

“TISSUE ENGINEERING” E RIGENERAZIONE TENDINEA

F. BASSETTO¹, B. BASSIRI GHARB¹, V. VINDIGNI¹, F. MAZZOLENI¹, C. TONELLO², A. DALLA VEDOVA²,
M. DEL FAVERO², G. ABATANGELO²

¹Clinica di Chirurgia Plastica - Dipartimento di Specialità Medico-chirurgiche, Padova

²Sezione di Istologia - Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche - Padova

“Tissue Engineering” and tendon regeneration

SUMMARY

Purpose: *Optimal tenocyte culture condition development and three-dimensional cell cultures growth on hialuronic acid biomaterial. Materials and Methods:* Tenocytes, obtained from tendon explants, are cultured and expanded in three passages in monolayer culture. After a cell count of 1×10^7 is obtained, tenocytes are seeded on a hialuronic acid biomaterial. Cell morphology, growth rate and biomaterial colonizing ability were assessed with light microscopy, scansion electron microscopy and MTT test. **Results:** Tenocytes migrated from tendon explants in 4 days reaching confluence in 15 days, maintaining a differentiated phenotype. **Conclusions:** Three dimensional tenocyte cultures are attainable from cell isolation and seeding on hialuronic acid biomaterial. Riv Chir Mano 2006; 3: 251-253

KEY WORDS

Tissue engineering, tendon, cell cultures, tendon healing

RIASSUNTO

Scopo: *Isolamento di tenociti umani dal tessuto tendineo e ricerca delle condizioni idonee allo sviluppo in vitro di colture cellulari su biomateriale a base di acido ialuronico. Materiali e Metodi:* Le cellule provenienti da espianti di tendine vengono poste in coltura ed espanse in tre passaggi successivi. Quando la moltiplicazione ha dato luogo ad un numero di cellule pari a 1×10^7 , le cellule vengono seminate sul biomateriale a base di acido ialuronico. La morfologia e l'efficienza della crescita cellulare e la capacità di colonizzazione del biomateriale sono stati indagati con microscopia ottica, microscopia elettronica a scansione e test MTT. **Risultati:** I tenociti hanno impiegato in media circa 4 giorni per migrare dal tendine e 15 giorni per colonizzare la piastra raggiungendo la confluenza in monostrato, mantenendo il fenotipo differenziato. **Conclusioni:** In questo studio preliminare si è dimostrata la possibilità di ottenere l'isolamento e la coltura su biomateriale a base di acido ialuronico di cellule tendinee.

PAROLE CHIAVE

Ingegneria tissutale, tendine, colture cellulari, guarigione tendinea

INTRODUZIONE

Il ripristino della funzione motoria di un tendine dopo la sua interruzione traumatica richiede il ricongiungimento dei monconi e la saldatura anato-

mica, libera da aderenze, ai tessuti circostanti. Nei vertebrati adulti, la saldatura è assicurata esclusivamente dalla deposizione di collagene operata dai fibroblasti residenti nelle strutture vicine (paratendine, mesotendine e guaine tendinee) che formano

una massa fibrosa unica ed irrispettosa delle differenze morfologiche tra strato e strato: "one wound - one scar". L'esito della guarigione spontanea è pertanto il blocco dello scorrimento e la perdita della funzione delle articolazioni coinvolte (1). Se il trauma ha sottratto una parte del tendine, la sua riproduzione è biologicamente impossibile (2).

In precedenti esperienze, avevamo osservato che dal contesto del tendine si possono isolare, a varia distanza di tempo, cellule di aspetto fibroblastico capaci di moltiplicarsi in vitro. Fu formulata l'ipotesi che la potenzialità rigenerativa intrinseca del tendine, fosse conservata entro certi limiti e che, in occasione di interruzioni traumatiche, fosse tenuta repressa dall'esuberanza dei fibroblasti esterni. Si ritenne altresì che con artifici chirurgici potesse essere attivata la capacità rigenerativa con sensibili benefici terapeutici (dalla procedura della tenosintesi, alla mobilizzazione immediata) (3).

Nell'intento di creare in laboratorio strutture simil-tendinee utilizzabili in clinica, una serie di ricerche è stata programmata, diretta ad identificare in prima battuta, quale procedura di coltura fosse più idonea agli effetti della proliferazione e successivamente quale metodo fosse atto a indurre la coltura cellulare verso la differenziazione di tenociti capaci di produrre e depositare collagene fibroso. Si presentano qui alcune osservazioni preliminari.

MATERIALI E METODI

Gli espianti di tendine vengono posti in un terreno di coltura (DMEM arricchito con siero fetale bovino al 10%, 100UI/ml penicillina, 100 µg/ml Streptomina, L-Glutamine (4 mM)) e mantenuti alla temperatura di 4°C. Il paratenon viene rimosso con delicatezza per ottenere colture cellulari di provenienza esclusivamente tendinea ed omogenea. I frammenti vengono sminuzzati e posti su piastra con terreno di coltura, senza essere sottoposti a preventiva digestione enzimatica. Al raggiungimento della confluenza le cellule vengono staccate dalla piastra mediante tripsinizzazione (tripsina 0.05%, EDTA 0.02%) e successivamente espanse (tre passaggi) fino ad ottenere un numero sufficien-

te (1×10^7) alla semina sul biomateriale (estere benzilico di acido ialuronico con e senza clotting di fibrina). In alternativa i frammenti di tendine sono stati posti direttamente a contatto con il biomateriale in terreno di coltura.

La morfologia e l'efficienza della crescita cellulare e la capacità di colonizzazione del biomateriale sono stati indagati con microscopia ottica, microscopia elettronica a scansione e test MTT.

RISULTATI

Le cellule di derivazione tendinea hanno impiegato in media circa 4 giorni per migrare dal tendine (Fig. 1) e 15 giorni per colonizzare la piastra e raggiungere la confluenza in monostrato. In questa fase, alla microscopia ottica, esse presentavano un corpo affusolato e processi citoplasmatici allungati che stabilivano contatti fra cellula e cellula. Si potenziava inoltre una significativa bipolarità. Man mano che la proliferazione procedeva gli spazi intercellulari si riducevano e le cellule si disponevano in aggregati a disposizione curvilinea (Fig. 2). Le cellule seminate aderivano sul biomateriale e la loro proliferazione era più elevata quando veniva aggiunto il coagulo di fibrina (Fig. 3). All'osservazione microscopica apparivano costituire bande numerose e parallele. La microscopia elettronica a scansione evidenziava le cellule adese alle fibre del biomateriale.



Figura 1. Le cellule migrano dall'espianto di tendine iniziando la colonizzazione della piastra.

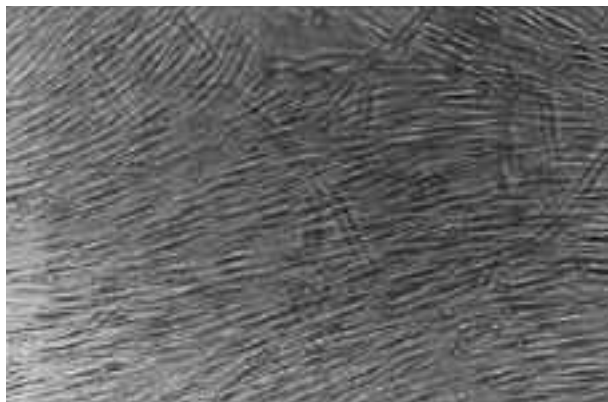


Figura 2. *I tenociti in confluenza si dispongono in aggregati curvilinei.*

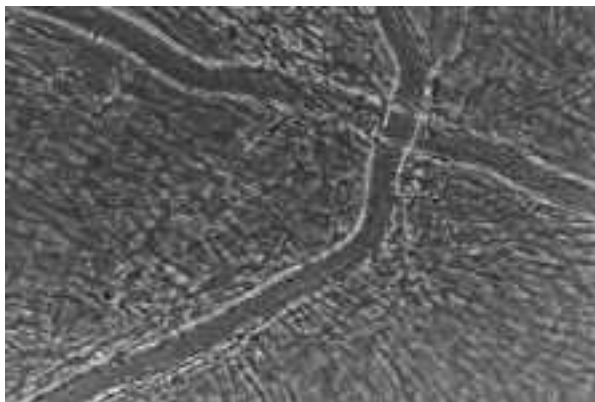


Figura 3. *I tenociti proliferano all'interno delle maglie del biomateriale mantenendo il fenotipo differenziato.*

CONCLUSIONI

La prima fase dell'esperimento ha messo in luce che le cellule ottenute dagli espianti tendinei mantenevano caratteristiche di cellule differenziate. Studi precedenti hanno dimostrato che cellule differenziate dopo coltura prolungata in monostrato tendono a perdere il fenotipo caratteristico (4). La seconda fase di questo studio, invece, ha evidenziato che il biomateriale a base di acido ialuronico ha consentito alle cellule di proliferare, di mantenere un aspetto differenziato grazie all'integrazione tra proliferazione e biomateriale. Una vera e propria coltura tridimensionale si è, infatti, costituita. La terza fase dello studio, di prossima esecuzione, si propone di valutare, in vitro, la possibilità di conservare il fenotipo, sottoponendo i costrutti (biomateriale e tenociti) a cicli di stress meccanico e di promuovere la formazione di strutture più complesse e di utilità clinica (5).

BIBLIOGRAFIA

1. Lin TW, Cardenas L, Soslowsky LJ. Biomechanics of tendon injury and repair. *J Biomech* 2004; 37: 865-77.
2. Vunjak-Novakovic G, Altman G, Horan R, et al. Tissue engineering of ligaments. *Annu Rev Biomed Eng* 2004; 6: 131-56.
3. Mazzoleni F, Trivello R, Moschella ME, Manganaro C, Chiarelli A. Lesioni tendinee: raffronto tra ripresa funzionale dopo tenosintesi e risultati della coltura in vitro e frammenti di moncone. *Rivista Italiana di Chirurgia Plastica* 1979; 11: 383.
4. Schulze-Tanzil G, Mobasheri A, Clegg PD, et al. Cultivation of human tenocytes in high-density culture. *Histochem Cell Biol* 2004; 122: 219-28.
5. Barkhausen T, Van Griensven M, Johannes Zeichen J, et al. Modulation of cell functions of human tendon fibroblasts by different repetitive cyclic mechanical stress patterns. *Exp Toxic Pathol* 2003; 55: 153-8.