



**UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA**



**DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE**

**CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA**

**“VALVOLE CARDIACHE INGEGNERIZZATE:  
MATERIALI UTILIZZATI E TECNICHE DI PRODUZIONE DEGLI  
SCAFFOLD”**

**Relatore: Prof. Andrea Bagno**

**Laureanda: Elisabetta Giacomelli**

**ANNO ACCADEMICO 2021 – 2022**

**Data di laurea 14/03/2022**



# Indice

<b>ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>CAPITOLO 1. INTRODUZIONE</b> .....	<b>7</b>
1.1 INTRODUZIONE ALL'INGEGNERIA TISSUTALE .....	8
1.1.1 <i>Lo scaffold e i biomateriali</i> .....	9
1.1.2 <i>Le cellule utilizzate nelle tecniche di TE</i> .....	9
1.1.3 <i>I segnali e i bioreattori</i> .....	10
1.2 TECNICHE DI PRODUZIONE DEI TESSUTI INGEGNERIZZATI.....	11
1.2.1 <i>In vitro seeding</i> .....	11
1.3 APPLICAZIONI DELL'INGEGNERIA TISSUTALE .....	13
<b>CAPITOLO 2. IL CUORE E LE VALVOLE CARDIACHE</b> .....	<b>15</b>
2.1 ANATOMIA CARDIACA.....	15
2.1.1 <i>Il pericardio e la struttura della parete cardiaca</i> .....	16
2.2 FISILOGIA CARDIACA .....	18
2.2.1 <i>I potenziali d'azione</i> .....	18
2.2.2 <i>Il sistema cardiaco di conduzione</i> .....	19
2.2.3 <i>Il ciclo cardiaco</i> .....	20
2.3 LE VALVOLE CARDIACHE .....	22
2.3.1 <i>Anatomia delle valvole cardiache</i> .....	23
2.3.2 <i>Patologie valvolari</i> .....	26
<b>CAPITOLO 3. VALVOLE CARDIACHE PROTESICHE</b> .....	<b>29</b>
3.1 TECNICHE DI INTERVENTO PER LA SOSTITUZIONE DI VALVOLE CARDIACHE.....	29
3.1.1 <i>Surgical Valve Replacement</i> .....	29
3.1.2 <i>Transcatheteral Valve Replacement</i> .....	30
3.2 LE VALVOLE CARDIACHE MECCANICHE.....	30
3.2.1 <i>Protesi meccanica a palla ingabbiata</i> .....	31
3.2.2 <i>Protesi meccanica mono-leaflet</i> .....	32
3.2.3 <i>Protesi meccanica bi-leaflet</i> .....	32
3.2.4 <i>Problemi delle valvole cardiache meccaniche</i> .....	32
3.3 LE VALVOLE CARDIACHE BIOLOGICHE .....	33
3.3.1 <i>Protesi biologiche in tessuto umano</i> .....	33
3.3.2 <i>Protesi biologiche in tessuto animale</i> .....	34
3.3.3 <i>Problemi delle valvole cardiache biologiche</i> .....	35
3.4 CONFRONTO TRA PROTESI MECCANICHE E BIOLOGICHE.....	36
<b>CAPITOLO 4. LE VALVOLE PROTESICHE INGEGNERIZZATE</b> .....	<b>37</b>
4.1 LE CELLULE.....	37
4.1.1 <i>Il ruolo delle cellule nella ECM</i> .....	38
4.1.2 <i>Tipologie di cellule utilizzate in vitro</i> .....	39
4.2 LO SCAFFOLD .....	40
4.2.1 <i>I prerequisiti meccanici</i> .....	40
4.2.2 <i>Le valvole decellularizzate</i> .....	42
4.2.3 <i>Gli scaffold artificiali</i> .....	44
4.2.3.1 <i>I polimeri naturali</i> .....	44
4.2.3.2 <i>I polimeri sintetici</i> .....	47
4.2.4 <i>Le tecniche di produzione di scaffold artificiali</i> .....	50
4.2.4.1 <i>Le tecniche convenzionali</i> .....	50

4.2.4.2 <i>Le tecniche di prototipizzazione rapida</i> .....	51
4.3 I FATTORI DI CRESCITA CELLULARE E I BIOREATTORI .....	53
4.4 SCAFFOLD IN POLI(L-LATTIDE-CO- $\epsilon$ -CAPROLATTONE) E FIBROINA DELLA SETA PER VALVOLE PROTESICHE .....	54
4.4.1 <i>La produzione degli scaffold</i> .....	54
4.4.2 <i>I metodi di analisi e i risultati</i> .....	56
<b>CONCLUSIONE</b> .....	<b>61</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>62</b>

## Abstract

Le malattie delle valvole cardiache, come stenosi e insufficienza, interessano una percentuale sempre maggiore della popolazione a causa dell'aumento dell'età media e dell'incidenza di patologie degenerative del cuore. In molti casi è necessario un intervento di sostituzione valvolare per risolvere questi problemi e, attualmente, esistono due procedure possibili: il *Surgical Valve Replacement (SVR)*, che prevede un intervento a cuore aperto, e il *Transcatheter Valve Replacement (TVR)*, meno invasiva e più adatta a pazienti anziani.

Le protesi valvolari ad oggi disponibili sono di tipo meccanico e biologico: le prime risultano più durevoli e resistenti ma sono soggette a problematiche di trombogenicità; le seconde, invece, possono essere inserite in modo meno invasivo mediante *TVR* e non necessitano di terapie anticoagulanti, ma sono meno resistenti. Le problematiche riguardanti tali tipologie di protesi hanno portato allo studio di una nuova alternativa per sostituire le valvole danneggiate: le *TEHVs (Tissue Engineered Heart Valves)*. L'applicazione delle tecniche di ingegneria tissutale alle valvole cardiache protesiche, infatti, aspira a produrre dei dispositivi capaci di crescere, rigenerarsi e rimodellarsi in modo da ricreare perfettamente le strutture native del paziente.

In questa tesina verrà analizzata la fabbricazione sperimentale di TEHVs che prevede la produzione di uno scaffold artificiale, costituito dalla matrice decellularizzata di una valvola animale o da una matrice polimerica artificiale o naturale, e il successivo inserimento di cellule e molecole in grado di stimolare la sintesi del nuovo tessuto valvolare. La struttura così ottenuta viene poi inserita in un bioreattore, che ricrea l'ambiente in cui operano le valvole cardiache, per migliorare le proprietà meccaniche del dispositivo ed "allenarlo" ai movimenti di apertura e chiusura dei lembi. In conclusione, verrà analizzata la fabbricazione di scaffold in poli(L-lattide-co-ε-caprolattone) (PLCL) e fibroina della seta per la produzione di valvole cardiache ingegnerizzate.



## Capitolo 1. Introduzione

L'aumento dell'aspettativa di vita media della popolazione ha portato ad un incremento dell'incidenza di malattie degenerative delle valvole cardiache e, di conseguenza, del numero degli interventi di riparazione o sostituzione di queste strutture. In numerosi paesi in via di sviluppo, inoltre, si è visto che le problematiche valvolari sono principalmente causate da febbre reumatica, una patologia infiammatoria che colpisce bambini tra i cinque e i quattordici anni, causando lesioni permanenti al cuore o alle valvole cardiache. In questi anni, di conseguenza, la richiesta di protesi valvolari adatte sia a pazienti giovani che anziani ha sollevato il problema della mancanza di un dispositivo in grado di ricreare perfettamente le caratteristiche delle valvole native.

Ad oggi le protesi di tipo meccanico e biologico utilizzate presentano delle problematiche che non le rendono i sostituti ideali. I dispositivi meccanici, infatti, offrono una buona resistenza meccanica ma, data la loro struttura rigida, possono essere inseriti solo mediante interventi invasivi, non adatti a pazienti anziani; il loro utilizzo, inoltre, presenta un elevato rischio di formazione di trombi e comporta una terapia anticoagulante a vita. I dispositivi biologici, invece, possono essere inseriti mediante operazioni micro-invasive, risultando più adatti a pazienti anziani; il loro utilizzo, tuttavia, non è indicato per i pazienti più giovani, a causa della minore resistenza meccanica e della breve durata di queste protesi. Nel caso di pazienti infantili, inoltre, è presente anche il problema legato alla crescita dell'individuo che potrebbe portare ad un *mismatch* tra le dimensioni della protesi valvolare e quelle dell'orifizio valvolare, causando una possibile insufficienza e rendendo necessario un secondo intervento di sostituzione.

La ricerca si è rivolta, quindi, verso l'applicazione delle tecniche di ingegneria tissutale alla fabbricazione sperimentale di dispositivi protesici valvolari in grado di crescere e rimodellarsi in risposta alle necessità del paziente. Questi nuovi dispositivi, inseribili mediante *SVR*, potrebbero risolvere le problematiche delle protesi valvolari meccaniche e biologiche in quanto offrirebbero: da una parte, una struttura perfettamente compatibile e rimodellabile priva di problematiche trombogeneiche, eliminando quindi la necessità di terapie anticoagulanti; dall'altra, un dispositivo resistente e capace di crescere con l'individuo, adatto ai pazienti più giovani.

In questo elaborato verranno presentate le tecniche di produzione di tali protesi ingegnerizzate e, in particolare, saranno analizzati i materiali adatti alla fabbricazione degli scaffold. Infine, sarà esposto un particolare materiale composto da poli(L-lattide-co-ε-caprolattone) (PLCL) e fibroina della seta, studiato in via sperimentale per la realizzazione degli scaffold delle valvole cardiache ingegnerizzate.

## 1.1 Introduzione all'ingegneria tissutale

L'ingegneria tissutale (*Tissue Engineering*, TE) è un settore nato alla fine degli anni '80 per supplire alla mancanza di organi o tessuti impiantabili e per offrire dei sostituti perfettamente compatibili con il paziente, evitando possibili problemi di rigetto.

Questa disciplina viene definita, per la prima volta, dall'ingegnere chimico Robert S Langer e dal chirurgo Joseph Vacanti come “un campo interdisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e delle scienze allo sviluppo di sostituti biologici che ripristinino, mantengano o migliorino la funzione di un tessuto o di un intero organo” [1]. Una definizione successiva la descrive come “la comprensione dei principi della crescita del tessuto e la sua applicazione alla produzione di un tessuto funzionale all'uso clinico” [2].

Dal punto di vista normativo, il Regolamento CE n. 1394/2007 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 13 novembre 2007 classifica l'ingegneria tissutale tra le terapie avanzate, insieme a terapia genetica e delle cellule somatiche, e definisce “prodotto dell'ingegneria tissutale” un dispositivo che “contiene o consiste di cellule o tessuti ingegnerizzati, presentato come avente proprietà di rigenerare, riparare o sostituire il tessuto umano” [3].

Si tratta, quindi, di un campo multidisciplinare che sfrutta le più recenti scoperte della bioingegneria, della scienza dei materiali, delle biotecnologie e della medicina rigenerativa per la fabbricazione di tessuti o organi in grado di sostituire quelli danneggiati o malfunzionanti degli esseri umani. È possibile ricondurre i contributi di tutte queste discipline a tre principali elementi che sono alla base di tutte le tecniche proprie di questa disciplina: i biomateriali, utilizzati per produrre lo scaffold; le cellule, che devono popolare lo scaffold; i segnali, che inducono la moltiplicazione cellulare e la degradazione dello scaffold [4] (Figura 1.1).

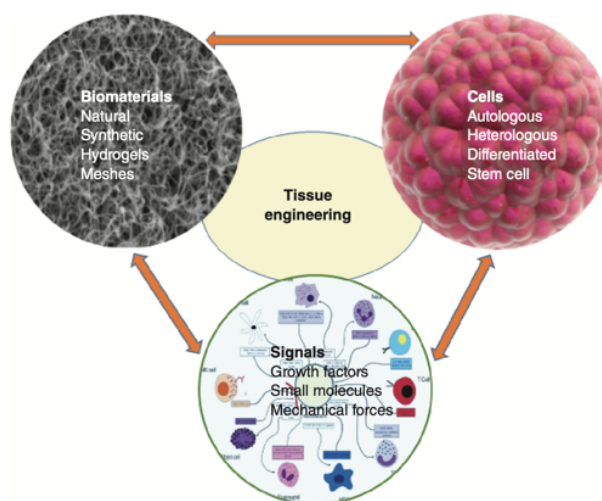


Figura 1.1: I tre pilastri dell'ingegneria tissutale. La combinazione di cellule, biomateriali per lo scaffold e segnali, sia chimici che fisici, è alla base delle tecniche di produzione dei tessuti ingegnerizzati.

### 1.1.1 Lo scaffold e i biomateriali

Lo scaffold è la struttura porosa alla base dei prodotti dell'ingegneria tissutale, che fornisce il supporto per la formazione di tessuti e organi tridimensionali. Questa matrice artificiale viene progettata con l'obiettivo di ricreare la struttura e la composizione del tessuto da sostituire, ma questo non sempre è possibile a causa della complessità dell'anatomia e della fisiologia umana. Oltre ad offrire il supporto strutturale al tessuto ingegnerizzato, lo scaffold ha anche il compito di inviare segnali meccanici alle cellule per stimolare la sostituzione dello scaffold stesso con la loro propria matrice sintetizzata, senza causare reazioni da corpo estraneo [5]. Questo particolare processo di sintesi e sostituzione deve avvenire in modo coordinato, in modo tale che la matrice sintetica non sia completamente biodegradata prima della completa rigenerazione tissutale. È necessario, quindi, che i materiali con cui si producono tali strutture siano biodegradabili e biorassorbibili in modo controllato e che le loro proprietà meccaniche siano compatibili con quelle del tessuto da sostituire.

I materiali utilizzati per la fabbricazione di queste matrici artificiali possono essere di tipo polimerico, naturali (come collagene, acido ialuronico e fibrina) o sintetici (come poliandridi e idrossiapatite), o di tipo biologico, ottenuti mediante la decellularizzazione di matrici biologiche allogeniche o xenogeniche [5,6].

Le matrici polimeriche naturali sono caratterizzate da una buona biocompatibilità e da una bassa immunogenicità, ma sono difficilmente biodegradabili e offrono poca stabilità dal punto di vista meccanico, a differenza di quelle polimeriche sintetiche, che però hanno minori capacità di interagire con le cellule [5]. Le matrici biologiche, invece, offrono una struttura tridimensionale ottimale e presentano già fattori di crescita e di proliferazione cellulare al loro interno; tuttavia, dopo il processo di decellularizzazione, è possibile che rimangano alcuni residui di cellule xenogeniche o allogeniche, che causano problemi di immunogenicità, e che la composizione e le proprietà strutturali dello scaffold siano modificate rispetto al tessuto nativo [6].

### 1.1.2 Le cellule utilizzate nelle tecniche di TE

Le cellule costituiscono un punto cruciale per la fabbricazione dei sostituti di organi o tessuti ingegnerizzati e la loro scelta può condizionare le capacità rigenerative e di crescita del prodotto finale. Queste, infatti, sono alla base della formazione di nuovo tessuto *in vitro*, detta neomorfogenesi, che prevede l'invio di segnali chimici, mediante l'utilizzo di fattori di crescita, e meccanici, sfruttando le proprietà dello scaffold (e dell'eventuale biorettore), per stimolare la proliferazione cellulare [7,8].

Le principali tipologie utilizzate nelle tecniche di TE sono: cellule autologhe, prelevate direttamente dal paziente; cellule allogene, provenienti da altri individui della stessa specie del paziente; cellule xenogene, isolate da individui di specie diversa rispetto al paziente. Negli ultimi anni, inoltre, anche grazie alle recenti scoperte di Shinya Yamanaka, secondo cui le cellule adulte differenziate possono essere indotte a diventare cellule staminali pluripotenti (*Induced Pluripotent Stem Cells*, iPSCs), si è iniziato a sfruttare anche le cellule staminali [7].

Le cellule autologhe sono considerate le migliori per le applicazioni dell'ingegneria tissutale, in quanto non evocano una risposta immunologica e non necessitano di terapie immunosoppressive; tuttavia, a causa della poca disponibilità quantitativa di queste cellule, è necessario un lungo periodo di coltura per ingegnerizzare i tessuti desiderati [7]. Nel caso di pazienti anziani o affetti da malattie geniche, inoltre, l'isolamento delle cellule autologhe può comportare delle difficoltà [9]. In risposta a questi problemi, è stato valutato l'utilizzo di cellule allogene e xenogene che, però, è associato ad alcune controindicazioni, come: il rigetto immunologico, la trasmissione di malattie e la possibilità di *mismatch* tra l'ambiente cellulare del ricevente e quello del donatore.

Dal momento che queste tipologie di cellule non sembrano essere i candidati ideali per popolare lo scaffold in modo ottimale, è cresciuto l'interesse nei confronti delle cellule staminali, responsabili del mantenimento e della risposta a malattie o lesioni nei tessuti adulti. Queste cellule possono essere differenziate mediante l'utilizzo di segnali chimici e fisici, permettendo il controllo dell'attivazione, della proliferazione, della migrazione e della differenziazione, fondamentali per le tecniche di produzione *in vitro* di tessuti e organi ingegnerizzati [6]. Nonostante questo, le cellule staminali presentano alcuni punti a loro sfavore in quanto non sono ancora conosciute tutte le loro proprietà e la loro applicazione potrebbe sollevare problemi di tipo etico, soprattutto a causa del possibile utilizzo di cellule embrionali [9].

### 1.1.3 I segnali e i bioreattori

Per promuovere la sintesi della matrice cellulare e la degradazione dello scaffold, oltre agli stimoli meccanici, sono necessari anche dei segnali chimici che permettano di migliorare l'interazione tra le cellule e la matrice artificiale. Questi segnali possono essere inviati alle cellule da alcune proteine bioattive poste sullo scaffold, come ad esempio: molecole che stimolano la divisione cellulare (mitogeni); fattori di crescita, che inducono la proliferazione cellulare, ad esempio i fattori di crescita dell'epitelio vascolare (*Vascular Epithelial Growth Factor*, VEGF); molecole morfogenetiche, che controllano la formazione di tessuto, ad esempio le proteine morfogenetiche ossee (*Bone Morphogenetic Proteins*, BMPs) [6,8].

Tra queste tipologie, i fattori di crescita (*Growth Factors*, GFs) sono i più utilizzati e la loro aggiunta allo scaffold risulta essenziale per la rigenerazione del tessuto [9].

Dopo aver distribuito queste proteine di segnalazione sullo scaffold insieme alle cellule, il tessuto ingegnerizzato viene spesso posto all'interno di un bioreattore, uno dispositivo in grado di fornire un ambiente adeguato alla crescita di nuovo tessuto. L'utilizzo di questi dispositivi è cresciuto molto negli ultimi anni, in risposta a studi che hanno dimostrato come i tessuti abbiano bisogno di essere soggetti a stimoli specifici per adottare un fenotipo naturale e ottenere una composizione fisiologica della matrice [7]. Un altro ruolo importante dei bioreattori è quello di riuscire ad ottenere risultati riproducibili, condizione fondamentale per l'implementazione clinica dei prodotti, in quanto permettono di controllare e standardizzare le condizioni di coltura.

## 1.2 Tecniche di produzione dei tessuti ingegnerizzati

La produzione di tessuti e organi ingegnerizzati può avvenire secondo due approcci [8]:

- *in vitro seeding*: le cellule del paziente ricevente sono seminate sullo scaffold insieme ai nutrienti e ai fattori di crescita e questo tessuto, prima di essere impiantato nel paziente, viene posto all'interno di un bioreattore che ricrea un ambiente favorevole alla crescita cellulare;
- *tissue guided regeneration*: in questo caso non avviene la semina cellulare *in vitro* e il tessuto viene direttamente impiantato nel paziente.

In questa trattazione si è deciso di analizzare il primo approccio che, nei capitoli successivi, sarà applicato alla progettazione di valvole cardiache ingegnerizzate.

### 1.2.1 *In vitro seeding*

La produzione di tessuti ingegnerizzati secondo l'approccio 'in vitro seeding' comprende tre principali fasi (Figura 1.2):

- la scelta delle cellule da utilizzare e la loro coltura *in vitro*;
- la produzione dello scaffold e la semina cellulare;
- l'inserimento del tessuto ingegnerizzato all'interno del bioreattore.

La progettazione dello scaffold adeguato, e la corretta semina cellulare, risultano fondamentali per questa tecnica, in quanto permettono di controllare le proprietà chimiche e meccaniche del prodotto finale. È necessario, infatti, che la matrice artificiale sia sufficientemente porosa per garantire il trasporto di gas respiratori e di nutrienti verso le cellule, consentendo la neovascolarizzazione del tessuto *in vivo* (impossibile *in vitro* ma necessaria per le future applicazioni *in vivo*) [6,7].

Nel caso di matrici biologiche decellularizzate questa proprietà è già assicurata dalla natura della struttura propria del tessuto; invece, per quelle di tipo polimerico, sono stati studiati diversi metodi di fabbricazione per creare vuoti isotropicamente distribuiti e pori di connessione, in modo da avere più controllo sulla distribuzione del materiale e sulla migrazione cellulare [6]. Le nuove tecniche di produzione di queste tipologie di scaffold, come il ‘bioprinting’ (stampa tridimensionale di tessuti e organi) e la ‘2-photon lithography’ (polimerizzazione multifotone), permettono la realizzazione di strutture tridimensionali precise e adatte alle applicazioni della TE, oltre alla possibilità di posizionare in modo preciso le cellule e i fattori di crescita, rendendo migliore il controllo della proliferazione cellulare.

L’inserimento delle cellule sulla matrice può avvenire in due modi diversi, a seconda del materiale scelto per la produzione dello scaffold [7,8]:

- nel caso di matrici biologiche e polimeriche, è possibile inserire direttamente le cellule sulla superficie della struttura tridimensionale, mediante semplice assorbimento o con l’utilizzo di ‘carrier’;
- nel caso di matrici polimeriche in idrogel, le cellule possono essere incapsulate direttamente all’interno della struttura, tenendo conto delle basse proprietà meccaniche del biomateriale che non ne permettono l’utilizzo per tessuti che devono sopportare carichi pesanti.

Il passo successivo alla semina cellulare dello scaffold è l’inserimento della struttura all’interno di un bioreattore, che fornisce un ambiente favorevole alla crescita e alla proliferazione cellulare.

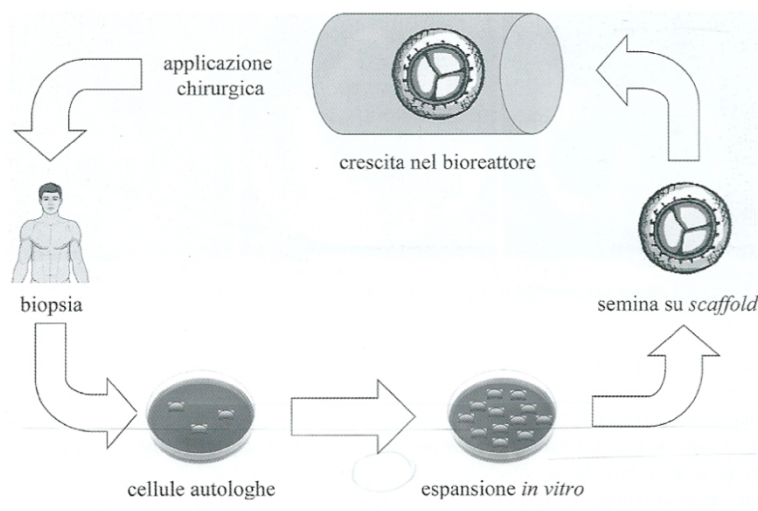


Figura 1.2. Esempio di applicazione della tecnica *in vitro seeding*: produzione di una valvola cardiaca ingegnerizzata.

### 1.3 Applicazioni dell'ingegneria tissutale

Negli ultimi cinquant'anni le tecniche di ingegneria tissutale, inizialmente sfruttate solo per la produzione di semplici tessuti come pelle e cartilagine, sono state fortemente implementate e migliorate, permettendo la fabbricazione sperimentale di organi ingegnerizzati più complessi, come trachea (Figura 1.2 c), vescica (Figura 1.2 d) e vasi sanguigni. Attualmente, la ricerca si sta dirigendo verso la progettazione di tessuti e organi ingegnerizzati tridimensionali; sono state riscontrate alcune problematiche dovute alle difficoltà di vascolarizzazione *in vitro* che non permettono la formazione di canali per il trasporto di nutrienti e la secrezione dei prodotti di scarto [7].

Lo sviluppo di valvole cardiache ingegnerizzate (Figura 1.2 f), che verrà analizzata in seguito in questa trattazione, risulta uno dei più importanti campi di applicazione di questa disciplina.



Figura 1.3: Esempi di tessuti/organi ingegnerizzati: (a) scaffold ottenuto da acido poliglicolico biodegradabile (PLA) nella forma di un orecchio di un bambino di 3 anni; (b) scaffold impiantato sotto cute sulla schiena di un topo immunodeficiente; (c) primo trapianto di trachea utilizzando cellule staminali del midollo osseo umano; (d) vescica ingegnerizzata seminata con cellule della vescica umana e immersa in una soluzione di crescita; (e) rene bioingegnerizzato che imita la funzione di un rene normale per quanto riguarda il controllo del sistema urinario e la filtrazione del sangue; (f) valvola cardiaca ingegnerizzata ottenuta utilizzando cellule stromali del midollo umano.



## Capitolo 2. Il cuore e le valvole cardiache

Il cuore è l'organo muscolare al centro del sistema cardiocircolatorio del corpo umano e svolge l'importante funzione di pompare il sangue all'interno dei vasi sanguigni, permettendo l'irrorazione di tutti gli organi e i tessuti, che risulta fondamentale sia per il rilascio di ossigeno e nutrienti sia per l'allontanamento di sostanze di scarto e di CO<sub>2</sub>. È situato all'interno del torace, sopra alla cupola diaframmatica nella regione del mediastino medio, ed è avvolto da un sacco fibrosiero costituito dal pericardio, sieroso e fibroso, che lo fissa al diaframma, isolandolo dagli altri organi (Figura 2.1). L'apice del cuore, corrispondente alla porzione ventricolare, è rivolto verso l'esterno e punta verso il basso e verso sinistra; invece, la base, corrispondente alla porzione atriale, è rivolta verso l'alto, a destra e all'indietro. Le dimensioni e il peso di questo organo variano in base al sesso, all'età e alla condizione fisica dell'individuo e la sua misura risulta pari alla grandezza del pugno della persona a cui appartiene [10,11,12].

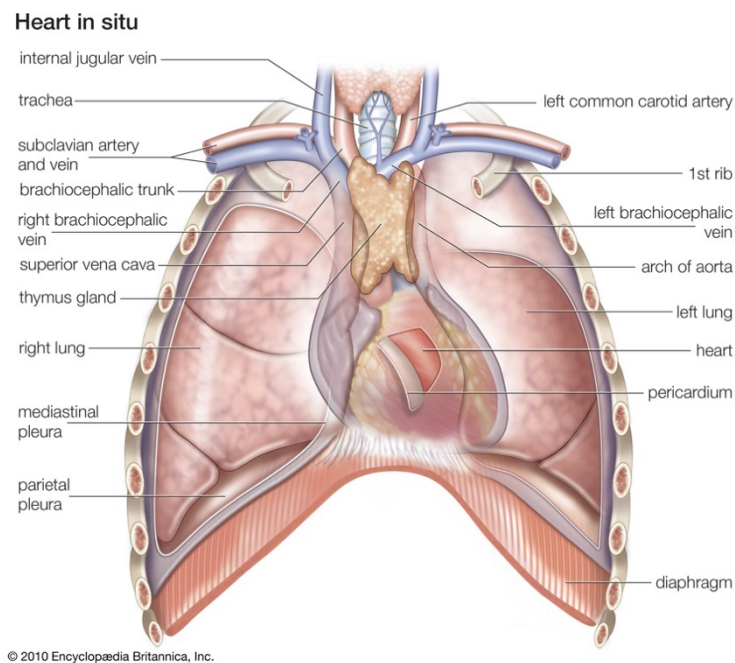


Figura 2.1. Immagine illustrativa della posizione del cuore all'interno del torace umano.

### 2.1 Anatomia cardiaca

Il cuore è un organo cavo avvolto esternamente da una doppia membrana, chiamata pericardio, costituita da un foglietto fibroso e uno sieroso, ed è caratterizzato da una parete composta da tre diverse tonache: l'epicardio, la membrana più esterna; il miocardio, la membrana intermedia; l'endocardio, la membrana più interna.

Internamente è suddiviso in quattro camere: nella porzione basale si trovano i due atri, rispettivamente il destro e il sinistro; nella porzione apicale si trovano i due ventricoli, rispettivamente il destro e il sinistro. Gli atri e i ventricoli situati nello stesso lato comunicano attraverso una valvola atrioventricolare, di tipo tricuspide a destra e di tipo bicuspide o mitrale a sinistra, che impedisce il reflusso di sangue tra le due cavità. Il ventricolo destro è separato dalla arteria polmonare sinistra mediante una valvola semilunare, detta valvola polmonare; invece, il ventricolo sinistro è separato dalla arteria aorta mediante la valvola semilunare aortica. È importante sottolineare che la parte destra e la parte sinistra del cuore non comunicano tra loro, in quanto separate da una parete muscolare e fibrosa denominata setto del cuore (Figura 2.2) [11,12,13].

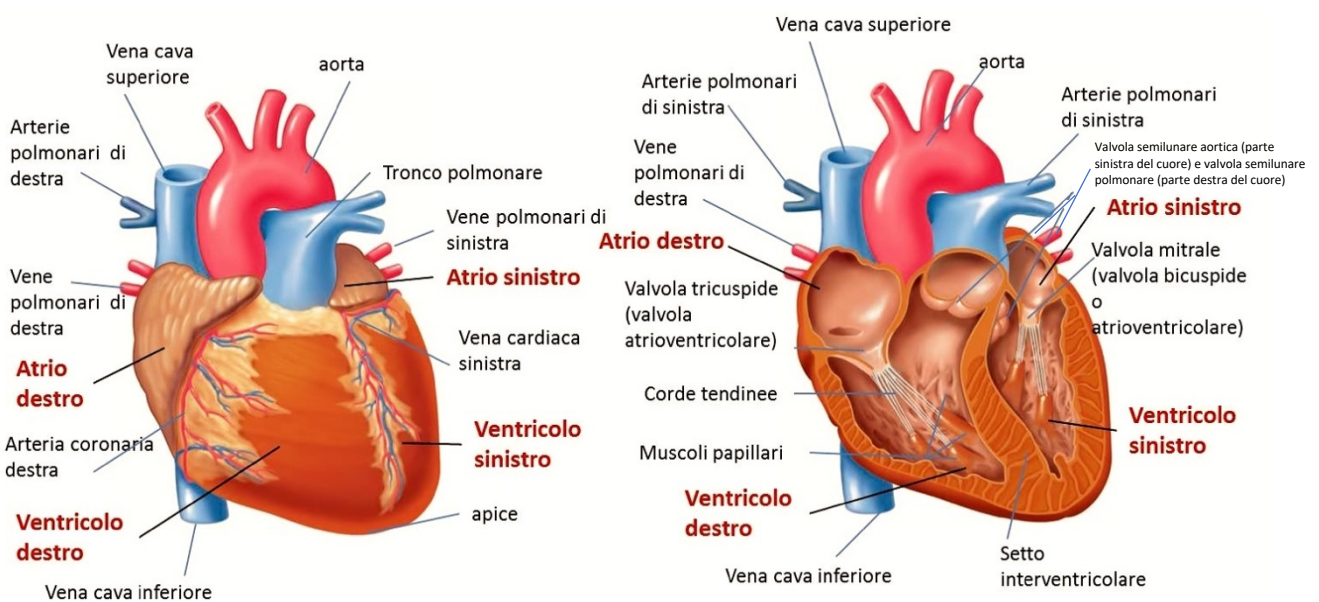


Figura 2.2. L'immagine rappresenta: a sinistra, la parete esterna del cuore e i vasi sanguigni che lo irrorano; a destra la sezione trasversale del cuore, che permette di osservare gli atri, i ventricoli e le quattro valvole.

### 2.1.1 Il pericardio e la struttura della parete cardiaca

Il *pericardio* costituisce la doppia sacca sierosa che avvolge il cuore e la porzione prossimale dei grandi vasi sanguigni. È composto da due membrane [12]:

- il *pericardio fibroso*, il rivestimento più esterno costituito da tessuto connettivo denso, che ancora la struttura al mediastino medio e al diaframma;
- il *pericardio sieroso*, articolato in due strati: uno interno, denominato viscerale, che aderisce al cuore e ne forma il rivestimento esterno; uno esterno, denominato parietale, che forma il rivestimento interno del pericardio fibroso. Tra le due membrane si trova il fluido pericardico che evita la frizione tra l'organo cardiaco e il suo rivestimento.

Il compito principale di questo involucro è quello di mantenere intatta la forma del cuore e stabilizzare l'organo nella sua posizione anatomica, insieme a quello di proteggerlo dalla diffusione di eventuali infezioni o neoplasie all'interno del mediastino [14].

La parete cardiaca è composta da tre tonache distinte, che si sovrappongono dall'esterno verso l'interno come descritto nel seguito.

- L'*epicardio* è il rivestimento esterno delle cavità cardiache e funge da strato protettivo. È costituito dal foglietto viscerale del pericardio sieroso, composto da tessuto connettivo rivestito da epitelio, e agisce da superficie di adesione per i vasi linfatici, le cellule nervose e le arterie coronarie [13, 15].
- Il *miocardio* è lo strato intermedio e più spesso della parete del cuore, responsabile della contrazione ritmica dell'organo. È costituito principalmente da tessuto muscolare cardiaco, una tipologia di muscolo striato involontario, formato da cellule contrattili striate mononucleate, denominate *cardiomiociti* [16]. In base alle caratteristiche dei cardiomiociti che lo compongono, il miocardio si distingue in due categorie: *il miocardio comune o di lavoro*, che realizza la contrazione cardiaca; *il miocardio specifico o di conduzione*, formato da cellule modificate con meno miofibrille e più mitocondri, che ha il compito di generare e condurre l'impulso elettrico in modo autonomo [16].
- L'*endocardio* è il rivestimento più interno delle cavità cardiache. È costituito da una lamina endoteliale, composta da un sottile strato di cellule piatte poligonali, e da un sottile strato di tessuto connettivo lasso (lamina propria), che permette l'adesione al miocardio. Questa tonaca favorisce il passaggio del flusso sanguigno evitando attriti che potrebbero causare dei coaguli sanguigni [13].

Il cuore, inoltre, è composto da una struttura di sostegno detta *scheletro fibroso*, formata da collagene e fibre elastiche, presente principalmente nella parete degli orifizi tra le camere cardiache, a livello degli *anelli fibrosi* attorno alle valvole [17].

## 2.2 Fisiologia cardiaca

Il cuore ha il doppio compito di pompare il sangue arterioso, ricco di ossigeno, nei tessuti e di spingere il sangue venoso, ricco di anidride carbonica, nei polmoni. Per compiere questa funzione, l'organo si contrae in modo ritmico ad intervalli regolari, solitamente per circa 75 volte al minuto in un individuo adulto a riposo [15,17]. Questa contrazione ritmica è indipendente dal sistema nervoso ed è generata da cardiomiociti specializzati che, come detto in precedenza nel sotto paragrafo 2.1.1, formano il *miocardio di conduzione*, presente nel nodo senoatriale (SA) e atrioventricolare (AV), nel Fascio di His e nelle Fibre di Purkinje. Gli stimoli elettrici alla base di queste contrazioni sono dovuti ad un potenziale d'azione che eccita i cardiomiociti e provoca una fase di depolarizzazione e, successivamente, di ripolarizzazione della membrana cellulare. Ogni singolo battito è quindi caratterizzato da una fase di contrazione, successiva alla propagazione dell'impulso, e una fase di rilassamento della muscolatura cardiaca, che possono essere registrate mediante l'utilizzo di elettrodi cutanei [15,17].

### 2.2.1 I potenziali d'azione

Il tessuto muscolare cardiaco, responsabile dell'attività contrattile del cuore, è costituito da cardiomiociti uniti tra loro mediante elementi giunzionali, chiamati *dischi intercalari*, in modo da formare un sincizio funzionale dal punto di vista elettrico. Le *giunzioni comunicanti* lungo il tratto longitudinale di questi dischi intercalari, infatti, favoriscono il passaggio di ioni e molecole, permettendo l'accoppiamento elettrico mediante la propagazione del *potenziale d'azione*, un repentino cambio dello stato elettrico della membrana cellulare [16].

La membrana cellulare delle cellule del miocardio comune, allo stato di riposo, presenta una differenza di potenziale elettrico tra la superficie interna, orientata negativamente, e quella esterna, orientata positivamente, chiamato *potenziale a riposo*, pari a circa -90 mV. In risposta a determinati impulsi, generati dalle *cellule pacemaker*, la membrana si eccita e il suo potenziale diventa un *potenziale d'azione*, passando dal valore a riposo ad un valore di +20 mV. È possibile derivare questi valori mediante l'utilizzo di elettrodi e analizzare le diverse fasi di questa inversione del potenziale. Nella fase di *depolarizzazione* della membrana si ha un aumento della permeabilità agli ioni  $\text{Na}^+$ , presenti in maggior quantità all'esterno, che entrano all'interno della cellula attraverso canali voltaggio dipendenti e ne aumentano il potenziale elettrico. Successivamente si ha una breve fase di *ripolarizzazione*, dovuta alla chiusura dei canali  $\text{Na}^+$  e all'apertura dei canali  $\text{K}^+$ , che permettono l'uscita di tali ioni dall'interno verso l'esterno della membrana. Prima che la membrana ritorni ai valori di riposo, si nota una fase *plateau* in cui il potenziale rimane costante grazie a due eventi: una diminuzione della permeabilità agli ioni  $\text{K}^+$  e un aumento della permeabilità agli ioni

$\text{Ca}^{2+}$ . Al termine di questa fase di *plateau*, si verifica la ripolarizzazione definitiva della membrana attraverso la chiusura dei canali del  $\text{Ca}^{2+}$  e l'apertura dei canali tardivi del  $\text{K}^+$ .

La fase di *plateau* risulta fondamentale in quanto allunga la durata del potenziale d'azione cardiaco e impedisce l'accavallamento di più impulsi, che potrebbe generare una contrazione tetanica [18].

Le *cellule pacemaker*, invece, responsabili dell'inizio dell'impulso elettrico, sono caratterizzate da un potenziale di membrana instabile che parte da un valore di -60 mV e lentamente arriva ad un valore di soglia di circa -40 mV, attivando spontaneamente il potenziale d'azione. Inizialmente i canali degli ioni  $\text{Na}^+$  e degli ioni  $\text{K}^+$  sono aperti, causando una lenta depolarizzazione della membrana fino al valore di soglia. Successivamente si chiudono i canali  $\text{Na}^+$  e si aprono quelli per il  $\text{Ca}^{2+}$ , che determinano la rapida discesa del potenziale di membrana di queste cellule. Una volta raggiunto il picco del potenziale d'azione, i canali  $\text{Ca}^{2+}$  si chiudono e vengono aperti quelli del  $\text{K}^+$ , responsabili della fase di ripolarizzazione [18].

### 2.2.2 Il sistema cardiaco di conduzione

Il sistema cardiaco di conduzione è responsabile del controllo e della propagazione del segnale di contrazione, descritto nel sotto paragrafo precedente, all'interno del cuore e comprende le seguenti strutture:

- il *nodo senoatriale* (SA), costituito da una porzione di cardiociti modificati posti nell'atrio destro, in prossimità della vena cava (Figura 2.3). È la struttura responsabile dell'inizio del battito cardiaco, di cui determina il ritmo, e viene definita pacemaker del cuore;
- il *nodo atrioventricolare* (AV), posto vicino alla valvola AV destra, all'estremità inferiore del setto interatriale (Figura 2.3). Questa struttura permette il passaggio nei ventricoli del segnale elettrico proveniente dagli atri che, altrimenti, sarebbe bloccato dallo scheletro fibroso presente nelle valvole AV, il quale agisce da barriera isolante in modo che tutte le eventuali correnti giungano ai ventricoli attraverso questo nodo [17];
- il *fascio di His* (*fascio atrioventricolare*), la continuazione diretta del nodo atrioventricolare costituita da un cordone di cardiomiociti modificati. È possibile distinguere la branca destra e quella sinistra di questa struttura (Figura 2.3);
- le *fibre di Purkinje*, delle strutture simili alle fibre nervose, che derivano dalle estremità inferiori delle due branche del fascio di His e si rivolgono in alto per diramarsi nel miocardio ventricolare. Queste fibre sono responsabili della propagazione dell'impulso elettrico nei ventricoli e formano una rete più fitta nel ventricolo sinistro (Figura 2.3) [17].

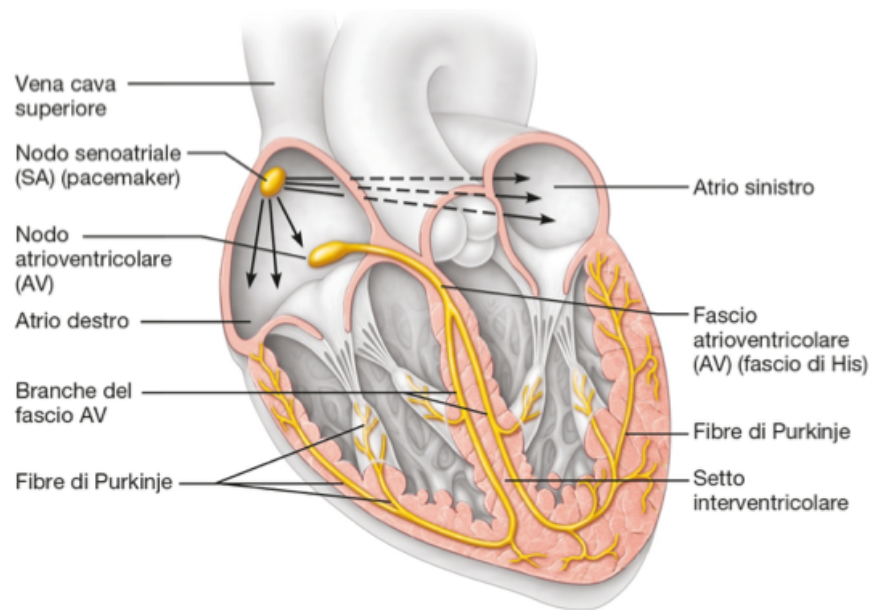


Figura 2.3. Immagine rappresentativa delle componenti del tessuto cardiaco responsabili dell'inizio e della conduzione della contrazione cardiaca all'interno del muscolo cardiaco. Tra queste si contano: il nodo senoatriale, il nodo atrioventricolare, le Fibre di Purkinje e il Fascio di His.

L'impulso elettrico che caratterizza la singola contrazione cardiaca è generato all'interno del nodo SA, dove si trovano le cellule pacemaker che sono in grado di sviluppare segnali senza la stimolazione del sistema nervoso. L'impulso viene propagato negli atri seguendo la direzione indicata dalle frecce nella Figura 2.4 e stimola la depolarizzazione delle fibre miocardiche, causando la contrazione atriale. Successivamente, con un ritardo di 0,1 s rispetto al momento di inizio per permettere la totale eiezione del sangue dagli atri ai ventricoli, il segnale passa attraverso il nodo AV e viaggia attraverso il fascio di His e le fibre di Purkinje per raggiungere l'apice del cuore e depolarizzare le fibre del miocardio ventricolare, dando inizio alla contrazione ventricolare [15].

È importante ricordare che, dopo ogni fase di depolarizzazione, avviene una fase di ripolarizzazione delle cellule del miocardio in cui il muscolo si rilassa.

### 2.2.3 Il ciclo cardiaco

L'attività elettrica del cuore, analizzata nel sotto paragrafo precedente, genera un'onda di depolarizzazione e di successiva ripolarizzazione delle fibre miocardiche che stimola degli eventi di contrazione, *sistole*, e di rilassamento, *diastole*, degli atri e dei ventricoli, provocando delle variazioni di pressione e volume all'interno delle cavità cardiache. Un ciclo completo di contrazione e rilassamento di tutte e quattro le cavità cardiaca è chiamato *ciclo cardiaco*.

È possibile studiare le correlazioni tra le variazioni di pressione e volume all'interno del cuore e la propagazione degli impulsi elettrici nel sistema di conduzione cardiaco, monitorata mediante elettrodi cutanei e visibile nel tracciato dell'elettrocardiogramma (Figura 2.4) [17,18].

Inizialmente, durante la fase di riempimento rapido degli atri, tutte le quattro camere sono in fase di diastole e le valvole AV risultano aperte, permettendo il parziale riempimento anche dei ventricoli. Le valvole aortica e polmonare, invece, sono chiuse. In risposta all'aumento del volume ematico negli atri e all'eccitazione del miocardio atriale in seguito all'attivazione del nodo SA (onda P), la pressione di queste camere aumenta e ha inizio la *sistole atriale*, che spinge il sangue nei ventricoli e ne completa il riempimento. In seguito all'aumento del volume e della pressione intraventricolare, si ha una fase di *diastole atriale*, la cui onda di ripolarizzazione non è visibile nel tracciato dell'elettrocardiogramma perché oscurata dal complesso QRS.

A questo punto, dopo l'attivazione del nodo AV e la diffusione dell'onda di depolarizzazione nel miocardio ventricolare (complesso QRS), ha inizio la *sistole ventricolare* che può essere distinta in due diverse fasi: una iniziale di *contrazione ventricolare isovolumetrica* e una successiva di *eiezione ventricolare* [17].

Nella prima fase il volume dei ventricoli resta costante e la pressione aumenta fino a superare quella atriale, inducendo la chiusura delle valvole AV per evitare il reflusso di sangue. Quando la pressione intraventricolare diventa più alta di quella dell'arteria aorta (80 mmHg), per il ventricolo sinistro, e dell'arteria polmonare (10 mmHg), per il ventricolo destro, avviene l'apertura della valvola aortica e polmonare. Nella seconda fase, invece, avviene l'eiezione completa del sangue dai ventricoli alle arterie. In seguito, la pressione ventricolare diminuisce e risulta inferiore rispetto a quella arteriosa, causando la chiusura delle valvole semilunari per evitare il reflusso di sangue. Per un breve periodo rimangono chiuse anche le valvole AV e si ha un brusco calo della pressione ventricolare, che corrisponde alla fase di *rilassamento ventricolare isovolumetrico* (parte finale dell'onda T di ripolarizzazione ventricolare) [18].

La durata di un ciclo cardiaco risulta pari a circa 0,8 secondi e il volume di sangue pompato da entrambe i ventricoli in condizione di riposo è compreso tra i 70 e i 90 ml (gittata sistolica). Questi valori, tuttavia, non rappresentano il volume reale del sangue all'interno dei ventricoli, che risulta essere pari a 130 ml: infatti, dopo la fase di sistole ventricolare, circa 50 ml di sangue rimangono all'interno delle cavità inferiori [18].

Ogni ciclo cardiaco è caratterizzato dalla presenza di tre toni, visibili nel tracciato del fonocardiogramma in Figura 2.4, che corrispondono: il primo alla chiusura delle valvole AV; il secondo alla chiusura della valvola aortica e polmonare; il terzo, che risulta più debole, che coincide con il riempimento ventricolare.

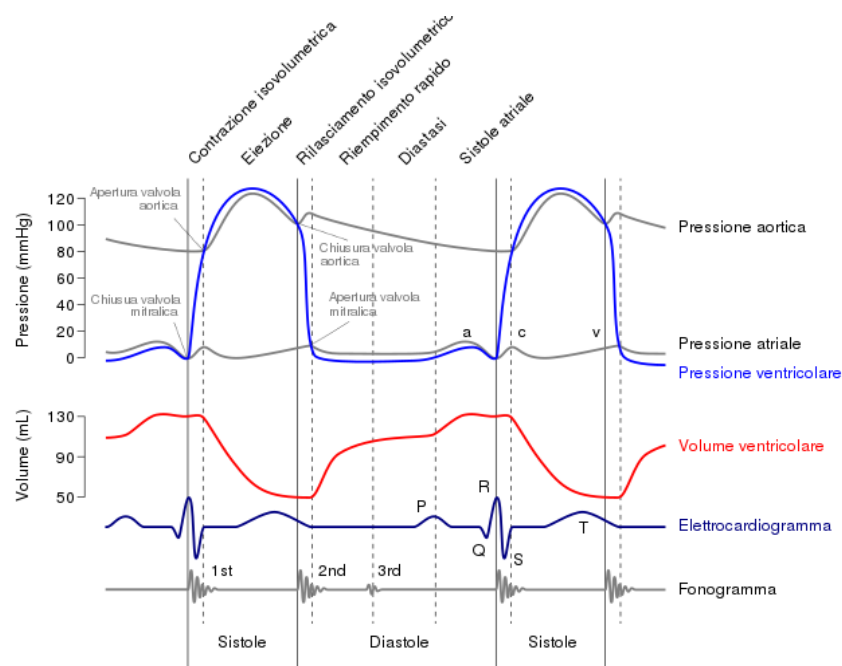


Figura 2.4. L'immagine rappresenta: in alto le variazioni dei livelli di pressione aortica, atriale, polmonare durante un ciclo cardiaco; al centro le variazioni di volume ventricolare durante un ciclo cardiaco; in basso il tracciato dell'elettrocardiogramma e del fonocardiogramma durante un ciclo cardiaco.

### 2.3 Le valvole cardiache

Le valvole cardiache si distinguono in due tipologie a seconda della loro posizione all'interno del cuore: tra atrio e ventricolo si trovano le *valvole atrioventricolari*, di tipo *tricuspide* a destra e *bicuspidale* a sinistra; tra ventricolo e arteria, invece, si trovano le *valvole semilunari*, di tipo *polmonare* a destra e *aortica* a sinistra. Le valvole cardiache hanno il compito di assicurare l'unidirezionalità del flusso ematico tra atri, ventricoli e arterie. I movimenti dei loro lembi, infatti, sono orientati in modo tale da permettere il passaggio in un unico verso e dipendono unicamente dai livelli di pressione esercitati dal sangue sulla loro superficie e, per le valvole AV, dalla contrazione dei muscoli papillari.

Le valvole situate nella parte sinistra del cuore, che pompa il sangue nella circolazione sistemica, sono soggette a pressioni più elevate rispetto a quelle della parte destra e, per questo motivo, sono più soggette a problematiche e malattie. Le valvulopatie principali possono essere distinte in: *stenosi*, casi in cui l'apertura della valvola risulta parziale, e *insufficienze*, casi in cui la chiusura della valvola risulta incompleta e il sangue rischia di tornare indietro.

### 2.3.1 Anatomia delle valvole cardiache

Le quattro valvole cardiache sono poste all'incirca sullo stesso piano, orientato in modo obliquo da sinistra a destra e dall'alto verso il basso (piano valvolare), che corrisponde alla *giunzione atrioventricolare* (Figura 2.5) [11]. Questo piano contiene lo *scheletro fibroso del cuore*, formato da un insieme di robuste strutture connettivali, che fornisce il supporto strutturale alle valvole cardiache, ancorandole alla parete ventricolare.

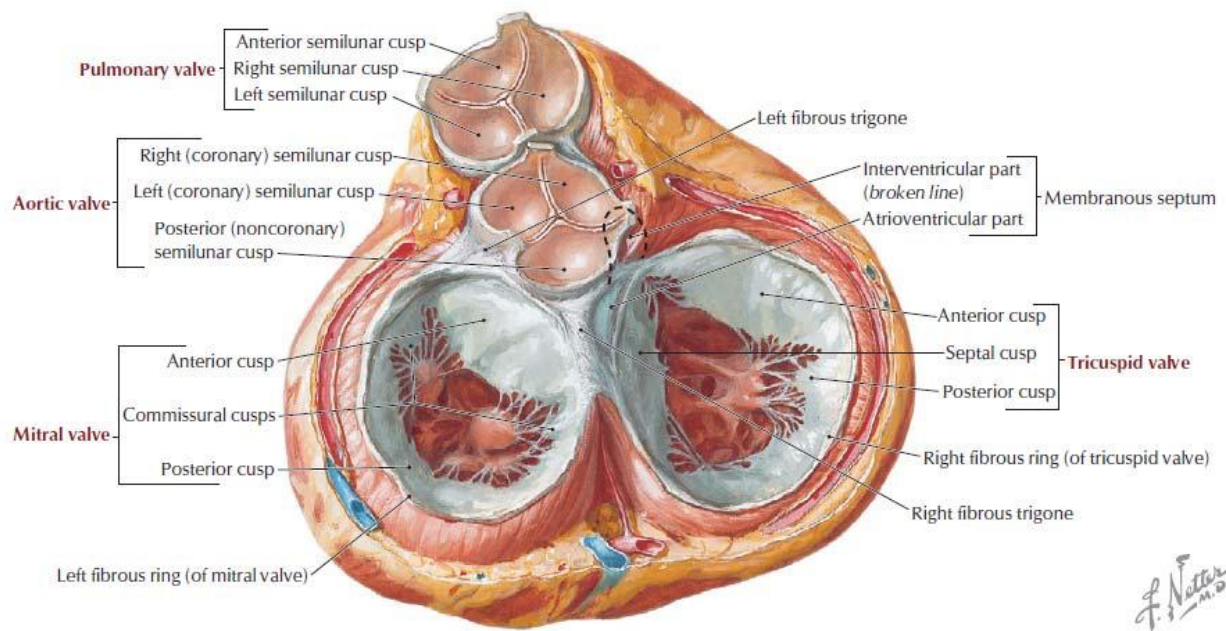


Figura 2.5. Immagine rappresentativa della sezione lungo il piano trasversale del cuore durante la fase di diastole, in cui le valvole AV sono aperte e le valvole semilunari sono chiuse. Sono visibili tutte le componenti strutturali delle due valvole atrioventricolari, tricuspide e bicuspide, e delle due valvole semilunari, polmonare e aortico.

Le *valvole atrioventricolari* sono costituite da due (a sinistra) o tre (a destra) cuspidi laminari di forma triangolare che partono dal contorno dell'orifizio atrioventricolare e si orientano verso la cavità ventricolare. La struttura di questi lembi è composta da una lamina fibrosa, collegata all'anello fibroso che fodera ogni orifizio atrioventricolare, e da un rivestimento di endocardio. La superficie rivolta verso gli atri risulta liscia e presenta, sotto al rivestimento endocardico, un sottile strato di tessuto connettivo fibroso più lasso dove possono estendersi fibre miocardiche della muscolatura atriale. La superficie rivolta verso i ventricoli e il margine libero rivolto verso la cavità ventricolare, invece, forniscono il punto di attacco delle *corde tendinee*, la cui componente di collagene continua da quella della lamina fibrosa della cuspidi [11].

Le componenti tendinee nascono dai muscoli papillari presenti nei due ventricoli e, insieme, queste due strutture formano l'*apparato di tensione*, svolgendo due importanti compiti: durante la fase di

sistole, in cui i muscoli papillari si contraggono, le corde tendinee trattengono i lembi delle valvole per impedire che questi vengano ribaltati verso l'atrio, assicurando la perfetta tenuta delle valvole; durante la fase di diastole, invece, in cui i muscoli papillari sono rilassati, le corde tendinee svolgono una funzione di trazione per permettere la completa apertura della valvola (Figura 2.6). I movimenti di apertura e chiusura dei lembi di queste valvole sono determinati anche dai livelli di pressione esercitati dal sangue sulle loro superfici: quando la pressione degli atri supera quella dei ventricoli, in fase di diastole atriale, si aprono per permettere al sangue di fluire nei ventricoli; quando la pressione dei ventricoli supera quella degli atri, in fase di sistole ventricolare, si chiudono per evitare il reflusso di sangue negli atri.

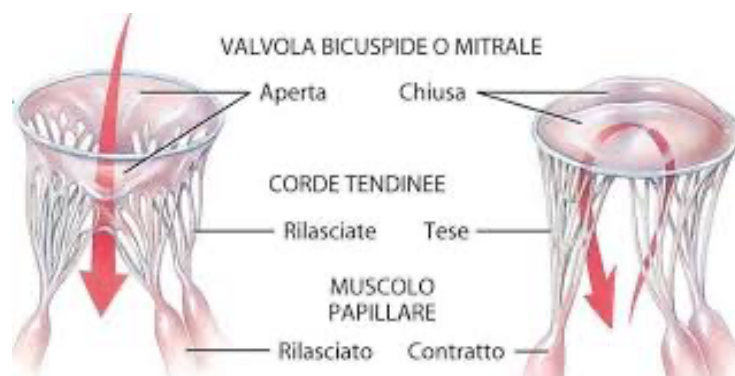


Figura 2.6. L'immagine rappresenta l'attività dell'apparato di tensione della valvola mitrale durante la fase di diastole atriale, a sinistra, e durante la fase di diastole ventricolare, a destra.

- La valvola AV destra è chiamata *valvola tricuspide* ed è costituita da tre lembi parzialmente uniti l'uno all'altro alla base, distinti in: cuspide anteriore, la più grande posta in posizione anteriore rispetto all'orifizio atrioventricolare; cuspide posteriore, posta in posizione posteroinferiore rispetto all'orifizio AV; cuspide settale, la meno sviluppata posta in posizione mediana (vedi Figura 2.5).
- La valvola AV sinistra è chiamata *valvola mitrale* ed è costituita da due lembi, uniti sul margine superiore da commessure, distinti in: una cuspide anteriore, caratterizzata da una base più ristretta e da un'altezza notevole, e una cuspide posteriore, dalla base più ampia e con un'altezza minore. La cuspide anteriore è strettamente collegata alla valvola aortica mediante una saldatura presente tra l'anello fibroso atrioventricolare sinistro e quello dell'orifizio aortico, chiamato *trigono fibroso sinistro* (vedi Figura 2.5).

Le *valvole semilunari* presentano una struttura più semplice rispetto alle valvole AV e sono costituite da tre ripiegamenti membranosi a tasca, posti all'interno dell'*anello fibroso* che circonda l'orifizio arterioso tra la porzione di efflusso dei ventricoli e l'origine delle rispettive arterie.

Le tre cuspidi che compongono queste valvole presentano un margine libero, rivolto verso l'interno del vaso, e un margine aderente, impiantato nell'anello fibroso in posizione adiacente a quello delle altre due. Queste strutture presentano una faccia superiore concava, rivolta verso l'arteria, e una faccia inferiore convessa, rivolta verso il ventricolo [11]. Come le valvole AV, anche le valvole semilunari presentano una lamina fibrosa interna rivestita da uno strato di endocardio che, nella faccia superiore, continua nella tonaca intima della rispettiva arteria e che, nella faccia inferiore, continua nell'endocardio ventricolare. La lamina fibrosa interna è caratterizzata, nel punto centrale del margine libero di ogni cuspidi, da un ispessimento nodulare e, quando la valvola si chiude, i tre noduli si incontrano rendendo più completa la chiusura dei tre lembi. La struttura di queste valvole risulta particolarmente robusta e non necessita di un apparato di tensione, a differenza delle valvole AV [11].

Anche per le valvole semilunari i movimenti dei lembi sono determinati dai livelli di pressione esercitati dal sangue sulle loro superfici: durante la fase di eiezione della sistole ventricolare, la pressione ventricolare supera quella dell'arteria corrispondente e la valvola si apre di scatto, lasciando le cuspidi librarsi nel flusso di sangue rimanendo a metà tra la posizione di chiusura e la parete del vaso; durante la fase di diastole ventricolare, invece, la pressione dell'aorta risulta più alta rispetto a quella del ventricolo e la valvola si chiude molto velocemente. Questi movimenti molto rapidi di apertura e chiusura sottopongono i margini delle cuspidi ad un elevato stress meccanico che, con il tempo, può provocare delle degenerazioni. Un'altra caratteristica del funzionamento di queste valvole è la non completa apertura delle cuspidi che non aderiscono alla parete del vaso durante la fase di eiezione, diminuendo la superficie di passaggio del flusso e aumentandone la velocità.

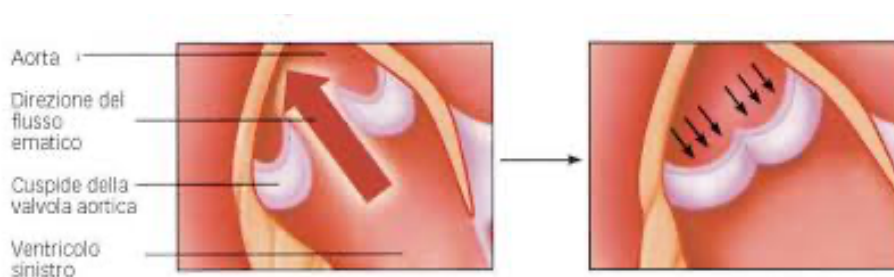


Figura 2.7. L'immagine rappresenta i movimenti della valvola aortica in fase di sistole ventricolare, a sinistra, e di diastole ventricolare, a destra.

- La *valvola polmonare*, posta tra il ventricolo destro e l'arteria polmonare, è costituita da tre semilune di dimensioni uguali: una posizionata anteriormente, detta *valvola semilunare anteriore*, e due posizionate posteriormente, dette *valvola semilunare destra e sinistra* (vedi Figura 2.5).
- La *valvola aortica*, posta tra ventricolo sinistro e l'arteria aorta, è costituita da tre semilune: due posizionate anteriormente, dette *valvola semilunare destra e sinistra*, e una posizionata posteriormente, detta *valvola semilunare posteriore* (vedi Figura 2.5). Questa valvola è sottoposta a pressioni maggiori rispetto a quella polmonare e, per questo motivo, risulta più soggetta a malfunzionamento e degenerazioni.

### 2.3.2 Patologie valvolari

Le patologie valvolari, dette anche valvulopatie, si sviluppano in seguito a processi degenerativi o infiammatori che possono causare: un restringimento dell'apertura della valvola, diminuendo il volume del flusso di sangue dagli atri ai ventricoli o dai ventricoli alle arterie (*stenosi valvolare*); oppure una deformazione delle cuspidi, che impedisce la loro completa chiusura e permette il reflusso di sangue (*insufficienza valvolare*) [11]. È possibile diagnosticare queste valvulopatie mediante auscultazione del cuore o attraverso un fonocardiogramma (vedi Figura 2.4).

In questo paragrafo verranno trattate principalmente le patologie che interessano la parte sinistra del cuore, in quanto risultano le più frequenti.

La *stenosi mitralica* è il restringimento dell'orifizio atrioventricolare, che ostacola il flusso di sangue tra l'atrio e il ventricolo sinistro durante la fase di sistole atriale. La causa principale di questa patologia risulta essere la febbre reumatica, una complicanza dell'infezione streptococcica acuta della gola, molto presente nei paesi in via di sviluppo in America Latina, Africa e Asia. In questa valvulopatia le cuspidi mitraliche risultano più spesse e poco flessibili e le corde tendinee più fisse e accorciate, causando una diminuzione dell'area della valvola da  $4/5 \text{ cm}^2$  (valore normale) fino a:  $2,5/1,5 \text{ cm}^2$ , nel caso di stenosi lieve; valori minori di  $1,5 \text{ cm}^2$ , nel caso di stenosi grave;  $1 \text{ cm}^2$ , nel caso di stenosi molto grave (Figura 2.8). I meccanismi di compensazione che entrano in gioco per sopperire alla diminuzione del volume ematico comportano l'aumento progressivo delle dimensioni e della pressione dell'atrio sinistro e, di conseguenza, l'aumento della pressione venosa polmonare che può provocare un'ipertensione polmonare. L'aumento delle dimensioni dell'atrio sinistro, inoltre, può far insorgere una fibrillazione atriale, uno dei fattori di rischio della tromboembolia. La terapia medica per curare questa malattia comprende: nei casi più lievi, la somministrazione di diuretici e anticoagulanti; nei casi più gravi, la riparazione dei lembi della valvola o la sostituzione valvolare [19].

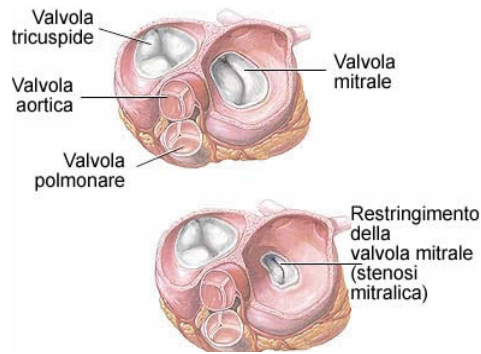


Figura 2.8. L'immagine rappresenta: in alto, una valvola mitrale sana; in basso una valvola mitrale affetta da stenosi.

La *stenosi aortica* è il restringimento dell'orifizio aortico in cui è collocata la valvola aortica, che ostacola il flusso ematico tra ventricolo sinistro e arteria aorta durante la fase di eiezione ventricolare (Figura 2.9). Le cause di questa malattia sono collegate all'età del paziente: per quelli di età superiore ai 70 anni vi è una prevalenza di stenosi dovuta a sclerosi aortica, che provoca un inspessimento della struttura valvolare in seguito a fibrosi e calcificazione; per quelli di età inferiore ai 70 anni, invece, vi è una prevalenza di stenosi dovuta a valvola aortica bicuspidale congenita, associata ad una progressiva dilatazione del tratto ascendente dell'aorta. Come per la stenosi mitralica, anche quella aortica può essere principalmente causata da febbre reumatica nei paesi in via di sviluppo.

La stenosi aortica comporta un sovraccarico di pressione all'interno del ventricolo sinistro che, come meccanismo di compensazione, diventa ipertrofico senza aumentare di volume (ipertrofia concentrica). Con il passare del tempo diventa necessaria la dilatazione volumetrica della cavità, che comporta una diminuzione della frazione di eiezione e della gittata cardiaca e, di conseguenza, la possibilità di sviluppare insufficienza cardiaca o sincope da sforzo. La terapia medica per curare questa malattia comprende la sostituzione della valvola per via chirurgica o percutanea [20].



Figura 2.9. L'immagine rappresenta: a sinistra, le posizioni di apertura e di chiusura di una valvola aortica sana; a destra, le condizioni di apertura e di chiusura di una valvola aortica affetta da stenosi.

L'*insufficienza mitralica* è un'incontinenza della valvola mitralica che provoca il reflusso di sangue dal ventricolo sinistro all'atrio sinistro durante la fase di sistole ventricolare. Si distingue in:

- insufficienza mitralica acuta, causata da febbre reumatica acuta o da endocardite infettiva con successiva rottura delle corde tendinee;
- insufficienza mitralica primaria, causata dal prolasso della valvola mitrale (una protrusione dei lembi valvolari nell'atrio sinistro durante la sistole) o dalla malattia cardiaca reumatica;
- insufficienza mitralica secondaria, causata da infarto miocardico che provoca la dislocazione dei muscoli papillari, impedendo la completa chiusura della valvola.

L'insufficienza mitralica comporta una graduale dilatazione dell'atrio sinistro, causata dal reflusso di sangue durante la fase di sistole ventricolare, e un'ipertrofia eccentrica del ventricolo sinistro, indotta per compensare il reflusso e preservare il volume di eiezione sistolico. Queste conseguenze con il tempo possono evolvere in uno scompenso cardiaco, a causa della diminuzione del volume di eiezione sistolico, e in una possibile endocardite. I pazienti affetti in modo lieve da questa malattia possono essere monitorati e curati con farmaci anticoagulanti; quelli affetti in modo grave, invece, devono essere sottoposti ad interventi di riparazione o sostituzione della valvola [21].

L'*insufficienza aortica* è un'incontinenza della valvola aortica che provoca il reflusso di sangue dall'arteria aorta al ventricolo sinistro durante la fase di diastole ventricolare. Si distingue in:

- insufficienza aortica acuta, causata da un'endocardite infettiva o da una dissezione del tratto ascendente dell'arteria aorta;
- insufficienza aortica cronica, causata da una degenerazione stessa della valvola o da un aneurisma dell'aorta toracica;
- insufficienza aortica cronica infantile causata da un difetto del setto intraventricolare e successivo prolasso della valvola aortica.

Questa malattia comporta un sovraccarico di volume ematico nel ventricolo sinistro. Nel caso di insufficienza aortica acuta, il ventricolo non riesce a dilatarsi in tempo, provocando l'aumento della pressione ventricolare e la conseguente diminuzione della gittata cardiaca. Nel caso di insufficienza aortica cronica, invece, il ventricolo riesce a crescere e dilatarsi, mantenendo i valori della gittata cardiaca; nel tempo, tuttavia, può provocare uno scompenso cardiaco. Il trattamento di questa valvulopatia comprende la riparazione o la sostituzione della valvola [22].

Nel capitolo successivo verranno analizzate le caratteristiche delle protesi valvolari utilizzate oggi negli interventi di sostituzione valvolare, necessari a curare tali patologie.

## Capitolo 3. Valvole cardiache protesiche

Le malattie delle valvole cardiache, analizzate nel capitolo precedente, sono una delle principali cause di morte al mondo e si stima che, nel 2050, gli interventi di valvuloplastica e sostituzione di queste arriveranno ad essere circa 850'000 [23].

Attualmente, per curare queste patologie, si seguono due metodologie di intervento: una più invasiva, che consiste nella sostituzione di valvola con intervento a cuore aperto ('SVR', 'Surgical Valve Replacement'), e una meno invasiva, che permette di inserire la protesi per via transcateretere ('TVR', 'Transcatheter Valve Replacement'). Nel primo caso, le protesi valvolari utilizzate possono essere di tipo meccanico, costruite con materiali artificiali, o di tipo biologico, in tessuto umano ('omologhe') o in tessuto animale ('eterologhe'); nel secondo caso, sono solo di tipo biologico.

Entrambe queste tipologie di valvole presentano delle problematiche che le rendono dei sostituti non ideali: quelle meccaniche necessitano di una terapia anticoagulante a causa del rischio di trombosi; quelle biologiche, invece, spesso risultano non abbastanza resistenti dal punto di vista meccanico ed hanno durata limitata.

### 3.1 Tecniche di intervento per la sostituzione di valvole cardiache

Le tecniche di intervento per la sostituzione delle valvole cardiache non funzionanti sono la 'Surgical Valve Replacement', decisamente più invasiva, e la 'Transcatheteral Valve Replacement', assai meno invasiva e perciò studiata per i pazienti ad alto rischio. L'utilizzo dell'una o dell'altra dipende dalle condizioni del paziente e determina la scelta della valvola protesica da utilizzare.

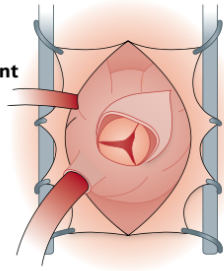
#### 3.1.1 *Surgical Valve Replacement*

Questa procedura inizia ad essere utilizzata negli anni '60 ed è stata ritenuta la migliore tecnica di intervento per curare le stenosi aortiche fino all'inizio degli anni 2000, visti gli eccellenti risultati ottenuti sia nel breve che nel lungo periodo [24]. L'operazione consiste in una iniziale incisione toracica del paziente per avere accesso al cuore, che viene fermato e temporaneamente sostituito da un bypass cuore-polmone, e successivamente nella rimozione e sostituzione chirurgica della valvola malata con una protesi di tipo meccanico o biologico (Figura 3.1) [25].

La tecnica 'SVR' comporta alcuni rischi dovuti alla possibilità di infezioni, infarti e battiti cardiaci irregolari e non è adatta a pazienti anziani o ad alto rischio. Nonostante questo, rimane comunque una procedura ancora oggi utilizzata, soprattutto per i pazienti più giovani, perché permette l'utilizzo di una protesi meccanica, più duratura, per sostituire le valvole danneggiate.

#### **Surgical aortic valve replacement**

- Established in 1952
- Gold standard
- Requires open-heart surgery
- For mechanical and bioprosthetic valves



#### **Transcatheter aortic valve replacement**

- Established in 2002
- Minimally invasive
- Fast recovery
- For bioprosthetic valves

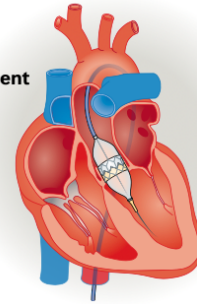


Figura 3.1: Immagini rappresentative delle tecniche di inserimento delle valvole cardiache: a destra si vede l'apertura del cuore per l'inserimento della valvola protesica mediante 'SVR'; a sinistra si vede una sezione trasversale del cuore e l'inserimento della valvola protesica mediante 'TVR'.

### **3.1.2 Transcatheteral Valve Replacement**

La sostituzione di valvola per via transcatetere, introdotta all'inizio degli anni 2000 da Alain Cribier, ha rivoluzionato le tecniche operatorie dei pazienti considerati ad alto rischio o particolarmente anziani, data la possibilità di operare non a cuore aperto ma utilizzando la procedura endovascolare. Ad oggi questa procedura è stata estesa anche al trattamento di pazienti a medio e basso rischio a seguito di studi che indicano dei risultati migliori o simili rispetto all'utilizzo della 'SVR' [24].

L'intervento mediante la tecnica 'TVR' utilizza un catetere per inserire la valvola protesica e può essere condotto in diversi modi, a seconda del tipo di accesso. L'approccio, infatti, può avvenire per via: transfemorale, attraverso l'arteria femorale; transapicale, con una piccola incisione toracica intercostale per arrivare all'arteria che conduce al ventricolo sinistro; transaortica, dalla parte superiore del torace. Una volta arrivato nel sito di sostituzione, il catetere rilascia la valvola protesica che, se necessario, viene aperta e posta nella posizione esatta gonfiando un palloncino (Figura 3.1) [26]; utilizzando invece stent auto-espandibili, non vi è la necessità di gonfiare il pallone poiché il rilascio è spontaneo. Questa tecnica viene anche utilizzata per le operazioni di 'valve-in-valve', in cui è necessario ri-sostituire una protesi biologica che, dopo 10-15 anni, si è degradata.

### **3.2 Le valvole cardiache meccaniche**

Le valvole cardiache meccaniche ('MHVs', 'Mechanical Heart Valves') sono dei sostituti protesici costituiti da uno o più organi mobili, vincolati ad una struttura attaccata alle pareti del cuore, che permettono il flusso di sangue da una parte all'altra. I materiali impiegati per la fabbricazione sono principalmente metalli e carbonio pirolitico, caratterizzati da una elevata durata e un'ottima resistenza agli stress meccanici.

A seconda della loro struttura si suddividono in tre tipologie: a palla ingabbiata, mono-leaflet e bileaflet [27].

### 3.2.1 Protesi meccanica a palla ingabbiata

Nel 1957 il chirurgo Albert Starr e l'ingegnere Lowell Edwards propongono il primo modello di protesi di valvola cardiaca: si tratta di un otturatore realizzato con una sfera di materiale polimerico capace di oscillare all'interno di una gabbia in metacrilato, consentendo il flusso sanguigno solo nella parte periferica (Figura 3.2, C). Il funzionamento di questa protesi si basa sulla capacità della sfera di alzarsi e abbassarsi a seconda della pressione interna alla camera cardiaca: quando il cuore si contrae e la pressione del ventricolo supera quella dell'arteria aortica, per le valvole aortiche, o dell'arteria polmonare, per le valvole polmonare, la sfera si colloca nella parte alta della gabbia, per permettere il flusso di sangue; quando la contrazione termina e la pressione ventricolare diminuisce, la sfera si colloca alla base della gabbia per chiudere l'orifizio, impedendo il reflusso [28]. Questa tecnologia è stata ormai superata e non viene più utilizzata a causa dell'elevata tendenza a creare coaguli e del limitato volume di sangue che lascia passare.

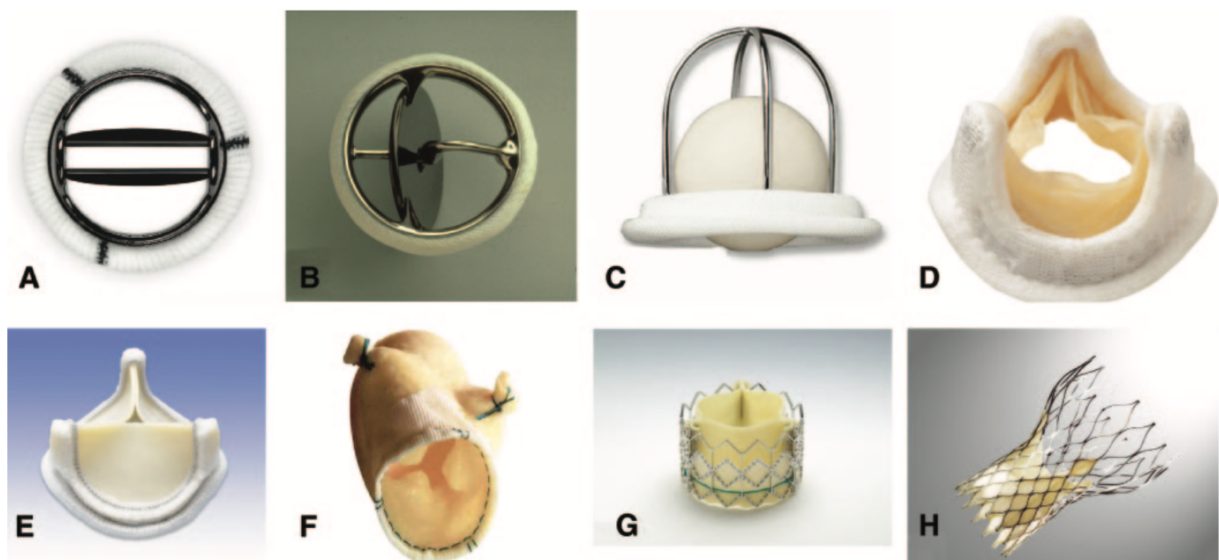


Figura 3.2: Modelli di valvole cardiache protesiche. A, Bileaflet mechanical valve (St Jude); B, monoleaflet mechanical valve (Medtronic Hall); C, caged ball valve (Starr-Edwards); D, stented porcine bioprosthesis (Medtronic Mosaic); E, stented pericardial bioprosthesis (Carpentier-Edwards Magna); F, stentless porcine bioprosthesis (Medtronic Freestyle); G, percutaneous bioprosthesis expanded over a balloon (Edwards Sapien); H, self-expandable percutaneous bioprosthesis (CoreValve).

### *3.2.2 Protesi meccanica mono-leaflet*

Negli anni '70, vista la necessità di un dispositivo in grado di far passare un flusso centrale, viene introdotto un nuovo tipo di protesi: la valvola a disco oscillante Björk-Shiley. Si tratta di un dispositivo costituito da un anello di materiale metallico, rivestito da un tessuto necessario per applicare i punti di sutura tra protesi e parete cardiaca, con un disco in carbonio pirolitico all'interno, inserito in modo tale da poter oscillare con un angolo compreso tra i 60° e gli 80°, creando due orifizi distinti (Figura 3.2, B). Anche in questo caso il funzionamento della protesi è legato alla differenza di pressione che si genera tra ventricolo e arteria, polmonare o aortica, durante la contrazione cardiaca: il disco oscillante si apre quando la pressione ventricolare risulta più alta di quella arteriosa, per consentire il flusso ematico nella parte laterale, e si richiude quando questa si abbassa, per evitare che il sangue rientri dentro.

Successivamente la forma del disco è stata modificata e resa concavo-convessa, in modo tale che potesse oscillare maggiormente e permettere un maggiore flusso di sangue, migliorando le qualità emodinamiche della protesi. Questo minimo cambiamento della geometria della valvola, tuttavia, provocò un aumento nelle incidenze di blocco del dispositivo e di embolia e per questo motivo il suo utilizzo diminuì drasticamente [28].

### *3.2.3 Protesi meccanica bi-leaflet*

Questo modello di protesi è quello più comunemente utilizzato oggi ed è stato introdotto nel mercato nel 1977 dalla St Jude Medical. Il primo modello consisteva in un anello metallico a cui erano incernierate, in corrispondenza del diametro, due emidischi in grado di aprirsi e chiudersi contemporaneamente con un angolo compreso tra i 75° e i 90° (Figura 3.2, A). Successivamente, nel 1993, questo modello venne migliorato dall'aggiunta di una struttura supra-annulare che riveste esternamente l'anello.

Il design di questo dispositivo crea tre diverse aree di passaggio attraverso l'anello: due semicirconferenze laterali e una piccola sezione rettangolare interna. In questo modo la protesi permette di ottenere un flusso centrale e più uniforme, limitando il ristagno di sangue e migliorando le proprietà emodinamiche della valvola [28].

### *3.2.4 Problemi delle valvole cardiache meccaniche*

I problemi legati alle protesi di tipo meccanico sono principalmente dovuti alla possibilità di creare dei trombi, masse solide costituite da fibrina e contenenti piastrine, globuli bianchi e rossi, che si formano per coagulazione del sangue all'interno di un sistema cardiovascolare non interrotto, in particolare nei primi sei mesi dopo l'intervento.

Le cause possono essere ricondotte al design di questi dispositivi, che non riesce ad imitare perfettamente la struttura delle valvole biologiche, e alla loro superficie trombogenica che, in alcuni casi, possono produrre uno stress elevato in corrispondenza dei punti di cerniera e dei getti di reflusso che rischiano di danneggiare i globuli rossi del sangue, attivando l'azione delle piastrine e generando dei trombi [24].

Per questo motivo i pazienti che vengono operati con questa tipologia devono seguire delle terapie di farmaci antitrombogenici e queste valvole non sono indicate per pazienti sportivi, giovani o donne in età fertile che desiderano avere figli [29].

### **3.3 Le valvole cardiache biologiche**

Le protesi di tipo biologico ('Biological Heart Valves', 'BHV's') sono, ad oggi, il dispositivo più usato per gli interventi di sostituzione di valvole cardiache danneggiate e si stima che, su 300'000 operazioni annue nel mondo, nel 40-60% dei casi siano stati impiegati sostituti di questo tipo, principalmente ottenuti da valvole porcine o bovine trattate con glutaraldeide [23]. Rispetto alle protesi di tipo meccanico, infatti, le valvole cardiache biologiche sono più adatte a pazienti anziani o ad alto rischio, in quanto possono essere inserite con la tecnica 'TAVR' in modo meno invasivo, e non richiedono una lunga terapia di farmaci antitrombogenici successiva all'intervento, grazie alle migliori proprietà emodinamiche e ad una sezione fisiologica dell'orifizio che permette un flusso sanguigno più regolare.

In base al tipo di tessuto di cui sono composte, le protesi cardiache biologiche si suddividono in due principali categorie: valvole in tessuto umano, che a loro volta si distinguono in omologhe, valvole umane prelevate da espanti, e autologhe, utilizzate nella procedura di Ross; valvole in tessuto animale, porcine o bovine, che possono essere 'stented', montate su un supporto, o 'non-stented', senza supporto.

#### *3.3.1 Protesi biologiche in tessuto umano*

Questa tipologia di valvola protesica biologica è costituita da tessuto umano e si distingue in due diverse categorie: omologhe, composte da tessuto umano diverso da quello del paziente ricevente, e autologhe, prelevate dallo stesso paziente.

Le protesi biologiche omologhe, ottenute da espanti di valvole cardiache umane, iniziano ad essere impiegate negli interventi di sostituzione all'inizio degli anni '60 come alternativa ai dispositivi di tipo meccanico. Queste valvole, avendo già le caratteristiche anatomiche e la composizione materiale uguali a quelle da sostituire, offrono proprietà emodinamiche migliori e una minore tendenza a creare trombi rispetto alle precedenti ma, dal punto di vista meccanico, risultano meno

resistenti e si stima che solo il 30-40% di queste protesi sia ancora funzionale dopo 20 anni [23]. Il processo di conservazione di queste valvole, inoltre, risulta molto complicato e prevede o l'utilizzo di antibiotici, per la sterilizzazione, e il mantenimento a 4°C allo stato umido, o la crioconservazione. Nonostante queste procedure abbiano subito importanti miglioramenti, le protesi omologhe spesso sono soggette a danneggiamento delle superfici e della struttura, provocando problemi di infiammazione e deterioramento successivi all'intervento [24].

Le protesi biologiche autologhe, invece, sono prelevate dallo stesso paziente e vengono utilizzate per la prima volta dal chirurgo Ross, nel 1967. La procedura di Ross consiste, infatti, nel sostituire la valvola cardiaca danneggiata, solitamente si tratta di quella aortica, con quella polmonare dello stesso paziente che viene, a sua volta, cambiata con una protesi omologa. Questa terapia è stata introdotta per curare giovani affetti da problemi alle valvole cardiache senza doverli poi obbligare a terapie anticoagulanti a vita, come succede nel caso di sostituzione con le protesi meccaniche, e migliorando la loro qualità della vita. Queste protesi autologhe, inoltre, essendo costituite dalle stesse cellule dell'individuo ricevente, hanno ottime qualità rigenerative e di rimodellamento, che permettono di ottenere un profilo emodinamico molto simile a quello fisiologico. Tuttavia, data l'alta complessità dell'intervento, questo tipo di valvole omologhe non viene molto impiegato [24].

### *3.3.2 Protesi biologiche in tessuto animale*

Le protesi biologiche eterologhe, costituite dalle valvole cardiache prelevate intatte da suini o bovini e trattate con glutaraldeide, vengono introdotte negli anni '70 per sopperire alla scarsità di donatori di tessuti e organi umani e alle difficoltà di mantenimento delle valvole omologhe.

Le valvole eterologhe di prima generazione sono principalmente di tipo porcino, in quanto più simili a quelle umane. Le prime prove di utilizzo, tuttavia, mostrano problemi di denaturazione delle fibre di collagene e di calcificazione precoce a causa della risposta immunogenica del paziente al materiale eterologo, che diminuisce notevolmente la durabilità di questi dispositivi. Per questo motivo, nel 1968, il chirurgo francese Alain Carpentier introduce un pretrattamento chimico dei tessuti animali con la glutaraldeide ( $\text{CHO}[\text{CH}_2]_3\text{CHO}$ ), in grado di creare dei legami crociati all'interno delle fibre di collagene proteggendo i lembi delle valvole dalla denaturazione e rendendo il tessuto immunologicamente inattivo grazie al mascheramento degli antigeni.

Negli stessi anni le valvole animali iniziano ad essere montate su dei supporti rigidi, chiamati 'stent', in modo da mantenere la struttura tridimensionale e semplificare le tecniche di impianto (Figura 3.2, E). Nonostante questi accorgimenti, a causa dei problemi di pressione legati alla geometria fissa della valvola suina e alla rigidità imposta dallo 'stent', si studiano nuovi materiali per produrre questo tipo di protesi e nel 1971 Marian Ionescu propone una valvola protesica in

tessuto pericardico bovino trattato con glutaraldeide e montato su un supporto flessibile ('Ionescu-Shiley valve'). Questo nuovo modello, completamente costruito dall'uomo, permette una configurazione anatomica ottimizzata e supera la geometria fissa delle valvole animali, offrendo un'apertura dei lembi più simmetrica. Dopo 5 anni dai primi interventi, tuttavia, si iniziano a notare dei problemi di deterioramento dovuti alla troppa libertà di movimento delle valvole data dai supporti uniti in modo troppo lasco e, per questo motivo, si sceglie di non utilizzarle più. In seguito, vengono introdotti diversi tipi di 'stent', più sottili e flessibili, che permettono l'inserimento di strutture sovra-annulari, in modo da poter utilizzare protesi più grandi.

Nel 1986 Tirone David propone dei modelli di valvole eterologhe prive di supporto che mostrano ottime proprietà emodinamiche ma, in seguito, si rivelano poco durevoli. Nonostante questo fallimento iniziale, le protesi 'stentless' suscitano molto interesse e negli anni 2000, grazie all'avvento delle tecniche di sostituzione per via transcatetere, iniziano ad essere sviluppati modelli 'self-expandable' e 'balloon-expandable' (Figura 3.2, F G H), che non necessitano di supporti per mantenere la struttura tridimensionale [28].

### *3.3.3 Problemi delle valvole cardiache biologiche*

Le protesi di tipo biologico sono soggette a problemi di tipo strutturale ('SVD', 'Structural Valve Deterioration'): i tessuti delle valvole tendono a deteriorarsi, diminuendo di molto la durabilità di questi dispositivi. Dopo 10-15 anni dall'intervento di sostituzione, infatti, i lembi iniziano a calcificare e diminuiscono di molto le proprietà meccaniche ed emodinamiche delle valvole. Studi in-vitro mostrano che la glutaraldeide, necessaria per ridurre l'antigenicità e assicurare una stabilità chimica, stimola un flusso dose-dipendente di ioni calcio dagli spazi extra-cellulari e l'aumento degli ioni fosfato, che entrano all'interno delle cellule trattate dei tessuti delle valvole, formando dei cristalli. Ricerche recenti [29] suggeriscono che questo processo di deterioramento possa includere, oltre ad un meccanismo passivo di degenerazione, anche uno attivo di rigetto immunologico o di arteriosclerosi. È possibile, infatti, che un residuo di antigeni animali, resistenti al trattamento con glutaraldeide, stimoli risposte umorali e immunologiche, portando alla mineralizzazione del tessuto. Dall'altra parte, nuovi studi [29] dimostrano che ci sia un collegamento tra la degenerazione strutturale delle protesi biologiche e numerosi fattori di rischio arteriosclerotico, come l'ipercolesteromia, il diabete, sindromi metaboliche o il fumo. Si pensa, infatti, che l'infiltrazione di lipoproteine a bassa densità all'interno del tessuto protesico e la loro ossidazione possano provocare un processo infiammatorio, stimolando la degenerazione della protesi.

Un'altra problematica propria delle valvole biologiche è la mancata corrispondenza della valvola con l'anatomia cardiaca del paziente ('PPM', 'Patient-Prosthesis Mismatch') [29].

In alcuni casi, infatti, l'area dell'orifizio dove scorre il flusso ematico risulta insufficiente per le necessità dell'individuo, causando un gradiente di pressione eccessivo. Questo fenomeno può avvenire a causa di una adesione imperfetta del supporto della valvola alle pareti cardiache, dovuta ad un'apertura non ottimale del dispositivo durante il suo inserimento.

Per limitare questa azione degenerativa, è possibile somministrare farmaci anti-mineralizzanti ma, data la breve durabilità del dispositivo, questo tipo di protesi non è indicata per i pazienti più giovani.

### **3.4 Confronto tra protesi meccaniche e biologiche**

La scelta della valvola più adatta risulta essere molto complicata ed è necessario valutare tutti le possibili indicazioni e controindicazioni legate all'età, all'aspettativa di vita, alle preferenze, al rischio tromboembolico e alla storia clinica del paziente. Durante il congresso dell'European Society of Cardiology del 2021 [30] sono stati indicati i principali casi in cui è preferibile utilizzare l'una o l'altra tipologia di valvole protesiche e si è notato che il peso dato dall'età del paziente nella scelta è stato notevolmente ridotto, in favore delle preferenze dell'individuo.

Le linee guida europee raccomandano [30] l'utilizzo delle protesi meccaniche, 'MHVs', per pazienti con un alto rischio di sviluppare una degenerazione valvolare ('SVD') o che hanno già subito un intervento con questo tipo di valvola e stanno seguendo una terapia anticoagulante e per pazienti sotto i 60 anni in caso di sostituzione della valvola aortica o sotto i 65 anni in caso di sostituzione della valvola mitralica. Le protesi biologiche, 'BHV's', sono invece preferite nel caso di pazienti affetti da problemi di coagulazione o soggetti ad un alto rischio di sanguinamento, come le donne fertili che desiderano avere figli, e in caso di individui sopra i 65 anni per le protesi in posizione aortica o sopra i 70 anni per le protesi in posizione mitralica [30].

Nonostante entrambe le tipologie di valvole prostetiche si siano evolute e abbiano migliorato le loro proprietà meccaniche ed emodinamiche, le problematiche legate alle terapie antitrombogeniche, per quelle meccaniche, e alla durabilità breve, per quelle biologiche, non le rendono i sostituti protesici ideali, soprattutto per i pazienti più giovani.

## Capitolo 4. Le valvole protesiche ingegnerizzate

I progressi ottenuti nel campo delle valvole protesiche meccaniche e biologiche, analizzati nel capitolo precedente, non sono riusciti a replicare in modo ottimale tutte le caratteristiche proprie delle valvole cardiache umane; per questo motivo la ricerca si è rivolta ad un nuovo tipo di sostituti protesici in grado di rimodellarsi, rigenerarsi e crescere in modo autonomo: le valvole cardiache ingegnerizzate (*Tissue engineered heart valves, TEHVs*).

L'approccio solitamente utilizzato per la produzione di questi dispositivi ingegnerizzati segue il paradigma classico dell'ingegneria tissutale, esposto nel primo capitolo, e prevede:

- l'espansione delle cellule scelte;
- la produzione di uno scaffold poroso che riproduca la forma della valvola;
- il seeding cellulare;
- la stimolazione meccanica e biochimica della struttura all'interno di un bioreattore per il condizionamento del costrutto ingegnerizzato.

In alternativa, alcuni studi *in vivo* hanno seguito un approccio diverso: inizialmente lo scaffold della valvola viene impiantato per via intraperitoneale, causando la risposta del sistema immunitario ad un corpo estraneo e la conseguente formazione di matrice extracellulare; successivamente la struttura ottenuta viene impiantata nel cuore come valvola sostitutiva [31]. Questo metodo, tuttavia, non permette il controllo del fenotipo delle cellule che popolano lo scaffold, necessario per ottenere il corretto rimodellamento della struttura valvolare.

Anche in questo capitolo verranno trattate solamente le protesi valvolari ingegnerizzate utilizzate per sostituire la valvola aortica e quella mitralica, in quanto le più soggette a fenomeni di degradazione, come analizzato nel Capitolo 2.

### 4.1 Le cellule

Il successo delle protesi valvolari ingegnerizzate è fortemente influenzato dal tipo di cellule scelte per essere seminate sulla matrice tridimensionale in modo tale da ricreare le caratteristiche fisiologiche proprie delle valvole cardiache. Questo primo passaggio, proprio delle tecniche dell'ingegneria tissutale, risulta fondamentale per la corretta formazione della matrice extracellulare (*Extra-cellular Matrix, ECM*) e, di conseguenza, della forma e della flessibilità dei lembi delle valvole [32].

#### 4.1.1 Il ruolo delle cellule nella ECM

La ECM presente nella valvola aortica e mitrale ha una struttura tri laminare (Figura 4.1) [33]:

- la membrana sierosa, posta vicino alla superficie di deflusso di sangue, è costituita da fibre di collagene allineate tra loro per dare resistenza alla valvola;
- la membrana spongiosa, al centro, è considerata il nucleo del tessuto connettivo lasso ricco di proteoglicani (PGs) e di glicosamminoglicani (GAGs), che trasmettono i movimenti degli strati adiacenti;
- la membrana ventricolare, situata nella parte opposta rispetto alla fibrosa, è costituita da numerose fibre di elastina orientate in modo radiale, responsabili dell'allungamento e dell'accorciamento del tessuto durante le fasi del ciclo cardiaco.

Questi tre strati sono popolati da cellule valvolari interstiziali (*Valvular Interstitial Cells, VICs*) e racchiusi tra due strati di cellule valvolari endoteliali (*Valvular Endothelial Cells, VECs*) (vedi Figura 4.1) [32]. Le prime, fisiologicamente simili ai fibroblasti, sono capaci di rispondere agli stimoli biochimici e biofisici dei tessuti circostanti, alterando la loro rigidità e rimodellando le componenti della ECM. Le seconde, invece, costituiscono una barriera tra il flusso sanguigno e il tessuto valvolare interno, riparando quest'ultimo dagli stress causati dall'emodinamica e da eventuali infiltrazioni di cellule infiammatorie.

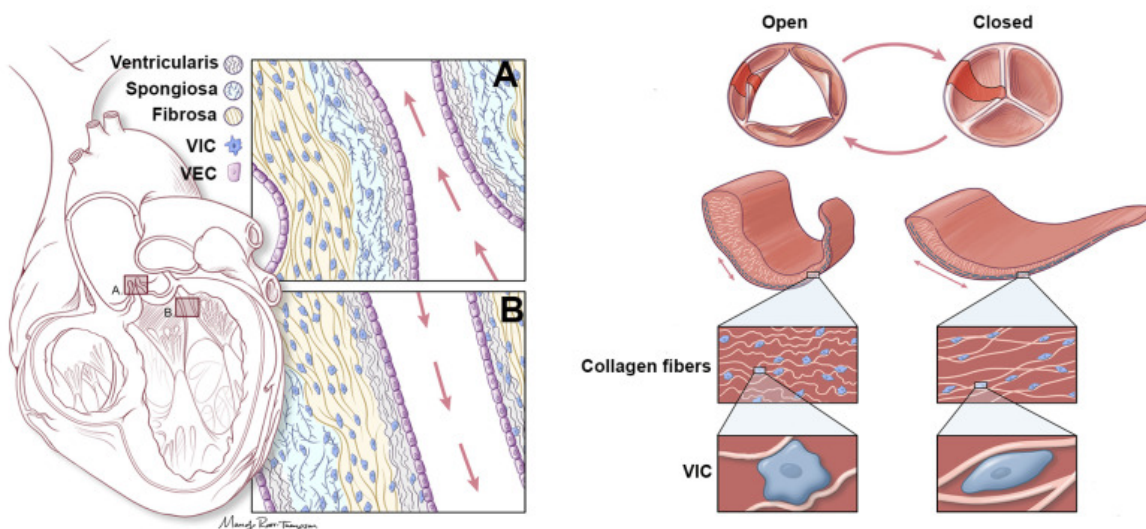


Figura 4.1. L'immagine rappresenta, nella parte sinistra, la ECM della valvola aortica (A) e mitrale (B) con i tre diversi strati; nella parte destra, la posizione aperta e chiusa della valvola aortica e di come la conformazione delle VIC cambi nel corso delle fasi di apertura e chiusura.

Il ruolo principale della ECM delle valvole cardiache, quindi, è quello di fornire le proprietà biomeccaniche necessarie al corretto funzionamento di queste strutture e, per questo motivo, viene

costantemente rimodellata per adeguarsi agli stress meccanici ai quali le valvole sono sottoposte [31]. Durante un ciclo cardiaco, infatti, i lembi valvolari compiono dei movimenti passivi che li rendono soggetti a: tensioni, quando si trovano in posizione di chiusura; flessioni, quando compiono i movimenti di apertura e di chiusura della valvola; sforzi di taglio, nel contatto con il flusso sanguigno in posizione di apertura.

Oltre a questa funzione di supporto strutturale e funzionale, l'ECM fornisce anche segnali, sia meccanici che umorali, in grado di favorire numerose funzioni delle cellule, tra cui quella dello sviluppo cellulare mediante il controllo dei fattori di crescita [33].

#### 4.1.2 Tipologie di cellule utilizzate *in vitro*

Le cellule utilizzate per il seeding *in vitro* di scaffold sintetici e biologici possono avere sia origine animale che umana, come analizzato nel primo capitolo, e si distinguono in: cellule di derivazione vascolare, cellule progenitrici e staminali.

I *miofibroblasti di derivazione cellulare* e le *cellule endoteliali*, prelevate dalla vena safena, hanno una particolare capacità di produzione di ECM e, per questo motivo, risultano molto adatte per queste applicazioni. Il loro utilizzo, tuttavia, è limitato dalla disponibilità ridotta e dalla necessità di incidere una vena intatta per prelevarle, che potrebbe essere un problema per pazienti affetti da malattie vascolari [34].

Le *cellule progenitrici*, derivate dal midollo osseo o dal sangue del cordone ombelicale, e le *cellule progenitrici endoteliali* (*Endothelial progenitor cells, EPCs*), invece, non necessitano di un ulteriore intervento chirurgico per essere prelevate e possono compiere sia la funzione endoteliale che quella interstiziale [31]. Le EPCs sono considerate la fonte principale di cellule endoteliali mature e risultano avere un ruolo importante nella formazione dello strato di rivestimento valvolare, mantenendo le proprietà di antitrombogenicità e fornendo elasticità all'endotelio [32].

Le *cellule staminali mesenchimali* (*Mesenchymal stem cells, MSCs*), prelevate dal midollo osseo o dal sangue del cordone ombelicale, sono particolarmente simili alle cellule vascolari interstiziali e possono differenziarsi in cellule endoteliali, fibroblasti, miofibroblasti e cellule del tessuto muscolare liscio. Questo tipo di staminali risulta particolarmente adatto all'applicazione delle valvole cardiache ingegnerizzate in quanto è facile da ottenere e da far proliferare ed è possibile guidarne la differenziazione attraverso l'applicazione di stimoli chimici e del microambiente adatto [34]. Ad esempio, una valvola cardiaca ingegnerizzata, costituita da MSCs applicate ad uno scaffold polimerico biorassorbibile e posta all'interno di un bioreattore a flusso pulsatile, ha mostrato un tessuto provvisto di ECM, di una superficie omogenea e di proteine mature (collagene di tipo I e III), con delle proprietà meccaniche simili a quelle delle valvole native [32].

Alcuni studi, inoltre, hanno evidenziato le proprietà antitrombogeniche e immunosoppressive delle MSCs [31].

## 4.2 Lo scaffold

Lo scaffold è la matrice artificiale porosa che fornisce la struttura tridimensionale e, insieme all'azione dei bioreattori, le proprietà biomeccaniche alle valvole cardiache ingegnerizzate. La capacità di ricreare fin da subito i movimenti meccanici propri delle valvole native, infatti, è fondamentale per il corretto funzionamento delle protesi ed è necessario trovare dei biomateriali in grado di soddisfare i requisiti meccanici propri di queste strutture.

Come analizzato nel primo capitolo, inoltre, lo scaffold ha l'importante doppio compito di inviare stimoli meccanici alle cellule per la sintesi della ECM e contemporaneamente di biodegradarsi in modo sincrono. I biomateriali utilizzati per la fabbricazione di questa struttura, quindi, devono essere biodegradabili e biorisorbibili in modo controllato.

Tutti gli scaffold progettati per le TEHVs devono anche soddisfare i requisiti di biocompatibilità e sterilizzabilità necessari per il successivo impianto *in vivo* nel paziente.

### 4.2.1 I requisiti meccanici

Al fine di comprendere meglio le proprietà meccaniche delle valvole cardiache, è importante analizzare la microstruttura del tessuto che le costituisce, che caratterizza le relazioni tra stress e deformazione. I lembi delle valvole cardiache sono principalmente composti da [35]:

- fibre di collagene (tipo I (74%), tipo III (24%) e tipo V (2%)), che costituiscono circa il 50% dei lembi delle valvole e forniscono resistenza meccanica alla trazione limitando l'estensibilità dei tessuti;
- fibre di elastina, altamente estensibili ma poco rigide, responsabili del ritorno alla conformazione pre-deformazione dopo l'apertura della valvola;
- proteoglicani, caratterizzati da catene laterali di glicosaminoglicani (GAGs) responsabili della produzione di una sostanza simile ad un gel, che consente l'interazione tra molecole di ECM e la conservazione dei fattori di crescita.

All'interno del tessuto sono presenti anche numerose molecole di acqua, che costituiscono circa il 60-70% del peso delle fibre di collagene e sono strettamente legate alla rete fibrosa, rendendo la struttura quasi incompressibile [36]. L'acqua, inoltre, è ritenuta responsabile del comportamento viscoelastico del tessuto valvolare che causa la dipendenza delle relazioni tra stress e deformazione dalla velocità di deformazione [36].

La struttura a tre strati della parete delle valvole garantisce sia l'elevata resistenza alla trazione e alla pressione, che la facilità di flessione necessaria per la normale apertura della valvola (Figura 4.2, a, c e d). È possibile constatare che l'allineamento in direzione circonferenziale del collagene nella fibrosa dell'ECM aumenta la rigidità e la resistenza in tale direzione; l'allineamento in direzione radiale della elastina nella membrana ventricolare, invece, aumenta l'elasticità in tale direzione [37].

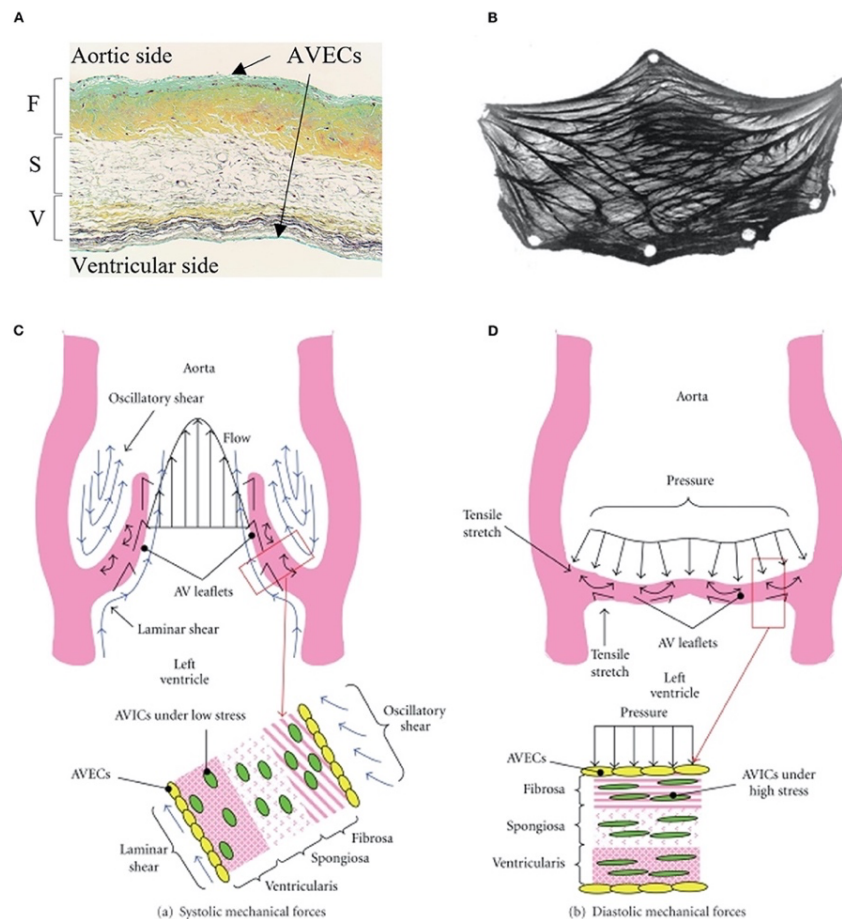


Figura 4.2. L'immagine rappresenta la struttura macroscopica e microscopica del tessuto della valvola aortica: sezione istologica del lembo della valvola aortica (a); struttura e disposizione delle fibre in un lembo di valvola (b); schema dello stress sperimentato dai lembi della valvola aortica e dalle cellule valvolari durante la sistole (c) e durante la diastole (d).

Ogni anno le valvole cardiache compiono in media 40 milioni di movimenti di apertura e chiusura e operano in una condizione di carico di trazione, di taglio e di flessione che richiede specifiche proprietà meccaniche (Figura 4.2, c e d). Durante ogni ciclo cardiaco, infatti, il sangue scorre ad una velocità di  $1.35 \pm 0.35$  m/s, attraverso l'aorta, e di  $0.89 \pm 0.15$  m/s, attraverso la valvola mitrale, causando un possibile stress da taglio dovuto alla frizione con i lembi delle valvole che raggiunge i  $20 \text{ dynes/cm}^2$  sulla superficie dell'aorta, durante la sistole [38].

La pressione transvalvolare, invece, risulta pari a 80 mmHg, per la valvola aortica, e a 120 mmHg, per la valvola mitrale, ed è supportata dalla membrana fibrosa dei lembi della valvola. I valori del picco di tensione studiati in generale sul tessuto valvolare sono stati calcolati in un range tra i 50 e i 100 N/m [38].

Alcuni studi hanno analizzato la differenza tra le proprietà meccaniche della valvola aortica nella direzione circonferenziale e radiale a causa del diverso orientamento delle fibre di collagene ed elastina all'interno della valvola. In direzione circonferenziale il modulo elastico, la sollecitazione ultima e la deformazione ultima risultano rispettivamente pari a  $15,34 \pm 3,84$  MPa,  $1,74 \pm 0,29$  MPa e  $18,35 \pm 7,61\%$ ; in direzione radiale, invece, sono rispettivamente uguali a  $1,98 \pm 0,15$  MPa,  $0,32 \pm 0,04$  MPa e  $23,92 \pm 4,87\%$  [37].

Questi valori possono essere utilizzati per definire degli intervalli di target per gli stress e le tensioni che devono essere sostenute dalle TEHVs e per trovare biomateriali con proprietà meccaniche adatte a funzionare a tali livelli di stress e deformazione.

#### 4.2.2 Le valvole decellularizzate

A causa della poca disponibilità di valvole di tipo allogenico, le principali valvole cardiache decellularizzate utilizzate per le applicazioni di ingegneria tessutale hanno origine xenogenica e provengono da bovini, ovini e suini (Figura 4.3). I processi di decellularizzazione, compiuti per conferire immunocompatibilità alla matrice, permettono di mantenere intatte le proprietà di molte molecole dell'ECM e la struttura stessa delle valvole, offrendo un vantaggio rispetto agli scaffold fabbricati artificialmente.

Le seguenti tecniche sono utilizzate per ottenere scaffold decellularizzati dalle valvole cardiache xenogeniche.

I *protocolli fisici* prevedono di sottoporre le valvole a stimoli fisici; ad esempio, cicli di congelamento e scongelamento sono in grado di causare la lisi cellulare per la formazione di cristalli di ghiaccio. In alcuni casi queste tecniche non vengono sfruttate perché rischiano di danneggiare la struttura della matrice extracellulare [39].

I *protocolli chimici* prevedono l'utilizzo di un agente chimico, che può essere:

- non ionico, in grado di separare i legami lipidici ma non quelli tra proteine, portando alla rottura delle membrane cellulari e al mantenimento dell'ECM con alcuni residui cellulari (ad esempio, il sodio dodecilsolfato ( $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$ ));
- ionico, in grado sia di eliminare le membrane cellulari sia di denaturare le proteine dell'ECM, rimuovendo completamente il materiale citoplasmatico e cellulare;

- zwitterionico, caratterizzato da proprietà sia dei detergenti ionici che di quelli non ionici e da una carica neutra [39].

I *protocolli biologici* sfruttano due principali tipi di enzimi: la nucleasi, per catalizzare la degradazione di DNA e RNA cellulari; la proteasi, per catalizzare la degradazione di proteine. La combinazione dei due enzimi porta sia alla degradazione delle cellule che delle proteine dell'ECM; quindi, è necessario calibrare la loro azione in modo corretto per minimizzare i danni alla matrice [39].

Gli scaffold decellularizzati, ottenuti dopo l'applicazione di queste procedure, possono essere ulteriormente trattati con crosslinkers, come glutaraldeide ( $C_5H_8O_2$ , GA) o pentagalloilglucosio ( $C_{41}H_{32}O_{26}$ , PGG), per diminuire l'antigenicità e stabilizzare le fibre di collagene della matrice. È stato evidenziato come, rispetto ai lembi valvolari trattati con GA, quelli trattati con PGG mantengano meglio le proprietà meccaniche biassiali e come, *in vivo*, supportino il ripopolamento da parte dei fibroblasti e il conseguente rimodellamento della matrice [37]. Per evitare che l'utilizzo di questi crosslinkers riduca la porosità degli scaffold, diminuendo la dimensione dei pori e rendendo l'ECM più rigida, è possibile trattare le matrici decellularizzate con acido acetico e, successivamente, rivestire la struttura con Arg-Gly-Asp ( $C_{12}H_{22}N_6O_6$ ) per aumentare l'adesione cellulare [37].

Nonostante questa particolare tipologia di scaffold sia già costituita da ECM, rimane sempre valido il principio su cui si basa l'ingegneria tissutale, ossia il riassorbimento della struttura esistente e sintesi di una nuova matrice da parte delle cellule seminate che, idealmente, dovrebbe portare alla creazione di un tessuto interamente autologo ed eliminare la risposta immunologica. È importante sottolineare come la velocità di degradazione dipenda da numerosi fattori, tra i quali risultano le tecniche di decellularizzazione e i crosslinkers utilizzati, che possono danneggiare l'ECM prima dell'impianto effettivo e portare ad effetti indesiderati. Un altro problema riguardante l'utilizzo di questi scaffold è la possibilità che alcuni residui cellulari rimangano sulla superficie della valvola e causino una risposta immunogenica da parte dell'organismo ricevente.

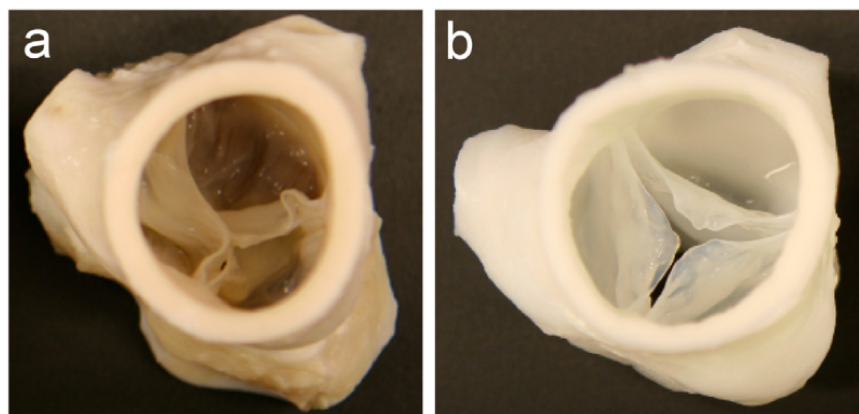


Figura 4.3. L'immagine rappresenta una valvola aortica porcina nativa, a sinistra, e decellularizzata, a destra.

#### 4.2.3 Gli scaffold artificiali

La fabbricazione di scaffold artificiali, in grado di riprodurre la struttura e la funzione di una valvola nativa, propone una valida alternativa alle matrici decellularizzate. È possibile, infatti, definire la porosità e le proprietà meccaniche di queste strutture e, in particolare, controllarne la fase di degradazione in modo molto più accurato rispetto alle valvole decellularizzate. Per questo tipo di scaffold vengono utilizzati materiali polimerici sia naturali, perfettamente biocompatibili ma caratterizzati da non adeguate proprietà meccaniche, sia sintetici, più resistenti a livello meccanico ma meno capaci di interagire con altre cellule.

Durante la progettazione e la fabbricazione di questa tipologia di scaffold è necessario considerare i seguenti aspetti [40]:

- la completa biocompatibilità del materiale scelto;
- la capacità di compiere la funzione della valvola che andranno a sostituire;
- la velocità di degradazione molto simile a quella della crescita del tessuto, in modo che il biorisorbimento e la sintesi di una nuova matrice siano coordinati;
- la morfologia della superficie in grado di stimolare l'adesione e la proliferazione cellulare.

##### 4.2.3.1 I polimeri naturali

Il *collagene* è la proteina strutturale più importante nei tessuti umani ed è costituita da molecole di tropocollagene, caratterizzate da una tripla elica di catene polipeptidiche primarie (Tabella 4.1.a) stabilizzata da legami di idrogeno inter-filamento tra i gruppi -CO e -NH adiacenti. Le tre catene polipeptidiche sono composte da una sequenza di tre amminoacidi di cui i primi due sono glicina ( $C_2H_5NO_2$ ) e prolina ( $C_5H_9NO_2$ ) oppure glicina e idrossiprolina ( $C_5H_9NO_3$ ) e il terzo un

amminoacido diverso da glicina, prolina e idrossiprolina (Glicina-Prolina-X oppure Glicina-Idrossiprolina-X).

Tra i ventotto tipi di collagene esistenti, distinti in base alla diversa disposizione delle triple eliche, il più comune è il collagene di tipo I, presente nella ECM di tessuti molli e duri [41]. Questo tipo di collagene è un componente fondamentale anche delle valvole cardiache, come analizzato nei paragrafi precedenti, e il suo utilizzo nella fabbricazione degli scaffold permette di mantenerne le particolari proprietà meccaniche e facilitare l'adesione tra le cellule valvolari e l'ECM. Solitamente viene utilizzato sotto forma di gel, ottenuto dalla purificazione di collagene di tipo I estratto dalla pelle o dai tendini che viene successivamente reso neutro, dando inizio al processo di fibrillogenesi [42]. Le proprietà meccaniche di questo materiale, in generale, risultano inferiori rispetto a quelle dell'ECM delle valvole native anche a causa della bassa concentrazione delle fibre di collagene stesse all'interno del gel. Una concentrazione maggiore potrebbe rendere il materiale più resistente ma, allo stesso tempo, una microstruttura troppo densa potrebbe causare problemi nella diffusione di ossigeno e nutrimento alle cellule dopo la fase del *seeding* cellulare [42].

La *fibrina* (Tabella 4.1.c), una proteina fibrosa alla base del processo di riparazione dei tessuti, si trova nel plasma sotto forma di molecola di fibrinogeno che inizia la polimerizzazione spontanea in presenza dell'enzima catalizzatore trombina e di ioni calcio. È possibile modificare alcune proprietà del polimero, come la lunghezza e lo spessore delle fibre o la grandezza dei pori, cambiando le condizioni di polimerizzazione. Questo biopolimero è molto sfruttato nelle tecniche di ingegneria tissutale per le sue proprietà di biocompatibilità e biorisorbibilità e, in particolare, per la capacità di incorporare al suo interno cellule e mediatori cellulari (ad esempio fattori di crescita), dando la possibilità di ricreare un microambiente specifico [43]. Come per il collagene, anche la fibrina offre una bassa resistenza meccanica e non risulta adatta a fabbricare scaffold soggetti a sforzi meccanici simili a quelli delle valvole cardiache. Un'altra limitazione nell'uso di questo biopolimero è la possibilità di restringimento dei gel di fibrina dovuto alle forze contrattili, con conseguente insufficienza valvolare [42].

L'*acido ialuronico* ((C<sub>14</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>11</sub>)<sub>n</sub>) (Tabella 4.1.e), un polisaccaride lineare naturale presente nell'ECM di molti tessuti, è composto dall'alternanza di residui di N-acetil-D-glucosamina e di acido D-glucuronico. Questa macromolecola naturale, oltre ad essere biocompatibile e poco immunogenica, ha particolari proprietà di riparazione dei tessuti e di trasporto di cellule ed è utilizzata nelle applicazioni di ingegneria tissutale sotto forma di idrogel. È possibile, infatti, modificare la molecola per ottenere un gel: inizialmente il gruppo carbossilico legato a ciascuna unità di disaccaride viene ionizzato a pH fisiologico (– COO<sup>-</sup>); successivamente la macromolecola di acido ialuronico, ora ricca di cariche negative, risulta capace di attrarre ioni positivi, assorbire

acqua ed espandere il suo volume fino a 1000 volte a causa del gradiente osmotico, formando una sostanza simile ad un gel [42]. Questo processo di idratazione della molecola diminuisce la velocità di degradazione del polimero e ne aumenta le proprietà di resistenza meccanica.

La *gelatina* (Tabella 4.1.b), derivante dell'idrolisi parziale del collagene, viene spesso utilizzata come gel per il trasporto di molecole o fattori di crescita e per la fabbricazione di scaffold. La gelatina metacrilata (GelMA), sintetizzata mediante la reazione di anidride metacrilata con una soluzione di gelatina, può essere trasformata in idrogel mediante l'esposizione ai raggi solari e utilizzata per produrre scaffold porosi [42].

Gli *alginati* (Tabella 4.1.d), polisaccaridi anionici derivati principalmente dalla parete cellulare delle alghe brune, sono sfruttati nelle applicazioni biomediche per le loro capacità di incapsulare cellule e trasportare farmaci. Sono composti dalla ripetizione o alternanza di monomeri di acido  $\beta$ -D-mannuronico e di acido  $\alpha$ -L-glucuronico; il rapporto tra queste due componenti caratterizza le proprietà meccaniche degli alginati [42]. È possibile utilizzare tali polimeri sotto forma di idrogel per la fabbricazione di scaffold biodegradabili che, tuttavia, come la maggior parte degli scaffold in materiali naturali, non offrono una particolare resistenza agli stress e alle tensioni.

Il *chitosano* (Tabella 4.1.f), un derivato deacetilato della chitina  $((C_8H_{13}O_5N)_n)$ , è un polisaccaride lineare estratto dall'esoscheletro dei crostacei mediante demineralizzazione. Ha una struttura molto simile a quella dei GAGs della ECM e, nonostante non sia presente nel corpo umano, può essere idrolizzato da alcuni enzimi in frammenti non tossici, rendendo la molecola un polimero biodegradabile e biocompatibile. Viene utilizzato sotto forma di idrogel per la produzione di scaffold che risultano avere proprietà meccaniche adatte alla produzione di TEHVs e una velocità di degradazione controllabile [42].


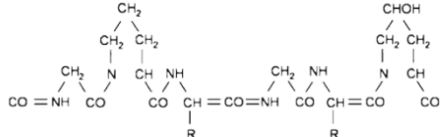
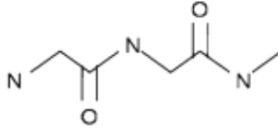
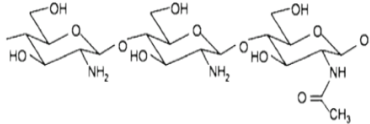
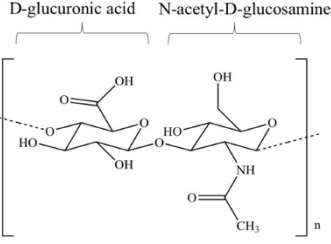
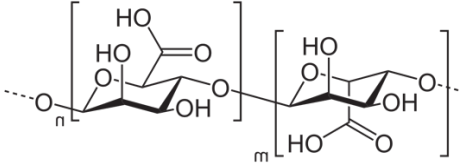
<b>a.</b> <b>Catena peptidica del tropocollagene</b>	 Glycine Proline Hydroxyproline	<b>b. Gelatina</b>	
<b>c.</b> <b>Fibrina</b>		<b>d. Chitosano</b>	
<b>e.</b> <b>Acido Ialuronico</b>	 D-glucuronic acid    N-acetyl-D-glucosamine	<b>f.</b> <b>Acido alginico</b>	

Tabella 4.1. La tabella mostra le strutture chimiche dei seguenti polimeri sintetici: (a) parte della catena peptidica primaria del tropocollagene; (b) gelatina; (c) fibrina; (d) chitosano; (e) acido ialuronico; (f) acido alginico.

#### 4.2.3.2 I polimeri sintetici

L'*acido poliglicolico*  $((C_2H_2O_2)_n)$ , indicato come PGA, è un poliesteri alifatico derivato da risorse di combustibili fossili e sintetizzato a partire da monomeri di acido glicolico mediante reazioni di policondensazione o polimerizzazione ad anello aperto (Figura 4.4).

Viene utilizzato nelle applicazioni di ingegneria tissutale per la sua biodegradabilità ed elevata resistenza agli stress meccanici, dovuta alla sua elevata cristallinità. Nonostante queste caratteristiche lo rendano un ottimo materiale per la produzione di scaffold, l'utilizzo del PGA è limitato dalla rapida degradazione del polimero, causata dalla sua instabilità idrolitica che lo rende particolarmente suscettibile a reazioni di idrolisi.

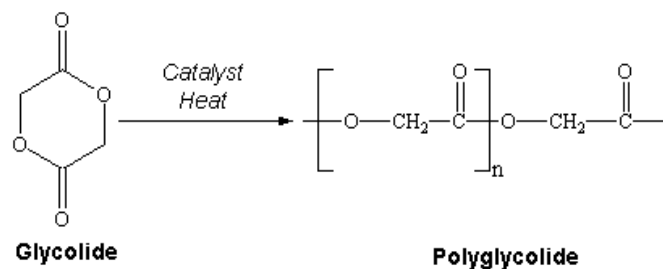


Figura 4.4. Reazione di polimerizzazione ad anello aperto dell'acido poliglicolico a partire dall'acido glicolico.

L'*acido polilattico*  $((C_3H_4O_2)_n)$ , indicato come PLA, è un poliesteri alifatico ottenuto dalla sintesi dell'acido lattico, che può essere derivato dalla fermentazione e successiva raffinazione di carboidrati, o dalla polimerizzazione ad anello aperto della molecola di lattide con l'utilizzo di

particolari catalizzatori (Figura 4.5). L'acido lattico è una molecola chirale che può esistere sotto forma di due enantiomeri L e D, la cui polimerizzazione ha come risultato dei materiali cristallini come l'acido poli-D-lattico (PDLA) e l'acido poli-L-lattico (PLLA), che possono essere miscelati insieme a formare l'acido poli-D-L-lattico (PDLLA). È possibile scegliere le proporzioni con cui i due componenti sono presenti nella miscela e, di conseguenza, modificare la cristallinità e la temperatura di fusione del materiale polimerico, caratterizzandone le proprietà meccaniche [44].

Il PLA può essere biodegradato mediante idrolisi dei legami esteri senza bisogno della presenza di enzimi e i prodotti di scarto di questa reazione sono non tossici ed espulsi attraverso l'urina. La sua velocità di degradazione risulta più lenta rispetto a quella del PGA a causa della maggiore idrofobicità [44]. Grazie a queste caratteristiche e alle proprietà di resistenza meccanica, dovute alla cristallinità del polimero, viene utilizzato sotto forma di film o fibre per la produzione di scaffold.

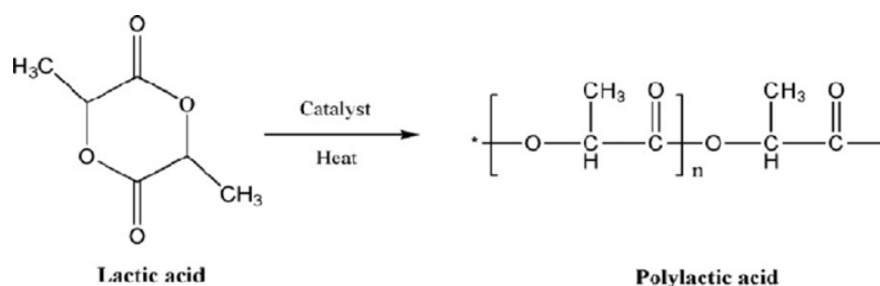


Figura 4.5. Reazione di polimerizzazione ad anello aperto dell'acido polilattico a partire dall'acido lattico.

L'acido poli(lattico-co-glicolico), indicato come PLGA, deriva dall'accoppiamento dei due polimeri analizzati in precedenza, PLA e PGA, che permette di calibrare la velocità di degradazione del materiale: il PLA contiene gruppi metile idrofobici che rallentano l'idrolisi del polimero; invece, l'instabilità idrolitica del PGA ne aumenta la degradazione (Figura 4.6). Scegliendo, quindi, le proporzioni dei due monomeri, acido lattico e glicolico, è possibile calibrare la velocità di degradazione, definirne le proprietà meccaniche, ottenendo un polimero biocompatibile e biorassorbibile adatto alla fabbricazione di scaffold per TEHVs [45].

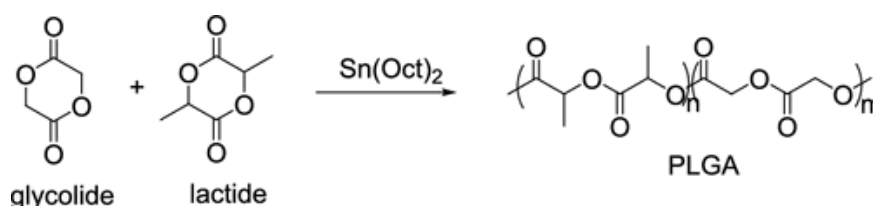


Figura 4.6. Reazione di polimerizzazione dell'acido poli(lattico-co-glicolico) a partire dall'acido lattico e glicolico.

Il *prolicaprolattone*  $((C_6H_{10}O_2)_n)$ , indicato come PCL, è un poliesteri alifatico che deriva dalla polimerizzazione ad anello aperto del monomero ciclico caprolattone e viene utilizzato sotto forma di polvere cristallina da miscelare insieme ad altri polimeri (Figura 4.7). È un materiale biocompatibile e può essere riassorbito mediante idrolisi con una velocità di degradazione molto minore rispetto ai polimeri analizzati in precedenza [45].

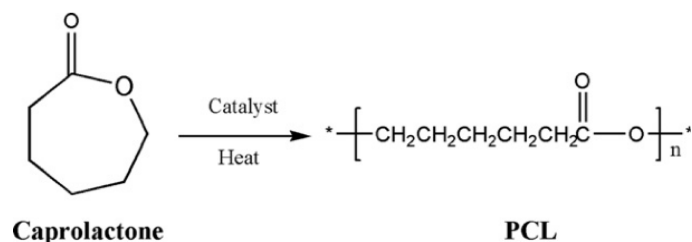


Figura 4.7. Reazione di polimerizzazione del policaprolattone a partire dal caprolattone.

Il *glicole polietilenico*  $(C_{2n}H_{4n+2}O_{n+1})$ , indicato come PEG, è un polimero sintetico ottenuto dalla reazione di polimerizzazione dell'ossido di etilene e viene spesso utilizzato come copolimero. Le unità monomeriche che lo compongono  $(-O-CH_2-CH_2-)$  sono caratterizzate sia da un ossigeno polare che da un gruppo  $-CH_2$  apolare e rendono il polimero solubile sia in acqua che in solventi organici, come acetone ed etanolo (Figura 4.8). Essendo idrofilico, quando viene posto a contatto con la superficie di un materiale assume una conformazione “a spazzola” all’interfaccia acqua/superficie e limita l’avvicinamento dei batteri al materiale [46].

Viene utilizzato nelle applicazioni dell’ingegneria tissutale sotto forma di idrogel all’interno del quale è possibile incorporare proteine, peptidi e polisaccaridi che si vogliono inserire sullo scaffold [42].

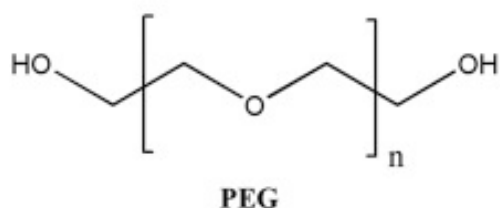


Figura 4.8. Formula di struttura del glicole polietilenico.

#### 4.2.4 Le tecniche di produzione di scaffold artificiali

L'utilizzo di polimeri naturali e sintetici permette la produzione di tre principali tipologie di scaffold tridimensionali:

- gli scaffold porosi, caratterizzati da una rete di pori interconnessa che fornisce un continuo passaggio di nutrienti e di scarti metabolici per permettere la crescita e la vascolarizzazione dei tessuti interessati;
- gli scaffold fibrosi, caratterizzati da una struttura simile a quella dell'ECM che permette un'ottima adesione, migrazione, proliferazione e differenziazione cellulare;
- gli scaffold in idrogel, costituiti da polimeri idrofilici capaci di incapsulare direttamente al loro interno le cellule e di ricreare una struttura simile a quella dell'ECM.

Per la fabbricazione di queste matrici artificiali vengono sfruttate sia tecniche convenzionali, basate sul principio di sottrazione di materiale dal prodotto iniziale per ottenere la conformazione desiderata, sia tecniche di prototipizzazione rapida, che sfruttano le nuove tecnologie per ottenere scaffold tridimensionali mediante la sovrapposizione di strati di materiale polimerico [47].

##### 4.2.4.1 Le tecniche convenzionali

Il processo di *freeze drying* prevede il raffreddamento al di sotto del punto di congelamento del polimero in soluzione in modo tale da far solidificare il solvente, che verrà successivamente sublimato per ottenere lo scaffold [47]. È possibile modificare la dimensione dei pori variando la temperatura di congelamento e, dato che si utilizzano solo basse temperature, i fattori biologici e le cellule incorporate nel materiale dello scaffold non vengono denaturati. L'utilizzo di solventi citotossici, tuttavia, costituisce uno svantaggio in quanto questi potrebbero deteriorare la superficie dello scaffold, in quanto solventi, e potrebbero provocare effetti dannosi sulle cellule, in quanto citotossici.

Il procedimento di *gas foaming* sfrutta gas ad alta pressione, ad esempio CO<sub>2</sub>, per ottenere delle strutture simili a spugne macroporose, evitando l'utilizzo di solventi. Mediante questa tecnica è possibile produrre scaffold spugnosi con un'elevata porosità, fino all'85%, e una dimensione dei pori fino a 700 µm [47]. I pori, tuttavia, non sono interconnessi tra di loro e la superficie dello scaffold risulta liscia, limitando la possibilità di colonizzazione cellulare.

Il processo di *solvent casting con lisciviazioni* si basa sul processo chimico della lisciviazione, attraverso il quale è possibile separare componenti solubili da un solido mediante l'uso di solventi. Secondo questa tecnica, alla soluzione polimerica vengono aggiunti dei sali e successivamente

avviene l'allontanamento del solvente mediante evaporazione, permettendo di definire la grandezza e la quantità di pori.

La tecnica di *elettrospinning* impiega forze di natura elettrostatica, ottenute da un'elevata differenza di potenziale tra due elettrodi, per formare fibre dal diametro variabile e scaffold con molecole bioattive incorporate all'interno [47]. Questo è il procedimento più sfruttato per la produzione di matrici artificiali fibrose in materiali polimerici sia sintetici che naturali, come il chitosano che è stato utilizzato per la fabbricazione dello scaffold di una valvola tricuspide la cui resistenza alla trazione in direzione radiale è risultata simile a quella delle valvole native (Figura 4. 9) [48]. L'elettrospinning permette, inoltre, di ottenere la disposizione anisotropa delle fibre dello scaffold tipica del tessuto valvolare, che ne caratterizza le proprietà meccaniche nelle diverse direzioni.

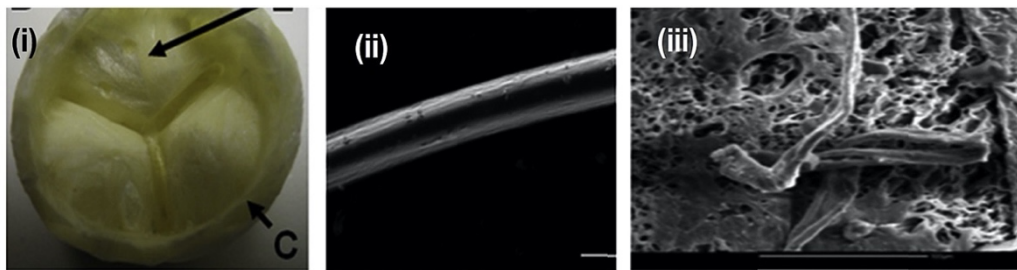


Figura 4.9. L'immagine rappresenta: i) lo scaffold in chitosano di una valvola cardiaca tricuspide ottenuto con la tecnica di elettrospinning; ii) e iii) la fibra di idrogel di chitosano.

#### 4.2.4.2 Le tecniche di prototipizzazione rapida

Le tecniche di prototipizzazione rapida impiegano strumenti controllati da computer per la deposizione strato per strato di materiale seguendo una geometria ottenuta da dati digitali derivati da modelli precedentemente creati. Vengono sfruttate per la produzione di scaffold porosi, in quanto permettono di controllare la dimensione dei pori e la loro interconnessione.

Il processo di *fused deposition modeling* utilizza un ugello mobile per depositare fibre polimeriche strato dopo strato, realizzando uno scaffold dotato di buona resistenza meccanica e con porosità variabile, dipendente dal diametro della punta dell'ugello [47]. Questa tecnica non richiede l'utilizzo di solventi tossici ma si avvale di elevate temperature che non permettono l'incorporazione di molecole biologiche all'interno dello scaffold.

Il procedimento della *stereolithography* prevede la focalizzazione di un raggio laser su una superficie di un liquido fotosensibile per indurre la polimerizzazione del liquido solo in quella regione, trasformandolo in un solido polimerizzato. Le resine fotosensibili che vengono utilizzate per la produzione di scaffold secondo questa tecnica risultano, tuttavia, citotossiche e possono causare problemi di biocompatibilità una volta impiantate [47].

La tecnica di *bioprinting* consiste nella deposizione successiva di piccole unità di biomateriale e cellule in modo molto accurato, permettendo la regolazione della distribuzione cellulare (Figura 4.10).

Esistono tre principali metodi di bioprinting per la fabbricazione di scaffold in idrogel [47,49]:

- la stampa a getto, che dirige il bio-inchiostro su un substrato per produrre strutture bi e tri-dimensionali offrendo, da una parte, il vantaggio di produrre scaffold in modo veloce e, dall'altra, lo svantaggio del numero ristretto dei materiali utilizzabili;
- l'estrusione, che utilizza un microiniettore per depositare continui filamenti di biomolecole attive miste ad idrogel, fabbricando scaffold ad alta vitalità cellulare;
- il laser, che sfrutta l'energia di un laser pulsato per trasferire i materiali su un substrato ricevente, fabbricando scaffold con un range di viscosità da 1 a 300 mPa/s.

I metodi di bioprinting risultano essere i migliori per la produzione di scaffold per TEHVs in quanto permettono la fabbricazione di una struttura valvolare capace di crescita e integrazione biologica. Grazie alla tecnologia di biostampa guidata da software programmabili, infatti, è possibile ottenere un design della matrice che mimi perfettamente la complessa microstruttura della valvola cardiaca, in modo da soddisfare i requisiti biomeccanici ed emodinamici richiesti.

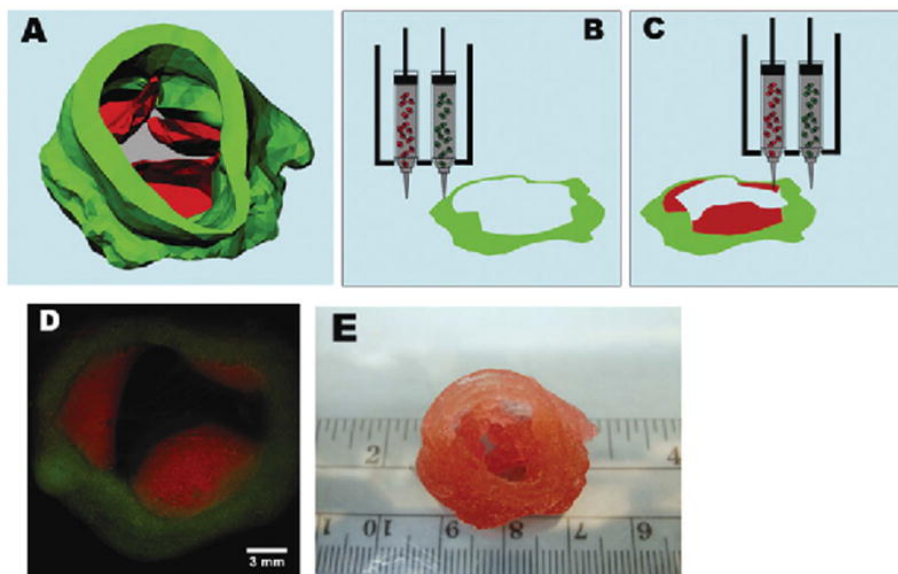


Figura 4.10. L'immagine rappresenta le diverse fasi del bioprinting di una valvola aortica: A) Modello della valvola aortica ricostruito da immagini micro-tomografiche; B e C) illustrazione schematica del processo di bioprinting con idrogel e due diverse tipologie di cellule; D) immagine in fluorescenza dei primi due strati stampati del condotto della valvola aortica; E) condotto valvolare stampato.

### 4.3 I fattori di crescita cellulare e i bioreattori

Una volta seminate le cellule sulla superficie dello scaffold, per le matrici decellularizzate o polimeriche, o direttamente all'interno del materiale polimerico, per le matrici in idrogel, è necessario stimolare la crescita cellulare e la sintesi di ECM mediante l'utilizzo molecole bioattive, che inviano segnali chimici, e bioreattori, dispositivi in grado di ricreare le caratteristiche dell'ambiente in cui si trovano le cellule native.

I *fattori di crescita* sono molecole in grado di legarsi a determinati recettori superficiali stimolando numerosi processi cellulari, tra cui la proliferazione, migrazione e la differenziazione cellulare durante lo sviluppo di nuovi tessuti. Il rilascio di questi fattori di crescita deve essere graduale e controllato mediante l'utilizzo di carrier che permettono alle molecole di svolgere la loro funzione nel sito di interesse, evitando che queste diffondano sullo scaffold in modo incontrollato. Nel caso di scaffold in idrogel è possibile inserire direttamente queste molecole durante la produzione della matrice [48].

I fattori di crescita principalmente utilizzati per le TEHVs sono: i VEGFs (*Vascular Endothelial Growth Factors*), responsabili della migrazione e proliferazione delle cellule endoteliali e caratterizzati da proprietà di angiogenesi; gli IGFs (*Insulin-like Growth Factors*), capaci di stimolare la proliferazione cellulare e di mediare l'apoptosi delle cellule; i TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factors  $\beta$* ), utilizzati per stimolare la differenziazione delle cellule staminali in cellule cardiache. Il preciso controllo sui segnali inviati da queste molecole potrebbe permettere la regolazione del processo rigenerativo dell'ECM che costituisce uno dei principali problemi delle applicazioni di ingegneria tissutale [50].

La stimolazione meccanica delle strutture ottenute in seguito al seeding cellulare permette di attivare i sensori cellulari e, di conseguenza, i percorsi di segnali per la produzione di ECM in condizioni di lavoro analoghe a quelle in vivo. L'utilizzo di bioreattori consente di ricreare il flusso e le pressioni fisiologici per ottimizzare le interazioni cellula-cellula e cellula-scaffold che portano ad un'espressione genica molto simile a quella osservata in vivo [48]. È importante sottolineare che l'applicazione di queste sollecitazioni emodinamiche deve essere introdotta in modo graduale per consentire alla cellula di aderire adeguatamente al tessuto, evitando di essere allontanata prima della formazione completa del tessuto [40]. I bioreattori più utilizzati per le TEHVs sono di tipo pulsatile e consentono di impostare parametri tipici del ciclo cardiaco, come la gittata sistolica, lo sforzo di taglio e il numero di cicli, con valori simili a quelli a cui sono soggette le valvole native (Figura 4.11). Le dimensioni di questi dispositivi consentono il loro inserimento all'interno di incubatori, assicurando le condizioni di sterilità e il controllo della temperatura e dello scambio di gas.

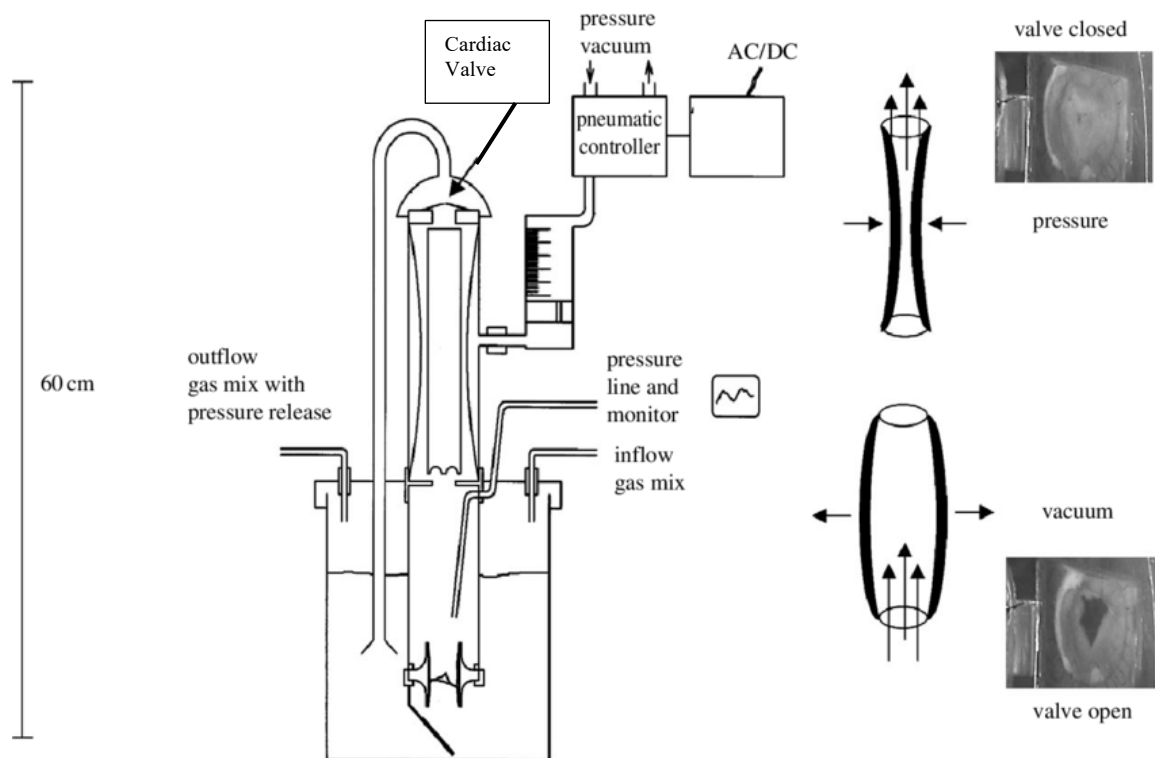


Figura 4.11. L'immagine rappresenta un bioreattore pulsatile utilizzato per la stimolazione meccanica di TEHVs; nella parte destra, sono presenti due fotografie rappresentanti una valvola chiusa, quando viene applicata una pressione, e una valvola aperta, quando viene fatto il vuoto all'interno del condotto.

#### 4.4 Scaffold in poli(L-lattide-co-ε-caprolattone) e fibroina della seta per valvole protesiche

Il recente studio condotto da Xiaoxiao Wang e colleghi dell'Accademia Cinese di Scienze Mediche di Tianjin ha analizzato l'applicazione all'ingegneria tissutale delle valvole cardiache di scaffold in poli(L-lattide-co-ε-caprolattone) (PLCL) e fibroina della seta, realizzati con diverse proporzioni tra i due componenti [51]. La ricerca di un nuovo materiale per la produzione delle matrici artificiali deriva dalla mancata corrispondenza tra le proprietà meccaniche di queste ultime rispetto a quelle proprie delle valvole cardiache, principale motivo di fallimento delle TEHVs.

##### 4.4.1 La produzione degli scaffold

Il poli(L-lattide-co-ε-caprolattone) (PLCL) è un copolimero ottenuto dalla polimerizzazione ad apertura di anello di monomeri di PLLA, materiale cristallino duro e fragile, e PCL, materiale semicristallino caratterizzato da un'elasticità simile a quella delle gomme (Figura 4.12). Modificando le percentuali con cui i due monomeri sono presenti, è possibile variare le proprietà del materiale, come la velocità di degradazione e la flessibilità.

Nel caso in esame è stato utilizzato un PLCL con un rapporto molare tra l'acido poli(L-lattico) e il policaprolattone pari a 50:50 e un coefficiente di viscosità di 2.6-2.8 [51].

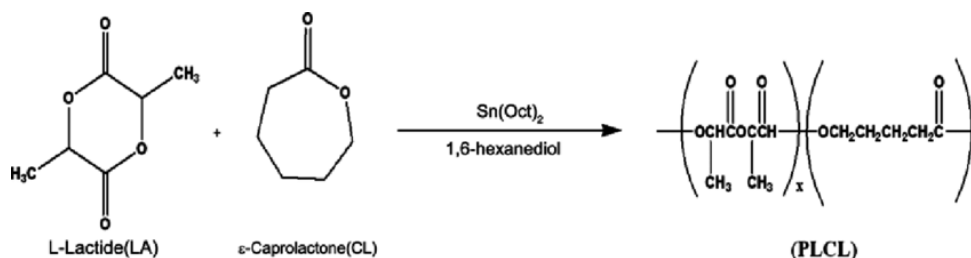


Figura 4.12. La reazione di polimerizzazione di PLCL a partire dai monomeri di L-Lattide e ε-caprolattone.

Questo copolimero, nonostante abbia una struttura interna reticolata e una buona elasticità, presenta lo svantaggio di essere bioinerte e di mancare della presenza di siti di legame e di riconoscimento cellulare. Per tale motivo, si è deciso di unirli insieme a materiali naturali o biomolecole per ottenere scaffold capaci di promuovere la proliferazione cellulare.

Nel caso in esame è stata utilizzata la *fibroina della seta* (FS) estratta da bozzoli di bachi da seta *Bombyx mori* [51]. Questa proteina fibrillare forma il filamento centrale della fibra di seta che è rivestito da un'altra proteina adesiva chiamata sericina.

La fibroina è costituita da tre sottounità: fibroina a catena pesante (391 kDa), fibroina a catena leggera (27 kDa) e P25 (25 kDa), che si trovano in un rapporto molare pari a 6:6:1 [52]. La catena pesante è composta da foglietti β antiparalleli, i cui fili sono disposti in modo parallelo rispetto all'asse della fibra e presentano array microcristallini di  $(\text{-Gly-Ser-Gly-Ala-Gly-Ala-})_n$ , che rendono la struttura insolubile in acqua, e da segmenti contenenti residui più voluminosi come Val, Tyr e Pro (Figura 4.13) [52]. La catena leggera, invece, non presenta una sequenza ripetitiva e ha una diversa composizione di amminoacidi, che la rendono più idrofilica e leggermente elastica, senza la presenza di cristallinità. È in grado di formare ponti a disolfuro con la catena pesante, evitandone la ritenzione nel reticolo endoplasmatico

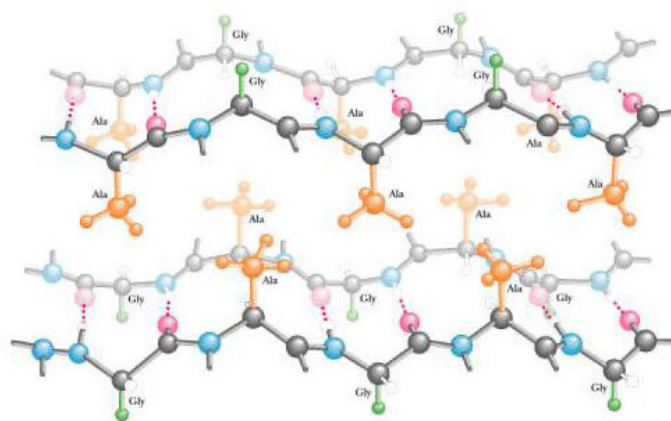


Figura 4.13. La struttura a foglietto β della catena pesante della fibroina della seta.

La fibroina risulta particolarmente adatta alle applicazioni di ingegneria tissutale grazie alle sue proprietà di biocompatibilità e stabilità meccanica, oltre che di permeabilità all'ossigeno e ai nutrienti, di bassa immunogenicità e di lenta degradazione.

Per la fabbricazione degli scaffold con tecnica di elettrospinning è stata ottenuta una soluzione di PLCL e FS disciolti in HFIP con un rapporto di 100/0, 90/10, 80/20, 70/30 e 60/40 per avere una concentrazione finale del 10% (p/v) [51]. Successivamente questi scaffold sono stati trattati con metanolo al 90% (v/v) per promuovere il passaggio della FS da una disposizione casuale alla conformazione a foglietto  $\beta$ , aumentando la cristallinità della proteina e la sua insolubilità in acqua, migliorandone la resistenza. Le matrici artificiali così ottenute sono poi state asciugate sottovuoto per 72 ore, in modo da eliminare i residui di solvente.

#### *4.4.2 I metodi di analisi e i risultati*

La morfologia superficiale degli scaffold elettrofilati in PLCL/FS è stata osservata utilizzando un microscopio elettronico a scansione (SEM) con una tensione di accelerazione di 10 kV [21]. Le immagini così ottenute (Figura 4.14.a) mostrano che gli scaffold sono costituiti da nanofibre distribuite casualmente e da strutture porose tridimensionali interconnesse, in grado di promuovere il trasporto di nutrienti alle cellule. Il diametro medio delle fibre ha valori compresi tra 1.89  $\mu\text{m}$  e 3.78  $\mu\text{m}$ , rispettivamente pari a:  $2,88 \pm 0,45 \mu\text{m}$  per 100/0,  $2,72 \pm 0,48 \mu\text{m}$  per 90/10,  $2,64 \pm 0,30 \mu\text{m}$  per 80/20,  $2,56 \pm 0,31 \mu\text{m}$  per 70/30 e  $2,34 \pm 0,21 \mu\text{m}$  per 60/40 (Figura 4.14.b e c) [51].

Si pensa che la dimensione minore del diametro delle fibre, corrispondente ad una proporzione minore di PLCL, sia dovuta all'aumento della conduttività della soluzione elettrofilata con una maggiore quantità di FS. È possibile, inoltre, che la diminuzione della viscosità della soluzione di elettrofilatura, dovuta all'aggiunta di fibroina della seta, causi una diminuzione del diametro delle fibre. La dimensione media dei pori, invece, ha valori compresi tra 6.92  $\mu\text{m}$  e 21.75  $\mu\text{m}$ , rispettivamente pari a:  $10,08 \pm 1,99 \mu\text{m}$  (100/0),  $11,50 \pm 1,49 \mu\text{m}$  (90/10),  $11,91 \pm 4,08 \mu\text{m}$  (80/20),  $12,72 \pm 1,54 \mu\text{m}$  (70/30) e  $13,71 \pm 3,26 \mu\text{m}$  (60/40) (Figura 4.14.d) [51]. La causa dell'aumento della dimensione media dei pori proporzionale all'aumento della FS nella proporzione tra PLCL/FS può essere ricondotta alla diminuzione del diametro della fibra o all'incremento della presenza di cariche elettriche, dovute alle catene di amminoacidi dei blocchi idrofilici di FS, che provoca repulsione tra cariche uguali, diminuendo la dimensione delle fibre e ingrandendo i pori.

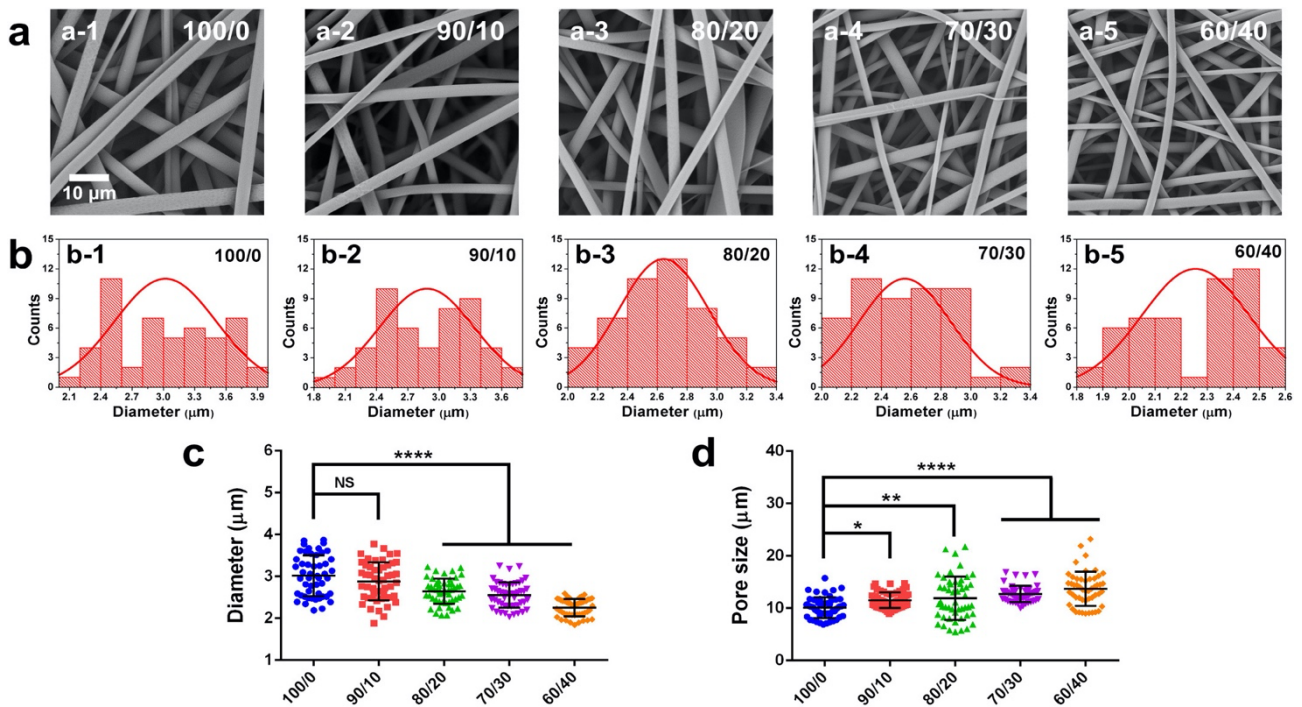


Figura 4.14. La morfologia degli scaffold elettrofilati in PLCL/FS. (a) Immagini SEM degli scaffold preparati con rapporti molari diversi tra PLCL e FS: 100/0, 90/10, 80/20, 70/30 e 60/40. (b) Distribuzione del diametro medio delle fibre degli scaffold elettrofilati. (c) Diametro medio delle fibre degli scaffold elettrofilati in PLCL/FS. (d) Dimensione media dei pori dei diversi scaffold elettrofilati in PLCL/FS.

Le proprietà meccaniche degli scaffold in PLCL/SF sono state analizzate mediante prove di resistenza alla trazione che hanno permesso di tracciare le curve di sforzo e deformazione da cui sono stati calcolati il modulo elastico, la resistenza alla trazione e l'allungamento fino al punto di rottura (Figura 4.15). Dalla graduale diminuzione del modulo elastico e dall'incremento dell'allungamento fino al punto di rottura, direttamente proporzionali all'aumento del contenuto di PLCL, è possibile notare che la diminuzione di FS provoca il passaggio dello scaffold da fragile a flessibile. La resistenza alla trazione, invece, ha una tendenza diversa: l'aumento di PLCL rispetto al contenuto in FS è caratterizzato da un aumento iniziale della resistenza ma, quando il rapporto supera il valore di 80/20, si nota una diminuzione. I valori ottenuti da queste analisi mostrano che l'unione di PLCL e FS può migliorare le proprietà meccaniche del PLCL puro, permettendo la sintesi di un materiale adatto alla produzione di uno scaffold per valvole cardiache ingegnerizzate. Gli scaffold trattati con metanolo (MeOH) al 90% per un'ora presentano proprietà meccaniche migliori, grazie al passaggio della conformazione casuale della seta alla conformazione a foglietto  $\beta$  (Figura 4.15).

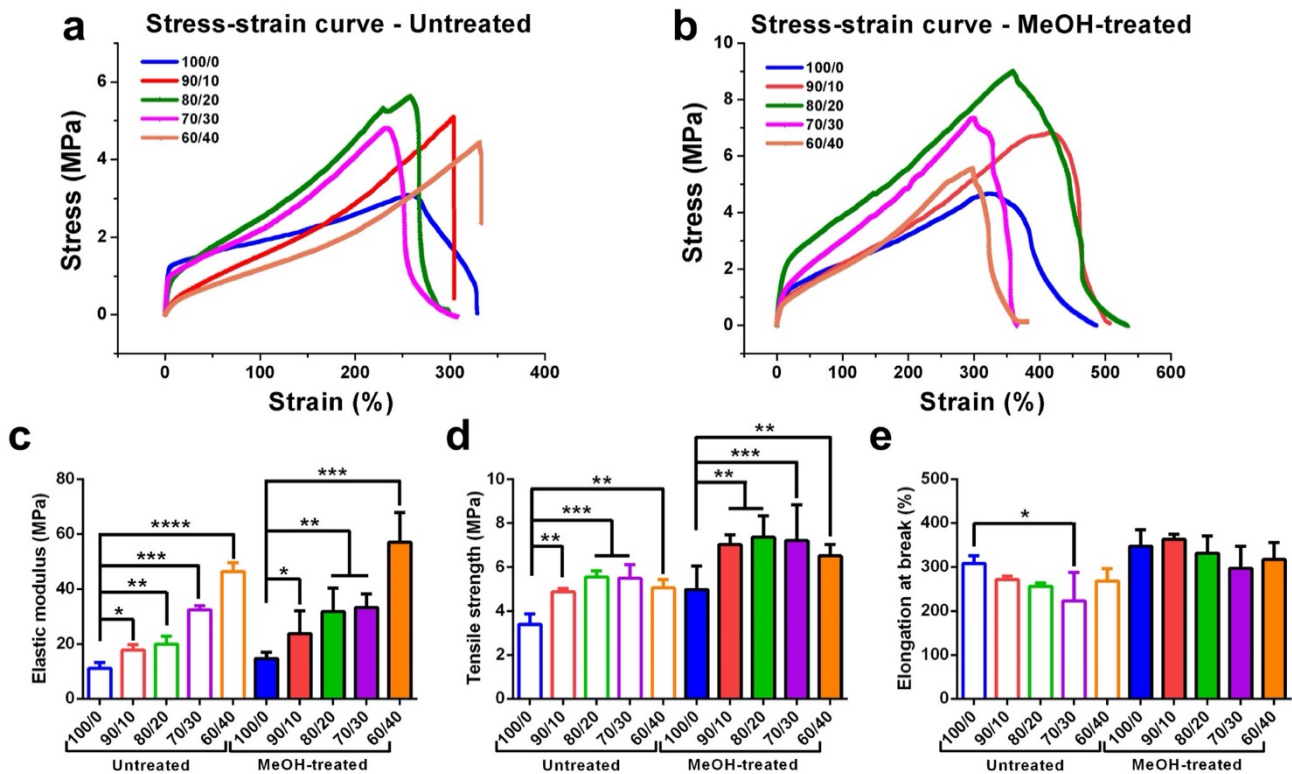


Figura 4.15. Le proprietà meccaniche degli scaffold elettrofilati in PLCL/FS. (a) Curva sforzo deformazione di scaffold in PLCL/SF non trattati. (b) Curva sforzo deformazione di scaffold in PLCL/SF trattati con MeOH. (c) Modulo elastico di scaffold PLCL/SF non trattati e trattati con MeOH. (d) Resistenza alla trazione di scaffold PLCL/SF non trattati e trattati con MeOH. (e) Allungamento fino al punto di rottura di scaffold PLCL/SF non trattati e trattati con MeOH.

La proprietà di anticalcificazione dello scaffold in PLCL/FS è stata valutata *in vitro* mediante l'utilizzo di *simulated body fluid* (SBF) in cui la matrice artificiale è stata immersa per 28 giorni per poi osservare la quantità di sali di calcio depositata al suo interno. Il contenuto di calcio minore è stato trovato sugli scaffold con rapporto PLCL/FS pari a 90/10, contenente  $0.08 \pm 0.01 \mu\text{g}/\text{mg}$ , e pari a 80/20, contenente  $0.09 \pm 0.02 \mu\text{g}/\text{mg}$ ; il contenuto maggiore, pari a  $0.44 \pm 0.21 \mu\text{g}/\text{mg}$ , è stato osservato sullo scaffold con rapporto pari a 60/40 [51].

Il motivo del maggior assorbimento di calcio da parte dello scaffold contenente una maggior percentuale di FS può essere dovuto alla presenza di numerosi gruppi idrossilici e carbossilici all'interno delle molecole di fibroina, che sono caricati negativamente e attraggono il  $\text{Ca}^{2+}$  positivo. A causa di questa capacità di assorbire calcio, ammentando le probabilità di calcificazione della valvola protesica in vivo, Xiaoxiao Wang e colleghi hanno ritenuto migliori gli scaffold con rapporto pari a 80/20 e 90/10.

L'analisi *in vivo* è stata compiuta mediante impianto sottocutaneo di scaffold con dimensioni pari a  $6 \times 6 \text{ mm}^2$  sul dorso di topi Wistar maschi di 45-65 g per quattro e dodici settimane [51]. Successivamente i topi sono stati soppressi e gli scaffold espianati per essere analizzati mediante

colorazione H&E, per valutare l'infiltrazione cellulare, e colorazione Von Kossa, per identificare i depositi di calcio all'interno delle matrici artificiali. I risultati della colorazione H&E non evidenziano particolari differenze di infiltrazione tra i diversi scaffold elettrofilati dopo quattro settimane (Figura 4.16.a); dopo dodici si può notare un incremento nel numero di cellule infiltrate negli scaffold con rapporto PLCL/FS fino a 70/30, mentre con valori pari a 60/40 è visibile una diminuzione (Figura 4.16.b). L'aggiunta della fibroina della seta al PLCL può, quindi, aumentare la biocompatibilità di scaffold in tali materiali grazie all'introduzione di gruppi funzionali, come  $-NH_2$ ,  $-COOH$  e  $-OH$ , ma quando la proporzione di FS raggiunge valori troppo elevati si verifica l'effetto contrario.

La colorazione Von Kossa non rileva particolari depositi di calcio fino a dodici settimane e, in accordo con l'analisi *in vitro*, anche nel caso *in vivo* il contenuto di  $Ca^{2+}$  aumenta con l'aumentare della quantità di FS nella proporzione PLCL/FS (Figura 4.16.f). Il livello di calcificazione dello scaffold con rapporto PLCL/FS pari a 80/20 risulta pari a  $0.33 \pm 0.07$   $\mu g/mg$ , dopo quattro settimane, e pari a  $0.41 \pm 0.13$   $\mu g/mg$ . Il contenuto di  $Ca^{2+}$  riscontrato negli scaffold analizzati in questo studio risulta comunque minore di quello delle valvole cardiache biologiche trattate con glutaraldeide clinicamente usate (GA-BHV), pari a 21.8-32.6  $\mu g/mg$  [51].

In conclusione, lo studio di Xiaoxiao Wang e colleghi ha dimostrato che il miglior rapporto per bilanciare la biocompatibilità e le proprietà di anticalcificazione degli scaffold PLCL/FS per TEHVs risulta essere 80/20.

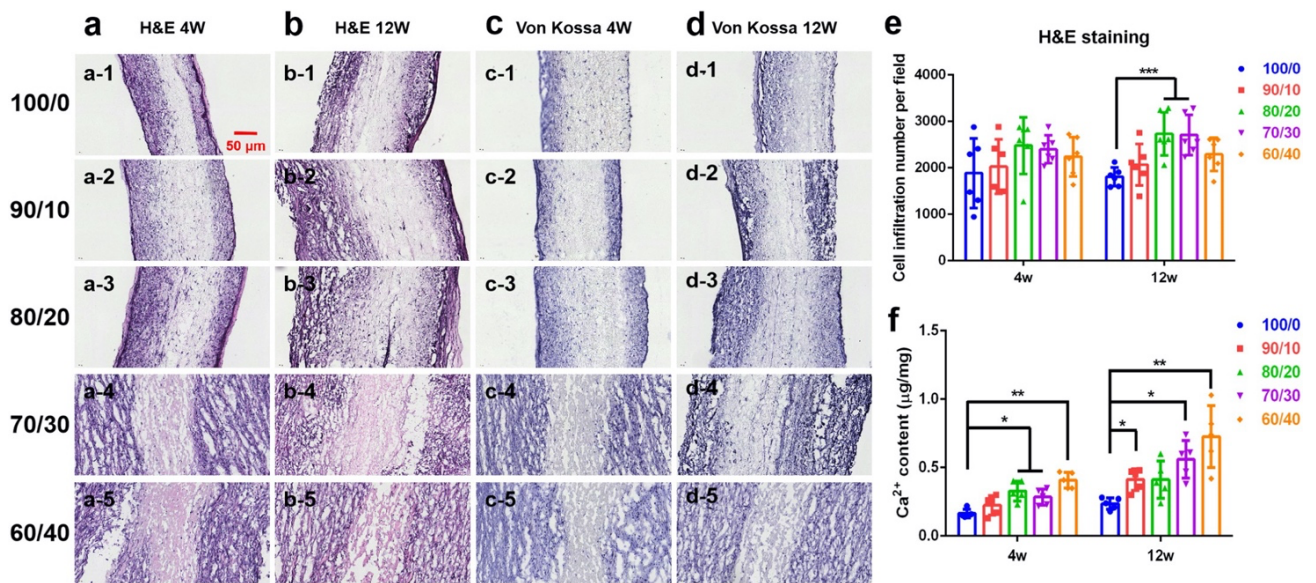


Figura 4.16. Analisi in vitro sulla calcificazione di scaffold in PLCL/FS elettrofilati espianati da topi Wistar. (a) Colorazione H&E dopo quattro settimane. (b) Colorazione H&E dopo dodici settimane. (c) Colorazione Von Kossa dopo quattro settimane. (d) Colorazione Von Kossa dopo dodici settimane. (e) Numero di infiltrazione cellulare negli scaffold elettrofilati PLCL/SF. (f) Contenuto di Ca<sup>2+</sup> su scaffold elettrofilati PLCL/SF.

## Conclusione

La ricerca nel campo delle valvole cardiache ingegnerizzate ha portato ad ottimi risultati sperimentali, riuscendo ad ottenere delle valvole *in vitro* perfettamente formate le cui proprietà meccaniche hanno evidenziato buona resistenza. In particolare, le protesi ottenute con scaffold in materiali polimerici biorisorbibili hanno suscitato grande interesse grazie all'opportunità di regolarne le proprietà meccaniche e geometriche e di controllarne il riassorbimento e la rigenerazione.

La possibilità di combinare materiali biologici e sintetici, come nel caso di poli(L-lattide-co-ε-caprolattone) (PLCL) e fibroina della seta, ha portato alla fabbricazione di scaffold con una morfologia molto simile a quella della matrice extracellulare delle valvole cardiache, permettendo un'ottima adesione e proliferazione cellulare.

Nonostante questi importanti progressi, l'utilizzo clinico delle *TEHVs* rimane ostacolato da numerose limitazioni, tra cui: la complessità tecnica della produzione di tali protesi; la loro sicurezza ed efficacia a lungo termine e il rimodellamento controllato per evitare future disfunzioni valvolari.

Sono ancora necessarie, per questi motivi, valutazioni precliniche a lungo termine in modelli animali appropriati e, successivamente, nei pazienti. La mancanza di normative comuni a livello internazionale, inoltre, frena la possibile traslazione delle *TEHVs* nell'applicazione clinica: la classificazione delle numerose tipologie di valvole ingegnerizzate, caratterizzate da componenti biologicamente attivi diversi, risulta molto complessa e saranno necessari sforzi notevoli per risolvere le incongruenze delle linee guida.

Attualmente sono stati condotti alcuni trials clinici su pazienti con valvole derivate da matrici decellularizzate, che hanno mostrato buoni risultati nel breve periodo ma che necessitano di ulteriori analisi per avere informazioni sul lungo termine; in futuro sono già in programma test clinici per le protesi valvolari con scaffold in materiali biorisorbibili. Questi studi potranno fornire importanti informazioni sulle capacità di rimodellamento delle *TEHVs* nell'uomo e getteranno le basi per le applicazioni cliniche di queste protesi.

## **Bibliografia**

- [1] Langer R, Vacanti JP Tissue engineering Science. 1993 May 14; 260(5110):920-6.
- [2] MacArthur BD, Oreffo RO. Bridging the gap. Nature. 2005 Jan 6; 433(7021):19.
- [3] Regolamento CE n. 1394/2007 del Parlamento Europeo e del Consiglio. 13 novembre 2007. Capitolo 1, Articolo 2, Paragrafo 1b
- [4] Shinoka T, Miyachi H. Current Status of Tissue Engineering Heart Valve. World Journal for Pediatric and Congenital Heart Surgery. 2016; 7(6):677-684.
- [5] Trinchese, G.F., Calabrese, E., Calabrò. Gli scaffold in medicina rigenerativa. LO SCALPELLO. 2019; 33: 230–236.
- [6] Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. J Bone Joint Surg Am. 2004 Jul; 86(7):1541-58.
- [7] Rami Mhanna, Anwarul Hasan Tissue Engineering for Artificial Organs: Regenerative Medicine, Smart Diagnostics and Personalized Medicine. First Edition (2017) Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. Pagine 3-23
- [8] Lee K, Silva EA, Mooney DJ. Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments. J R Soc Interface. 2011; 8(55):153-170.
- [9] Sharma P, Kumar P, Sharma R, Bhatt VD, Dhot PS. Tissue Engineering; Current Status & Futuristic Scope. J Med Life. 2019 Jul-Sep;12(3):225-229.
- [10] Britannica, The Editors of Encyclopaedia. "heart". Encyclopedia Britannica, 2021
- [11] G. Anastasi, P. Castano, S. Castorina, O. Cremona, R. De Caro, E. Gaudio, G. Macchiarelli, M. Rende, D. Ribatti, C. Sforza, C. Tacchetti. Anatomia Umana. Volume 1: Atlante. Milano: Edi.Ermes, 2013; 490-498.

- [12] Shah S., Gnanasegaran G., Sundberg-Cohon J., Buscombe J. The Heart: Anatomy, Physiology and Exercise Physiology. In: Movahed A., Gnanasegaran G., Buscombe J., Hall M. (eds) Integrating Cardiology for Nuclear Medicine Physicians. Springer, Berlin, Heidelberg, 2009.
- [13] Flanigan, Martha; Gaskell, Stephanie Mello. A Review of Cardiac Anatomy and Physiology. Home Healthcare Nurse: The Journal for the Home Care and Hospice Professional, 2004; 22 (1): 45-51.
- [14] Rodriguez ER, Tan CD. Structure and Anatomy of the Human Pericardium. Prog Cardiovasc Dis, 2017; 59(4): 327-328.
- [15] Gray, H. & Standring, S. Gray's anatomy: the anatomical basis of clinical practice. 41. ed. New York: Elsevier Limited, 2016; 994-1028.
- [16] Maraldi, N. M. et al. Istologia medica. Milano: Edi-Ermes, 2016; 572-580
- [17] Saladin, K. S. et al. Anatomia umana. 2. ed. italiana sulla 5. americana / a cura di Raffaele De Caro; con la collaborazione di Sergio Galli. Padova: Piccin, 2017; 539-560.
- [18] Ganong, W. F. et al. Fisiologia medica di Ganong. 12. ed. italiana sulla 23. di lingua inglese / a cura di M. Midrio; con la collaborazione di M. Avoli. Padova: Piccin, 2011; 541-576.
- [19] Guy P. Armstrong. Stenosi mitralica. Manuale MSD Versione per professionisti, 2020.
- [20] Guy P. Armstrong. Stenosi aortica. Manuale MSD Versione per Professionisti, 2020.
- [21] Guy P. Armstrong. Insufficienza mitralica. Manuale MSD Versione per professionisti, 2020.
- [22] Guy P. Armstrong. Insufficienza aortica. Manuale MSD Versione professionisti, 2020.
- [23] Li KYC. Bioprosthetic Heart Valves: Upgrading a 50-Year-Old Technology. Frontiers in Cardiovascular Medicine, 2019; 6-47

- [24] Emanuela S. Fioretta, Sarah E. Motta, Valentina Lintas, Sandra Loerakker, Kevin K. Parker, Frank P. T. Baaijens, Volkmar Falk, Simon P. Hoerstrup, Maximilian Y. Emmert. Next-generation tissue-engineered heart valves with repair, remodelling and regeneration capacity. *Nature Reviews Cardiology*, 2021; 18: 92-116.
- [25] SAVR: Surgical Aortic Valve Replacement. Frankel Cardiovascular Center, University of Michigan Health.
- [26] TAVR: Transcatheter Aortic Valve Replacement. Frankel Cardiovascular Center, University of Michigan Health.
- [27] Gopal S, Hauser JM, Mahboobi SK. Mechanical Aortic Valve Replacement. *StatPearls*, 2021
- [28] Marco Russo, Maurizio Taramasso, Andrea Guidotti, Alberto Pozzoli, Fabian Nietilspach, Ludwig K. von Segesser, Francesco Maisano. The evolution of surgical valves. *Cardiovascular Medicine*, 2017; 285-292.
- [29] Philippe Pibarot, Jean G. Dumesnil Prosthetic Heart Valves, selection of the optimal prosthesis and long-term management. *Circulation*, 2009; 119(7):1034-48.
- [30] Alec Vahanian, Friedhelm Beyersdorf e altri. ESC/EZCTS Guidelines for the management of valvular heart disease. *European Heart Journal* 00, 2021; 1-72
- [31] Donal MacGrogan, Guillermo Luxa', Anita Driessen-Mol, Carlijn Bouten, Frank Baaijens, and Jose' Luis de la Pompa. How to Make a Heart Valve: From Embryonic Development to Bioengineering of Living Valve Substitutes. *Cold Spring Harbour Perspectives in Medicine*, 2014; 4.
- [32] Soumen Jana, Robert T. Tranquillo and Amir Lerman. Cells for tissue engineering of cardiac valves. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 2016; 10: 804-824.
- [33] Kodigepalli KM, Thatcher K, West T, et al. Biology and Biomechanics of the Heart Valve Extracellular Matrix. *J Cardiovasc Dev Dis*. 2020; 7(4):57.

- [34] Stefan Neuenschwander, Simon P. Hoerstrup. Heart valve tissue engineering. *Transplant Immunology*, 2004; 12(3-4): 359-365.
- [35] Taylor PM. Biological matrices and bionanotechnology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Science*, 2007; 362(1484):1313-20.
- [36] Anwarul Hasan, Kim Ragaert, Wojciech Swieszkowski, Šeila Selimović, Arghya Paul, Gulden Camci-Unal, Mohammad R.K. Mofrad, Ali Khademhosseini. Biomechanical properties of native and tissue engineered heart valve constructs. *Journal of Biomechanics*, 2014; 9(14): 1949-1963.
- [37] S. Jana, B.J. Tefft, D.B. Spoon, R.D. Simari. Scaffolds for tissue engineering of cardiac valves. *Acta Biomaterialia*, 2015; 10(7): 2877-2893.
- [38] A.K. Capulli, L.A. MacQueen, Sean P. Sheehy, K.K. Parker. Fibrous scaffolds for building hearts and heart parts. *Advanced drug delivery reviews* (2016); 96:83-102.
- [39] Taufiek Konrad Rajab, Thomas J. O'Malley, Vakhtang Tchanchaleishvili. Decellularized scaffolds for tissue engineering: Status and future perspective. *Artificial Organs*, 2020; 44:1031–1043.
- [40] Yosry S. Morsi. Bioengineering strategies for polymeric scaffold for tissue engineering an aortic heart valve: an update. *Int J Artif Organs* 2014; 37 (9): 651-667.
- [41] Majid Qasim A., Fricker Annabelle T. R., Gregory David A., Davidenko Natalia, Hernandez Cruz Olivia, Jabbour Richard J., Owen Thomas J., Basnett Pooja, Lukasiewicz Barbara, Stevens Molly, Best Serena, Cameron Ruth, Sinha Sanjay, Harding Sian E., Roy Ipsita. Natural Biomaterials for Cardiac Tissue Engineering: A Highly Biocompatible Solution. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 2020; 7.
- [42] Zhang X, Xu B, Puperi DS, Wu Y, West JL, Grande-Allen KJ. Application of hydrogels in heart valve tissue engineering. *J Long Term Eff Med Implants*, 2015; 25(1-2):105-134.
- [43] Maria Chiara Barsotti, Francesca Felice, Alberto Balbarini, Rossella Di Stefano. Fibrin as a scaffold for cardiac tissue engineering. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Inc.* 2011; 58(5): 301–310.

- [44] Singhvi MS, Zinjarde SS, Gokhale DV. Polylactic acid: synthesis and biomedical applications. *J Appl Microbiol*, 2019; 127(6):1612-1626.
- [45] Joydip Kundu, Falguni Pati, Young Hun Jeong, Dong-Woo Cho. Biomaterials for Biofabrication of 3D Tissue Scaffolds. *Biofabrication*, William Andrew Publishing, 2013; 23-46.
- [46] Iolanda Francolini, Luanne Hall-Stoodley, Paul Stoodley. Biofilms, Biomaterials, and Device-Related Infections. *Biomaterials Science (Fourth Edition)*, 2020; 823-840.
- [47] Trinchese, G.F., Calabrese, E., Calabrò, G. et al. Gli scaffold in medicina rigenerativa. *LO SCALPELLO*, 2019; 33: 230–236.
- [48] Anwarul Hasan, John Saliba, Hassan Pezeshgi Modarres, Ahmed Bakhaty, Amir Nasajpour, Mohammad R.K. Mofrad, Amir Sanati-Nezhad. Micro and nanotechnologies in heart valve tissue engineering. *Biomaterials*, 2016; 103: 278-292.
- [49] ShiqingZhang, Haibin Wang. Current Progress in 3D Bioprinting of Tissue Analogs, *SLAS Technology*,2019;24(1):70–78
- [50] Lee K, Silva EA, Mooney DJ. Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments. *J R Soc Interface*, 2011; 8(55):153-170.
- [51] Xiaoxiao Wang, Jing Liu, Huimin Jing, Binhan Li, Zhiting Sun, Boxuan Li, Deling Kong, Xigang Leng, Zhihong Wang. Biofabrication of poly(l-lactide-co- $\epsilon$ -caprolactone)/silk fibroin scaffold for the application as superb anti-calcification tissue engineered prosthetic valve. *Materials Science and Engineering: C*, 2021; 121.
- [52] Augusto Zuluaga-Vélez, Adrián Quintero-Martinez, Lina M. Orozco, Juan C. Sepúlveda-Arias. Silk fibroin nanocomposites as tissue engineering scaffolds – A systematic review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021; 141.