

Organi Artificiali con Tessuti a Membrana

Loredana De Bartolo, S. Morelli, E. Drioli

Istituto di Ricerca su Membrane e Modellistica di Reattori Chimici, IRMERC-CNR, c/o Università della Calabria, via P: Bucci cubo 17/C Rende (CS)

Membrane polimeriche semipermeabili per le loro caratteristiche di separazione, immunoprotezione e di matrice artificiale possono essere adoperate per la ricostruzione dei tessuti e organi *in vitro* e in processi di trattamento del sangue [1]. Tessuti costituiti da membrane polimeriche sono già in uso in molti settori industriali. La disponibilità di membrane in diverse configurazioni (e.g., fibre capillari, films piani) e in diverso materiale polimerico (naturale, sintetico) ha reso sempre più attraente ed interessante il loro impiego nello sviluppo di nuovi tessuti nel settore tessile, biomedicale e diagnostico. Nelle applicazioni tessili, le membrane sono adoperate per coating e separazione allo scopo di realizzare tessuti impermeabili all'acqua (i.e., goretex) e per filtrazione di fluidi corporei nella realizzazione di pannolini ed assorbenti. Nelle applicazioni biomedicali, dispositivi a membrane sono già da molti anni adoperati nella pratica clinica per la purificazione del sangue in sostituzione delle funzioni renali e per l'ossigenazione del sangue in sostituzione delle funzioni polmonari. Membrane oggi vengono anche usate per lo sviluppo di organi bioartificiali e per la ricostruzione di nuovi tessuti. Sia nelle applicazioni tessili che in quelle biomedicali è molto importante conoscere le proprietà di membrana come le proprietà chimico-fisiche, strutturali e di trasporto che possono influenzare le funzioni che la membrana svolge e soprattutto la compatibilità del materiale polimerico a contatto con le cellule e i fluidi del corpo (vedi Figura 1).

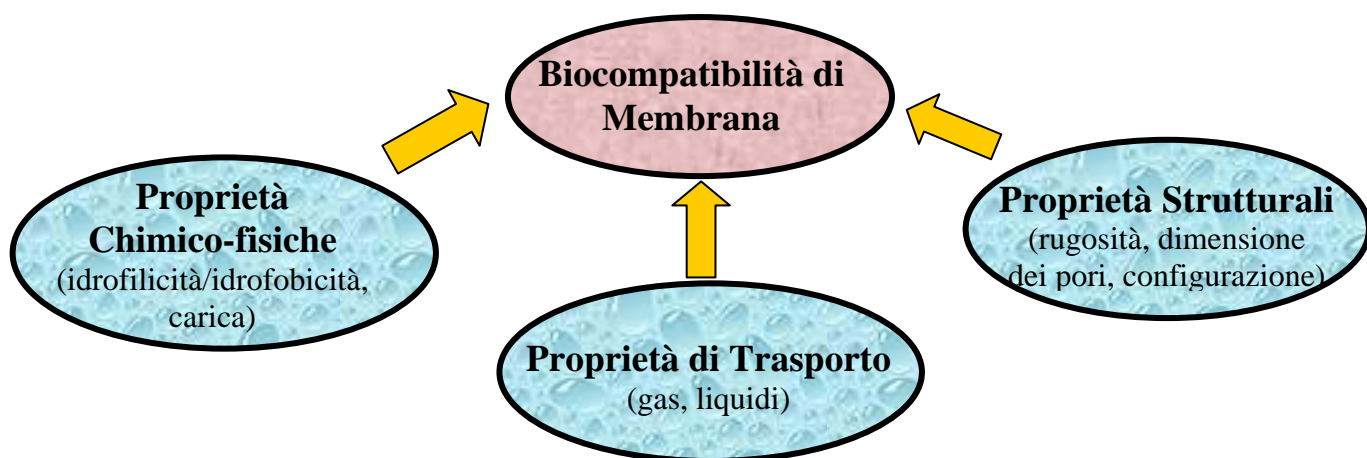


Figura 1. Schema illustrativo dell'influenza delle proprietà di membrana sulla biocompatibilità

Uno dei primi esempi di ingegneria tissutale risale al 1933, quando Bisceglie adoperò cellule tumorali di topo incapsulate in membrane di nitrocellulosa che inserì nella cavità addominale di maiali senza avere reazioni di rigetto, dimostrò così le proprietà immunoprotettive delle membrane [2]. Oggigiorno le membrane sono adoperate in organi artificiali ibridi (fegato bioartificiale, pancreas bioartificiale) per il trattamento terapeutico di pazienti affetti da insufficienze di tipo organico che sono in attesa di trapianto o di rigenerazione dell'organo parzialmente danneggiato [3]. In organi bioartificiali, le membrane funzionano come barriere immunoselettive, che consentono di prevenire il contatto tra le cellule e le specie immunocompetenti presenti nel sangue del paziente, e nel contempo consentono il trasporto di nutrienti e metaboliti da e alle cellule [4-5]. In tali dispositivi, le membrane funzionano anche come mezzo per l'ossigenazione delle cellule e come supporto per l'adesione di cellule ancoraggio-dipendenti (i.e., cellule epatiche) [6-8]. In un fegato bioartificiale a membrana una frazione significativa di cellule è in diretto contatto con la superficie di membrana per cui la superficie di membrana può influenzare la vitalità e il metabolismo delle cellule ed avere così un effetto sulla prestazione terapeutica del bioreattore.

Le problematiche comuni nelle interazioni di questi tessuti speciali con le cellule, con liquidi fisiologici ed in generale con le varie componenti e funzioni dei sistemi viventi sono di particolare interesse ed in larga parte sono ancora oggetto di studio. A tale scopo, in questo contributo, è stata effettuata un'analisi sulle membrane e moduli a membrana adoperati in organi artificiali con particolare riferimento alle interazioni cellule-membrane.

In vivo, le cellule sono supportate da una matrice extracellulare che influenza la loro morfologia, proliferazione e differenziazione nonché la loro funzione metabolica. Quando le cellule sono coltivate *in vitro*, un simile supporto meccanico e chimico deve essere fornito dall'ambiente di coltura. Per questo motivo caratteristiche di membrana come permeabilità selettiva, biostabilità, ed induzione della crescita cellulare possono svolgere un ruolo determinante nell'interazione cellule-membrana. Quindi la scelta del tipo di membrana da adoperare in un dispositivo dipende dalle sue caratteristiche di permeabilità così come dalle sue proprietà chimico-fisiche correlate al processo di separazione. In tali dispositivi la capacità di una membrana di svolgere queste funzioni e di fornire un adeguato microambiente di coltura alle cellule dipende dalle sue proprietà di permeabilità e di superficie, in particolare dalle proprietà morfologiche e chimico-fisiche [9-11].

Tali proprietà possono avere un effetto sull'adesione e sulla risposta metabolica delle cellule influenzando sia l'attacco delle cellule sulla superficie di membrana in base alle caratteristiche topografiche, sia la capacità del substrato di adsorbire le proteine presenti nel mezzo oppure secrete dalle cellule e sia alterando la conformazione delle proteine adsorbite della matrice extracellulare

(Figura 2). In tal modo la biocompatibilità e citocompatibilità di una membrana polimerica può essere migliorata cambiando le proprietà chimico-fisiche e morfologiche della superficie.

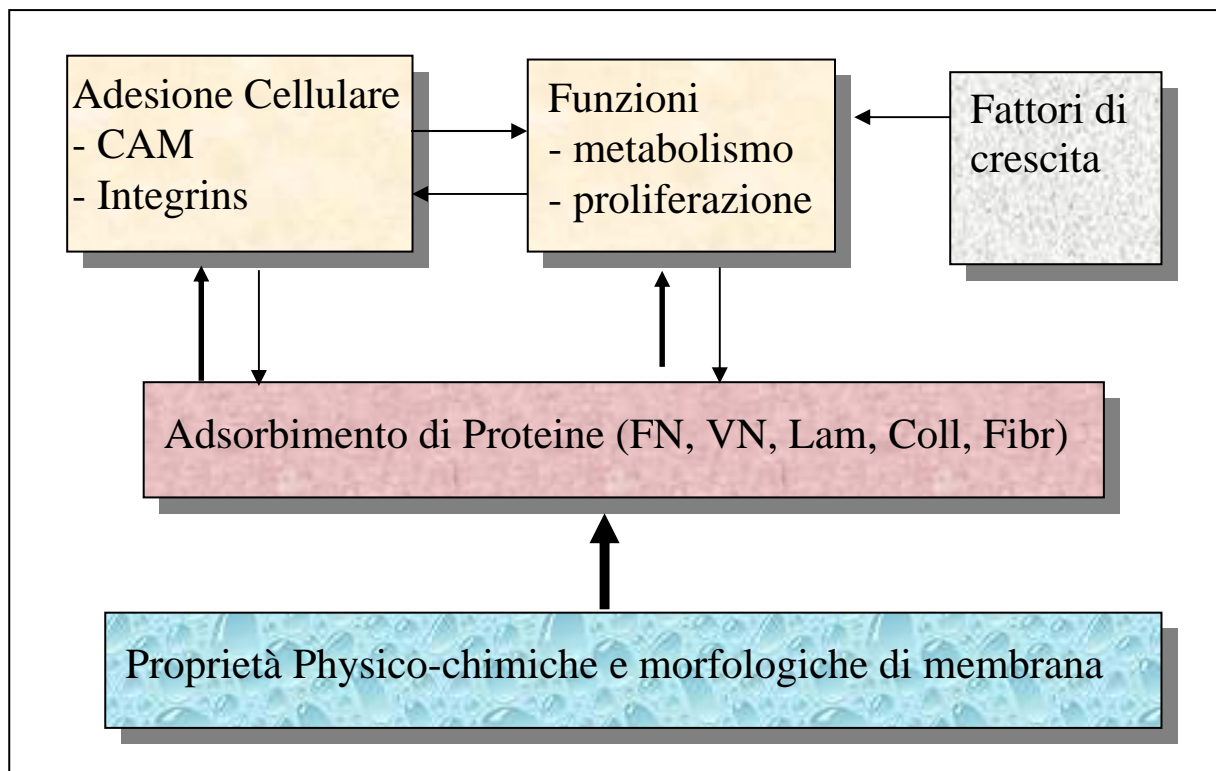
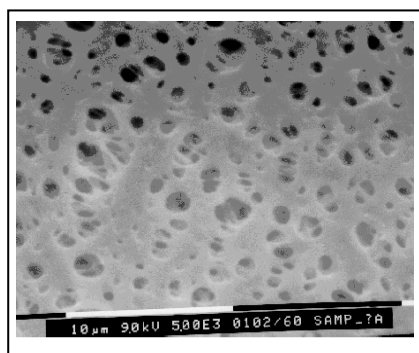
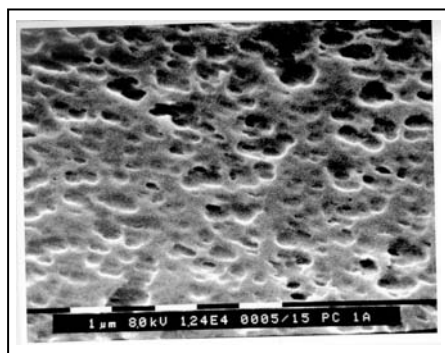


Figura 2. Schema illustrativo dell'influenza delle proprietà di membrana sull'adesione e metabolismo cellulare.

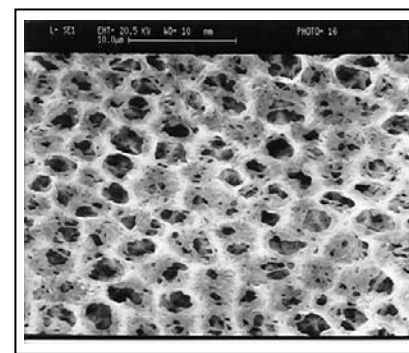
In questo studio sperimentale sono state investigate diverse membrane polimeriche semipermeabili per la coltura di cellule isolate da organi di mammifero. Sono state analizzate membrane con diversa dimensione e morfologia dei pori (Figure 3a-f). Le proprietà morfologiche delle membrane sono state caratterizzate mediante osservazione della superficie e dello spessore di membrana al microscopio elettronico a scansione (SEM). Le immagini ottenute sono state poi analizzate con un programma adeguato allo scopo.



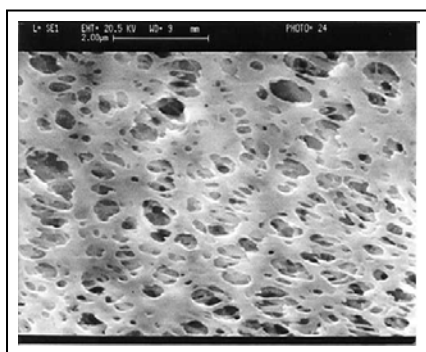
a) membrana di polipropilene



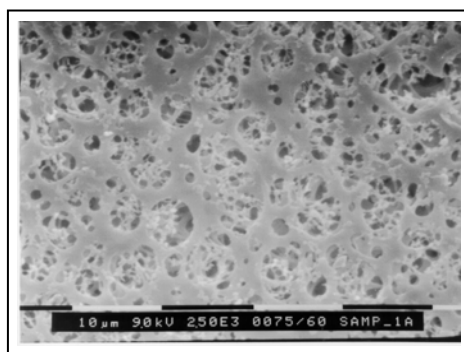
b) membrana di acetato di cellulosa



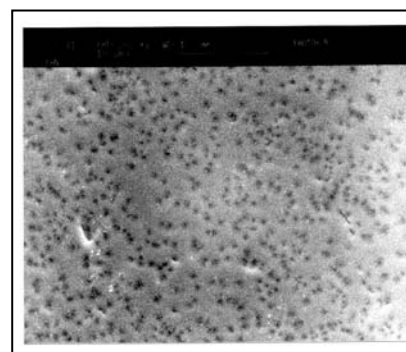
c) membrana di poliacrilonitrile



d) membrana di polietersulfone



e) membrana di policarbonato



f) membrana di poliamide

Figura 3. SEMs di membrane polimeriche con diversa morfologia e dimensione di pori.

Sono state prese in esame anche membrane con diverse caratteristiche idrofiliche/idrofobiche costituite da diverso materiale polimerico: membrane di acetato di cellulosa (CA), poliacrilonitrile (PAN), polisulfone (PSf), policarbonato (PC), polipropilene (PP) e perfluoropolimero (PF). Tutte le membrane adoperate sono membrane commerciali ad eccezione della membrana di perfluoropolimero che è stata preparata nei nostri laboratori mediante la tecnica di evaporazione. Le membrane sono state caratterizzate mediante misure di angolo di contatto statico in acqua prima di essere adoperate per la coltura di cellule epatiche. Come si può vedere nella figura 4, le membrane presentano diverse caratteristiche chimico-fisiche: l'angolo di contatto diminuisce all'aumentare dell'energia libera superficiale e quindi all'aumentare dell'idrofilicità di membrana. Così con le membrane idrofiliche come CA, PAN, PSf sono stati ottenuti valori di

angolo di contatto compresi tra 50-70° mentre con membrane idrofobiche come PP e PF sono stati raggiunti valori maggiori di 100°.

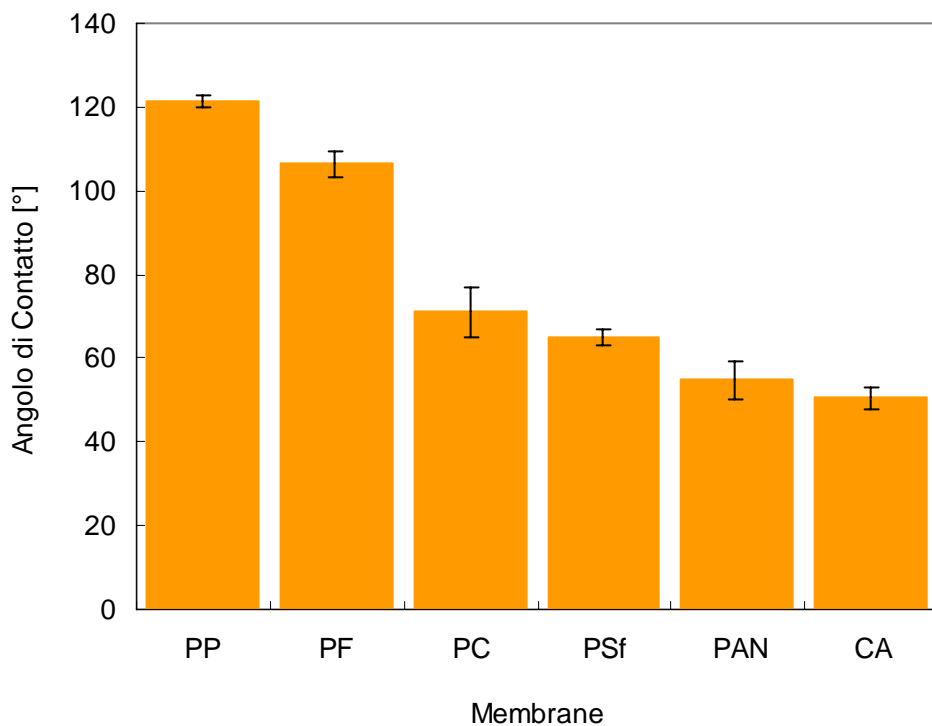


Figura 4. Misure di angolo di contatto statico in acqua su membrane con diverse caratteristiche chimico-fisiche

Le membrane caratterizzate sono state poi adoperate nella coltura di cellule isolate da fegato di ratto. Dopo 24 h di coltura, le cellule ristabiliscono le giunzioni intercellulari e formano degli aggregati tridimensionali simili a quelli osservati in vivo. La dimensione e la forma degli aggregati è differente a seconda delle caratteristiche chimico-fisiche di membrana. Su membrane di CA e PAN le cellule mostrano delle proiezioni della membrana citoplasmatica che servono loro come ancoraggio alla superficie. Su membrane di PSf le cellule si trovano organizzate in piccoli aggregati e conservano una forma piuttosto rotondeggiante. Queste osservazioni sono state confermate da un'analisi quantitativa delle cellule adese alle diverse membrane. I risultati ottenuti dimostrano che l'adesione delle cellule aumenta all'aumentare dell'energia libera superficiale di membrana ottenendo un valore massimo di adesione su superficie ad alta energia e con basso angolo di contatto.

Da questi risultati emerge che la citocompatibilità e biocompatibilità delle membrane a contatto con cellule e fluidi biologici può essere migliorata modulando le proprietà chimico-fisiche e morfologiche di membrana. A tale scopo per la completa comprensione del ruolo che le diverse proprietà di membrana svolgono nell'interazione con le cellule si stanno effettuando ulteriori esperimenti nei nostri laboratori.

Riferimenti Bibliografici

- [1] L. De Bartolo and E. Drioli In: *New Biomedical Materials - Basic and Applied Studies*, P.I. Haris, D. Chapman (Eds.), IOS Press: Amsterdam/Berlin/Tokjo/Washington, 1998, 167.
- [2] J.A. Hubbell., R. Langer, *C&EN*, American Chemical Society 1995, **13**, 42.
- [3] R. Langer, J.P. Vacanti, *Science*, 1993, **260**, 920.
- [4] G. Catapano, L De Bartolo, C.P. Lombardi and E. Drioli, *Int. J. Artif. Organs* 1996, **19**, 61.
- [5] G. Catapano, L. De Bartolo, C.P. et al., *Int. J. Artif. Organs* 1996, **19**, 77.
- [6] A. Bader, N. Fruhauf, M. Tiedge et al., *Exp. Cell Res*, 1999, **246**, 221.
- [7] L. De Bartolo, G. Jarosch-Von Schweder, A. Haverich, A. Bader, *Biotech. Progress*, 2000, **16**, 102.
- [8] A. Bader, L. De Bartolo and A. Haverich, *J. Biotechnology*, 2000, **81**, 95.
- [9] L. De Bartolo, G. Catapano, C. Della Volpe et al., *Artificial Organs*, 1997, **21**, 526.
- [10] L. De Bartolo, G. Catapano, C. Della Volpe, E. Drioli, *J. Biomat. Sci. -Polymer Edn.*, 1999, **10**, 641.
- [11] L. De Bartolo, G. Catapano, L. Ambrosio, *Int. J. Artif. Organs*, 1998, **21**, 657.