Academic Press, 2002.
2. Rheinwald JG, Green H. Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocyte. *Nature* 1977; 265: 421-4.
3. Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocyte: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 1975; 6: 331-43.
4. Pianigiani E, Ierardi F. Dalla "banca della pelle" alla bioingegneria tessutale. *Kosmè* 2003; 18-22.
5. Zacchi V, Soranzo C, Cortivo R, Radice M, Brun P, Abatangelo G. In vitro engineering of human skin-like tissue. *J Biomed Mater Res* 1998; 40: 187-94.
6. Andreassi L, Pianigiani E, Andreassi A, Taddeucci P, Biagioli M. A new model of epidermal culture for the surgical treatment of vitiligo. *Int J Dermatol* 1998; 37: 595-8.