**PROGETTO DI RICERCA**

**Realizzazione e validazione di un dispositivo per lo studio dei meccanismi patogenetici delle malattie croniche dell’apparato locomotore associate all’invecchiamento e per l’esecuzione di saggi farmacologici**

**Tutor: Prof. Nicola Baldini (DIBINEM, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna)**

*Premessa:* L’attività di ricerca sarà svolta presso l’Istituto Ortopedico Rizzoli IRCCS (IOR, Bologna) nell’ambito del progetto PE8 – AGE-IT “A novel public-private alliance to generate socioeconomic, biomedical and technological solutions for an inclusive Italian ageing society”

**Descrizione breve attività di ricerca**

Scopo del progetto è la realizzazione di un dispositivo basato su tecniche di coltura cellulare tridimensionale e di microfluidica, idoneo per analisi mediante microscopia time-lapse e microscopia confocale multispettrale, opportunamente modulabile per lo studio dei processi fisiopatologici di malattie di interesse ortopedico ad elevata incidenza e impatto socioeconomico, l’osteoporosi e l’artrosi. Il dispositivo potrà servire inoltre in sostituzione degli obsoleti e inaffidabili sistemi di coltura bidimensionale, incapaci di riprodurre in modo adeguato i contesti clinici, e dei modelli sperimentali animali, in base ai principi etici delle 3 R (Replace, Reduce, Refine), per l’esecuzione di saggi preclinici di efficacia di farmaci per la cura medica delle condizioni sopra citate.

*The aim of the project is the development of a device, based on three-dimensional cell culture technologies and microfluidics, suitable for analyses by time lapse microscopy and multispectral confocal microscopy, that can be used for the study of the pathophysiology of orthopaedic conditions with a high incidence and a significant social and economical impact. i.e ostoprosis and osteoarthritis. The device is suitable to replace the outdated and unreliable bidimensional culture systems as well as of the in vivo models of disease, according to the 3R principles (Replace, Reduce, Refine), to carry out preclinical assays for the screening of drugs to be considered for the treatment of the aforementioned conditions.*

**Introduzione**

Secondo l’indagine ISTAT “Aspetti della vita quotidiana”, l’artrosi e l’osteoporosi nel 2015 hanno interessato rispettivamente il 15,6% e il 7,3% della popolazione, risultando tra le condizioni croniche più diffuse in Italia. La prevalenza di queste malattie aumenta con l’età ed è nettamente superiore nel sesso femminile. Dopo i 75 anni l’artrosi colpisce quasi il 70% delle donne e quasi il 50% degli uomini e l’osteoporosi quasi il 50% delle donne e circa il 12% degli uomini.

L’osteoporosi è definita come un disturbo scheletrico caratterizzato da una compromissione della resistenza dell’osso che predispone il soggetto ad un aumentato rischio di frattura. La conseguenza clinica più grave è infatti la frattura, che compare a seguito di traumi anche lievi. Le fratture osteoporotiche rappresentano una delle principali cause di disabilità nella popolazione anziana e uno dei maggiori costi sanitari. In assenza di un’incompleta conoscenza dei meccanismi fisiopatologici, il trattamento dell’artrosi e delle fratture da fragilità è basato sulla chirurgia, associato a terapie mediche e fisioterapiche per alleviare i sintomi e rallentare il decorso della malattia. I costi del trattamento chirurgico sono estremamente elevati e in rapida crescita, parallelamente all’invecchiamento della popolazione.

Scopo del progetto è un approfondimento della conoscenza dei meccanismi fisiopatologici alla base di queste due condizioni. Nonostante la grande quantità di dati raccolti finora, a causa della complessità ed eterogeneità del fenomeno, non disponiamo ancora di strumenti efficaci di prevenzione o trattamento non cruento. Il dispositivo previsto dallo studio ha l’obiettivo di riprodurre le complesse condizioni sistemiche e microambientali dei tessuti muscoloscheletrici che possono portare ai fenomeni regressivi, degenerativi e infiammatori alla base dei due processi patologici in oggetto. A tale scopo, attraverso un approccio modulare, saranno realizzati dispositivi capaci di riprodurre i fenomeni di sviluppo della malattia in condizioni sperimentali stringenti e facilmente riproducibili, senza la necessità di ricorrere a modelli animali, gravati da costi, problemi etici e affidabilità che ne scoraggiano l’utilizzo. Utilizzando questi dispositivi sarà inoltre possibile eseguire saggi farmacologici anche personalizzati per la validazione di terapie mediche che siano in grado di incidere in modo efficace sulla storia naturale di queste due malattie.

**PIANO DELLE ATTIVITA’**

###### Laboratorio dove saranno eseguite le prove

L'attività dell’assegnista di ricerca sarà svolta presso l’Istituto Ortopedico Rizzoli IRCCS (IOR Bologna), presso la SC di Scienze e Tecnologie Biomediche (Responsabile Nicola Baldini).

**Materiale e Metodo**

Le attività si svolgeranno su due obiettivi diversi:

1) la prima attività sarà dedicata alla validazione di un prototipo di dispositivo che permette di coltivare cellule della linea osteogenica in un microambiente tridimensionale che mima l’osso e che è già stato sviluppato dal laboratorio. Il dispositivo verrà validato per la sua potenzialità come piattaforma di saggio per farmaci anti-osteoporotici. A questo scopo, dopo che le cellule saranno inserite nel dispositivo e mantenute in condizioni di perfusione passiva, saranno saggiati diversi farmaci in via di sperimentazione e saranno effettuati saggi biologici e di biologia molecolare per valutare la vitalità/morte cellulare e il differenziamento cellulare dopo il trattamento. In particolare, verranno utilizzate tecniche di *imaging* avanzato (microscopia confocale a doppio fotone), per quantificare il segnale fluorescente delle cellule vive all’interno del dispositivo. Per i saggi di biologia molecolare, verrà estratto l’RNA e le proteine, con protocolli messi a punto su quantitativi cellulari molto bassi, a cui seguiranno saggi di Q-RT-PCR e western blot capillare per verificare l’inibizione o l’induzione del differenziamento osteogenico. La variazione di espressione di antigeni verrà valutata anche con saggi di immunofluorescenza delle cellule direttamente all’interno del dispositivo.

2) la seconda attività sarà dedicata allo sviluppo di un prototipo di dispositivo per permetta di ottenere una coltura cellulare tridimensionale di condroblasti che riproduca le condizioni di ipossia, acidità e gradiente di nutrienti della cartilagine delle articolazioni, e che permetta di analizzare circuiti paracrini tra le cellule della cartilagine e le cellule dei tessuti nelle strette vicinanze, come gli adipociti o le cellule della sinovia. In particolare, si verificherà, nel contesto dell’induzione di uno stato infiammatorio cronico, la capacità di una tipologia cellulare di condizionare il comportamento delle cellule dei tessuti adiacenti, portando alla formazione di stati alterati cronici. Il prototipo verrà sviluppato aumentando la complessità del modello tramite passaggi successivi, e utilizzando tecniche di coltura fluidica alla micro- e alla milli-scala, in *hydrogel*, tecniche di perfusione passiva e attiva, e l’uso di membrane porose che permettano la compartimentalizzazione tissutale. Il comportamento cellulare all’interno del dispositivo verrà valutato con i medesimi saggi descritti nell’attività al punto 1.

Verso la fase finale del progetto, sarà possibile implementare i due dispositivi utilizzando cellule isolate dai campioni biologici ottenuti dal paziente.

**Piano di formazione dell’assegnista**

Grazie all’affiancamento con personale già formato, il titolare dell’assegno acquisirà specifiche competenze riguardo:

1) allo sviluppo di colture 3D tramite tecniche di micro e millifluidica e tramite tecniche di coltura di organoidi;

2) formazione sull’utilizzo della microscopia a fluorescenza, time lapse e confocale;

3) saggio biologici di vitalità e differenziamento cellulare;

4) saggi molecolari (RT-PCR e western blot capillare) e immunofluorescenze;

5) stesura di richieste di approvazione a comitati etici per studi clinici osservazionali (uso di materiale biologico per indagini molecolari e per l’allestimento di colture in vitro)

6) conduzione di studi in vitro effettuati a partire da cellule del paziente: nozioni sulla raccolta, processazione, stoccaggio e gestione dei campioni biologici;

6) analisi statistica dei dati, con uso di tecniche uni- e multivariate.

*Partecipazione a seminari e corsi*

* Meeting interni di laboratorio e Journal Clubs;
* Eventuali seminari ed eventi scientifici nazionali ed internazionali sugli argomenti trattati dal progetto