UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTA' DI INGEGNERIA

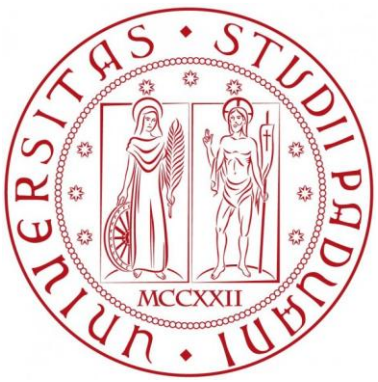
DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

TESI DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

INGEGNERIA DEI TESSUTI CARDIACI

RELATORE: CH.MO PROF. ANDREA BAGNO

LAUREANDA: CANOSSA SOFIA



ANNO ACCADEMICO 2011/2012

INDICE

ABSTRACT 5

INTRODUZIONE 7

CAPITOLO 1. Ingegneria tessutale 8

1.1 Principali strategie 8

CAPITOLO 2. Il cuore 10

2.1 anatomia cardiaca 10

2.2 fisiologia cardiaca 12

2.2.1 fibrocellula miocardica 14

2.3 malattie cardiache più comuni 18

2.3.1 infarto miocardico 20

CAPITOLO 3. Costrutti cardiaci 24

3.1 scaffolds 24

3.1.1 biomateriali utilizzati 24

3.1.1.1 biomateriali naturali 24

3.1.1.2 biomateriali sintetici 26

3.1.2 struttura 28

3.2 colture cellulari 32

3.2.1 scelta delle cellule 32

3.2.2 in vitro 34

3.2.3 in situ 36

3.2.4 in vivo 38

3.3 Sostanze capaci di indurre la formazione di tessuto 38

CAPITOLO 4. Cardiac patch su scaffold in alginato con nanofilamenti in oro 40

4.1 Metodi di formazione della cardiac patch 46

CONCLUSIONI 49

BIBLIOGRAFIA 50

ABSTRACT

L'ingegneria tessutale cardiaca è una promessa per il futuro, è un processo innovativo per la cura di problemi cardiaci che possono essere congeniti, post-traumatici o verificarsi nel corso della vita di un essere umano. Molto vasto è il campo dell'ingegneria tessutale cardiaca, comprende infatti studi nelle scienze dei biomateriali, di biologia cellulare e della medicina. In questa trattazione varrà in particolare analizzato anatomicamente e fisiologicamente il comportamento dell'organo cardiaco e delle cellule che principalmente lo compongono. Verranno analizzati i principali biomateriali impiegati in questo contesto facendo una distinzione tra naturali: collagene, fibrina, acido ialuronico, alginati, chitosano; e sintetici: PGA, PLA, PLGA, PTFE, PEG, PCL. Saranno poi descritti i vari approcci e le diverse strategie di formazione di neotessuto partendo dalle tipologie di scaffolds utilizzate: preformati, in idrogel, "senza scaffold", e proseguendo con la scelta delle cellule da impiantare, fondamentalmente cellule staminali. Verrà poi in conclusione descritta una particolare tipologia di patch cardiaca realizzata con nanofilamenti in oro su scaffold in alginato.

INTRODUZIONE

Il cuore è l'organo più importante del nostro corpo, il cui funzionamento corretto è essenziale per condurre una vita normale. Negli ultimi anni, per svariate cause, dallo stress, all'invecchiamento, al subentrare di malattie, i disturbi cardiaci ed in particolare gli infarti miocardici sono sempre più numerosi. A seguito del verificarsi di un infarto le cellule cardiache adulte, cardiomiociti, hanno una capacità di rigenerarsi molto limitata e il trapianto di cuore è il rimedio migliore; questa terapia di cura però non è sempre praticabile, soprattutto per la mancanza di donatori, ad oggi infatti il numero di organi trapiantabili è di molto inferiore rispetto a quelli necessari. L'avvento dell'ingegneria tessutale, ed il suo continuo evolversi, ha dato molte possibili soluzioni a queste tipologie di problemi. L'ingegneria tessutale cardiaca, del tessuto miocardico in particolare, si occupa infatti dello studio dell'organo cardiaco, e dell'ambiante ad esso prettamente circostante al fine di cercare di riparare e rimpiazzare le parti lese dell'organo in seguito ad un infarto. In questa trattazione si parlerà delle varie tecniche e strategie utilizzate nell'ingegneria del tessuto miocardico mostrandone pro e contro, fornendo così una panoramica generale di questo ambito. In ultima analisi verrà descritta una particolare patch cardiaca ancora in fase di studio e di verifica per la quale sono però in prospettiva futura buoni risultati.

CAPITOLO 1 - INGEGNERIA TESSUTALE

L'ingegneria tessutale è stata definita nel 1998 in California come " *una tecnica interdisciplinare che applica i principi e i metodi dell'ingegneria e delle scienze biologiche con l'obiettivo di comprendere le relazioni fondamentali tra struttura e funzione nei tessuti sani e malati dei mammiferi e di sviluppare sostituti biologici in grado di ripristinare, mantenere o migliorarne le funzioni* " .

Questo recente campo di ricerca è nato in risposta: al crescente fabbisogno di tessuti e organi che le donazioni non sono in grado di soddisfare, all'insufficienza della quantità di tessuto disponibile nel caso di autotrapianti, allo scopo di evitare tutti i problemi di rigetto sempre presenti nel caso di trapianti di tessuti (sia che si tratti di allotrapianti che di xenotrapianti) e per evitare problemi relativi a gravi infezioni virali cui i materiali di provenienza umana o animale utilizzati per l'innesto nei trapianti possono essere trasportatori.

Tale settore è caratterizzato da una grande interdisciplinarità: in esso convergono significativi contributi delle scienze di base, della scienza dei biomateriali, della bioingegneria, delle biotecnologie, della biologia cellulare, della medicina rigenerativa. Forse è proprio questa collaborazione di menti specializzate in campi diversi che ci ha portato e porterà a validi risultati.

L'ingegneria tessutale mira a coltivare a livello di laboratorio e, in molti casi, anche a livello industriale, linee cellulari e tessuti con le caratteristiche del ricevente. Le cellule ed i tessuti ottenuti in vitro sono poi innestati nel paziente stesso, rispristinando le funzionalità compromesse senza dover ricorrere al trapianto di materiali biologici prelevati da donatori estranei. Rispetto alle tradizionali tecniche di trapianto quindi, i tessuti ingegnerizzati, in caso di successo, si integrano con quelli del paziente, apportando in tal modo un contributo specifico e duraturo alla cura dello stato patologico, senza richiedere debilitanti e costosi trattamenti farmacologici. [1]

1.1 Principali strategie

Definendo la neomorfogenesi come il processo che porta alla formazione di nuovo tessuto sia in vitro che in vivo, dobbiamo tenere presente che, perché questo processo in vitro abbia successo, è necessario creare un ambiente favorevole. Con ciò si intende una situazione che porti le cellule a riprodursi e al contempo a restare sufficientemente vicine da favorire l'organizzazione necessaria

per la formazione di nuovo tessuto. Secondo la tecnica più comune le cellule vengono seminate su matrici porose, denominate scaffolds, con strutture che possono essere: a maglia, spugnosa o fibrosa; le cellule vengono fatte crescere controllando attentamente i nutrienti e le condizioni ambientali. La struttura degli scaffolds e il materiale che li compone, devono essere studiati con scrupolosità, in quanto devono permettere l'adesione delle cellule alla superficie e al contempo mantenere queste ultime abbastanza vicine da poter interagire per la generazione di nuovo tessuto.

Le principali strategie di rigenerazione di tessuto sono fondamentalmente tre:

- Impiego di sostanze capaci di indurre la formazione di tessuto:
  si tratta di molecole segnale, fattori di adesione e di crescita, isolate in piccole quantità da fonti naturali con l'uso di sofisticati e costosi metodi di purificazione.
- Utilizzo di cellule isolate, cellule staminali:
  metodologie che potrebbero permettere la sostituzione mirata delle cellule malate con cellule capaci di ripristinare la funzione desiderata. Le cellule staminali in particolare, nonostante le diverse implicazioni di carattere etico e morale che le circondano, sono le più utilizzate e studiate.
- Uso di cellule seminate su matrici o inglobate all'interno di esse:
  matrici di origine naturale o costituite invece da polimeri di sintesi, tecniche utilizzate per la costruzione di sistemi nei quali le cellule legate alle matrici vengono direttamente impiantate nell'organismo del ricevente.

Le tecniche di ingegneria tessutale stanno rapidamente progredendo verso la progettazione di qualsiasi tessuto umano, seguirà nei prossimi capitoli una trattazione in questo senso inerente al tessuto cardiaco.

CAPITOLO 2 – IL CUORE

2.1 Anatomia cardiaca

Il cuore è l'organo centrale dell'apparato circolatorio sanguineo che permette la circolazione del sangue all'interno dei vasi sanguinei con le sue contrazioni ritmiche. E' un organo cavo, impari, a struttura prevalentemente muscolare. E' situato nella cavità toracica, più precisamente in una parte di questa, il mediastino anteriore (fra i due polmoni), sopra il diaframma. Non è in posizione perfettamente mediana, essendo per due terzi spostato a sinistra. E' contenuto in un sacco sieroso, il pericardio, che lo isola dagli organi vicini e che è formato da due parti: l'una esterna, connettivale, detta pericardio fibroso, l'altra interna, sierosa, denominata pericardio sieroso.

Il cuore possiede al suo interno quattro cavità: due superiori, gli atrii, distinti in destro e sinistro, due inferiori, i ventricoli destro e sinistro (Figura 2.1).

La cavità dell'atrio destro comunica con quella del ventricolo destro mediante un orifizio atrioventricolare munito di una valvola atrioventricolare detta valvola tricuspide che assicura la chiusura dell'orifizio durante la contrazione (sistole) del ventricolo, impedendo il reflusso del sangue nel sovrastante atrio. La valvola tricuspide aperta ha la forma di un imbuto, con apice sporgente nella cavità ventricolare. E' formata da tre lembi triangolari (cuspidi) che con la loro base si fissano al contorno dell'orifizio e presentano, sul margine, l'attacco per le corde tendinee, sottili prolungamenti muscolari posti all'interno dei ventricoli. Analogamente la cavità dell'atrio sinistro comunica con quella del ventricolo sottostante per mezzo di un orifizio atrioventricolare che presenta una valvola denominata valvola bicuspide o mitrale, costituita da due lembi (cuspidi) trapezoidali che, come già descritto per la valvola tricuspide, hanno un margine che si fissa al contorno dell'orifizio atrioventricolare e un margine libero rivolto verso la cavità del ventricolo sinistro, al quale si inseriscono le corde tendinee dei muscoli papillari. Tale valvola permette al sangue di passare dall'atrio al ventricolo durante la sistole atriale (e la contemporanea diastole ventricolare), ma impedisce il reflusso del sangue dal ventricolo all'atrio durante la sistole ventricolare.

Le due cavità di destra non comunicano con quelle di sinistra, ma sono separate da una parete continua (setto) in parte di natura fibrosa, ma per la massima estensione di natura muscolare.

Da ciascun ventricolo trae origine un grosso vaso arterioso: l'aorta dal ventricolo sinistro, l'arteria polmonare da quello destro. Dall'aorta origina il circolo sistemico che ritorna al cuore attraverso

due vene cave sfocianti nell'atrio destro (vena cava superiore e vena cava inferiore). L'arteria polmonare porta il sangue a irrorare i polmoni dai quali, a scambi gassosi avvenuti, esso ritorna al cuore attraverso le vene polmonari, due da ciascun polmone, sfocianti nell'atrio sinistro.

Il circuito che il sangue compie è pertanto duplice:

- circolo sistemico o grande circolo: dall'atrio sinistro, attraverso la valvola mitrale, al ventricolo sinistro e da questo agli organi periferici attraverso aorta, arterie, arteriole e capillari, ove hanno sede gli scambi a livello cellulare. Da qui attraverso venule, vene e le due vene cave il sangue ritorna all'atrio destro;

- circolo polmonare o piccolo circolo: dall'atrio destro, attraverso la valvola tricuspide, al ventricolo destro e da questo, attraverso l'arteria polmonare e le sue diramazioni, ai capillari polmonari ove hanno sede gli scambi gassosi. Da qui, infine, attraverso venule e vene polmonari il sangue ritorna all'atrio sinistro.

La parete del cuore è formata da tre tonache sovrapposte che dall'interno all'esterno sono:

- L'endocardio, sottile membrana che riveste tutte le cavità del cuore formato da una lamina endoteliale disposta su un sottile strato di connettivo lasso, a sua volta poggiante sopra un sottile strato di connettivo elastico.

- Il miocardio, che costituisce la parte più spessa della parete del cuore, è organizzato in modo da formare due sistemi fra loro indipendenti, uno per gli atrii e uno per i ventricoli, separati dall'interposizione dello scheletro fibroso del cuore, sul quale le fibrocellule muscolari, soprattutto quelle dei ventricoli, prendono attacco. Il miocardio che forma le pareti del cuore è detto miocardio comune, per distinguerlo da quello che costituisce una sua particolare differenziazione, specializzato nel trasporto degli impulsi contrattili, che è il miocardio specifico del sistema di conduzione, che collega funzionalmente la muscolatura degli atrii alla muscolatura dei ventricoli. Il miocardio specifico è formato da cellule miocardiche che hanno perso le loro proprietà contrattili acquisendo in modo specifico funzioni di conducibilità. Esse pertanto contengono pochi fasci di miofibrille e appaiono più chiare rispetto alle fibrocellule del miocardio comune. Il miocardio specifico possiede frequenza spontanea e velocità di conduzione elevata: esso rappresenta la sede nella quale insorgono gli stimoli di contrazione del cuore ed è la via attraverso la quale gli stimoli stessi si propagano al miocardio comune. [2 - 3 - 26]

- L'epicardio, il foglietto viscerale del pericardio sieroso, che aderisce esternamente al miocardio.

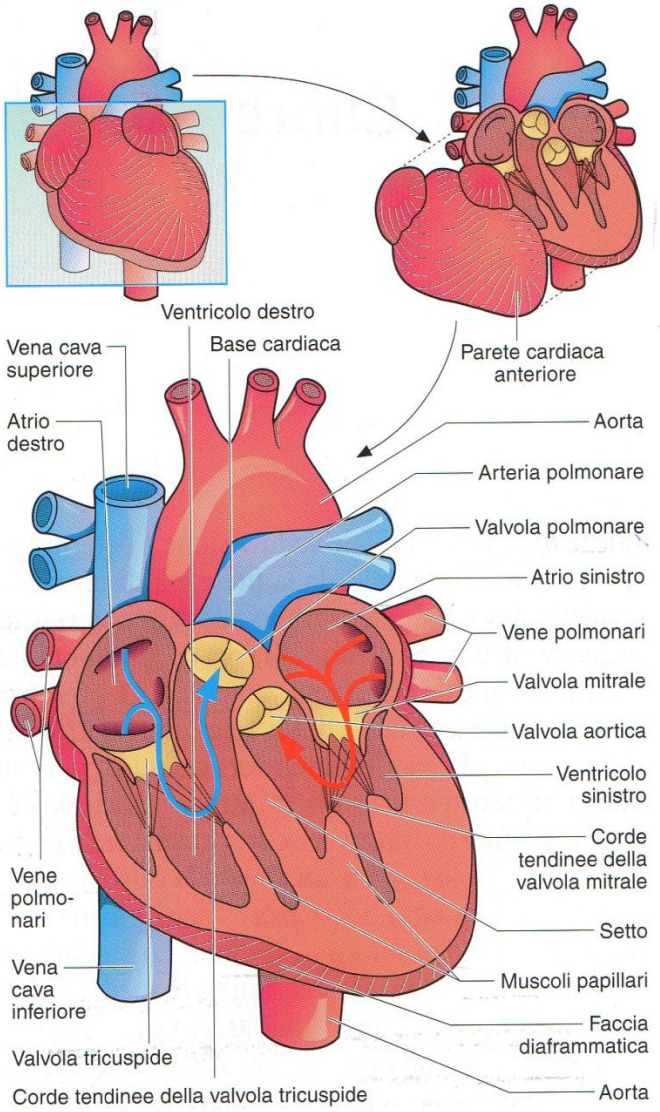


Figura 2.1. Rappresentazione schematica del cuore. Rimuovendo la parete cardiaca anteriore, si rendono visibili le cavità cardiache rappresentate dagli atri e dai ventricoli.

2.2 Fisiologia cardiaca

L'azione del cuore è ritmica, la sua muscolatura infatti si contrae e si rilascia alternativamente e in modo coordinato nel corso di un ciclo cardiaco. Mediante tale azione ciclica il cuore fornisce al sangue l'energia necessaria a farlo scorrere nei vasi. La contrazione e il rilasciamento sono capacità intrinseche del muscolo costituente le pareti delle cavità cardiache, rappresentato da muscolo striato. La contrazione del miocardio non è avviata dall'impulso di un nervo motore, ma da cellule muscolari cardiache, specializzate e raggruppate in una struttura, il nodo senoatriale, localizzata nella parete dell'atrio destro, in prossimità dello sbocco della vena cava superiore. Tre fasci presenti nella parete dell'atrio destro trasportano l'impulso dal nodo senoatriale a una struttura di raccolta, il

nodo atrioventricolare, situata nella parete posteriore destra del setto interatriale. Da qui lo stimolo è trasmesso al rimanente miocardio dal sistema di conduzione costituito, in successione, dal fascio di His che si suddivide, a sua volta, in due branche ventricolari che decorrono lungo le due facce del setto interventricolare e si ramificano, alla fine, nelle fibre di Purkinje, che prendono intimo e diffuso contatto con le cellule miocardiche (Figura 2.2).

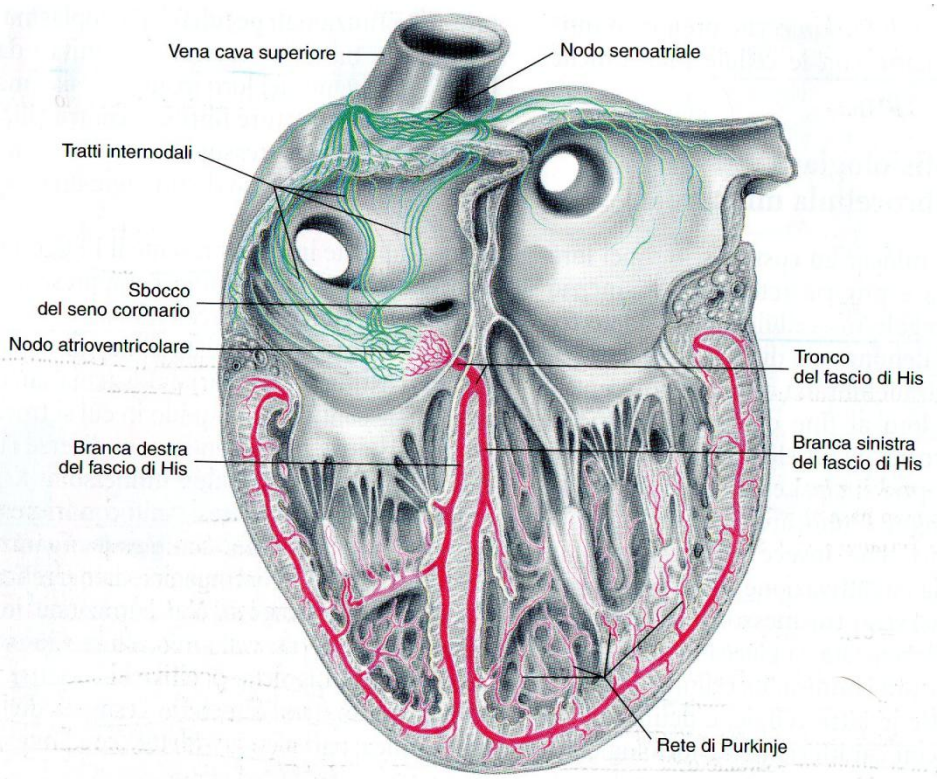
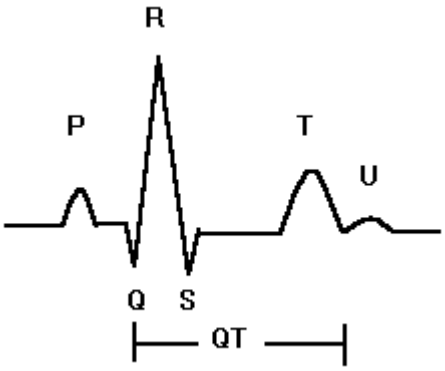


Figura 2.2. Immagine del cuore in sezione, con rappresentazione dell'apparato di genesi e conduzione dell'impulso cardiaco.

Il cuore è quindi sede di un'intensa attività elettrica, un'attività che, originata nel nodo del seno, si trasmette in modo coordinato a tutte le fibrocellule miocardiche che divengono, a loro volta, sede di potenziale d'azione. La somma algebrica di tutti i potenziali d'azione dà luogo a fluttuazioni cicliche e caratteristiche di tensione elettrica che possono essere registrate a livello cutaneo.
Esempio di classico tracciato ECG:



Onda P: depolarizzazione degli atrii

Complesso QRS: depolarizzazione ventricoli (+ ripolarizzazione atrii)

Onda T: ripolarizzazione ventricoli

2.2.1 Fibrocellula miocardica

Le cellule del miocardio costituiscono nel loro insieme una vera e propria rete definita sincizio funzionale. Le singole miocellule sono saldate tra loro da strutture denominate dischi intercalari costituiti da zone di membrana cellulare adiacenti e interdigitate tra loro al fine di garantire efficaci connessioni meccaniche ed elettriche, dal significato di vere e proprie sinapsi elettriche (Figura 2.3).

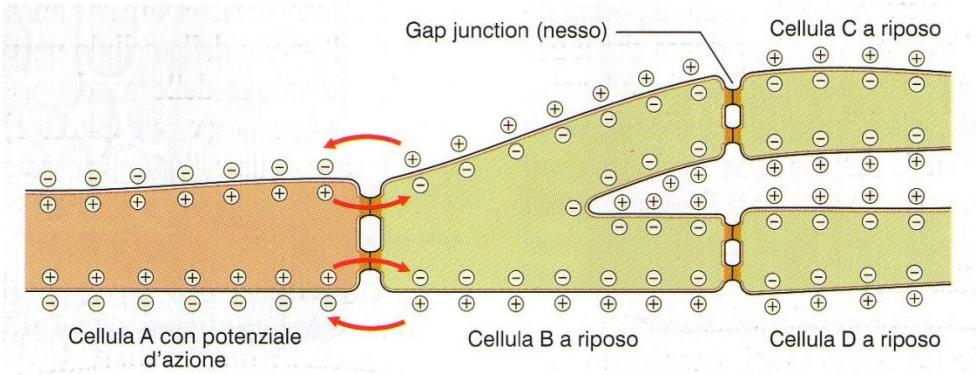


Figura 2.3. Rappresentazione schematica del modo in cui il potenziale d'azione si trasferisce da una fibrocellula miocardica all'altra.

La cellula miocardica, al pari di tutte le altre cellule, è delimitata da una membrana con caratteristiche morfologiche e proprietà funzionali peculiari. Il citoplasma è differenziato in tubuli e vescicole, delimitati da membrane costituenti nel loro insieme il sistema sarcotubulare, e in strutture fibrillari contrattili. Ne consegue che si può distinguere una tripla partizione:

- un ambiente in cui è presente il liquido extracellulare, esterno alla miocellula, il cui confine è rappresentato dalla membrana cellulare;

- un ambiente interno alla cellula, ma separato dagli altri costituenti cellulari dal sistema sarcotubulare;

- il sistema miofibrillare e i mitocondri a esso strettamente associati.

Tale complessa organizzazione, unitamente a una continua spesa energetica, mantiene differenze di concentrazione ionica tra l'interno e l'esterno della miocellula. Ciò costituisce la base della differenza di potenziale elettrico rilevabile, a riposo, tra l'interno e l'esterno della cellula miocardica, pari a circa -80 mV, con l'interno negativo rispetto all'esterno.

Sulla base dei dati riportati (Tabella 2) e tenendo conto che esiste una differenza di potenziale tra i due lati della membrana cellulare è evidente che il potenziale a riposo rappresenta una situazione termodinamicamente improbabile, in quanto il sodio tenderebbe a entrare nella cellula mentre il potassio tenderebbe a uscire, seguendo il gradiente di concentrazione. Ciò implica la presenza di meccanismi di membrana che mantengano tale situazione di squilibrio consumando energia.

Ioni	**Liquido intracellulare (mmol)**	**Liquido extracellulare (mmol)**
Na^+	15	145
K^+	150	4
Ca^{2+}	0.0001	2
Cl^-	5	120

Tabella 2. Concentrazione delle principali specie ioniche presenti nel liquido intracellulare di una cellula miocardica e nel liquido extracellulare.

Per potersi contrarre, tuttavia, la cellula miocardica deve prima sviluppare un potenziale d'azione. Ciò significa che ciascuna cellula miocardica deve andare incontro a una serie rapida e stereotipata di eventi in seguito ai quali il potenziale di membrana cadrà transitoriamente verso un valore più basso e vi resterà per qualche tempo finchè non sarà ripristinato lo stato antecedente il potenziale d'azione. Tale sequenza si riassume nelle fasi di: depolarizzazione rapida, determinata dall'incremento a picco della permeabilità al sodio; plateau, aumento della permeabilità al calcio e diminuzione della permeabilità al potassio; ripolarizzazione, fase in cui a contrazione avvenuta il calcio è riportato all'interno del reticolo sarcoplasmatico e vi è un aumento della conduttanza per lo ione potassio (Figura 2.3).

Gli eventi elementari alla base di questa sequenza sono identificabili quindi in rapide e transitorie variazioni delle conduttanze di membrana di alcune specie ioniche (sodio, potassio, calcio).

L’esistenza di una rigida gerarchia tra la sede di generazione dell’impulso cardiaco (nodo SA), le vie di trasmissione dello stesso e l’azione meccanica ventricolare accompagnata da una rigida successione cronologica di questi eventi, garantiscono una coordinazione dei movimenti delle singole cellule miocardiche, fondamentale per un corretto funzionamento del cuore.

Il potenziale d’azione del nodo SA si diffonde al rimanente miocardio attraverso le vie di conduzione, con ritardi ai vari livelli. Affinchè l’impulso giunga a livello dei singoli miociti, esso è trasmesso al loro interno dal “sistema T”: costituito da profonde invaginazioni tubuliformi del sarcolemma che si affacciano alla parte terminale e dilatata delle cisterne sarcoplasmatiche, che avvolgono a loro volta le miofibrille. Il potenziale d’azione si diffonde da una cellula muscolare alla successiva attraverso i dischi intercalari, costituiti da porzioni affacciate del sarcolemma di ciascuna delle due cellule miocardiche, finemente pieghettate e in stretto contatto fisico tra loro, in modo da assicurare sia la coesione meccanica sia la connessione elettrica tra i due elementi cellulari, consentendo così la trasmissione del potenziale d’azione (sinapsi elettrica).

L’arrivo del potenziale d’azione a livello delle cellule miocardiche innesca una serie di eventi elettrici e meccanici che sfociano nella contrazione del miocardio cui consegue il rilasciamento. Il potenziale d’azione si propaga lungo la membrana cellulare e arrivato ai tubuli T viene trasmesso in profondità con conseguente rilascio di ioni Ca^{2+} dalle cisterne del reticolo sarcoplasmatico. Aumenta così la concentrazione intracellulare di Ca^{2+} determinato anche da un afflusso di calcio dal liquido extracellulare. Nel momento in cui la quantità di Ca^{2+} nel citoplasma supera 1 µM, si innescano una serie di interazioni tra le molecole costituenti il sistema miofibrillare. Il calcio si lega alla troponina C (proteina legante il calcio presente solo nelle cellule muscolari), con conseguente spostamento della tropomiosina (proteina filamentosa) e scopertura dei siti di legame tra actina e miosina. Le teste di miosina si possono così legare all’actina, e con consumo di ATP (nucleotide, principale fonte intracellulare di energia chimica), si verifica il movimento di piegatura delle molecole di miosina e il conseguente scorrimento reciproco dei filamenti di miosina e actina (Figura 2.4). Questo comporta l’accorciamento del sarcomero e quindi la contrazione del miocardio.[5]

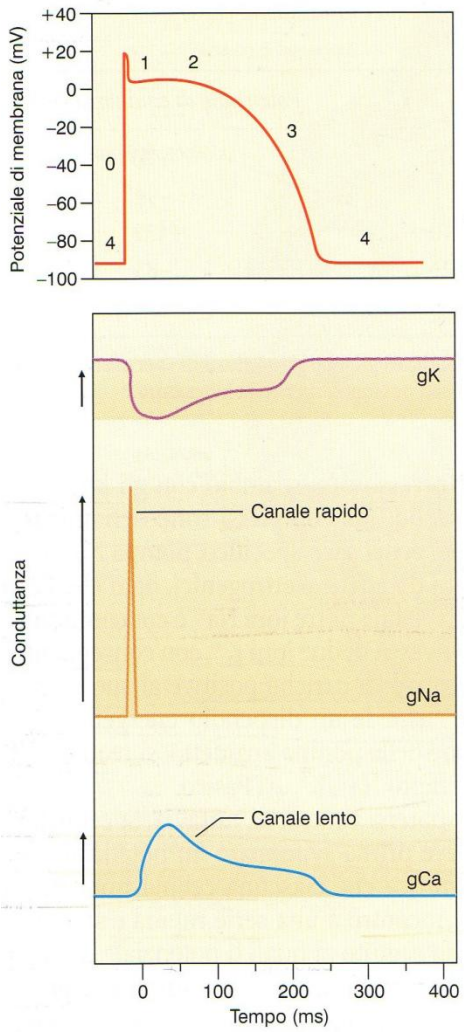


Figura 2.3. Nel riquadro superiore sono rappresentate le fasi del potenziale d'azione di una cellula miocardica: depolarizzazione rapida (0-1), plateau (2) e ripolarizzazione (3), mentre con 4 è indicato il potenziale di riposo. Il riquadro inferiore rappresenta l'andamento, in funzione del tempo, delle conduttanze dei tre ioni principalmente implicati nella genesi del potenziale d'azione. L'aumento delle conduttanze di Na^+ e Ca^{2+} causa un aumento del flusso di cariche positive verso l'interno della cellula con conseguente depolarizzazione. La ripolarizzazione coincide con l'aumento della conduttanza per il K^+.

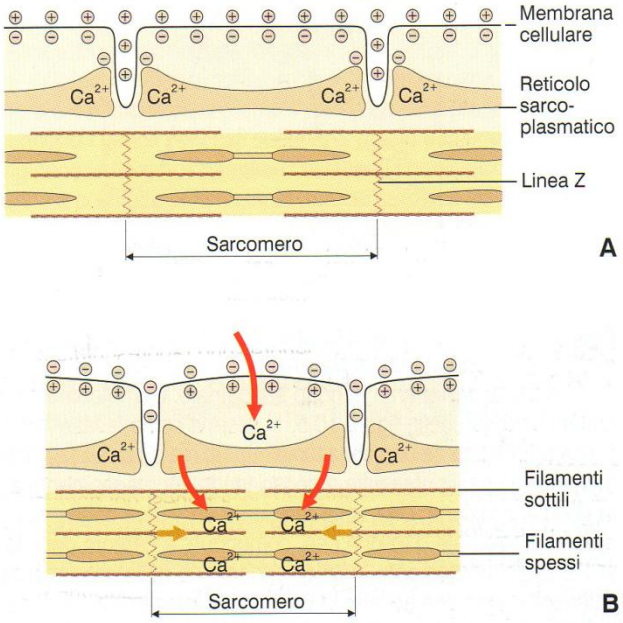


Figura 2.4. Rappresentazione schematica dell'accoppiamento tra eccitazione e contrazione della fibrocellula miocardica. **A)** Rappresenta la condizione di riposo, lo ione calcio è sequestrato all'interno delle cisterne endoplasmatiche e l'interno della cellula è negativo rispetto all'esterno. **B)** Illustra la propagazione del potenziale d'azione, oltre che in superficie, anche in profondità nella cellula mediante le invaginazioni della membrana sarcoplasmatica. Ne consegue l'inversione della polarità di membrana e l'ingresso dello ione calcio nel citosol. Il Ca^{2+} proviene sia dal liquido extracellulare sia dalle cisterne endoplasmatiche. Ciò innesca il meccanismo di contrazione mediante lo scorrimento dei filamenti di actina su quelli di miosina.

2.3 malattie cardiache più comuni

Le malattie cardiache sono molto eterogenee per cause e quadro clinico e comprendono alterazioni sia di carattere funzionale che strutturale:

- cardiopatia ipertensiva: malattia del muscolo cardiaco che insorge a causa di un sovraffaticamento determinato da una pressione arteriosa mantenutasi a livelli elevati per numerosi anni;

- cardiopatia cronica o coronaropatia: patologia provocata dall'insufficiente apporto di sangue al cuore da parte delle arterie coronarie. Può manifestarsi come dolore al torace, infarto miocardico (necrosi del tessuto cardiaco causata da una mancata circolazione sanguigna) o può addirittura portare alla morte improvvisa. La principale causa della riduzione del flusso sanguigno al cuore è l'arteriosclerosi (indurimento della parete arteriosa che compare con il progredire dell'età);

- valvulopatie: malattie delle valvole cardiache, che non si aprono o non si chiudono correttamente e che a lungo andare, costringendo il muscolo cardiaco a un superlavoro, ne provocano il progressivo ed irreversibile indebolimento. I vizi valvolari cardiaci possono essere congeniti, cioè già presenti

alla nascita, oppure svilupparsi in età adulta. In quest'ultimo caso le cause più frequenti sono rappresentate dalla febbre reumatica e dalle infezioni batteriche, o endocarditi;

- aritmie: alterazioni del regolare ritmo e della corretta frequenza delle pulsazioni cardiache, che possono comportare una accelerazione o una decelerazione delle stesse. Possono assumere diverse forme ed essere più o meno gravi; in molti casi impediscono il normale funzionamento del cuore nel suo complesso;

- scompenso cardiaco o insufficienza cardiaca: indebolimento del muscolo cardiaco, che diviene così insufficiente di fronte alle richieste di apporto di sangue dell'organismo;

- infezioni: possono colpire qualsiasi struttura del cuore ed essere di origine batterica o virale. La più comune è quella che interessa il pericardio, o pericardite; seguono l'endocardite e quella del muscolo stesso detta miocardite;

- cardiopatie congenite: comprendono le valvulopatie, alle quali si aggiungono comunicazioni anomale tra le cavità cardiache e malformazioni delle grandi arterie che dal cuore prendono origine;

- tumori cardiaci: molto rari e nella maggior parte dei casi benigni.

Le malattie cardiache sono la causa più frequente di morte in tutto il mondo. In particolare le coronaropatie, conducono a ischemie e se non curate, alla completa occlusione dell'arteria portando ad un infarto miocardico (MI). Studi recenti hanno dimostrato che esiste un potenziale di rigenerazione cellulare nel cuore adulto, ma il livello di turnover è di molto inferiore a quanto sarebbe necessario per ripristinare la funzione contrattile persa a causa di un significativo MI.

In assenza di una funzionale rigenerazione cellulare, in risposta alla perdita della parte lesa del miocardio contrattile, ha inizio una cascata di meccanismi di compensazione, che portano alla formazione di una cicatrice in collagene al posto di tessuto normale. Seppur inizialmente questo dia un risultato benefico, nel tempo, porta a insufficienza cardiaca. Anche se molte terapie, sono state utilizzate per rallentare il progredire dell'insufficienza cardiaca, i trattamenti non permettono di ripristinare la funzione contrattile nella parte danneggiata.

Il trapianto d'organo, in questi casi, è la soluzione migliore, ma il numero di pazienti supera di molto quello di organi trapiantabili. Nascono allora, per risolvere il problema, nuove strategie quali il ricorso all'ingegneria tessutale, per ripristinare la contrattilità e la funzionalità elettrica di cuori colpiti da MI. [2]

2.3.1 infarto miocardico

L’infarto è definito come la necrosi di una zona di tessuto muscolare cardiaco dovuto all’occlusione totale di un grosso ramo coronarico e quindi alla mancanza di afflusso sanguigno in quella zona (Figura 2.5, 2.6). A seconda del ramo coronarico sede di occlusione l’infarto miocardico può essere: apicale, antero-settale, antero-laterale, postero-laterale, posteriore (Figura 2.7).

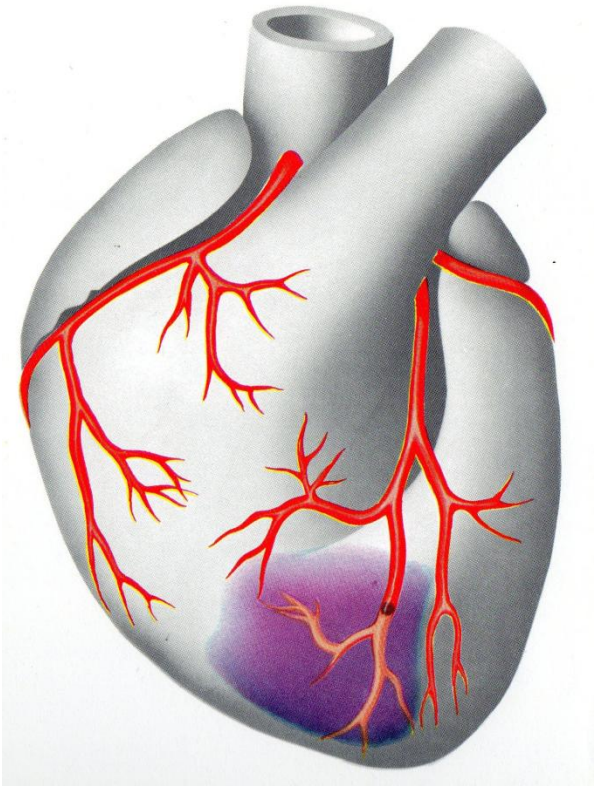


Figura 2.5. Mostra occlusione totale di un grosso ramo coronarico

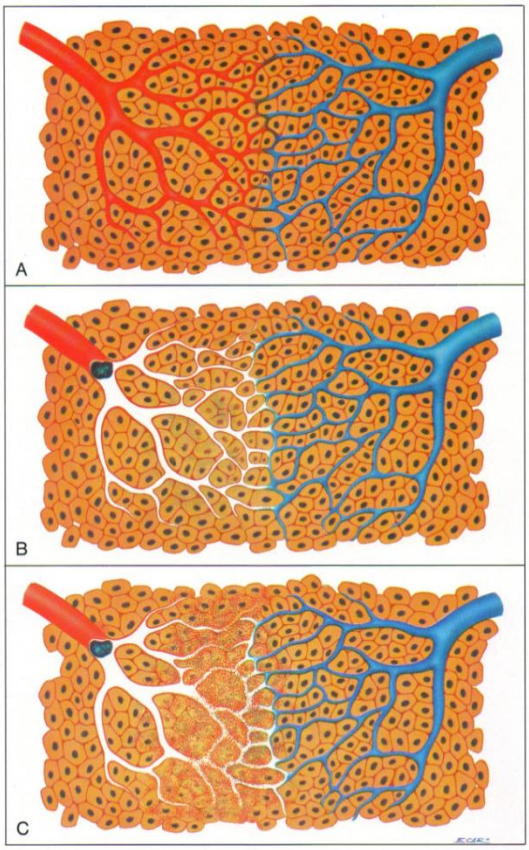


Figura 2.6. Riporta graficamente l'aspetto istologico di un tessuto normale (**A**) che diviene sede di infarto. In un ramo arterioso terminale si instaura un'ostruzione (trombo o embolo) che impedisce la normale irrorazione arteriosa di un tessuto, provocando un'iniziale sofferenza delle cellule che lo compongono (**B**). Successivamente i limiti cellulari scompaiono, citoplasma e nuclei si dissolvono e il tessuto ne rimane gravemente compromesso (**C**).

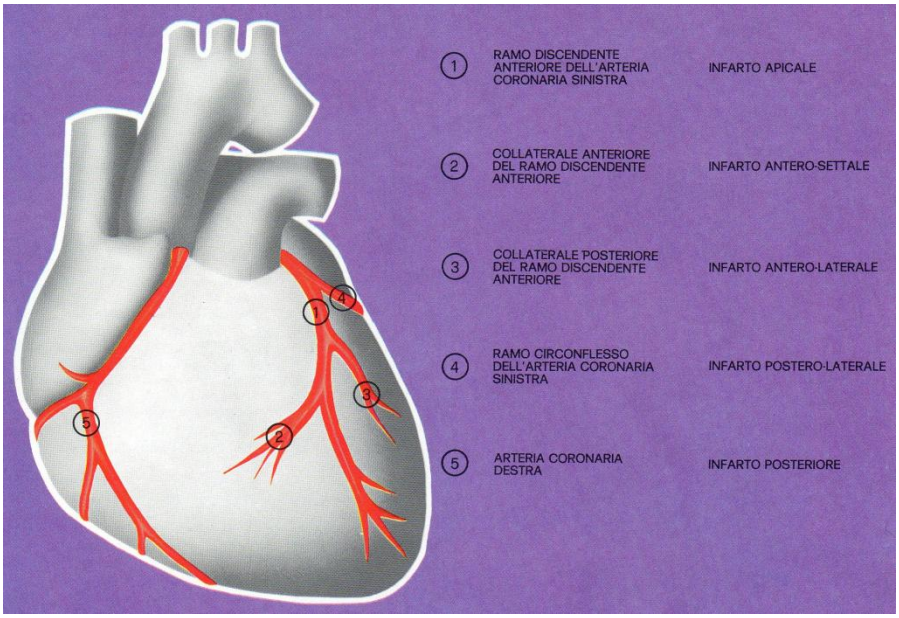


Figura 2.7. Il grafico mostra le varie localizzazioni che può avere l'infarto miocardico, in relazione al ramo coronarico sede di occlusione.

L’infarto miocardico è divenuto molto frequente negli ultimi trent’anni. Una delle possibili cause di questa grande diffusione è attribuibile agli stress emotivi che sono notevolmente incrementati dal tenore di vita moderno, specialmente per chi conduce una vita molto attiva nelle grandi città; con molta probabilità sono poi causa di infarto miocardico lesioni infettive delle arterie coronarie, di natura virale, causa preponderante nei casi di infarto in soggetti giovani, nei quali i fenomeni arteriosclerotici devono ancora iniziare. Negli ultimi anni il verificarsi di questa malattia si è esteso anche al sesso femminile, ciò è dovuto, più che alla partecipazione attiva della donna alla vita moderna e alla abitudine del fumo che si è notevolmente allargata, alle cause infettive che non fanno differenza fra i sessi. La malattia colpisce in genere la fascia di età che va dai 40 ai 70 anni, non vanno però esclusi alcuni casi anche al di sotto dei 20 anni e eccezionalmente anche in bambini al di sotto di un anno, solitamente con malformazioni congenite. Come in altre malattie, vi può essere una tendenza familiare all’affezione delle arterie coronarie, e quindi il verificarsi di infarto in molti membri della stessa famiglia. Fattori predisponenti all’infarto sono: l’obesità (Figura 2.8), le malattie croniche che possono provocare affezioni delle piccole arterie come diabete mellito, le intossicazioni croniche voluttuarie o alimentari o da lavoro che possono produrre un’alterazione locale della parete delle arterie coronarie ed infine le alterazioni degenerative proprie della parete arteriosa legate all’età (arteriosclerosi).

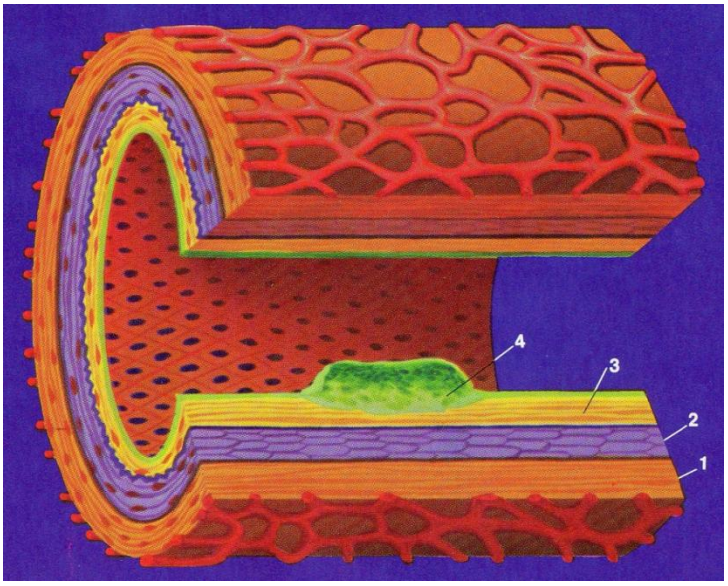


Figura 2.8. Una delle cause più frequenti di infarto è costituita dalla presenza di accumuli di sostanze lipoidee sull’endotelio delle arterie, il cui lume viene perciò ad essere ristretto. **1)** tunica esterna; **2)** tunica media; **3)** tunica interna o intima; **4)** accumulo lipoideo.

La causa scatenante dell'infarto è quasi sempre uno stimolo neurovegetativo, prodotto da un fattore emotivo, o da un affaticamento, che agisce producendo una vasocostrizione istantanea riflessa nel circolo coronarico a cui non segue una vasodilatazione immediata; con l'arreso circolatorio compaiono rapidamente riflessi locali che accentuano l'ischemia, la estendono alle zone vicine in modo da produrre una ipossia (condizione patologica determinata da una carenza di ossigeno) di notevole grado in una zona miocardica di ampiezza sufficiente a provocare il dolore riflesso (àngor).

La comune evoluzione dell'infarto miocardico, visualizzabile tramite ECG (Figura 2.9), avviene in poche ore, abitualmente nello spazio di mezza o una giornata, a seconda della grandezza del vaso e quindi dell'ampiezza della zona ischemica e si articola in più stadi: occlusione vaso, ischemia, edema (versamento del plasma sanguigno al di fuori dei capillari), emorragia, necrosi, evoluzione cicatriziale. In questa ultima fase viene a formarsi una vera e propria cicatrice, nell'arco di settimane, che non avrà potere contrattile e quindi seguirà passivamente la contrazione della muscolatura circostante, ma sarà valida a contenere la pressione endocavitaria; la cicatrice è permanente e quindi si potrà riscontrare anche a distanza di tempo attraverso esame ECG l'infarto pregresso.[2 - 4 - 27]

Non sempre l'infarto colpisce come sopra descritto, infatti esistono situazioni molto più gravi nelle quali la zona colpita è di dimensioni troppo grandi, tali da condurre il paziente alla morte.

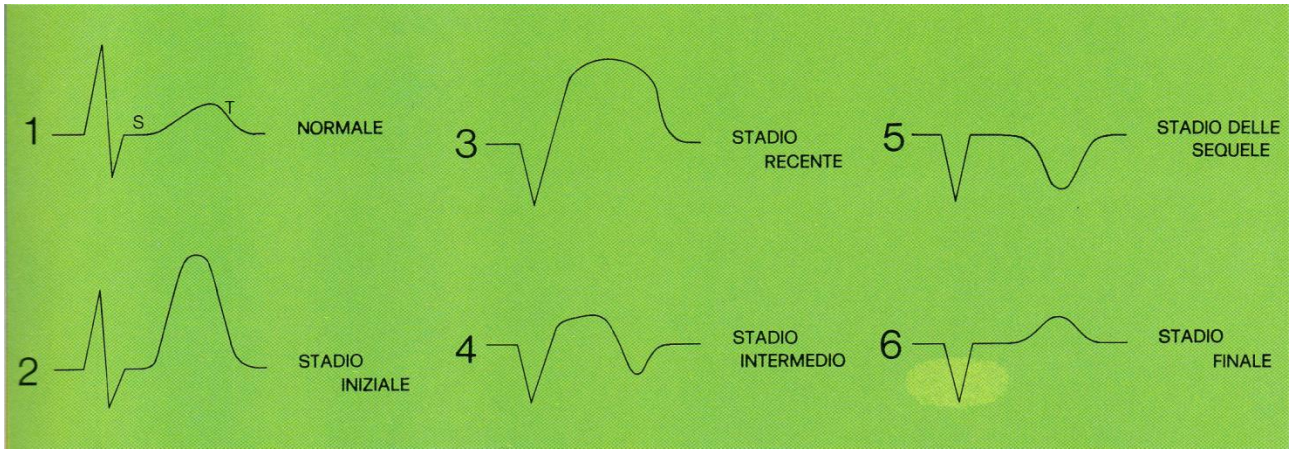


Figura 2.9. Il grafico mostra l'aspetto elettrocardiografico di un cuore normale e di uno affetto da infarto in vari stadi della sua evoluzione. Evidenti sono in quest'ultimo caso le modificazioni che si registrano a carico del tratto S-T.

CAPITOLO 3 . Costrutti cardiaci

3.1 Scaffolds

3.1.1 Biomateriali utilizzati per la realizzazione di Scaffolds cardiaci

L'ingegneria tessutale utilizza dei modelli biodegradabili/riassorbibili, chiamati scaffolds, costituiti da biomateriali di origine naturale o sintetica, per rimpiazzare tessuti malati, malformati o mancanti, come ossa, pelle, organi. In particolare nel seguito si parlerà dei biomateriali utilizzati per la creazione di scaffolds cardiaci.

3.1.1.1 Biomateriali naturali

Il **collagene** è una proteina fibrosa costituente l'ECM (matrice extracellulare) ed ha compiti prettamente strutturali: svolge infatti funzioni di supporto e di collegamento. E' uno dei principali costituenti dei tessuti molli che supportano la cute e gli organi interni come il cuore. E' formato da microfibrille, ognuna delle quali è costituita da un insieme di unità elementari o molecole di tropocollagene. A sua volta, ciascuna molecola di tropocollagene (Tabella 3) è formata da tre catene polipeptidiche intrecciate, particolarmente ricche in glicina (date le piccole dimensioni si colloca perfettamente all'interno della tripla elica), prolina e idrossiprolina, che favoriscono il caratteristico avvolgimento a spirale delle catene: sono questi i particolari amminoacidi che, coadiuvati da una sofisticata struttura, conferiscono al collagene peculiari caratteristiche. Dalla giustapposizione lineare e ripetitiva delle molecole di tropocollagene si forma una singola microfibrilla e più microfibrille si aggregano a formare fibrille che, a loro volta, formano le fibre collagene.

Esistono oltre 25 tipi di collagene, tutti caratterizzati dalla presenza di triple eliche che però sono collegate tra loro in modi diversi. In particolare, studiato come biomateriale naturale nell'ambito dell'ingegneria tessutale cardiaca è il collagene I, principale componente dell'ECM nel miocardio: esso aiuta nel creare una struttura di base tridimesionale molto simile all'ambiente naturale promuovendo la formazione di tessuto e la differenziazione cellulare in vitro. Tuttavia il collagene presenta degli svantaggi, cioè: caratteristiche meccaniche non sufficienti e una rapida degradazione. Per superare questi inconvenienti sono state utilizzate tecniche quali la reticolazione chimica e la

miscelazione con altri polimeri come Matrigel, utilizzato tuttavia con molta cautela in quanto derivante da tessuto tumorale.

Il collagene come la maggior parte delle proteine, quando viene riscaldato, perde completamente la sua struttura, e si trasforma in gelatina, composta da un'unica sequenza di amminoacidi con il susseguirsi in maniera frequente della classica tripletta glicina, prolina e idrossiprolina. Caratterizzata da un'eccellente biocompatibilità e bioriassorbibilità il suo utilizzo come rivestimento dei polimeri sintetici ha dimostrato di promuovere l'adesione e l'integrazione delle cellule alla superficie epicardica del cuore infartuato.

La **fibrina** (Tabella 3) è una proteina fibrosa che si forma nel processo di coagulazione del sangue; è un'attraente alternativa di biopolimero naturale in quanto è facilmente ricavabile e si articola in una rete fibrillare molto simile alla struttura del collagene I. Inoltre un vantaggio importante caratterizza questo biomateriale, il fatto di poter creare uno scaffold autologo: la fibrina può essere estratta direttamente dal sangue del paziente, alleviando il rischio di rigetto. Questa proteina inoltre regola i processi di infiammazione che potrebbero crearsi e favorisce la sopravvivenza cellulare. Nonostante questi vantaggi, durante la formazione dello scaffold, le caratteristiche meccaniche di quest'ultimo si impoveriscono di molto. Miscelando fibrina con altri biomateriali, anche di natura sintetica, si ottengono buoni risultati, compensando gli svantaggi emersi dall'uso di sola fibrina.

L'**acido ialuronico** è un costituente della matrice extracellulare e fa parte della famiglia dei glicosamminoglicani, eteropolissaccaridi che assieme alle proteine fibrose, costituiscono il vasto intreccio che caratterizza l'ECM. E' costituito da residui di N-acetil-glucosammina, un amminozucchero, e di acido D-glucoronico. L'acido ialuronico ha un ruolo molto importante nella riparazione dei tessuti attraverso la promozione della migrazione e differenziazione delle cellule mesenchimali ed epiteliali, in questo modo favorendo la deposizione del collagene e l'angiogenesi. Questa proprietà, in aggiunta alla sua immunoneutralità, rende l'acido ialuronico un biomateriale ideale per ingegneria tessutale e rilascio di farmaci. L'utilizzo di acido ialuronico aiuta nella neovascolarizzazione dei tessuti e ha mostrato di aumentare la densità capillare e normalizzare la funzione ventricolare sinistra in un cuore di ratto infartuato.

Gli **alginati**, sali derivanti dalle alghe brune, sono copolimeri a blocchi composti da due unità monosaccaridiche, l'acido L-glucuronico e l'acido D-mannuronico. Le regioni costituite da blocchi di L-glucoronico formano prontamente, se esposte al calcio, reticolati di idrogeli. Questa caratteristica viene sfruttata per incapsulare farmaci, fattori di crescita e/o cellule. I processi di fabbricazione di scaffolds a base di alginati comprendono normalmente una fase di gelificazione attraverso la quale si ottiene l'architettura tridimensionale richiesta. Cellule cardiache fetali

seminate su scaffolds in alginato stimolano la neovascolarizzazione e la guarigione in cuori di ratti dopo infarto miocardico.

Il **chitosano** (Tabella 3) è un derivato deacetilato dalla chitina, costituente l'esoscheletro dei crostacei, la cui struttura è molto simile ai gligosamminoglicani. Ha un'eccellente biocompatibilità oltre ad ottime attività antimicrobiche. Una delle proprietà tipiche del chitosano è la sua capacità di essere modellato in varie forme ed in strutture porose, tramite tecniche di liofilizzazione. La dimensione dei pori e il livello di porosità possono essere controllati tramite la temperatura. Grazie alla porosità controllabile, è possibile creare canali di flusso adatti per l'adeguato trasporto di nutrienti e di segnali cellulari per una corretta rigenerazione di tessuto.[1 - 7 - 9]

3.1.1.2 Biomateriali sintetici

L'utilizzo di biopolimeri sintetici per la creazione di scaffolds è senz'altro una scelta vantaggiosa, in quanto risulta semplice modificare un polimero, riuscendo a controllare le proprietà finali dello scaffold come la struttura, la dimensione e l'orientazione dei pori. La composizione polimerica può essere inoltre adattata per creare adeguata resistenza meccanica e degradazione controllabile.

I **polimeri biodegradabili** sono materiali che forniscono prestazioni per un periodo di tempo programmabile dopo il quale scompaiono dall'organismo senza richiedere interventi chirurgici. I più conosciuti ed utilizzati sono quelli derivanti dalla polimerizzazione dell'acido glicolico e lattico, rispettivamente PGA e PLA, utilizzati come materiali di sutura già negli anni '70.

La copolimerizzazione di PGA e PLA porta alla formazione di **PLGA**, che permette di trovare un giusto equilibrio nei tempi di degradazione. Proprio per questo motivo risulta essere molto utilizzato: variando infatti la concentrazione dei costituenti, è possibile controllarne la degradazione (Tabella 3).

Un polimero sintetico utilizzato soprattutto in applicazioni cardiache pediatriche è il **PTFE**, politetrafluoroetilene: nonostante le ottime caratteristiche fisiche e meccaniche, la mancata capacità dell'organismo di riassorbirlo porta spesso a severi problemi infiammatori che potrebbero causare rioperazioni.

Il **PEG**, glicole polietilenico, è un polimero preparato per polimerizzazione dell'ossido di etilene, riveste una grande importanza a livello commerciale. Ne esistono di diversi tipi, classificati in base alla lunghezza media delle molecole, ai quali sono legate proprietà fisiche diverse e diversi campi di

impiego. In esso è assente tossicità e questo ne abilita l'impiego a livello di dispositivo medico e farmaceutico.

Il **PCL**, policaprolattone (Tabella 3) è un polimero sintetico semicristallino, lineare, biodegradabile, relativamente economico. E' dotato di buone caratteristiche di biocompatibilità e stabilità termica ed ha inoltre una buona idrofobicità. Membrane in PLC sono controllabili a livello di porosità ed hanno un elevato carico di rottura adatto a sostenere la pressione ventricolare.

Nonostante i polimeri naturali abbiano il vantaggio di promuovere l'adesione e la ripopolazione cellulare, le loro proprietà e caratteristiche meccaniche non sono sufficienti per il loro utilizzo esclusivo nella creazione degli scaffolds. Al contrario, i materiali sintetici hanno buone caratteristiche meccaniche e permettono un facile controllo dei tempi di degradazione e della struttura superficiale, ma non incentivano la crescita, la proliferazione e differenziazione cellulare. Studi hanno dimostrato che ibridazioni (attraverso processi di miscelazione, rivestimento, copolimerizzazione e multistratificazione) tra biopolimeri naturali e sintetici portano ad una vantaggiosa combinazione.[1 - 7 - 9]

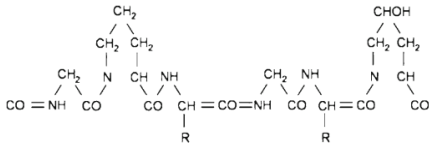
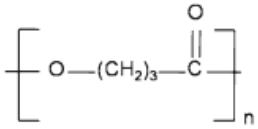
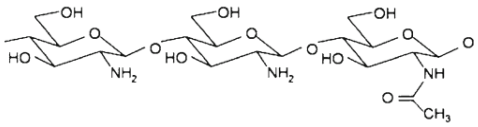
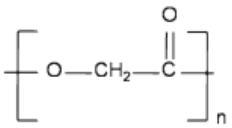
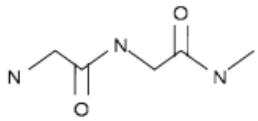
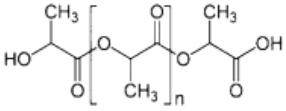
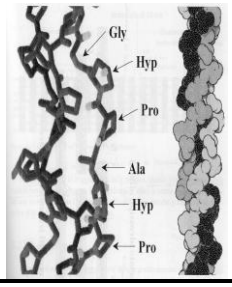
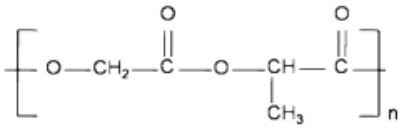
Biopolimeri naturali	**Biopolimeri sintetici**
Gelatina 	*PCL* 
Chitosano 	*PGA* 
Fibrina 	*PLA* 
Struttura tropocollagene 	*PLGA* 

Tabella 3. Struttura chimica dei principali biomateriali naturali e sintetici.

3.1.2 Struttura

Quando si realizza un tessuto ingegnerizzato, complementare alla scelta del materiale, è lo studio della struttura dello scaffold che sarà utilizzato per la generazione del tessuto. In generale uno scaffold è una struttura artificiale, capace di supportare le formazioni di tessuto tridimensionali, sulla quale vengono impiantate le cellule. Uno scaffold deve avere alcune proprietà specifiche per raggiungere l'obiettivo della ricostruzione tessutale:

- proprietà fisiche: elevata porosità ed adeguata dimensione dei pori; necessarie allo scopo di facilitare l'impianto delle cellule e la diffusione attraverso l'intera struttura di cellule e nutrienti;
- proprietà chimiche: biodegradabilità (lo scaffold deve essere riassorbito dai tessuti circostanti senza necessità di essere rimosso tramite intervento chirurgico), velocità di degradazione controllata (garantendo che nel momento in cui esso degraderà completamente, il tessuto nuovo si sarà formato e sarà in grado di supportare il carico meccanico richiesto);
- proprietà meccaniche: resistenza meccanica, modulo di elasticità.

Esistono principalmente tre diverse tipologie di scaffold [7]:

- **scaffolds preformati**: (Figura 3.a) sono il fulcro dell'ingegneria tessutale più classica; sono inizialmente creati con assenza di cellule, che vengono seminate a posteriori sullo scaffold prima della cultura in vitro. Hanno la potenzialità di essere biodegradabili e non immunogenici, sono caratterizzati da un'ampia superficie molto porosa adatta alla semina di cellule. Questa tipologia di scaffold consente un grande controllo sulla struttura, dimensione dei pori, orientazione e può essere realizzata mediante combinazione di materiali (biopolimeri naturali o sintetici), attraverso la decellularizzazione dell'organo o ancora tramite elettrofilatura di soluzioni polimeriche.

Per quanto riguarda la combinazione di materiali, innesti cardiaci sono stati creati ad esempio con scaffolds preformati in PLGA e spugne di collagene, derivanti da procedure di liofilizzazione atte a garantire la formazione di una superficie altamente porosa. In queste spugne possono essere intrappolati segnali chimici che aiutano l'attecchimento cellulare creando un ambiente più adatto; una limitazione però le caratterizza, cioè la difficoltà nel seminare cellule in maniera uniforme.

Un'altra tipologia di scaffold preformato è l'organo decellularizzato, studiato nel suo complesso o in parte, limitandosi alla realizzazione di patch cardiache. La matrice extracellulare decellularizzata mantiene tutti i componenti chimici del tessuto originale ed inoltre preserva la struttura geometrica,

molto difficile da riprodurre attraverso le attuali tecnologie. Il tessuto cardiaco decellularizzato, in particolare, preserva anche il tracciato della vascolarizzazione, permettendo una più semplice ricostruzione dei vasi sanguigni. Nonostante ricercatori abbiano accertato che nell'ECM siano presenti fattori di crescita e adesione cellulare, similmente alle spugne, riseminare cellule nello scaffold rispecchiando una situazione nativa del miocardio, è molto difficile.

L'elettrofilatura di soluzioni polimeriche è un altro metodo per creare scaffolds preformati che rispecchino la struttura di nanofibre dell'ECM del tessuto cardiaco; consente infatti di fornire polimeri fibrosi ultrafini, con diametri di pochi nanometri. Una tipica apparecchiatura per elettrofilatura consiste principalmente in una siringa che spinge il polimero fuso o in soluzione all'interno di un capillare ed in uno schermo di raccolta posto di fronte. Il capillare e lo schermo collettore sono caricati elettrostaticamente ad un diverso potenziale elettrico, variando il quale è possibile controllare il diametro, la densità e l'allineamento delle fibre. Lo scaffold creato avrà oltre alla struttura fibrosa voluta, un'alta permeabilità e una struttura porosa interconnessa, permettendo l'infiltrazione e proliferazione cellulare. I materiali più utilizzati in questo processo sono il collagene, PLGA, fibroina della seta (proteina fibrosa prodotta da alcuni insetti), fibrinogeno. Tipicamente l'elettrofilatura è attuata in assenza di cellule, in quanto l'ambiente che si crea durante il processo è inadeguato per la vita cellulare e le danneggerebbe; le cellule vengono seminate sullo scaffold a posteriori.

- **scaffolds in idrogel**, (Figura 3.b) costituiti da reticolati polimerici con elevato contenuto d'acqua tra le catene; uno dei maggiori benefici che forniscono all'ingegneria tessutale è l'abilità nell'intrappolare cellule nella loro fitta maglia. Sono una scelta invitante in quanto permettono di poter controllare forma, rigidezza, spessore, ma hanno lo svantaggio di non rispondere efficacemente alla dinamicità meccanica dell'ambiente miocardico. I materiali più utilizzati per la loro realizzazione sono, per quanto riguarda i naturali: fibrina, collagene, chitosano; mentre per i polimeri sintetici: PLGA e PEG. Questi materiali possono essere utilizzati come unici protagonisti oppure abbinati, creando combinazioni, come PEG-fibrina, per ottenere migliori risultati finali. Scaffolds in idrogel possono anche essere creati iniettando (Figura 3.c) lo stampo direttamente nella zona infartuata, creando così uno scaffold in situ, tipologia trattata nel seguito.

- **scaffoldless** ovvero senza scaffold, è un ulteriore approccio esplorato dall'ingegneria tessutale cardiaca per cercare di avvicinarsi sempre più al raggiungimento di ottimi risultati. Questo processo consiste nel seminare cellule in situ (già sulla superficie da rigenerare, nell'organismo), invitandole a creare da sé una struttura di supporto senza l'ausilio di materiali per tenerle assemblate. Questa tecnica è benefica in quanto limita l'utilizzo di materiali estranei da impiantare nell'organismo,

evitando problemi immunologici e di rigetto. Una specifica tecnica in questo senso è rappresentata dal cell-sheet engineering (Figura 3.d), sviluppata dal gruppo ricercatori del professor Okano (Università di Tokyo) dal 1999, consistente nell'utilizzare una superficie di coltura cellulare innestata su un biomateriale polimerico, poli(N-isopropilacrilamide) (PIPAAm), sensibile alla temperatura, in modo da gestire, attraverso appunto la temperatura, la proliferazione, l'adesione e la connessione delle cellule così da indurle a depositare una nuova ECM che aderisca sul tessuto miocardico (Figura 3.1). Uno dei maggiori svantaggi consiste nella difficoltà del controllo spaziale della disposizione e crescita dello scaffold, essendo le cellule stesse a creare la propria impalcatura: infatti, sono più libere nel disporsi, nell'assemblarsi e non hanno una traccia da rispettare. [8 - 10 - 11]

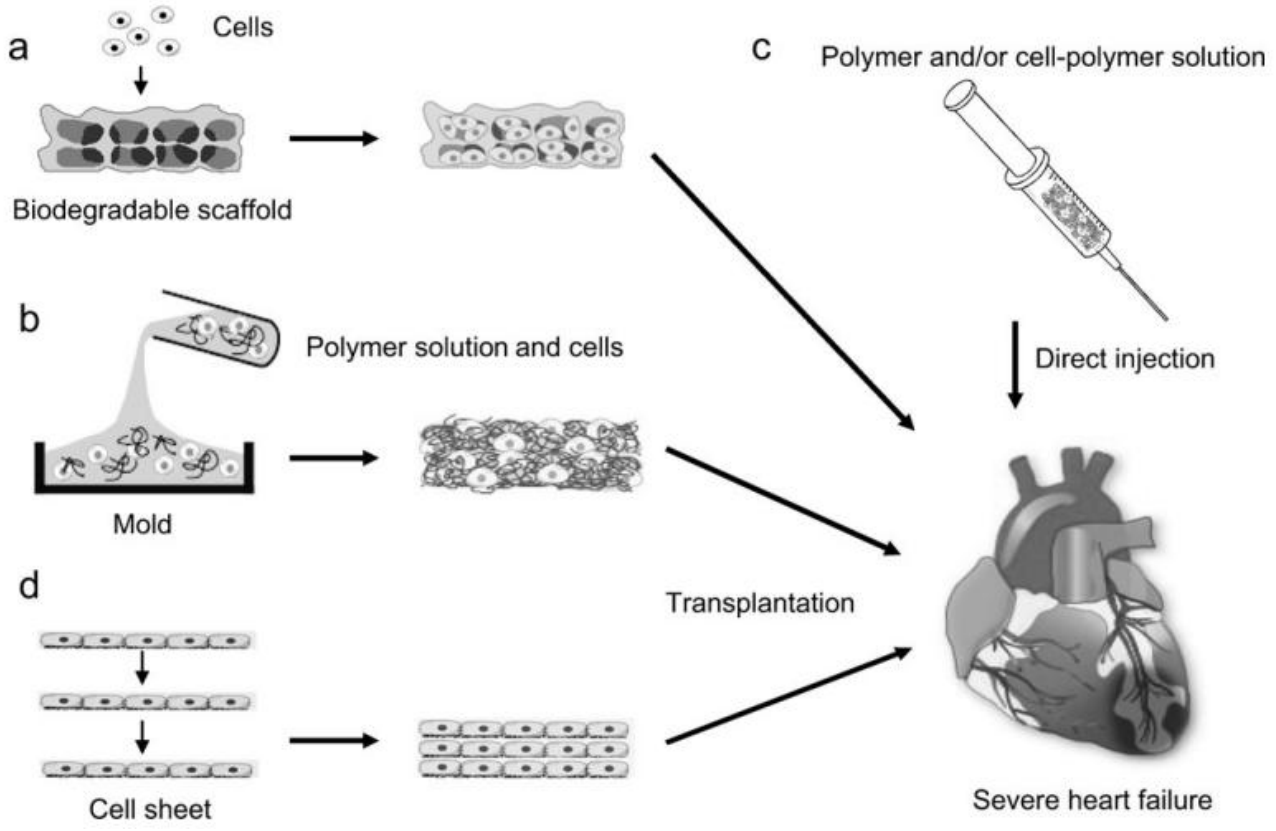


Figura 3. Approcci dell'ingegneria tessutale per la riparazione di tessuto miocardico.

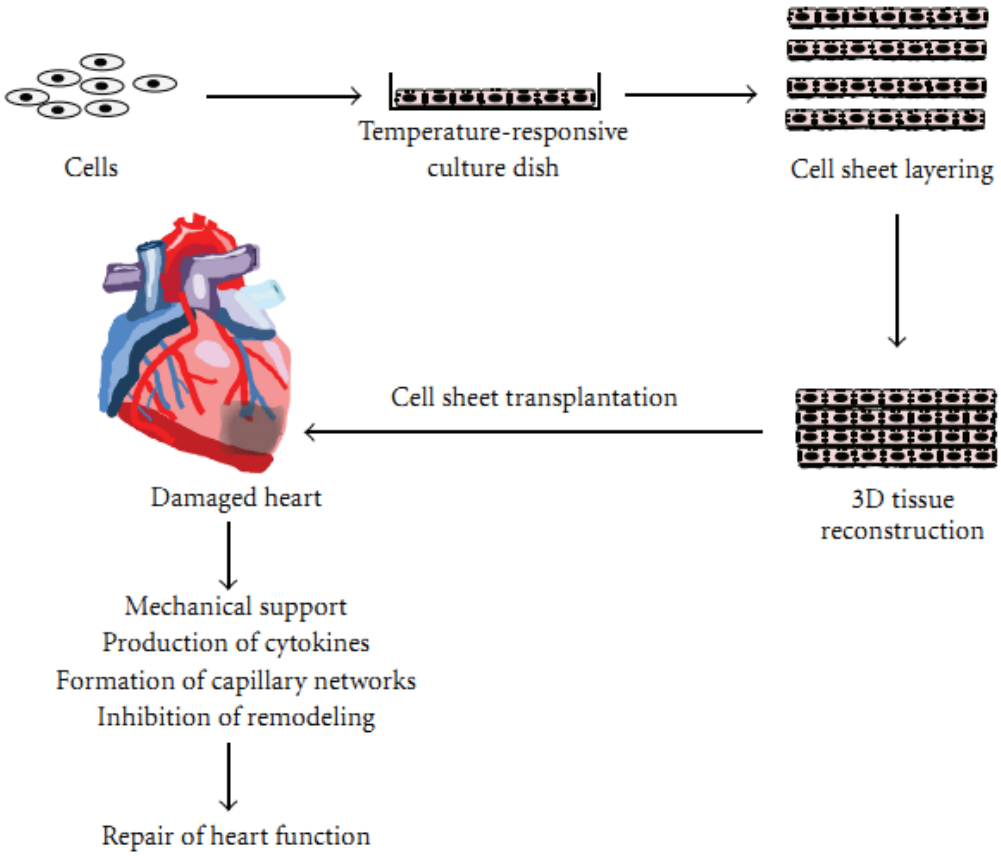


Figura 3.1. Scaffold-less, cell-sheet engineering: fabbricazione di tessuto miocardico in 3D, trapianto e effetti terapeutici.

3.2 colture cellulari

Il tessuto cardiaco, il miocardio in particolare, è caratterizzato, in condizioni naturali, da una forte presenza di segnali fisiologici che contribuiscono nella crescita e nella funzionalizzazione del tessuto. Di conseguenza l'ambiente e le condizioni di coltura cellulare costituiscono un aspetto importantissimo per l'ingegneria del tessuto cardiaco, perché devono assomigliare il più possibile alle condizioni naturali presenti nell'organismo umano.

3.2.1 Scelta delle cellule

Le componenti fondamentali senza le quali la formazione di neo-tessuto non potrebbe avere inizio (Figura 3.2) sono le cellule. Importante è quindi definire, relativamente al contesto del tessuto cardiaco ingegnerizzato, quali cellule vengano utilizzate [1 - 7 - 13 - 14 - 15 - 16 - 17].

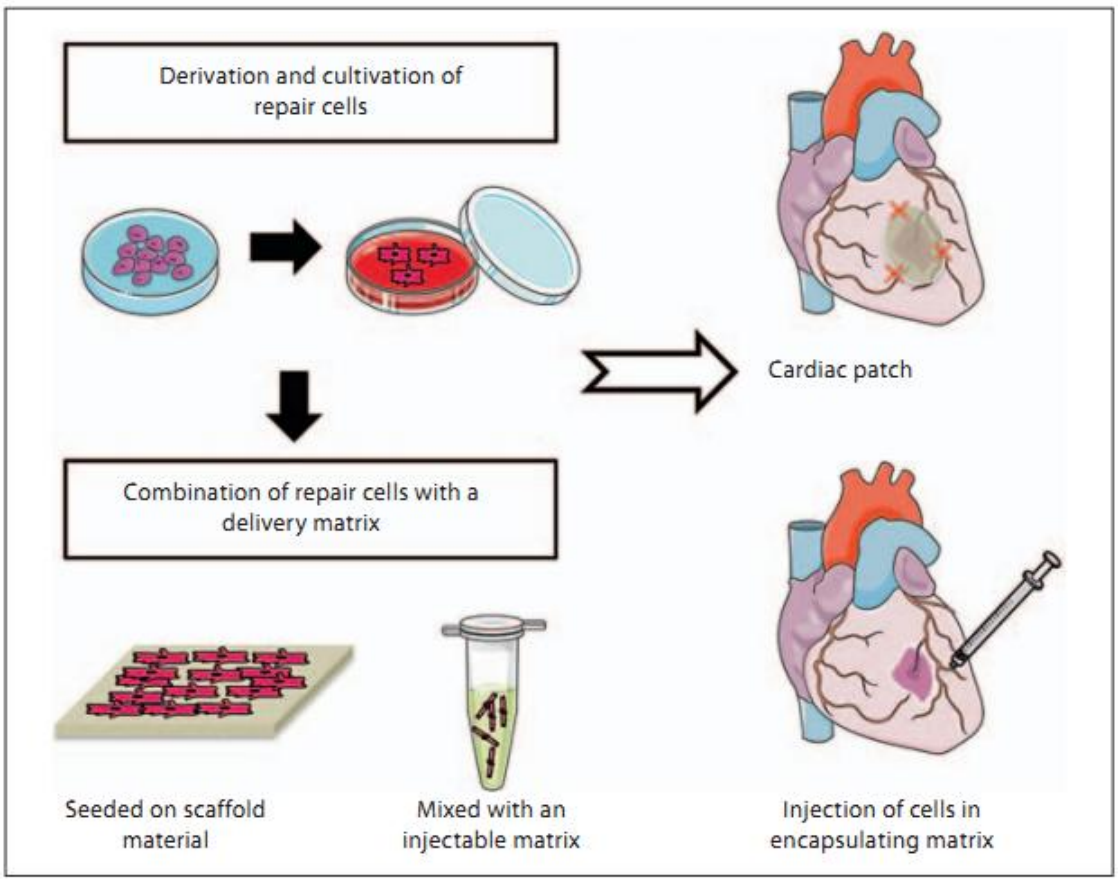


Figura 3.2. Esempio di due approcci per l'ingegneria dei tessuti cardiaci. Le cellule staminali si differenziano in cellule cardiache, vengono seminate su uno scaffold (approccio 1) o mescolate con una matrice iniettabile (approccio 2). I due costrutti formatisi sono l'uno posizionato come patch nella zona lesa e l'altro iniettato direttamente.

Le cellule sulle quali, nonostante i problemi di carattere etico e morale incontrati negli ultimi anni, si studia maggiormente e grazie alle quali sono stati riscontranti molti progressi, sono le cellule staminali. Cellule primitive, capaci di dividersi in coltura per periodi indefiniti di tempo e di differenziarsi generando cellule specializzate. Esistono diversi tipi di cellule staminali, divise in base alla capacità di differenziarsi:

- totipotenti, dotate di capacità illimitate, la loro differenziazione infatti può portare alla formazione di tutti i tessuti sia dell'embrione che extra-embrionari, cellula staminale totipotente è la cellula zigote, dotata della potenzialità di formare un organismo completo;
- pluripotenti, hanno la capacità di differenziarsi e di dare origine alla maggior parte dei tessuti di un organismo, compongono la massa cellulare interna della blastocisti, sfera cava che si forma dopo circa quattro giorni dalla fecondazione, all'inizio del processo di embriogenesi;
- multipotenti, capaci di differenziarsi in tipi di cellule diverse, derivano dalla specializzazione delle cellule pluripotenti e sono dotate di specifiche funzioni, sono presenti nei bambini ed anche negli adulti, ad esempio nel midollo osseo. Sono di questo tipo inoltre anche le cosiddette cellule satellite, solitamente quiescenti e localizzate alla periferia delle fibre muscolari scheletriche che, in seguito a lesioni muscolari, rispondono attivandosi rapidamente proliferando e differenziandosi a riparo della lesione;
- unipotenti, capaci di differenziarsi in un unico tipo di cellule.

Le cellule staminali alle quali si fa maggiore riferimento nel processo di formazione di neo-tessuto cardiaco, tutte in grado di differenziarsi in cardiomiociti adulti, sono in particolare: mioblasti scheletrici, cellule del midollo osseo, cellule staminali residenti nel tessuto cardiaco, embrionali.

Mioblasti scheletrici, denominate anche cellule satellite, sono cellule staminali multipotenti che si trovano nel muscolo scheletrico adulto e possono essere isolate tramite biopsia ed espanse in vitro. Sono cellule staminali autologhe e quindi sempre compatibili dal momento che provengono dal paziente stesso e pertanto il loro utilizzo non comporta problemi di ordine etico. Attraverso test su modello animale è stato riscontrato che il loro trapianto porta sì a miglioramenti nella regione infartuata ma, al contempo, crea una sorta di aritmia, non nasce infatti una sincronizzazione tra le cellule cardiache native e quelle dell'organismo.

Cellule del midollo osseo, anche queste autologhe e quindi tali da evitare rischi di rigetto, sono le cellule staminali in linea di massima preferite a livello di studio. Possono essere isolate dal midollo osseo tramite biopsia e anche grazie alla loro abilità di aderire a diversi substrati plastici. Recenti

studi hanno dimostrato che queste cellule possono differenziarsi oltre che in cellule muscolari scheletriche e in neuroni anche in cardiomiociti sia in vivo che in vitro. Queste cellule sono inoltre in grado di rilasciare fattori di crescita, di prevenire la morte di miociti e di promuovere la rivascolarizzazione di tessuto ischemico o infartuato.

Cellule staminali residenti nel tessuto cardiaco, hanno la capacità di differenziarsi in cardiomiociti in vivo e la scoperta della loro esistenza offre la possibilità di riparare il tessuto cardiaco inducendo la proliferazione e differenziazione di queste cellule in vivo. E' stato confermato, attraverso studi su modello animale, che l'attivazione di queste cellule stimolata dal rilascio di fattori di crescita (hepatocyte growth factor, HGF, e IGF-1), può alleviare l'invecchiamento del muscolo cardiaco, migliorarne le condizioni, allungando così la durata della vita. Inoltre, il trapianto nella zona cardiaca infartuata di queste cellule, prima isolate e coltivate in vitro, promuove la formazione di cardiomiociti e aiuta nel ripristinare le funzionalità ventricolari.

Cellule staminali embrionali, si sviluppano circa al quinto giorno dalla fecondazione dell'ovocita negli essere umani, sono cellule staminali pluripotenti, caratterizzate perciò da un enorme capacità di proliferazione e differenziazione in un grande numero di cellule differenti, inclusi i cardiomiociti. Nonostante siano le più promettenti per la produzione in larga scala di cardiomiociti, la loro utilità è limitata da considerazioni etiche, dalla difficoltà nell'isolarle, dalla possibilità di rigetto e dalla presenza di rischi nell'indurre lo sviluppo di tumori. Sono caratterizzate inoltre da una potenziale capacità di provocare future aritmie.

Importante è sottolineare che il processo di estrazione, di trattamento e di conservazione delle cellule deve essere svolto seguendo prestabilite regole di igiene, in condizioni operative adeguate dove la sterilità è una priorità e secondo determinate tempistiche.

3.2.2 In vitro

Promuovere colture cellulari in vitro significa creare, in laboratorio, un ambiente adatto alla crescita cellulare per favorire la formazione di tessuto, facendo uso di tecniche, strutture e metodologie appropriate.

Il tessuto cardiaco, in particolare, è caratterizzato da una forte anisotropia: le caratteristiche, le proprietà, le risposte a particolari stimoli, dipendono dalla direzione in cui vengono misurate. È perciò opportuno creare un ambiente che agevoli, nella geometria, l'organizzazione delle cellule, cercando di indurre le cellule ad una interconnessione che conferisca al neo-tessuto sia le

caratteristiche strutturali che quelle funzionali, più difficili da ottenere. In particolare l'anisotropia generata dalla compattazione cellulare su scaffolds in idrogel guidata da ben pensati vincoli, ha portato a buoni risultati per quanto riguarda l'aumento della forza contrattile del neo-tessuto, più di quanto fosse stato riscontrato tramite un semplice allineamento delle cellule in una direzione prestabilita.

Un problema delle colture in vitro è quello dimensionale: infatti, nonostante le dimensioni di patch cardiache siano ad oggi aumentate, resta comunque molto complicata la realizzazione del processo di costruzione di tessuto di dimensioni ancora maggiori. L'omogeneità delle proprietà fisiche e la crescita uniforme di cellule diventa difficile quando si vogliono aumentare le dimensioni del neo-tessuto (Figura 3.2).

La scelta di promuovere colture cellulari in vitro è di largo utilizzo a causa dell'esistenza dei bioreattori, protagonisti nella cosiddetta "coltura cellulare dinamica", grazie ai quali si ha un basso rischio di contaminazione ed è possibile controllare alcuni parametri durante il processo (temperatura, pH, concentrazione di ossigeno), aumentando i fattori di riproducibilità dei risultati ottenuti e riscontrando una miglior comprensione dei meccanismi di sviluppo del neo-tessuto. In particolare nuovi parametri, inerenti al trasporto di ossigeno, di nutrienti e a stimolazioni meccaniche ed elettriche caratterizzano i bioreattori per tessuto miocardico data l'elevata complessità dell'ambiente in vivo da riprodurre.

I bioreattori sono quindi dispositivi nei quali le cellule vengono fatte crescere favorendo la proliferazione e funzionalizzazione cellulare; una continua perfusione con mezzo di coltura nelle strutture porose dello scaffold, permette un nutrimento ciclico di ogni parte del costrutto, facilitando il trasporto di massa ed in particolare consentendo all'ossigeno di essere disponibile a tutte le cellule, anche a quelle più nascoste. Questo continuo rimescolamento del nutrimento, che avviene in diversi modi a seconda del bioreattore, guida lo sviluppo della composizione biochimica dei tessuti ed è considerato fattore determinante nella differenziazione e crescita delle cellule in vitro.

In particolare i bioreattori più comunemente utilizzati sono: bioreattore a miscelazione (*mixing bioreactor*), incentiva di molto il trasporto di ossigeno e di nutrienti ma al contempo provoca un flusso troppo turbolento che potrebbe risultare distruttivo per la coltura cellulare; bioreattore a pareti rotanti (*rotating-wall*), enfatizza il trasporto di massa ma non è in grado di creare gli stress meccanici tipici presenti nell'ambiente che circonda il tessuto cardiaco in vivo; bioreattore a perfusione (*perfusion bioreactor*), mantiene un ottimo trasporto di ossigeno ma porta talvolta ad una disomogeneità nelle funzioni delle cellule. L'obiettivo ad oggi è quello di cercare di migliorare soprattutto questa ultima tipologia di bioreattori al fine di ottenere risultati sempre più soddisfacenti.

Come precedentemente detto, il cuore ha un ruolo veramente importante nel nostro organismo e funzionalità meccaniche ed elettriche particolari. Nello sviluppo di neo-tessuto cardiaco è necessario quindi sottoporre a particolari condizioni di stress meccanico e a sollecitazioni elettriche il costrutto per vincolarlo al raggiungimento delle funzionalità desiderate. Zimmerman, ricercatore in questo campo, ha creato un costrutto (*ring-like*) che meccanicamente stimolato, in maniera ciclica, aiuta a funzionalizzare i cardiomiociti e induce ad una sovra regolazione di integrine e di fattori di adesione che collaborano nella formazione delle fibre miocardiche. Inoltre questa stimolazione fisica promuove l'allineamento delle cellule e le stimola nella formazione dell'ECM. L'azione di una stimolazione elettrica, invece, è utilizzata per cercare di promuovere la formazione di una contrazione sincrona del costrutto e per migliorare quindi la funzionalizzazione del neo-tessuto durante la sua nascita in vitro. Radisic, ricercatore, mostrò che sollecitando il costrutto attraverso un'onda quadra opportunamente calibrata, questo risponde con un miglioramento delle sue proprietà contrattili. Questa sollecitazione deve però essere effettuata in un periodo di tempo ben preciso, dopo tre giorni dalla coltivazione; in caso contrario a buoni risultati se ne sostituiscono di negativi: inibizione dell'accumulo di proteine cardiache e cedimento della contrattilità nel caso di applicazione della sollecitazione prima dei tre giorni, nessun effetto se viene applicata troppo tardi. Successivamente alla sollecitazione, si riscontrano variazioni nelle concentrazioni prevalentemente di sodio e di calcio, tali da promuovere l'organizzazione dei sarcomeri nel neo-tessuto e tali da indurre un allineamento delle cellule secondo la direzione del campo elettrico, agevolandone così la velocità di propagazione. L'idea di combinare, eseguire in contemporanea, la stimolazione meccanica con quella elettrica, è presente nell'ambito della ricerca ma, per ora, non ha dato risultati soddisfacenti, in ogni caso non è stata ancora studiata nel dettaglio perciò non è un'ipotesi da abbandonare in maniera definitiva. [1 - 7 - 23]

3.2.3 In situ

Un altro tipo di approccio consiste nella creazione di neo-tessuto in situ, per la riparazione di parti cardiache lese, in particolare di miocardio infartuato. Questa tecnica risolve alcuni dei problemi incontrati nella coltura in vitro come le tempistiche di intervento e l'invasività; oltre ad essere utilizzata per la rigenerazione di tessuto, è anche impiegata nel rilascio di sostanze terapeutiche per stimolare la guarigione.

La generazione di tessuto cardiaco in situ consiste fondamentalmente nell'iniettare, in maniera il meno invasivo possibile, nella zona miocardica affetta da infarto, biomateriale in forma viscosa, solitamente: fibrina, alginato, peptidi auto-assemblanti, ECM; e cellule. Il biomateriale, scelto

adeguatamente, ha il compito di guidare il comportamento delle cellule inducendole ad aderire e a stimolare la rigenerazione del tessuto danneggiato, di supportare la parte indebolita del tessuto cardiaco e di sollecitare lo scorrimento del sangue nella zona malata. Inoltre, una particolare osservazione va al tempo di degradazione del biomateriale: questo deve mantenere infatti per un periodo sufficiente una condizione favorevole per la crescita, la proliferazione e la funzionalizzazione cellulare (Figura 3.2).

Nel lasso di tempo che trascorre dal momento in cui la coltura in situ ha inizio al risultato finale possono verificarsi dei cambiamenti, la lesione può variare (ad esempio aumentare), il tessuto circostante indebolirsi, e il biomateriale o le cellule iniettate potrebbero non risultare più sufficienti per un risultato soddisfacente. Inoltre le condizioni che circondano una zona malata, miocardio infartuato in questo caso, non sono sicuramente ideali per la formazione di tessuto (Figura 3.3); il processo di protezione interno all'organismo umano tende ad isolare l'area danneggiata da quella sana, limitando così la comunicazione e l'integrazione tra costrutto e miocardio sano. Sono questi alcuni dei problemi che riguardano la coltura cellulare in situ. [1 - 7 - 23]

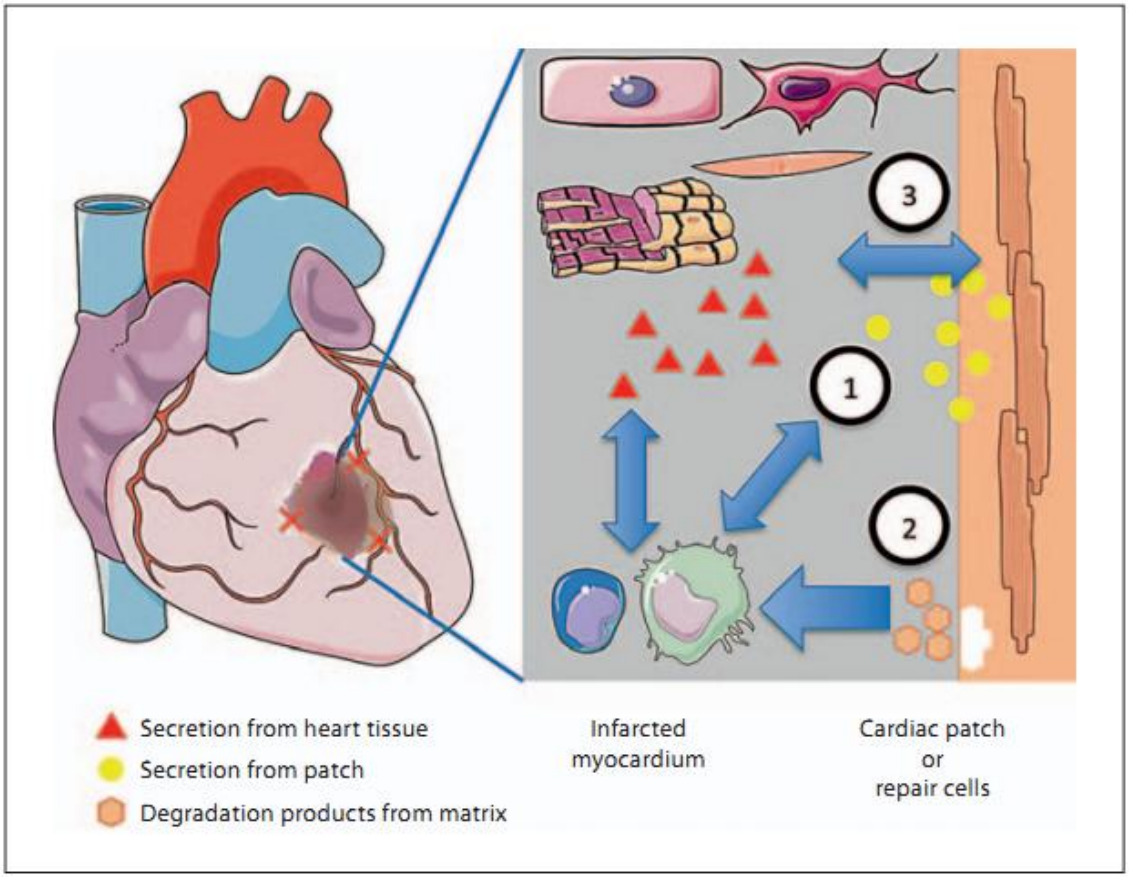


Figura 3.3. Dinamica e reciproca interconnessione tra tessuto miocardico infartuato e neo-tessuto ingegnerizzato. **1)** contatto tra cellule secrete dalla patch e cellule zona lesa; **2)** elementi di degradazione dello scaffold; **3)** interazione tra cellule sane e tessuto necrotico.

3.2.4 In vivo

In questo tipo di approccio il neo-tessuto viene fatto crescere altrove nel paziente rispetto al luogo in cui ve ne è la necessità, in una zona isolata, e trapiantato poi nell'ambiente di interesse successivamente alla sua formazione. Solitamente le zone scelte rispondono alle caratteristiche di essere altamente angiogeniche; prove sono state fatte, ad esempio, tra le vene femorali di un ratto: si è trovato un ambiente angiogenico che ha indotto la crescita di neo-tessuto cardiaco spesso e vascolarizzato. Questo tipo di metodologia, risolve uno degli svantaggi incontrati nella coltura in situ, il neo-tessuto infatti si sviluppa in una zona non danneggiata e quindi in un ambiente sano. Studi hanno dimostrato che trapianti di patch-cardiaci (realizzati in vivo) su cuori infartuati, sono in grado di mantenere nel tempo un adeguato spessore della parete cardiaca e di prevenire una eventuale dilatazione ventricolare. [7]

3.3 Sostanze capaci di indurre la formazione di tessuto

I fattori analizzati nei paragrafi precedenti: ambiente favorevole, scaffolds, cellule, sono essenziali per la rigenerazione di tessuto ma non sono sufficienti; è necessario infatti, per promuovere la rigenerazione di tessuto introdurre sostanze capaci di indurla: fattori di adesione e fattori di crescita.[1]

L'adesione si realizza attraverso interazioni molto specifiche e selettive tra le proteine presenti sulla membrana delle singole cellule (integrine, caderine, immunoglobuline e selectine) con formazione di legami: fra cellule vicine, ed in questo caso si parla di adesione cellula-cellula e/o con particolari proteine dell'ECM (fibronectina, laminina e tenascina C), dove si parla di adesione cellula-ECM.

Per avere applicazioni dell'ingegneria tessutale di successo sono quasi sempre necessari dei fattori di crescita, proteine che si legano ad opportuni recettori sulla superficie cellulare, attivando così il processo di proliferazione e/o quello di differenziamento cellulare. L'iniezione diretta di questi fattori sotto forma solubile nel sito da rigenerare, non è generalmente una metodologia efficace, è stato riscontrato infatti che i fattori di crescita diffondono rapidamente lontano dal sito di iniezione. E' necessario ricorrere quindi ad un sistema di rilascio controllato, attraverso l'utilizzo di appropriati carrier (polimerici), così da permettere ai fattori di crescita di svolgere in maniera efficiente il loro effetto biologico nel sito d'interesse. Il carrier protegge il fattore di crescita dalla sua proteolisi, avendo così una prolungata attività in vivo, successivamente, una volta che il rilascio sia completato, il carrier dovrebbe degradarsi nel corpo umano in quanto non più necessario.

I fattori di crescita più utilizzati nell'ingegneria tessutale cardiaca sono:

- Gli **IGFs** (*Insulin-like Growth Factors*), i fattori di crescita più abbondanti prodotti dagli osteoblasti e immagazzinati nelle ossa. Membri più importanti di questa famiglia sono: l'IGF-1, la principale proteina prodotta dall'organismo in risposta all'ormone della crescita, consente di mediare l'effetto apoptotico (forma di morte cellulare programmata) in seguito ad una insufficienza cardiaca, indurre benefici nella terapia dello scompenso cardiaco con miglioramenti dal punto di vista della circolazione e conseguente aumento della sopravvivenza; l'IGF-2, per lo più espresso dai tessuti embrionali e neonatali.

- Gli **FGFs** (*Fibroblast Growth Factors*), appartengono ad un'ampia famiglia di proteine che legano l'eparina e regolano il processo di proliferazione, differenziamento e migrazione cellulare in tessuti diversi. E' stato osservato che il rilascio di FGF è in grado di stimolare l'angiogenesi. I primi membri di questa famiglia ad essere caratterizzati e studiati sono: FGF1 e FGF2, protetti dalla veloce degradazione grazie al legame con l'eparansolfato, importante costituente dell'ECM.

- I **TGF-β** (*Trasforming Growth Factors-β*), famiglia di fattori di crescita più numerosa prodotta dagli osteoblasti umani. TGF-β e BMP-2 (proteine morfogenetiche dell'osso) sono impiegate per promuovere la differenziazione delle cellule staminali embrionali in cardiomiociti.

- **VEGF** (*vascular endothelial growth factor*), specifica sottofamiglia di fattori di crescita coinvolta sia nella vasculogenesi (intesa come genesi ex novo di un sistema circolatorio in età embrionale) sia nell'angiogenesi (la formazione di vasi da strutture già esistenti). La proteina più importante di questa categoria è il VEGF-A. Fattore di crescita utilizzato nella rigenerazione del tessuto miocardico come mediatore degli effetti angiogenici.

L'utilizzo dei fattori di crescita ha tuttavia talvolta un successo limitato nella specifica applicazione rivolta al tessuto miocardico, ciò è dovuto al fatto che la loro somministrazione determina significativi effetti collaterali secondari alla presenza di recettori distribuiti in numerosi tessuti dell'organismo. In particolare gli effetti collaterali dovuti ad esempio al rilascio di IGF-1 possono essere ipoglicemia, vasodilatazione e tachicardia. La ricerca sperimentale nell'ambito della rigenerazione del miocardio si è focalizzata sullo studio di sistemi di rilascio intramiocardici che consentano un rilascio controllato e diretto di fattori di crescita direttamente nel sito d'azione, un esempio tra gli studi condotti sono il rilascio di fattori di crescita tramite l'utilizzo di microsfere in gelatina iniettabili e tramite iniezione di colla di fibrina.[1 - 16 - 24]

CAPITOLO 4. Cardiac patch su scaffold in alginato con nanofilamenti in oro

Daniel Kohane ed i suoi colleghi presso Massachussets Institute of Technology conducono attualmente studi sull'utilizzo di nanofilamenti in oro incorporati in uno scaffold tridimensionale costituito da alginato (Figura 4). Ciò che già si è potuto appurare dalle ricerche riguarda innanzitutto un miglioramento dal punto di vista della conducibilità dello scaffold ed inoltre un più marcato sincronismo nella contrazione delle cellule cardiache che crescono su di esso.

Questa particolare tipologia di cardiac patch [18 - 19 - 20] nasce dall'esigenza di far interagire il più attivamente possibile le cellule tra loro, cosa che, nelle matrici porose abitualmente utilizzate nell'ingegnerizzazione del tessuto cardiaco, viene limitata per la presenza di pareti non conduttive tra i pori degli scaffold.

Nanoparticelle in oro possono essere definite una promessa per l'ingegneria tissutale, in quanto possono essere progettate minimizzando i rischi di tossicità ed inoltre sono già utilizzate per il rilascio controllato di farmaci e in terapie volte alla cura di tumori.

Come materiale per la realizzazione dello scaffold è stato scelto l'alginato, il più utilizzato per la rigenerazione del tessuto miocardico in generale. Uno scaffold che mostra una struttura porosa ben definita e alta biocompatibilità, ma che presenta delle lacune dal punto di vista della conduttività elettrica; lacune che verranno compensate attraverso l'utilizzo dei nanofilamenti. Questi, devono avere una lunghezza bene definita, tale da riuscire ad unire due pori adiacenti, devono quindi essere lunghi tanto quando lo spessore della parete tra i pori che è di circa 500 nm. In questo modo diviene possibile l'interazione tra le cellule situate in pori adiacenti. I nanofilamenti realizzati hanno una lunghezza di 1 µm ed un diametro di 30 nm (Figura 4.1). Uno scaffold composito così realizzato, abbinando alginato e nanofilamenti (Alg-NW), mostra miglioramenti nelle proprietà meccaniche, il nanomateriale che interagisce con il polimero funge quindi anche da rinforzo oltre ad essere un mezzo incentivante la comunicazione.

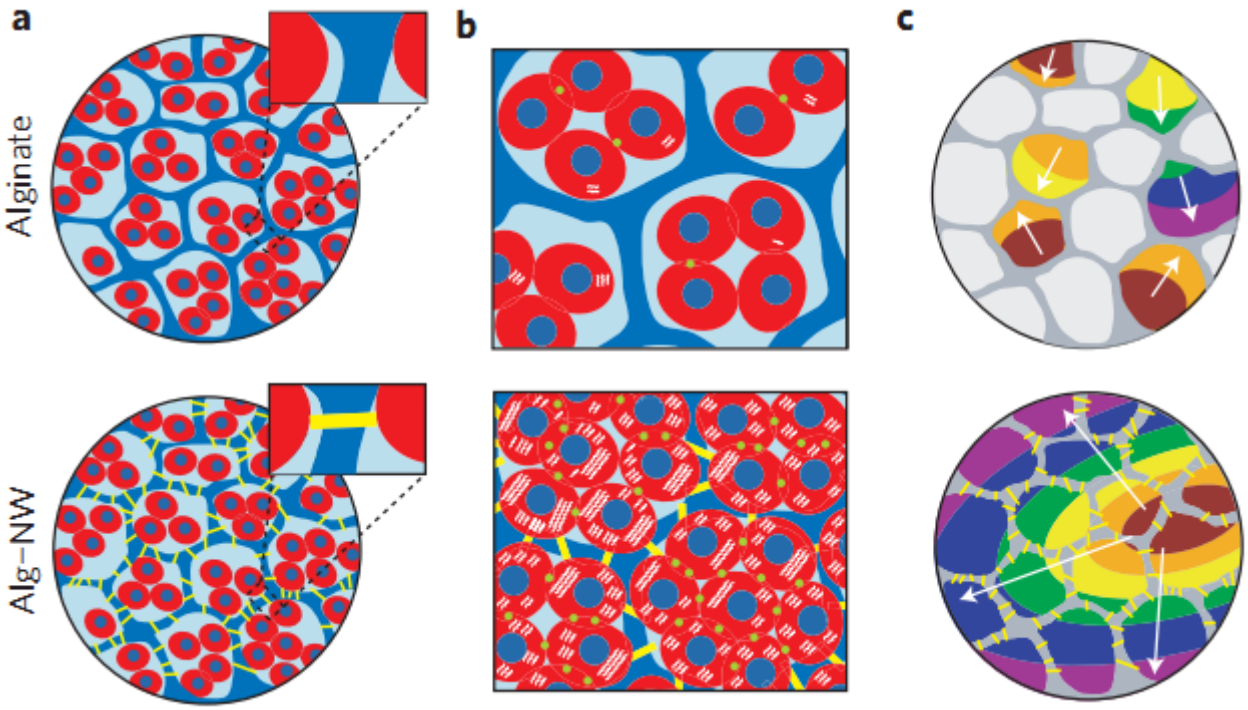


Figura 4. Visione complessiva schematica di tessuto cardiaco tridimensionale realizzato utilizzando: **a,b,c sopra)** scaffold Alg; **a,b,c sotto)** scaffold Alg-NW. I cardiomiociti sono indicati in colore rosso, le pareti dei pori dello scaffold in blu ed infine ai nanofilamenti è stato assegnato il colore giallo. Si notano le differenze tra l'utilizzo di scaffold Alg e Alg-NW sia in termini di disposizione dei cardiomiociti che in termini di sincronismo del battito e propagazione del segnale. In c si nota la differenza, a seconda dello scaffold che si utilizzi, nella propagazione spaziale e temporale del segnale.

Sono state fatte poi, dal gruppo di Kohane, alcune considerazioni sul modulo di elasticità (Ec) del costrutto, necessarie per valutare l'abilità nel reggere la tensione di compressione provocata dal battito cardiaco. Il valore dell'Ec misurato sullo scaffold è inferiore di molto rispetto a quello misurato nel cuore nativo, ma nonostante questo, è possibile definire improbabile che lo scaffold Agl-NW possa in qualche modo inibire la contrazione del tessuto ingegnerizzato grazie al fatto che un simile Ec è stato misurato anche nella matrice cardiaca decellularizzata.

Attraverso l'utilizzo della microscopia elettronica a scansione (SEM), metodo d'analisi delle superfici, è possibile valutare la tomografia del costrutto (Figura 4.1) e la concentrazione di nanofilamenti. Con una concentrazione di 0.5 mg/ml i nanofilamenti sono o paralleli alle pareti tra i pori o perpendicolari tra pori adiacenti, ad una concentrazione di 1 mg/ml i nanofilamenti formano un aggregato a stella all'interno delle pareti dei pori di dimensione di circa 5 µm. Con queste concentrazioni i nanofilamenti sono omogeneamente distribuiti all'interno dello scaffold.

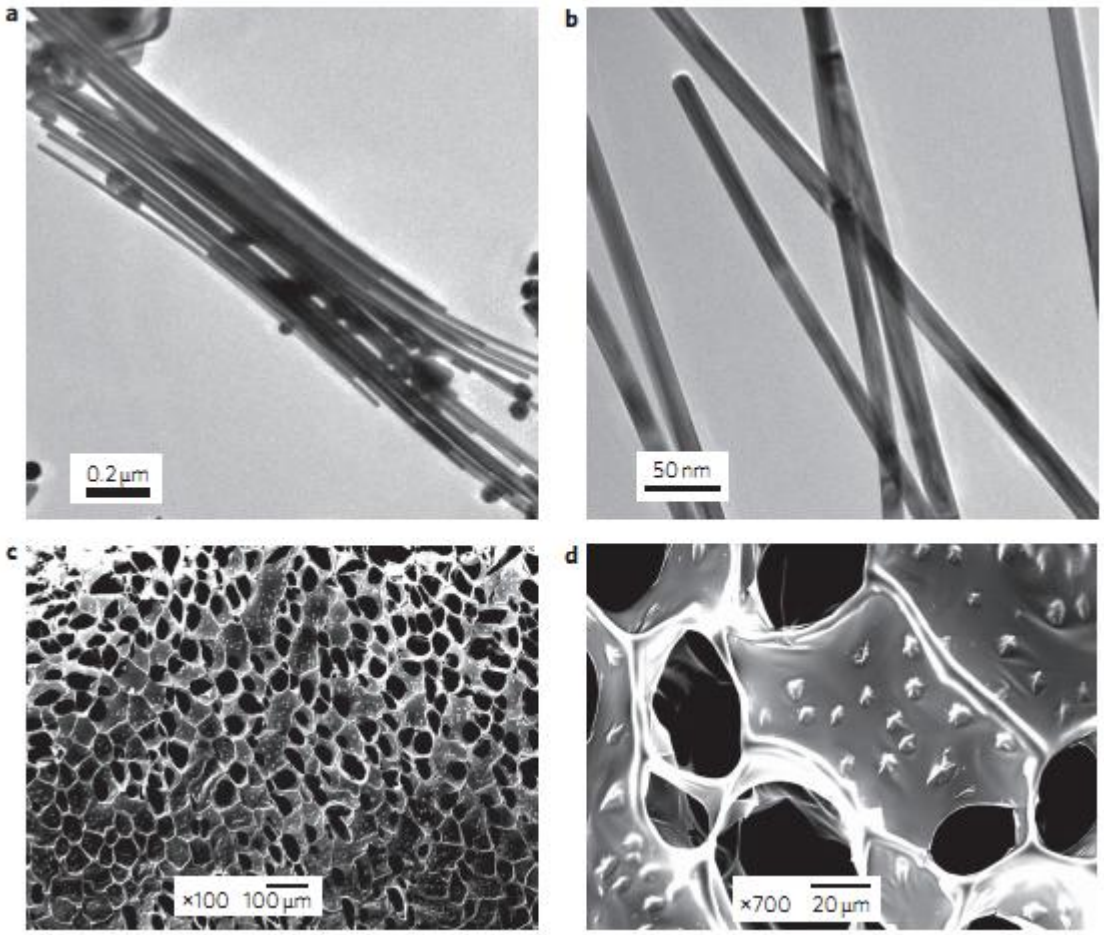


Figura 4.1. Visualizzazione tramite SEM delle dimensioni dei nanofilamenti in oro e della loro distribuzione all'interno dello scaffold. **a,b)** tipica distribuzione dei nanofilamenti con una lunghezza in media di circa 1 µm ed un diametro medio di circa 30 nm; **c,d)** la visualizzazione tramite SEM permette di rilevare che i nanofilamenti ad una concentrazione di 1 mg/ml si assemblano con le pareti dei pori dello scaffold formando un aggregato a stella di larghezza di circa 5 µm.

Sono state fatte poi simulazioni per valutare le potenzialità e la conduttività di questi "ponti" tra pori. Queste consistono essenzialmente nel misurare la conduttività di una pellicola di Alg-NW spessa circa 500 nm rivestita con ossido di indio e stagno (ITO), attraverso microscopia a forza atomica (C-AFM). Grazie a queste prove si sono ottenuti riscontri positivi, i nanofilamenti creano effettivamente una comunicazione elettrica tra pori adiacenti (Figura 4.2).

Una ulteriore prova del miglioramento della conduttività dello scaffold con i nanofili è stata ottenuta misurando l'impedenza complessiva della pellicola. La pellicola è stata posizionata tra due elettrodi ITO e fatta attraversare da corrente alternata alle frequenze tra 1MHz e 1Hz. L'impedenza misurata alle alte frequenze (>10 kHz) risulta bassa, alle basse frequenze invece, che comprendono lo spettro di frequenze del battito cardiaco dei mammiferi (ordine di grandezza di 1 Hz),

l'impedenza di Alg-NW è considerevolmente più bassa rispetto all'originario scaffold privo di nanofilamenti. Questo implica una maggiore conduttività.

Cardiomiociti isolati dal ventricolo sinistro di un cuore di ratto appena nato sono stati seminati su scaffold Alg-NW e su scaffold privo dei nanofilamenti. Il contributo dei nanofilamenti nell'organizzazione delle cellule è stato studiato inizialmente in condizioni statiche ovvero senza stimolazioni elettriche, 3 giorni dopo l'inizio della cultura cellulare, e successivamente, 5 giorni dopo, in presenza di stimolazioni al fine di promuovere l'allineamento delle cellule. Tipicamente, le cellule seminate sugli scaffolds in alginato privi di nanofilamenti non si legano intimamente alla matrice, ma si dispongono in un compatto aggregato circolare all'interno dei pori. Nei "nuovi" scaffold Alg-NW invece, attraverso colorazione all'ottavo giorno tramite ematossilina e eosina (H&E) si osserva che le cellule hanno assunto una disposizione più omogenea e allineata. All'ottavo giorno inoltre i nanofilamenti nello scaffold Alg-NW sono ancora presenti, ciò sta a significare che hanno resistito al processo di coltivazione cellulare (Figura 4.3). E' stato riscontrato inoltre attraverso attività di test che né i nanofilamenti né i loro residui chimici, che potrebbero crearsi e disperdersi nello scaffold durante il periodo di coltura cellulare, hanno provocato effetti citotossici nelle cellule cardiache seminate. Studi in vivo saranno cruciali per una dimostrazione definitiva sulla biocompatibilità di scaffold Alg-NW.

Nel processo di coltura cellulare viene inoltre esaminata la presenza di due proteine fondamentali per il muscolo cardiaco: troponina I, proteina ad alto peso molecolare presente soprattutto nel tessuto muscolare, importante nella fase di eccitazione-contrazione muscolare; connessina 43, essenziale nel processo di coordinazione della depolarizzazione del muscolo cardiaco, è una " gap junction protein", proteina di membrana con il principale compito di trasportatrice.

Al terzo giorno (prima della stimolazione elettrica) i cardiomiociti nello scaffold Alg-NW esprimono un alto livello di entrambe le proteine sopra citate (Figura 4.3). All'ottavo giorno è rilevata una ancor più alta quantità di troponina I e una disposizione uniforme delle cellule su tutto lo scaffold, cosa che non si verifica nello scaffold privo di nanofilamenti. Nella cultura cellulare con scaffold Alg-NW, inoltre, connessina 43, situata tra cardiomiociti stimola la maturazione del tessuto, questo non è riscontrato nella matrice non modificata (senza nanofilamenti). Test hanno appurato poi che anche la quantità di connessina 43 è superiore nelle culture cellulari con scaffold Alg-NW rispetto a quelli privi di nanofilamenti, questo significa che scaffold Alg-NW permettono un aumento nell'accoppiamento meccanico ed elettrico e nelle proprietà contrattili del tessuto. L'elevata quantità di connessina 43 nello scaffold Alg-NW già al terzo giorno della cultura cellulare

e quindi in assenza di stimolazioni elettriche esterne ci suggerisce che l'effetto dei nanofilamenti agisce sul costrutto da subito, indipendentemente da stimolazioni elettriche esterne.

Un ultimo test, per valutare gli effetti elettrofisiologici dei nanofilamenti nei costrutti, è stato fatto utilizzando un colorante sensibile al calcio, elemento protagonista nell'eccitazione-contrazione della cellula miocardica. Si è visto che, negli scaffold Alg-NW, i transitori di calcio sono significativamente più alti che non negli scaffold privi di nanofilamenti ciò a significare miglioramenti nella contrazione poi del neo-tessuto.

Per la prima volta, è stato dimostrato, che nanocompositi di nanomateriali inorganici in matrice polimerica possono essere utilizzati in ingegneria tessutale, per arricchire la struttura del neo-tessuto a livello di caratteristiche morfologiche e funzionali.

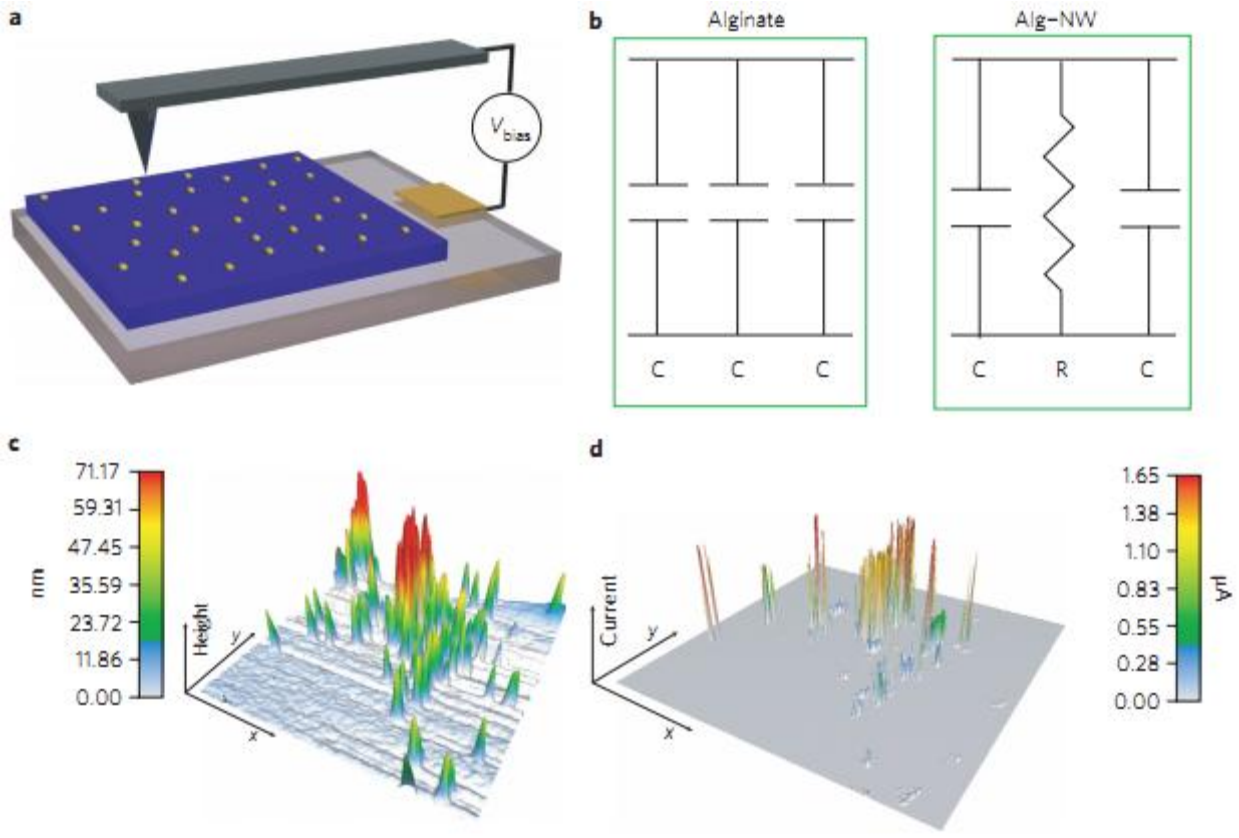


Figura 4.2. Aumento della conduttività elettrica dell'alginato dopo aver aggiunto i nanofilamenti: **a)** utilizzo del C-AFM, misurazione della tomografia e contemporaneamente della conduttività della pellicola; **b)** circuito equivalente, condensatori (alginato) e resistori (nanofilamenti) connessi in parallelo; **c)** mappatura topografica; **d)** misurazione della conduttività attraverso C-AFM, picchi di corrente sono rilevati in corrispondenza dei nanofilamenti.

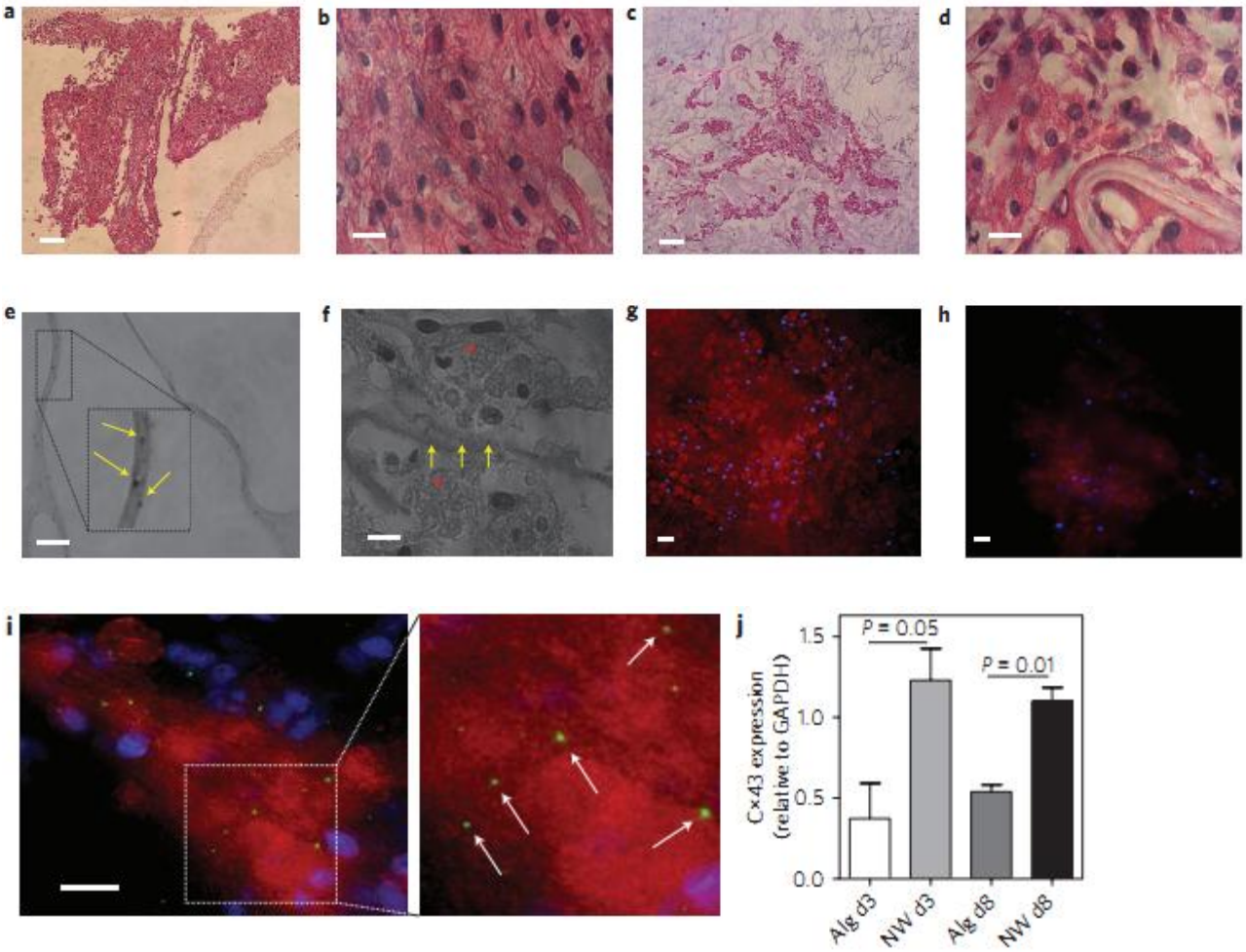


Figura 4.3. Organizzazione dei cardiomiociti nello scaffold. **a-d)** sottoponendo piccole senzione di tessuto ingegnerizzato all'ottavo giorno a sostanze coloranti H&E il tessuto realizzato tramite scaffold Alg-NW mostra consistenza più spessa (a,b) mentre quello realizzato tramite scaffold Alg presenta non compattezza e discontinuità (c,d); **e)** Nanofilamenti all'interno delle pareti tra i pori (punti indicati dalle frecce); **f)** vicinanza tra nanofilamenti (indicati dalle frecce) e aggregati di cellule (punti rossi); **g,h)** rilevamento di troponina I (puntini rossi) in scaffold Alg-NW (g) e in scaffold Alg (h); **i)** connessina 43 (punti verdi), trovata tra i cardiomiociti (scaffold Alg-NW); **j)** quantificazione connessina 43; Unità di scala: 200 µm (a,c), 20 µm (b,d,e-i).

4.1 Metodi di formazione della cardiac patch

- Preparazione dei nanofilamenti d'oro

Tutte le sostanze chimiche utilizzate nel processo di formazione dei nanofilamenti sono state acquisite da una grande industria produttrice nel campo della scienza e della biomedica, Sigma-Aldrich, operativa a livello mondiale in più di 40 stati.

Gli elementi o composti chimici utilizzati sono: $HAuCl_4$ (acido cloroaurico, un acido complesso), $NaBH_4$ (boroidruro di sodio), citrato di sodio, HNO_3 (acido nitrico), CTAB (Cetyltrimethylammonium Bromide), acido ascorbico.

1) Vengono preparati i semi d'oro attraverso la creazione di una soluzione acquosa di 20 ml consistente in $HAuCl_4$ e sodio citrato, alla quale, sotto energica agitazione, vengono aggiunti 0.6 ml di soluzione acquosa molto fredda di $NaBH_4$. La soluzione assume immediatamente una colorazione rossa, ciò a significare la formazione di oro in forma colloidale. Un tipico prodotto contiene particelle d'oro sferiche, circa di 4 nm in diametro e con una stimata densità di circa 7.6x10^13 particelle/ml.

2) La sospensione viene fatta riposare a temperatura ambiente per diverse ore prima del suo riutilizzo, questo per assicurarsi che si sia completata la degradazione di $NaBH_4$. L'oro colloidale è stabile, a 4°C, per diversi mesi.

3) I fili sono creati attraverso allungamento anisotropico dei semi d'oro. Per raggiungere l'aspetto dei nanofili desiderato, la reazione è portata a termine attraverso tre passi distribuendo la sospensione in due parti: 25 ml in fiasche di Erlenmeyer (A e B) e 250 ml in una fiasca a fondo tondeggiante (C) (Figura 4.4).

4) Preparazione della soluzione di crescita; CTAB, Cetyltrimethylammonium Bromide, (7.54 g) viene dissolta in 200 ml di acqua deionizzata alla temperatura di 37°C. Dopo la completa dissoluzione di CTAB, viene aggiunto $HAuCl_4$ seguito da acido ascorbico che provoca un cambiamento di colorazione della soluzione, da giallo pallido a giallo intenso.

5) Viene aggiunto HNO_3, acido nitrico. Ora la soluzione di crescita viene suddivisa nelle tre fiasche sopra citate rispettivamente: A (9 ml), B (18 ml), C (173 ml). La crescita dei nanofilamenti è inizializzata aggiungendo 1 ml della soluzione di semina alla fiasca A. Dopo 15 s, 1 ml di soluzione viene trasferita dalla fiasca A alla B. Dopo 30 s, 5 ml di soluzione vengono trasferiti dalla B alla C, tutti questi trasferimenti avvengono mantenendo la soluzione sotto energica agitazione. La fiasca C viene mantenuta alla temperatura di 37°C, in movimento, ed assume colorazione viola nel corso di due ore.

6) La soluzione contenente un miscuglio di morfologie che successivamente verrà purificato, viene raccolta in un tubo da 50 ml per centrifuga, mantenuto ad una temperatura di 37°C, indisturbato, per circa una settimana. Durante questo lasso di tempo, si formano sul fondo di questo tubo, granuli. Il surnatante viene scartato e la parte solida risospesa in acqua deionizzata. Una tipica sintesi di questo genere porta a circa 60 mg di prodotto dopo la purificazione.

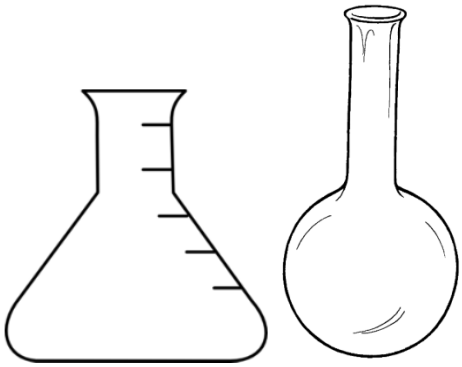


Figura 4.4. Fiaschea di Erlenmeyer la prima (A e B); fiasca a fondo tondeggiante la seconda (C)

- Preparazione dello scaffold Alg-NW

Preparato utilizzando la forma di alginato utilizzata anche in ambito farmaceutico, Protanal LF 5/6 (FMC Biopolymers), che ha una elevata quantità di acido glucoronico (65%). Il metodo di preparazione dello scaffold Alg-Nw consiste fondamentalmente in 5 passi:

1) Preparazione di una soluzione di alginato di sodio;
2) mescolazione delle due soluzioni (nanofilamenti e alginato) seguita da agitazione rapida;
3) facilitare la creazione di reticolazioni tra nanofilamenti e alginato attraverso l'aggiunta di sostanze reticolanti come ad esempio gluconato di calcio;
4) congelamento dell'alginato reticolato in un ambiente alla temperatura di -20°C;
5) liofilizzazione, conferendo allo scaffold consistenza spugnosa (5 mm x 2 mm, d x h) (Figura 4.5);
6) sterilizzazione dello scaffold attraverso raggi UV prima dell'utilizzo.

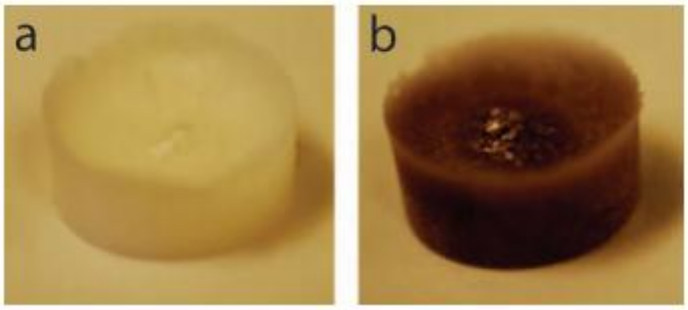


Figura 4.5. Fotografie degli scaffolds, 5 mm di diametro e 2 mm di altezza. **a)** scaffold Alg; **b)** scaffold Alg-NW.

CONCLUSIONI

Da questa trattazione possiamo trarre che l'ingegneria tessutale del miocardio è un campo in pieno sviluppo e molto importante è investire nella ricerca in questo settore. Gli studi dell'ingegneria tessutale in questa specifica diramazione infatti, sono ancora agli albori rispetto a ciò che ci si prefigge per il futuro. E' evidente, che data la sua grande complessità, curare o rimpiazzare il muscolo cardiaco non è un compito facile. Un passo avanti è stato fatto negli ultimi anni introducendo l'utilizzo di scaffolds realizzati tramite una giusta combinazione tra biomateriali naturali ed artificiali e mostrando molta più attenzione nella morfologia del costrutto, nella tipologia di cellule e nelle strategie di coltura cellulare. Le cellule staminali hanno dato una grande mano all'evolversi dell'ingegneria tessutale e sono le cellule più studiate in assoluto nonostante i problemi di carattere etico e morale incontrati negli ultimi anni. Ad oggi la realizzazione di patch cardiache di dimensioni ridotte, per la rigenerazione di piccole parti lese di muscolo cardiaco, ha raggiunto ottimi risultati. La prospettiva futura, in parte già realizzata ma ancora in fase di prova, di studio e miglioramento, è la creazione di un intero organo cardiaco bioartificiale, partendo dalla decellularizzazione di un cuore di un cadavere, preservandone la matrice extracellulare. La scienza e l'ingegneria in collaborazione con la medicina hanno veramente compiuto grandi passi, sono state rivoluzionate tecniche e metodi di azione in senso clinico e sperimentale, in prospettiva futura non si potrà che avere un sempre più positivo riscontro dagli studi in questo settore.

BIBLIOGRAFIA

[1] Biomateriali, introduzione allo studio dei materiali per uso biomedico, Carlo Di Bello, Patron Editore

[2] Enciclopedia Garzanti della Medicina, Robert E. Rothenberg, M.D., F.A.C.S.

[3] Link a: http://it.wikipedia.org/wiki/Cuore

[4] Link a: http://it.wikipedia.org/wiki/Infarto_miocardico

[5] P. Passolunghi. G. Arisi, B. Taccardi: Origine e propagazione dell'eccitamento nel cuore; Prof. Marcello Bracale Appunti Elettronica Biomedica

[6] Rohin K Iyer, Loraine LY Chiu, Lewis A Reis, Milica Radisic: Engineered cardiac tissues; (2011) Elsevier, DOI 10.1016/j.copbio.2011.04.004

[7] Kathy Yuan Ye: Strategies for tissue engineering cardiac constructs to affect functional repair following myocardial infarction; J. of Cardiovasc. Trans. Res. (2011) 4:575 –591, from Springer

[8] Kareen L. Kreutziger, Charles E. Murry: Engineered Human Cardiac Tissue; Pediatr Cardiol (2011) 32:334–341, from Springer

[9] Seokwon Pok, Jeffrey G. Jacot: Biomaterials advances in patches for congenital heart defect repair; J. of Cardiovasc. Trans. Res. (2011) 4:646 –654, from Springer

[10] Yuji Haraguchi, Tatsuy a Shimizu, Masayuki Yamato, Teruo Okano: Regenerative therapies using cell sheet-based tissue engineering for cardiac disease; SAGE-Hindawi Access to Research Cardiolog Research and Pr ctice Volume 2011, Article ID 845170, 8 pages

[11] Hidekazu Sekine, Tatsuya Shimizu, Teruo Okano: Myocardial tissue engineering: toward a bioartificial pump; DOI 10.1007/s00441-011-1267-6, Springer-Verlag 2011,

[12] Giancarlo Forte, Stefani a Pagliari, Francesca Pagliari, Mitsuhiro Ebara, Paolo Di Nardo, Takao Aoyagi: Towards the generation of patient-specific patches for cardiac repair; Stem Cell Rev and Rep DOI 10.1007/s12015-011-9325-8, Springer Science+Business Media, LLC 2011

[13] Runqian Sui, Xiaobo Liao, Xinmin Zhou, Qi Tan: The current status of engineering myocardial tissue; Stem cell Rev and Rep (2011) 7:172-180, from Springer

[14] Beatriz Pelacho, Manuel Mazo, Juan Jose Gavira, Felipe Prosper: Adult stem cells: from new cell sources to changes in methodology; J. of Cardiovasc. Trans. Res. (2011) 4:154 –160

[15] Sara S. Nunes, Hannah Song, C. Katherine Chiang, Milica Radisic: Stem Cell-Based Cardiac Tissue Engineering; J. of Cardiovasc. Trans. Res. (2011) 4:592 –602, DOI 10.1007/s12265-011-9307-x

[16] Jayarama Reddy Venugopal, Molamma P. Prabhakaran, Shayanti Mukherjee, Rajeswari Ravichandran, Kai Dan and Seeram Ramakrishna: Biomaterial strategies for alleviation of myocardial infarction; J. R. Soc. Interface published online 7 September 2011 doi: 10.1098/rsif.2011.0301

[17] Donald O. Freytes, Laura Santambrogio, Gordana Vunjak-Novakovic: Optimizing dynamic interactions between a cardiac patch and inflammatory host cells; Cells tissues organs DOI: 10.1159/000331392

[18] Tal Dvir, Brian P.Timko, Mark D.Bringham, Shreesh R.Naik, Sandeep S.Karajanagi, Oren Levy, Hongwei Jin, Kevin K.Parker, Robert Langer and Daniel S. Kohane: Nanowired three-dimensional cardiac patches; DOI: 10.1038/NNANO.2011.160, Nature nanotechnology

[19] Marisa E. Jaconi: Gold nanowires to mend a heart; nanomedicine, nature nanotechnology Vol 6, 2011

[20] Tal Dvir, Brian P.Timko, Mark D.Bringham, Shreesh R.Naik, Sandeep S.Karajanagi, Oren Levy, Hongwei Jin, Kevin K.Parker, Robert Langer and Daniel S. Kohane: Nanowired three dimensional cardiac patches; supplementary information; DOI: 10.1038/NNANO.2011.160

[21] John A. Schoenhard, Antonis K. Hatzopoulos: Stem Cell Therapy: Pieces of the Puzzle; J. of Cardiovasc. Trans. Res. (2010) 3:49 –60, DOI 10.1007/s12265-009-9148-z

[22] Erik Willems, Marion Lanier, Elvira Forte, Frederick Lo, John Cashman, Mark Mercola: A Chemical Biology Approach to Myocardial Regeneration; J. of Cardiovasc. Trans. Res. (2011) 4:340 –350, DOI 10.1007/s12265-011-9270-6

[23] Karen L. Christman, R.J. Lee: Biomaterials for the Treatment of Myocardial Infarction; Journal of the American College of Cardiology, Vol. 48, No. 5, 2006, doi:10.1016/j.jacc.2006.06.005

[24] Atta Behfar, L. V. Zingman, D. M. Hodgson, J. Rauzier, G. C. Kane, A. Terzic, M. Puceat: Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart; doi: 0892-6638/02/0016-1558

[25] Birsen Demirbag, Pinar Y. Huri, Gamze T. Kose, Arda Buyuksungur, Vasif Hasirci: Advanced cell therapies with and without scaffolds; Biotechnol. J. 2011, 6, 1437–1453, DOI 10.1002/biot.201100261

[26] Paolo Castano, Rosario F. Donato, Pietro Enrico di Prampero, Arsenio Veicsteinas: Anatomia e fisiologia dell'uomo; edi-ermes

[27] Grande enciclopedia medica, Vol 9; Armando Curcio editore