

Linda Falaschi 455135

Laurea specialistica in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche DM270

STUDIO DI UN MODELLO CARDIACO “GIOVANE”: STIMOLAZIONE IN BIOREATTORE S2PR E ANALISI DEL PROCESSO DI IPOSSIA-RIPERFUSIONE

Relatore: Prof. Vincenzo Calderone

SSD BIO/14

Introduzione: Le cardiopatie ischemiche sono una delle principali cause di morte al mondo. Il recupero della funzionalità cardiaca, con la relativa riperfusione, rappresenta l’approccio più efficace per limitare il danno ipossico: generalmente si agisce a livello coronarico tramite terapia trombolitica, angioplastica e rivascolarizzazione chirurgica con bypass aorto-coronarici. Questo approccio favorisce il ricircolo di sangue ricco di nutrienti ed ossigeno, ma determina una perdita di massa contrattile, ipertrofia e rimodellamento del ventricolo sinistro, portando molto spesso a scompenso cardiaco.

L’ingegneria tissutale rappresenta uno dei più promettenti approcci per l’individuazione di nuove tecniche di trattamento volte al recupero del tessuto cardiaco. In particolare essa si basa sulla possibilità di riprodurre un modello cardiaco capace di mimare il tessuto nativo e di essere dotato delle medesime proprietà biomeccaniche.

Scopo: Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di caratterizzare biologicamente una nuova tipologia di scaffold poliuretano con caratteristiche biomeccaniche correlate ad un tessuto cardiaco “giovane”. Su tale struttura polimerica sono stati seminati cardiomiociti neonatali di ratto ed in seguito a stimoli esterni ne è stato analizzato il loro comportamento; il lavoro ha infatti compreso una fase di test in bioreattore (S2PR) per ricreare condizioni di stimolazione meccanica simili a quelle fisiologiche. Sono state inoltre testate le condizioni patologiche di ipossia-riperfusione, al fine di valutarne i mediatori coinvolti. Tale argomento di tesi rientra all’ambito del Progetto PRIN denominato “MIND - Ingegnerizzazione di modelli d’organo di interesse fisiologico e patologico per l’indagine di disturbi legati all’invecchiamento”

Materiali e metodi: Le cellule utilizzate in questo lavoro sono state cardiomiociti primari neonatali di ratto. Su ogni scaffold sono state seminate 10^6 cellule. La vitalità cellulare è stata

valutata tramite alamar blue assay. Le prime fasi dello studio sono state volte alla valutazione della capacità dei cardiomiociti di colonizzare gli scaffold ricreando tessuto cardiaco.

Successivamente gli scaffold cellularizzati sono stati sottoposti a stimolazione meccanica per 24h in bioreattore S2PR. Questo sistema permette l'applicazione di una forza idrodinamica pulsatile (frequenza di 1Hz) sul mezzo di coltura contenuto nella camera del bioreattore.

Un' ulteriore fase di studio è stata incentrata sulla messa a punto di un protocollo di ipossia-riperfusionamento tramite camera ipossica. Sono stati svolti test sia utilizzando diverse tipologie di terreno di coltura sia variando i tempi di trattamento (range 3-24h).

Al termine delle varie fasi, campioni di cellule e terreni sono stati sottoposti a diverse analisi, quali, valutazione tramite RT-PCR dei livelli di Endotelina-1 (ET-1) e peptidi natriuretici (ANP, BNP, CNP e relativi recettori); analisi dei livelli di stress ossidativo tramite saggi fluorimetrici e microscopia a fluorescenza; analisi dello stato di aging cellulare tramite saggio della SA- β -galattosidasi.

Risultati: L'analisi PCR ha evidenziato un'espressione costante dopo 7 giorni dei geni codificanti per i peptidi natriuretici e di ET-1. Inoltre, i cardiomiociti hanno mostrato un aumento dei pathway di trasduzione del segnale mediati da chinasi implicate nella sopravvivenza cellulare, come Erk e Akt/GSK-3 beta. I campioni sottoposti ad analisi per la β -galattosidasi mostrano un aumento dei livelli enzimatici nelle cellule sottoposte a stress da ipossia-riperfusionamento come anche dei livelli di stress ossidativo (ROS, H₂O₂). La vitalità cellulare su scaffold, dopo 3h di ipossia e 2h di riperfusionamento, si è ridotta di circa il 30% rispetto ai controlli non trattati. La stimolazione meccanica in bioreattore ha invece mostrato livelli di vitalità compatibili con i controlli.

Conclusioni: I risultati di questo lavoro di tesi mostrano una buona vitalità dei cardiomiociti su scaffold in condizioni basali, nonché dopo stimolazione meccanica in bioreattore S2PR. I livelli di espressione dei peptidi natriuretici ed ET-1 si mantengono costanti in condizioni statiche dopo 7 giorni di coltura. Lo stress ossidativo tende invece ad aumentare in seguito ad ipossia-riperfusionamento, così come i livelli di senescenza cellulare. I risultati sugli effetti della stimolazione meccanica, seppure preliminari e non completi, mostrano le potenzialità per un modello di studio in-vitro di tessuto cardiaco giovane. L'obiettivo futuro sarà quello di completare la caratterizzazione biologica della matrice "giovane" e confrontarla con una pari matrice biomeccanicamente associabile ad un tessuto "vecchio", allo scopo di analizzare i fenomeni di sviluppo dell'Aging e arrivare così alla realizzazione di un suo modello di studio in-vitro.