

Dispositivi medici di collagene utilizzati come agenti emostatici e cicatrizzanti

Collagen Medical devices as Haemostatic and Cicatrizing Agents

A.R. Taddei¹, S. Picchietti¹, G. Gambellini¹, A.M. Fausto¹, F. Giorgi², E. Cervadoro², F. Ricciuti²

Clin. Term. 56 (1-2):61-67, 2009

RIASSUNTO – Quattro dispositivi medici di collagene sono stati esaminati al microscopio elettronico per determinare le migliori condizioni strutturali che ne giustificano il ruolo come agenti emostatici e cicatrizzanti. I parametri che sono stati considerati più efficaci per il processo di guarigione sono la struttura interstiziale e lo spessore dei fasci di collagene che la delimitano. Spazi interstiziali troppo grandi o troppo piccoli non sono in grado di sostenere la migrazione cellulare, mentre fasci di collagene troppo fini o troppo spessi possono influenzare il tempo di persistenza del dispositivo sulla ferita. Sulla base di questi criteri, è stato trovato che i campioni di Condress realizzano il miglior compromesso tra l'estensione della struttura interstiziale e lo spessore dei fasci di collagene.

ABSTRACT – Four collagen samples were examined at the electron microscope to find out the best structural conditions satisfying their haemostatic and cicatrizing roles. Parameters considered most effective during healing process are the mesh substructure and the thickness of the collagen strands. Meshes too large or too small may not be suitable for sustaining cell migration, while collagen strands too thin or too thick may affect the actual persistence of the medical device on the wounded area. Based on these criteria, Condress samples are thought to provide the best structural compromise between extension of the mesh areas and thickness of the collagen strands.

PAROLE CHIAVE – Collagene, microscopia elettronica, idrossiprolina, fibroblasti
KEY WORDS – Collagen, electron microscopy, hydroxyproline, fibroblasts

Introduzione

Il collagene è una proteina fibrosa costitutiva della matrice extracellulare di molti tessuti umani, inclusi i tendini, la pelle e le ossa (1). A livello molecolare, risulta composto di tre catene polipeptidiche elicoidali del peso complessivo

di 300 kDa (2). La disposizione tridimensionale di queste catene conferisce alle fibre collaginee una caratteristica alternanza periodica facilmente evidenziabile con la microscopia elettronica (3). In virtù della bassa immunogenicità e della relativa stabilità, il collagene è stato ampiamente usato come dispositivo medico per il tratta-

¹Dipartimento di Scienze Ambientali e Centro di Microscopia Elettronica, Università della Tuscia, Viterbo;
²Dipartimenti di Neuroscienze e Chirurgia, Università di Pisa, Pisa

mento di lesioni cutanee di diversa eziologia (8). Attualmente sono in commercio numerose placchette di collagene nativo eterologo impiegate per la cicatrizzazione di piaghe da decubito, diabetiche o ustioni.

In questo studio, gli autori hanno posto a confronto quattro diversi campioni di collagene - Condress, Promogran, Colactive and Puracol - allo scopo di determinare le caratteristiche strutturali ottimali per la migliore interazione con i tessuti della ferita nel corso del processo di cicatrizzazione. I risultati sono presentati e discussi secondo la corrente letteratura sulla biodegradabilità e stabilità del collagene.

Materiali e Metodi

Gli esperimenti riportati in questo studio sono stati effettuati sul collagene equino dei seguenti dispositivi medici: (1) Condress (Euroresearch), (2) Puracol (Skin & Health Care), (3) Promogran (Johnson & Johnson) e (4) Colactive (Hartmann). Ognuno di questi campioni è stato analizzato per il contenuto in idrossiprolina utilizzando il metodo spettrofotometrico di Prockop e Udenfriend (11) e fissato in glutaraldeide e formaldeide (7) per l'osservazione alla microscopia elettronica a scansione (SEM) ed in trasmissione (TEM). Le dimensioni dello spazio interstiziale di ciascun campione sono state determinate tramite un analizzatore di immagini fornito di programma Image J (NIH). I dispositivi medici di Condress, Puracol, Promogran e Colactive sono stati sottoposti a trattamenti con collagenasi (C0130 - Sigma Aldrich) ed analizzati a vari tempi di esposizione - 24, 48 e 72 ore - tramite elettroforesi in gel di poliacrilamide e microscopia elettronica. Infine gli stessi campioni sono

stati posti in un mezzo di coltura (DMEMF 10) in presenza di fibroblasti 3T3 e linfociti ed osservati a vari tempi di incubazione tramite microscopia ottica ed elettronica.

Risultati

In Tabella 1 sono riportati alcuni parametri fisico-chimici per ciascuno dei campioni di collagene analizzati in questo studio. Come è evidente dalla colonna D, la quantità di collagene presente in ciascun campione è pari al 100% per Condress, al 89,82% per Puracol, al 57,44% per Promogran and 83,10% per Colactive. Questi valori sono stati calcolati attraverso due determinazioni indipendenti del contenuto di azoto (B) e di idrossiprolina (C). Inoltre, per determinare quanto collagene sia presente in ogni campione e quanto di questo sia effettivamente disponibile per il contatto, la distribuzione di collagene per unità di volume e di superficie è stata determinata. Come è chiaramente osservabile in Tabella 2, il Condress ha una quantità totale di collagene superiore a quella di ogni altro campione, ma, al tempo stesso, ha la minore densità volumetrica. Questi dati sono da porre in rapporto alla porosità del dispositivo medico e, quindi, al ruolo da questo svolto nei confronti della invasività cellulare durante il processo di guarigione.

Tabella 1 - A: Percentuale della perdita di peso a seguito dell'essiccamento - B: Percentuale di azoto per materia secca - C: Percentuale di idrossiprolina per materia secca - D: Percentuale di collagene per materia secca

SAMPLES	A	B	C	D
Condress	13,26%	12,13	13,60	101,49
Puracol	4,00%	15,85	12,04	89,82
Promogran	8,18%	10,44	7,70	57,44
Colactive	9,71%	15,11	11,14	83,10

Tabella 2 - A: Quantità di collagene (mg) presente in ogni dispositivo medico - B: Superficie disponibile per il contatto (cm²) in ogni dispositivo medico - C: Volume totale (cm³) per ciascun dispositivo medico di collagene - D: Quantità di collagene (mg) per unità di volume (cm³) per ogni dispositivo medico

SAMPLES	A	B	C	D
Condress	217,00	25,00	12,50	17,36
Puracol	54,32	25,00	2,50	21,73
Promogran	76,18	28,27	7,07	10,78
Colactive	165,00	26,50	5,30	31,13

Di ogni campione di collagene sono state esaminate sia l'estensione dell'area interstiziale che le proprietà della matrice collagenica per mezzo della microscopia ottica ed elettronica. Da un'analisi quantitativa dell'area interstiziale risulta che questa abbia la massima estensione nel dispositivo medico Promogran e minima in Puracol, mentre Colactive e Condress hanno valori intermedi (Fig. 1). Al microscopio elettronico, il campione Colactive appare caratterizzato da un fitto intreccio di sottili lamine dello spessore medio di 2 μ m (Fig. 2A,B) prive di qualsiasi periodicità (Fig. 2C). Nelle stesse condizioni il campione Condress appare invece caratterizzato da lamine variamente intrecciate e comprensive di numerose fasci collagenici densamente impacchettati con una tipica periodicità strutturale (Fig. 2D-F). Rispetto agli altri campioni, Promogran presenta una densità di collagene molto inferiore, mentre i fasci che delimitano le aree interstiziali raggiungono spessori molto elevati dell'ordine di 10 μ m (Fig. 2G,H). La caratteristica periodicità delle fibre collagene è comunque facilmente evidenziabile in questi fasci (Fig. 2I). Infine il campione Puracol presenta una densità di lamine eccezionalmente elevata con la conseguente riduzione delle aree interstiziali e dello spessore dei fasci di

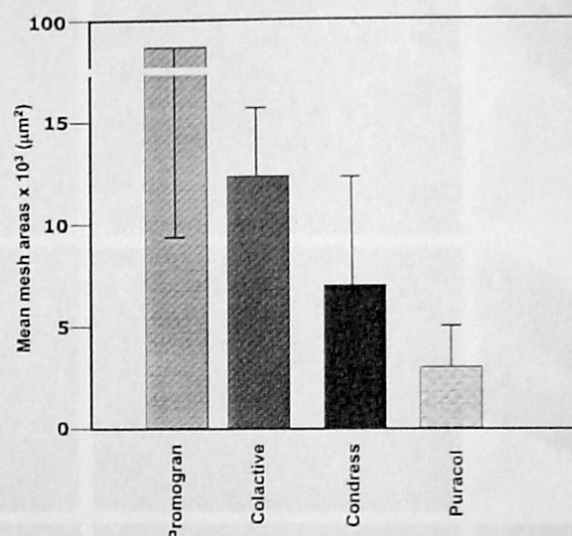


Fig. 1. Istogramma per la misura dell'estensione dell'area interstiziale compresa tra i filamenti di collagene per ciascuno dei quattro dispositivi medici analizzati in questo studio. Sezioni epossidiche dei campioni erano analizzate al microscopio ottico e le aree circoscritte misurate tramite un analizzatore di immagini dotato di un programma image J (NIH).

collagene (Fig. 2L,M). In quest'ultimi sono presenti fibre collageniche dalla caratteristica periodicità strutturale (Fig. 2N).

Per verificare l'entità delle modificazioni che i campioni di collagene subiscono nel corso del processo di cicatrizzazione sono stati esposti a trattamenti con collagenasi o lasciati interagire in cultura con cellule fibroblastiche e linfociti. A seguito del trattamento con collagenasi per 5 ore a 37 °C i campioni Colactive si collassano in grossi aggregati di materiale filamentoso, privi di qualsiasi periodicità. Questa struttura rimane essenzialmente invariata anche in presenza di fibroblasti 3T3, mentre risulta frammentata in un materiale particolato più fine in presenza di linfociti (Fig. 3A-C). Quando i campioni di Condress vengono esaminati nelle stesse

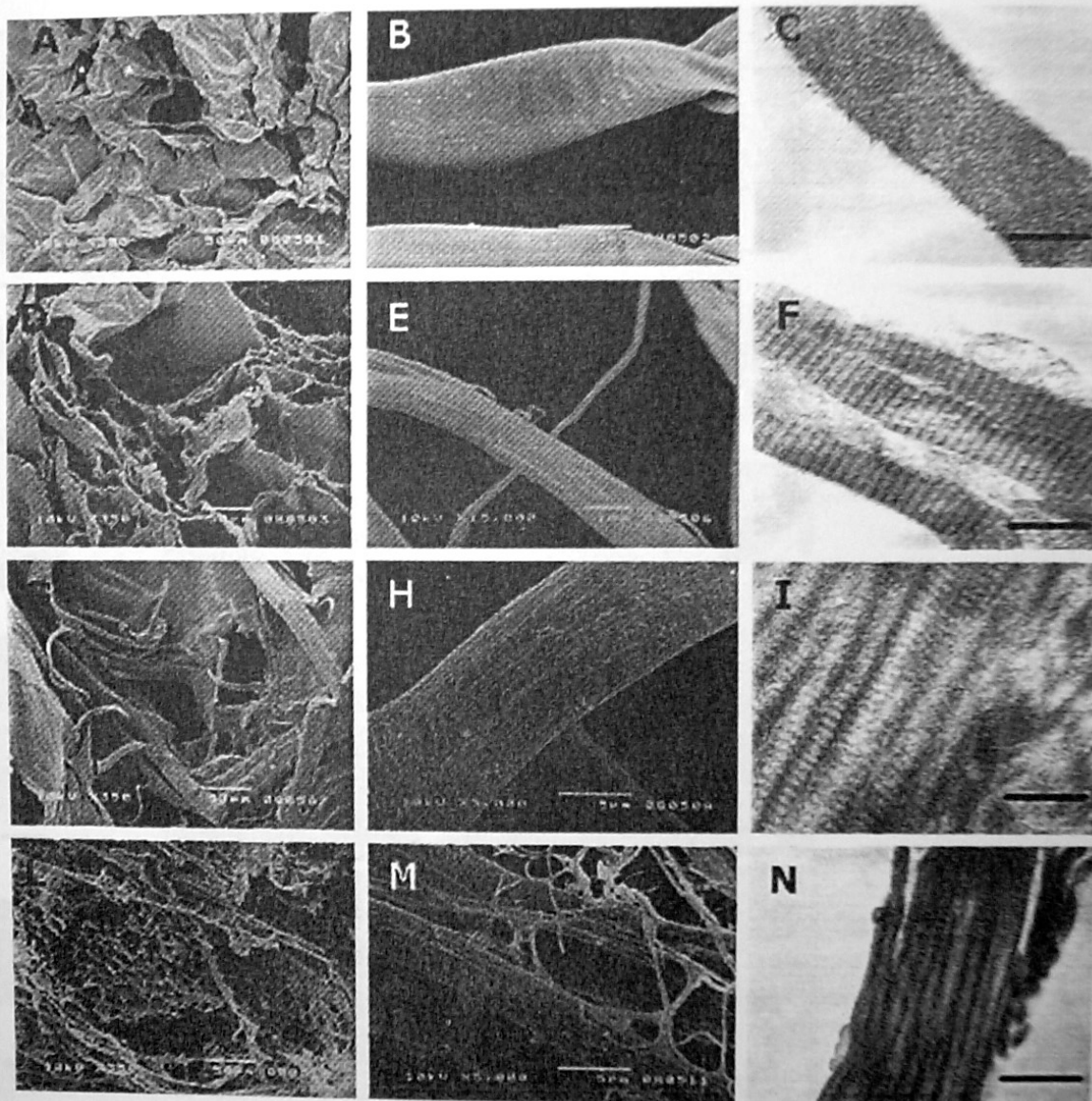


Fig. 2 A-C – Micrografie al microscopio elettronico a scansione (SEM) di collagene Colactive (A,B). Le barre indicano 50 μm e 5 μm , rispettivamente. Micrografia al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) di collagene Colactive (C). La barra indica 200 nm.

Fig. 2 D-F – Micrografie al microscopio elettronico a scansione (SEM) di collagene Condress (D,E). Le barre indicano 50 μm e 5 μm , rispettivamente. Micrografia al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) di collagene Condress (F). La barra indica 200 nm.

Fig. 2 G-I – Micrografie al microscopio elettronico a scansione (SEM) di collagene Promogran (G,H). Le barre indicano 50 μm e 5 μm , rispettivamente. Micrografia al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) di collagene di Promogran (I). La barra indica 200 nm.

Fig. 2 L-N – Micrografie al microscopio elettronico a scansione (SEM) di collagene Puracol (L,M). Le barre indicano 50 μm e 5 μm , rispettivamente. Micrografia al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) di collagene Puracol (N). La barra indica 500 nm.

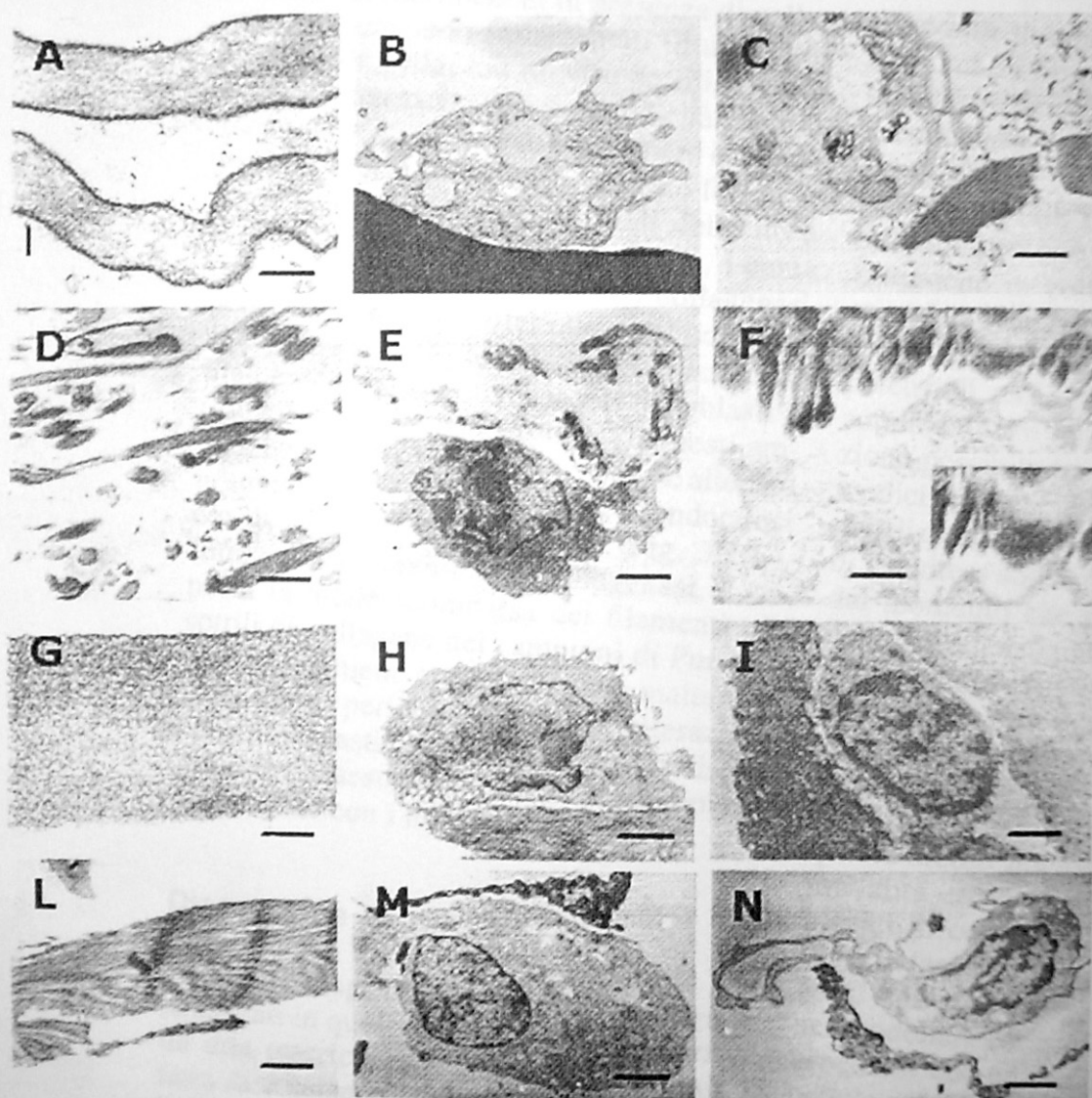


Fig. 3 A-L – Micrografie al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) di campioni di collagene trattati con collagenasi per 5 ore a 37 °C: Colactive (A), Condress (D), Promogran (G) e Puracol (L). Le barre indicano 100 nm.

Fig. 3 B-M – Micrografie al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) di campioni di collagene posti in co-coltura con fibroblasti 3T3 in mezzo (DMEMF 10) per 24, 48 e 72 ore: Colactive (B), Condress (E), Promogran (H) e Puracol (M). Le barre indicano 1 μ m.

Fig. 3 C-N - Micrografie al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) di campioni di collagene posti in co-coltura con linfociti in mezzo (DMEMF 10) per 24, 48 e 72 ore: Colactive (C), Condress (F), Promogran (I) e Puracol (N). Le barre indicano 1 μ m (C,I,N) e 0.5 μ m (F).

condizioni sperimentali in presenza di collagenasi, appaiono frammentati in una serie di fibre di collagene brevi e sottili, ancora dotate di una caratteristica periodicità. La loro interazione con fibroblasti e linfociti è tale da indurre ulteriori degradazioni sotto forma di sfilacciamenti e frammentazioni delle fibre periodiche di collagene (Fig. 3D-F). I campioni di Promogran esposti alla collagenasi perdono la loro caratteristica periodicità e si collassano sotto forma di grossi ammassi filamentosi. L'interazione con fibroblasti e linfociti non altera la struttura di questi ammassi per cui, pur aderendovi, non ne alterano la superficie, né mostrano segni di endocitosi e/o di formazioni microvillari (Fig. 3H-L). Infine il trattamento con collagenasi, comporta la totale scomparsa dei filamenti più sottili di collagene nei campioni di Puracol, mentre mantiene apparentemente inalterati i grossi fasci periodici. Tuttavia l'interazione con i fibroblasti porta alla progressiva disgregazione di questi fasci e ad una più complessa interazione con i linfociti (Fig. 3L-N).

Discussione

Tutti i dispositivi medici di collagene analizzati in questo studio sono caratterizzati da una matrice interstiziale delimitata da fasci di collagene. Per valutare l'efficienza e l'efficacia con cui essi interagiscono con la superficie della ferita, l'estensione della loro area interstiziale e dello spessore dei fasci di collagene che la delimitano è stata determinata. Entrambi questi parametri possono infatti influire sulla migrazione delle cellule deputate alla cicatrizzazione e sulla stessa persistenza

temporale del dispositivo sulla ferita. È noto infatti che i fibroblasti svolgono un ruolo essenziale nella riparazione delle ferite cutanee, producendo vari componenti della matrice extracellulare (4) oltre che secernere la stessa collagenasi (13; 10). Inoltre, sia leucociti che linfociti possono incorporare per endocitosi frammenti di collagene (5), e così facendo, stimolare reazioni immuni per la distruzione del tessuto connettivo (12). In vista di questi potenziali ruoli è importante determinare le condizioni che favoriscono la miglior interazione possibile tra il collagene dei dispositivi medici e le superfici esposte delle ferite (6). I dati di questo studio dimostrano che i campioni di Condress soddisfano in pieno questi criteri dal momento che presentano un'estensione dell'area interstiziale adeguata per l'accesso delle cellule – sia fibroblasti che linfociti – e fasci di collagene di dimensioni sufficienti per garantirne la biodegradabilità ad opera della collagenasi.

In conclusione, le evidenze fornite in questo studio documentano chiaramente le modalità attraverso cui diversi dispositivi medici di collagene interagiscono con una ferita in fase di cicatrizzazione. Dal momento che il collagene svolge un ruolo fondamentale nel modellare i tessuti cicatriziali (9), c'è da aspettarsi che enzimi quali la collagenasi e cellule quali i fibroblasti possano modificare la struttura molecolare di collagene esogeno apposto sulla ferita. Contrariamente agli altri dispositivi medici saggiati in questo studio, Condress appare come l'unico tipo di collagene in grado di frammentarsi gradualmente, pur mantenendo la caratteristica periodicità fino al completamento della sua totale sfaldatura.

Bibliografia

1. ALBERTS B, BRAY D, LEWIS J, et al.: *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing Inc. New York and London. 1983
2. BORNSTEIN P, TRAUB W: In *The Proteins*, (Neurath H Ed), Academic Press, London, 1979; 4:411-605
3. BUEHLER MJ: *Nature designs tough collagen: Explaining the nanostructure of collagen fibrils*. Proc Natl Acad Sci USA, 2006; 103:12285-90
4. EICKELBERG O, KOHLER E, REICHENBERGER F, et al.: *Extracellular matrix deposition by primary human lung fibroblasts in response to TGF- β 1 and TGF- β 3*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 1999; 276:814-24
5. GAY S, BALLEISEN L, REMBERGER K, et al.: *Immunohistochemical evidence for the presence of collagen type III in human arterial walls, arterial thrombi, and in leukocytes, incubated with collagen in vitro*. J Molecular Med 1975; 53:899-902
6. HASTON WS, SHIELDS JM, WILKINSON PC: *Lymphocyte Locomotion and Attachment on Two-Dimensional Surfaces and in Three-Dimensional Matrices*. J Cell Biol 1982; 92:747-52
7. KARNOVSKY MJ: *A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy*. J Cell Biol 1965; 27:137A
8. LYNN AK, YANNAS IV, BONFIELD W: *Antigenicity and immunogenicity of collagen*. J Biomaterials Res 2004; 71B:2343-354
9. MADDEN JW, PEACOCK EE Jr: *Studies on the biology of collagen during wound healing. 3. Dynamic metabolism of scar collagen and remodelling of dermal wounds*. Ann Surg 1971; 174:511-20
10. PARDO A, SELMAN M, RAMIREZ R, et al.: *Production of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases by fibroblasts derived from normal and fibrotic human lungs*. Chest 1992; 102:1085-9
11. PROCKOP DJ, UDENFRIEND S: *A specific method for the analysis of hydroxyproline in tissues and urine*. Anal Biochem 1960; 1:228-39
12. VAES G: *Cell-to-cell interactions in the secretion of enzymes of connective tissue breakdown, collagenase and proteoglycan-degrading neutral proteases*. A review. Inflammation Research 1980; 10:474-85
13. VALLE KJ, BAUER EA: *Biosynthesis of Collagenase by Human Skin Fibroblasts in Monolayer Culture*. J Biol Chem 1979; 254:10115-22