UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

"L'INGEGNERIA TISSUTALE APPLICATA ALLE VALVOLE CARDIACHE: LIMITI E PROSPETTIVE FUTURE"

Relatore: Prof. Andrea Bagno

Laureanda: Giulia Cappelletto

ANNO ACCADEMICO 2024 – 2025

Data di laurea 22/09/2025

Indice

Abstract pagina 3
Introduzione pagina 4
Capitolo 1: Le valvole cardiache meccaniche e biologiche pagina 6
1.1 Descrizione e confronto tra valvole cardiache meccaniche e biologiche pagina 7
1.1.1 Protesi meccanica mono-leaflet pagina 7
1.1.2 Protesi meccanica bi-leaflet pagina 8
1.1.3 Protesi biologiche porcine e pericardiche pagina 9
1.2 Criticità cliniche legate all'uso delle valvole cardiache artificiali pagina 9
Capitolo 2: L'ingegneria tissutale applicata alle valvole cardiache pagina 11
2.1 Descrizione delle valvole cardiache ingegnerizzate pagina 12
2.1.1 Architettura e meccanica del tessuto valvolare cardiaco nativo pagina 12
2.1.2 Ingegneria tissutale in vitro e in situ pagina 14
2.1.3 Caratteristiche dello scaffold pagina 17
2.2 Classificazione degli scaffold delle valvole ingegnerizzate pagina 18
2.2.1 Scaffold sintetico pagina 18
2.2.1.1 Elastomeri termoplastici ed elastomeri poliuretanici pagina 19
2.2.1.2 Elastomeri a base di poliidrossialcanoato (PHA) pagina 20
2.2.1.3 Elastomeri termoplastici a base di policaprolattone (PCL) pagina 22
2.2.1.4 Elastomeri termoindurenti a base di poliglicerolo sebacato (PGS) pagina 23
2.2.2 Scaffold biologico da tessuti decellularizzati pagina 25
Capitolo 3: Esempio applicativo nei pazienti pediatrici di una valvola cardiaca tubolare ingegnerizzata pagina 28
3.1 Fabbricazione e decellularizzazione dei tubi di tessuto pagina 28
3.2 Fabbricazione della valvola pagina 30
3.3 Test in vitro pagina 31
3.4 Limiti e prospettive della valvola tubolare pediatrica pagina 35
Conclusioni pagina 37
Bibliografia pagina 39

Abstract

Le valvulopatie colpiscono circa il 2% della popolazione mondiale e rappresentano un importante problema di salute pubblica. La disfunzione valvolare, soprattutto legata alle valvole aortica e polmonare, ha un impatto estremamente significativo e causa la morte di decine di migliaia di persone ogni anno. Il rischio di sviluppare la malattia, inoltre, aumenta drasticamente con l'avanzare dell'età e, in considerazione dell'incremento dell'aspettativa di vita in tutto il mondo, è necessario trovare soluzioni terapeutiche efficaci. Le attuali terapie si basano principalmente sulla sostituzione valvolare e, in particolare, esistono due tipi di valvole protesiche, entrambe caratterizzate da importanti limitazioni. Le valvole meccaniche, infatti, possono causare tromboembolismo e rendono necessaria l'assunzione a vita di terapia anticoagulante; le protesi biologiche, a causa del progressivo deterioramento dei tessuti, hanno una durata limitata e possono richiedere un re-intervento. L'ingegneria dei tessuti cardiovascolari è un settore multidisciplinare che lega i principi ingegneristici e le scienze della vita con il fine di superare i limiti delle attuali protesi valvolari. A partire da uno scaffold tridimensionale, l'obiettivo è quello di sviluppare il tessuto valvolare dai suoi componenti cellulari in modo da creare valvole cardiache vitali, con un'emodinamica eccellente e la capacità di rimodellarsi e crescere una volta impiantate.

Introduzione

Le valvulopatie causano il malfunzionamento delle valvole cardiache le quali, non essendo più in grado di svolgere la propria funzione, non garantiscono l'unidirezionalità del flusso sanguigno.

Si tratta di patologie che colpiscono circa il 2% della popolazione mondiale ma, essendo spesso conseguenza dell'invecchiamento, questa percentuale è destinata a crescere e a diventare di primaria importanza, a fronte di una società in cui l'età media sta inesorabilmente avanzando.

Attualmente, l'unica opzione terapeutica possibile consiste nella riparazione o, nei casi più gravi, nella sostituzione della valvola malata. A questo proposito, in commercio esistono dispositivi protesici meccanici e biologici che hanno però alcune importanti limitazioni riguardanti, rispettivamente, la biocompatibilità e la durata.

Per quanto riguarda la popolazione pediatrica, circa l'1% dei neonati presenta un malfunzionamento congenito delle valvole cardiache, che costringe i pazienti a sottoporsi ad una serie di interventi chirurgici necessari ad adattare il dispositivo protesico alla loro costante crescita fisiologica.

L'ingegneria tissutale si propone di sviluppare un sostituto valvolare ingegnerizzato, innovativo rispetto alle soluzioni cliniche attualmente in uso in quanto, essendo un costrutto paziente-specifico e popolato di cellule "vitali", risolverebbe i problemi di biocompatibilità, di immunogenicità e di durata delle protesi meccaniche e biologiche. Inoltre, sarebbe in grado di crescere con il paziente e quindi potrebbe rivelarsi un'ottima opzione terapeutica anche e soprattutto in ambito pediatrico.

Si tratta di un approccio che prevede l'utilizzo di cellule staminali autologhe, quindi appartenenti al paziente, che vengono successivamente coltivate e, se necessario, differenziate in vitro (in alcuni casi anche in situ) con lo scopo di creare un costrutto "vivente" capace di rimodellarsi in base agli stimoli a cui viene sottoposto.

Risulta quindi fondamentale il ruolo dello scaffold sul quale seminare le cellule autologhe, che deve essere biocompatibile e biodegradabile, deve poter permettere la crescita e la proliferazione cellulare e deve avere forma, dimensioni e proprietà meccaniche il più simili possibile a quelle dei lembi valvolari nativi, al fine di poter costituire un valido supporto per la corretta crescita e differenziazione delle cellule. Si tratta, però, di un'importante sfida all'interno della comunità scientifica, in quanto le valvole cardiache sono caratterizzate da tre diversi foglietti di tessuto connettivo fibroso che conferiscono proprietà meccaniche uniche e difficilmente replicabili.

La presente tesina si propone di analizzare i limiti delle protesi valvolari attualmente in uso, di approfondire i vantaggi e gli svantaggi dei possibili materiali con cui realizzare lo scaffold di un costrutto valvolare ingegnerizzato e, infine, di esplorare le prospettive future di questa tecnologia, in particolare quelle applicabili ad un contesto pediatrico e quindi riguardanti la capacità del tessuto ingegnerizzato di crescere e rimodellarsi all'interno dell'organismo a seguito dell'impianto.

L'obiettivo è quindi quello di fornire una panoramica completa delle conoscenze attuali in questo campo e di individuare le potenzialità di un settore che, sebbene ancora in fase di ricerca sperimentale, si prospetta estremamente promettente negli ambiti della bioingegneria e della medicina rigenerativa.

Capitolo 1. Le valvole cardiache meccaniche e biologiche

Il cuore dei mammiferi presenta quattro valvole: aortica, polmonare, mitrale o bicuspide e tricuspide (Figura 1.1). Le prime due sono anche note come valvole semilunari e sono collocate a monte delle arterie che lasciano il cuore, mentre le seconde due si trovano tra gli atri e i ventricoli e prendono il nome di valvole atrioventricolari. Le valvole cardiache hanno la funzione di mantenere l'unidirezionalità del flusso sanguigno e di impedirne il reflusso. I lembi delle valvole cardiache si aprono e si chiudono in maniera sincrona circa quattro milioni di volte all'anno e più di tre miliardi di volte durante il corso della vita [1].

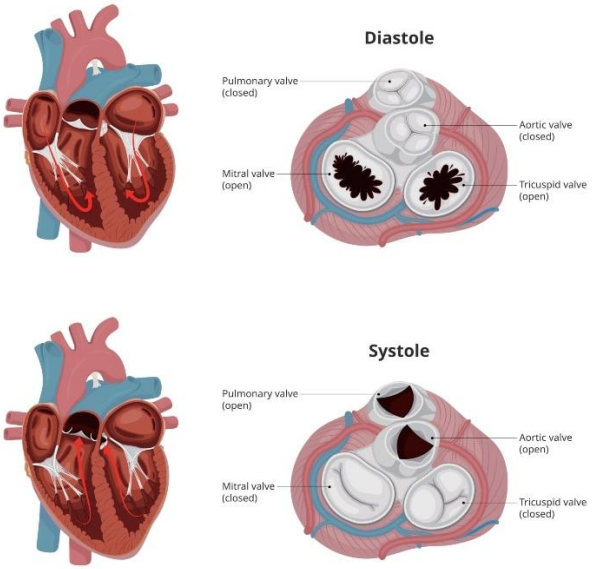

Figura 1.1: le valvole cardiache nelle fasi di diastole (sopra) e sistole (sotto).

Le cardiopatie valvolari colpiscono circa il 2% della popolazione mondiale e rappresentano un importante problema di salute pubblica. In particolare, si è stimato che le malattie cardiache avessero un'incidenza di oltre cinque milioni di casi nella popolazione adulta statunitense all'inizio del XXI secolo e che la disfunzione valvolare, soprattutto legata alle valvole aortica e polmonare, rappresenti una fetta significativa di queste ultime causando la morte di circa 20.000 persone in tutto il mondo ogni anno [1,2].

Circa l'1% dei neonati presenta un malfunzionamento congenito delle valvole cardiache ma, principalmente, i problemi legati a queste ultime sono dovuti alla calcificazione e a difetti genetici nella struttura delle proteine della matrice [1]. Si è notato, inoltre, come le cardiopatie valvolari, inclusa la stenosi valvolare (Figura 1.2), abbiano un impatto maggiore sui pazienti più anziani, a causa di cambiamenti degenerativi legati all'età come un maggiore deposito di calcio ed una più alta probabilità di sviluppare problemi di tipo coronarico e a livello del tessuto connettivo; a questo

proposito è stato stimato che, entro il 2050, la popolazione ottantenne risulterà triplicata e saranno quindi fondamentali soluzioni efficaci contro queste patologie [2].

Figura 1.2: raffigurazione della stenosi valvolare aortica.

Poiché i farmaci non possono in alcun modo riparare il danno valvolare conseguente a degenerazione calcifica, l'attuale strategia di trattamento prevede la riparazione o la sostituzione delle valvole. In particolare, per quanto riguarda quest'ultima, i principali dispositivi medici utilizzati sono le valvole cardiache meccaniche e bioprotesiche (biologiche).

1.1 Descrizione e confronto tra valvole cardiache meccaniche e biologiche

Le valvole cardiache meccaniche hanno un'elaborata struttura, tipicamente caratterizzata da un disco oscillante (valvola mono-leaflet) o un doppio emidisco (valvola bi-leaflet), che si apre e si chiude con il fine di regolare la direzione del flusso sanguigno. In particolare, il funzionamento delle valvole cardiache è comandato da una differenza di pressione poiché, quando il cuore si contrae e la pressione di monte supera quella di valle, la valvola si apre permettendo al sangue di fluire e viceversa, quando si rilassa, la valvola si chiude evitando il reflusso. Per la costruzione di questa tipologia di dispositivi vengono utilizzati materiali rigidi biocompatibili che offrono un'elevata durabilità e resistenza alla deformazione, appartenenti quindi alle classi dei metalli, dei polimeri e delle ceramiche [3].

Le valvole cardiache biologiche sono caratterizzate da una discreta varietà di modelli, essendo realizzate utilizzando tessuti provenienti da fonti umane o animali. In base a questo possono, infatti, essere classificate in autologhe, omologhe ed eterologhe. Le prime vengono realizzate utilizzando tessuti del paziente stesso, le seconde sono valvole umane prelevate da un donatore mentre le terze sono costruite a partire da tessuto pericardico (il rivestimento esterno del cuore) o da tessuti valvolari prelevati da maiali o bovini.

1.1.1 Protesi meccanica mono-leaflet

La valvola meccanica mono-leaflet (Figura 1.3), anche definita "a disco oscillante", è caratterizzata da un disco centrale in grafite, rivestito da carbonio pirolitico, collocato all'interno di un anello

circolare grazie all'utilizzo di due supporti, solidali all'anello rigido esterno. L'intera struttura è, inoltre, rivestita da un ulteriore anello in materiale polimerico [4].

Figura 1.3: esempio di una valvola meccanica mono-leaflet.

Questo tipo di protesi, inizialmente, permetteva un'inclinazione del disco di 60° mentre oggi la massima apertura della valvola è di circa 70°. Nonostante i miglioramenti apportati nel corso degli anni, il posizionamento del disco e dei supporti presenta ancora delle criticità legate soprattutto alla stabilità della struttura e al conseguente cedimento della stessa [4]. Perciò, la valvola bi-leaflet è preferita.

1.1.2 Protesi meccanica bi-leaflet

La valvola meccanica bi-leaflet (Figura 1.4), è simile a quella precedentemente descritta ma l'otturatore è costituito da un doppio emidisco, che ha permesso un notevole miglioramento delle caratteristiche fluidodinamiche della protesi, rendendole più simili a quelle fisiologiche. I due emidischi, infatti, formano un angolo di 180° in chiusura e uno di 85° in apertura rispetto al piano orizzontale. L'anello esterno è costruito in titanio o in carbonio pirolitico e rivestito in dacron, mentre i dischi sono in grafite e tungsteno rivestiti con carbonio pirolitico [4].

Figura 1.4: esempi di valvola meccanica bi-leaflet.

1.1.3 Protesi biologiche porcine e pericardiche

Le valvole biologiche in tessuto animale (Figura 1.5) si ottengono a partire dalla decellularizzazione e dal trattamento chimico di valvole cardiache porcine o di pericardio bovino al fine di preservare i tessuti e di ridurne l'immunogenicità. I reagenti chimici utilizzati possono essere molteplici, ma è necessario che siano biocompatibili e utili al miglioramento delle proprietà meccaniche, della durata e della stabilità della valvola; un esempio significativo di reagente di reticolazione è rappresentato dalla glutaraldeide. Le protesi porcine, dopo essere state prelevate dal cuore del maiale, vengono inserite in uno stent (supporto rigido) e successivamente impiantate nel paziente; le valvole pericardiche sono prodotte da pericardio bovino opportunamente sagomato e inserito in un supporto. Quest'ultimo, però, può causare problemi di ingombro e modificare le caratteristiche della protesi su cui è applicato in quanto ha influenza sulla rigidezza e sulla durata del dispositivo; a questo proposito, infatti, sono state progettate valvole protesiche senza supporto.

Attualmente è possibile inserire la protesi in tessuto xenogenico (tessuto animale) fissato con glutaraldeide tramite procedura transcatetere: si tratta di un approccio significativamente meno invasivo rispetto all'intervento chirurgico a cuore aperto ed è attuabile anche in individui ad alto rischio [5].

Figura 1.5: esempi di valvole biologiche in tessuto animale: valvola porcina (a sx) e valvola pericardica (a dx)

1.2 Criticità cliniche legate all'uso delle valvole cardiache artificiali

Gli interventi di cardiochirurgia per la sostituzione di valvole cardiache sono svolti a livello mondiale e contribuiscono a migliorare efficacemente l'aspettativa di vita dei pazienti. Attualmente, le valvole protesiche meccaniche e biologiche sono utilizzate clinicamente ma presentano sia punti di forza che alcune limitazioni. Le valvole cardiache meccaniche risultano, infatti, essere ottime in termini di durata e di proprietà meccaniche, ma il loro principale svantaggio riguarda le eventuali complicanze tromboemboliche causate dalla presenza di materiali estranei nell'organismo. La formazione di trombi, ovvero di masse solide costituite da globuli rossi, bianchi e piastrine sulle superfici della

valvola protesica, può portare alla perdita di funzionalità e talvolta al decesso del paziente. Risulta, quindi, essere necessaria per i pazienti una terapia anticoagulante permanente che causa una riduzione dell'ematocrito piastrinico ed un conseguente aumento del rischio di sanguinamento grave, limitando la possibilità di future procedure chirurgiche [1,2]. In particolare, nelle protesi meccaniche gli elementi maggiormente trombogenici sono quelli costituiti da dacron e teflon, tipicamente presenti nell'anello esterno, mentre i lembi valvolari hanno una biocompatibilità più elevata [6].

Le valvole biologiche, invece, sono caratterizzate da un'ottima emodinamica ed emocompatibilità rispetto a quelle meccaniche, ma spesso vanno incontro a deterioramento strutturale e calcificazione. Recentemente è stato possibile migliorare notevolmente le prestazioni delle bioprotesi in termini di resistenza alla degradazione enzimatica grazie alla reticolazione con glutaraldeide con incremento della durabilità dei tessuti [2]. È stato osservato come la calcificazione sia molto ridotta nei pazienti anziani, principalmente a causa della senescenza immunitaria; infatti, nei soggetti di età superiore ai 65 anni, il deterioramento valvolare si verifica, in media, dopo dieci anni dall'intervento mentre in pazienti di età inferiore ai 35 anni il tempo risulta essere dimezzato [6]. Ad ulteriore conferma di quanto appena riportato, è stato evidenziato come la produzione di calcio sia stimolata dalle citochine (mediatori che permettono la comunicazione delle cellule del sistema immunitario), rilasciate in quantità significativa dalle cellule immunitarie dei pazienti più giovani [7].

Una problematica ancora aperta e molto discussa riguarda, invece, il trattamento della disfunzione valvolare con sostituzione chirurgica nei bambini e negli adolescenti: a causa della continua crescita somatica, sono richiesti molteplici reinterventi per adattare il dispositivo protesico ai cambiamenti delle dimensioni del cuore [5].

La protesi ideale, quindi, richiederebbe un'eccellente emodinamica ed emocompatibilità, dovrebbe essere in grado di rimodellarsi e di crescere con il paziente e dovrebbe possedere un'immunogenicità assente/minima, resistendo quindi alla degradazione e alla calcificazione. Infine, dovrebbe poter essere inserita tramite una procedura transcatetere in modo da rendere l'intervento il meno invasivo possibile e non dover ricorrere all'operazione a cuore aperto. A questo proposito, l'ingegneria tissutale, tramite la produzione di sostituiti valvolari ingegnerizzati, mira a superare i limiti delle attuali protesi valvolari creando valvole cardiache vitali e su misura per il ricevente [5].

Capitolo 2. L'ingegneria tissutale applicata alle valvole cardiache

La ricerca di metodi alternativi per superare le limitazioni delle valvole sostitutive in uso ha portato all'adozione delle tecniche di ingegneria tissutale (TE) al fine di produrre sostituti valvolari ingegnerizzati. Il concetto di TE delle valvole cardiache (Figura 2.1) è stato introdotto da Shinoka et al. nel 1995 e consiste nel fornire uno scaffold tridimensionale come "scheletro" per lo sviluppo di un nuovo tessuto a partire dai suoi componenti cellulari, con l'obiettivo di produrre un neo-tessuto per sostituire o riparare quello danneggiato [1]. L'ingegneria tissutale potrebbe migliorare la limitata capacità di auto-guarigione dei tessuti danneggiati, malformati o malati attraverso la ricostruzione guidata della matrice extracellulare (ECM) nativa, con adeguata integrità biomeccanica e fornendo i necessari stimoli fisici e biologici [8]. Lo scaffold, nello specifico, dovrebbe costituire l'ambiente idoneo all'adesione cellulare e alla conseguente crescita del tessuto; inoltre, secondo le procedure attualmente in fase di studio, le cellule seminate sul supporto possono successivamente proliferare e differenziarsi sia in vitro che in vivo. Il fine ultimo della TE, quindi, è quello di fabbricare un neo-tessuto che riproduca nel modo più fedele possibile le caratteristiche del tessuto originale, che non induca reazioni di tipo immunogenico o infiammatorio e che abbia adeguate proprietà meccaniche e di durabilità [1].

Nel campo delle valvole cardiache, il tessuto neoformato dovrebbe, idealmente, resistere all'ambiente meccanico dinamico di destinazione, guidare la rigenerazione del tessuto malato e, soprattutto, avere la capacità di crescere con il paziente. Poiché, spesso, le malattie valvolari cardiache comportano una perdita importante di cellule sane e un danneggiamento del tessuto nativo, le potenzialità dell'ingegneria tessutale per sostituti valvolari cardiaci (HVTE) risultano evidenti e particolarmente significative. Attualmente, si sta cercando di ottenere le proprietà sopraelencate mediante la costruzione di un design biomimetico dei costrutti ingegnerizzati in grado di riprodurre l'ambiente microscopico della valvola cardiaca in vivo, sebbene ciò debba essere ancora testato a livello clinico [8].

Il processo che porta alla fabbricazione di un nuovo tessuto può essere riassunto in tre fasi principali:

1. la creazione di uno scaffold tridimensionale;
2. la selezione e la coltura delle cellule;
3. lo sviluppo in vitro del tessuto ingegnerizzato.

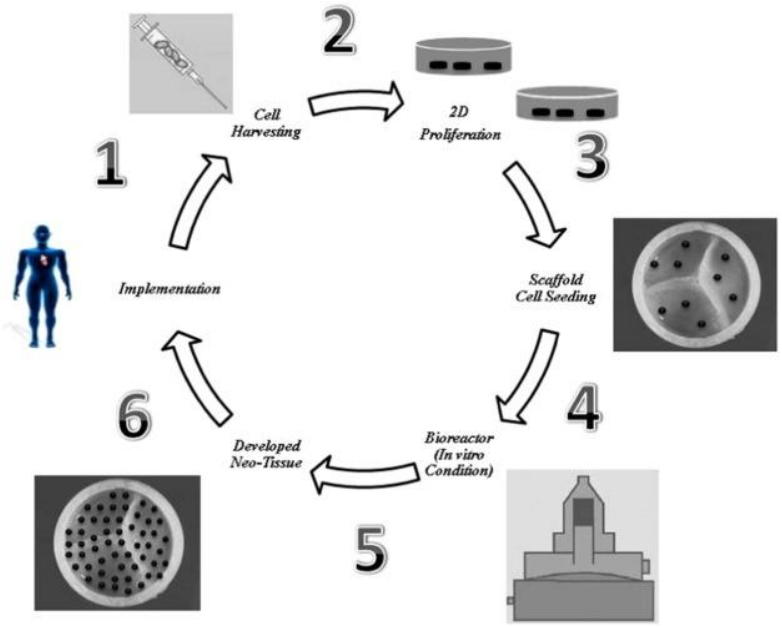

Figura 2.1: la sequenza delle fasi per l'ingegnerizzazione delle valvole cardiache.

2.1 Descrizione delle valvole cardiache ingegnerizzate

La corretta funzionalità delle valvole durante il ciclo cardiaco è possibile grazie ad una complessa rete di elementi presenti all'interno della matrice extracellulare, che sono responsabili delle proprietà meccaniche necessarie per sostenere il lavoro richiesto a tali strutture. La ECM della valvola cardiaca è sintetizzata durante lo sviluppo embrionale, rimodellata e mantenuta durante la vita da cellule residenti; qualsiasi alterazione nella corretta organizzazione dell'ECM può compromettere la funzione biomeccanica della valvola e portare a problemi quali la chiusura o l'apertura incompleta della stessa e alla conseguente insufficienza valvolare [14]. Alla base del processo che porta alla formazione di valvole cardiache ingegnerizzate ci sono l'architettura ed i materiali che compongono lo scaffold; quest'ultimo fornisce, infatti, il supporto strutturale e gli stimoli alle cellule seminate e, successivamente, coltivate su di esso [8]. Al fine di poter realizzare un supporto che permetta alle cellule di proliferare e di dar vita ad un neo-tessuto specializzato e funzionale, è necessario analizzare la struttura del tessuto valvolare cardiaco nativo, la cui ECM ha forma macroscopica, dimensioni e microarchitetture fibrillari uniche [9].

2.1.1 Architettura e meccanica del tessuto valvolare cardiaco nativo

Le cuspidi originali delle valvole cardiache sono composte da tre foglietti flessibili con un diametro valvolare di circa 23-26 mm ed uno spessore di circa 0,5 mm [8]. La struttura del foglietto valvolare risulta essere altamente complessa poiché, lungo la sezione trasversale, si compone di tre diversi strati di tessuto (lamina fibrosa, spongiosa e ventricolare) ciascuno dei quali è caratterizzato dalla propria composizione proteica e da una specifica architettura della ECM (Figura 2.2) [10]. La lamina fibrosa,

in particolare, si compone di una struttura di fibre collageniche, prevalentemente ordinate lungo la direzione circonferenziale, che conferiscono al foglietto la resistenza meccanica necessaria per resistere agli sforzi ciclici esercitati dal sangue in movimento [11]. La lamina ventricolare è caratterizzata da fibre elastiche (principalmente elastina), orientate lungo la direzione radiale, che permettono alla valvola di avere l'elasticità necessaria per chiudersi e aprirsi correttamente [12]. Le proteine orientate circolarmente e radialmente nei due strati appena descritti conferiscono una struttura anisotropa non omogenea e proprietà meccaniche non lineari ai foglietti valvolari, rendendoli in questo modo particolarmente difficili da replicare in laboratorio utilizzando gli scaffold convenzionali per la TE e, di conseguenza, rendendo necessaria la ricerca di una nuova generazione di scaffold biomimetici per la HVTE [8]. La lamina spongiosa, infine, è costituita da proteoglicani orientati casualmente, che agiscono come un cuscinetto tra gli strati precedentemente descritti [12].

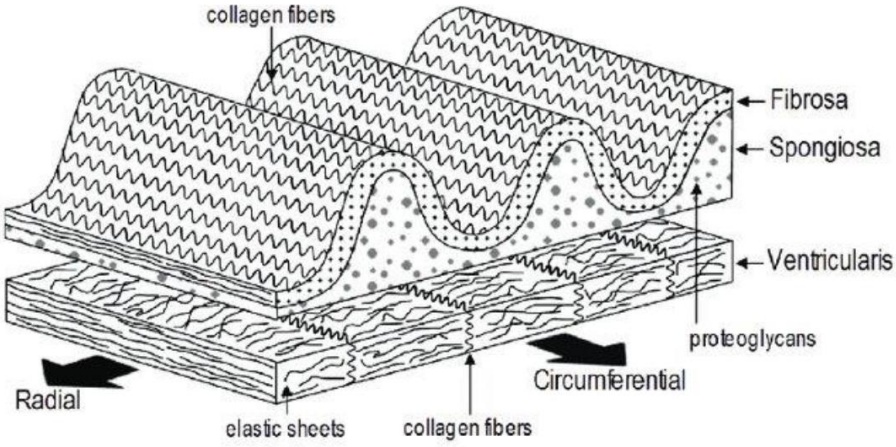

Figura 2.2: rappresentazione della struttura di una sezione trasversale di un lembo valvolare cardiaco.

In vivo, le valvole cardiache umane sono responsabili del controllo del flusso sanguigno che deve mantenersi unidirezionale. In condizioni normali, il cuore batte mediamente 100.000 volte al giorno, oltre 3 miliardi di volte nell'arco della vita [8]. Conseguentemente, le valvole cardiache sono sottoposte a carichi meccanici ciclici altamente dinamici; i lembi valvolari, negli adulti, subiscono una pressione ed uno stress di taglio rilevanti poiché costantemente soggetti al flusso sanguigno. La velocità media del sangue è di circa 1,35 ± 0,35 m/s, la pressione può giungere fino a 12 kPa e lo stress di taglio è compreso tra 30 e 1500 dyne/cm^2 [1]. Uno scaffold valvolare efficace deve poter mimare le proprietà meccaniche dell'ECM nativa sia durante la prima fase di sostituto temporaneo in vivo, sia allo scopo di fornire i segnali adatti alle cellule che andranno a riparare o rigenerare il tessuto di interesse [8]. Sperimentazioni su valvole aortiche di provenienza porcina hanno evidenziato come i lembi presentino un comportamento elastico quasi quattro volte superiore nella direzione radiale

rispetto a quella circonferenziale; le fibre radiali, infatti, risultano più increspate di quelle longitudinali. Inoltre, il rapporto tra il modulo elastico nella direzione circonferenziale e quello nella direzione radiale risulta dell'ordine delle decine. Ad esempio, test meccanici uniassiali hanno rivelato come il modulo elastico nella fase di carico iniziale vari tra i 2 e i 10 kPa nella direzione radiale e tra i 20 e i 100 kPa in quella circonferenziale, mentre test biassiali hanno ulteriormente evidenziato come l'estensibilità (quantificata dalla deformazione di Green) dei lembi della valvola cardiaca risulti significativamente diversa nelle due direzioni [8, 13].

2.1.2 Ingegneria tissutale in vitro e in situ

Attualmente, esistono due modalità diverse tramite cui si sta cercando di proseguire nel campo dell'HVTE, le quali differiscono principalmente per l'ambiente in cui avviene lo sviluppo e la maturazione dei tessuti valvolari. L'ingegneria tissutale delle valvole cardiache in vitro (Figura 2.3) è l'approccio comunemente più utilizzato e richiede l'espansione delle cellule in laboratorio.

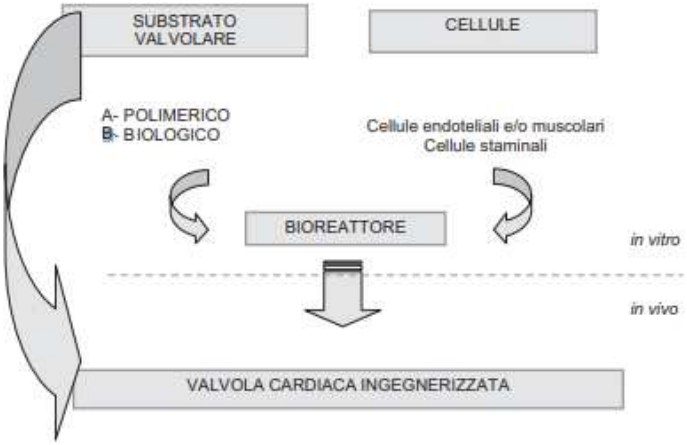

Figura 2.3: processo di realizzazione delle valvole cardiache ingegnerizzate in vitro.

Generalmente, si procede creando uno scaffold che replichi, nel modo migliore possibile, la struttura della valvola cardiaca nativa sulla quale, successivamente, vengono seminate le cellule del paziente [6]. Queste ultime sono cellule staminali o progenitrici e le motivazioni che hanno portato alla scelta di queste tipologie cellulari stanno nella loro unicità biologica, poiché entrambe giocano un ruolo cruciale nello sviluppo, nella riparazione e nel mantenimento dei tessuti del corpo. Le cellule staminali sono cellule indifferenziate in grado di replicarsi per lunghi periodi e di differenziarsi in molteplici linee cellulari; quando vengono seminate su scaffold in vitro possono essere guidate nella differenziazione grazie ad un insieme di fattori controllabili in laboratorio, quali l'architettura e le proprietà fisico-chimiche dello scaffold, una composizione adeguata del mezzo di coltura cellulare (in particolare, la presenza di specifici fattori di crescita e altre biomolecole) e una stimolazione

meccanica, elettrica o magnetica appropriata [15]. D'altra parte, le cellule differenziate risultano particolarmente utili nel campo della medicina rigenerativa e dell'ingegneria tissutale poiché possiedono il fenotipo corretto per una specifica applicazione e svolgono le funzioni biologiche desiderate, come la produzione di matrice extracellulare, la secrezione di specifiche molecole segnale e l'adeguata interazione con le cellule e i tessuti circostanti. L'utilizzo delle cellule staminali, però, è considerato più vantaggioso rispetto a quello delle cellule differenziate poiché le prime sono ottenibili più facilmente e in maggiori quantità, hanno una capacità proliferativa sensibilmente più elevata, sono di supporto alla vascolarizzazione degli scaffold e possono essere applicate ad una vasta gamma di situazioni, essendo in grado di differenziarsi successivamente [15].

Esistono quattro principali fonti di cellule staminali (Figura 2.4):

- il tessuto embrionale, dal quale derivano le cellule staminali embrionali; esse hanno la capacità di differenziarsi in tutti i tipi di cellule del corpo umano, incluse le cellule placentali e, per questo motivo, sono dette totipotenti. Le cellule staminali embrionali derivate dalla blastocisti, una fase dello sviluppo embrionale, sono invece pluripotenti e possono, quindi, creare qualsiasi tessuto del corpo eccetto la placenta;
- il tessuto fetale, dal quale derivano le cellule staminali fetali; esse hanno la capacità di differenziarsi solo in un numero limitato di tipi cellulari specializzati e sono, quindi, multipotenti. Tuttavia, esistono alcune parti del feto, quali testicoli e polmoni, caratterizzate da cellule pluripotenti;
- gli organi e i tessuti già sviluppati, dai quali derivano le cellule staminali adulte o somatiche; esse possono differenziarsi in un numero limitato di tipi cellulari, specifici per il tessuto in cui risiedono e sono perciò cellule multipotenti. Per esempio, le cellule staminali ematopoietiche del midollo osseo possono differenziarsi nei vari tipi cellulari del sangue;
- la riprogrammazione genetica di cellule adulte, tramite la quale è possibile ritornare allo stato pluripotente, da cui derivano le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs); similmente alle cellule staminali embrionali, le iPSCs sono in grado di differenziarsi in diversi tipi di cellule.

Le cellule staminali adulte tendono ad essere preferite all'interno della comunità scientifica poiché, nonostante la loro capacità di differenziarsi in una quantità limitata di tipi cellulari, non sono soggette a limitazioni etiche e legali che, al contrario, riguardano le restanti tipologie di staminali. Inoltre, possono essere utilizzate in forma autogena e sono presenti in quasi tutti i tessuti dell'organismo [15].

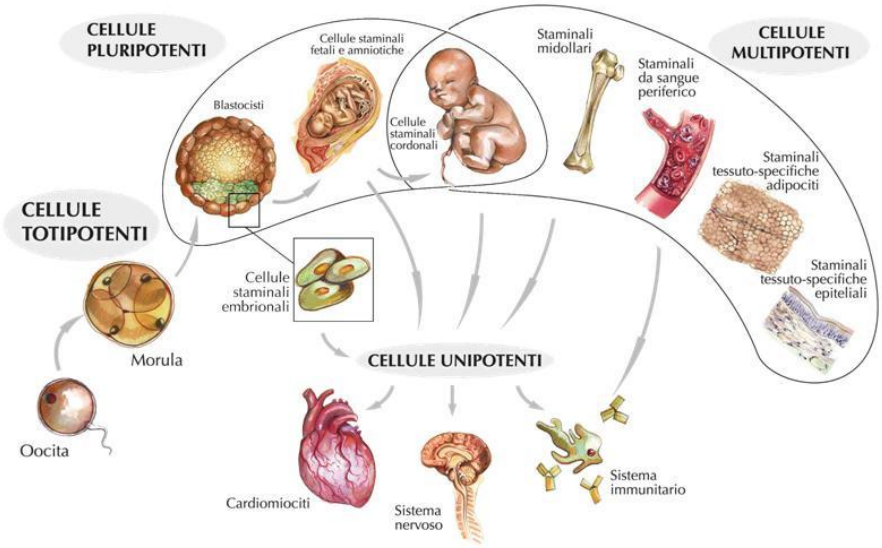

Figura 2.4: gerarchia e provenienza dei differenti tipi di cellule staminali.

Spesso, in alternativa alle cellule staminali, vengono utilizzate anche le cellule progenitrici, le quali sono simili a quelle sopracitate ma, avendo già iniziato un percorso di differenziazione, hanno la capacità di dividersi per un numero limitato di volte [15].

Uno strumento che assume un ruolo di fondamentale importanza per l'ingegneria tissutale in vitro è il bioreattore, il quale consente di ricreare le condizioni fisiologiche di pressione e pulsatilità del flusso sanguigno [6, 16].

Un secondo approccio, per il momento meno esplorato del precedente, risiede nell'ingegneria tissutale delle valvole cardiache in situ, il cui obiettivo è quello di sfruttare le capacità rigenerative e di guarigione del corpo umano. Anche in questo caso, è necessario realizzare uno scaffold che sia in grado di accogliere le cellule staminali o progenitrici del paziente e di permetterne la migrazione e la conseguente differenziazione e proliferazione. Il ruolo assunto dal bioreattore nell'approccio in vitro, viene qui ricoperto interamente dall'organismo, poiché lo scaffold risulta fin da subito inserito nell'ambiente biologico a cui è destinato e, sfruttando i segnali biochimici e biofisici presenti a causa della lesione del tessuto nativo, questo verrà popolato da nuove cellule che procederanno, nel tempo, alla riparazione del lembo valvolare [6, 17]. L'HVTE in situ risulta essere vantaggiosa rispetto a quella in vitro poiché diminuisce il tempo e le risorse necessarie allo sviluppo del tessuto in laboratorio, ma è un processo meno controllabile e, di conseguenza, molto più imprevedibile e che può variare significativamente da un paziente ad un altro.

2.1.3 Caratteristiche dello scaffold

L'architettura degli scaffold, i materiali con cui esso viene realizzato e le condizioni di sviluppo e proliferazione cellulare sono i fattori discriminanti per la realizzazione di un buon prodotto per la HVTE. Le caratteristiche che garantiscono il successo dello scaffold sono:

- la presenza di una rete di pori interconnessi per fornire ossigeno e nutrienti alle cellule lontane dalla superficie;
- l'utilizzo di materiali biocompatibili e biodegradabili;
- il rispetto della forma, delle dimensioni e delle proprietà meccaniche del foglietto valvolare.

In generale, per indagare le proprietà meccaniche del tessuto valvolare cardiaco vengono eseguiti tre tipi di test: test di resistenza a trazione (test monoassiali e biassiali), test di flessione (macro-indentazione e test di piegatura a tre punti) e test di fatica [1].

Il test monoassiale viene comunemente utilizzato per stimare le curve tensione-deformazione dei tessuti, attraverso un apparato che sottopone il materiale in fase di studio ad una forza di trazione fino a rottura. La resistenza a trazione si definisce come $\sigma = F/A$, dove F è la forza applicata e A la sezione trasversale del campione; la deformazione è, invece, definita come $\varepsilon = \Delta L/L_0$, dove L_0 rappresenta la lunghezza iniziale del provino e ΔL la variazione di lunghezza. Tali valori permettono il calcolo del modulo elastico (o modulo di Young) del materiale in esame, ottenuto come il rapporto tra la resistenza e lo stress a trazione: $E = \sigma/\varepsilon$ nella regione lineare della curva tensione-deformazione [1].

Tuttavia, gli studi precedenti sul comportamento tensione-deformazione dei tessuti molli e le osservazioni riguardanti la particolare struttura dei foglietti valvolari nativi analizzate ad inizio capitolo, evidenziano come il test di trazione biassiale, sebbene maggiormente complesso, sia più efficace per valutare queste particolari strutture anatomiche, poiché tiene in considerazione contemporaneamente gli effetti delle forze sia lungo la direzione radiale che lungo quella circonferenziale. A tale proposito, esperimenti sui lembi delle valvole cardiache porcine hanno evidenziato come il modulo di Young e la resistenza a trazione siano più elevati nella direzione circonferenziale, ovvero la direzione lungo cui si orientano le fibre di collagene, rispetto a quella radiale e, inoltre, come i test di trazione monoassiale non rispecchino in pieno le proprietà meccaniche dei tessuti nativi [1].

Al fine di rappresentare compiutamente la deformazione fisiologica del tessuto valvolare, vengono condotti i test di flessione, quali la macro-indentazione e i test di piegatura a tre punti, che consentono di quantificare la deformazione a carichi relativamente bassi. La rigidezza alla flessione del lembo è definita utilizzando il modello biomeccanico della trave con $EI = FL^3/48y_{max}$, dove F è la forza applicata, L è la lunghezza utile di flessione e y_{max} rappresenta la massima profondità dell'indentazione [1].

Infine, il test di fatica viene generalmente svolto al fine di misurare la resistenza di un tessuto sottoposto a carichi e scarichi ripetuti nel tempo, cercando di valutare il carico soglia che determina la formazione di microfratture all'interno del materiale, le quali rendono quest'ultimo meno resistente e più incline alla rottura [1].

2.2 Classificazione degli scaffold delle valvole ingegnerizzate

Lo scaffold di una valvola cardiaca realizzata grazie a tecniche di ingegneria tissutale può essere a base polimerica sintetica o naturale; in entrambi i casi, la selezione dei materiali utilizzati deve basarsi sulla loro biocompatibilità, biodegradabilità e sulle loro caratteristiche meccaniche [1].

2.2.1 Scaffold sintetico

Nel campo dell'HVTE, gli scaffold a base di elastomeri (polimeri caratterizzati da un'elevata elasticità) sintetici biodegradabili offrono numerosi vantaggi, tra i quali:

1. la composizione e la struttura del materiale risultano più controllabili rispetto all'utilizzo di materiali di derivazione biologica ed è possibile ridurre al minimo la variabilità tra diversi lotti [8];
2. la loro realizzazione permette di controllare le caratteristiche meccaniche ottimizzando la capacità di resistere a carichi ciclici e complessi meccanismi di trazione e rilassamento [1,8];
3. godono di bassa immunogenicità e tossicità, in quanto i prodotti della degradazione sono, per la maggior parte, metaboliti endogeni [8];
4. i tassi di degradazione sono regolabili e definiti durante la realizzazione, permettendo il bilanciamento tra la progressiva perdita di proprietà meccaniche dello scaffold sintetico che va degradandosi e la secrezione di nuova ECM del tessuto che si sta rigenerando [1,8];
5. sono caratterizzati da una relativa facilità di lavorazione mediante alcuni comuni metodi di fabbricazione dei materiali, quali stampa 3D, filatura e stereolitografia [8].

Nonostante l'intensificarsi della ricerca in questo settore, l'individuazione di un materiale sintetico biodegradabile che possa efficacemente sostituire le valvole native e fungere da base per la creazione di scaffold per costrutti ingegnerizzati destinati ad applicazioni cliniche, rimane una sfida aperta [1,8]. Le principali difficoltà risiedono nella complessità dell'architettura delle valvole cardiache native e nella mancanza di materiali che combinino un tasso di degradazione controllabile, una lavorabilità adeguata a riprodurre la struttura fibrosa nativa e proprietà meccaniche ottimali. Inoltre, le caratteristiche morfologiche, fisiche, meccaniche e di degradazione di un costrutto HVTE ideale non sono ancora state definite in modo univoco, probabilmente a causa della scarsità di dati a lungo termine sull'efficacia e la sicurezza dei dispositivi ingegnerizzati per l'HVTE in vivo [8].

Di seguito verranno elencati diversi elastomeri sintetici biodegradabili che sono stati esplorati per l'HVTE fino ad oggi.

2.2.1.1 Elastomeri termoplastici ed elastomeri poliuretanici

Gli elastomeri termoplastici sono una categoria di polimeri le cui catene sono unite da interazioni deboli, come i legami ad idrogeno e le interazioni dipolo-dipolo. Spesso, queste molecole presentano un dominio rigido, che garantisce l'integrità strutturale, e un dominio amorfo, che conferisce flessibilità [8].

I polimeri a base di poliuretano (PU, una vasta famiglia di polimeri caratterizzati dalla presenza di legami uretanici nella catena polimerica, la cui formula chimica è NH-(CO)-O (Figura 2.5)) comprendono un'ampia classe di elastomeri con diverse strutture chimiche, proprietà fisiche, velocità di degradazione e metodi di fabbricazione semplici. Queste caratteristiche collocano i poliuretani tra i polimeri sintetici più utilizzati per le applicazioni biomediche.

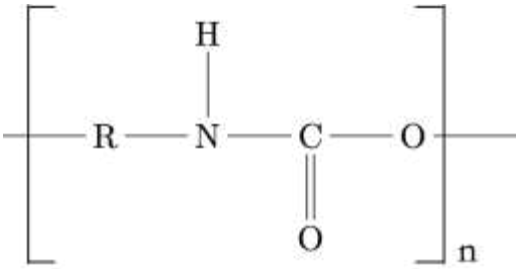

Figura 2.5: formula chimica di un generico poliuretano.

I PU sono tutti caratterizzati da una struttura comune del polimero di base, composto da unità alifatiche o aromatiche, e da una parte più complessa derivata da monomeri di polietere o poliestere. Tradizionalmente, i PU sono stati sviluppati per resistere alla degradazione in quanto utilizzati per impianti a lungo termine ma, più recentemente, sono stati modificati chimicamente al fine di accelerare la loro biodegradabilità [8]. Nella Tabella 2.1 sono stati riassunti alcuni studi sugli elastomeri a base di poliuretano.

Tipo di elastomero PU	**Anno** pubblicazione paper scientifico	**Metodo di fabbricazione**	**Descrizione dello scaffold**	**Risultati significativi**
PCU (policarbonatouretano)	2003 [8,18]	Stampaggio	Struttura a due fogli (valvola mitrale)	Eccellenti prestazioni emodinamiche, lieve calcificazione nel modello di vitello
PEUU (poliesteruretanourea)	2006 [8,19]	Elettrofilatura su mandrino rotante in acciaio inossidabile	Fibre con diversi diametri, porosità. Comportamento anisotropo	Proprietà meccaniche altamente anisotrope, simili a quelle della valvola polmonare nativa. L'aumento della velocità del mandrino ha comportato la produzione di fibre con un indice di anisotropia più elevato.
PU (poliuretano non specificato)	2012 [8,20]	Tecnica di spruzzatura	Foglio di fibre in PU di 0,3 mm di spessore e casualmente orientate e un'unità di fissaggio in Teflon	Il condizionamento degli scaffold in un bioreattore pulsatile migliora la tolleranza delle cellule allo stress di taglio
PEUU (poliesteruretanourea) con PEO (polietileneossido) e PCL (policaprolattone)	2012 [8,21]	Elettrofilatura su mandrino rotante in acciaio inossidabile	Scaffold con fibre presenti in varie densità e caratterizzate da diverse proprietà meccaniche	Morfologia e proprietà meccaniche dello scaffold possono essere regolate utilizzando popolazioni di fibre secondarie
PEUU (poliesteruretanourea)	2015 [8,22]	Elettrofilatura su mandrini conici di angoli di passo variabili	La variabilità dell'angolo di allineamento delle fibre è linearmente proporzionale alla lunghezza dello scaffold	Fibre con struttura curvilinea e proprietà meccaniche locali simili al foglietto nativo. L'architettura delle fibre curvilinee è stata determinata come l'architettura ottimale per il foglietto valvolare

Tabella 2.1: elastomeri a base di PU utilizzati per studi HVTE.

2.2.1.2 Elastomeri a base di poliidrossialcanoato (PHA)

I poliidrossialcanoati (PHA) costituiscono una classe di poliesteri biosintetici, caratterizzati da una struttura polimerica derivata da acidi idrossialcanoici, la cui formula generale è HO-R-COOH, dove R rappresenta una catena alchilica (Figura 2.6).

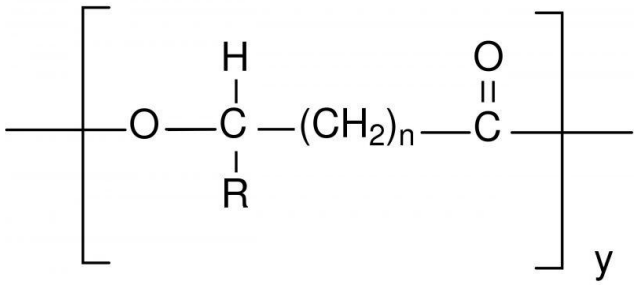

Figura 2.6: formula chimica del poliidrossialcanoato (PHA).

Questi polimeri naturali sono prodotti da una vasta gamma di microrganismi e si distinguono come una categoria di elastomeri che, in genere, dimostrano una maggiore resistenza meccanica rispetto ai

poliuretani. Tale superiorità li rende particolarmente adatti per applicazioni in condizioni dinamiche, inclusi i tessuti impiegati nel sistema cardiovascolare [8]. Nella Tabella 2.2 sono stati riassunti alcuni studi sugli elastomeri a base di poliidrossialcanoato.

Tipo di elastomero PHA	**Anno** pubblicazione paper scientifico	**Metodo di fabbricazione**	**Descrizione dello scaffold**	**Risultati significativi**
PGA (poliglicolide), PHA (poliidrossialcanoato) e P4HB (poli-4-idrossibutirrato)	2000 [8,23]	Lisciviazione di sale	Scaffold a tre foglietti con porosità del 95% (dimensione dei pori: 100-300 μm)	PHA e P4HB possono essere modellati nello scaffold di una valvola cardiaca a tre foglietti e sono caratterizzati da una soddisfacente adesione cellullare e formazione di ECM
Composito P4HB (poli-4-idrossibutirrato) / PGA (poliglicolide)	2000 [8,24]	Saldatura a caldo	Maglia in PGA rivestita in P4HB	Gli scaffold condizionati in ambiente biomimetico in vitro possono funzionare in vivo fino a cinque mesi
Composito P4HB (poli-4-idrossibutirrato) / PGA (poliglicolide)	2002 [8,25]	Saldatura a caldo	Maglia in PGA rivestita in P4HB	Lo scaffold ha mostrato una buona biocompatibilità con cellule stromali estratte dal midollo osseo e i costrutti si sono rivelati simili a quelli nativi per proprietà meccaniche e caratteristiche morfologiche
P3HB (poli-3-idrossibutirrato), P4HB (poli-4-idrossibutirrato), P3HB-co-4HB (poli(3idrossibutirrato-co-4-idrossibutirrato)) + valvola decellularizzata	2004 [8,26]	Rivestimento per immersione del polimero su ECM	Morfologia superficiale, tessitura e microporosità simili alla ECM decellularizzata	Da uno studio condotto in vivo, le valvole ibride matrice/polimero hanno caratteristiche biologiche e biomeccaniche migliori rispetto all'ECM decellularizzata
P3HB (poli-3-idrossibutirrato), P4HB (poli-4-idrossibutirrato), P3HB-co-4HB (poli(3idrossibutirrato-co-4-idrossibutirrato)) + valvola decellularizzata	2004 [8,27]	Rivestimento per immersione del polimero su ECM	Scaffold poroso rivestito con un sottile strato polimerico	Gli scaffold ibridi hanno mostrato eccellenti caratteristiche in termini di biomeccanica, emodinamica e struttura in condizioni di carico sistemico
P4HB (poli-4-idrossibutirrato)	2006 [8,28]	ECM decellularizzata e modellazione stereo litografica tridimensionale	Porosità dell'80% (dimensione dei pori: 200-400 μm)	La semina di cellule crioconservate del cordone ombelicale umano ha mostrato un eccellente potenziale di crescita e formazione di tessuto (in vitro)
PHBHHx (poli(3idrossibutirrato-co-3-idrossiesanoato)) + valvola decellularizzata	2007 [8,29]	Rivestimento di PHBHHx	Scaffold poroso rivestito con un sottile strato polimerico	Il rivestimento in PHBHHx ha migliorato le proprietà meccaniche, ridotto la calcificazione e incentivato la ripopolazione della valvola decellularizzata
P4HB (poli-4-idrossibutirrato) + valvola decellularizzata	2008 [8,30]	Elettrofilatura	Le fibre di PH4B ultrasottili hanno grandezza molto simile alle fibrille dell'ECM nativo	È stata dimostrata la fattibilità nella realizzazione di un nuovo scaffold ibrido con migliorate proprietà meccaniche
Foglio valvolare decellularizzato rivestito con	2009 [8,31]	Elettrofilatura	Fibre di chitosano e P4HB depositate casualmente sulla	I foglietti valvolari ibridi hanno mostrato maggiori proprietà

chitosano e P4HB (poli-4-idrossibutirrato)			superficie di foglietti decellularizzati	meccaniche e una buona citocompatibilità
P4HB (poli-4-idrossibutirrato)	2009 [8,32]	Modellazione stereolitografica	Scaffold con lunghezza e diametro interno paragonabili all'omoinnesto (innesto tra individui della stessa specie)	Scaffold polimerici per l'HVTE realizzati con una tecnica innovativa che permette di creare costrutti personalizzati e specifici per il paziente
P4HB (poli-4-idrossibutirrato)	2010 [8,33]	Modellazione stereolitografica tridimensionale	Scaffold porosi con porosità dell'80% (dimensione dei pori: 200-400 μm)	La generazione di valvole cardiache ingegnerizzate con scaffold di P4HB e cellule derivate dal cordone ombelicale ha avuto successo e risulta promettente per il futuro
Composito P4HB (poli-4-idrossibutirrato) / PGA (poliglicolide)	2010 [8,34]	Rivestimento per immersione su P4HB	Maglia in PGA non tessuta rivestita con P4HB	Il condizionamento meccanico in vitro ha indotto lo sviluppo di un'architettura tissutale simile a quella nativa

Tabella 2.2: elastomeri a base di PHA utilizzati per studi HVTE.

2.2.1.3 Elastomeri termoplastici a base di policaprolattone (PCL)

Gli elastomeri termoplastici (TPE) sono polimeri che combinano le proprietà degli elastomeri (elasticità e flessibilità) con la lavorabilità dei termoplastici. A temperatura ambiente, si comportano come gomme, ma possono essere fusi e rimodellati ripetutamente senza perdere le loro caratteristiche. Questa reversibilità li rende particolarmente interessanti per applicazioni biomediche.

In aggiunta ai TPE anche le termoplastiche a base di poli(ε-caprolattone) (PCL), acido poliglicolico (PGA), acido polilattico (PLA) e i loro copolimeri sono stati ampiamente utilizzati in questo campo in quanto sono materiali che offrono un'eccellente biocompatibilità e una biodegradabilità controllata, caratteristiche essenziali per dispositivi medici come suture e sistemi di rilascio di farmaci approvati dalla FDA [8]. Il tasso di degradazione del PCL (generalmente poco più di tre anni) è inferiore rispetto a quello del PLA (circa due anni) e a quello del PGA (circa due o tre mesi) [1].

La loro sintesi avviene tramite polimerizzazione ad apertura d'anello del monomero acido corrispondente, in presenza di un iniziatore [8]. Nello specifico, la sintesi del PCL (Figura 2.7) si ottiene dall'Ɛ-caprolattone grazie all'azione di un catalizzatore e in presenza di alcoli a basso peso molecolare.

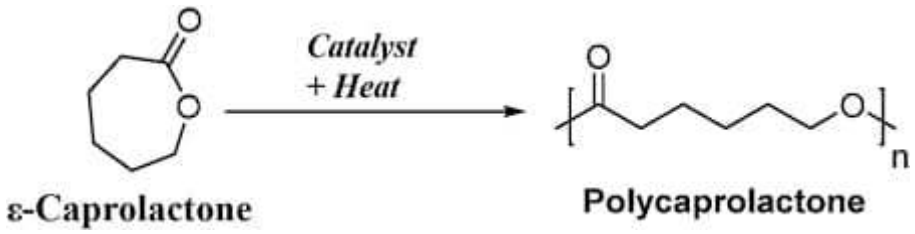

Figura 2.7: sintesi del PCL.

Nella Tabella 2.3 sono stati riassunti alcuni studi sugli elastomeri a base di policaprolattone.

Tipo di elastomero PCL	**Anno** pubblicazione paper scientifico	**Metodo di fabbricazione**	**Descrizione dello scaffold**	**Risultati significativi**
PCL (policaprolattone)	2006 [8,35]	Elettrofilatura e tessitura a maglia	Struttura a maglia: base rettangolare con tre lembi intrecciati. Struttura elettrofilata con diametro delle fibre: 5-10 μm e dimensione dei pori: 15-20 μm.	La resistenza della struttura a maglia e la capacità di trattenere le cellule della struttura ottenuta per elettrofilatura potrebbero costituire un'ottima combinazione per l'implementazione di un buono scaffold
PCL (policaprolattone)	2008 [8,36]	Elettrofilatura	Fibre di diametro di 4 μm a forma di valvola a tre lembi	Il test dei lembi in un simulatore di flusso pulsatile ha mostrato che questi sono in grado di assumere un comportamento simile a quello fisiologico durante un singolo ciclo cardiaco
Composito PGA (poliglicolide) e PLLA (poli-l-lattide)	2010 [8,37]	Punzonatura manuale e meccanica tramite aghi	Foglio di fibre non tessuto	In uno studio in vivo nel modello ovino, le cellule staminali mesenchimali seminate sullo scaffold hanno funzionato bene al momento dell'impianto ma il costrutto ingegnerizzato ha subito rigurgito dopo sei settimane
Composito PEG (polietilenglicole) e PCL (policaprolattone)	2014 [8,38]	Elettrofilatura e stampaggio	Scaffold di PCL anisotropo incorporato in idrogel di PEG	Il PCL potrebbe migliorare la resistenza del costrutto e conferirgli un comportamento meccanico anisotropo
PEGDMA (polietilenglicole dimetacrilato) – PLLA (poli-l-lattide)	2014 [8,39]	Elettrofilatura	Scaffold morfologicamente simile ai lembi nativi	Lo scaffold ha mostrato proprietà meccaniche molto simili a quelle della valvola nativa
Composito PCL (policaprolattone) e Chitosano + valvola decellularizzata	2015 [8,40]	Elettrofilatura	Nanofibre con morfologia perlinata	Gli scaffold hanno proprietà meccaniche superiori alla media e citocompatibilità ed emocompatibilità molto buone
PGA (poliglicolide) – P4HB (poli-4-idrossibutirrato) o PCL (policaprolattone)	2016 [8,41]	Elettrofilatura	Scaffold elettrofilato	Gli scaffold a degradazione lenta sono stati preferiti a quelli realizzati con materiali a degradazione rapida, poiché più vantaggiosi in termini di mantenimento della loro forma, della promozione della proliferazione cellulare e della secrezione di ECM

Tabella 2.3: elastomeri a base di PCL utilizzati per studi HVTE.

2.2.1.4 Elastomeri termoindurenti a base di poliglicerolo sebacato (PGS)

Gli elastomeri termoindurenti, o chimicamente reticolati, rappresentano una classe di elastomeri caratterizzati da una struttura costituita da singole catene polimeriche, interconnesse tra loro mediante legami covalenti. La formazione di un elastomero termoindurente richiede che almeno uno dei

monomeri presenti possieda un minimo di tre gruppi funzionali capaci di reagire con altri monomeri, dando luogo a una struttura reticolare che si sviluppa in modo non lineare. La sintesi degli elastomeri termoindurenti si articola, generalmente, in due fasi distinte:

1. sintesi di un pre-polimero a catena lineare, caratterizzato da un basso grado di reticolazione;
2. processo di indurimento, che conduce alla formazione della struttura reticolare polimerica, ottenuto mediante trattamento termico o esposizione a radiazioni.

Una volta sottoposti al processo di indurimento, gli elastomeri possono andare incontro esclusivamente a fenomeni di degradazione, i quali hanno dimostrato un'eccellente velocità poiché questo tipo di materiale può degradarsi in sole quattro-sei settimane [1,8].

Il poliglicerolo sebacato (PGS) (Figura 2.8) costituisce un esempio di elastomero termoindurente ampiamente studiato. La sua sintesi è stata realizzata per la prima volta nel 2002 attraverso una reazione di policondensazione tra glicerolo e acido sebacico.

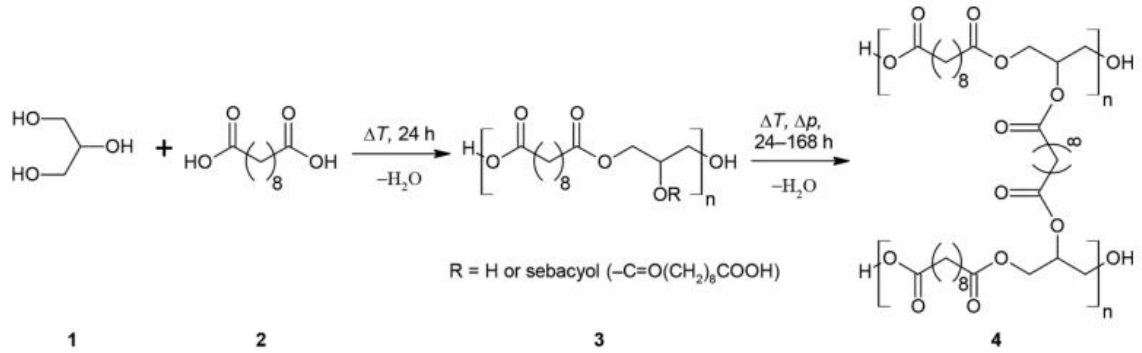

Figura 2.8: schema di sintesi del PGS.

Nel corso degli anni, il PGS è stato oggetto di approfondite caratterizzazioni in relazione alla sua degradazione, alle proprietà meccaniche e alle proprietà biologiche, evidenziandone l'idoneità a diverse metodologie di fabbricazione e la potenziale applicazione in ambito di ingegneria tissutale [8]. I test di resistenza a trazione del PGS hanno mostrato un comportamento non lineare della curva stress-deformazione, un modulo di Young tra 0,025 e 1,2 Mpa, una resistenza massima a trazione maggiore di 0,5 MPa e una deformazione a rottura del 330% (il tessuto delle valvole cardiache native ha un modulo di Young tra 0,02 e 0,5 MPa e una deformazione a rottura del 260%). È stato inoltre dimostrato come le proprietà meccaniche di questo polimero dipendano fortemente dal tempo e dalla temperatura durante la sua sintesi e dal rapporto molecolare tra glicerolo e acido sebacico. In particolare, la temperatura e il modulo di Young sono direttamente proporzionali e l'aumento del tempo durante il quale avviene la sintesi ha comportato un aumento del modulo tangente, il quale però è inversamente proporzionale alla quantità di glicerolo [1].

Nella Tabella 2.4 sono stati riassunti alcuni studi che coinvolgono l'uso del PGS per l'HVTE.

Tipo di elastomero PCL	**Anno** pubblicazione paper scientifico	**Metodo di fabbricazione**	**Descrizione dello scaffold**	**Risultati significativi**
PGS (poliglicerolo sebacato) rivestito di proteine	2007 [8,42]	Fusione di sale	Dimensione dei pori di 75-150 µm, porosità del 90% e spessore di 1,0 mm	Il pre-rivestimento dello scaffold con proteine ha consentito la regolazione del comportamento cellulare, modificando la produzione di ECM e il fenotipo cellulare. Lo scaffold si presenta con proprietà anisotrope e moduli tangenti di picco simili ai lembi della valvola aortica bovina nativa
PGS (poliglicerolo sebacato) e PCL (policaprolattone)	2013 [8,43]	Micromodellazione ed elettrofilatura	Scaffold elettrofilato poroso	Le VIC (cellule interstiziali valvolari) sono state in grado di rimodellare lo scaffold sintetico depositando nuove proteine dell'ECM e mantenendone le proprietà meccaniche
PGS (poliglicerolo sebacato) e PCL (policaprolattone) + acido ialuronico e gelatina	2014 [8,44]	Elettrofilatura e incorporamento in idrogel	Idrogel rinforzato con fibre	Gli scaffold PGS-PCL hanno conferito alla struttura buone proprietà meccaniche, mentre l'idrogel ha migliorato la distribuzione tridimensionale delle VIC
PGS (poliglicerolo sebacato) e PCL (policaprolattone)	2014 [8,45]	Micromodellazione, elettrofilatura e assemblaggio strato per strato	Struttura a tre strati, simile a quella del lembo valvolare	Lo scaffold presenta proprietà anisotrope simili alle valvole cardiache native, inoltre i lembi ingegnerizzati si aprono e chiudono correttamente nel modello ex vivo
PGS (poliglicerolo sebacato) e PCL (policaprolattone) + acido ialuronico e gelatina	2015 [8,46]	Elettrofilatura e incorporamento in idrogel	Idrogel rinforzato con fibre	L'espressione dei geni "collagene di tipo I" ed "elastina" risulta più alta negli scaffold compositi fibra-idrogel

Tabella 2.4: elastomeri a base di PGS utilizzati per studi HVTE.

2.2.2 Scaffold biologico da tessuti decellularizzati

Poiché la biocompatibilità, la modesta velocità di degradazione e la risposta infiammatoria costituiscono i principali limiti degli scaffold polimerici sintetici, la ricerca scientifica nell'ambito dell'HVTE ha orientato la propria attenzione sull'impiego di materiali di origine naturale per la fabbricazione di tali strutture di supporto [1]. Come precedentemente evidenziato, la matrice extracellulare si configura come una complessa aggregazione di proteine strutturali e funzionali, glicoproteine e proteoglicani, organizzati in un'ultrastruttura tridimensionale peculiare e specifica per ciascun tessuto. Essa svolge un ruolo di sostegno strutturale, fornendo siti di adesione per le cellule e agendo da riserva per fattori di segnalazione, i quali modulano processi biologici di primaria importanza quali l'angiogenesi, la vasculogenesi, la migrazione e la proliferazione cellulare. In virtù

di tali caratteristiche, l'ECM stessa è oggetto di approfonditi studi in quanto potenziale scaffold idoneo per la riparazione e la ricostruzione tissutale [47].

Omotrapianti (trapianti di tessuti tra individui della stessa specie ma geneticamente diversi) o xenotrapianti (trapianti di tessuti tra individui di specie diverse) decellularizzati sono stati efficacemente ricolonizzati con diverse tipologie cellulari. Steinhoff et al. hanno condotto esperimenti di semina di miofibroblasti e cellule endoteliali autologhe su condotti valvolari cardiaci allogenici decellularizzati, procedendo successivamente al loro impianto in modelli ovini. Ulteriori studi hanno valutato l'impiego di valvole polmonari suine decellularizzate e ricolonizzate con cellule endoteliali autologhe, sempre su modello ovino [47].

Inoltre, in tempi recenti, sono stati presi in considerazione ulteriori materiali di origine naturale per la realizzazione di scaffold. Taylor et al. hanno analizzato e testato sei differenti tipi di collagene (di tipo I, II, III, V, VI e XI) come materiale di base per scaffold biologici, in quanto il collagene costituisce la principale proteina della matrice extracellulare delle valvole cardiache native, in particolare il collagene di tipo I. L'utilizzo del collagene presenta alcune criticità correlate all'antigenicità, all'immunogenicità, alla limitata manipolabilità, alle proprietà meccaniche e a una biodegradabilità meno controllata; tuttavia, l'ibridazione con altri biomateriali e la reticolazione tra le catene peptidiche hanno permesso di fronteggiare tali potenziali svantaggi. Matheny et al. hanno invece riportato risultati promettenti nell'impiego della sottomucosa intestinale nella valvola cardiaca polmonare suina, in quanto tale scaffold ha dimostrato longevità senza la necessità di terapia anticoagulante o immunosoppressiva. Masters et al. hanno sviluppato uno scaffold naturale di idrogel a base di acido ialuronico, un glicosamminoglicano peculiare in quanto polisaccaride non solfato presente in forma libera, privo di proteine legate covalentemente. Lo studio ha evidenziato che gli idrogel incrementavano significativamente la produzione di ECM e la proliferazione cellulare [1].

Ad oggi, tuttavia, gli scaffold sintetici e biologici non trovano applicazione in ambito clinico, in quanto si trovano ancora in una fase di ricerca e sviluppo. L'attuale prassi terapeutica clinica, infatti, prevede l'impiego di protesi valvolari meccaniche o biologiche.

In prospettiva, qualora le valvole cardiache ingegnerizzate fossero introdotte nella pratica clinica, il protocollo terapeutico del paziente potrebbe articolarsi nelle seguenti fasi:

1. prelievo di cellule mediante anestesia locale;
2. espansione cellulare e successiva differenziazione su scaffold per l'ingegnerizzazione di valvole cardiache in vitro;
3. valutazione delle caratteristiche biochimiche, istologiche e di biocompatibilità del neo-tessuto prima dell'eventuale impianto.

L’uso di cellule staminali autologhe in combinazione con uno scaffold sintetico biodegradabile, però, sembra estremamente promettente.

Capitolo 3. Esempio applicativo nei pazienti pediatrici di una valvola cardiaca tubolare ingegnerizzata

Come accennato precedentemente, le attuali protesi valvolari presentano limitazioni significative per i pazienti pediatrici (di età inferiore ai diciotto anni). La loro incapacità di adattarsi alla crescita somatica del paziente comporta la necessità di reiterati interventi chirurgici al fine di sostituire dispositivi divenuti inadeguati. Pertanto, l'HVTE potrebbe rappresentare un progresso significativo anche e soprattutto in ambito pediatrico, in quanto la capacità di crescita e rimodellamento di tali valvole eviterebbe le numerose operazioni previste dall'attuale prassi clinica.

Diversi tentativi di implementazione di valvole cardiache si sono focalizzati sull'imitazione della morfologia dei lembi valvolari nativi, spesso ricorrendo a stampi complessi. Tuttavia, in tempi più recenti, sono state oggetto di studio HVTE con un design a lembo tubolare, basato quindi su uno stampo più semplice da realizzare. Tale configurazione consiste, infatti, in un singolo tubo, connesso a uno stent, a un telaio o integrato all'interno di un condotto inerte, al fine di generare una dinamica di flusso simile a quella fisiologica. Jay M. Reimer et al. hanno osservato che una valvola di questa tipologia, dotata di un telaio inerte, risulta priva della capacità di crescita, rendendola pertanto inadeguata per l'applicazione pediatrica. Il gruppo di ricerca ha conseguentemente sviluppato una valvola realizzata mediante tecniche di ingegneria tissutale a partire da due tubi di tessuto ingegnerizzato decellularizzati, suturati insieme secondo uno schema specifico mediante l'impiego di suture biodegradabili. Un design di questo tipo vede il tubo esterno fungere da condotto di flusso e fornire i vincoli meccanici necessari affinché il tubo interno svolga la funzione dei lembi valvolari. Le regioni non vincolate di quest'ultimo, infatti, si chiudono verso l'interno quando esposte a contropressione [48].

3.1 Fabbricazione e decellularizzazione dei tubi di tessuto

Per la fabbricazione del tessuto è stato utilizzato un gel di fibrina isotropo con cellule al suo interno, creato miscelando fibrinogeno bovino (4 mg/mL), fibroblasti dermici ovini (1 milione di cellule/mL), trombina (0,38 U/mL) e cloruro di calcio $CaCl_2$ (5 mM). La soluzione così ottenuta è stata iniettata in uno stampo tubolare realizzato in vetro e, dopo due settimane, i tubi di tessuto sono stati trasferiti su tubi di lattice da 16 mm, fissati a collettori e allungati ciclicamente in un bioreattore a flusso pulsato per 5 settimane, fino a raggiungere una deformazione massima dei costrutti del 5% [48]. I tubi di tessuto ingegnerizzato sono stati fabbricati consentendo ai fibroblasti dermici ovini di sostituire il gel di fibrina (Figura 3.1a); le cellule, infatti, hanno sostituito la fibrina (Figura 3.1b, colorazione rossa) con collagene prodotto dalle cellule stesse e allineato lungo la direzione circonferenziale (Figura 3.1b, colorazione verde-azzurra) [48].

Successivamente, i tubi di tessuto sono stati trattati con sodio dodecilsolfato (SDS) all'1% in acqua distillata per sei ore a temperatura ambiente e con agitazione continua. Dopo il trattamento con SDS, i costrutti sono stati sottoposti a tre lavaggi da 10 minuti in Triton X-100 all'1% in acqua distillata a temperatura ambiente e poi ampiamente risciacquati in soluzione salina tamponata con fosfato per una settimana a 4°C. La decellularizzazione ha rimosso i componenti cellulari, lasciando un tubo ingegnerizzato composto esclusivamente dalla matrice (Figura 3.1b), nella quale le fibre di collagene sono state visualizzate mediante colorazione con Picrosirius Red (Figura 3.1c) [48].

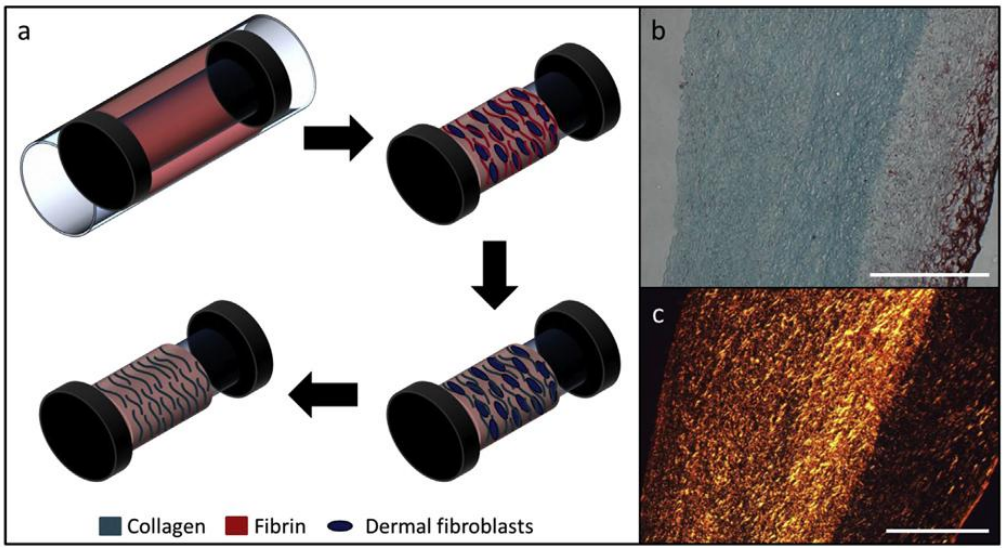

Figura 3.1: (a) schema della fabbricazione del tubo di tessuto. I fibroblasti dermici sostituiscono il gel di fibrina con una matrice di collagene orientata, che rimane inalterata dopo la decellularizzazione. (b) La colorazione tricromica mostra il collagene, colorato in verde-azzurro, e la fibrina, colorata in rosso, dopo la decellularizzazione (scala di 500 μm). (c) Organizzazione delle fibre di collagene evidenziate grazie al Picrosirius red (scala di 500 μm).

I tubi ingegnerizzati sono stati testati a trazione e i risultati ottenuti sono stati confrontati, in termini di proprietà meccaniche, con la valvola Contegra, una valvola polmonare pediatrica attualmente in commercio. I tubi ingegnerizzati sono risultati anisotropi ma lo spessore dei lembi e della radice della valvola Contegra è risultato significativamente diverso dallo spessore di questi ultimi (Tabella 3.1) [48].

Table 1
Mechanical properties of a commercial, pulmonary bioprosthetic valve & the engineered tubes.

Property	Contegra Valve	Engineered Tubes
Leaflet Thickness (mm)	0.21 ± 0.03	1.35 ± 0.05
Leaflet Circumferential UTS (MPa)	3.3 ± 1.1	1.5 ± 0.4
Leaflet Circumferential Modulus (MPa)	12.6 ± 1.8	5.2 ± 0.6
Leaflet Modulus Anisotropy	N/A	3.8 ± 0.9
Root Thickness (mm)	0.76 ± 0.10	1.35 ± 0.05
Root Circumferential UTS (MPa)	3.4 ± 0.3	1.5 ± 0.4
Root Circumferential Modulus (MPa)	6.5 ± 0.1	5.2 ± 0.6
Root Modulus Anisotropy	1.0 ± 0.1	3.8 ± 0.9

Tabella 3.1: confronto tra le proprietà meccaniche a trazione della valvola Contegra e dei tubi ingegnerizzati.

3.2 Fabbricazione della valvola

A partire dai tubi, sono state realizzate quattro valvole cardiache tubolari ingegnerizzate. Ciascuna di esse era costituita da due tubi concentrici aventi un diametro interno di 16 mm, sezionati ad una lunghezza assiale di circa 15 mm per il tubo esterno e 12 mm per quello interno. Successivamente, i due tubi sono stati assemblati mediante sutura continua lungo l'intera circonferenza, posizionando il costrutto di lunghezza inferiore all'interno di quello più lungo, utilizzando suture riassorbibili 7-0 Maxton CV (Figura 3.2a).

Al fine di incrementare i punti di ancoraggio e fornire un rinforzo strutturale mirato, le regioni delle commissure (le zone in cui i lembi si incontrano e si uniscono all'anello valvolare) sono state sottoposte ad una seconda sutura a tratteggio incrociato (Figura 3.2b). Tale soluzione è stata implementata per ottimizzare la resistenza meccanica in corrispondenza di queste aree critiche.

Le porzioni del tubo interno localizzate tra le commissure, non essendo soggette a vincoli meccanici, presentavano la capacità di chiudersi verso l'asse centrale in presenza di una contropressione applicata. Questo meccanismo di chiusura dinamica ha determinato la formazione di tre lembi funzionali, conferendo al dispositivo ingegnerizzato un comportamento analogo a quello di una valvola nativa (Figura 3.2c). Contestualmente, il tubo esterno ha svolto la duplice funzione di condotto per il flusso ematico e di supporto strutturale per il componente interno [48].

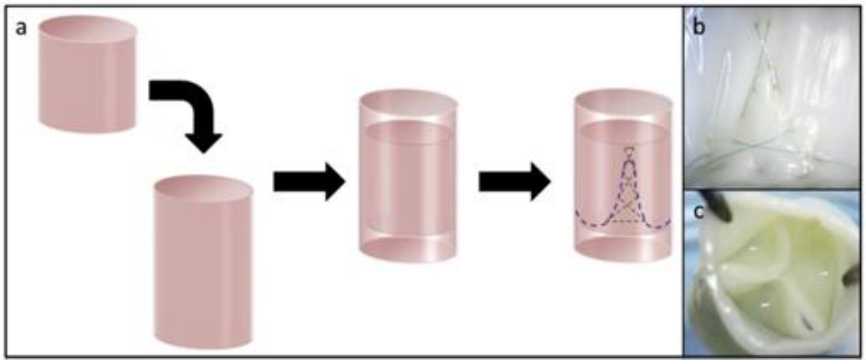

Figura 3.2: (a) schema di una valvola cardiaca tubolare senza supporto realizzata con due tubi concentrici di tessuto ingegnerizzato. Essi sono uniti tramite una linea di sutura degradabile (viola) che definisce le regioni del ventre e delle commissure. (b) Le regioni delle commissure sono rinforzate con un motivo secondario a tratteggio incrociato (linea verde in (a)). (c) Il tubo interno collassa verso l'interno tra le tre commissure quando la valvola è esposta a contropressione, generando tre lembi e un'azione simile a quella di una valvola.

3.3 Test in vitro

Sono stati svolti test meccanici a trazione selezionando delle strisce di tessuto dei tubi, per valutare le proprietà del costrutto. Sono stati prelevati campioni sia lungo la direzione circonferenziale sia lungo quella radiale dei tubi di circa 2 mm x 12 mm. Un'analisi simile è stata svolta anche per strisce di tessuto prelevate dai lembi e dalla radice della valvola Contegra. Questa distinzione tra radice e lembi non è stata fatta per i tubi ingegnerizzati poiché erano caratterizzati da un unico tipo di tessuto. Sono stati eseguiti sei cicli di precondizionamento (0-10% di deformazione) prima di sottoporre i campioni a deformazione fino a rottura a 3 mm/min.

La deformazione è stata calcolata secondo la formula:

$$\varepsilon = ln\frac{L}{L_0}$$

dove L è la lunghezza estesa del campione e L0 è la lunghezza iniziale del campione.

Lo stress (tensione) è stato invece definito come:

$$\sigma = \frac{F}{A_0}$$

dove F: forza applicata e A_0 rappresenta l'area della sezione trasversale indeformata del campione.

La rigidezza longitudinale (modulo di Young) e la resistenza ultima a trazione sono stati considerati rispettivamente come la pendenza della regione lineare della curva sforzo-deformazione e lo stress massimo misurato [48].

Inoltre, è stata misurata la resistenza a trazione della sutura dei tubi ingegnerizzati attraverso test in conformità con la norma ISO 7198, utilizzando una sutura in prolene che è stata annodata a 2 mm dal bordo libero e poi tirata secondo la presunta direzione delle fibre ad una velocità di 50 mm/min.

Infine, tre HVTE e una valvola Contegra di controllo sono state testate in un pulse duplicator (Figura 3.3a) in condizioni polmonari, con un flusso unidirezionale e con una portata media anterograda di

3,6 ± 0,2 L/min. La caduta di pressione diastolica è stata definita come la differenza media tra le pressioni di ingresso e di uscita durante il periodo del ciclo in cui la portata era inferiore o uguale a zero; la caduta di pressione sistolica è stata definita come la differenza di pressione media durante il periodo del ciclo in cui la pressione di ingresso superava quella di uscita. Il rigurgito, invece, si riferisce al rapporto tra il flusso negativo totale e il volume di eiezione (o flusso positivo) per ciascun ciclo. Tutte le grandezze appena menzionate fanno riferimento alla norma ISO 5840.

I dati sono stati poi rappresentati nel grafico in Figura 3.3b, in cui i colori delle forme d'onda corrispondono ai sensori di pressione e flusso posizionati all'interno del pulse duplicator e visibili in Figura 3.3a [48].

Durante la chiusura della valvola si è verificato un effetto "colpo di ariete", tipico nei sistemi duplicatori di impulsi e che influenza tutte le tracce di pressione sul lato di ingresso della valvola [48].

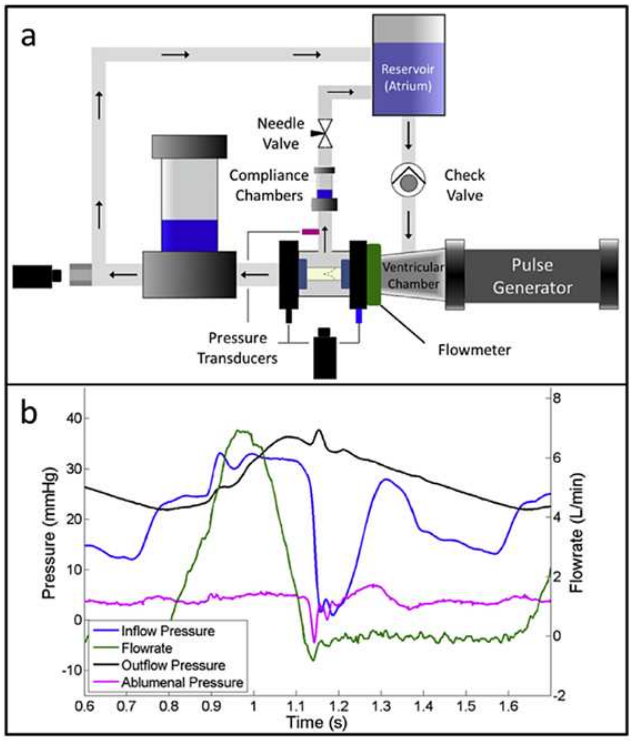

Figura 3.3: (a) pulse duplicator che permette la distensione della radice valvolare e il flusso trans-radice. (b) Alcune tracce rappresentative del flusso e della pressione a cui sono state sottoposte le valvole. L'effetto "colpo di ariete" è visibile in tutte le tracce al tempo t~1.15.

Ciascuna delle HVTE testate aveva un rigurgito ed una caduta di pressione sistolica media inferiori rispetto alla valvola Contegra e l'area della sezione trasversale del foro (Geometric Orifice Area) per quest'ultima risultava sostanzialmente inferiore rispetto a quella delle valvole ingegnerizzate, nonostante i suoi lembi fossero molto più sottili (Tabella 3.2) [48].

Table 2
Pulse duplicator testing of TEHVs compared with a commercial, pulmonary bio-prosthetic valve.

Property	Contegra Valve	TEHVs (n = 3)
Mean Diastolic ΔP (mmHg)	16.5	14.5 ± 3.7
Mean Systolic ΔP (mmHg)	3.3	2.4 ± 0.1
Mean Ablumenal Pressure (mmHg)	4.3	3.5 ± 0.7
Mean Forward Flow Rate (L/min)	3.4	3.6 ± 0.2
Regurgitant Fraction	7.3%	4.8% ± 0.8%
Geometric Orifice Area	52%	76% ± 15%

Tabella 3.2: confronto tra i dati relativi a pressione e flusso per la valvola Contegra e per le valvole tubolari ingegnerizzate.

Di seguito sono riportati i fotogrammi relativi all'apertura di una delle valvole ingegnerizzate (Figura 3.4) in cui è possibile osservare come questa si sia chiusa completamente durante la diastole e poi ha iniziato ad aprirsi simmetricamente prima di raggiungere l'apertura massima al picco della sistole [48].

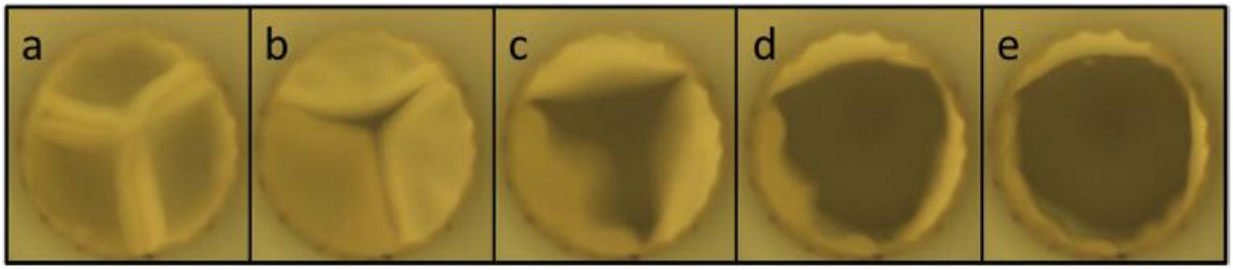

Figura 3.4: immagini del movimento dei lembi valvolari ingegnerizzati durante i test nel pulse duplicator, in condizioni di flusso polmonare. (a) La coaptazione (perfetto contatto tra i lembi in fase di chiusura) dei lembi viene mantenuta durante la diastole. (b-d) Apertura dei lembi durante la sistole. (e) Momento di piena apertura della valvola.

Infine, è stato analizzato il comportamento del costrutto dopo essere stato sottoposto a prove di fatica per due settimane a 100 cicli/minuto nel pulse duplicator. L'HVTE è stata ispezionata visivamente attraverso uno stereoscopio, con particolare attenzione alle zone commissurali (Figura 3.5a): non sono stati rilevati danni macroscopici al tessuto prima (Figura 3.5b-c), durante (Figura 3.5d-e) o dopo (Figura 3.5f-g) la prova. Nello specifico, durante il test, sembrava che le linee di sutura ed in particolare il motivo a tratteggio incrociato si fossero allentati (Figura 3.5b-d-f) ma il tubo interno è rimasto saldamente attaccato a quello esterno (Figura 3.5c-e-g) [48].

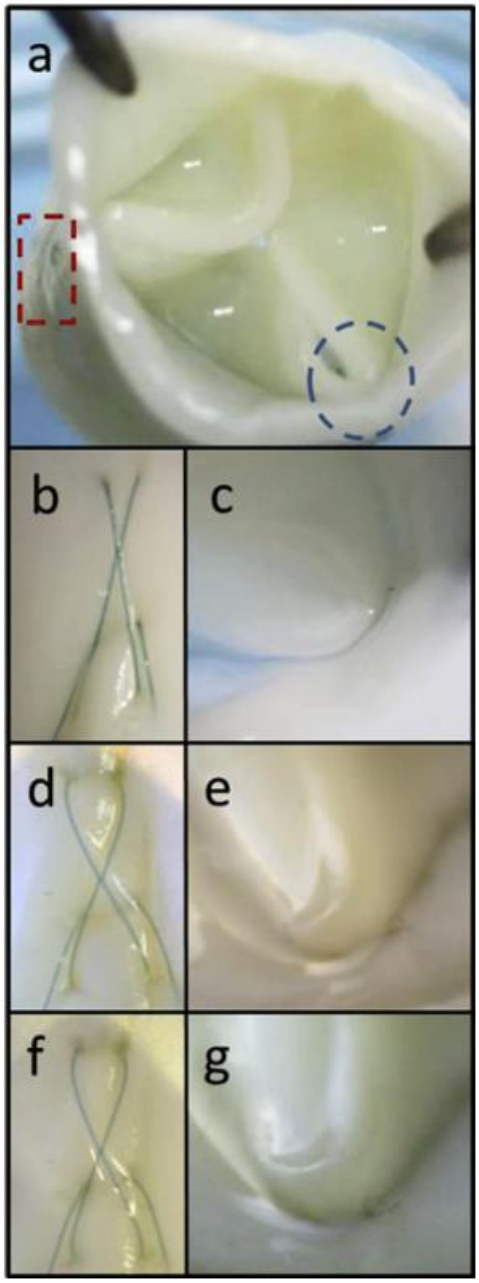

Figura 3.5: immagini di una HVTE sottoposta a fatica nel pulse duplicator per due settimane a 100 cicli/minuto. Le immagini sono state scattate vicino alle commissure sulla superficie abluminale (a, tratteggio rettangolare in colore rosso) o luminale (a, tratteggio circolare in colore blu). La valvola ingegnerizzata è stata analizzata nelle stesse posizioni (b-c) prima della prova di fatica, (d-e) dopo 1 settimana e (f-g) al completamento del test dopo 2 settimane.

È stata riscontrata una variazione nell'area della sezione trasversale del foro (Geometric Orifice Area) del costrutto, la quale è aumentata dall'81% (valore pre-affaticamento) all'89% dopo una settimana di test, stabilizzandosi successivamente all'87% al termine delle due settimane di test (Tabella 3.3). Contestualmente, è stato osservato lo sviluppo di un lieve prolasso di un lembo valvolare durante la fase diastolica dopo la prima settimana. Tale fenomeno ha determinato un incremento del rigurgito, passato dal 3,9% al 12,9%. Tuttavia, né il prolasso né il rigurgito hanno mostrato progressione durante

la seconda settimana di test. Inoltre, non sono stati rilevati danni tissutali evidenti a carico della linea di sutura [48].

Table 3
Pulse duplicator testing before, during, and after TEHV fatiguing.

Property	T = 0 weeks	T = 1 Week	T = 2 weeks
Mean Diastolic ΔP (mmHg)	13.2	11.9	11.4
Mean Systolic ΔP (mmHg)	2.5	1.8	3.1
Mean Ablumenal Pressure (mmHg)	4.0	3.0	1.4
Mean Forward Flow Rate (L/min)	3.6	3.2	3.8
Regurgitant Fraction	3.9%	12.9%	13.8%
Geometric Orifice Area	81%	89%	87%

Tabella 3.3: confronto tra i dati relativi a pressione e flusso per la valvola tubolare ingegnerizzata prima, durante e dopo la prova a fatica.

3.4 Limiti e prospettive della valvola tubolare pediatrica

La valvola così implementata presenta tutte le caratteristiche necessarie per essere classificata come un costrutto ingegnerizzato. Essa è, infatti, costituita da due tubi realizzati con materiali biologici, in grado di accogliere e supportare l'invasione e la crescita cellulare. L'unione dei due tubi è ottenuta tramite suture completamente biodegradabili. Tali peculiarità risultano fondamentali per garantire il potenziale di crescita e rimodellamento in vivo tipico delle valvole HVTE.

Uno dei principali vantaggi di questo prototipo risiede nell'assenza di un telaio rigido, caratteristica che la rende particolarmente adatta all'impiego in ambito pediatrico, poiché ne favorisce la crescita e l'adattamento fisiologico al paziente. Inoltre, il design adottato ha permesso di risolvere molte delle problematiche tipicamente associate ad un approccio a stampo singolo, che prevedeva l'utilizzo del gel di fibrina come scaffold. Alcune di queste difficoltà consistevano nella realizzazione di lembi con spessore iniziale adeguato, nella garanzia della coaptazione e della resistenza meccanica durante l'adesione progressiva delle cellule ospiti, nonché nella realizzazione di stampi complessi in cui gli angoli acuti sottoponevano lo scaffold ad elevato stress, causando assottigliamenti e possibili strappi. Un ulteriore punto di forza del progetto riguarda la tempistica della degradazione delle suture, che si è dimostrata ben correlata ai tempi di ricellularizzazione. Tale valutazione si basa su studi precedenti condotti dallo stesso gruppo di ricerca su innesti arteriosi, nei quali la colonizzazione cellulare dell'intera lunghezza dell'innesto (pari a circa 2-3 cm) si completava entro otto settimane. Le suture impiegate, selezionate per la loro lenta velocità di degradazione, risultano quindi teoricamente idonee a fornire un supporto meccanico sufficiente durante le fasi iniziali di crescita cellulare e rimodellamento tissutale in vivo.

I test in vitro condotti per valutare la capacità del costrutto di resistere alla fase iniziale di crescita cellulare e alla degradazione delle suture hanno fornito risultati soddisfacenti. In particolare, il test di fatica eseguito in condizioni di pressione polmonare non ha evidenziato lacerazioni né danni evidenti ai tessuti, ad eccezione di un leggero prolasso di un lembo, verosimilmente attribuibile ad un'asimmetria dei lembi o alla prolungata esposizione all'effetto "colpo di ariete" generato dal pulse duplicator.

In conclusione, la valvola ingegnerizzata ha mostrato prestazioni superiori rispetto a quelle della valvola Contegra, attualmente disponibile in commercio, in riferimento a due parametri critici per la sostituzione della valvola polmonare quali la caduta di pressione sistolica e il rigurgito.

Nonostante i promettenti risultati in vitro, rimangono aperte alcune questioni relative alla crescita, al rimodellamento e alla fusione dei tessuti della valvola ingegnerizzata che non possono essere completamente risolte solamente svolgendo prove in laboratorio. Nel complesso, i test con il pulse duplicator e i test di fatica forniscono una solida evidenza delle eccellenti prestazioni iniziali del design attuale della valvola in posizione polmonare. Tuttavia, resta da verificare se la valvola subirà un rimodellamento nella stessa misura osservata in posizione arteriosa. Ulteriori ricerche in vivo saranno quindi fondamentali per approfondire queste dinamiche [48].

Conclusioni

L'analisi svolta nella presente tesina permette di rilevare l'importanza della ricerca nell'ambito delle cardiopatie valvolari, poiché sono attualmente un problema sanitario di primaria importanza e sono destinate ad esserlo sempre in maggior misura nel futuro in ragione dell'aumento progressivo dell'età media della popolazione mondiale. Le opzioni terapeutiche attuali hanno limitazioni significative, nonostante i continui progressi in campo medico, farmacologico ed ingegneristico.

L'ingegneria tissutale sembrerebbe quindi essere un'alternativa capace di rivoluzionare l'approccio clinico al trattamento delle valvulopatie. Lo sviluppo di valvole ingegnerizzate funzionali e clinicamente validate permetterebbe di ottenere dei dispositivi in grado di integrarsi, rimodellarsi e crescere assieme al paziente.

I progressi degli ultimi anni stanno dimostrando la fattibilità di tali soluzioni, ponendo le basi per un futuro in cui la sostituzione valvolare con costrutti ingegnerizzati possa rappresentare la terapia di elezione.

L'utilizzo di bioreattori sempre più sofisticati e la scoperta di nuovi materiali biodegradabili e biocompatibili hanno permesso di ottenere risultati incoraggianti sia in vitro che in vivo. Rimane però una sfida aperta l'individuazione di un materiale sintetico o di origine biologica che possa efficacemente sostituire le valvole native, replicandone le caratteristiche fisiche e meccaniche al fine di poter guidare la crescita e lo sviluppo delle cellule.

Con particolare attenzione all'ambito pediatrico, inoltre, risulta ancor più evidente la necessità di sviluppare un costrutto che sia in grado di crescere e adattarsi ai cambiamenti fisici del paziente, evitando che quest'ultimo si debba sottoporre a iterati interventi chirurgici. Nella costruzione della valvola tubolare (citata nel Capitolo 3) è stato sottolineato come un prototipo sprovvisto di un telaio rigido risulti più adatto a questo scopo ma, anche in questo caso, la strada verso l'applicazione clinica è ancora lunga e complessa poiché, nonostante i successi raggiunti, rimangono aperte ancora numerose questioni, quali la standardizzazione dei protocolli di produzione, la definizione di criteri condivisi per la valutazione delle prestazioni biomeccaniche, la riduzione dei costi e la verifica della sicurezza a lungo termine. Sarà quindi necessario un ulteriore impegno che vede coinvolte numerose discipline scientifiche al fine di superare tali ostacoli e rendere le valvole cardiache ingegnerizzate uno strumento clinico efficace.

In conclusione, l'ingegneria tissutale applicata alle valvole cardiache rappresenta una delle frontiere più promettenti della medicina rigenerativa e della bioingegneria. Sebbene ancora in fase di sviluppo, essa possiede tutte le caratteristiche per rivoluzionare l'approccio terapeutico alle valvulopatie, offrendo soluzioni personalizzate e durature. La speranza è che i progressi futuri consentano di trasformare questo ambito di ricerca in una pratica clinica consolidata, capace di migliorare

significativamente la vita di milioni di pazienti in tutto il mondo e di segnare un nuovo capitolo nella storia della cardiochirurgia moderna.

Bibliografia

[1] E. Fallahiarezoudar, M. Ahmadipourroudposht, A. Idris, N. Mohd Yusof; A review of: Application of synthetic scaffold in tissue engineering heart valves; Materials Science and Engineering; 2015

[2] Y. Snyder, S. Jana; Strategies for development of decellularized heart valve scaffolds for tissue engineering; Biomaterials; 2022

[3] F. Oveissi, S. Naficy, A. Lee, D.S. Winlaw, F. Dehghani; Materials and manufacturing perspectives in engineering heart valves: a review; Materials Today Bio; 2019

[4] P. Mathew, A. Kanmanthareddy; Prosthetic Heart Valve; StatPearls; 2022

[5] E.S. Fioretta, L. vonBoehmer, S.E. Motta, V. Lintas, S.P. Hoerstrup, M.Y. Emmert; Cardiovascular tissue engineering: from basic science to clinical application; Experimental Gerontology; 2019

[6] S. Biasibetti; Caratteristiche tecniche e recenti sviluppi tecnologici nel settore delle protesi valvolari cardiache; anno accademico 2022-2023; Università degli Studi di Padova

[7] R.A Manji, J.S Manji; Studying Xenograft Rejection of Bioprosthetic Heart Valves; Methods in Molecular Biology; 2020

[8] Y. Xue, V. Sant, J. Phillippi, S. Sant; Biodegradable and biomimetic elastomeric scaffolds for tissue-engineered heart valves; Acta Biomaterialia; 2017

[9] C.V.C. Bouten, P.Y.W. Dankers, A. DriessenMol, S. Pedron, A.M.A. Brizard, F.P.T. Baaijens ; Substrates for cardiovascular tissue engineering; Advanced Drug Delivery Reviews; 2011

[10] I. Vesely, R. Noseworthy; Micromechanics of the fibrosa and the ventricularis in aortic valve leaflets; Journal of Biomechanics; 1992

[11] M.S. Sacks, A.P. Yoganathan; Heart valve function: a biomechanical perspective; The Royal Society; 2007

[12] S. Jana, R.D. Simari, D.B. Spoon, A. Lerman; Drug delivery in aortic valve tissue engineering; Journal of Controlled Release; 2014

[13] J. Leeson-Dietrich, D. Boughner, I. Vesely; Porcine pulmonary and aortic valves: a comparison of their tensile viscoelastic properties at physiological strain rates; Journal of Heart Valve Disease; 1995

[14] K.M. Kodigepalli, K. Thatcher, T. West, D.P. Howsmon, F.J. Schoen, M.S. Sacks, C.K. Breuer, J. Lincoln; Biology and Biomechanics of the Heart Valve Extracellular Matrix; Journal of Cardiovascular Development and Disease; 2020

[15] L. Bacakova, J. Zarubova, M. Travnickova, J. Musilkova, J. Pajorova, P. Slepicka et al; Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells – a review; Biotechnology Advances; 2018

[16] L. Dainese, F. Barili, D. Andreini, A. Guarino, B. Micheli, C. Anna Borsetti, G. Polvani, A. Parolari, M. Fusari, P. Biglioli; Valvole cardiache ingegnerizzate: lo stato dell'arte; Giornale Italiano di Cardiologia; 2008

[17] S. Abdulghani, G.R. Mitchell; Biomaterials for In Situ Tissue Regeneration: a review; Biomolecules; 2019

[18] S.H. Daebritz, J.S. Sachweh, B. Hermanns, B. Fausten, A. Franke, J. Groetzner, B. Klosterhalfen, B.J. Messmer; Introduction of a flexible polymeric heart valve prosthesis with special design for mitral position; Circulation; 2003

[19] T. Courtney, M. Sacks, J. Stankus, J. Guan, W. Wagner; Design and analysis of tissue engineering scaffolds that mimic soft tissue mechanical anisotropy; Biomaterials; 2006

[20] G. Aleksieva, T. Hollweck, N. Thierfelder, U. Haas, F. Koenig, C. Fano, M. Dauner, E. Wintermantel, B. Reichart, C. Schmitz, B. Akra; Use of a special bioreactor for the cultivation of a new flexible polyurethane scaffold for aortic valve tissue engineering; Biomedical Engineering Online 11; 2012

[21] N.J. Amoroso, A. D'Amore, Y. Hong, C.P. Rivera, M.S. Sacks, W.R. Wagner; Microstructural manipulation of electrospun scaffolds for specific bending stiffness for heart valve tissue engineering; Acta Biomaterialia; 2012

[22] C.M. Hobson, N.J. Amoroso, R. Amini, E. Ungchusri, Y. Hong, A. D'Amore, M.S. Sacks, W.R. Wagne; Fabrication of elastomeric scaffolds with curvilinear fibrous structures for heart valve leaflet engineering; Journal of Biomedical Materials Research; 2015

[23] R. Sodian, S.P. Hoerstrup, J.S. Sperling, D.P. Martin, S. Daebritz, J.E. Mayer Jr., J.P. Vacanti; Evaluation of biodegradable, three-dimensional matrices for tissue engineering of heart valves; ASAIO Journal; 2000

[24] S.P. Hoerstrup, R. Sodian, S. Daebritz, J. Wang, E.A. Bacha, D.P. Martin, A.M. Moran, K.J. Guleserian, J.S. Sperling, S. Kaushal, J.P. Vacanti, F.J. Schoen, J.E. Mayer Jr.; Functional living trileaflet heart valves grown in vitro; Circulation; 2000

[25] S.P. Hoerstrup, A. Kadner, S. Melnitchouk, A. Trojan, K. Eid, J. Tracy, R. Sodian, J.F. Visjager, S.A. Kolb, J. Grunenfelder, G. Zund, M.I. Turina; Tissue engineering of functional trileaflet heart valves from human marrow stromal cells; Circulation; 2002

[26] N. Grabow, K. Schmohl, A. Khosravi, M. Philipp, M. Scharfschwerdt, B. Graf, C. Stamm, A. Haubold, K.P. Schmitz, G. Steinhoff; Mechanical and structural properties of a novel hybrid heart valve scaffold for tissue engineering; Artificial Organs; 2004

[27] C. Stamm, A. Khosravi, N. Grabow, K. Schmohl, N. Treckmann, A. Drechsel, M. Nan, K.P. Schmitz, A. Haubold, G. Steinhoff; Biomatrix/polymer composite material for heart valve tissue engineering; Annals of Thoracic Surgery; 2004

[28] R. Sodian, C. Lueders, L. Kraemer, W. Kuebler, M. Shakibaei, B. Reichart, S. Daebritz, R. Hetzer; Tissue engineering of autologous human heart valves using cryopreserved vascular umbilical cord cells; Annals of Thoracic Surgery; 2006

[29] S. Wu, Y.L. Liu, B. Cui, X.H. Qu, G.Q. Chen; Study on decellularized porcine aortic valve/poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) hybrid heart valve in sheep model; Artificial Organs; 2007

[30] H. Hong, G.N. Dong, W.J. Shi, S. Chen, C. Guo, P. Hu; Fabrication of biomatrix/ polymer hybrid scaffold for heart valve tissue engineering in vitro; ASAIO Journal; 2008

[31] H. Hong, N. Dong, J. Shi, S. Chen, C. Guo, P. Hu, H. Qi; Fabrication of a novel hybrid heart valve leaflet for tissue engineering: an in vitro study; Artificial Organs; 2009

[32] P.K. Schaefermeier, D. Szymanski, F. Weiss, P. Fu, T. Lueth, C. Schmitz, B.M. Meiser, B. Reichart, R. Sodian; Design and fabrication of three-dimensional scaffolds for tissue engineering of human heart valves; European Surgical Research; 2009

[33] R. Sodian, P. Schaefermeier, S. Abegg-Zips, W.M. Kuebler, M. Shakibaei, S. Daebritz, J. Ziegelmueller, C. Schmitz, B. Reichart; Use of human umbilical cord blood-derived progenitor cells for tissue-engineered heart valves; Annals of Thoracic Surgery; 2010

[34] M.A.J. Cox, J. Kortsmit, N. Driessen, C.V.C. Bouten, F.P.T. Baaijens; Tissue engineered heart valves develop native-like collagen fiber architecture; Tissue Engineering Part A; 2010

[35] M.I. van Lieshout, C.M. Vaz, M.C. Rutten, G.W. Peters, F.P. Baaijens; Electrospinning versus knitting: two scaffolds for tissue engineering of the aortic valve; Journal of Biomaterials Science Polymer Edition; 2006

[36] C. Del Gaudio, M. Grigioni, A. Bianco, G. De Angelis; Electrospun bioresorbable heart valve scaffold for tissue engineering; International Journal of Artificial Organs; 2008

[37] D. Gottlieb, T. Kunal, S. Emani, E. Aikawa, D.W. Brown, A.J. Powell, A. Nedder, G.C. Engelmayr, J.M. Melero-Martin, M.S. Sacks, J.E. Mayer; In vivo monitoring of function of autologous engineered pulmonary valve; Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery; 2010

[38] H. Tseng, D.S. Puperi, E.J. Kim, S. Ayoub, J.V. Shah, M.L. Cuchiara, J.L. West, K.J. Grande-Allen; Anisotropic poly(ethylene glycol)/polycaprolactone hydrogel fiber composites for heart valve tissue engineering; Tissue Engineering; 2014

[39] S. Hinderer, J. Seifert, M. Votteler, N. Shen, J. Rheinlaender, T.E. Schäffer, K. Schenke-Layland; Engineering of a bio-functionalized hybrid off-the-shelf heart valve; Biomaterials; 2014

[40] S. Jahnavi, T.V. Kumary, G.S. Bhuvaneshwar, T.S. Natarajan, R.S. Verma; Engineering of a polymer layered bio-hybrid heart valve scaffold; Materials Science Engineering; 2015

[41] M.M.C.P. Brugmans, R.S. Soekhradj-Soechit, D. van Geemen, M. Cox, C.V.C. Bouten, F.P.T. Baaijens, A. Driessen-Mol; Superior tissue evolution in slow degrading scaffolds for valvular tissue engineering; Tissue Engineering; 2015

[42] V.L. Sales, G.C. Engelmayr Jr., J.A. Johnson Jr., J. Gao, Y. Wang, M.S. Sacks, J.E. Mayer Jr.; Protein precoating of elastomeric tissue-engineering scaffolds increased cellularity, enhanced extracellular matrix protein production, and differentially regulated the phenotypes of circulating endothelial progenitor cells; Circulation; 2007

[43] S. Sant, D. Iyer, A.K. Gaharwar, A. Patel, A. Khademhosseini; Effect of biodegradation and de novo matrix synthesis on the mechanical properties of valvular interstitial cell-seeded polyglycerol sebacate-polycaprolactone scaffolds; Acta Biomaterialia; 2013

[44] M. Eslami, N.E. Vrana, P. Zorlutuna, S. Sant, S. Jung, N. Masoumi, R.A. Khavari Nejad, G. Javadi, A. Khademhosseini; Fiber-reinforced hydrogel scaffolds for heart valve tissue engineering; Journal of Biomaterials Applications; 2014

[45] N. Masoumi, N. Annabi, A. Assmann, B.L. Larson, J. Hjortnaes, N. Alemdar, M. Kharaziha, K.B. Manning, J.E. Mayer, A. Khademhosseini; Tri-layered elastomeric scaffolds for engineering heart valve leaflets; Biomaterials; 2014

[46] M. Eslami, G. Javadi, N. Agdami, M.A. Shokrgozar; Expression of collagen 1 and elastin genes in mitral valvular interstitial cells within microfiber reinforced hydrogel; Cell Journal; 2015

[47] S. Neuenschwander, S.P. Hoerstrup; Heart valve tissue engineering; Transplant Immunology; 2004

[48] J.M. Reimer, Z.H. Syedain, B.H.T. Haynie, R.T. Tranquillo; Pediatric tubular pulmonary heart valve from decellularized engineered tissue tubes; Biomaterials; 2015