

IL RUOLO DELL'INGEGNERIA TISSUTALE NELLA RIGENERAZIONE CUTANEA

M. MARAZZI, F. CROVATO, A. CHIARATTI

Centro di Riferimento Regionale per la coltura di epidermide umana *in vitro* e Banca per la crioconservazione dei tessuti
S.S. Terapia Tissutale - A.O. Ospedale Niguarda Ca' Granda, Milano

The role of tissue engineering in skin regeneration

SUMMARY

Purpose: *Tissue Engineering techniques offer the possibility to repair extensive solutions of continuity of the skin.*
Materials and methods: *engineered epidermis is obtained by the use of a esterificated hyaluronic acid scaffold, from a skin sample we obtain keratinocytes suspensions that are sown on scaffold.* **Results:** *The growing method used allows to obtain biocompatible skin substitutes able to care different etiology skin wounds.* **Conclusions:** *Tissue engineering in cutaneous reconstruction must be considered the beginning of possible future applications for the development of next technologies.* Riv Chir Mano 2006; 3: 247-250

KEY WORDS

Tissue engineering, cultured keratinocytes, wounds healing, skin ulcers

RIASSUNTO

Scopo: *L'ingegneria tissutale offre la possibilità di riparare estese soluzioni di continuo a livello cutaneo.* **Materiali e Metodi:** *L'epidermide ingegnerizzata è ottenuta mediante l'utilizzo di uno scaffold in acido ialuronico esterificato sul quale sono seminate sospensioni di cheratinociti, ottenute da un prelievo cutaneo.* **Risultati:** *Il metodo di coltura utilizzato ha permesso di ottenere dei sostituti cutanei biocompatibili e applicabili nella cura delle lesioni cutanee di varia eziologia.* **Conclusioni:** *L'ingegneria tissutale nella rigenerazione cutanea deve essere considerata il punto di partenza per possibili applicazioni future per lo sviluppo di nuove tecnologie.*

PAROLE CHIAVE

Ingegneria dei tessuti, colture di cheratinociti, wounds healing, lesioni cutanee

INTRODUZIONE

L'ingegneria dei tessuti è un importante ambito di ricerca a carattere interdisciplinare che offre prospettive terapeutiche innovative volte a superare i limiti del trapianto e della protesizzazione e perciò atta a migliorare la qualità della vita di milioni di persone. Consente la creazione di sostituti biologici funzionali e compatibili che sono in gra-

do di ripristinare la struttura danneggiata o mancante ed è volta alla creazione *in vitro* di tessuti qualitativamente e quantitativamente idonei a sopprimere alle necessità cliniche. La riparazione cutanea è stata il primo campo di applicazione delle tecniche del Tissue Engineering, ed è tuttora il settore in cui i prodotti dell'ingegneria tissutale sono più numerosi e maggiormente diffusi in ambito clinico.

MATERIALI E METODI

Per ottenere un sostituto cutaneo ingegnerizzato viene effettuato un prelievo di cute da pazienti ustionati, da pazienti con lesioni cutanee acute e croniche estese, da donatori multiorgano o a cuore fermo. Al fine di minimizzare il rischio infettivo, tutti i prelievi di cute che giungono presso il nostro centro devono essere accompagnati da una scheda sulla quale vengono registrati tutti i risultati relativi ai test di screening effettuati per evitare il rischio di trasmissione di agenti infettivi (HBV, HCV, HAV, HIV I-II, CMV, HSV, Treponema Pallidum) (1).

Le colture di cheratinociti vengono realizzate secondo il metodo di Rheinwald e Green (2), modificato nell'ultimo passaggio, in modo da ovviare ad alcuni difetti presenti nella tecnica tradizionale (trattamento enzimatico con Dispase e scarsa maneggevolezza) (3); questo risultato è stato ottenuto con l'utilizzo di un supporto costituito da un estere benzilico dell'acido ialuronico denominato HYAFF.

La tecnica di laboratorio delle colture cellulari si articola in due fasi:

1. Allestimento di colture primarie di cheratinociti basali, secondo il metodo di Rheinwald e Green, per selezionare e far riprodurre la popolazione di cheratinociti dotati di attività replicativa;
2. Semina dei cheratinociti selezionati nella prima fase in sottocolture sulle membrane di acido ialuronico per ottenere l'espansione della popolazione cellulare su un supporto pronto per l'innesto.

Raggiunta la confluenza e la pluristratificazione cellulare sullo HYAFF (4), il complesso ottenuto può essere facilmente staccato senza il ricorso alla Dispase e clinicamente impiegabile.

RISULTATI

L'autoinnesto di lamine epiteliali ottenute in coltura costituisce oggi un metodo validato ed efficace per il trattamento di vaste perdite cutanee: da un piccolo prelievo biotico (1-2 cm²) di cute sana è possibile ottenere, dalla crescita di cellule singole,

una espansione cellulare di 10.000 volte in 2-3 settimane (Tab. 1).

L'innesto delle lamine di cheratinociti, utilizzato come autoinnesto, conduce alla formazione di un primo strato mesenchimale-dermico o di una cicatrice, mentre l'epidermide sviluppa in una settimana tutti gli strati tipici dell'epidermide normale; in seguito la zona sottostante l'autoinnesto viene rimodellata dalle cellule mesenchimali fino alla formazione di una struttura dermica più simile a quella normale che permette anche lo sviluppo e la crescita di una rete vascolare efficiente (5-7).

Le lamine di cheratinociti, utilizzate come alloinnesti, offrono il vantaggio di una pronta disponibilità per la copertura delle lesioni, pur non dimostrando segni di sopravvivenza se non a breve termine e sono quindi da considerarsi delle medicazioni biologicamente attive rilasciando citochine e fattori di crescita (8, 9) (Tab. 2).

L'utilizzo clinico di questi sostituti cutanei comprende ustioni e lesioni cutanee di varia natura: vascolare, traumatica, diabetica, da malattia autoimmune di base, da decubito, post chirurgica.

CONCLUSIONI

Dai risultati ottenuti presso il nostro Centro e dal grande consenso della comunità scientifica internazionale è possibile confermare l'effettiva e reale validità e utilità delle cellule basali epidermiche coltivate in vitro su un supporto di acido ialuronico. L'applicazione di queste tecnologie è da sviluppare e non si limita solo al campo della ricostruzione cutanea ma occupa uno spazio ben più vasto, tanto da consentire il trapianto di un grande numero di cellule esprimenti un determinato fenotipo o addirittura, grazie a tecniche di transfezione, di cellule o tessuti geneticamente modificati, ad esempio dal patologico al normale e da un isotipo ad un altro.

L'ingegneria tissutale non deve essere considerata come un punto d'approdo, dove la medicina può trovare ogni risposta alle sue domande, infatti sta aprendo le porte ad un nuovo seme della ricerca, quello della nanotecnologia. Questa scienza per-

Tabella 1. *Caratteristiche strutturali dell'epidermide in vivo e delle cellule epidermiche in coltura.*

Caratteristiche epidermiche	Cute normale	Cellule epidermiche in coltura
Architettura tissutale	4 strati: basale, spinoso, granulare, corneo.	3 strati: basale, intermedio, superficiale
Antigeni di superficie e citoplasmatici	Antigeni di istocompatibilità	Non riscontrabili
Struttura delle membrana basale	Membrana basale delle cellule basali con gli emidesmosomi, lamina basale (lamina lucida e lamina densa), fibrille di ancoraggio, matasse di fibrille e fibre collagene	Gli emidesmosomi e la lamina basale si formano solo su substrati di acido ialuronico, la lamina basale è presente solo in corrispondenza degli emidesmosomi
Filamenti di cheratina	Presenti in tutte le cellule, in associazione ai desmosomi, aumentano dall'alto verso il basso fino a fondersi con la sostanza amorfa proveniente dai granuli di cheratoialina	Presenti in tutte le cellule, aumentano dal basso verso gli strati superficiali, non sempre associati a desmosomi, le cheratine differiscono biologicamente
Desmosomi	Presenti tra tutte le cellule epidermiche	Presenti in tutti gli strati, le modificazioni involutive a livello degli strati superficiali sono poco evidenziabili
Granuli lamellari	Presenti a livello dello strato spinoso alto e granulare	Rari, solo a basso pH
Granuli di cheratoialina	Presenti con forma stellare	Infrequenti nelle cellule soprabasali, non sempre associati ai filamenti
Distruzione nucleare	Completa a livello dello strato corneo	Usualmente incompleta
Involuzione nucleare	Completa	Talvolta presente nelle cellule pluristratificate
Noduli di cheratina	Presenti nello strato granuloso e corneo	Assenti
Cheratinizzazione	Ortocheratosi	Strutturalmente incompleta
Annessi cutanei	Variano con il variare delle zone corporee	Non si formano
Cellule di Langerhans	Presenti 400-1000 cell/mm ²	Assenti
Cellule di Merkel	Presenti	Assenti
Melanociti	Presenti	Presenti in co-culture

Tabella 2. *Autoinnesti ed impianti allogenetici.*

Tecnica	Vantaggi	Svantaggi
Autoinnesti coltivati (CEA)	<ul style="list-style-type: none"> - Possibilità di coprire aree di lesione estese dalla coltura di una piccola biopsia cutanea - Copertura permanente della ferita - Risultati estetici accettabili 	<ul style="list-style-type: none"> - Gap temporale per ottenere sufficienti quantità di lamine in vitro (3 settimane) - Fragilità dell'innesto - Formazione di bolle a seguito di traumi - La formazione di "neoderma" richiede anni
Impianti allogenetici coltivati (CEALLO)	<ul style="list-style-type: none"> - Disponibilità immediata - Promuovono la guarigione di ferite a spessore parziale 	<ul style="list-style-type: none"> - Possibile trasmissione di malattie - Non adatte per ferite a tutto spessore

mette di agire all'interno dell'organismo stesso tramite l'introduzione di nanosistemi, frutto di una tecnologia avanzata, in grado di modificare, diagnosticare e curare all'interno dell'organismo.

BIBLIOGRAFIA

1. Linee Guida per il prelievo, la conservazione e l'utilizzo di cute e dei prodotti dell'ingegneria dei tessuti a scopo di trapianto. All.5, 1° Suppl. Straordinario al n. 17, Boll. Uff. Regione Lombardia- 24 Aprile 2003.
2. Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 1975; 6: 331-43.
3. Donati L, Veronesi AM, Garbin S, et al. In vitro development and clinical application in burn patient of keratinocytes on hyaluronic acide ester membrane. Proceeding of Workshop held at the Annual Meeting of the European Society for Biomaterials, Pisa 10/09/1994.
4. Andreassi L, Casini L, Donati L, et al. Human keratinocytescultured on membranes composed of benzyl ester of HA suitable for grafting. *Wounds* 1991; 3: 116-26.
5. Teepe RGC. Cultured keratinocyte grafting. Implication for wound healing. CIP-DATA Koninklijke Bibliotheek, Den Haag 1993: 45-58.
6. Tompkins RG, Remensnyder JP, Burke JF, et al. Significant reduction in mortality for children with burn injuries through the use of prompt eschar excision. *Ann Surg* 1988; 208: 577-85
7. Gallico CC III, O'Connor NE, Compton CC, et al. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N Engl J Med* 1984; 311: 448-51.
8. Burt AM, Pallet CD, Sloane JP, et al. Survival of cultured allograft in patients with burns assessed with probe specific for Y-chromosome. *British Med J* 1989; 298: 915-7.
9. Kaniakakis J, Mauduit G, Faure M, Schmitt D, Thivolet J. Ultrastructural studies of cultured human epithelial sheets used as skin allograft. *Wircnows Arch A* 1987; 410: 523-30.