



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**



**DIPARTIMENTO
DI INGEGNERIA
DELL'INFORMAZIONE**

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**“CARATTERISTICHE TECNICHE E RECENTI SVILUPPI TECNOLOGICI NEL
SETTORE DELLE PROTESI VALVOLARI CARDIACHE”**

Relatore: Prof. Andrea Bagno

Laureanda: Sofia Biasibetti

ANNO ACCADEMICO 2022-2023

Data di laurea 16/03/2023

Indice

Abstract	5
Capitolo 1. Introduzione	7
1.1 Anatomia e fisiologia cardiaca	8
1.2 Le valvole cardiache e la loro funzione	10
1.3 Patologie valvolari	12
1.3.1 Stenosi ed insufficienza aortica.....	12
1.3.2 Stenosi ed insufficienza mitralica.....	14
1.3.3 Interventi sostitutivi e riparativi.....	15
1.3.4 TAVI e TMVR.....	16
Capitolo 2. Valvole cardiache protesiche meccaniche	18
2.1 Protesi meccanica a palla ingabbiata	18
2.2 Protesi meccanica a disco oscillante (mono-leaflet)	19
2.3 Protesi meccanica a due emidischi (bileaflet)	20
2.4 Complicanze associate alle valvole protesiche meccaniche	20
2.4.1 Fattori di superficie.....	21
2.4.2 Emodinamica.....	21
2.4.3 Emostasi.....	22
2.5 Trattamento farmacologico	22
Capitolo 3. Valvole cardiache protesiche biologiche	24
3.1 Protesi biologiche in tessuto umano	24
3.2 Protesi biologiche in tessuto animale	25
3.2.1 Complicanze associate.....	25
3.2.2 Soluzioni per mitigare la risposta immunitaria.....	26
3.3 Protesi biologiche e meccaniche a confronto	27
Capitolo 4. I progressi dell'ingegneria tissutale	28
4.1 Ingegneria tissutale in vitro	29
4.1.2 Scaffold sintetici.....	29
4.1.3 Scaffold naturali.....	30
4.1.4 Scaffold di organi decellularizzati.....	30
4.1.5 Il ruolo del bioreattore e le cellule seminate in vitro.....	31
4.1.6 Limitazioni.....	32
4.2 Ingegneria tissutale in situ	32
4.2.1 Biomateriali utilizzati nella realizzazione dello scaffold.....	32
4.2.2 Architettura e caratteristiche superficiali degli scaffold.....	35
4.3 Valvole TEHV: dal vitro al situ	36
4.3.1 La formazione del tessuto.....	37
4.3.2 Comportamento chimico-fisico dopo l'impianto.....	38

4.4 Applicazioni della TEHV in situ	39
4.4.1 Obbiettivi del progetto	40
4.4.2 Realizzazione	40
4.4.3 Valutazione.....	41
Conclusione	42
Bibliografia	43

Abstract

Molteplici sono le cause delle malattie degenerative che portano al malfunzionamento delle valvole cardiache: si tratta di patologie congenite oppure acquisite come, ad esempio, l'infarto, la febbre reumatica, lo scompenso cardiaco e l'ipertensione arteriosa. In particolare, sono molto frequenti le valvulopatie che interessano la valvola mitrale e aortica, con conseguente comparsa di stenosi e/o insufficienza.

Nei casi in cui l'intervento di riparazione delle valvole compromesse non risulti possibile, viene eseguita la sostituzione chirurgica. Le protesi valvolari attualmente a disposizione sono di due tipologie: meccaniche e biologiche. Le prime sono costituite da materiale sintetico biocompatibile e hanno una buona durabilità (il più delle volte dai 20 ai 30 anni), tuttavia, a causa della trombogenicità dei materiali utilizzati, i pazienti necessitano di terapia anticoagulante a vita. Le seconde, invece, sono realizzate con tessuto biologico e, a seconda dell'origine dello stesso, si dividono in autografts, homografts e xenografts. Prima di essere impiantate devono essere sterilizzate e rese biologicamente inattive al fine di evitare il rigetto.

L'innovativo approccio dell'ingegneria tissutale suggerisce una soluzione ai limiti delle attuali protesi valvolari cardiache: cellule autologhe vengono seminate su uno scaffold biodegradabile, che ne permette l'adesione e la crescita, arrivando a sviluppare, dopo un periodo di condizionamento, un sostituto valvolare del tutto compatibile, biologicamente e funzionalmente, con il ricevente.

Nella presente tesi vengono trattati i seguenti aspetti: definizione e ambiti di applicazione dell'ingegneria tissutale; cenni all'anatomia e fisiologia del cuore e alle malattie degenerative che portano al deterioramento delle valvole cardiache; le caratteristiche tecniche, funzionali e prestazionali delle protesi valvolari meccaniche e biologiche attualmente in uso; i progressi dell'ingegneria tissutale nello sviluppo di protesi valvolari capaci di superare i limiti delle attuali.

Capitolo 1. Introduzione

Le patologie valvolari cardiache compromettono il corretto funzionamento delle valvole cardiache che, di conseguenza, ostacolano il corretto flusso sanguigno e perciò rappresentano un grave problema per la salute dei pazienti che ne sono affetti. In questi casi, le principali opzioni terapeutiche consistono nella riparazione o nella sostituzione della valvola malata. Quando possibile, si preferisce ricorrere alla riparazione della valvola, essendo una procedura più conservativa; diversamente, si ricorre alla chirurgia tradizionale “a cielo aperto”, decisamente più invasiva, anche se sta prendendo piede la nuova procedura transcateretere molto meno rischiosa. Nel mondo, si stimano circa 300.000 interventi annuali di sostituzione valvolare, che prevedono l’impianto di protesi meccaniche o biologiche. Questi interventi sono associati ad alcune complicanze dovute principalmente alla terapia anticoagulante (nel caso delle protesi meccaniche) e alla calcificazione (nelle biologiche). Un altro aspetto molto importante da tenere in considerazione è la mancata capacità di crescita di queste valvole, un problema di particolare rilevanza soprattutto per la popolazione pediatrica affetta da malattie congenite delle valvole cardiache. La ricerca ha fatto moltissimi progressi negli ultimi 30 anni nel settore dell’ingegneria tissutale, studiando e progettando un nuovo tipo di terapia sostitutiva, in grado di superare i limiti delle valvole attualmente in commercio. L’ingegneria tissutale “in vitro” prevede l’utilizzo di scaffold sui quali vengono seminate cellule autologhe, precedentemente prelevate dal paziente ed espanse in vitro, con lo scopo di creare una struttura “vivente” capace di rispondere e rimodellarsi in funzione delle sollecitazioni che riceve. Questo tipo di approccio prevede poi l’utilizzo di un bioreattore: si tratta di un dispositivo che, ricreando condizioni di lavoro simili a quelle fisiologiche, permette di realizzare una fase di condizionamento della valvola protesica ingegnerizzata prima dell’impianto. L’ingegneria tissutale “in situ” prevede invece la fabbricazione di uno scaffold costituito da materiali biocompatibili e impiantato al posto della valvola malata: non necessita né di coltura cellulare in vitro né dell’utilizzo del bioreattore. Infatti, la rigenerazione del tessuto avviene grazie al reclutamento e all’adesione allo scaffold delle cellule in circolo. Nella presente tesi verranno illustrate le caratteristiche tecniche e funzionali delle protesi valvolari meccaniche e biologiche e analizzati i limiti attuali. Infine, saranno presentati gli approcci dell’ingegneria tissutale “in vitro” e “in situ”, le sfide nella progettazione della valvola cardiaca tissutale ingegnerizzata (TEHV) e una sua applicazione.

1.1 Anatomia e fisiologia cardiaca

Il cuore è un organo muscolare cavo a forma di tronco di cono che riveste un ruolo fondamentale nella circolazione sanguigna. Svolgendo le funzioni di una doppia pompa in parallelo, è responsabile della progressione del sangue nelle circolazioni sistemica e polmonare. È diviso funzionalmente da un asse verticale che lo separa in metà destra e metà sinistra; ciascuna metà si compone di una camera di afflusso, denominata atrio e di una camera di efflusso denominata ventricolo (Figura 1.1).

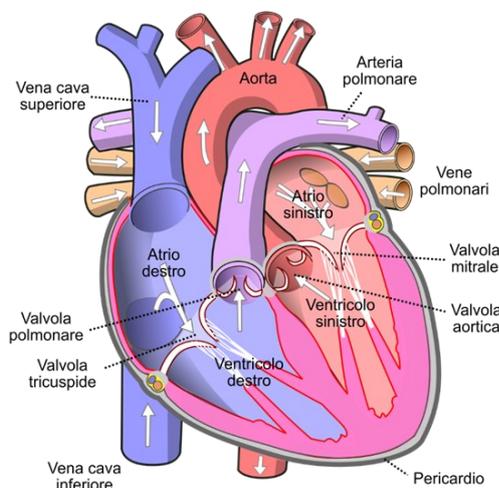


Figura 1.1: Rappresentazione di un cuore umano.

Il cuore destro ospita sangue deossigenato: l'atrio destro è connesso con la vena cava superiore e la vena cava inferiore e viene messo in comunicazione con il ventricolo destro tramite la valvola tricuspide; il ventricolo destro pompa il sangue nell'arteria polmonare permettendo al sangue di giungere ai polmoni per ossigenarsi. Il cuore sinistro accoglie sangue ossigenato: l'atrio sinistro riceve il sangue ossigenato da due vene polmonari per lato; il sangue viene condotto al ventricolo sinistro tramite la valvola mitrale (o bicuspidale), passa attraverso la valvola aortica, viene pompato nell'aorta e successivamente trasportato nei tessuti periferici [1].

Le pareti del cuore sono composte da tre strati: pericardio, miocardio ed endocardio. Il pericardio avvolge e protegge il cuore ed è costituito da due membrane separate da un sottile strato di liquido; la membrana esterna è formata da tessuto fibroso, quella interna da tessuto sieroso. Il miocardio costituisce la parte muscolare del cuore ed è infatti composto da fibre muscolari e da cellule cardiache dette miocardiociti, specializzate nella generazione e conduzione dell'impulso elettrico di contrazione. L'endocardio avvolge la superficie interna del miocardio ed è costituito da tessuto connettivo ed epiteliale (Figura 1.2) [2].

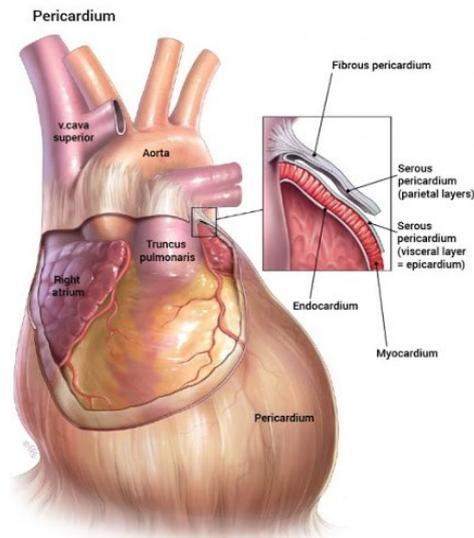


Figura 1.2: Le pareti cardiache.

Il sangue viene trasportato in tutto il corpo tramite i vasi sanguigni, i più grandi dei quali sono composti da tre tonache; la più interna è la tonaca avventizia ed è composta da tessuto connettivo denso; più esternamente la tonaca media, responsabile della regolazione del calibro del vaso, e costituita da tessuto connettivo elastico e muscolare liscio; infine, la tonaca intima formata da un rivestimento epiteliale: l'endotelio (Figura 1.3). La capacità propulsiva delle arterie, che permette al sangue di fluire al loro interno in quantità e pressione elevate, è garantita da una tonaca muscolare più spessa e ricca di fibre elastiche. Le vene, invece, sono vasi a bassa pressione; dunque, il ritorno venoso all'atrio destro è garantito anche dall'intervento della contrazione dei muscoli scheletrici. Qualora le vene agiscano contro gravità, l'azione delle valvole a nido di rondine consente l'unidirezionalità del flusso verso il cuore [2].

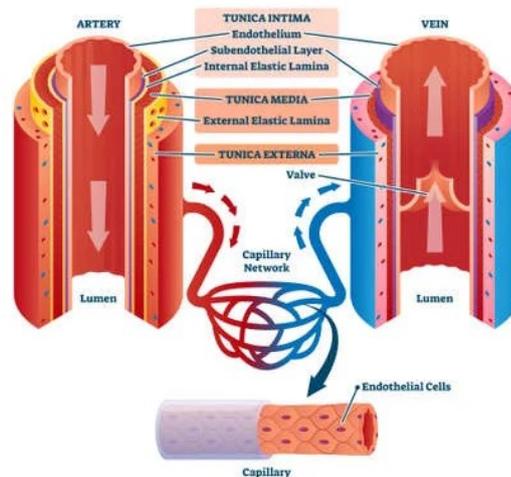


Figura 1.3: La struttura dei vasi sanguigni.

Il funzionamento del cuore si basa su una precisa sequenza di contrazioni e rilassamenti delle sue parti, detta ciclo cardiaco. Quando tutte le cavità sono rilassate si parla diastole completa: le valvole atrio-ventricolari (tricuspide e mitrale) sono aperte, le semilunari (polmonare e aortica) sono chiuse. Il ciclo inizia con la contrazione degli atri (sistole atriale), successivamente si contraggono i ventricoli (sistole ventricolare). A questo punto le valvole atrio-ventricolari si chiudono e si aprono le semilunari. Successivamente gli atri e i ventricoli si rilassano, le valvole semilunari si chiudono e si aprono le atrio-ventricolari: il cuore è in diastole completa.

Durante la fase di diastole completa il sangue venoso entra nell'atrio destro attraverso le due vene cave. Il sangue arterioso entra nell'atrio sinistro dalle vene polmonari. Durante la sistole atriale il sangue viene spinto nei ventricoli. Con la sistole ventricolare il sangue esce dal cuore: il sangue venoso fluisce nell'arteria polmonare, quello arterioso entra nell'aorta (Figura 1.4) [2].

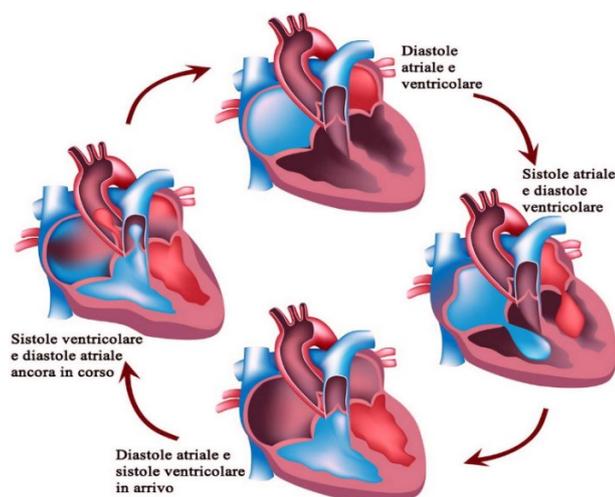


Figura 1.4: Schema rappresentativo delle fasi del ciclo cardiaco.

1.2 Le valvole cardiache e la loro funzione

Il cuore contiene quattro valvole: tricuspide, mitrale, polmonare e aortica (Figura 1.5). La valvola aortica regola il flusso dal ventricolo sinistro all'aorta, le valvole tricuspide e mitrale regolano l'afflusso di sangue dall'atrio sinistro e destro ai ventricoli, la valvola polmonare controlla il flusso di sangue in uscita dal ventricolo destro all'arteria polmonare. Le strutture delle valvole polmonare e aortica sono simili e sono entrambe costituite da tre foglietti semilunari; sono inoltre caratterizzate da circonferenze più piccole rispetto alle valvole tricuspide e mitrale [2].

Le valvole atrio-ventricolari (AV) sono le valvole che mettono in comunicazione atri e ventricoli, mentre le valvole semilunari (SL) sono situate tra ventricoli e arterie (vedi Figura 1.1). Sia le AV che le SL garantiscono un flusso sanguigno unidirezionale attraverso il cuore. L'apertura e la chiusura delle valvole è legata alle variazioni pressorie intracardiache; non esiste

dunque alcun tipo di controllo nervoso o muscolare che regola l'attività delle valvole, dal momento che esse hanno il compito di garantire una resistenza efficace e passiva al flusso retrogrado del sangue. Con la contrazione dei ventricoli durante la sistole, il sangue viene espulso attraverso le semilunari polmonari e aortiche, mentre la chiusura della tricuspide e della mitrale impedisce il retroflusso del sangue negli atri. Allo stesso modo, durante la diastole il sangue scorre attraverso la tricuspide e la mitrale, i ventricoli si riempiono e le valvole SL chiuse impediscono al sangue di tornare al cuore [2].

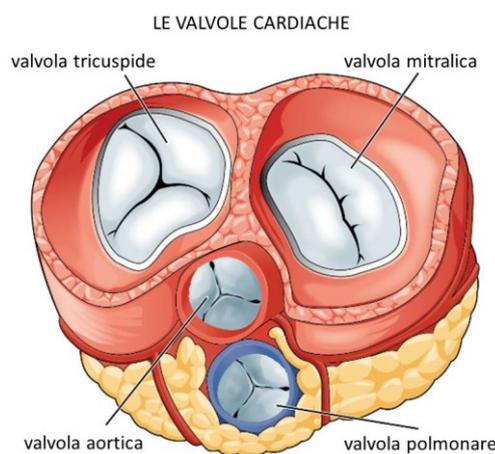


Figura 1.5: Rappresentazione delle quattro valvole cardiache.

I componenti principali della matrice extracellulare (ECM) delle valvole cardiache e dei tessuti circostanti sono il collagene e l'elastina, che creano microstrutture complesse e anisotrope; la disposizione e le proprietà meccaniche di questi componenti influenzano il comportamento meccanico complessivo dei tessuti cardiaci. Le valvole SL e AV condividono un'architettura molto simile, composta di tre strati di ECM intervallati da cellule interstiziali valvolari (VIC) e rivestiti da un monostrato di cellule endoteliali valvolari endocardiche (VEC); l'unione di questi strati fornisce resistenza e durata alle valvole. Lo strato centrale è costituito da proteoglicani e assicura la comprimibilità del foglietto, lo strato di collagene prevalentemente fibrillare fornisce resistenza meccanica, mentre l'elastina conferisce elasticità [3].

Data l'architettura altamente complessa delle valvole cardiache, le loro prestazioni meccaniche sono dominate dall'elastina nel dominio delle basse sollecitazioni e dal collagene resistente nelle regioni ad alta sollecitazione. Le valvole cardiache, durante ogni ciclo cardiaco, sperimentano un'ampia gamma di sollecitazioni meccaniche, tra cui la contro pressione quando sono chiuse, lo sforzo di taglio del sangue, lo sforzo di flessione e lo stiramento assiale, durante ogni ciclo cardiaco [3].

1.3 Patologie valvolari

Il corretto funzionamento delle valvole cardiache viene alterato da malattie cardiache (valvulopatie) che possono essere suddivise in congenite (presenti dalla nascita) e acquisite (compaiono nel corso della vita). Queste ultime possono essere degenerative (dovute alla degradazione delle strutture valvolari), infettive (endocarditi), ischemiche (nel caso di infarto del miocardio acuto) e traumatiche. Nella maggior parte dei casi, tali patologie attraversano un lento stadio evolutivo, con una fase anche molto lunga di completa asintomaticità; qualora invece vi sia una manifestazione acuta, le conseguenze possono essere fatali.

Le patologie del settore destro del cuore, dove sono situate le valvole tricuspide e polmonare, sottoposte ad un regime pressorio non eccessivamente elevato, sono molto rare e in genere dovute a problemi congeniti; sono invece molto più frequenti le malattie che interessano le valvole aortiche e mitrali (sottoposte a pressioni comprese tra circa 100 e 150 mmHg). Il corretto funzionamento delle valvole può essere infatti compromesso da fenomeni di stenosi e insufficienza: la stenosi è caratterizzata dalla riduzione della capacità di apertura della valvola aortica, l'insufficienza è la conseguenza di un difetto di chiusura della valvola [2].

1.3.1 Stenosi ed insufficienza aortica

La presenza di stenosi aortica (Figura 1.6) ostacola la fuoriuscita di sangue dal ventricolo sinistro, obbligando quest'ultimo a compiere uno sforzo maggiore per permettere al sangue di fluire in aorta; a lungo andare, l'eccessivo carico di lavoro provoca un ispessimento della parete muscolare, con conseguente comparsa di ipertrofia ventricolare sinistra, e un successivo indebolimento del potere contrattile. Le alterazioni che conducono alla stenosi sono causate da processi patologici che prevedono accumulo di lipidi, infiammazione e calcificazione. I sintomi più frequenti in un paziente affetto da stenosi aortica sono: angina, sincope e insufficienza cardiaca; nei casi più critici si ricorre alla sostituzione della valvola. La maggior parte dei pazienti, tuttavia, riscontra sintomi più lievi: il più frequente è la diminuzione della capacità di resistenza durante l'esercizio fisico [5].

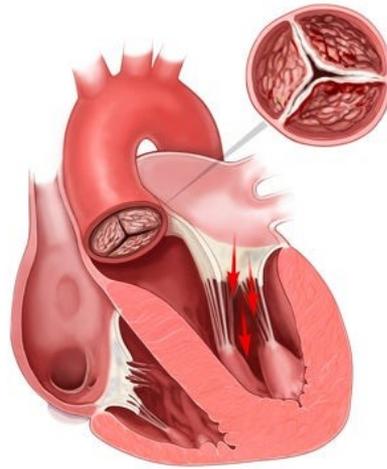


Figura 1.6: Valvola aortica stenotica.

Nota anche come rigurgito aortico (AR), l'insufficienza aortica (Figura 1.7) consente il reflusso di sangue dall'aorta al ventricolo sinistro durante la sistole; raggiunta l'aorta, al momento della sistole ventricolare, il sangue riattraversa la valvola aortica tornando al ventricolo sinistro, non appena quest'ultimo inizia la diastole. Il ritorno del sangue comporta un notevole sforzo da parte del ventricolo sinistro per ostacolare il reflusso sanguigno. Le conseguenze emodinamiche sono diverse nel contesto acuto o cronico: in caso di AR acuta, il notevole aumento di volume del sangue nel ventricolo sinistro, determina un brusco e prominente aumento di pressione, con conseguente diminuzione della gittata cardiaca e della pressione sistolica.

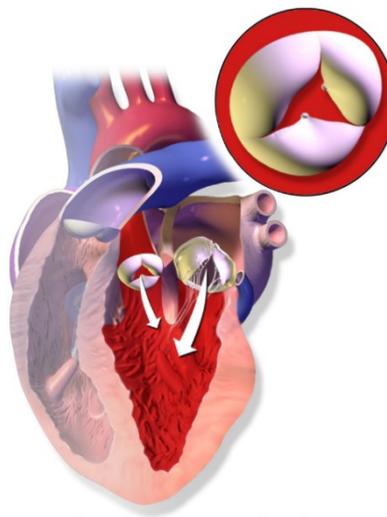


Figura 1.7: Rigurgito della valvola aortica

Nei pazienti con AR cronica, invece, i sovraccarichi di volume e pressione conducono ad una progressiva dilatazione e rimodellamento del ventricolo sinistro. Inizialmente, questi

meccanismi di adattamento garantiscono la conservazione della funzione sistolica globale: i pazienti risultano asintomatici e l'emodinamica è preservata. Tuttavia, questi meccanismi di compensazione possono diventare inefficienti a lungo termine. L'AR è una malattia insidiosa e asintomatica, che richiede un monitoraggio attento e accurato per lunghi periodi per anticipare il danno miocardico. L'intervento chirurgico nell'AR grave si basa principalmente sulla sostituzione della valvola. Tuttavia, in base alle caratteristiche morfologiche della valvola aortica, vengono effettuati anche interventi di riparazione [6].

1.3.2 Stenosi ed insufficienza mitralica

La stenosi mitralica (Figura 1.8) innesca un meccanismo compensatorio che prevede un aumento di pressione nell'atrio sinistro per consentire il flusso del sangue nel ventricolo sinistro; si assiste successivamente ad un incremento di pressione nelle vene polmonari che portano il sangue al cuore, con conseguente formazione di liquido nei polmoni (congestione), aumento di pressione dell'arteria polmonare e sovraccarico del ventricolo destro. La stenosi della valvola mitrale è più frequente negli individui che presentano una cavità ventricolare sinistra di dimensioni ridotte [7].

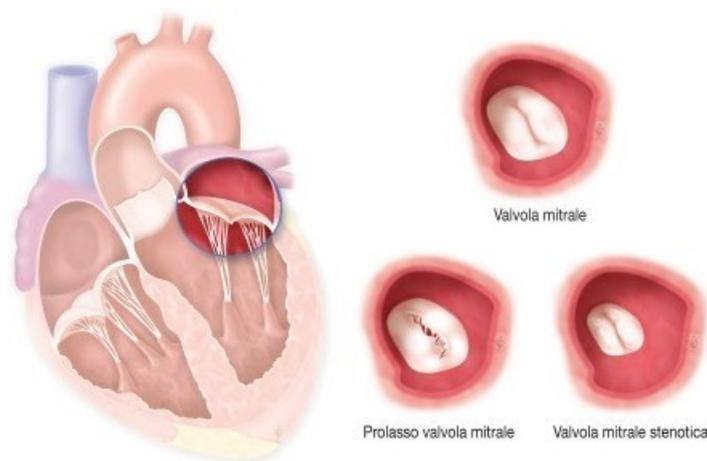


Figura 1.8: Rappresentazione di prolasso e stenosi della valvola mitrale.

In condizione di insufficienza, la scorretta chiusura della valvola mitralica consente il reflusso di sangue dal ventricolo sinistro all'atrio sinistro; quest'ultimo si dilata per poter contenere maggiori quantità di sangue. Il rigurgito della valvola mitrale (MR) primario è associato ad una condizione patologica dell'apparato valvolare mitralico, mentre il rigurgito mitralico secondario è una condizione patologica del ventricolo sinistro. La causa più comune dell'MR primario è la degenerazione dei foglietti della valvola mitrale; lo spettro di gravità della

degenerazione va dal deficit fibroelastico (foglietti sottili e prolasso locale), alla malattia di Barlow (foglietti molto spessi e dilatati). Le malattie reumatiche, i farmaci, le radiazioni e le malattie del tessuto connettivo portano ad un ispessimento dei bordi dei lembi dell'apparato subvalvolare, che limita di conseguenza il loro movimento. L'unidirezionalità della gittata cardiaca può essere mantenuta grazie a meccanismi di compensazione: nella fase compensata, la dilatazione del ventricolo sinistro mantiene lo stress di parete e le pressioni diastoliche normali, contrastando l'evoluzione della fase acuta in cronica [8].

L'insufficienza mitralica funzionale secondaria (FMR) è una condizione patologica dell'atrio e del ventricolo: la valvola si presenta in condizioni anatomicamente normali, ma funzionalmente difettose. Nella FMR il difetto di chiusura ha origine da una grave compromissione della funzione contrattile del ventricolo sinistro. È possibile classificare la FMR in due entità fisiopatologiche distinte: (i) pazienti con FMR che presentano una dilatazione anulare mitralica predominante (lesione di tipo I) e (ii) pazienti con FMR caratterizzata da rigurgito causato prevalentemente dal rimodellamento del ventricolo sinistro, che provoca una dilatazione incrementale della continuità atrioventricolare e, successivamente, della valvola mitrale (lesione di tipo IIIb). Sebbene la definizione di FMR implichi generalmente la presenza di una valvola mitrale strutturalmente normale, le strategie di trattamento dipendono dallo specifico meccanismo fisiopatologico [9].

Nei pazienti affetti dalla lesione di tipo I, la geometria del ventricolo sinistro è sufficientemente conservata e i lembi mitralici si muovono normalmente a livello anulare durante la sistole; la strategia di trattamento chirurgico o interventistico mira semplicemente a ridurre il diametro dell'annulus mitralico (l'orifizio della valvola mitrale) per ristabilire la competenza della valvola. In caso di FMR di tipo IIIb, la tecnica chirurgica standard di anuloplastica restrittiva è inefficace, in quanto non è in grado di affrontare il meccanismo di rigurgito sottostante; è stato infatti dimostrato che questa tipologia di intervento porta ad un alto tasso di recidiva dopo la riparazione della valvola mitrale. È però stato riscontrato che l'intervento di anuloplastica con simultanea riparazione subannulare, rispetto alla sola anuloplastica, ha ridotto significativamente il fenomeno di recidiva [9].

1.3.3 Interventi sostitutivi e riparativi

Grazie all'ecocardiografia, alla TAC e alla risonanza magnetica è possibile effettuare una diagnosi accurata delle valvulopatie e valutare di conseguenza il trattamento più adeguato. Quando possibile, si preferisce ricorrere alla riparazione, poiché garantisce un miglior mantenimento della funzione cardiaca, maggiore probabilità di sopravvivenza e minor rischio

di endocardite. L'intervento di riparazione può essere eseguito sia in condizioni di stenosi che insufficienza. Esistono differenti tecniche di riparazione che possono essere utilizzate singolarmente o associate fra loro. Nei casi in cui la riparazione non fosse possibile, la valvola viene sostituita. Fino ad oggi, sono state utilizzate solo valvole meccaniche e bioprotesiche che sono spesso associate a disagi e complicazioni, legati all'assunzione di farmaci anticoagulanti (nel caso delle meccaniche) e calcificazione della valvola protesica (nelle biologiche). Inoltre, la crescita somatica di bambini e neonati che ricevono una valvola cardiaca sostitutiva, necessita di continui interventi chirurgici affinché le dimensioni della valvola siano adeguate al paziente. L'obiettivo della ricerca attuale è quello di utilizzare nuovi materiali con una biomeccanica simile a quella del tessuto valvolare cardiaco nativo, in modo da realizzare dispositivi sostitutivi che presentano caratteristiche tecniche e funzionali simili a quelle degli organi umani.

1.3.4 TAVI e TMVR

In alternativa all'intervento di sostituzione chirurgico tradizionale (Surgical Aortic Valve Replacement, SAVR), viene effettuato l'impianto valvolare aortico trans-catetere (TAVI). Questo tipo di operazione è indicato solamente in pazienti di età molto avanzata con controindicazione o a rischio molto elevato per la chirurgia convenzionale e nei pazienti con protesi valvolare biologica degenerata. La TAVI (Figura 1.9) consiste in un approccio percutaneo molto meno invasivo rispetto alla chirurgia tradizionale: l'intervento prevede l'inserimento di un catetere (contenente una valvola biologica) nel cuore del paziente tramite accesso arterioso, generalmente per via transfemorale. Il primo intervento venne effettuato nel 2002; attualmente viene eseguito circa in 400.000 pazienti annualmente [10].

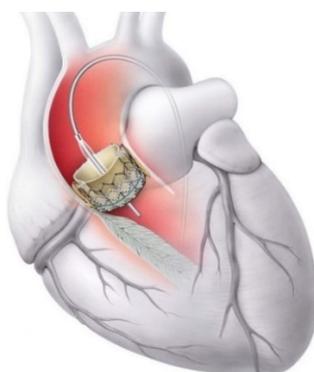


Figura 1.9: Impianto di valvola aortica per via transcatetere.

Seguendo le linee guida della tecnica TAVI, nel campo della cardiologia interventistica strutturale, sono stati introdotti nuovi dispositivi per la sostituzione valvolare mitralica

transcatetere (TMVR). Nel 2012 venne eseguito il primo intervento con la TAVR CardiAQ-Edwards (Edwards Lifesciences); ad oggi più di 30 dispositivi per la TMVR sono stati sviluppati e almeno 11 sono già stati impiantati. Tuttavia, durante le fasi di progettazione e impianto delle valvole sono state riscontrate numerose difficoltà dovute alla struttura della valvola mitrale: l'anulus mitralico (anello fibromuscolare di ampie dimensioni), presenta una forma complessa a doppia sella "D-shaped" ed è soggetto a deformazione durante il ciclo cardiaco. L'intervento richiede perciò l'utilizzo di protesi "D-shaped" (Tendyne, Tiara), inserite tramite accesso transfemorale (TF)-transettale (TS) [11].

Capitolo 2. Valvole cardiache protesiche meccaniche

Le valvole cardiache meccaniche (Mechanical Heart Valves, MHVs) (Figura 2.1) sono caratterizzate da un orifizio che consente il passaggio del sangue e un meccanismo che apre e chiude il dispositivo. I materiali che le compongono sono metalli, polimeri e ceramiche: materiali rigidi biocompatibili che offrono elevata durabilità e resistenza alla deformazione, tuttavia, a contatto con il flusso sanguigno, generano fenomeni di trombosi [3]. A seconda della loro struttura si dividono in tre tipologie: a palla ingabbiata (Figura 2.1 a), mono-leaflet (Figura 2.1 b) e bileaflet (Figura 2.1 c).

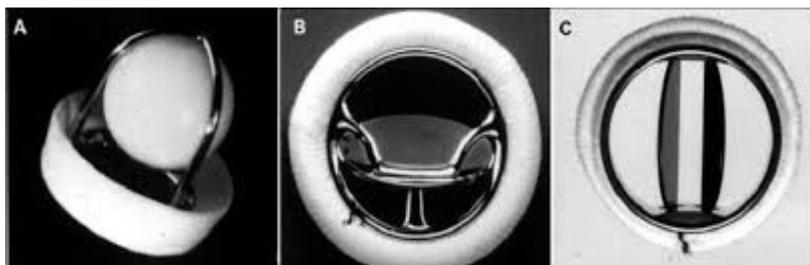


Figura 2.1: Le tre principali tipologie di valvole meccaniche: (a) protesi meccanica a palla ingabbiata, (b) protesi meccanica a disco oscillante, (c) protesi meccanica a due emidischi

2.1 Protesi meccanica a palla ingabbiata

Le valvole della prima generazione (Figura 2.1 a), presentavano un anello metallico circondato da 3 o 4 elementi simmetrici, la cui disposizione formava una gabbia chiusa; sia anello che gabbia venivano entrambi realizzati con lega di cromo-nichel-cobalto-molibdeno (Stellite). L'anello di metallo era a sua volta rivestito da un anello di sutura costituito da tessuto di teflon-polipropilene. L'elemento mobile era costituito da una palla di gomma siliconica impregnata di solfato di bario; successivamente, nel 1968 venne introdotto il trattamento termico della gomma siliconica dopo lo stampaggio per polimerizzare ulteriormente le sfere di silicone e prevenire l'assorbimento dei lipidi, che nei modelli precedenti comportava il deterioramento e il rigonfiamento della sfera.

Nonostante l'elevata resistenza strutturale e durabilità, questo tipo di valvola non venne più realizzato a causa dei problemi connessi al suo funzionamento: innestata nel cuore del paziente (Figura 2.2), produceva una forte distorsione del flusso ematico con conseguente danno emolitico e trombosi. La posizione centrale della palla, inoltre, generava occlusione del flusso e caduta di pressione [4].



Figura 2.2: Impianto di protesi meccanica a palla ingabbiata.

2.2 Protesi meccanica a disco oscillante (mono-leaflet)

Le valvole a disco oscillante (Figura 2.3), rispetto alle valvole precedenti, hanno rappresentato un significativo miglioramento progettuale sia dal punto di vista dei materiali utilizzati che dal punto di vista delle capacità di controllo del flusso ematico, con notevole riduzione della distorsione del flusso. Erano costituite da un disco centrale (in grafite, rivestita da carbonio pirolitico) vincolato a pressione all'interno di un anello circolare, mediante due supporti, a loro volta solidali ad un anello rigido metallico, rivestito da un anello esterno in materiale polimerico. La massima apertura della valvola prevedeva un'angolazione di 60° del disco; successivamente, la valvola venne modificata (1979) per consentire un angolo di apertura di 70° . Tuttavia, il posizionamento del disco e dei supporti non era adeguato e rendeva instabile la struttura: in 2 casi su 3 la protesi andava incontro a cedimento [4].



Figura 2.3: Esempio di protesi valvolare cardiaca meccanica a disco oscillante.

2.3 Protesi meccanica a due emidischi (bileaflet)

Nelle protesi bi-leaflet, il singolo disco oscillante è sostituito da un doppio emidisco (Figura 2.4) che migliora notevolmente le caratteristiche fluidodinamiche della protesi, rendendo le prestazioni più simili a quelle fisiologiche. L'elemento mobile è costituito da due emidischi che in chiusura formano un angolo di 120° , in apertura 85° rispetto al piano orizzontale dell'anello della protesi. Le valvole bileaflet dell'era attuale sono per lo più realizzate in carbonio pirolitico, con scheletro dell'anello in titanio o carbonio pirolitico e rivestito in dacron, i dischi in grafite e tungsteno ricoperti all'esterno con carbonio pirolitico [4].



Figura 2.4: Esempio di protesi valvolare cardiaca meccanica a due emidischi.

2.4 Complicanze associate alle valvole protesiche meccaniche

Nel marzo 1960 è stata eseguita la prima sostituzione della valvola aortica con una protesi meccanica; negli anni successivi sono state apportate numerose modifiche e sono stati introdotti nuovi modelli per ovviare a specifiche limitazioni di questi primi dispositivi [12]. Nonostante l'ottima efficienza sia in termini di durata che di proprietà meccaniche, questi dispositivi presentano lo svantaggio di provocare fenomeni tromboembolici. La trombosi è un evento patologico caratterizzato dalla formazione di trombi: masse solide costituite da globuli rossi, piastrine, fibrina e globuli bianchi. La formazione di coaguli di sangue, in risposta ad una lesione, è un meccanismo riparativo fisiologico; tuttavia, quando il coagulo si forma all'interno di un vaso sanguigno o a livello cardiaco, può creare occlusione e ostacolare il flusso ematico. In tal caso la formazione del coagulo è associata ad un evento patologico.

Dal punto di vista clinico, la formazione di trombi può portare alla perdita di funzionalità della valvola, un evento potenzialmente letale. Allo stesso modo, parti del trombo possono dar vita ad embolie in porzioni arteriose periferiche, provocando uno spettro di effetti che talvolta sono eventi transitori, altre volte fatali [13].

Secondo i principi della triade di Virchow, i 3 principali meccanismi di formazione di un trombo endovascolare coinvolgono fattori legati alla superficie, all'emodinamica e all'emostasi [14].

2.4.1 Fattori di superficie

A differenza dell'endotelio sano, che resiste attivamente alla trombosi, le superfici artificiali promuovono la coagulazione attraverso una serie di processi interconnessi. Nel momento in cui il sangue entra in contatto con una superficie diversa dall'endotelio sano, si attiva la via intrinseca della cascata coagulativa. L'evento iniziale nella formazione del trombo prevede il deposito del fibrinogeno (proteina plasmatica) (Figura 2.5) sul collagene subendoteliale o sulla superficie artificiale. Altre proteine adesive, tra cui la fibronectina e il fattore di von Willebrand vengono adsorbite e, insieme al fibrinogeno, mediano l'adesione delle piastrine. Una volta attivate, le piastrine rilasciano adenosina difosfato e trombassano A2 che coinvolgono ulteriori piastrine nell'adesione. Il fibrinogeno adsorbito viene presto sostituito con altri componenti, tra cui il fattore XII, il chininogeno ad alto peso molecolare, la precalicreina e il fattore XI. L'attivazione del fattore XII, attraverso la via intrinseca della coagulazione, innesca la produzione di trombina. La trombina, a sua volta, converte il fibrinogeno in fibrina determinando la formazione di un tappo piastrinico consolidato sulla superficie della protesi [14].

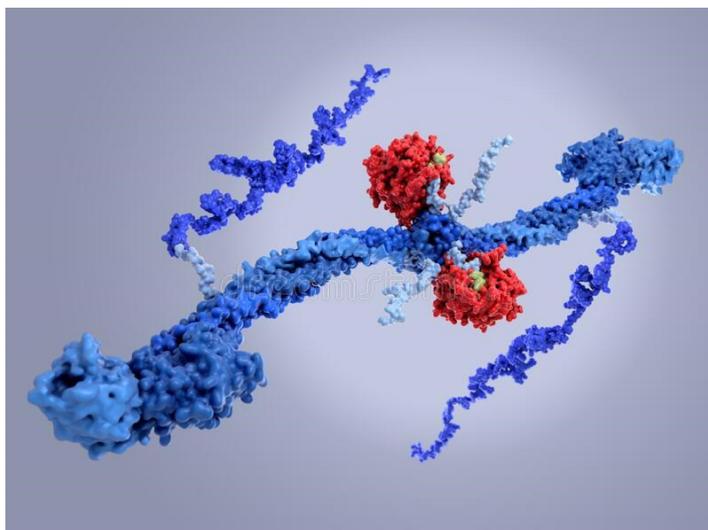


Figura 2.5: Molecola di fibrinogeno: in rosso le molecole di trombina responsabili dell'attivazione della fibrina mediante la rimozione di alcuni residui di amminoacidi (qui in giallo) dalle braccia flessibili al centro della molecola di fibrinogeno.

2.4.2 Emodinamica

I fattori emodinamici fanno riferimento allo stato emodinamico cardiocircolatorio del paziente e alle caratteristiche emodinamiche specifiche della protesi. Sia la turbolenza (moto caotico delle particelle) (Figura 2.6 b) che la stasi del flusso ematico generano trombosi: in presenza di simili condizioni si assiste all'aumento dell'attività pro-coagulante. La turbolenza locale è un

fattore che contribuisce al deterioramento valvolare: interrompe il flusso laminare (Figura 2.6 a) e diminuisce lo sforzo di taglio alle pareti, favorendo l'adesione delle piastrine sulla valvola. Gli stati a bassa gittata cardiaca, invece, impediscono al sangue di scorrere correttamente in prossimità della valvola generando stasi. In questa condizione le piastrine entrano in contatto più facilmente con l'endotelio, i fattori della coagulazione si attivano e si accumulano, l'afflusso di fattori anticoagulanti si riduce dando origine al trombo [14].

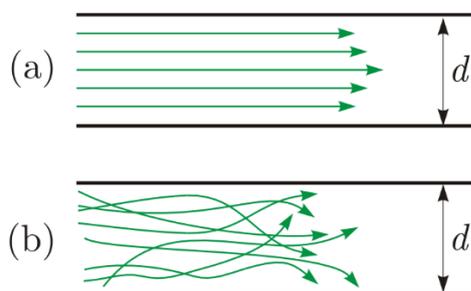


Figura 2.6: (a) rappresentazione del flusso laminare ideale in un tubo (le frecce indicano le velocità delle particelle: si noti che le particelle al centro del tubo si muovono più velocemente, in quanto risentono in misura minore dell'effetto dissipativo), (b) rappresentazione del flusso turbolento (le particelle si muovono con velocità e direzioni diverse).

2.4.3 Emostasi

Nel momento in cui un tessuto subisce un danno, l'emostasi consente di arrestare il sanguinamento grazie all'attivazione della via estrinseca della cascata coagulativa. Lesioni locali dei tessuti durante interventi chirurgici di sostituzione valvolare possono esporre il fattore tissutale (rilasciato spontaneamente dai tessuti in seguito al danno) al sangue, inducendo così l'attivazione locale della via di coagulazione estrinseca. Questo meccanismo può verificarsi anche in presenza di una valvola nativa gravemente danneggiata [14].

2.5 Trattamento farmacologico

Le protesi meccaniche innescano la coagulazione attraverso la via intrinseca ed estrinseca. I trattamenti antitrombotici consistono in antiaggreganti piastrinici (aspirina e/o un inibitore del recettore P2Y12 situato sulla membrana delle piastrine) e anticoagulanti (VKA o anticoagulanti orali diretti). I farmaci VKA agiscono come inibitori della vitamina K e sono il warfarin (Coumadin) e l'acenocumarolo (Sintrom).

Nelle protesi meccaniche i segmenti dell'anello di cucitura in dacron e teflon sono più trombogenici rispetto ai lembi della valvola. Pertanto, per prevenire la formazione di trombi

sull'anello di cucitura mentre si verifica l'endotelizzazione, i pazienti devono assumere il walfrin in un periodo che va da 3 a 6 mesi.

Un altro farmaco molto utilizzato è il Dabigatran il quale agisce come inibitore diretto della trombina, prevenendo la formazione di coaguli di sangue. A tal proposito è stato effettuato un esperimento in cui sono stati messi a confronto il walfrin e il dabigatran. L'esperimento ha dimostrato che il walfrin è più efficace: innescando la via intrinseca, le protesi meccaniche inducono la generazione locale di trombina in concentrazioni superiori a quelle di dabigatran, il quale agisce con successo solo se le due concentrazioni sono in rapporto 1:1. Al contrario, la trombina generata in presenza di warfarin è minima poiché a monte vengono ridotti i livelli funzionali dei fattori IX, X e II, responsabili della conversione di protrombina in trombina.

Gli inibitori orali del fattore Xa (molecola addetta alla produzione di mille molecole di trombina) sono farmaci molto efficaci; tuttavia, non sono ancora stati testati su pazienti con protesi meccaniche. Tali farmaci sono il rivaroxaban, l'apixaban e l'edoxaban [14].

Capitolo 3. Valvole cardiache protesiche biologiche

Le protesi valvolari biologiche (Biological Heart Valves, BHVs) sono ad oggi i dispositivi più utilizzati nelle operazioni di sostituzione poiché non necessitano di terapie anticoagulanti a vita; alcune di esse possono essere inserite tramite procedura transcateretere nei pazienti ad alto rischio [15].

Ogni anno, in tutto il mondo, vengono eseguiti oltre 300.000 interventi chirurgici di sostituzione delle valvole cardiache, il 40-60% dei quali utilizza BHV prodotte con tessuto animale (bovino o suino) fissato con glutaraldeide [15]. Le BHV hanno una discreta varietà di modelli e in base al tessuto con cui sono realizzate possono essere classificate in: autologhe (autografts), omologhe (homografts) ed eterologhe (xenografts).

3.1 Protesi biologiche in tessuto umano

Le protesi biologiche in tessuto umano si dividono in autologhe e omologhe: le valvole autologhe vengono costruite utilizzando tessuti ricavati dallo stesso paziente, le omologhe sono valvole umane prelevate da un donatore. Le due tipologie di valvole appena citate possono essere utilizzate in combinazione: la procedura di Ross è un esempio di intervento chirurgico homograft/autograft. Tale procedura, introdotta nel 1967 da Donald Ross, consiste nel trapianto della valvola polmonare autologa in posizione aortica; la lacuna nel tratto di efflusso del ventricolo destro viene successivamente colmata con l'inserimento di un homograft. Questa tecnica è per lo più riservata a bambini e giovani in quanto le valvole polmonari utilizzate come innesto, oltre a presentare un buon potenziale di crescita e rigenerazione, sono poco soggette ad endocarditi. La procedura di Ross è fortemente sconsigliata nei pazienti affetti da malattie del tessuto connettivo, disturbi infiammatori e patologie che coinvolgono la valvola polmonare. Gli strumenti utilizzati nella procedura sono l'ecocardiografia, il dilatatore di Hegar (per misurare gli autoinnesti) e le suture di polipropilene (per fissare la valvola innestata) [16].

Subito dopo l'estrazione della valvola polmonare, l'Hegar viene dilatato ed utilizzato per la misurazione dell'autotrapianto: se l'anulus non presenta le dimensioni adeguate all'impianto si procede con l'annuloplastica. Il passo successivo è la rimozione della valvola malata e l'innesto della valvola polmonare in posizione aortica, fissata grazie alle suture in propilene. Al posto della valvola polmonare viene inserito l'homograft (nei pazienti con meno di sei anni si preferisce utilizzare un innesto di vena giugulare bovina) [16]. Sebbene l'utilizzo di questa tecnica consenta di ottenere una valvola sostitutiva di ottime prestazioni dal punto vista emodinamico, i pazienti con meno di 25 anni vengono spesso rioperati a causa della degenerazione del condotto del tratto di efflusso nel ventricolo destro [16].

3.2 Protesi biologiche in tessuto animale

Le valvole cardiache bioprotesiche in tessuto animale (xenografts) (Figura 3.2) sono costruite a partire da valvole cardiache porcine o da pericardio bovino decellularizzati e trattati chimicamente, per preservarne i tessuti e ridurne l'immunogenicità. Il reagente di reticolazione deve essere biocompatibile e favorevole al miglioramento delle proprietà meccaniche, della durata e della stabilità della valvola. Esempi di reticolanti sono: l'alginato azide, il cloridrato di carbodiimmide, la glutaraldeide e il glicerolo [3]. Recentemente è stato riscontrato che, nonostante la decellularizzazione e i trattamenti chimici, gli xenotrapianti generano una significativa risposta immunitaria, che a sua volta porta le valvole impiantate alla calcificazione e al rapido deterioramento strutturale, in particolare nei pazienti giovani [17].

Le protesi porcine vengono prelevate intatte dal cuore del maiale e successivamente inserite in un supporto rigido (stent); le valvole pericardiche, invece, sono costituite da pericardio bovino sagomato ed applicato ad un supporto. La presenza dello stent, tuttavia, procura ingombro e rigidità alla protesi; sono dunque state introdotte le protesi stentless (senza supporto) (Figura 3.2). Anche gli stent di supporto possono influenzare la durata meccanica delle valvole cardiache bioprotesiche: uno stent rigido è esposto ad un rischio di cedimento precoce in corrispondenza delle commissure, mentre uno stent flessibile attutisce gli urti, mantenendo illese le commissure. Quest'ultimo, tuttavia, se inserito in posizione mitralica, può deformarsi durante l'operazione di inserimento o durante la contrazione cardiaca. Anche la flessione del perno dello stent può portare al deterioramento precoce della valvola poiché aumenta lo stress commissurale.

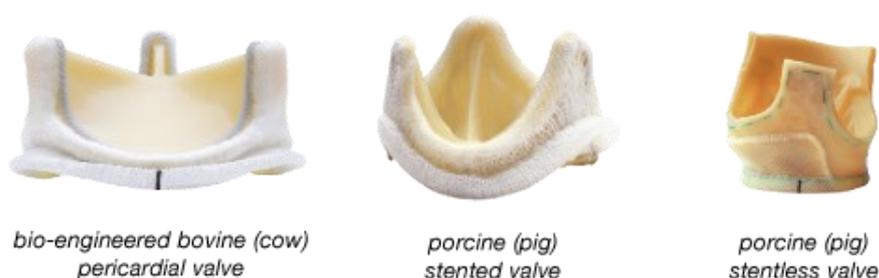


Figura 3.2: Esempi di protesi biologiche in tessuto xenogenico. A partire da sinistra: valvola in pericardio bovino, valvola porcina con supporto, valvola porcina senza supporto.

3.2.1 Complicanze associate

Lo svantaggio principale delle bioprotesi in tessuto xenogenico è il deterioramento valvolare causato dai processi chimici tra glutaraldeide e ioni calcio liberi nel sangue. Recenti studi

suggeriscono che alla base vi sia il rigetto cronico immunomediato del tessuto estraneo. Il sistema immunitario è una complessa rete costituita da diversi tipi di cellule, vie di segnalazione e molecole effettrici, che si è evoluta per difendere l'organismo da agenti patogeni esterni. Il meccanismo chiave del deterioramento strutturale della valvola dopo lo xenotrapianto è basato sul riconoscimento dell'antigene estraneo presente sui tessuti/organi impiantati, con conseguente attivazione del sistema immunitario [17]. Nelle valvole impiantate nei pazienti anziani è stata osservata una calcificazione minima, nei giovani, invece è risultata molto più evidente. Attualmente, nei pazienti di età superiore ai 65 anni il deterioramento valvolare nel 10% dei casi si verifica dopo dieci anni dall'intervento, mentre nei pazienti con età inferiore ai 35 anni la valvola si deteriora entro 5 anni dal trapianto. Questo deriva dal fatto che nei pazienti giovani le cellule immunitarie, come i linfociti e i macrofagi, secernono citochine (mediatori polipeptidici che consentono la comunicazione delle cellule del sistema immunitario) che a loro volta stimolano la produzione di calcio. In altri stati patologici, invece, la calcificazione è associata all'infiammazione [19].

Il principale xenoantigene che stimola il rigetto dello xenotrapianto di tessuti e organi provenienti da suini e bovini è l'antigene galattosio-alfa 1,3-galattosio (Gal): è stato osservato che gli anticorpi anti-Gal interagiscono con l'antigene, accelerando il processo di calcificazione. Recenti studi hanno dimostrato l'esistenza di un altro antigene che contribuisce al rigetto della valvola impiantata: l'acido N-glicolilneuraminico (NeuGc), un oligosaccaride espresso in tutti i mammiferi, ad eccezione dell'uomo, che, di conseguenza, lo riconosce come estraneo. La rimozione di tale oligosaccaride dal tessuto xenogenico favorirebbe la riduzione della risposta immunitaria (nello specifico degli anticorpi anti-NeuGc) [3].

3.2.2 Soluzioni per mitigare la risposta immunitaria

Sebbene la fissazione con glutaraldeide riduca in parte l'immunogenicità e la degenerazione delle valvole cardiache bioprotesiche, la risposta immunitaria persiste e può innescare calcificazione [20]. Il sistema immunitario può essere diviso in due grandi categorie: immunità innata e immunità adattativa, ciascuna in grado di riconoscere e rispondere ad una moltitudine di antigeni. L'immunità adattativa è operata principalmente dai linfociti T e B, dalle plasmacellule e dalla generazione di anticorpi, in grado di riconoscere ed eliminare in modo specifico gli agenti patogeni estranei. La risposta immunitaria adattativa umana è stata valutata sottoponendo matrici di foglietti di valvole cardiache xenogeniche non decellularizzati, alla crioconservazione senza ghiaccio (IFC). L'esperimento ha confermato che l'IFC può essere un metodo di trattamento o una fase di lavorazione appropriata per attenuare l'attivazione del

sistema immunitario adattivo poiché nelle valvole vi è stata una ridotta proliferazione di cellule T [17].

In un altro esperimento, è stata applicata una modifica immunologica con α -galattosidasi agli xenotrapianti decellularizzati e fissati con GA. Le cinque fasi del trattamento sono le seguenti:

- i) decellularizzazione completa con 1% sodio dodecil solfato, 1% Triton X-100 e 1% sodio lauroil sarcosinato per sopprimere l'antigenicità residua;
- ii) trattamento con α -galattosidasi per inattivare efficacemente gli epitopi α -Gal espressi sugli xenotrapianti decellularizzati;
- iii) utilizzo di un riempitivo per colmare gli spazi vuoti interstiziali nei tessuti trattati con GA con una sostanza macromolecolare;
- iv) utilizzo di un solvente organico per ridurre il potenziale di calcificazione dei tessuti fissati con GA estraendo i fosfolipidi e i cambiamenti conformazionali del collagene;
- v) disintossicazione per neutralizzare i gruppi aldeidici residui di GA.

È stata inoltre creata una piastra in Nitinol (lega di nichel-titanio a memoria di forma) come supporto della valvola. Questo nuovo protocollo di anti-calcificazione è stato applicato ad una valvola aortica suina fissata con GA e successivamente testato su piccoli animali; gli esiti sono stati positivi [20].

3.3 Protesi biologiche e meccaniche a confronto

Alla luce di quanto visto precedentemente risulta possibile affermare che ad ogni tipo di valvola protesica sono associati benefici e rischi. Le valvole meccaniche vengono solitamente impiantate nei pazienti più giovani in quanto, essendo dispositivi di lunga durata, non necessitano di continui interventi sostitutivi. Tuttavia, richiedono un trattamento farmacologico a vita a base di anticoagulanti, al fine di prevenire eventi tromboembolici. Le valvole bioprotesiche sono, invece, raccomandate nei pazienti che mostrano scarsa tolleranza al trattamento anticoagulante (in particolar modo i pazienti anziani); tuttavia subiscono un precoce deterioramento strutturale. Ciononostante, per la popolazione ad alto rischio la valvola bioprotesica presenta il vantaggio di poter essere sostituita tramite procedura transcateretere, evitando così i rischi dell'intervento "a cuore aperto" [21].

Capitolo 4. I progressi dell'ingegneria tissutale

La necessità di trovare approcci alternativi per superare i limiti delle valvole sostitutive attualmente utilizzate, ha condotto all'applicazione delle tecniche di ingegneria tissutale (TE) per la produzione di sostituti valvolari ingegnerizzati. La TE si occupa della rigenerazione dei tessuti danneggiati grazie all'utilizzo di sostituti biologici che ne ripristinano e migliorano la funzione. Il termine "tissue engineering" prende vita in un workshop della National Science Foundation (NSF) a Granlibakken, in California, e viene successivamente pubblicato negli atti del workshop da Skalak nel 1988. Questa definizione è stata successivamente perfezionata da Langer e Vacanti nel 1993 e articolata in tre gruppi principali che sono focalizzati su [22]:

- i) impianto delle singole cellule;
- ii) introduzione di fattori di crescita per stimolarne la crescita delle cellule;
- iii) applicazione di cellule su o all'interno di diversi scaffold che simulano la funzione della matrice extracellulare.

L'ingegneria tissutale in vitro (Figura 4.1 a) prevede l'utilizzo di scaffold in cui vengono seminate cellule di diverso tipo precedentemente coltivate in vitro, con lo scopo di creare una struttura capace di rispondere e rimodellarsi adeguatamente agli stress meccanici e dinamici a livello valvolare.

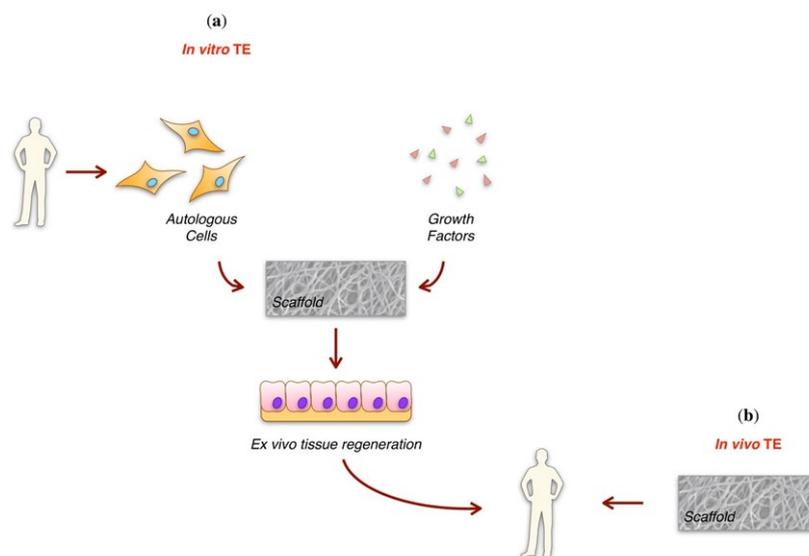


Figura 4.1: i passaggi fondamentali dell'ingegneria tissutale in vitro (a) e in situ (b).

L'ingegneria tissutale in situ (Figura 4.1 b) utilizza un supporto valvolare impiantato direttamente a contatto con le cellule del paziente, evitando così la fase di maturazione in vitro [24].

Entrambe le strategie si focalizzano sulla proliferazione e migrazione nel supporto delle cellule, sulla produzione dei componenti della matrice extracellulare, sulla degradazione del substrato e sul rimodellamento tissutale [24].

4.1 Ingegneria tissutale in vitro

L'ingegneria tissutale in vitro (approccio più comunemente utilizzato) (Figura 4.2) è associata alla semina di cellule viventi su scaffold naturali o sintetici. Si tratta di strutture prodotte con materiali biologici o sintetici in grado di fornire un supporto funzionale in tre dimensioni per promuovere la formazione di una nuova matrice extracellulare (ECM), simile a quella del tessuto nativo. In questa tecnica le cellule vengono raccolte, coltivate in vitro, seminate all'esterno o all'interno di uno scaffold poroso e biodegradabile (di dimensioni e forma specifiche) e inserite in un bioreattore per diverse settimane. All'interno di questo dispositivo, le cellule sono esposte a segnali biochimici e a stimoli meccanici grazie ai quali si forma e matura il tessuto desiderato [22].

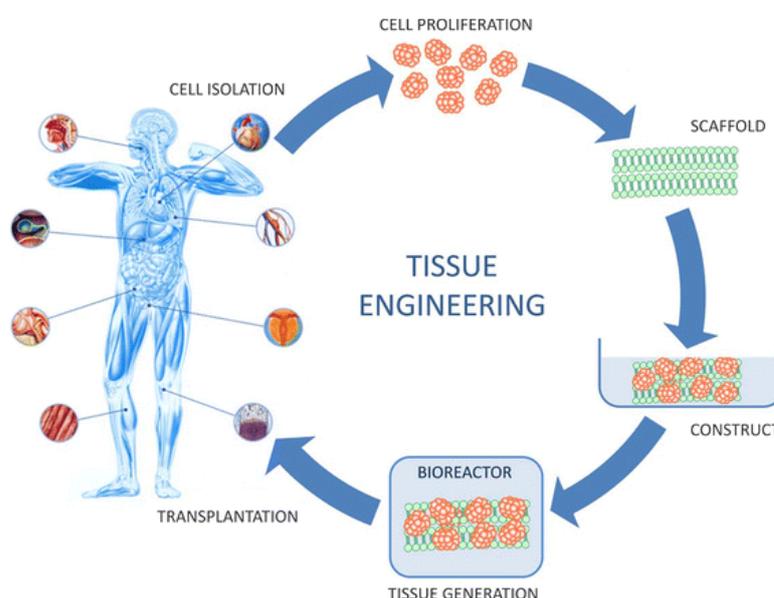


Figura 4.2: Ciclo esplicativo dell'ingegneria tissutale in vitro.

4.1.2 Scaffold sintetici

La crescita cellulare è favorita negli scaffold biodegradabili, biocompatibili, riassorbibili e con macrostrutture ad elevata porosità (almeno del 90%). I polimeri maggiormente impiegati sono l'acido poliglicolico (idrofilico) e polilattico (idrofobico): utilizzando entrambi si ottiene una matrice che limita l'assorbimento dell'acqua riducendo l'idrolisi. Tuttavia, in questo tipo di applicazione, entrando in contatto con le cellule del paziente, tali materiali potrebbero indurre

una reazione infiammatoria locale: la degradazione degli stessi polimeri risulterebbe rallentata o incompleta [24]. Successivamente, a seguito della degradazione e riassorbimento del substrato sintetico, negli spazi originariamente occupati dal substrato subentrano le cellule del paziente che costituiranno la matrice extracellulare. Diversamente, si genera tessuto fibroso con un'alterazione dell'architettura e della specializzazione cellulare che può portare alla necrosi del tessuto [24].

L'acido poliglicolico venne utilizzato nel 2000 in uno dei primi lavori sperimentali di Hoerstrup. L'esperimento prevedeva la realizzazione di una valvola a partire un substrato sintetico di acido poliglicolico associato a polidrossibutirrato, successivamente seminato in vitro con mioblasti e cellule endoteliali, all'interno di un bioreattore. La valvola venne poi innestata chirurgicamente in una pecora al posto della valvola polmonare e sottoposta a controllo ecocardiografico: la funzionalità della valvola era ottima e la matrice cellulare presentava caratteristiche simili ad una valvola normale. Inoltre, la degradazione del polimero aveva portato ad una endotelizzazione uniforme e ad una struttura trilaminare molto simile alla valvola nativa [24].

4.1.3 Scaffold naturali

I polimeri naturali impiegati nella produzione degli scaffold sono un sottoinsieme di materiali bioattivi che possono essere raggruppati in tre categorie: polisaccaridi (cellulosa, chitina e chitosano, acido ialuronico), proteine (collagene, elastina) e polipeptidi [25]. In quanto composti presenti in natura, presentano buoni profili di compatibilità e non sono tossici. L'utilizzo di questo tipo di materiali, tuttavia, presenta una serie di svantaggi: il primo legato al sistema immunitario nel caso di pazienti affetti da patologie autoimmuni (il sistema immunitario potrebbe riconoscere lo scaffold come identico al tessuto antigenico originale), il secondo di durata nel tempo (a differenza delle controparti sintetiche possono andare incontro a rapida degradazione). Dal punto di vista produttivo, la realizzazione di scaffold naturali è molto più complessa rispetto alle loro controparti sintetiche [25].

4.1.4 Scaffold di organi decellularizzati

È possibile impiegare organi animali o umani nella realizzazione di scaffold a base di ECM. Una volta decellularizzati, gli scaffold risultano altamente biomimetici poiché conservano l'architettura strutturale originale, le reti vascolari, le molecole di adesione e i marcatori per la segnalazione cellulare [25]. Le prime ricerche sono state condotte utilizzando solo organi di origine animale (ad esempio murini e suini) per esplorare l'integrità degli scaffold ottenute dal

processo di decellularizzazione, successivamente, raggiunti risultati ottimali nell'utilizzo di scaffold animali, negli esperimenti sono stati impiegati anche organi umani quali: il cuore, il fegato, i reni e i polmoni [25]. Recenti esperimenti hanno sottoposto le valvole porcine al trattamento di decellularizzazione attraverso detergenti enzimatici, alternando trattamenti ipertonici e ottenendo la completa eliminazione di cellule e nuclei cellulari. Tuttavia, non è ancora chiaro quanto la decellularizzazione debba essere estesa affinché non vengano deteriorati i componenti della matrice extracellulare fondamentali nel mantenimento dell'elasticità dei tessuti e nella prevenzione della calcificazione.

Secondo alcuni studi, i supporti valvolari biologici ideali sono omoinnesti valvolari decellularizzati e successivamente ricellularizzati con cellule autologhe: è stata rilevata una bassissima risposta antigenica, mantenimento delle proprietà meccaniche e un perfetto rimodellamento in vivo grazie alle cellule seminate in vitro [24].

4.1.5 Il ruolo del bioreattore e le cellule seminate in vitro

La semina cellulare è uno dei momenti più importanti nella realizzazione di una valvola ingegnerizzata: il bioreattore favorisce tale processo. Tale dispositivo consente di ricreare le condizioni fisiologiche che si verificano in vivo all'interno del cuore e permette di variare la pressione e il flusso pulsatile, applicando così stimoli idrodinamici opportuni. In questo modo è possibile stimolare la differenziazione cellulare ottenendo elementi che riproducono i componenti della matrice extracellulare della valvola nativa [24].

Le cellule più adatte a ripopolare la matrice non sono ancora state individuate; tuttavia, gli attuali studi sono indirizzati sia verso cellule differenziate tessuto-specifiche come le cellule endoteliali e muscolari, sia verso cellule staminali autologhe o allogeniche.

In un recente esperimento sono stati ottenuti fibroblasti e progenitori di cellule endoteliali a partire da cellule prelevate dal cordone ombelicale. Successivamente, partendo da cellule situate nelle arterie e vene periferiche sono state generate cellule endoteliali e miofibroblasti. La limitazione principale è la permanenza delle differenze morfofunzionali tra cellule vascolari e valvolari, unita alla necessità di sacrificare tessuto sano per il prelievo [24]. Un notevole interesse è stato riposto anche nelle cellule progenitrici derivanti dal midollo osseo: esse hanno la capacità di differenziarsi in molte tipologie cellulari ed inoltre sono semplici da prelevare (il prelievo si effettua tramite puntura ossea). Recentemente è stata realizzata una valvola cardiaca a tre lembi utilizzando cellule di derivazione stromale da midollo osseo: i risultati non sono stati soddisfacenti poiché la quantità di proteine della matrice extracellulare era inferiore rispetto a quella della valvola nativa [24].

4.1.6 Limitazioni

Per garantire la sopravvivenza, la migrazione, la proliferazione e la differenziazione cellulare, l'ambiente in cui avviene lo sviluppo del tessuto funzionale deve imitare i segnali chimici e biofisici dell'organismo. Le cellule autologhe prelevate da un qualsiasi tessuto richiedono lunghi e complicati procedimenti di espansione cellulare prima dell'impianto; inoltre, l'utilizzo di cellule allogene e xenogene, rende particolarmente impegnativi i processi di isolamento e di espansione cellulare, uniti alle complicazioni che comprendono: le risposte immunologiche derivanti dalle differenze genetiche e la potenziale trasmissione di batteri e virus dal donatore al tessuto ospite. Anche la via alternativa basata sull'utilizzo delle cellule staminali e progenitrici richiede una procedura molto complicata. Inoltre, le condizioni sviluppate all'interno del bioreattore potrebbero non essere pienamente ottimali per la crescita accelerata e il mantenimento della funzione cellulare [22].

4.2 Ingegneria tissutale in situ

Le limitazioni della TE convenzionale hanno dato origine all'ingegneria tissutale in situ, che sfrutta la capacità rigenerativa dell'organismo per consentirgli di autorigenerarsi e guarire. Questo processo è favorito dall'utilizzo di particolari scaffold, in grado di consentire la migrazione delle cellule staminali/progenitrici del paziente sulle superfici, assicurandone la successiva proliferazione. La manipolazione cellulare in vitro non è più necessaria: questo percorso terapeutico alternativo diminuisce il tempo e le risorse necessarie per rigenerare organi e tessuti. Il processo di rigenerazione in situ ha inizio con l'impianto di uno scaffold tessuto-specifico (talvolta in combinazione con fattori di crescita) nell'area di tessuto danneggiata [22]. La TE in situ sfrutta i segnali biochimici e biofisici presenti nel sito lesso del tessuto vivente: il corpo del paziente è il nuovo bioreattore, in grado di rigenerare il tessuto nel sito della lesione. I biomateriali che costituiscono gli scaffold sono essenziali per la rigenerazione tissutale in situ, ma anche la capacità rigenerativa delle cellule reclutate è di fondamentale importanza e gioca un ruolo critico in questo processo [22].

4.2.1 Biomateriali utilizzati nella realizzazione dello scaffold

Durante la rigenerazione tissutale in situ lo scaffold che viene impiantato nel sito danneggiato deve presentare le seguenti caratteristiche:

- i) la sua dimensione deve essere pari alla dimensione del sito danneggiato, in modo da occuparlo interamente;

- ii) deve fornire un microambiente favorevole allo spostamento delle cellule staminali o progenitrici del paziente;
- iii) deve fornire stimoli per innescare le cascate coagulative;
- iv) deve promuovere la differenziazione e proliferazione cellulare per la riparazione in situ;
- v) deve fornire un supporto provvisorio fino alla formazione del nuovo tessuto.

I biomateriali impiegati nella realizzazione dello scaffold devono essere biodegradabili, con sottoprodotti di degradazione non tossici e che non siano causa di rigetto. I biomateriali, inoltre, devono essere sufficientemente resistenti: se lo scaffold viene sottoposto a carico meccanico durante il processo di rigenerazione, può degradarsi e provocare un cedimento meccanico precoce; se invece il processo di degradazione è troppo lento potrebbero verificarsi complicazioni legate all'infiammazione. La degradazione può avvenire per idrolisi, come nel caso del destrano e del poli-lattide-coglicolide (PLGA) o per mezzo di enzimi [22]. Esistono quattro classi di biomateriali utilizzati nella rigenerazione tissutale in situ: (i) polimeri naturali e (ii) sintetici, (iii) biomateriali a base di ECM e (iv) bioceramiche.

- i) I polimeri naturali, derivati dai polisaccaridi e dalle proteine, sono biodegradabili, biocompatibili, e con caratteristiche molto simili alla matrice extracellulare (ECM). I più utilizzati nella rigenerazione tissutale in situ comprendono: cellulosa, alginato, acido ialuronico, amido, destrano, eparina e chitosano. Il chitosano, derivato della chitina, in particolare, presenta una natura cationica che lo rende un sistema ideale nella veicolazione di glicosaminoglicani anionici, fattori di crescita, citochine e geni. Le proteine, come il collagene, la fibrina, la gelatina e la seta, costituiscono l'altra classe di polimeri a base naturale. Il collagene, la proteina più abbondante nell'uomo, è un biomateriale facilmente lavorabile e che, nel peggiore dei casi, provoca risposta infiammatoria e immunitaria minime [22].
Esperimenti effettuati su un modello murino hanno dimostrato che la coniugazione di scaffold di collagene con anticorpi specifici per le cellule staminali consente la cattura di quest'ultime nel sito della ferita e promuove la rigenerazione dei cardiomiociti [23]. Tuttavia, l'utilizzo di biomateriali naturali presenta alcune limitazioni, come le proprietà meccaniche relativamente scarse, che ne riducono l'applicazione in siti anatomici caratterizzati da un elevato carico meccanico. Pertanto, per migliorare tali proprietà, i polimeri naturali sono spesso combinati con quelli sintetici, per produrre biomateriali ibridi che godono dei vantaggi di entrambe le classi di polimeri [22].

ii) I polimeri sintetici permettono di realizzare scaffold specifici, in grado di adattarsi all'anatomia del paziente e alle proprietà chimiche e fisiche del tessuto danneggiato. Una volta impiantati, non attivano la risposta immunitaria e possono essere progettati e costruiti con uno specifico tasso di biodegradazione, specifiche proprietà meccaniche e microstruttura. I biomateriali sintetici possono inoltre presentare siti funzionali, mediante l'accoppiamento con biomolecole [22]. Vengono utilizzati principalmente i poliesteri alifatici come il poli(acido L-lattico) (PLLA), il poliuretano (PU), il poli(acido lattico-glicolico)(PLGA) e il poli(caprolattone) (PCL): la loro degradazione comporta l'idrolisi dei gruppi estere nelle loro catene dorsali (prodotti non citotossici). Le proprietà di questa classe di biomateriali possono essere personalizzate selezionando la distribuzione del peso molecolare, la natura dell'architettura porosa e le caratteristiche del tessuto (comprese le modalità con cui viene degradato), per una specifica applicazione di rigenerazione tissutale, variando la composizione monomerica dei copolimeri [22].

iii) I biomateriali a base di ECM derivati da tessuti ECM decellularizzati (dECM), sono stati ampiamente studiati nella rigenerazione tissutale in situ, in quanto forniscono un ambiente molto simile a quello della ECM del tessuto nativo. Il processo di decellularizzazione preserva l'integrità strutturale, garantendo una perfetta vascolarizzazione. Nella produzione di tali scaffold, la matrice della vescica urinaria decellularizzata e la sottomucosa dell'intestino hanno prodotto ottimi risultati: impiantate in vivo, hanno mantenuto le caratteristiche bioattive necessarie a produrre effetti di rimodellamento. Queste bioattività includono reclutamento/differenziazione di cellule staminali/progenitrici endogene e la modulazione della risposta immunitaria dell'ospite [22]. Il principale svantaggio della dECM è la carenza di donatori; tuttavia, in un esperimento di rigenerazione ossea e cartilaginea, i biomateriali a base di ECM sono stati realizzati a partire da cellule coltivate in vitro con risultati favorevoli [22].

Recenti esperimenti hanno realizzato uno scaffold composto da un idrogel di poli-etilenglicole poroso degradabile, da una matrice di metalloproteinasasi, e da valvola aortica porcina decellularizzata. Questo scaffold è stato successivamente testato in un modello subdermico di ratto [26]. L'idrogel è stato caricato con il fattore derivato dalle cellule stromali-1 α (SDF-1 α) per rendere biologicamente attivo lo scaffold decellularizzato e attirare le cellule progenitrici dal flusso sanguigno, consentendo la ricellularizzazione del tessuto in vivo. Gli strati superficiali di idrogel hanno agevolato l'attività cellulare e protetto lo scaffold decellularizzato dalla rapida

degradazione, infiammazione e calcificazione, con conseguente miglioramento dei processi di ricellularizzazione e rimodellamento delle valvole cardiache decellularizzate impiantate.

Un altro studio ha dimostrato che SDF-1 α può controllare il fenotipo delle cellule valvolari ed è coinvolto nella ricellularizzazione e nella rigenerazione dello scaffold [27].

- iv) Le bioceramiche possono essere classificate nei seguenti gruppi: ceramiche quasi inerti (a base di allumina e zirconia), bioattive (a base di vetro bioattivo) e ceramiche riassorbibili (a base di β - e α -tricalcio fosfato). Le bioceramiche più utilizzate nel campo della TE in situ e che dimostrano una buona compatibilità, bioattività, osteoconduttività e osteoinduttività sono: l'idrossiapatite (HAp), i fosfati di calcio (CP) e il fosfato tricalcico (TCP). Sebbene siano molto fragili, combinate ai polimeri offrono buone proprietà meccaniche e vantaggi biologici.

4.2.2 Architettura e caratteristiche superficiali degli scaffold

L'architettura degli scaffold deve essere funzionale al passaggio delle sostanze nutritive e alla formazione di capillari sanguigni, per regolare l'infiltrazione e la crescita cellulare. La struttura dello scaffold può essere inoltre utilizzata per incapsulare molecole bioattive, necessarie al controllo del microambiente in vivo e all'ottimizzazione del processo di rigenerazione in situ: fattori di crescita, geni e citochine (molecole di natura proteica che forniscono istruzioni precise alle cellule grazie al legame con specifici recettori di membrana) [22]. Recenti studi hanno dimostrato che gli scaffold di PLGA arricchiti con il fattore 1 derivato dalle cellule stromali (SDF-1 α , un potente fattore di reclutamento delle cellule staminali) sono in grado di reclutare un notevole numero di cellule, aumentando così la formazione di nuovi vasi sanguigni, diminuendo la risposta fibrotica e regolando le risposte delle cellule infiammatorie. È stato inoltre dimostrato che anche le dimensioni, le forme e l'orientamento dei pori dello scaffold influenzano notevolmente la risposta cellulare (Figura 4.3). Nel caso dei materiali sostitutivi ossei, ad esempio, è stato osservato che gli scaffold con pori piccoli (200-300 μ m) presentano un ambiente ottimale per la semina delle cellule, tuttavia, limitano la proliferazione e la differenziazione cellulare. [22]

Gli scaffold devono inoltre presentare determinate caratteristiche chimiche e fisiche superficiali per promuovere l'adesione e proliferazione cellulare. Oltre al tipo di biomateriale impiegato nella fabbricazione dello scaffold, i trattamenti chimici superficiali e l'inclusione di nanoparticelle possono influenzare la rugosità delle superfici e migliorare la bioattività degli

scaffold. Recenti studi hanno dimostrato che incorporando particelle di fosfato di calcio e idrossiapatite in biomateriali porosi è possibile ottenere una migliore rigenerazione ossea [22].

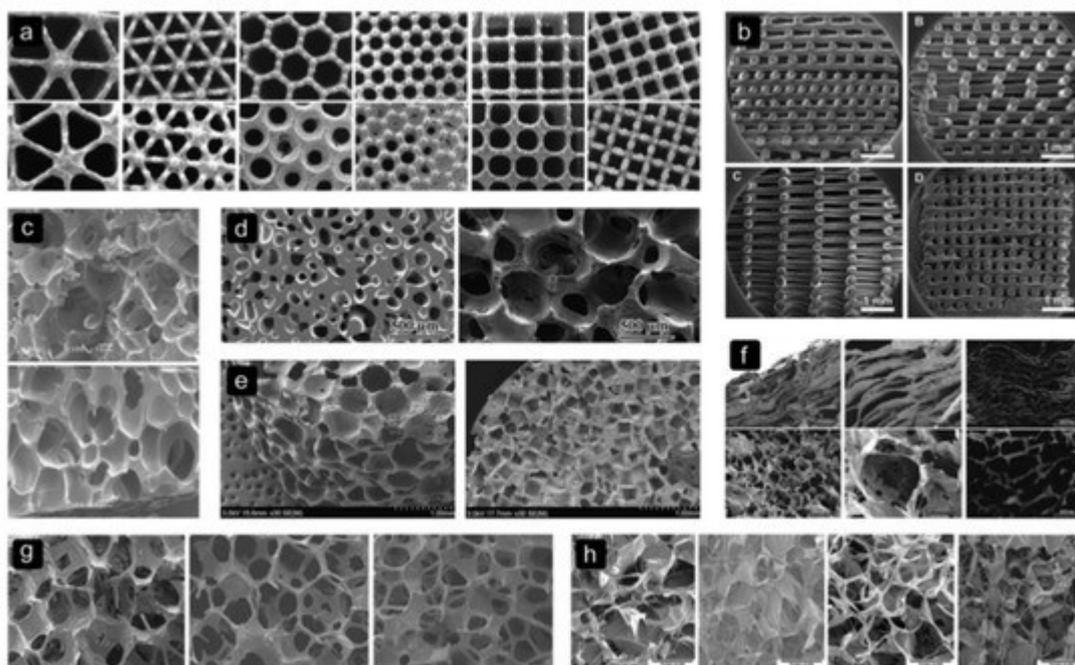


Figura 4.3: Esempi di diverse dimensioni dei pori, forme e biomateriali per scaffold per l'ingegneria tissutale. (**a**) Titanio (Ti6Al4V), (**b**) Amido poli(ϵ -caprolattone) (SPCL), (**c**) poli(lattide-co-glicolide) (PLGA), (**d**) Vetro bioattivo (BG), (**e**) poli (propilene fumarato) (PPF), (**f**) collagene-apatite, (**g**) vetro mesoporoso bioattivo (MBG) e (**h**) fibroina di seta (SF).

4.3 Valvole TEHV: dal vitro al situ

A partire dall'endotelizzazione in vitro di valvole biologiche, è stata progettata la valvola cardiaca tissutale ingegnerizzata (TEHV) [28]. Nello sviluppo della TEHV è stata prestata molta attenzione alla ECM, al rimodellamento e al comportamento cellulare delle TEHV, al fine di migliorarne le proprietà chimiche e meccaniche.

Sebbene recenti studi abbiano contribuito allo sviluppo tecnologico delle TEHV, queste valvole sono sottoposte a molteplici sfide che rendono difficile la loro commercializzazione: le rigide normative sulle terapie effettuate mediante l'utilizzo di materiale vivente, la complessità del procedimento di coltura in vitro e la conservazione delle valvole [28]. Queste sfide sono attualmente affrontate in due modi: la dTEHV (i) e la TEHV in situ (ii).

- i) La decellularizzazione (dTEHV) rimuove le cellule native e preserva l'ECM generata in un bioreattore in vitro (Figura 4.4); una volta impiantato, le cellule dell'ospite si infiltrano nell'innesto e formano una nuova valvola cardiaca autologa. Tuttavia, gli eccessivi costi dei bioreattori ne complicano la realizzazione [28].

ii) La TEHV in situ (Figura 4.4), non richiedendo alcun tipo di coltura in vitro, risulta priva di quei componenti biologici superficiali responsabili dell'attivazione della risposta immunitaria. Ciò che effettivamente permette allo scaffold di diventare un organo vero e proprio è l'attività cellulare dell'ospite, una condizione molto svantaggiosa in presenza di difetti immunologici e malattie di vario tipo [28].

Verranno di seguito illustrate le sfide delle attuali strategie di fabbricazione TEHV in situ che mirano ad ottenere dispositivi effettivamente utilizzabili nell'ambito della chirurgia riparativa e rigenerativa.

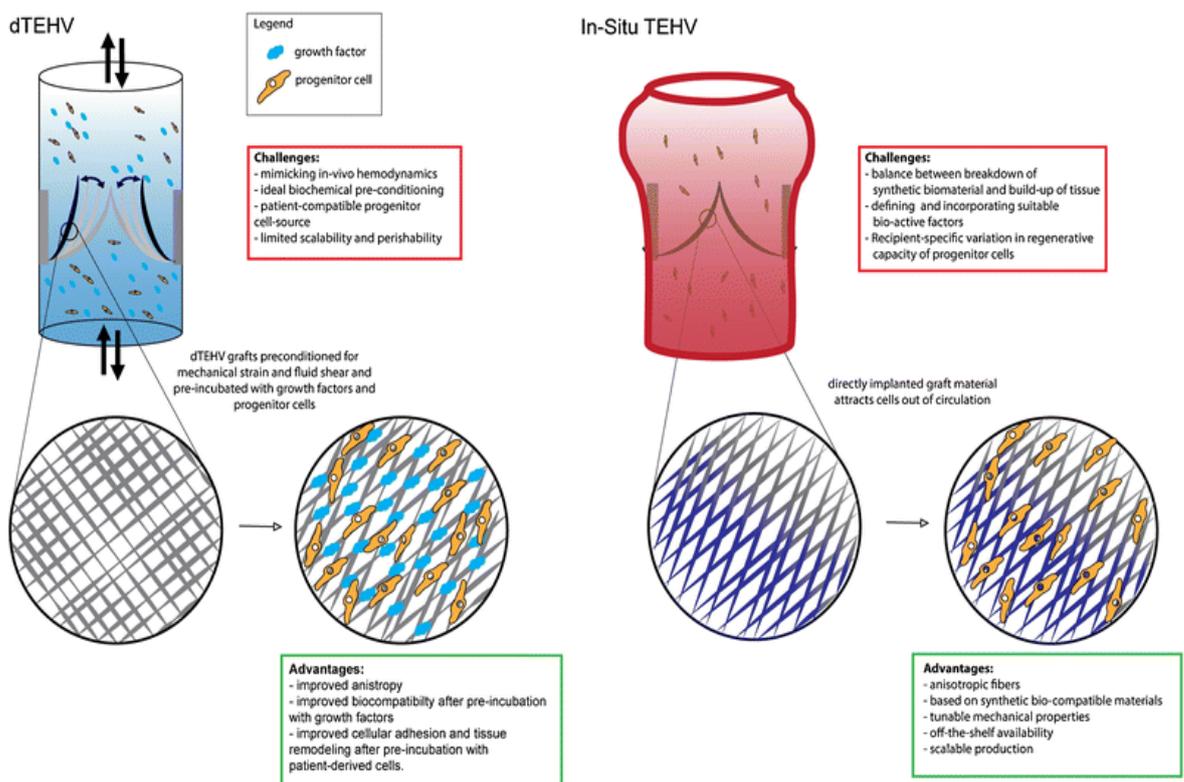


Figura 4.4: A partire da sinistra: schemi rappresentativi della dTHEV e THEV in situ.

4.3.1 La formazione del tessuto

Dal momento che il contenuto cellulare di un innesto 'in situ' è costituito dalle cellule del ricevente, la qualità della risposta cellulare influenza inevitabilmente il tasso di successo degli innesti. Sebbene sia difficile definire l'origine precisa e il carattere della risposta cellulare, si presume sia necessaria una popolazione di cellule progenitrici per ottenere lo sviluppo della valvola cardiaca. Tuttavia, fattori come il diabete mellito e l'età del paziente possono

influenzare direttamente la funzionalità delle cellule progenitrici, riducendone la proliferazione e migrazione [28].

La migrazione cellulare (fondamentale per il popolamento degli scaffold) è legata al numero di cellule CD34+ (cellule staminali emopoietiche multipotenti), carenti nei fumatori e nei soggetti affetti da malattie coronariche. I bambini, invece, presentano livelli significativamente più alti di cellule CD34+/KDR+, che assicurano una maggiore capacità di rigenerazione e maggiore probabilità di diffusione sugli innesti. Recenti studi hanno dimostrato che somministrando fattori di crescita ai pazienti maturi prima dell'impianto degli scaffold, si ottiene un aumento del numero e un miglioramento funzionale delle cellule progenitrici. Il fattore di stimolazione delle colonie di granulociti (una tipologia di globuli bianchi che presenta delle granulazioni nel citoplasma), in un trattamento di 4-5 giorni, ha infatti triplicato i globuli bianchi e aumentato di circa 6 volte il numero delle cellule CD34+ [28].

Un altro modo per guidare la formazione del tessuto consiste nel modificare il materiale degli scaffold: le caratteristiche meccaniche e biologiche dei tessuti, infatti, dipendono anche dalle caratteristiche della matrice, a cui le cellule aderiscono. Gli studi effettuati sui materiali polimerici si sono concentrati sulla riproduzione del collagene e dei glicosaminoglicani: elementi della matrice extracellulare con buone proprietà adesive. Alla luce di questo, è possibile dedurre che per sostituire completamente il materiale polimerico dell'innesto stimolando la proliferazione cellulare, è necessaria una buona quantità di ECM.

In sintesi, la scelta dei candidati per la realizzazione di scaffold bioattivi tiene in considerazione entrambi gli aspetti appena illustrati. Dal punto di vista applicativo, le chemochine, ad esempio, sono molecole in grado di favorire sia la migrazione che lo sviluppo cellulare. Inoltre, il fattore di crescita di derivazione piastrinica PDGF e il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF), applicati ai materiali sintetici, mostrano risultati promettenti nell'incorporare specifiche bioattività [28].

4.3.2 Comportamento chimico-fisico dopo l'impianto

La prima reazione dopo l'impianto nel sito danneggiato consiste nell'attivazione della risposta immunitaria: i macrofagi riconoscono lo scaffold come un corpo estraneo, lo degradano e lo trasformano in tessuto. Il tessuto si stabilizza gradualmente, fino a diventare simile alla valvola nativa sana. Nella valvola cardiaca nativa, i principali tipi di cellule sono le cellule endoteliali valvolari (VEC) e le cellule interstiziali valvolari (VIC): la loro interazione mantiene l'integrità strutturale della valvola. Gli esperimenti effettuati sulle dTEHV in vivo dimostrano che a quattro settimane l'endotelio ha già parzialmente rivestito le valvole; l'interstizio, invece,

contiene cellule simil-fibroblastiche quiescenti e cellule contrattili attive. Si presume che il processo di formazione della valvola dopo l'impianto sia iniziato con l'endotelizzazione (da cellule progenitrici endoteliali circostanti), seguita dalla transizione endotelio-mesenchimale (EndoMT) [28].

Dopo l'impianto, lo scaffold è la struttura portante principale e man mano che viene degradato e sostituito da ECM e cellule, le proprietà meccaniche della valvola cambiano; tuttavia, l'integrità strutturale deve essere mantenuta durante l'intero processo. I carichi a cui la valvola è sottoposta, infatti, agiscono in maniera continuativa sull'organizzazione delle cellule e sul rimodellamento della ECM. Per imitare queste condizioni e rendere la valvola idonea all'impianto, sono stati utilizzati bioreattori in vitro che sollecitano meccanicamente il tessuto. Gli esperimenti in vivo, tuttavia, hanno dato luogo a rigurgito e retrazione dei lembi (effetto dello squilibrio del carico esercitato sulla valvola in diastole). Tramite la modellazione computazionale, è stato possibile migliorare il design della protesi lavorando su due aspetti di fondamentale importanza nel funzionamento della valvola: il bilanciamento delle forze emodinamiche e le proprietà meccaniche dei tessuti. La successiva riprogettazione della valvola ne ha migliorato la funzionalità. [28].

Diversi studi hanno inoltre esaminato la via di segnalazione Notch: una via di segnalazione diretta tra cellula e cellula, di grande importanza per l'organizzazione generale dei tessuti, in particolare nello sviluppo cardiovascolare. I difetti nella segnalazione di Notch alterano la risposta cellulare sia nelle VICs sotto sforzo e nelle VEC sottoposte a forze di taglio, predisponendo le cellule a un destino calcifico e complicando l'implementazione della TEHV in situ [28].

4.4 Applicazioni della TEHV in situ

ImaValve (Materiali intelligenti per l'ingegneria tissutale delle valvole cardiache in situ) è un consorzio europeo composto da partner accademici e industriali con sede nei Paesi Bassi, Svizzera e Germania. Il consorzio ha lavorato per quattro anni con lo scopo di realizzare una valvola cardiaca aortica umana vivente (Figura 4.5) di ottime prestazioni (sia in termini di funzionalità che di durabilità) [29]. Dopo essere stata inserita nel paziente tramite procedura transcateretere minimamente invasiva, tale valvola ha la capacità di trasformarsi gradualmente in una valvola aortica vera e propria. Il prototipo di ImaValve è stato testato nelle pecore con ottimi risultati: la terapia rigenerativa ha avuto successo.

4.4.1 Obiettivi del progetto

Il consorzio ImaValve si è proposto di affrontare i limiti delle valvole cardiache attualmente utilizzate, guidando il corpo a guarire da solo. Il progetto si è posto importanti obiettivi:

- i) utilizzare due materiali nella produzione degli scaffold: un polimero elastico a lento riassorbimento e un polimero altamente idratato a rapido assorbimento;
- ii) combinare stent e scaffold in modo tale da favorire l'operazione trans catetere;
- iii) studiare i meccanismi di interazione tra corpo umano e scaffold;
- iv) rigenerare il tessuto danneggiato;
- v) dimostrare l'efficienza della nuova valvola dopo l'impianto.

4.4.2 Realizzazione

I materiali polimerici sintetici bioattivi a base di ureido-pirimidinone (UPy) che presentano proprietà elastiche possono essere resi bioattivi e trasformati in fibre sottili grazie alla tecnica dell'elettrofilatura. Sono stati progettati materiali altamente riassorbibili, simili a gel idratati: uniti alle fibre hanno permesso di realizzare tre famiglie di polimeri UPy biodegradabili e biocompatibili. Sulla base di test meccanici e studiando le tecniche di elettrofilatura, è stato selezionato il polimero con le caratteristiche più promettenti e successivamente, attraverso una serie di test in vivo, è stata testata la biocompatibilità di tale polimero e dei suoi prodotti di degradazione. Dopo aver incorporato nel polimero i fattori bioattivi, è stato realizzato uno scaffold ibrido mediante elettrofilatura coassiale di un idrogel a rapida degradazione (shell) e di un elastomero a lenta degradazione (core). Il materiale elastomerico procura funzionalità a lungo termine, mentre il materiale idrogel a rapida erosione controlla la risposta infiammatoria precoce e crea lo spazio vuoto necessario tra le fibre elastomeriche [29].

L'impianto transcateretere della valvola aortica (TAVI) è stato facilitato dall'utilizzo di marcatori in grado di guidare il corretto posizionamento della valvola nella radice aortica. Le dimensioni dello stent hanno inoltre consentito il rilascio controllato della valvola e la minima invasività [29].



Figura 4.5: Valvola realizzata nel progetto del consorzio ImaValve.

4.4.3 Valutazione

Per valutare l'effetto del materiale dello scaffold e il carico meccanico nelle prime fasi dopo l'impianto e dopo la formazione del tessuto, sono stati analizzati i comportamenti dei macrofagi: le prime cellule del sistema immunitario che aderiscono allo scaffold. Grazie alla stimolazione con il fattore bioattivo IL-4, questo tipo di cellula è stata resa pro-rigenerativa [29]. È stata inoltre studiata la risposta della via di segnalazione cellulare Notch ai segnali meccanici e incorporata in un modello computazionale di segnalazione cellulare cardiovascolare. Il modello ha permesso di valutare in quanto tempo sarebbe stata raggiunta l'omeostasi (attitudine degli organismi viventi a conservare le proprie caratteristiche al variare delle condizioni esterne, tramite meccanismi di autoregolazione).

Sono stati inoltre sviluppati modelli sperimentali e computazionali per prevedere la crescita e il rimodellamento dei neo-tessuti. A tal proposito è stato progettato e testato un modello di tessuto ingegnerizzato in vitro per valutare la resistenza cellulare e le condizioni strutturali del tessuto prima e dopo l'azione del carico. Al termine dell'esperimento è stato constatato che, a seconda del design iniziale dello scaffold, è possibile raggiungere uno stato meccanicamente stabile. Il prototipo valvola aortica di ImaValve è stato testato sulle pecore e i risultati ottenuti si sono dimostrati promettenti.

Conclusione

Alla luce di quanto analizzato, gli attuali dispositivi protesici non possiedono caratteristiche adeguate a rispondere alle reali esigenze del paziente nel corso del tempo: le valvole meccaniche richiedono un trattamento anticoagulante a vita, mentre le valvole biologiche calcificano e vanno sostituite ogni 10-15 anni.

La soluzione a queste limitazioni sembrerebbe risiedere nell'innovativo approccio dell'ingegneria tissutale in questo settore, con due differenti metodologie applicative: la prima, detta "in vitro", che prevede l'utilizzo di scaffold in cui vengono impiantate cellule di diverso tipo precedentemente coltivate in vitro, con lo scopo di creare una struttura capace di rispondere e rimodellarsi adeguatamente agli stress meccanici e dinamici a livello valvolare; la seconda, detta "in situ", che consente all'organo di autorigenerarsi e non necessita né di coltura cellulare in vitro né dell'utilizzo del bioreattore.

Come testimoniato dai numerosi esperimenti precedentemente illustrati, ambedue le metodologie innovative hanno avuto ottimi riscontri applicativi su modello animale, ma non sono ancora stati condotti test su soggetti umani.

In conclusione, l'approccio dell'ingegneria tissutale rappresenta sicuramente il futuro delle protesi valvolari cardiache e delle terapie rigenerative di altri organi.

Bibliografia

- [1] Anna O'Donnell and Katherine E. Yutzey Mechanisms of heart valve development and disease. The Company of Biologists Ltd. 2020; 147(13).
- [2] Britannica, The Editors of Encyclopaedia. "heart". Encyclopedia Britannica, 2021.
- [3] Oveissi F, Naficy S, Lee A, Winlaw DS, Dehghani F. Materials and manufacturing perspectives in engineering heart valves: a review. Mater Today Bio 5. 2019.
- [4] Mathew P, Kanmanthareddy A. Prosthetic Heart Valve. In: StatPearls. 2022.
- [5] Akahori H, Tsujino T, Masuyama T, Ishihara M. Mechanisms of aortic stenosis. J Cardiol. 2018; 71(3):215-220.
- [6] Siani A, Perone F, Costantini P, Rodolfi S, Muscogiuri G, Sironi S, Carriero S, Pavon AG, van der Bilt I, van Rosendaal P, Broekhuizen L, Teske A, Cramer MJ, Guglielmo M. Aortic regurgitation: A multimodality approach. J Clin Ultrasound. 2022; 50(8): 1041-1050.
- [7] Alkady H, Saber A, Abouramadan S, Elnaggar A, Nasr S, Mahmoud E. Mitral valve replacement in mitral stenosis; the problem of small left ventricle. J Cardiothorac Surg. 2020; 15(1): 67.
- [8] El Sabbagh A, Reddy YNV, Nishimura RA. Mitral Valve Regurgitation in the Contemporary Era: Insights Into Diagnosis, Management, and Future Directions. JACC Cardiovasc Imaging. 2018; 11(4): 628-643.
- [9] Girdauskas E, Pausch J, Harmel E, Gross T, Detter C, Sinning C, Kubitz J, Reichenspurner H. Minimally invasive mitral valve repair for functional mitral regurgitation. Eur J Cardiothorac Surg. 2019; 55(Suppl 1): 17-25.
- [10] Enta Y, Nakamura M. Transcatheter mitral valve replacement. J Cardiol. 2021; 77(6): 555-564.
- [11] Federico De Marco, Matteo Casenghi, Andrea Garatti, Marco Guerrini, Maurizio Tusa, Francesco Bedogni Protesi mitraliche transcaterere: quale il ruolo attuale G Ital Cardiol 2019; 20(4 Suppl 1): 20-26.
- [12] Hirji SA, Kaneko T, Aranki S. The revolution and evolution of mechanical valves: The ball has left the cage. J Thorac Cardiovasc Surg. 2018 May;155(5): 149-150.
- [13] Cannegieter SC, Rosendaal FR, Briët E. Thromboembolic and bleeding complications in patients with mechanical heart valve prostheses. Circulation. 1994; 89(2): 635-41.
- [14] Dangas GD, Weitz JI, Giustino G, Makkar R, Mehran R. Prosthetic Heart Valve Thrombosis. J Am Coll Cardiol. 2016; 68(24): 2670-2689.

- [15] Li KYC. Bioprosthetic Heart Valves: Upgrading a 50-Year Old Technology. *Front Cardiovasc Med.* 2019; 6: 47.
- [16] Ali MA, Chowdhury YS. Stentless Autograft/Homograft Aortic Valve Replacement. 2022. In: *StatPearls.*
- [17] Bozso SJ, El-Andari R, Al-Adra D, Moon MC, Freed DH, Nagendran J, Nagendran J. A review of the immune response stimulated by xenogenic tissue heart valves. *Scand J Immunol.* 2021; 93(4): 13018.
- [18] Manji RA, Lee W, Cooper DKC. Xenograft bioprosthetic heart valves: Past, present and future. *Int J Surg.* 2015 Nov; 23(Pt B): 280-284.
- [19] Manji RA, Manji JS. Studying Xenograft Rejection of Bioprosthetic Heart Valves. *Methods Mol Biol.* 2020; 2110: 227-243.
- [20] Lim HG, Kim GB, Jeong S, Kim YJ. Development of a next-generation tissue valve using a glutaraldehyde-fixed porcine aortic valve treated with decellularization, α -galactosidase, space filler, organic solvent and detoxification. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2015 Jul; 48(1): 104-13.
- [21] Goldstone AB, Chiu P, Baiocchi M, Lingala B, Patrick WL, Fischbein MP, Woo YJ. Mechanical or Biologic Prostheses for Aortic-Valve and Mitral-Valve Replacement. *N Engl J Med.* 2017; 377(19): 1847-1857.
- [22] Abdulghani S, Mitchell GR. Biomaterials for In Situ Tissue Regeneration: A Review. *Biomolecules.* 2019; 9(11): 750.
- [23] Shi C, Li Q, Zhao Y, Chen W, Chen B, Xiao Z, Lin H, Nie L, Wang D, Dai J. Stem-cell-capturing collagen scaffold promotes cardiac tissue regeneration. *Biomaterials.* 2011; 32(10): 2508-15.
- [24] Dainese L, Barili F, Andreini D, Guarino A, Micheli B, Borsetti CA, Polvani G, Parolari A, Fusari M, Biglioli P. Valvole cardiache ingegnerizzate: stato dell'arte [Cardiac engineered valves: state of the art]. *G Ital Cardiol.* 2008; 9(3): 167-72.
- [25] Edgar L, McNamara K, Wong T, Tamburrini R, Katari R, Orlando G. Heterogeneity of Scaffold Biomaterials in Tissue Engineering. *Materials.* 2016; 9(5): 332.
- [26] Dai J, Qiao W, Shi J, Liu C, Hu X, Dong N. Modifying decellularized aortic valve scaffolds with stromal cell-derived factor-1 α loaded proteolytically degradable hydrogel for recellularization and remodeling. *Acta Biomater.* 2019; 88: 280-292.

- [27] Levato R, Planell JA, Mateos-Timoneda MA, Engel E. Role of ECM/peptide coatings on SDF-1 α triggered mesenchymal stromal cell migration from microcarriers for cell therapy. *Acta Biomater.* 2015; 18: 59-67.
- [28] Stassen OMJA, Muylaert DEP, Bouten CVC, Hjortnaes J. Current Challenges in Translating Tissue-Engineered Heart Valves. *Curr Treat Options Cardiovasc Med.* 2017 Sep; 19(9): 71.
- [29] Carlijn Bouten Intelligent materials for in-situ heart Valve tissue engineering Final publishable summary report. 2017.