

PRODUZIONE, RECUPERO ED USO DI ARTERIE COSTRUITE IN VIVO DA CELLULE STAMINALI ADULTE

Nei casi d'infarto cardiaco dovuto a grave insufficienza coronaria, il trattamento attualmente più usato è il by-pass, cioè l'autotrapianto di un segmento d'arteria prelevata da un'altra regione del corpo. Questa pratica è efficace, ma presenta alcuni inconvenienti. Comporta un doppio intervento chirurgico sul paziente e lascia la regione del prelievo (in genere una gamba) con una circolazione sanguigna difettosa.

Problemi della medicina dei trapianti

La questione dell'origine dell'organo sano, comune a tutta la chirurgia dei trapianti, limita notevolmente le potenzialità di questo importante campo della medicina moderna con problemi etici (commercio degli organi), immunitari (rigetto) ed epidemiologici (trasmissione di malattie infettive), o di effetti negativi collaterali, come detto sopra. La soluzione a questi problemi sarebbe l'uso di organi artificiali, come nel caso dei cuori meccanici, o la produzione di organi in laboratorio partendo da cellule staminali, cioè non ancora differenziate o capaci di differenziarsi. Quest'ultimo approccio ha grandi potenzialità, grazie alla conoscenza ormai avanzata dei fattori di differenziamento e del loro modo d'azione a livello molecolare. Purtroppo un altro problema etico si è intromesso in questo campo di ricerca. Le cellule staminali potrebbero essere ottenute da embrioni rimasti inutilizzati dalle cliniche che praticano la riproduzione assistita, ma questa pratica è respinta da una parte significativa dell'opinione pubblica. La soluzione alternativa sarebbe l'uso di cellule staminali prelevate dagli organi adulti che possono rigenerare cellule vecchie o danneggiate, cioè la maggior parte degli organi nel nostro corpo. L'inconveniente in questo caso risiede, di nuovo, nel

problema dell'origine dell'organo e delle conseguenze etiche, immunitarie ed epidemiologiche menzionate sopra.

Un approccio del tutto nuovo

Come si vede, il campo dei trapianti d'organo ha grandi potenzialità tecniche, ma numerose remore pratiche.

Un gruppo di ricercatori che lavorano presso la University of Queensland (Brisbane) sta però sviluppando una soluzione per il trapianto d'arteria che probabilmente eviterà tutti gli inconvenienti menzionati sopra. La Professoressa Julie Campbell dirige il Centre for Research in Vascular Biology presso la School of Biomedical Sciences, ed il Wesley Research Institute presso l'ente ospedaliero privato Wesley Hospital di Brisbane. Assieme ai colleghi Gordon Campbell, Johnny Efendy, Chih-Lu Han e WaiLeng Chue, la Professoressa Campbell ha messo a punto una tecnica per produrre delle arterie senza ricorrere all'uso di embrioni o di organi donati. Le cellule staminali potrebbero cioè essere ottenute dalla cavità peritoneale del paziente stesso con una procedura abbastanza semplice e poco invasiva, la quale porterebbe alla produzione di un'arteria immunocompatibile, capace di essere trapiantata nello stesso paziente e resistente ad una pressione sanguigna compatibile con quelle delle arterie normalmente sostituite in chirurgia vascolare. Fin'ora la ricerca è stata condotta su modelli sperimentali animali, ma i risultati sono tali da giustificare ottimismo per un'applicazione clinica non lontana.

La scoperta

Il gruppo di ricerca di Brisbane ha dimostrato che l'inserzione di un tubo di polietilene di lunghezza

varia (fino a 8 centimetri) nella cavità peritoneale di cani, conigli, ratti, e topi induce in 2-3 settimane la formazione di una capsula di tessuto attorno al tubo stesso. Si tratta di una normale reazione che avviene quando materiale estraneo (un grumo di sangue per esempio) viene introdotto nella cavità peritoneale; lo scopo funzionale è di isolare dal resto del corpo.

La capsula è composta (dall'interno all'esterno) di miofibroblasti, la loro matrice collagena extracellulare ed un singolo strato di cellule mesoteliali. I miofibroblasti derivano probabilmente da macrofagi della cavità peritoneale (vedi sotto), e le cellule mesoteliali dalla parete della cavità stessa. Queste ultime possiedono le stesse proprietà anti-trombotiche delle cellule endoteliali dei vasi sanguigni.

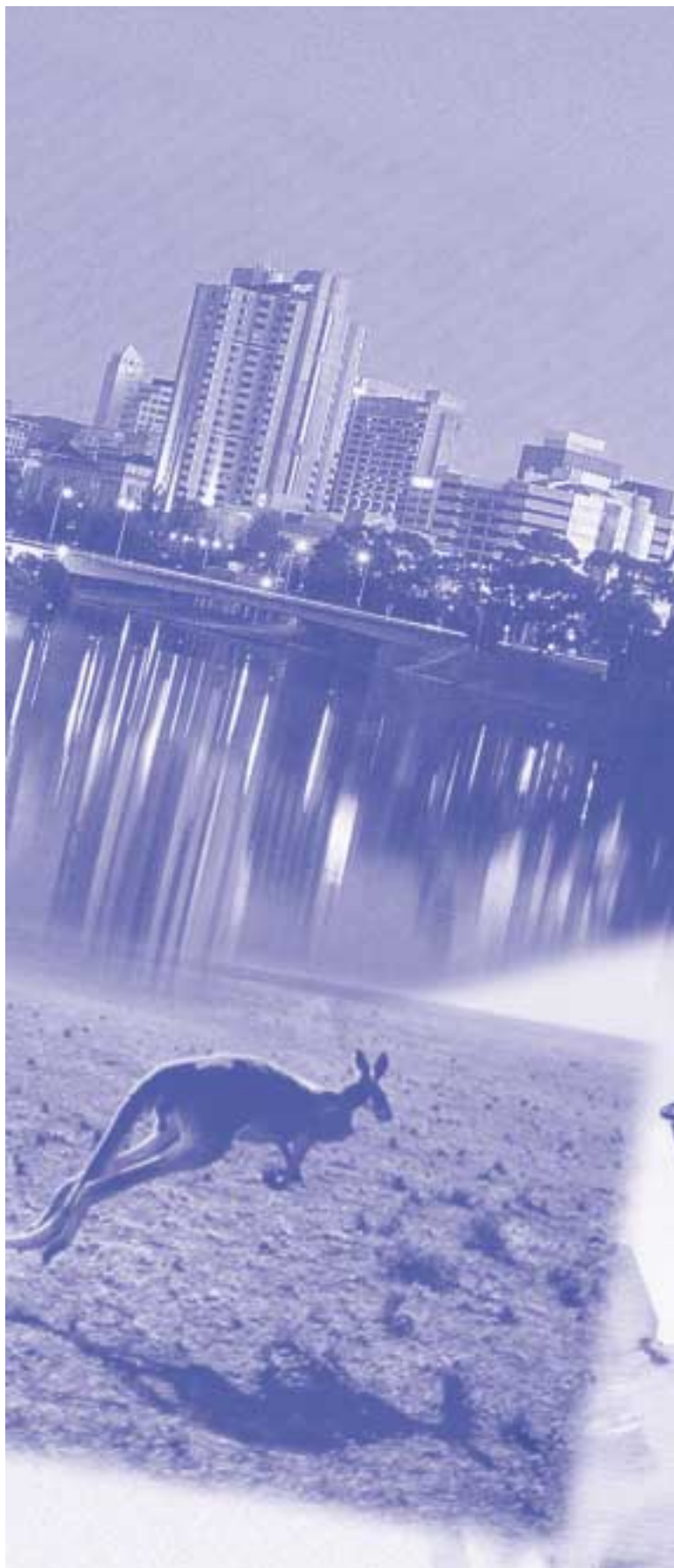
La capsula che si forma attorno al tubo è quindi prodotta da normali cellule del corpo del paziente; essa è ottenuta per mezzo di un artificio, ma non è 'artificiale'. L'applicazione clinica di questo metodo eviterebbe i problemi etici, immunitari ed epidemiologici di cui sopra.

Preparazione dell'arteria e trapianto (*)

La capsula così formata può essere rimossa dal tubo di polietilene semplicemente rivoltandola, come quando si toglie un calzettino. Basta tagliarla ad una estremità, trattenere il bordo e tirarlo indietro fin tanto che non si sia sfilata per tutta la lunghezza. Questo tubo di tessuto vivente, così liberato dal supporto di polietilene, ha ora lo strato endoteliale all'interno, proprio come deve essere in un vaso sanguigno.

Preparazioni di questo tipo con una lunghezza di circa 2 centimetri sono state usate per due tipi di trapianti nello stesso animale in cui si erano formate. Un primo tipo consisteva nel tagliare la carotide (nel coniglio) o l'aorta discendente (nel ratto) e ricongiungere le due estremità con quelle dell'arteria designer. Il secondo tipo era uno shunt arterioveno-oso eseguito sui vasi femorali del coniglio.

Alla data di questa pubblicazione, i vasi trapiantati appaiono ancora beanti 16 mesi dopo l'operazione, come dimostrato con il metodo degli ultrasuoni Doppler. L'indagine istologica ha mostrato che, 3-4 mesi dopo il trapianto in una posizione esposta ad alta pressione arteriosa, i miofibroblasti dell'arteria designer si sono differenziati in cellule simili a quelle muscolari lisce; infatti la proporzione in volume degli elementi contrattili (miofibrille) non è molto diversa da quella delle vicine arterie normali. Per di





più, fibre elastiche si sono formate nello strato omologo a quello medio, mentre alla superficie si è differenziato uno spesso strato di cellule omologo all'avventizia, il quale comprende anche i vasa vasorum. L'indagine fisiologica ha poi dimostrato che 6 settimane dopo il trapianto lo strato muscolare delle arterie designer è capace di contrarsi o rilassarsi, in presenza di agenti vasocostrittori o acetilcolina aggiunti in bagno d'organo.

L'origine delle cellule della parete arteriosa

Al fine di perfezionare il metodo qui descritto era necessario determinare l'origine dei miofibroblasti della capsula iniziale. Si sono dunque inseriti nella cavità peritoneale di topi, ratti e conigli segmenti di tubo di polietilene ed anche grumi di sangue coagulato e bollito proveniente da un'altra specie. Le capsule di tessuto così ottenute sono state analizzate a tempi successivi dopo l'operazione.

Durante i primi due o tre giorni si osservano cellule rotondeggianti attaccate alla superficie dei corpi estranei. Queste cellule si marciano con anticorpi Ly5 (CD45), indicazione preliminare che tratta di elementi del ceppo ematopoietico del midollo osseo (vedi sotto per prove ulteriori). Dal punto di vista ultrastrutturale queste cellule assomigliano ai macrofagi che si trovano normalmente nella cavità peritoneale, o a cellule meno differenziate ancora localizzate nel midollo osseo. Nelle stesse preparazioni si osservano anche delle cellule mesoteliali.

Sei giorni dopo l'operazione le capsule sono già abbastanza spesse, ma composte dagli stessi due tipi di cellule; uno strato di matrice extracellulare si è però formato al di sotto delle cellule mesoteliali. A questo stadio alcune cellule interne cominciano ad assumere l'apparenza di fibroblasti e solo poche cellule si marciano ancora con Ly5.

Due settimane dopo l'operazione quasi tutte le cellule che formano la capsula hanno assunto la forma fusiforme tipica delle cellule muscolari lisce e sono stratificate come nello strato medio di un vaso sanguigno. Esse contengono anche strati periferici di miofibrille.

Controlli immunoistocibimici

Le cellule muscolari lisce differenziate all'interno della capsula prodotta come descritto sopra sono state sottoposte a indagine immunoistochimica per confennare l'ipotesi che si tratti di elementi del ceppo ematopoietico del midollo osseo. Due setti-

mane dopo l'operazione le cellule dello strato medio possono essere marcate con anticorpi contro la alfa-actina specifica delle cellule muscolari lisce, mentre nessuna di loro si marca più con quelli contro Ly5 (vedi sopra), un antigene noto per la sua presenza nei miofibroblasti non ancora differenziati.

Allo scopo di confermare l'origine dal midollo osseo, topi femmine del ceppo C57BL/6 che esprime la variante Ly5.2 alla superficie delle cellule ematopoietiche sono state irradiate con raggi X per distruggere il midollo osseo, e subito dopo trasfuse con 10⁶ cellule nucleate del midollo osseo prelevate dal femore e dalla tibia di maschi congeniti appartenenti ad un ceppo che esprime la variante Ly5.1. Dopo quattro settimane il successo del trapianto delle cellule maschili è stato controllato nel sangue delle femmine ospiti con citometria di flusso (80~99% di cellule maschili). Segmenti di tubi di polietilene sono quindi stati inseriti nella cavità peritoneale delle femmine in questione e le capsule sono state prelevate dopo due settimane. L'origine maschile delle cellule allungate della capsula, e quindi la loro origine dal midollo osseo, è stata dimostrata per mezzo di ibridazione in vitro con una sonda del cromosoma Y.

Un'altra interessante osservazione è stata fatta in queste femmine dal sangue chimerico. Dopo aver causato sperimentalmente una lesione per raschiamento (scratch injury) sulla parete interna delle arterie normali, è stato trovato che circa la metà delle molecole di alfa-miosina presenti nelle cellule muscolari lisce della neointima (tessuto di riparazione) erano derivate dal midollo osseo. Questo risultato mette in dubbio la tradizionale interpretazione dell'origine delle cellule presenti nelle lesioni re-stenotiche (reblock) causate dagli interventi di angioplastica (chirurgia riparatrice delle placche aterosclerotiche), dato che finora si pensava che provenissero dalla parete dei vasi sanguigni sani.

Conclusione

Questa linea di ricerca dimostra che una migliore conoscenza dei normali processi di difesa e riparazione dei tessuti può aprire nuove possibilità nel campo della produzione di organi utilizzabili per interventi di trapianto. Probabilmente nella maggior parte dei casi non è necessario ricorrere all'uso di tessuti embrionali, il che eviterebbe i molti problemi etici, immunitari ed epidemiologici.

In termini più generali, l'antico criterio ippocratico,

per cui il medico dovrebbe solo aiutare il corpo del paziente a riparare se stesso, sembra in parte rivivere in tutta la propria saggezza in questa procedura che sfrutta appunto un processo naturale di difesa e riparazione del corpo. La produzione di altri organi potrebbe trarre ispirazione da questa armonia tra antica saggezza e tecnologia di punta moderna.

(*) Questa procedura è protetta da un brevetto in Australia, Europa ed USA. La licenza appartiene alla ditta VasCam di Brisbane.

Bibliografia

Campbell JH, Efendy JL, Campbell GR (1999) "A novel vascular graft grown within the recipients own peritoneal cavity." *Circ Res* 85:1173-1178.

Campbell JH, Efendy JL, Campbell GR (2000) "The effect of environmental cues on the differentiation of myofibroblasts in peritoneal granulation tissue." *J Pathol*

192: 257-262.

Campbell JH, Efendy JL, Han CL, Campbell GR (2000) "Haemopoietic origin of myofibroblasts formed in the peritoneal cavity in response to a foreign body." *J Vasc Res* 37: 364-371.

Han C, Campbell GR, Campbell JH. (2001) "Circulating bone marrow cells can contribute to neointimal formation" *J Vasc Res* 38: 113-119.