

Gare di appalto per le matrici acellulari dermiche: proposta per l'individuazione di score di qualità

Cristina Magnoni,¹ Fernando Campitiello,² Giovanni Papa,³ Alessandro Scalise,⁴ Corrado Durante,⁵ Francesco Petrella⁶

¹Unità Operativa Complessa di Dermatologia, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia; ²Unità Operativa Semplice Studio e Cura delle Lesioni Ulc. Aa.ii, Centro di Eccellenza per lo Studio e il Trattamento delle Ulcere Cutanee e del piede diabetico, Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli", Azienda Ospedaliera Universitaria, Dipartimento ad Attività Integrata di Chirurgia Polispecialistica; ³UCO Chirurgia Plastica, Trieste; ⁴Dipartimento di Chirurgia Plastica, Ricostruttiva ed Estetica, Università Politecnica delle Marche, Ancona; ⁵Unità per la Cura delle Lesioni, Ospedale Militare dell'Esercito, Roma; ⁶Centro di II Livello Area Polidistrettuale A, Area di Coordinamento Rete Aziendale di Riparazione Tessutale ASL Napoli 3 Sud, Italia

INTRODUZIONE

I sostituti cutanei bioingegnerizzati sono una valida alternativa alle tecniche tradizionali di rigenerazione tissutale e vengono utilizzati sempre più frequentemente in interventi di ricostruzione di ferite sia acute che croniche.

La cute è uno dei tessuti più studiati nel campo dell'ingegneria tissutale e sicuramente è stato il primo organo ingegnerizzato a essere applicato con successo nella pratica clinica.^{1,2}

Negli ultimi decenni sono stati sviluppati moltissimi sostituti cutanei bioingegnerizzati utilizzando materiali sia naturali sia sintetici. In generale i sostituti dovrebbero ripristinare a livello della cute lesa la funzione di barriera

impedendo un'eccessiva *transepidermal water loss*, proteggere dai microrganismi, ridurre il dolore e soprattutto promuovere la rigenerazione tissutale. Questi prodotti, infatti, fungono da *scaffold* tridimensionale temporaneo in cui le cellule possono migrare e proliferare in modo organizzato, portando alla rigenerazione dei tessuti e infine alla chiusura della ferita.³

CLASSIFICAZIONE

La denominazione di questi prodotti non è mai univoca e in letteratura sono elencati con diversi termini quali: i) *bioengineered skin equivalents*; ii) *tissue-engineered skin*; iii) *tissue-engineered skin constructs*; iv) *biological skin substitutes*; v) *bioengineered skin substitutes*; vi) *skin substitute bioconstructs*; vii) *living skin replacements*; viii) *bioengineered alternative tissue*.

In letteratura i sostituti cutanei hanno inoltre diverse classificazioni basate su: i) struttura anatomica: dermo-epidermici (compositi), epidermici, dermici; ii) durata: permanenti, semi-permanenti, temporanei; iii) tipo di biomateriale: biologico (autologo, allogeneico, xenogeneico) sintetico (biodegradabile, non-biodegradabile); iv) presenza di componente cellulare: cellularizzati (cellularizzati *in vitro*, cellularizzati *in vivo*), acellulari.⁴

LE MATRICI ACELLULARI DERMICHE

Le Matrici acellulari dermiche (MAD) mimano le caratteristiche strutturali e funzionali della Matrice Extracellulare Nativa e sono state sviluppate al fine di favorire la rigenerazione della componente dermica della cute.

In Europa, la maggior parte dei prodotti a matrice acellulare viene classificata come dispositivo medico di Classe III e deve essere identificata con il marchio CE. Nella classificazione nazionale dei dispositivi medici le

Corrispondenza: Cristina Magnoni, Unità Operativa Complessa di Dermatologia, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Via Università 4, 41121 Modena, Italia.
E-mail: magnoni.cristina@gmail.com

Parole chiave: Matrici acellulari dermiche; gare di appalto.

Contributi: gli autori hanno contribuito equamente; CM ha coordinato il lavoro.

Conflitto d'interesse: gli autori dichiarano l'assenza di conflitti d'interesse.

Fondi: nessuno.

Ricevuto per la pubblicazione: 24 maggio 2018.
Accettato per la pubblicazione: 25 giugno 2018.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution Non-Commercial 4.0 License (CC BY-NC 4.0).

©Copyright C. Magnoni et al., 2018
Licensee PAGEPress, Italy
Italian Journal of Wound Care 2018; 2(2):50-53
doi:10.4081/ijwc.2018.32

MAD sono classificate con i dispositivi protesici impiantabili e prodotti per osteosintesi (P004 Sistemi di Riempimento, Sostituzione e Ricostruzione di Strutture).

Possono essere costituiti da: i) materiali biologici naturali (ad es. derma da cadavere, sottomucosa intestinale suina); ii) materiali biologici ricostituiti (ad es. molecole biologiche purificate mediante liofilizzazione come il collagene bovino di Tipo I); iii) sostituti sintetici (ad es. molecole non biologiche come nylon, acido poliglicolico).

Le MAD di derivazione umana sono però considerati tessuti da Banca degli Organi Umani e il loro utilizzo è consentito solo previa valutazione preliminare della loro idoneità e sicurezza da parte di una Banca dei tessuti.

In Italia non è consentito il trapianto di tessuti di derivazione umana che non abbiano la documentazione rilasciata da una banca, che certifichi la sicurezza e la qualità del tessuto fornito e ne garantiscano la tracciabilità.

SCORE DI QUALITÀ

A oggi non esiste una classificazione univoca e condivisa delle MAD ma soprattutto non esistono degli standard di riferimento riconosciuti che aiutino il clinico a determinare l'appropriatezza del prodotto e la sua efficacia. Lo scopo del presente documento è quello di identificare delle caratteristiche tecniche del prodotto che possano essere riconosciute come parametri di qualità del prodotto stesso. Una volta identificate e condivise, queste caratteristiche potranno essere inserite nelle procedure di gara come *score* di qualità, sulla base dei quali si baserà la scelta del prodotto.

Parametri strutturali

Una matrice è biologicamente attiva cioè ha una reale azione rigenerativa, quando è in grado di guidare la guarigione fisiologica della ferita verso la sintesi di nuova matrice extracellulare evitando la contrazione e la formazione di cicatrici. A oggi possiamo affermare che le caratteristiche strutturali che conferiscono a una MAD azione rigenerativa sono le seguenti: i) porosità; ii) chimica di superficie; iii) tempo di degradazione.

Porosità

La migrazione cellulare all'interno della matrice è un requisito fondamentale per l'attività rigenerativa. Infatti, una volta migrate all'interno della matrice attraverso la sua architettura, le cellule si dispongono alla superficie in modo uniforme, aderiscono, proliferano e possono produrre una matrice extracellulare distribuita in maniera omogenea.

Per ottenere questo risultato è necessario che il

diametro medio dei pori abbia un valore medio contenuto entro un intervallo critico di 20-125 mm anche se il range ideale è stato individuato tra 70 e 120 mm. Pori più piccoli di 20 mm impediscono alle cellule di entrare nella matrice, mentre pori maggiori di 125 mm permettono alle cellule di entrare in numero troppo alto e di associarsi in cluster impedendo una uniforme distribuzione delle cellule a contatto con la superficie attiva della matrice.^{5,6}

Le cellule contrattili, contenute in pori a distribuzione *random*, in presenza della superficie attiva a cui aderiscono perdono i loro normali stati di assemblaggio e l'orientamento lungo un asse di deformazione comune, con conseguente annullamento quasi completo della forza contrattile macroscopica che normalmente contrae le ferite cutanee nei mammiferi adulti.

Score numero 1: porosità 20-125 mm con range ideale tra 70 e 120 mm.

Chimica di superficie

Un ulteriore prerequisito per le interazioni cellula-matrice è la presenza di ligandi appropriati per i recettori di adesione cellulare sulla matrice. Molti studi si sono concentrati sull'identità dei ligandi di adesione presenti sulle biomolecole della matrice extracellulare, in particolare sui ligandi per le integrine, la principale famiglia di recettori di adesione.

Una volta penetrate all'interno della matrice, le cellule si legano a queste molecole di adesione localizzate sulla superficie della matrice e questa interazione porta alla perdita del fenotipo contrattile e di conseguenza a un processo rigenerativo e non semplicemente riparativo.

Dati in letteratura dimostrano una riduzione significativa nel numero di cellule contrattili aSMA-positive (miofibroblasti) all'interno di matrici attive a base di collagene utilizzati per la rigenerazione dermica.⁶

Questa riduzione delle cellule contrattili è dovuta al fatto che il legame delle cellule con le fibre della matrice che sono orientate casualmente annulla l'orientamento lungo un asse di deformazione cellulare comune. La randomizzazione dei singoli vettori di forza contrattile delle cellule, che si trovano così orientati in tante diverse direzioni, diminuirebbe ulteriormente l'entità della forza di contrazione macroscopica della ferita.

Studi recenti mostrano che uno dei requisiti per un buon legame tra cellula e matrice è la presenza di una densità ben precisa dei ligandi per le integrine $\alpha1\beta1$ e $\alpha2\beta1$. I dati sono ancora limitati ma le evidenze sperimentali suggeriscono densità di ligandi che superano 200 μM per ambedue i ligandi $\alpha1\beta1$ o $\alpha2\beta1$.⁷

Score numero 2: chimica di superficie. Densità ideale per i ligandi delle Integrine maggiore di μM per ambedue i ligandi $\alpha1\beta1$ o $\alpha2\beta1$.

Tempo di degradazione

Un tempo di degradazione della matrice troppo veloce distrugge l'attività biologica, come evidenziato da MDA inattive che degradano prima di 2-3 settimane.

Il tasso di degradazione deve consentire alla matrice di rimanere insolubile per un periodo ben definito. I miofibroblasti compaiono in una ferita cutanea acuta a tutto spessore circa una settimana dopo il trauma e scompaiono in circa 3-4 settimane.

Una matrice che possiede un'emivita inferiore a circa 7 giorni sarebbe quindi eccessivamente degradata nel momento in cui la ferita viene colonizzata dai miofibroblasti ad attività contrattile. In queste condizioni si perderebbe il blocco della contrazione della ferita.

All'opposto, una matrice con un'emivita molto più lunga di 3-4 settimane potrebbe provocare un prolungato reclutamento di macrofagi, che vengono richiamati per partecipare al processo di degradazione della matrice. La prolungata presenza di macrofagi porta a una risposta infiammatoria di lunga durata che potrebbe annullare l'attività di inibizione dei miofibroblasti.

Le matrici dermiche di derivazione biologica sono generalmente costituite in piccola parte da contenuto solido (1-2%) e risultano relativamente instabili.⁸

Per stabilizzare e aumentare l'emivita della matrice abbastanza a lungo in modo che possa esercitare i suoi effetti sul processo di guarigione della ferita, spesso si ricorre a processi di *cross-linking*; quindi il *cross-linking* va considerato solamente come una tecnica di stabilizzazione della matrice che allunga il tempo di degradazione e non come un requisito che possa aumentare la qualità della matrice. Al contrario se non ben standardizzato il *cross-linking* può esercitare effetti dannosi sul processo di guarigione della ferita; prolungando eccessivamente l'emivita della matrice può contribuire a causare una risposta da corpo estraneo (*foreign body response*), influenzando la formazione del derma, l'attecchimento di un successivo innesto dermo-epidermico e l'esito contrattile della ferita.

Il *cross-linking* chimico può inoltre produrre prodotti di degradazione che sono dannosi per la sopravvivenza delle cellule e rendere la matrice troppo rigida.

In alternativa, l'emivita delle matrici può essere aumentata e stabilizzata mediante l'aggiunta di componenti ECM che le proteggono dalla degradazione, quali: i) Condroitina 6-solfato; ii) Condroitin 4-solfato; iii) Dermatan solfato; iv) Eparina; v) Eparan solfato; vi) Fibronectina; vii) Acido ialuronico; viii) Elastina.⁹

Score numero 3: tempo di degradazione ideale 3-4 settimane.

Caratteristiche tecniche

Oltre ai parametri strutturali sopra elencati vanno prese in considerazione per la scelta di una MAD alcune

caratteristiche tecniche legate alla produzione industriale, commercializzazione ed applicazione scientifica.

- Presenza di studi clinici con il prodotto registrato. Gli studi clinici sono necessari per ottenere il marchio CE come disposto dal Ministero della Salute (nel documento sulle indagini cliniche dei dispositivi medici).
- Presenza di *references* in PubMed con il prodotto registrato.
- Dimensioni. Le matrici impiantabili devono essere fornite in almeno tre differenti dimensioni per permettere maggiore maneggevolezza sul campo operatorio. Di seguito alcuni esempi di prodotti in uso: i) 5.2 cm×7.4 cm, 10.5 cm×14.8 cm, 21 cm×29.7 cm; ii) 5 cm×5 cm, 10 cm×12.5 cm, 10 cm×25 cm, 20 cm×25 cm.
- Procedure chirurgiche/tecniche chirurgiche. Le matrici devono essere fornite con spessori differenti (ad es. 1 e 2 mm) in modo da permettere l'esecuzione di procedure chirurgiche *one or two step*. Nelle procedure *one step* la matrice sottile (1 mm) e l'innesto dermo epidermico *split-thickness* vengono impiantati nella stessa seduta chirurgica. Nelle procedure *two step* l'innesto viene eseguito circa 20 giorni dopo l'impianto della matrice.
- Sterilizzazione. La sterilizzazione è importante per ridurre il rischio di trasmissione infettiva ed è richiesta per ottenere l'autorizzazione della US Food and Drug Administration all'utilizzo di prodotti impiantabili di derivazione animale. Al contrario la maggior parte dei prodotti acellulari derivati dall'uomo è lavorata in modo sterile sin dall'inizio e non necessita processi di sterilizzazione terminale. Le sostanze chimiche residue utilizzate durante il processo di sterilizzazione (e.g. ossido di etilene o glutaraldeide) possono produrre una risposta infiammatoria all'interno del tessuto ospite. Le radiazioni possono danneggiare la matrice. Nonostante questo, la procedura resta un requisito fondamentale.
- Conservazione: i prodotti che hanno disponibilità immediata e che possono essere conservati a temperatura ambiente, richiedono una preparazione minima e sono vantaggiosi sia per i clinici che per i pazienti riducendo i tempi operatori.
- Scadenza: la durata di validità può variare da 18 mesi a 5 anni.

CONCLUSIONI

Score di qualità del prodotto: le condizioni necessarie per entrare in gara elencate secondo importanza sono le seguenti. i) Porosità; ii) Tempo di degradazione; iii) Studi clinici con il prodotto; iv) References in PubMed; (v: aggiuntiva) Chimica di superficie.

Score di qualità del lotto: le condizioni necessarie per entrare in gara elencate secondo importanza sono le seguenti. i) Dimensioni; ii) Procedure chirurgiche/tecniche chirurgiche; iii) Sterilizzazione; iv) Conservazione; v) Scadenza.

BIBLIOGRAFIA

1. Rheinwald JG, Green H. Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. *Nature* 1977;265:421-4.
2. O'Connor N, Mulliken JB, Banks-Schlegel S, et al. Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. *Lancet* 1981;1:75-8.
3. Bottcher-Haberzeth S, Biedermann T, Reichmann E. Tissue engineering of the skin. *Burns* 2010;36:450-60.
4. Vig K, Chaudhari A, Tripathi S, et al. Advances in skin regeneration using tissue engineering. *Int J Mol Sci* 2017;18:789-808.
5. Yannas IV, Lee E, Orgill DP, et al. Synthesis and characterization of a model extracellular matrix which induces partial regeneration of adult mammalian skin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:933-7.
6. Soller EC, Tzeranis DS, Miu K, et al. Common features of optimal collagen scaffolds that disrupt wound contraction and enhance regeneration both in peripheral nerves and in skin. *Biomaterials* 2012;33:4783-91.
7. Tzeranis DS, Roy A, So PTC, Yannas IV. An optical method to quantify the density of ligands for cell adhesion receptors in three-dimensional matrices. *J R Soc Interface* 2010;7S:649-61.
8. Yannas IV. Emerging rules for inducing organ regeneration. *Biomaterials* 2013;34:321-30.
9. Van der Veen VC, Van der Wal MBA, Van Leeuwen MCE, et al. Biological background of dermal substitutes. *Burns* 2010;36:305-21.