



Ministero della Salute – Direzione Generale della Ricerca scientifica e Tecnologica

Rendiconto di spesa
Fondi 5 per mille ANNO 2017
Enti della Ricerca Sanitaria

ENTE¹:



Sede Legale: Padiglione Rama - Via Paccagnella, 11 - 30174 Zelarino VE
Iscrizione nel Registro Regionale delle Persone Giuridiche al n. 83 (VE/299)
C.F. 02320670272 P.I. 03068370273

Titolo del progetto:

**RIGENERAZIONE DELL'ENDOTELIO CORNEALE A PARTIRE DA
CELLULE – UNA NUOVA PROSPETTIVA PER LA CHERATOPLASTICA
ENDOTELIALE DI TIPO DMEK**

Introduzione

L'endotelio corneale è il quinto e più profondo strato della cornea. Si tratta di un singolo strato di cellule piatte e dalla forma esagonale, con nuclei allungati orizzontalmente. Le sue cellule sono strettamente adese tra loro grazie a interdigitazioni che si dipartono dalle porzioni laterali delle loro membrane plasmatiche, coadiuvate da giunzioni serrate e giunzioni comunicanti. Il compito dell'endotelio corneale è essenzialmente quello di fungere da filtro posteriore per gli strati superiori della cornea ed è inoltre il principale responsabile della idratazione corneale. Le cellule endoteliali corneali (HCEncs) hanno una modesta capacità mitotica e il loro numero diminuisce gradualmente con l'età del soggetto. I danni all'endotelio corneale sono quelli che maggiormente portano alla richiesta di trapianto. In particolare una delle maggiori cause di disfunzione corneale è la distrofia di Fuch's. Riducendosi il numero di cellule endoteliali funzionanti, si rompe l'equilibrio che regola le funzioni barriera e pompa e inizia l'eccessiva idratazione della cornea. Il fluido edematoso distacca le lamelle corneali e si accumula in sacche. La separazione delle fibrille di collagene porta ad un annebbiamento della cornea, perdita della trasparenza e quindi inevitabilmente della vista. Il trattamento d'elezione è la cheratoplastica endoteliale che negli ultimi anni ha soppiantato la cheratoplastica perforante che prevede la sostituzione di tutti gli strati della cornea. I due principali tipi di interventi di cheratoplastica endoteliale sono la DSAEK (Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty) e la DMEK (Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty),

¹ Istituzione beneficiaria del contributo del 5 per mille.

SF

introdotta da Melles nel 2006. Quest'ultima rappresenta l'ultima evoluzione della cheratoplastica endoteliale e prevede la sostituzione della sola membrana di Descemet con l'endotelio corneale (10-20 micron) senza la presenza di stroma. Negli ultimi anni, però, le tecniche di biologia cellulare hanno portato allo sviluppo di nuove strategie terapeutiche basate sull'amplificazione di cellule *in vitro*. Nonostante sia noto che le HCEncs non si rigenerino *in vivo*, è stato ampiamente dimostrato che in opportune condizioni di crescita *in vitro* sono in grado di replicare ed essere propagate. Questo è stato dimostrato sia a partire da cornee di donatori giovani (Peh et al., 2015) che anziani (Parekh et al., 2017). Recentemente inoltre proprio il nostro gruppo ha dimostrato che l'endotelio corneale periferico che non viene trapiantato in seguito all'ottenimento di lenticoli per cheratoplastica endoteliale può dare origine a colture di cellule endoteliali di ottima qualità. Il motivo è che la densità è elevata (oltre 2200 cellule/mm²) e le porzioni periferiche dell'endotelio sono ricche di cellule con maggiore capacità proliferativa rispetto a quelle della porzione centrale (Parekh et al., 2019A; Parekh et al., 2019B). La coltura di cellule endoteliali corneali, opportunamente cresciute su una matrice biocompatibile, permetterebbe pertanto di ottenere membrane endoteliali del tutto simili a quelle ottenute da cornea di donatore per il trapianto di tipo DMEK. Il prossimo step nel campo del trapianto di cornea sarebbe quindi di utilizzare membrane ottenute da cellule invece che da donatore, permettendo quindi una maggiore inclusione di pazienti che sono in lista d'attesa per una chirurgia di tipo DMEK. Essendoci già in commercio e avendo noi stessi sviluppato dei *device* per il trasporto e il *loading/unloading* di membrane per DMEK, lo sviluppo clinico verrebbe notevolmente accelerato. Ad oggi, un solo studio clinico ha dimostrato la capacità delle cellule corneali endoteliali di avere una efficacia clinica. In questo caso le cellule sono state iniettate in camera anteriore come una sospensione cellulare, con i pazienti che sono dovuti restare per varie ore a testa supina in modo da permettere alle cellule iniettate di ripopolare l'endotelio corneale. Nonostante i risultati abbiano dimostrato un beneficio clinico, molti hanno però criticato tale strategia, chiedendosi quale fosse il destino delle cellule che non si sono integrate nella matrice endoteliale. Pensiamo pertanto che l'utilizzo di uno scaffold in cui le HCEncs possano crescere permetta di avere un prodotto che (1) è più facilmente controllabile dal punto di vista di *safety* e (2) può essere trasferito al paziente con sistemi di *delivery* già ampiamente validati dal punto di vista clinico.

Scopo del progetto

Lo scopo del progetto è la messa a punto di un protocollo di crescita delle cellule corneali endoteliali su scaffold biocompatibile e possibilmente degradabile in seguito a digestione enzimatica in modo tale da ottenere una membrana facilmente arrotolabile in un *device* per DMEK. Questo permetterebbe al chirurgo di avere a disposizione un prodotto di terapia cellulare pre-caricato e ready-to-go per la successiva chirurgia.

Risultati

Nella prima fase del progetto sono state testate diverse condizioni di coltura *in vitro* delle cellule ottenute da donatore. Sono state utilizzate cornee che sono risultate non idonee per il trapianto e caratterizzate da una bassa densità cellulare (circa 1500 cell/mm²). Le cellule sono state isolate con due step consecutivi: stripping della porzione tissutale endotelio-membrana di Descemet e digestione enzimatica per degradare la membrana di Descemet. Le cellule sono poi state esaminate sia valutando la morfologia, sia analizzando l'espressione di marcatori proteici d'identità quali ZO-1, proteina delle giunzioni cellulari che mantiene le cellule adese tra loro, e la pompa Na/K, necessaria per mantenere la capacità di regolare il trasporto di soluti con gli strati superiori e l'idratazione della cornea. Più del 60% delle colture non ha dato esito positivo. Nonostante la creazione di un pool di cellule proveniente da più donatori per sopperire alla bassa densità cellulare, le cellule non sono state in grado di rigenerare lo strato endoteliale atteso. Successivamente, per migliorare la qualità delle colture, è stato deciso di scegliere cornee da donatori che avessero una maggiore densità cellulare (non inferiore a

1.800cell/mm²). Sono state poi modificate alcune condizioni di crescita riguardanti le superfici di crescita *in vitro* (usati supporti di grandezze diverse) e i reagenti per alcune fasi del protocollo di isolamento e di coltura delle cellule, come la fase di digestione enzimatica, la fase di adesione e il terreno di coltura delle cellule. Questi cambiamenti hanno permesso di migliorare notevolmente la qualità delle colture cellulari e hanno permesso di affinare ulteriormente il protocollo utilizzato.

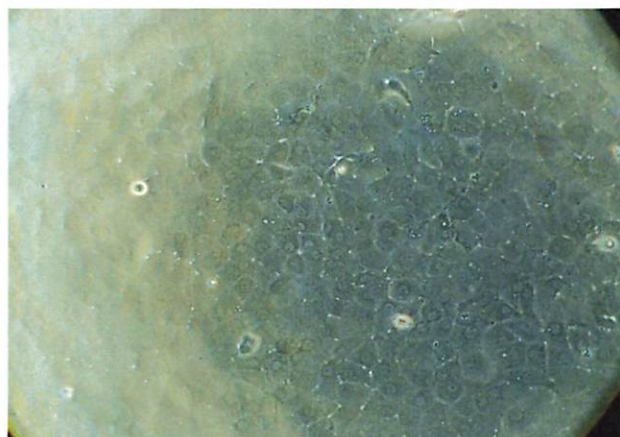


Figura 1

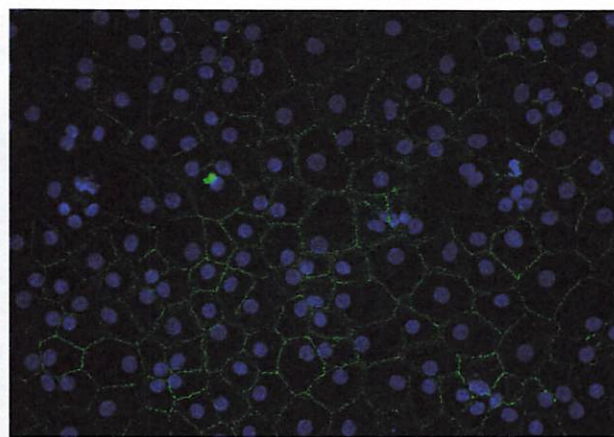


Figura 2

Come è possibile osservare nella Figura 1, con il nuovo protocollo è possibile ricostruire *in vitro* un endotelio molto simile a quello fisiologico. La morfologia è regolare e le cellule sono ben adese formando uno strato uniforme. In media le cellule estratte impiegano dai 5 ai 7 giorni per ricostruire lo strato visibile in Figura 1 e fino ad oggi sono state processate circa 120 cornee da donatore. Anche la valutazione dei marcatori proteici precedentemente citati ha dato esito positivo. Come è possibile notare in Figura 2 (marcatore proteico ZO-1) e Figura 3 (marcatore proteico pompa Na/K), le cellule, una volta ricostituito lo strato endoteliale, esprimono correttamente entrambe le proteine. Sull'onda di questo risultato, per la crescita delle cellule è stato usato anche un supporto di origine biologica, lo scaffold corneale. Si tratta di una cornea non idonea al trapianto in cui è stato rimosso solo lo strato delle cellule endoteliali. Come riportato nella Figura 4, le cellule sono cresciute e sembrano aver colonizzato la superficie, nonostante in alcuni punti non sembrano aver aderito correttamente a causa dell'irregolarità strutturale della cornea scaffold.

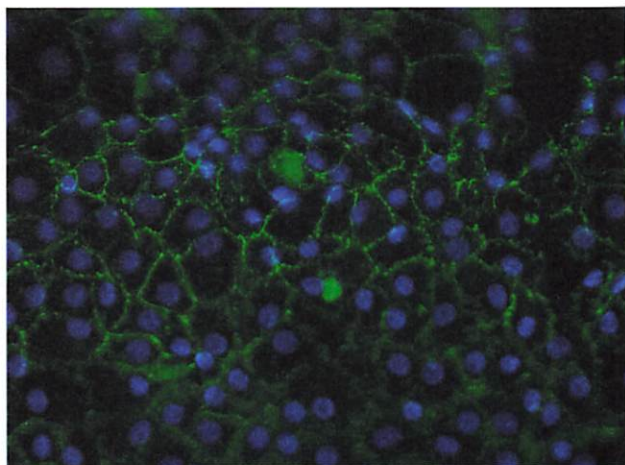


Figura 3

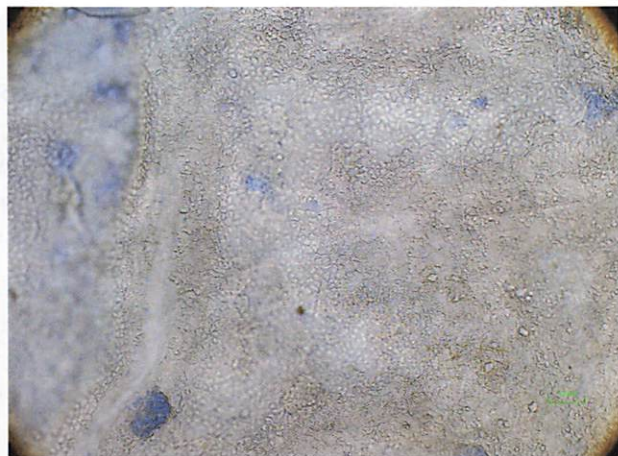


Figura 4

SF

I dati ottenuti nella prima fase hanno permesso di delineare un protocollo standard che permette di ottenere una buona coltura di cellule endoteliali al primo passaggio. Tale protocollo prevede, come detto in precedenza, l'utilizzo di un enzima di digestione (collagenasi) e un terreno di coltura addizionato di siero bovino fetale e fattori di crescita. Nella fase successiva, l'efficacia dell'isolamento delle cellule è stata tale da permetterci di non dover ricorrere al pool di più cornee. Come è possibile osservare infatti, è possibile ricavare una buona coltura cellulare anche dalla cornea singola. Le cellule hanno raggiunto la confluenza e mantenuto una buona morfologia (Figura 5).

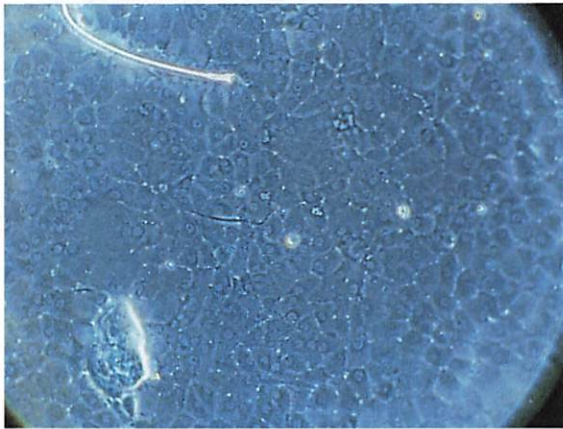


Figura 5

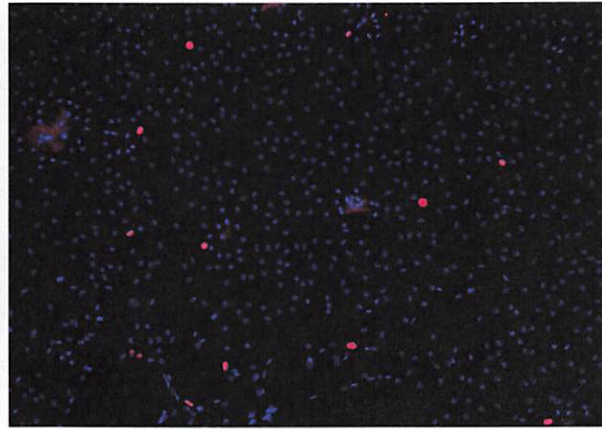


Figura 6

Oltre ai marcatori proteici precedentemente citati, è stata analizzata anche l'espressione della proteina nucleare Ki67 mediante immunofluorescenza. Tale marcatore è un indice di proliferazione. I risultati hanno dimostrato che le cellule endoteliali mantengono una certa capacità proliferativa (Figura 6, in rosso il segnale marcatore Ki67). Nonostante il protocollo delineato sia in grado di produrre delle buone colture al primo passaggio, sono state vagliate delle alternative sia per la fase di estrazione enzimatica che per la fase di coltura *in vitro*. Nello specifico, è stata utilizzata la liberasi, un enzima di digestione come alternativa alla collagenasi. I risultati però non hanno evidenziato delle miglierie, motivo per cui è stato deciso di continuare ad utilizzare l'enzima del protocollo standard. Riguardo invece alla fase di coltura, l'utilizzo del terreno singolo nel protocollo standard è stato confrontato con un approccio che prevede l'utilizzo di due terreni utilizzati in modo alternato. La coltura infatti è stata incubata per le prime 24h con un terreno basilare privato di tutti i fattori di crescita. Allo scadere del primo giorno le cellule sono state trasferite in terreno addizionato di fattori di crescita per stimolare la proliferazione. Una volta raggiunta la confluenza, le cellule sono state nuovamente trasferite in terreno basilare con lo scopo di stabilizzare la morfologia. Come si può notare in foto (Figura 7 terreno singolo, Figura 8 doppio terreno), le cellule mantengono una buona morfologia in entrambe le condizioni, motivo per cui è stato deciso di mantenere l'utilizzo del terreno

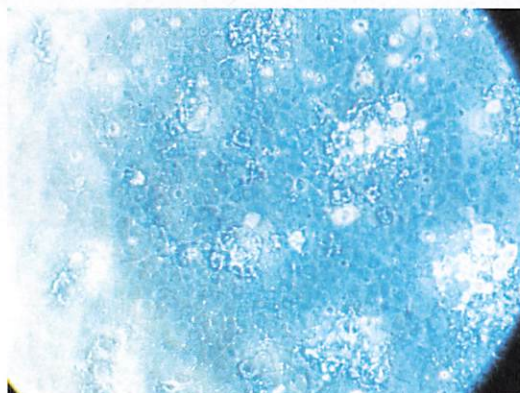


Figura 7

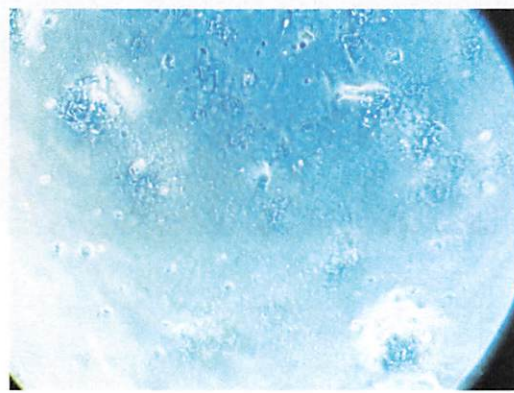


Figura 8

singolo, così da semplificare la procedura.

Successivamente lo studio si è concentrato sul mantenimento delle cellule in coltura per passaggi ulteriori e quindi sull'amplificazione del pool cellulare. A tale scopo sono state introdotte delle nuove variabili nel protocollo per l'isolamento delle cellule, come l'utilizzo del reagente EDTA e un nuovo terreno di coltura. L'EDTA è un reagente in grado di rompere i legami cellulari associati agli ioni Ca^{2+} . L'utilizzo di questo reagente permetterebbe di isolare le cellule endoteliali dalla membrana di Descemet senza la necessità di ricorrere ad una digestione enzimatica. La nuova procedura di isolamento è stata poi testata sia con il terreno utilizzato nel protocollo standard sia con il nuovo terreno. Sfortunatamente, nonostante le novità introdotte, non è stato possibile mantenere le cellule in coltura per più di un passaggio. Anche con il protocollo standard, le cellule perdono la propria morfologia, divenendo altamente irregolari e con caratteristiche fibroblastoidi. Lo stesso risultato è stato ottenuto anche nella combinazione della digestione enzimatica e il nuovo terreno di coltura. Nelle foto di sotto riportate possiamo notare come, dopo la prima amplificazione, le cellule perdono completamente la loro morfologia (Figura 9: Collagenasi+terreno standard; Figura 10: collagenasi+nuovo terreno; Figura 11: EDTA+terreno standard; Figura 12 EDTA+nuovo terreno).

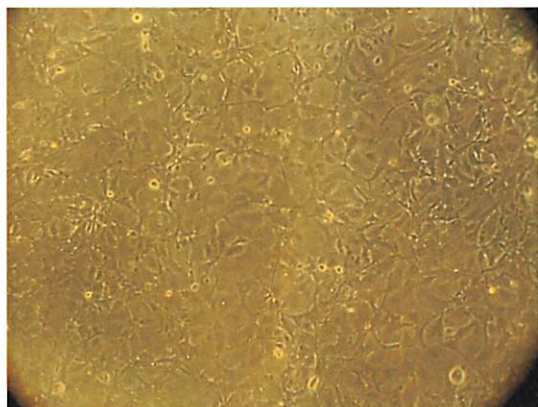


Figura 9

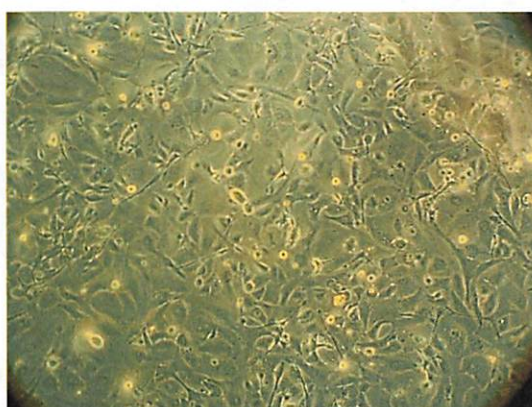


Figura 10

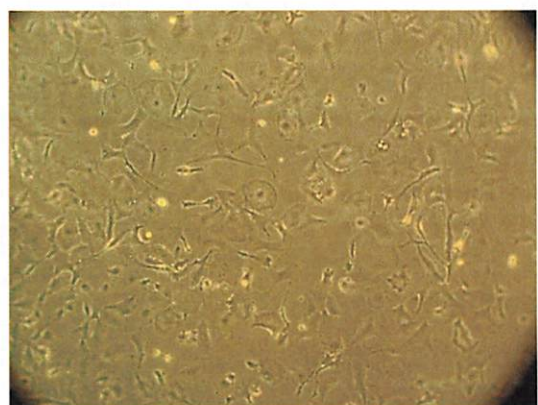


Figura 11

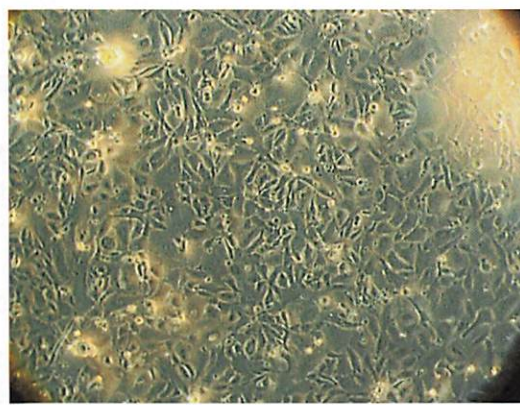


Figura 12

Nel tentativo di mantenere una corretta morfologia endoteliale, sono state poi effettuate delle prove di coltura su una superficie addizionata della matrice extracellulare ottenuta da una linea cellulare immortalizzata di endotelio umano. Alcuni studi hanno dimostrato come l'utilizzo della matrice extracellulare possa creare una condizione per la coltura delle cellule endoteliali simile a quella fisiologica, grazie alla presenza di alcuni fattori di crescita. Il test effettuato però non ha mostrato differenze significative tra l'impiego della matrice extracellulare e il normale protocollo di coltura *in vitro* per il primo passaggio.

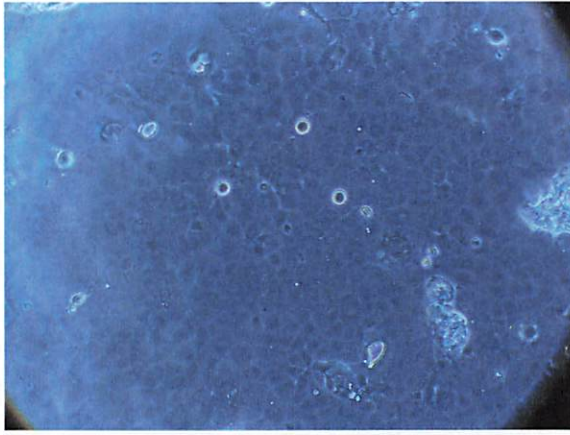


Figura 13

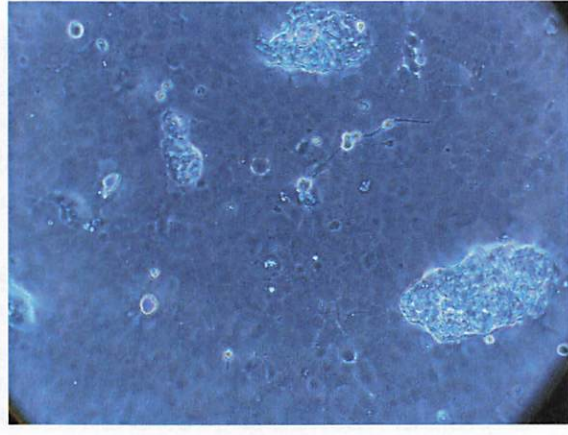


Figura 14

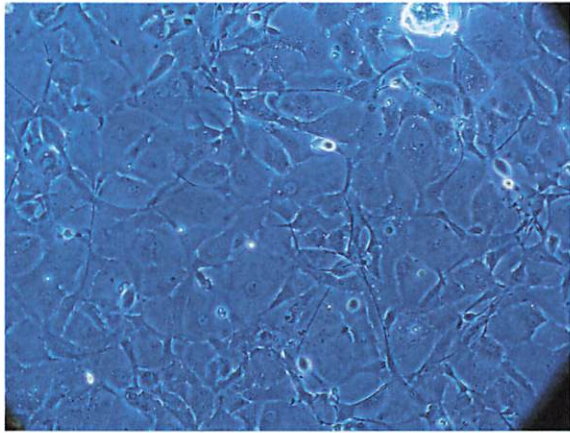


Figura 15

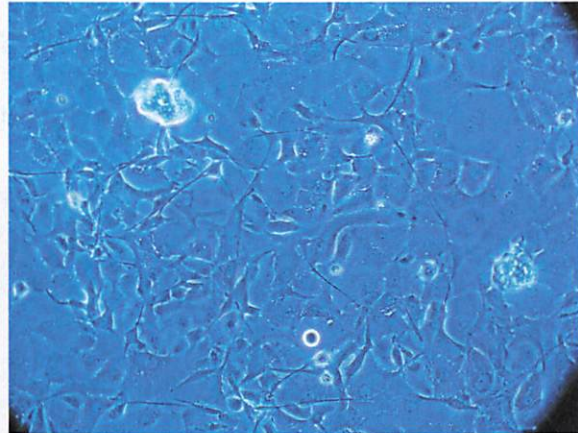


Figura 16

Al primo passaggio, le cellule mantengono una buona morfologia in entrambe le condizioni di coltura (Figura 13 protocollo standard; Figura 14 Coltura su matrice extracellulare). Nei passaggi successivi però le cellule perdono nuovamente le caratteristiche morfologiche, divenendo fibroblastiche (Figura 15 protocollo standard; Figura 16 coltura su matrice extracellulare). Un'ulteriore condizione testata è stata quella riguardante l'utilizzo del reagente DAPT nel terreno di coltura. Come è noto in letteratura, questo composto è in grado di agire stimolando la proliferazione cellulare e inibendone il differenziamento. Purtroppo, come nel caso della matrice extracellulare, non sono emerse differenze nell'impiego di tale composto rispetto al normale protocollo di coltura. Le cellule, una volta amplificate dopo il primo passaggio, perdono la loro morfologia e subiscono una transizione verso la forma fibroblastica. Nonostante ciò, l'utilizzo di tale composto è ancora in fase di studio e necessita di ulteriori approfondimenti.

In merito alla possibilità di coltura delle cellule su uno scaffold ingegnerizzato, successivi esperimenti non hanno permesso di replicare il risultato ottenuto nella prima fase. Le cellule seminate sugli scaffold ingegnerizzati non hanno avviato alcuna coltura, evidenziando notevoli difficoltà nell'utilizzo di cornee ingegnerizzate. È stato testato un nuovo procedimento per la produzione dello scaffold ingegnerizzato, che prevede 3 cicli di congelamento e scongelamento all'interno di un terreno di coltura. Il protocollo precedente prevedeva che i 3 cicli fossero condotti a secco, senza alcun mezzo liquido. Purtroppo, anche variando la procedura e introducendo il terreno per il congelamento, lo scaffold prodotto non ha permesso alle cellule di ricostituire uno strato endoteliale.

Considerate dunque le numerose difficoltà nel mantenimento in coltura delle cellule endoteliali e la loro amplificazione oltre il primo passaggio, lo studio si è soffermato sulla prima fase del progetto, a discapito della fase successiva WP2 volta a determinare la vitalità e caratteristiche della membrana endoteliale ricostruita una volta caricata in un

device per chirurgia DMEK.

Prospettive per i prossimi mesi

L'obiettivo futuro sarà quello di standardizzare l'intero processo di coltura cellulare. Nello specifico, verranno effettuate dei test per valutare la miglior concentrazione di partenza per l'avvio della coltura cellulare, il tempo necessario per il raggiungimento della confluenza, la morfologia finale e il numero di cellule ottenute al termine della coltura. Inoltre, verranno condotti ulteriori approfondimenti sull'utilizzo del reagente DAPT nella fase di coltura.

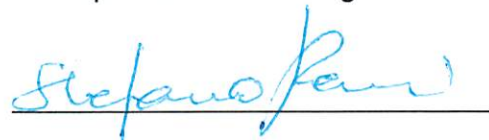
Saranno vagliate anche nuove soluzioni per poter far crescere le cellule su supporti differenti tra cui anche gli scaffold biologici ottenuti da cornea che non sono idonee al trapianto, cercando di correggere l'irregolarità strutturale di quest'ultimi e nuovi supporti di origine artificiale.

Bibliografia

- Peh GS, et al. **The effects of Rho-associated kinase inhibitor Y-27632 on primary human corneal endothelial cells propagated using a dual media approach.** Sci Rep. 2015;5;
- Parekh M, et al. **Human corneal endothelial cell cultivation from old donor corneas with forced attachment.** Sci. Rep. 2017;7:142.
- Parekh M, et al. **Culturing Discarded Peripheral Human Corneal Endothelial Cells From the Tissues Deemed for Preloaded DMEK Transplants.** Cornea. 2019; 38(9): 1175-1181. A
- Parekh M, et al. **Increasing donor endothelial cell pool by culturing cells from discarded pieces of human donor corneas for regenerative treatments.** Journal of Ophthalmology 2019; 2019: 2525384. B

Data 28 gennaio 2021

Il Responsabile del Progetto



Il Legale Rappresentante



Si autorizza al trattamento dei dati ai sensi del d.lgs. 196/2003

Il Legale Rappresentante

