

RICOSTRUZIONE DEL MIDOLLO SPINALE LESIONATO CRONICAMENTE TRAMITE BIOPROTESI NANOSTRUTTURATE COMPOSITE E CELLULE STAMINALI NEURALI

(Dr. Fabrizio Gelain, Prof. Angelo Luigi Vescevi)

Nel caso di lesioni croniche del midollo spinale abbiamo una perdita estesa e ben localizzata di tessuto nervoso: in tale condizione la terapia cellulare deve poter agire in sinergia con l'ingegneria dei tessuti biologici. Infatti, all'interno delle cavità che si vengono a formare, sono necessari dei supporti, chiamati scaffold, per dirigere la rigenerazione delle fibre nervose ed, al tempo stesso, far sì che le cellule da trapiantare possano integrarsi con il tessuto nervoso del paziente.

I peptidi-autoassemblanti (SApeptidi) sono una classe di peptidi sintetici che formano nano fibre 5000 volte più piccole di un capello umano. Tali fibre formano, a loro volta, dei gel una volta iniettate in organismi viventi.

Tutto questo avviene grazie al cambio di acidità della soluzione in cui si trovano disciolti. Tali SApeptidi, sono già stati utilizzati per una varietà di applicazioni in ambito biomedico, come ad esempio il RADA16-I, ovvero il SApeptide più comunemente usato nell'ingegneria dei tessuti biologici. Le caratteristiche fisico-chimiche e meccaniche di questi SApeptidi, permettono di ottenere dei supporti nanostrutturati simili a quelli presenti nei tessuti biologici. I SApeptidi possiedono inoltre una gran varietà di proprietà chimiche e fisiche che ne permettono una loro progettazione "ad hoc" per il tessuto da rigenerare (nervoso, cartilagineo, osseo, ecc.). E' difatti possibile fornire della funzionalità biologiche (motivi funzionali) ai SApeptidi affinché possano meglio interagire con i tessuti del paziente e/o migliorare la sopravvivenza delle cellule da trapiantare. La scelta e l'inserimento di motivi funzionali è pertanto una parte cruciale nella progettazione razionale di nuovi SApeptidi.

Negli ultimi anni, il nostro gruppo ha sviluppato dei nuovi SApeptidi funzionalizzati, derivanti dalla incorporazione della sequenza BMHP1, un motivo biologico trovato eseguendo studi di Phage Display in vivo. Una volta così funzionalizzato, il sapeptide RADA16-I-BMHP1 supporta in modo significativo la sopravvivenza ed il differenziamento di cellule staminali neurali (umane e murine) in vitro.

D'altra parte, anche le protesi elettrofilate, ovvero prodotte tramite electrospinning, stanno attualmente ottenendo un crescente interesse per la medicina rigenerativa. L'elettrofilatura è una tecnica ben consolidata che consente la produzione di scaffold elettrofilati con fibre continue aventi diametri da alcuni micron fino a pochi nanometri. Gli scaffold elettrofilati possono essere sintetizzati in strutture tubolari o in garze dall'elevata porosità, con un alto rapporto superficie/volume e con le desiderate proprietà meccaniche.

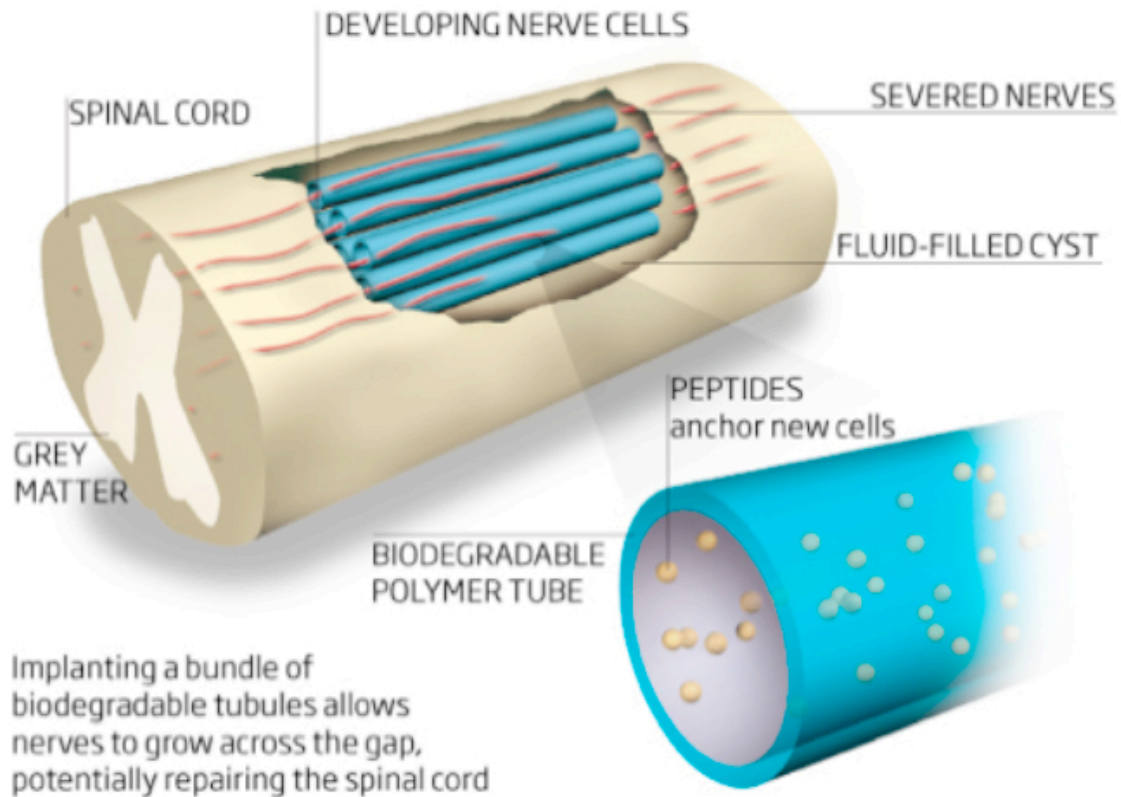
In passato il nostro gruppo ha testato con successo guide tubulari biorisorbibili elettrofilate per la rigenerazione del nervo sciatico, stimolando la rigenerazione nervosa funzionale in nervi recisi nei ratti.

Tuttavia, al fine di formare una bioprotesi composta da cellule e scaffold, l'elettrofilatura presenta alcuni svantaggi. Primo fra questi è la presenza, durante il processo di sintesi, di solventi chimici dannosi per cellule eventualmente aggiunte

durante la formazione dello scaffold stesso. Tale fenomeno non avviene invece nel caso dei SApeptidi.

Una strategia sinergica, in grado di trarre vantaggio dalla versatilità e biocompatibilità dei SApeptidi ed, al tempo stesso, dalla processabilità delle guide elettrofilate in grado di guidare nello spazio le fibre in rigenerazione potrebbe essere in grado di fornire le condizioni migliori per indurre la rigenerazione del tessuto nervoso.

Per affrontare il tema cruciale della rigenerazione delle lesioni croniche del midollo spinale, abbiamo così sviluppato uno scaffold composito nanostrutturato, costituito da microguide elettrofilate tubulari riempite con il SApeptide RADA16 funzionalizzato con il motivo BMHP1 e imbibito di fattori pro-rigenerativi. In questo studio abbiamo sviluppato un metodo per sostituire la cisti e cicatrice gliale, tipiche delle lesioni croniche del midollo spinale (SCI), con un substrato permissivo alla ricrescita nervosa. Un mese dopo la contusione del midollo spinale, la cicatrice gliotica è stata rimossa e la protesi neurale è stata impiantata all'interno della cavità. Una volta asportate la cicatrice e la cisti, i canali di guida sono stati collocati all'interno della cavità, uno ad uno, lungo l'asse longitudinale del midollo. Una lamina elettrofilata è stata quindi suturata alla dura madre per impedire l'invasione dell'impianto da parte di cellule dei tessuti circostanti. Sei mesi dopo l'impianto delle protesi, laddove nei gruppi di controllo erano presenti cisti e cicatrici in gran parte delle sezioni del midollo lesionato, in tutti gli animali dei gruppi trattati, è stato rilevato del tessuto neoformato costituito anche da fibre nervose. Neuroni parzialmente mielinizzati sono stati notati in tutto il tessuto rigenerato sia all'interno che tra i condotti elettrofilati. Vasi sanguigni neoformati, deposizione di collagene IV e laminina, sono stati individuati all'interno e tra le micro guide impiantate. Abbiamo constatato una contenuta risposta infiammatoria ai nostri impianti. È stato inoltre riscontrato un significativo recupero motorio della coordinazione dei movimenti degli arti posteriori negli animali trattati rispetto a quelli di controllo. Abbiamo infine rilevato un aumento dell'ampiezza e della velocità di conduzione degli impulsi nervosi ascendenti e discendenti, negli animali trattati. Questo lavoro ispiratore ha dimostrato che un approccio comune, che riunisca la versatilità e la biocompatibilità dei SApeptidi e la possibilità di guidare nello spazio le fibre nervose in rigenerazione tramite microguide elettrofilate, può stimolare una rigenerazione funzionale ed anatomica nelle lesioni croniche midollari in ratti. La rigenerazione testata riguarda lesioni croniche contusive al midollo spinale in ratti, un passaggio successivo sarà testarne l'efficacia, a seguito di ulteriori miglioramenti nelle tecniche chirurgiche e di sintesi delle protesi, in animali più vicini all'uomo.



Dr. Fabrizio Gelain

Vice-direttore scientifico del centro di nanomedicina ed ingegneria dei tessuti dell'ospedale di Niguarda-Ca' Granda a Milano
 Capo-unità di nanomedicina presso CSS-Mendel di Roma
 Principal investigator presso il dipartimento di biotecnologie e bioscienze dell'Università di Milano-Bicocca
 Editore accademico presso le riviste scientifiche internazionali PLoS ONE e Frontiers in Neuroengineering

Prof. Angelo Luigi Vescovi

Professore di Biologia Cellulare dell'Università di Milano Bicocca
 Docente di Cell Biology al Brain Research Center e Adjunct professor al dipartimento di neuroscienze della Università della Florida
 Direttore del Centro di Nanomedicina ed Ingegneria dei Tessuti dell'ospedale Niguarda (Milano)
 Direttore del centro di ricerca e banca delle Cellule Staminali Cerebrali di Terni
 Direttore scientifico dell'IRCCS Casa Sollievo della sofferenza di San Giovanni Rotondo e dell'Istituto Mendel di Roma