

Relazione scientifica sui risultati dell'attività di ricerca svolta
Fuitore: Dr.ssa Oriella Gennari
Proponente: Dr.ssa Simonetta Grilli

Innovative Pyro-Electrified Platform for Cardiomyocytes Differentiation

La Dr.ssa Oriella Gennari svolge Attività di Ricerca presso l'Istituto di Scienze Applicate e Sistemi Intelligenti del CNR (CNR-ISASI) e durante la sua attività di Ricerca in ISASI-CNR ha acquisito una notevole esperienza scientifica in alcuni campi specialistici quali la *pyroelectrification of polymer membranes for biological application*. Attualmente questi materiali polimerici elettrizzati attirano grande interesse per la possibilità di disporre di piattaforme flessibili e free-standing utili nel pattern cellulare e nello studio della modulazione di processi funzionali cellulari. Il controllo dell'attività cellulare utilizzando piattaforme funzionalizzate fisicamente è di attuale importanza e presenta notevoli vantaggi (stabilità e costi) se confrontati con funzionalizzazioni chimiche. Numerosi lavori suggeriscono che il differenziamento di cellule staminali può essere indotto sfruttando proprietà fisiche del substrato come la topografia o la ruvidità della superficie mentre pochi riportano la possibilità di poter modulare tali funzioni tramite cariche di superficie. L'impatto delle cariche elettriche sulla funzionalità cellulare oltre che sull'espressione genica in molti tipi di cellule suggerisce che è un parametro potenzialmente utilizzabile per il controllo del destino cellulare. Presso i laboratori dell'ISASI-CNR di Pozzuoli si ha la possibilità di realizzare queste strutture polimeriche che sono state testate presso i laboratori del MERLN Institute for Technology-Inspired Regenerative Medicine, Faculty of Health, Medicine and Life Sciences Maastricht University, sotto la supervisione del Prof. Lorenzo Moroni. Il progetto si è proposto di studiare per la prima volta le potenzialità e l'efficacia di substrati piro-elettrizzati nel promuovere il differenziamento della linea staminale in cellule cardiache. Con questo scopo, sono stati testati differenti pattern (lineari ed esagonali) elettrizzati su diverse membrane polimeriche. In particolare, sono stati testati come polimeri il Polimetilmetacrilato (PMMA) ed il Polistirene (PS). Su ciascuna membrana sono state seminate 1.25×10^5 H9c2 (P12) ed ogni esperimento è stato condotto su tre replicati e le cellule sono state osservate su un periodo di nove giorni (tempo necessario per promuovere i processi di differenziamento). Da sottolineare che nessuna condizione di coltura è stata variata (normalmente per promuovere la fusione la concentrazione di siero nel mezzo di coltura deve essere ridotta dal 10% al 1%). Un altro parametro misurato è stata l'attività metabolica cellulare (PrestoBlue Analysis).

Al nono giorno ciò che è stato riscontrato è questo:

- I campioni di PMMA sembrano promuovere il differenziamento cellulare delle H9c2. La fusione della linea cellulare a formare miotubi multinucleati avviene senza riduzione della concentrazione di siero;
- Non sono state osservate differenze tra il PMMA non elettrizzato e quello esagonale (probabilmente il vuoto usato durante il processo di sterilizzazione ha ridotto la densità di carica superficiale)
- La morfologia delle cellule sui campioni di PS (sia lineari che esagonali) appare condizionata dal pattern di carica;
- L'attività metabolica (misurata attraverso l'analisi PrestoBlue) è stata più elevata per cellule cresciute su campioni di PMMA non elettrizzato, seguono quelle cresciute su campioni di PMMA esagonali, campioni di PS lineare e PS esagonale. I livelli più bassi sono stati misurati per le cellule su campioni di PS non elettrizzato.
- Il PMMA, come polimero, appare promuovere l'adesione delle H9c2 in misura maggiore rispetto al PS.
- Differenze morfologiche sono ben visibili per le cellule su campioni di PMMA comparate con quelle cresciute su campioni di PS.

Altri parametri sono in corso di valutazione per valutare il processo di differenziamento su tali supporti elettrizzati:

- Quantificazione del contenuto di DNA (da poter correlare con i risultati di attività metabolica);
- Saggi di immunofluorescenza (nuclei/filamenti di actina/Troponina T) in grado di evidenziare i caratteri morfologici del differenziamento cardiaco;
- Analisi SEM;
- Saggio di vitalità cellulare per osservare la quantità di cellule vive/morte sui diversi substrati;
- Test di membrane di PMMA con pattern lineare tenendo conto che per il PMMA è stato testato solo il pattern esagonale e che il pattern lineare (testato solo per PS) sembra influenzare l'organizzazione cellulare,
- Test di membrane di PMMA ad alto peso molecolare in modo da aumentare la carica di polarizzazione.