

PROGETTO FIRB – WP1

Universita' degli Studi di Siena

Unita' prof. Marina Ziche

PROGRESS REPORT: NOVEMBRE 2003

WP	Biomateriale	Fornitore	Sterilizz.
WP1	TESSUTI a maglia in PET, PTFE, PET rivestito con Carbofilm	SORIN BIOMEDICA CARDIO S.p.A.	Ossido di etilene
WP1	FILM in PET, PTFE	GOOD FELLOW	Ossido di etilene
WP1	HYAFF® trasparente wound dressing	Fidia Advanced Biopolymers	sterile

MODELLO CELLULARE	FENOMENI STUDIATI	METODICHE UTILIZZATE
-CVEC (Coronary Venular Endothelial Cells): isolate dal microcircolo, sede del rimodellamento vascolare e dell'angiogenesi	1- Citotossicità del biomateriale	1- Trypan Blue Exclusion Test
	2-Attività proliferativa/sopravvivenza sul biomateriale	2- MTT Cell Proliferation assay
	3- Adesione al biomateriale	3- Colorazione vitale con Acridine Orange / Ethidium bromide

METODICHE

Dopo un'iniziale valutazione della citotossicità, i biomateriali vengono caratterizzati per la capacità di indurre angiogenesi, vale a dire migrazione e proliferazione delle cellule endoteliali, e di promuovere l'adesione/sopravvivenza e funzionalità endoteliale a lungo termine.

Citotossicità

E' stato utilizzato il TRYPAN BLUE EXCLUSION TEST, incubando i materiali in studio con 200.000 o 400.000 cellule sospese in terreno con 10% siero per 1-4 ore a 37 C.

Attività proliferativa sul biomateriale

La capacità delle cellule di proliferare sui biomateriali è stata valutata utilizzando MTT CELL PROLIFERATION ASSAY. Tale test si basa sulla capacità delle cellule metabolicamente attive di trasformare, mediante una reduttasi mitocondriale, il composto solubile MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) in un sale del formazano insolubile che può essere determinato spettrofotometricamente. 4 ore prima della fine dell'esperimento si sostituisce il medium cellulare con del terreno privo di rosso-fenolo e si aggiunge lo MTT 5mg/ml e le cellule vengono incubate a 37°C. Durante questo periodo le cellule metabolizzano MTT nel derivato insolubile. Il sale di formazano viene solubilizzato con DMSO e la sua concentrazione è determinata mediante lettura spettrofotometrica a 540 nm.

Per tale saggio le CVEC sono state seminate alla concentrazione di 20000 cell/ml sui biomateriali in multiwell da 48. I dischetti di tessuto e film sono stati ancorati sul fondo del well utilizzando, in un primo momento, del silicone medical-grade e poi la fibrina e su di essi sono state seminate le cellule. E' stata valutata la proliferazione a 1, 2, 4 e 7 giorni di distanza dalla semina delle cellule.

Adesione al biomateriale

La capacità cellulare ad aderire e sopravvivere sui dischetti di PET e PTFE FILM è stata valutata utilizzando la colorazione vitale con Acridine Orange/Ethidium Bromide, in accordo al protocollo fornitoci dalla Prof. Brandi (Università di Firenze-WP2). In tale test le cellule vitali incorporano AO mostrando al microscopio a fluorescenza, con set di filtri per FITC, una fluorescenza verde brillante mentre quelle non vitali incorporano EB mostrando una fluorescenza arancio. Per tale saggio le CVEC sono state seminate alla concentrazione di 40000 cell/ml sui dischetti di PET e PTFE film, adesi al fondo dei pozzetti con la fibrina. E' stata valutata l'adesione a 2 giorni di distanza dalla semina delle cellule.

RISULTATI

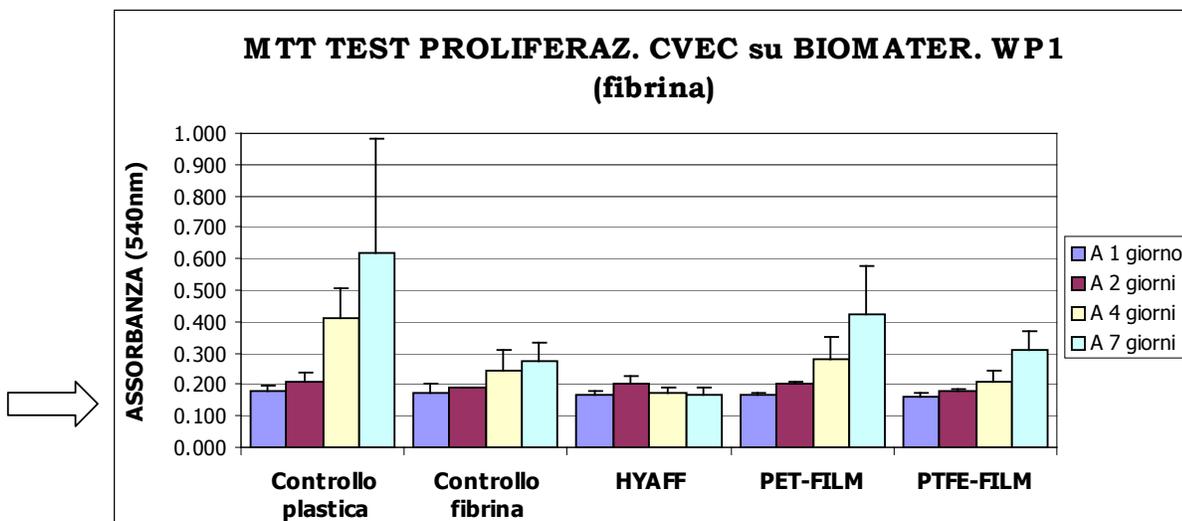
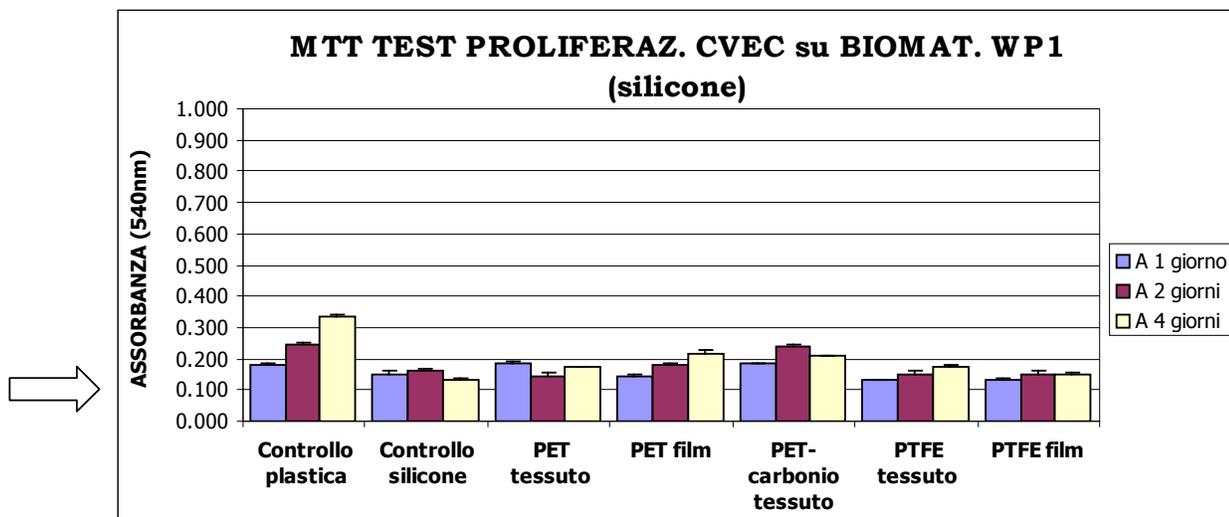
Citotossicità:

I valori di % di mortalità ottenuti con il test permettono di asserire che i tessuti e i film di biomateriali analizzati non risultano essere citotossici sia dopo 1 che 4 ore di contatto con le cellule.

Proliferazione cellulare

E' stata valutata la capacita' dei tessuti di PET, PTFE e CARBOFILM e dei film di PET e PTFE di sostenere/stimolare la proliferazione endoteliale.

Dai risultati ottenuti dal test utilizzato (MTT test) è possibile dedurre che i biomateriali non sono in grado di stimolare la proliferazione endoteliale anche se sostengono la sopravvivenza cellulare, ulteriore conferma della loro non citotossicità. Le cellule endoteliali presentano però una migliore affinità per il PET e PTFE FILM e il PET-Carbofilm. Infatti, su tali biomateriali si può notare una lieve crescita cellulare nel tempo. Non si osserva differenza di comportamento cellulare tra gli esperimenti fatti con il silicone e la fibrina, quindi i risultati sono sovrapponibili.



La freccia indica l'assorbanza delle cellule al momento della semina (tempo 0)

Adesione al biomateriale

Utilizzando la colorazione vitale con Acridine Orange/ Ethidium Bromide è stata valutata la capacità cellulare ad aderire e sopravvivere sui dischetti di PET e PTFE film, paragonandola alla crescita sulla plastica da colture cellulari e sulla fibrina. Dall'osservazione al microscopio a fluorescenza è emerso che le CVEC sul PET-film aderiscono e rimangono vitali come provato dall'intensa fluorescenza verde. Sul PTFE-film non si ha una completa adesione e la fluorescenza arancio è indice della sofferenza cellulare (vd allegato 1).

Questi dati confermano i risultati ottenuti con il test MTT per la proliferazione cellulare, in cui si osservava infatti una migliore crescita cellulare sul PET-film rispetto al PTFE-film.

Interazione con i biomateriali e valutazione della funzione endoteliale

Le fasi successive del nostro lavoro consisteranno nell'analizzare al SEM e/o ESEM la morfologia cellulare sui biomateriali (in collaborazione con l'Unità di Napoli) e nell'analizzare l'espressione genica e proteica (di enzimi chiave del signaling intracellulare e delle funzioni endoteliali) delle cellule in seguito al loro contatto con i biomateriali.

CONCLUSIONI

I dati finora ottenuti indicano che:

- 1) I biomateriali del WP1 non sono citotossici per l'endotelio;
- 2) PET film e PET-Carbofilm (tessuto) sono in grado di sostenere la crescita cellulare;
- 3) HYAFF e PTFE-film e tessuto inibiscono la crescita cellulare anche se sostengono la sopravvivenza endoteliale.