

Dipartimento di Scienze Mediche
Facoltà di Medicina e Chirurgia
Università del Piemonte Orientale “A. Avogadro” (sede di Novara)

Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare (XIX ciclo)

Relazione I anno

Dottoranda: **Francesca Boccafoschi**

Introduzione

Le malattie cardiovascolari sono la causa principale di morte in Italia (44% del totale dei decessi - Fonte: Centro Nazionale di Epidemiologia, Prevenzione e Promozione della Salute - Istituto Superiore di Sanità Roma). La situazione riflette quanto accade in Europa e in generale nei paesi industrializzati. Sono malattie di origine multifattoriale, le cui cause possono essere ricercate in un'errata alimentazione, una vita sedentaria, nello stress e nella componente genetica. Una delle malattie cardiovascolari più comuni è l'arteriosclerosi. Questa causa la progressiva occlusione dei vasi, con conseguente mancanza di flusso sanguigno, e quindi di nutrienti, agli organi.

La chirurgia ricorre sempre più frequentemente alla sostituzione delle zone vascolari danneggiate con protesi artificiali di origine sia naturale (autologhe, omologhe o eterologhe) sia sintetiche. Attualmente tutti i materiali utilizzati, per esempio Teflon utilizzato per le protesi arteriose di medio diametro (<10mm) o Dacron utilizzato per la sostituzione di vasi di grosso diametro (>10mm), hanno evidenziato, a breve o a lungo termine, una non idonea bio- ed emocompatibilità, con conseguenti ristenosi o aneurismi (Bruck, 1983).

La ricerca sta focalizzando l'interesse nel migliorare le prestazioni biologiche dei biomateriali, con l'obiettivo di ridurre le complicazioni post-chirurgiche che sovente implicano un secondo intervento, incidendo decisamente sulla qualità di vita del paziente. Se, da un lato, si cerca di modificare i materiali già in uso per minimizzare gli effetti dannosi sull'organismo o migliorarne le prestazioni, dall'altro vi è una continua ricerca di materiali innovativi con caratteristiche meglio adattabili alle esigenze del settore.

I progetto: *Collagen-based Scaffold per l'Ingegneria Vascolare Tissutale*

I parte: influenza del metodo di preparazione sulle prestazioni bio-meccaniche

Abbiamo studiato le caratteristiche chimico-fisiche e le prestazioni biologiche del collagene tipo I. Il collagene è una delle maggiori proteine costituenti i vasi sanguigni, e supporta le funzioni strutturali e meccaniche degli stessi (Bou-Gharios, 2004). La bassa antigenicità, la modesta risposta infiammatoria e citotossica (Nicolas, 1997), e la possibilità di essere utilizzato come substrato per la crescita e la proliferazione cellulare (Reid, 1993), hanno reso questa proteina molto interessante per l'utilizzo in campo bio-medico. Le proprietà dei materiali a base di collagene sono influenzate, oltre che dalla fonte da cui viene estratto e di conseguenza dal diverso tipo di collagene purificato, anche dal metodo di processazione dello stesso. Sono stati paragonati due metodi di estrazione e preparazione del collagene di tipo I. Il metodo utilizzato per l'estrazione (A) è già stato descritto in letteratura (Ehrmann, 1956). Brevemente, i tendini vengono estratti e dissolti in acido acetico. Questo metodo (soluzione A) prevede un lavaggio in acqua e la dissoluzione in acido acetico 0.04N. Dopo 72 ore a 4°C, la soluzione viene centrifugata, degasata sotto vuoto e dializzata per ottenere un'idonea sterilità. La soluzione di collagene B modifica leggermente il metodo tradizionalmente usato (A), aggiungendo un passaggio di liofilizzazione per permettere lo stoccaggio a lungo termine e, dunque, la riproducibilità delle successive soluzioni. I tendini estratti vengono dissolti in acido acetico 0.02N per 72 ore a 4°C e successivamente mescolati in ghiaccio fino ad ottenere una massa viscosa omogenea. Successivamente il gel viene congelato a -20°C e liofilizzato. La soluzione liofilizzata viene mescolata nuovamente in acido acetico 0.02N ad una concentrazione di 4mg/ml ed infine centrifugata, degasata sotto vuoto e sterilizzata con un processo di dialisi.

La struttura primaria del collagene consiste nella ripetizione di un'unità aminoacidica di base: glicina-X-Y, dove X frequentemente indica una prolina e Y un'idrossiprolina. La molecola risultante forma un'elica levogira con i domini N-terminale e C-terminale globulari, che mantengono la molecola solubile. Il passaggio nel reticolo endoplasmatico e nell'apparato di Golgi permette la glicosilazione della molecola, l'attacco di gruppi idrossilici all'aminoacido Y e il legame covalente di tre catene con ponti disolfuro. In questo modo tre catene legate formano una tripla elica che caratterizza la struttura terziaria del collagene. Quando la tripla elica viene secreta dalle cellule (generalmente fibroblasti o cellule muscolari lisce), le code globulari N-terminale e C-terminale vengono tagliate per permettere la formazione di fibrille lineari insolubili.

La struttura chimica di entrambe le soluzioni (A e B) è stata analizzata in spettroscopia ad infrarossi. Non sono risultate differenze strutturali sostanziali, ed in entrambe è stato riscontrato un

alto contenuto di collagene denaturato. L'ipotesi di un utilizzo del collagene come substrato per la crescita cellulare ha richiesto la modificazione dell'acidità del collagene, inizialmente a pH 3.5, che altrimenti lo avrebbe reso totalmente inadatto allo scopo. La variazione del pH, ottenuta con l'aggiunta di una soluzione all'1% di NaOH fino a stabilizzare il collagene a pH 7, induce un cambiamento conformazionale simile in entrambe le soluzioni, con l'aumento delle strutture ad elica caratteristiche del collagene in forma non denaturata.

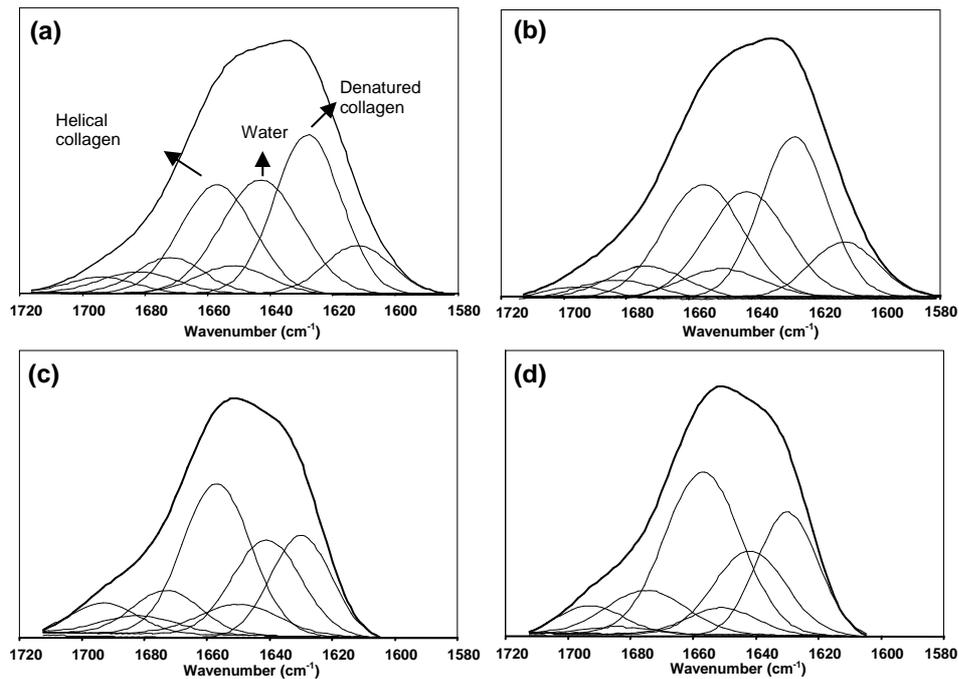


Figura 1. Analisi all'infrarosso di diversi tipi di collagene (a) collagene A, (b) collagene B, (c) collagene A neutro e (d) collagene B neutro.

Le caratteristiche meccaniche non si discostano in maniera significativa tra le due soluzioni di collagene, tranne, anche in questo caso, in seguito a variazioni di pH. La neutralizzazione rende meno rigide le interazioni strutturali, anche se non ne modifica la capacità di allungamento.

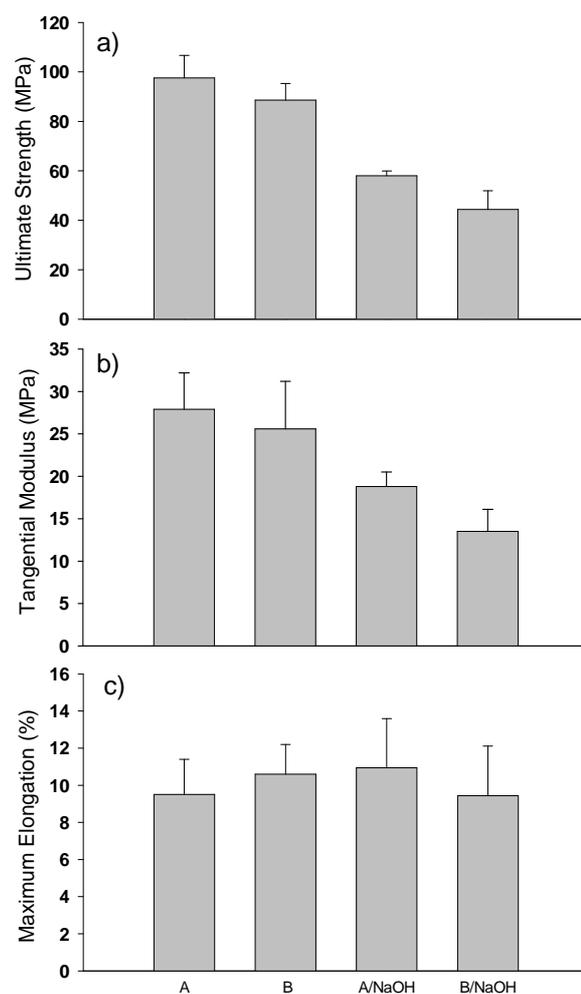


Figura 2. *Proprietà meccaniche dei diversi tipi di collagene.*

Le prestazioni biologiche dei film di collagene sono state studiate utilizzando la linea cellulare di fibroblasti murini NIH3T3. Come atteso, l'utilizzo del collagene puro (A e B) è reso inappropriato dal basso pH (3.5) previsto dal metodo di processazione. Il collagene (A e B), neutralizzato a pH 7, si è rivelato il miglior compromesso fra caratteristiche meccaniche e biologiche del materiale. La bassa tossicità ha permesso l'adesione e la proliferazione cellulare, evidenziando qualche differenza ma senza alterare sostanzialmente la risposta cellulare.

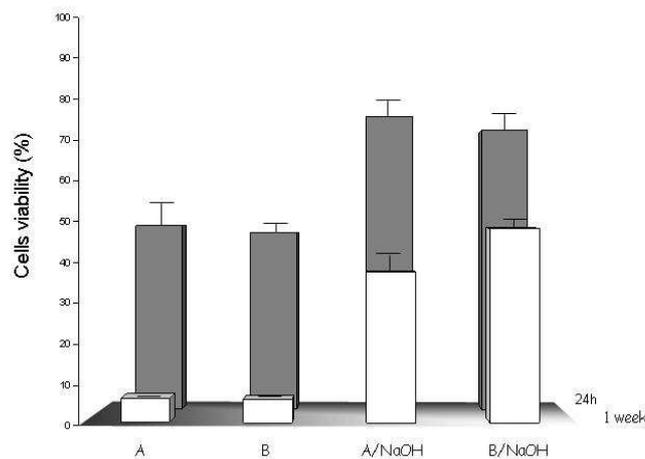
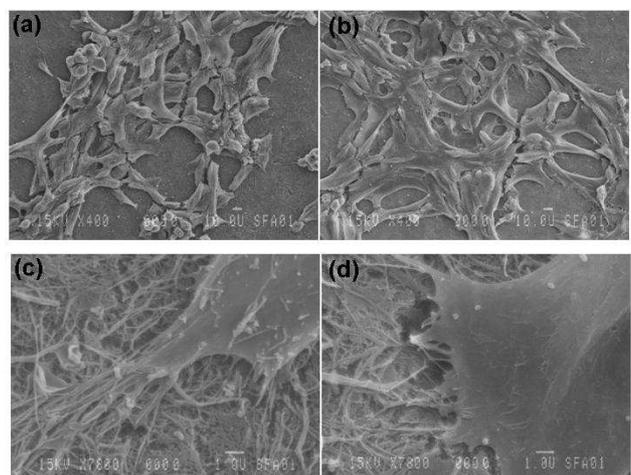


Figura 3. MTT test. I dati ottenuti evidenziano l'elevata tossicità del collagene non neutralizzato (pH 3.5), e le buone caratteristiche dello stesso tipo di collagene a pH 7.

Morfologicamente non si evidenziano differenze tra le cellule in proliferazione sul collagene di tipo A neutro o sul collagene di tipo B neutro. L'analisi nel dettaglio delle adesioni cellulari permette di osservare delle differenze nel tipo di adesione: nel primo caso i contatti focali formano numerosi filopodi, mentre il collagene di tipo B, pur mostrando ugualmente un'adeguata adesione alla superficie, induce interazioni differenti tra cellule e substrato. La natura di queste differenze va ricercata a livello molecolare, nell'espressione di differenti proteine coinvolte nella formazione dei contatti focali. Un esame approfondito a questo riguardo esula dallo scopo di questo progetto, che si prefigge unicamente di validare l'uso di un tipo di collagene come substrato, ed è stata dunque rimandato a progetti futuri.

Figura 4. Immagini al microscopio elettronico a scansione. Fibroblasti NIH 3T3 dopo una settimana di proliferazione su due diversi substrati di collagene: (a) collagene A neutro (b) collagene B neutro. Le figure (c) e (d) mostrano in dettaglio la differente adesione cellulare a livello dei contatti focali.



II parte: caratteristiche biologiche.

La prima parte del progetto ci ha permesso di valutare che il metodo di estrazione da noi utilizzato (B), che prevede un passaggio di liofilizzazione del collagene estratto, non altera le caratteristiche bio-meccaniche dello stesso, altresì permettendone lo stoccaggio a lungo termine.

Nell'ipotesi di un utilizzo del collagene di tipo B neutro come "scaffold" per la rigenerazione tissutale vascolare, si è reso necessario valutarne in maniera specifica le caratteristiche di emo- e bio- compatibilità. Sono state studiate le modificazioni di viscosità, i tempi di formazione della fibrina e del coagulo in seguito al contatto del sangue con il collagene. I risultati sono stati paragonati agli stessi ottenuti con il sangue in seguito al contatto con una superficie di Teflon, che come precedentemente menzionato, è un materiale comunemente utilizzato per le protesi vascolari, e con il vetro, usato come controllo negativo, in quanto attiva la via intrinseca della coagulazione (Meijers, 1992).

E' stata misurata la quantità di emoglobina libera in seguito a lisi ipotonica dei globuli rossi non trattenuti dalla fibrina all'interno del trombo formato dal sangue a contatto con i diversi materiali. Questo test permette di misurare la dinamica e la stabilità del coagulo stesso.

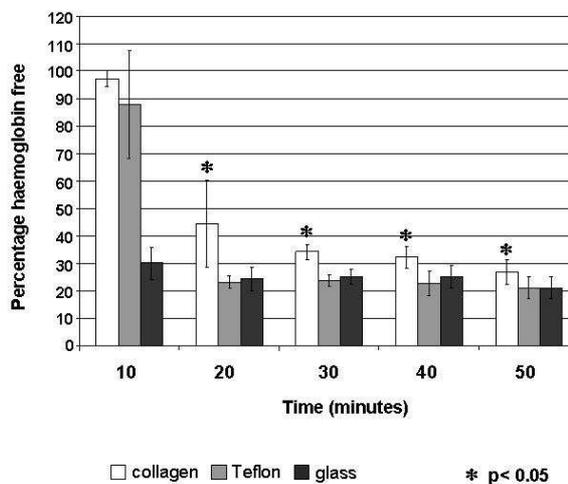


Figura 5. Tempo di coagulazione. Il collagene, paragonato al Teflon (materiale di riferimento) e al vetro (controllo negativo), ha una minore trombogenicità, formando un coagulo stabile (percentuale emoglobina libera circa 25%) più lentamente.

Per la valutazione dell'emocompatibilità è stato utilizzato un tromboelastografo. Questo permette di misurare tutte le fasi dinamiche di formazione del coagulo fino all'eventuale lisi dello

stesso. E' un test di viscoelasticità che caratterizza la formazione e la consistenza del coagulo nel tempo. Il sangue viene incubato a 37°C per 30 minuti a contatto con le superfici da valutare. Successivamente vengono misurate le proprietà elastiche del sangue. Brevemente, il sangue viene messo in una cuvetta alla quale è applicato un movimento rotatorio. La fibrina che gradualmente si forma trasmette i movimenti dalla cuvetta ad un pistone immerso nella stessa. La formazione del coagulo, che diventa gradatamente più solido, imprime al pistone una forza differente che corrisponde ad una diversa fase di formazione del coagulo. Le varie fasi di formazione del coagulo sono graficamente rappresentate nel tempo da un tracciato dalla caratteristica forma a "sigaro". I parametri del tracciato considerati permettono di misurare il tempo di formazione della fibrina (r), la dinamica della formazione del coagulo (k) e le interazioni tra piastrine e fibrina (MA). La combinazione di questi ultimi due permette di calcolare l'indice di trombogenicità del materiale studiato.

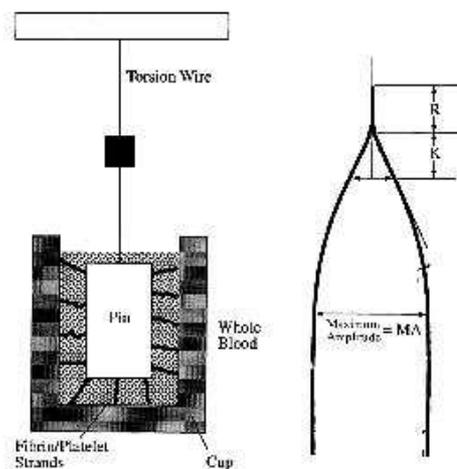


Figura 6. Rappresentazione schematica del funzionamento del trombelastografo e del tracciato ottenuto dalla formazione del coagulo.

Sono state evidenziate delle caratteristiche che rendono il collagene potenzialmente idoneo per future applicazioni biomediche, come una ridotta trombogenicità e una sostanziale invariabilità delle proprietà fisiche del sangue stesso. Infatti, Il collagene ha dimostrato avere un tempo significativamente più lungo di formazione della fibrina se paragonato ai tempi ottenuti con il Teflon e con il vetro. L'indice di trombogenicità risulta basso dopo il contatto con il collagene, mentre i risultati ottenuti in seguito al contatto con il Teflon mostrano un'elevata variabilità inter-individuale che non permette di raggiungere un risultato statisticamente significativo.

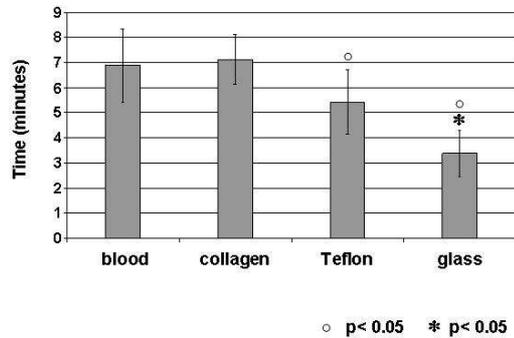


Figura 7. *Formazione di fibrina.*

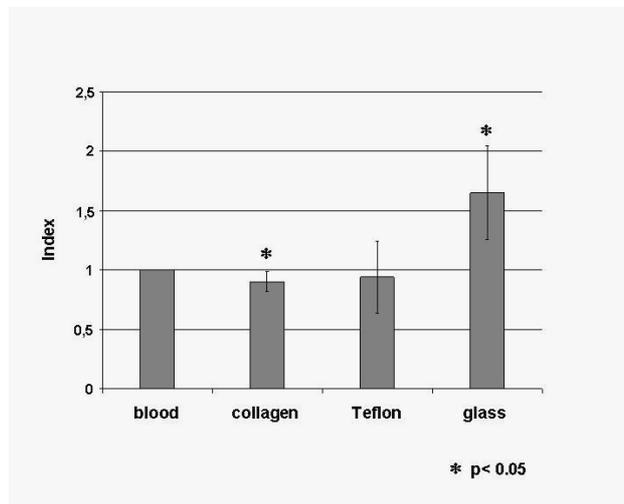


Figura 8. *Indice di trombogenicità.*

Il collagene, a livello vascolare, ha un ruolo importante nell'emostasi e nella trombogenesi. Gli incoraggianti risultati ottenuti ci hanno, dunque, positivamente sorpreso. Le possibili spiegazioni sono da ricercarsi sia nella struttura del collagene, sia nella totale assenza del fattore di von Willebrand nel collagene estratto. Infatti, il collagene di tipo fibrillare è molto più efficace nell'attivare la risposta trombogenica rispetto al collagene di tipo acido-solubile utilizzato in questo caso (Sixma, 1991). Inoltre, è riportato in letteratura che l'attivazione piastrinica, e di conseguenza l'attivazione della cascata di coagulazione, dipendono dalla struttura quaternaria del collagene (Kawamoto, 1990). Anche se l'aspetto strutturale delle fibre di collagene influisce sull'adesione e l'aggregazione piastrinica, i fattori biochimici hanno un ruolo dominante. E' stato condotto un test enzimatico su un campione della soluzione di collagene utilizzato e questo ha confermato la totale assenza del fattore di von Willebrand. Fisiologicamente esso agisce in maniera sinergica con le

fibre di collagene per l'attivazione della cascata di coagulazione (Bernardo, 2004). Questo spiega il fatto che il collagene, che naturalmente possiede eccezionali proprietà emostatiche, in questo caso non provoca una marcata attivazione della cascata di coagulazione.

In seguito è stata valutata anche la capacità del collagene di essere utilizzato come substrato per la crescita e la proliferazione di cellule vascolari (endoteliali e muscolari lisce) estratte da aorta di maiale. Le cellule, 24 ore dopo l'adesione, sviluppano solidi e numerosi contatti focali con le fibre di collagene. La morfologia cuboidale delle cellule endoteliali, e quella allungata delle cellule muscolari lisce sono ben rappresentate. Dopo 72 ore di proliferazione le cellule formano un monostrato omogeneo.

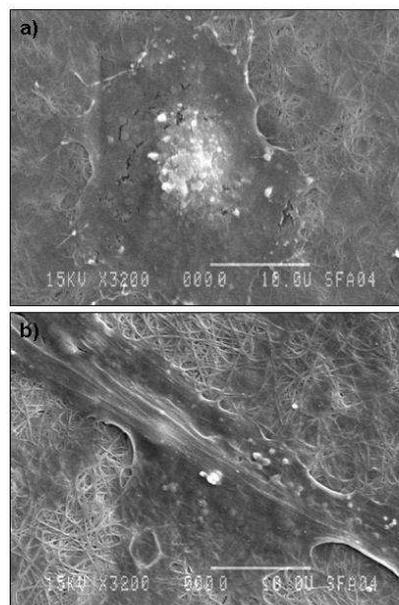


Figura 9. Immagine al microscopio elettronico a scansione. Cellule endoteliali (a) e cellule muscolari lisce (b) estratte da aorta di maiale dopo 24 ore di adesione al collagene.

La citotossicità del collagene è stata valutata con l'utilizzo del test MTT. Questo è un test colorimetrico che sfrutta la riduzione tramite la deidrogenasi mitocondriale dell'[3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] (MTT) in sali di formazano, indicando un metabolismo cellulare non alterato (nei controlli). I cristalli formati vengono solubilizzati e la lettura della densità ottica fornisce il risultato numerico indice del metabolismo cellulare. I risultati mostrano che la proliferazione delle cellule endoteliali è decisamente più lenta se paragonata al controllo, mentre le cellule muscolari lisce rallentano la crescita solo dopo 72 ore (già evidenziato nei test preliminari nel I progetto utilizzando i fibroblasti). Questo potrebbe indicare che il collagene stimola le cellule in altre attività metaboliche (per esempio nella produzione matrice

extracellulare) a discapito della velocità di proliferazione. Ulteriori test sono necessari per approfondire questo aspetto.

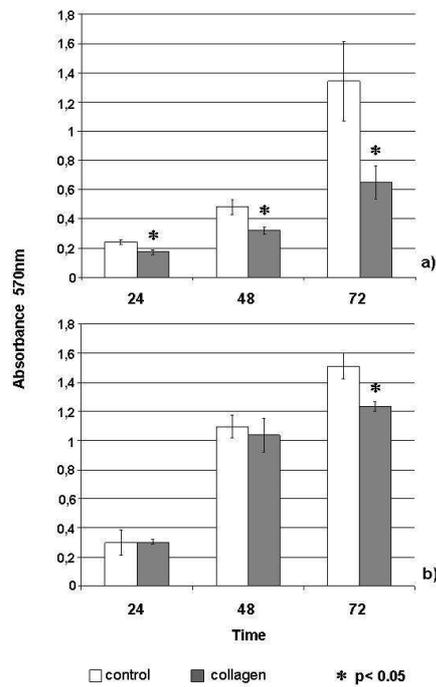


Figura 10. MTT test su cellule endoteliali (a) e muscolari lisce (b).

Gli incoraggianti risultati ottenuti sia per quanto riguarda i test di emocompatibilità, sia per quelli di biocompatibilità, permettono di poter considerare il collagene come un materiale naturale d'eccezione per un futuro utilizzo dello stesso nella rigenerazione vascolare.

II progetto: *Valutazione della Biocompatibilità delle Superfici in Teflon Modificate con Carbonio Amorfo.*

Un secondo progetto riguarda la modificazione della superficie di biomateriali, depositando uno strato di carbonio amorfo tramite l'utilizzo di un reattore al plasma.

Nel tentativo di migliorarne le prestazioni, è stato modificato il Teflon, comunemente utilizzato per le protesi vascolari di medio diametro.

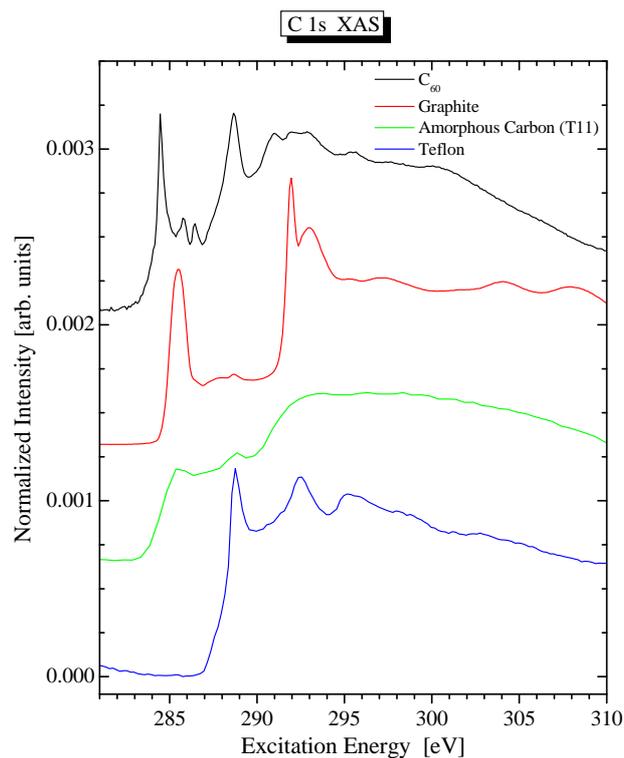


Figura 11. Spettro di assorbimento a raggi X.

I risultati ottenuti finora non sono incoraggianti. La modificazione non ha migliorato le caratteristiche del materiale ne per quanto riguarda la trombogenicità del materiale, ne per l'adesione cellulare. E' stato calcolato l'indice di trombogenicità del materiale, usando lo stesso metodo descritto nella prima parte della relazione, utilizzando i tracciati ottenuti con il trombelastogramma. Un valore più basso dell'indice di trombogenicità indica una minore capacità trombogena. Il Teflon, sia prima sia dopo la modificazione della superficie con carbonio amorfo, non presenta delle buone caratteristiche e l'alta variabilità indica inoltre di essere altamente influenzato dalle differenze inter-individuali.

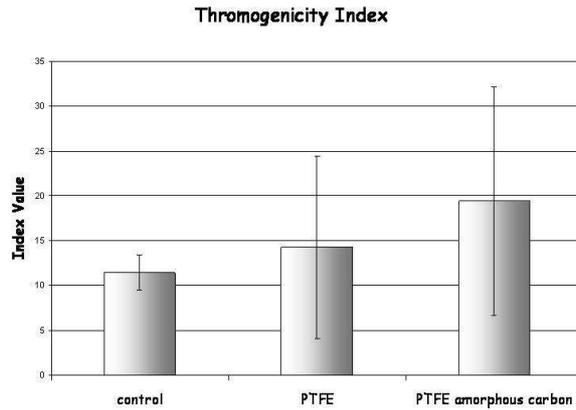


Figura 11. *Indice di trombogenicità.*

I risultati ottenuti dall'osservazione al microscopio elettronico dell'adesione cellulare, valutata utilizzando la linea di fibroblasti murini NIH3T3, ha evidenziato una marcata difficoltà nell'adesione e nel successivo "spreading" cellulare.

Sono in discussione ulteriori modificazioni della superficie che migliorino le proprietà del Teflon.

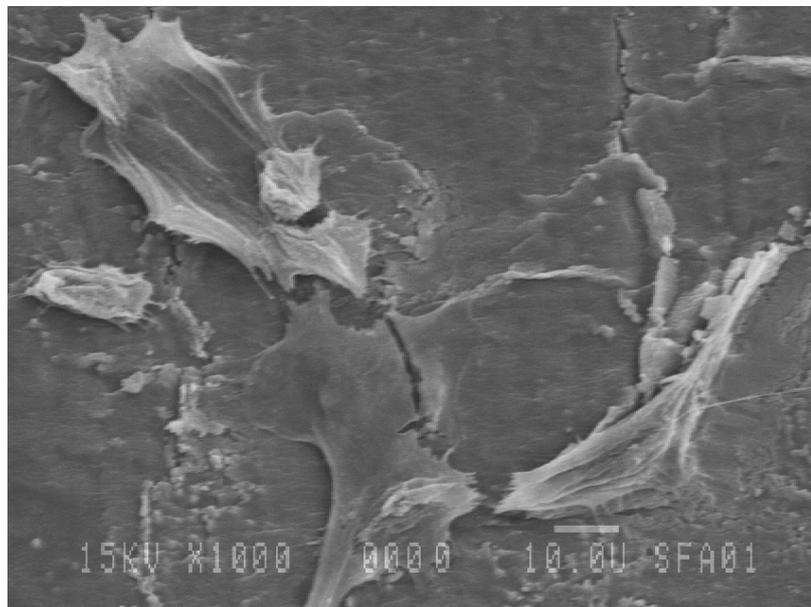


Figura 12. *Immagine al microscopio ottico a scansione. Fibroblasti su Teflon trattato con carbonio amorfo dopo 24 ore di adesione.*

Bibliografia

1. Bruck SD. Problems and challenges of biomaterials in cardiovascular applications: a status report. *Biomater Med Devices Artif Organs* 1983-84; 11:271-280.
2. Bou-Gharios G, Ponticos M, Rajkumar V, Abraham D. Extra-cellular matrix in vascular networks. *Cell Prolif* 2004; 37:207-220.
3. Nicolas FL, Gagnieu CH. Denatured thiolated collagen II. Cross-linking by oxidation. *Biomaterials* 1999; 20:27-34
4. Reid GG, Gorham SD, Lackie JM. The attachment and spreading and growth of hamster kidney cells on collagen, chemically modified collagen and collagen composite substrata. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 1993; 4:201-209.
5. Meijers JC, McMullen BA, Bouma BN. The contact activation proteins: a structure/function overview. *Agents Actions Suppl* 1992; 38: 219-230.
6. Sixma JJ, Hindriks G, Van Breugel H, Hantgan R, Groot PG. Vessel wall proteins adhesive for platelets. *J Biomater Sci Polym Ed* 1991; 3:17-26.
7. Kawamoto Y, Kaibara M. Precoagulant activity of collagen. Effect of difference in type and structure of collagen. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1035: 361-368.
8. Bernardo A, Bergeron AL, Sun CW, Guchhait P, Cruz MA, Lopez JA, Dong J-F. Von Willebrand factor present in fibrillar collagen enhances platelet adhesion to collagen and collagen-induced platelet aggregation. *J Thromb Haemost* 2004; 2:660-669.

CORSI SEGUITI

Biomateriaux et organes artificiels. Corso inter-facoltà per studenti laureati presso il Dipartimento di Ingegneria dei Materiali, Università Laval, Quebec City (QC), Canada. Durata del corso: gennaio-aprile 2004. Totale: 45 ore.

PARTECIPAZIONI CONGRESSUALI

INCTC International New Cardiovascular Technology Congress - Quebec City 11-12 settembre 2004

Presentazione poster: *Collagen-based Scaffold for Vascular Tissue Regeneration: Biological Performances*.