



Meccanobiologia della riparazione tissutale: dalla fisiopatologia alle implicazioni terapeutiche

Carmelo Sgarlata, Sonia Torti, Giovanni Borroni, Olga Ciocca

*Clinica Dermatologica, Università degli Studi di Pavia,
Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italia*

Meccanobiologia della riparazione tissutale: dalla fisiopatologia alle implicazioni terapeutiche

Molte delle funzioni cellulari sono controllate o mediate da forze meccaniche. Le cellule sono in grado di rispondere a variazioni delle proprietà meccaniche della matrice trasducendo tali informazioni in risposte molecolari mirate: i segnali meccanici sono in grado di determinare lo sviluppo di una cellula staminale, o di modulare il funzionamento di un intero tessuto, e giocano un ruolo centrale in numerose patologie. Inoltre, sulla base delle proprietà meccaniche dell'ambiente circostante le cellule sono in grado di modificare la loro motilità e la loro attività metabolica, agendo non come passivi recettori degli stimoli meccanici, ma anche manipolando attivamente la matrice nella quale si trovano sia producendone le principali componenti, che modificandone attivamente la tensione meccanica. Di conseguenza, la meccanotrasduzione svolge un ruolo fondamentale nella riparazione e nel rimodellamento tissutale, suggerendo importanti implicazioni terapeutiche, e permettendo di valutare sotto una nuova luce vecchie terapie empiriche spesso sottovalutate.

Tissue repair mechanobiology: from pathophysiology to therapeutic implications

Many cellular reactions are controlled or mediated by mechanical forces. Cells probe the mechanical properties of their environment and subsequently transduce this information accurately into a specific molecular response: mechanical cues can determine the fate of stem cells, modulate the function of entire tissues and play a key role in various pathologies. Cells also alter their motility and metabolic functions depending on the mechanics of their surroundings. Strikingly, cells are not passive observers of the mechanical properties – many cells actively manipulate their surroundings either by the generation of new extracellular or pericellular materials or, even by exerting forces on the outside world. Thus, mechanotransduction plays a central role in tissue repair and remodeling with important implication for treatment, and allows re-evaluating of old and sometimes underestimated treatments.

Introduzione

Il processo di riparazione tissutale è di estrema importanza per garantire l'integrità fisica e la sopravvivenza di ogni organismo vivente complesso. Sono note a tutti le straordinarie capacità rigenerative di talune specie animali; ad esempio, alcuni anfibi urodela come i tritoni, sono in grado di rigenerare in un tempo relativamente breve le loro code, gli arti, il cristallino, la retina, le mascelle e perfino parte del cuore [9]. Questa capacità di rigenerazione di interi tessuti e organi è stata persa nei mammiferi [10] e gli esseri umani, ad eccezione che nelle primissime fasi della loro esistenza biologica, possiedono delle capacità di ripristino dell'integrità dei propri tessuti decisamente meno eclatante. Infatti, nella nostra specie il ripristino dell'integrità di un tessuto avviene soprattutto grazie ad una risposta di tipo fibroproliferativo: il processo di guarigione tissutale [5, 11]. Tale processo si occupa di riparare piuttosto che rigenerare un certo tessuto [11] ed è costituito da una serie di fenomeni tra loro strettamente integrati interessanti sia le cellule che la matrice extracellulare, con una cascata di eventi soggetti ad una fine e complessa volta a ripristinare l'integrità anatomica e funzionale del tessuto o dell'organo leso. Numerosi fattori, sia endogeni (le caratteristiche biologiche dell'organismo leso come ad esempio l'età, lo stato nutrizionale, o la presenza di eventuali patologie) che esogeni (agenti esterni di natura biologica, chimica o fisica), possono influenzare in modo determinante la dinamica e talora l'esito finale dei processi riparativi [11].

Uno degli aspetti forse meno noti ma indubbiamente più interessanti del processo di riparazione tissutale a livello cutaneo è la risposta dei tessuti cutanei all'applicazione di forze meccaniche, e la loro influenza sul processo di riparazione. La maggior parte degli studi riguardanti il processo di guarigione delle ferite si è finora concentrata sull'effetto di stimoli di natura biologica e chimica. Negli ultimi anni, tuttavia, sono stati raccolti dati molto importanti sul ruolo svolto anche da stimoli fisici ed in particolare meccanici nell'influenzare processi cellulari fondamentali per lo sviluppo dei tessuti e per la riparazione tissutale: con lo studio di tali meccanismi è possibile chiarire le cause biologiche di alcuni effetti noti di terapie empiriche, come ad esempio la terapia compressiva per i cheloidi e la terapia a pressione negativa per le ulcere, ed eventualmente aprire nuove strade per la comprensione e il trattamento delle alterazioni dei processi riparativi.

Il ruolo della matrice extracellulare e l'equilibrio meccanico della cute

La cute è costituita da uno strato superficiale di cellule, l'epidermide, spesso tra 0.06 e 1.00 millimetri, connesso ad uno strato sottostante, il derma, che contiene cellule e matrice extracellulare (ECM) ed ha uno spessore compreso tra 1 e 4 mm [8]. La matrice extracellulare si è sviluppata parallelamente all'evoluzione degli organismi pluricellulari e rappresenta il substrato per l'adesione, la crescita e la differenziazione cellulare fornendo il necessario supporto meccanico a tessuti ed organi. Essa svolge un ruolo primario nello sviluppo, nella differenziazione e nel mantenimento dell'omeostasi delle cellule e dei tessuti nonché una funzione fondamentale nella trasmissione delle forze meccaniche. Le cellule aderiscono all'ECM mediante recettori di superficie specializzati, i più importanti dei quali sono le integrine, una classe di proteine transmembrana eterodimeriche ($\alpha\beta$) che a seconda della specificità delle loro subunità sono in grado di legare diversi tipi di ligandi presenti nell'ECM [8, 12, 19]. Le integrine connettono fisicamente l'ECM al citoscheletro consentendo la trasmissione di forze meccaniche dalle cellule alla matrice e viceversa, con un ruolo centrale nella meccanotrasduzione e nel mantenimento dell'equilibrio meccanico della cute [1]. Quest'ultimo è essenzialmente determinato da due diversi tipi di forze: forze esterne applicate alla superficie cutanea e forze interne alla cute stessa. Le forze esterne applicate alla superficie cutanea sono trasmesse attraverso l'epidermide al derma e ai tessuti sottocutanei sottostanti, mentre le forze interne sono trasmesse dal derma all'epidermide [1]. La trasmissione dall'epidermide al derma di forze esterne applicate alla superficie cutanea può avvenire

mediante diversi meccanismi tra i quali interazioni intercheratinocitarie nell'epidermide, interazioni tra i cheratinociti e la matrice extracellulare a livello delle membrane basali e della giunzione dermo-epidermica, interazioni tra macromolecole del derma e interazioni tra fibroblasti sempre nel dermico [1]. Le forze interne sono dovute in parte alla tensione passiva esercitata dalle fibrille di collagene del derma (che viene acquisita dalle fibrille di collagene durante la loro formazione) [2] ed in parte ad una tensione attiva prodotta dalla contrazione del citoscheletro dei fibroblasti: entrambe le tensioni sono dirette approssimativamente attraverso le ben note linee di tensione cutanea di Langer [2] ed insieme sono fondamentali per il mantenimento dell'equilibrio meccanico dei tessuti cutanei.

La risposta cellulare agli stimoli meccanici

È stato dimostrato che le cellule presenti nel tessuto connettivo sono in grado di modificare l'ECM circostante in risposta a sollecitazioni meccaniche [12, 19]. Ciò è reso possibile dalla presenza di meccanismi di controllo mediante i quali le cellule sono in grado di percepire gli stress meccanici trasmessi dal substrato in cui sono immerse (l'ECM) mettendo in atto delle risposte consistenti in variazioni nell'espressione genica con modificazioni quantitative e qualitative nella produzione di proteine che conducono ad un rimodellamento della matrice extracellulare stessa il cui scopo è l'adattamento alla stimolazione meccanica applicata [1, 12]. La composizione dell'ECM non è pertanto regolata solamente da meccanismi cellulari endogeni e da fattori di crescita ma è anche fortemente influenzata in modo diretto da stimolazioni di tipo meccanico [1, 12]. L'applicazione di forze meccaniche alla superficie cutanea, influenzando l'espressione di specifici geni, è infatti in grado di modificare alcuni dei fattori più importanti del processo di riparazione tissutale come il metabolismo cellulare, la produzione di componenti fibrose, fibrillari e non fibrillari della matrice extracellulare e di proteasi, ed anche l'espressione sulle membrane di recettori integrinici o di altro tipo, come ad esempio canali calcio-dipendenti simili a quelli presenti nelle cellule muscolari [1]. È stato inoltre dimostrato che variazioni della tensione applicata alla superficie cutanea sono in grado di modificare direttamente lo stato di attivazione dei fibroblasti [12-14]. In particolare, l'aumento di tensione determina il passaggio dei fibroblasti ad un fenotipo attivato stimolando la proliferazione cellulare, la sintesi di matrice e la produzione di citochine profibrogeniche e riducendo la produzione di enzimi proteolitici come le metalloproteasi (MMPs) [12]. Al contrario, se la tensione viene ridotta (ad esempio applicando una compressione alla cute) si osserva un passaggio dei fibroblasti ad un fenotipo infiammatorio, con inibizione della proliferazione cellulare, aumento della degradazione della matrice e rilascio di mediatori infiammatori [12], con ovvie ripercussioni sul processo riparazione tissutale. Ciò è reso possibile dalla capacità dei fibroblasti di percepire stress meccanici grazie alle loro connessioni con l'ECM, in gran parte attraverso le integrine le quali, consentendo la trasduzione di segnali meccanici in segnali biochimici, agiscono direttamente da sensori di tensione [1, 12]. Inoltre, anche alcuni recettori di tipo non integrinico, come alcuni canali ionici, sembrano essere implicati nel processo di meccanotrasduzione [1]. Esistono diverse vie di trasduzione del segnale che svolgono un ruolo significativo nella risposta cellulare all'applicazione di forze meccaniche, e gran parte di esse determina l'attivazione della via delle MAP-chinasi o del fattore nucleare kB, con risultanti modificazioni dell'espressione genica del fibroblasto, influenzandone sia l'attività proliferativa che quella biosintetica [1, 12, 19]. Oltre all'importante azione regolatoria sul metabolismo dei fibroblasti, sono state individuate altre risposte cellulari elicitate dall'applicazione di forze meccaniche alla cute. Anche i cheratinociti sono fortemente influenzati da stimolazioni meccaniche: la produzione di proteasi cheratinocitarie, un importante meccanismo di regolazione dell'omeostasi tissutale, è infatti fortemente influenzata dalla tensione meccanica. La cute integra è sottoposta ad una tensione costante trasmessa dal derma sottostante [1]: se tale tensione viene meno (come accade ad esempio in seguito ad una ferita) si osserva un aumento dell'attività proteasica [2]. In particolare, una proteasi, l'attivatore del plasminogeno di tipo urochinasi (uPA), è particolar-

mente importante nella reazione cheratinocitaria durante la guarigione delle ferite [3-4], attivando la migrazione dei cheratinociti verso la superficie lesa da riepitelializzare [5]. È stato dimostrato che in seguito ad una ferita (che determina perdita di tensione meccanica) si osserva nell'area lesa un aumento della produzione di uPA, che si riduce quando in seguito al processo di guarigione la tensione meccanica viene ad essere ripristinata [6-7]. Alcuni Autori hanno valutato in vitro la relazione tra l'applicazione di tensione meccanica sulla superficie cutanea e la produzione di uPA, coltivando due popolazioni cheratinocitarie: una costituita da cheratinociti umani normali, l'altra da cheratinociti umani trasformati utilizzando il Papillomavirus umano (HPV 16), un virus in grado di indurre lesioni cutanee epidermiche di tipo produttivo e ipertrofico. Entrambe le popolazioni cheratinocitarie sono state sottoposte all'applicazione di tensioni meccaniche che hanno condotto ad una riduzione della produzione dell'uPA da parte dei cheratinociti normali proporzionale all'entità della tensione applicata riscontrando quindi una risposta concordante con quanto osservato in vivo durante il processo di guarigione di una ferita. Nei cheratinociti trasformati non è stata osservata invece alcuna relazione tra la produzione di uPA e l'applicazione di tensione meccanica [6-7].

Conclusioni

Le forze meccaniche giocano un ruolo centrale nel determinare la struttura ed il rimodellamento della cute, influenzando sia le interazioni intercellulari che le interazioni cellula-ECM. Alla luce nuove conoscenze relative agli effetti della biomeccanica sulla riparazione tissutale e i processi di rimodellamento, è possibile rivalutare l'efficacia di alcune terapie empiriche di uso comune in dermatologia, comprendendone più a fondo gli effetti e il potenziale. Ad esempio, l'uso di medicazioni compressive nella terapia delle cicatrici ipertrofiche e dei cheloidi crea una riduzione nella tensione del tessuto, quindi è probabilmente in grado di attivare il rimodellamento del tessuto cicatriziale sottostante influenzando il fenotipo dei fibroblasti dermici [15]. Al contrario, l'applicazione di una tensione meccanica, come accade nella terapia a pressione negativa delle ulcere cutanee, attiva il fenotipo produttivo dei fibroblasti, stimolandone la proliferazione e la biosintesi di componenti strutturali della matrice, e accelerando così la guarigione [16]. Qualcosa di analogo avviene anche con l'uso degli espansori cutanei impiantati nel derma mesi prima di un intervento di chirurgia plastica e ricostruttiva: essi determinano gradualmente un aumento di tensione meccanica, permettendo di ottenere un aumento della superficie cutanea che potrà essere poi utilizzata per l'intervento [17-18]. Ulteriori studi volti a chiarire ulteriormente i meccanismi fondamentali che regolano la meccanobiologia delle cellule implicate nella riparazione tissutale saranno sicuramente importanti non solo ai fini speculativi, ma anche per migliorare i presidi e i dispositivi esistenti o svilupparne di nuovi in grado di promuovere o inibire selettivamente attività cellulari e della matrice, accelerando la riparazione tissutale o permettendo la cura di lesioni cutanee anche di altra natura.

Bibliografia

1. Silver FH, Siperko LM, Seehra GP. Mechanobiology of force transduction in dermal tissue. *Skin Res Technol* 2003;9:3-23.
2. Ahokas K, Skoog T, Suomela S et al. Matrilysin-2 (matrix metalloproteinase-26) is upregulated in keratinocytes during wound repair and early skin carcinogenesis. *J Invest Dermatol* 2005;124:849-856.
3. Jensen PJ, Lavker RM. Urokinase is a positive regulator of epidermal proliferation in vivo. *J Invest Dermatol* 1999;112:240-244.
4. Wang XQ, Sun P, Paller AS. Gangliosides inhibit urokinase-type plasminogen activator (uPA)-dependent squamous carcinoma cell migration by preventing uPA receptor / α 5 β 1 integrin / epidermal growth factor receptor interactions. *J Invest Dermatol* 2005;124:839-848.

5. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999;341:738-746.
6. Huang EY, Wu H, Island ER et al. Differential expression of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in early and late gestational mouse skin and skin wounds. *Wound Repair Regen* 2002;10:387-396.
7. Watanabe M, Yano W, Kondo S et al. Up-regulation of urokinase-type plasminogen activator in corneal epithelial cells induced by wounding. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:3332-3338.
8. Morphology of connective tissue: structure of skin and tendon. *Connective tissue and its heritable disorders. John Wiley & Sons Inc, Hoboken, NJ, USA* 1993.
9. Brockes JP, Kumar A. Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:566.
10. Tanaka EM. Regeneration: if they can do it, why we can't? *Cell* 2003;113:559.
11. Clark RAF. Wound repair. In: *The Molecular and Cellular Biology Of Wound Repair. Plenum Press, New York, NY* 1996.
12. Chiquet M, Renedo AS, Huber F et al. How do fibroblasts translate mechanical signals into changes in extracellular matrix production? *Matrix Biology* 2003;22:73-80.
13. Eckes B, Zweers MC, Zhang ZG et al. Mechanical Tension and Integrin α 2 β 1 Regulate Fibroblast Functions. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 2006;11:16-24.
14. Kessler D, Dethlefsen S, Haase I et al. Fibroblasts in Mechanically Stressed Collagen Lattices Assume a "Synthetic" Phenotype. *The Journal of Biological Chemistry* 2001;276(39):36575-36585.
15. Kibschler CW, Shetlar MR, Shetlar CL. Alteration of hypertrophic scars induced by mechanical pressure. *Arch Dermatol* 1975;111:60-64.
16. Mous CM, Heule F. A review of topical negative pressure therapy in wound healing: sufficient evidence? *The American Journal of Surgery* 2011;201:544-556.
17. Lorber M, Milosky SA. A straining of the skin in vivo. A method influencing cell division and migration in the rat epidermis. *J Invest Dermatol* 1968;51:395-402.
18. Francis AJ, Marks R. Factors responsible for dermally induced epidermal hyperplasia. *Arch Dermatol Res* 1977;258:275-280.
19. Chiquet M. Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress. *Matrix Biology* 1999;18:417-426.