



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA



DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN
BIOINGEGNERIA

CARATTERIZZAZIONE MECCANICA DI MEMBRANE IBRIDE
PER LA PRODUZIONE DI CAMERE VENTRICOLARI DI UN NUOVO
CUORE TOTALE ARTIFICIALE

Relatore:

Ch.mo Prof. Andrea Bagno

Correlatore:

Ing. Martina Todesco

Laureando:

Andrea Martella

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

28 febbraio 2022

INDICE

| | |
|---|----|
| ABSTRACT | 5 |
| CAPITOLO 1:IL CUORE E LE PATOLOGIE CARDIACHE..... | 7 |
| 1.1: ANATOMIA DEL CUORE..... | 7 |
| 1.2: GENERAZIONE DELLO STIMOLO CARDIACO..... | 9 |
| 1.3: APPARATO CARDIOCIRCOLATORIO..... | 10 |
| 1.4: GRANDEZZE CARDIACHE FONDAMENTALI..... | 11 |
| 1.5: PATOLOGIE CARDIACHE..... | 12 |
| CAPITOLO 2: SOLUZIONI AL FALLIMENTO CARDIACO E DISPOSITIVI DI ASSISTENZA AL CIRCOLO..... | 15 |
| 2.1: TRAPIANTO DI UN CUORE BIOLOGICO..... | 15 |
| 2.2: SOLUZIONI MECCANICHE PER L'ASSISTENZA AL CIRCOLO COME ALTERNATIVE AL TRAPIANTO.... | 17 |
| 2.2.1: VAD (<i>Ventricular Assist Device</i>)..... | 17 |
| 2.2.2: TAH (<i>Total Artificial Heart</i>)..... | 18 |
| 2.3: TAH: STORIA E STATO DELL'ARTE..... | 19 |
| CAPITOLO 3. REQUISITI FONDAMENTALI PER LA REALIZZAZIONE DI UN TAH E PROGETTO PADOVANO..... | 27 |
| 3.1: SPECIFICHE DI PROGETTO PER UN TAH..... | 27 |
| 3.2: PROGETTO PADOVANO..... | 29 |
| CAPITOLO 4: MATERIALI E METODI..... | 33 |
| 4.1: MATERIALI E APPARECCHIATURE UTILIZZATE PER LA REALIZZAZIONE DI MEMBRANE IBRIDE..... | 33 |
| 4.1.1: <i>ChronoFlex® AR e ARLT (CF AR e CF ARLT)</i> | 33 |
| 4.1.2: <i>Pericardio bovino e porcino nativo</i> | 35 |
| 4.1.3: <i>Pericardio bovino, porcino decellularizzato e metodo di decellularizzazione</i> | 36 |
| 4.1.4: <i>Membrane ibride</i> | 38 |
| 4.1.5: <i>Forno Vacuum Drying Oven</i> | 39 |
| 4.1.6: <i>TRAMA</i> | 40 |
| 4.1.7: <i>MatLab®</i> | 41 |
| 4.1.8: <i>Altra strumentazione</i> | 41 |
| 4.2: METODI..... | 43 |
| 4.2.1: <i>Pretensionamento</i> | 43 |
| 4.2.2: <i>Comportamento a fatica</i> | 43 |
| 4.2.3: <i>rilassamento delle tensioni</i> | 44 |
| CAPITOLO 5: RISULTATI..... | 47 |
| 5.1: COMPORTAMENTO A FATICA..... | 47 |
| 5.2: RILASSAMENTO DELLE TENSIONI..... | 51 |
| CAPITOLO 6: CONCLUSIONI..... | 55 |
| APPENDICE..... | 57 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 61 |
| RINGRAZIAMENTI..... | 67 |

ABSTRACT

Lo studio e la produzione di nuovi materiali ibridi è una sfida attuale che nella presente tesi è finalizzata alla realizzazione di camere ventricolari di un TAH (Total Artificial Heart) sviluppato e progettato all'interno del Dipartimento di Ingegneria Industriale dell'Università degli Studi di Padova.

Le membrane ibride identificate con l'acronimo HYME (HYbrid MEmbrane) sono ottenute per *solution casting* accoppiando uno strato di poliuretano carbonato (ChronoFlex®) con pericardio decellularizzato di origine bovina o porcina. In questo modo vengono combinate le proprietà meccaniche del polimero con le proprietà di compatibilità ed emocompatibilità del pericardio. Non solo: essendo il pericardio decellularizzato, ci si attende che possa essere ripopolato in vivo dalle cellule in circolo.

La maggiore emocompatibilità dei materiali ibridi dovrebbe inoltre permettere di evitare, o quantomeno diminuire, la terapia anticoagulante da somministrare al paziente e quindi di evitare/ridurre gli effetti collaterali associati a questa terapia.

Lo scopo del lavoro illustrato in questa tesi è stato quello di caratterizzare meccanicamente i singoli materiali impiegati per la produzione di HYME e le membrane ibride ottenute: in particolare ci si è occupati della caratterizzazione del comportamento a fatica.

Confrontando i risultati sperimentali si è poi cercato di identificare la HYME ideale per la realizzazione delle camere ventricolari che risulterà essere quella che manterrà adeguate proprietà meccaniche nelle prove post-fatica.

Infine, per proporre un modello costitutivo dei materiali presi in considerazione, si è proceduto a studiare il loro comportamento con prove meccaniche di rilassamento delle tensioni.

CAPITOLO 1: IL CUORE E LE PATOLOGIE CARDIACHE

1.1 ANATOMIA DEL CUORE

Il cuore è un organo di natura muscolare ed è collocato al centro della gabbia toracica, dietro lo sterno nel mediastino, cioè nello spazio presente tra i due polmoni.

Peso e dimensione variano da persona a persona: nella media il peso è 250-300 grammi, le dimensioni sono pari a circa 12-13 centimetri in lunghezza, 8-9 centimetri in larghezza con spessore di 6 centimetri circa [1].

Il cuore è un organo cavo al cui interno vi sono quattro camere: due atri e due ventricoli (Figura 1.1). Il cuore è dotato di quattro valvole cardiache che hanno il compito di mantenere la unidirezionalità del flusso ematico, che nel cuore passa prima negli atri e successivamente riempie i ventricoli.

Le valvole cardiache sono quattro: due atrioventricolari e due semilunari. Le valvole atrioventricolari separano gli atri dai ventricoli e sono chiamate valvola mitrale e tricuspide; la valvola aortica e la valvola polmonare sono invece le valvole semilunari e separano rispettivamente il ventricolo sinistro dall'arteria aorta e il ventricolo destro dall'arteria polmonare.

Il lavoro compiuto dalle valvole è quello di aprirsi e chiudersi durante le fasi del ciclo cardiaco cioè sistole e diastole. L'apertura e la chiusura delle valvole avvengono quando la pressione del distretto di monte supera la pressione del distretto di valle, generando quindi un gradiente pressorio che permette l'avvicinarsi o l'allontanarsi dei lembi valvolari.

La chiusura delle valvole non è perfetta poiché è presente un piccolo orifizio residuo che genera il retro-flusso, cioè un modesto volume di sangue che entro certi limiti risulta fisiologico.

Si può considerare il cuore diviso in due metà distinte, separate dal setto interatriale e dal setto interventricolare che impediscono la comunicazione rispettivamente tra i due atri e tra i due ventricoli.

Le due metà del cuore lavorano in modo sincrono alternando movimenti di contrazione e di rilassamento che permettono al sangue arterioso di raggiungere tutti gli organi e i tessuti e al sangue venoso di tornare al cuore, da qui ai polmoni e poi di nuovo al cuore una volta ossigenato.

Anatomicamente la parete del cuore è costituita da tre strati: endocardio, miocardio e epicardio (Figura 1.2). Il primo è il sottile strato che riveste le cavità interne e costituisce le valvole; il miocardio è lo strato muscolare intermedio che svolge le funzioni contrattili ed è responsabile

di sistole e diastole; infine, l'ultimo strato è l'epicardio, una sottile membrana sierosa che riveste il cuore.

Il cuore è collegato con lo sterno e con il diaframma per mezzo di una membrana sierosa posta esternamente all'epicardio.

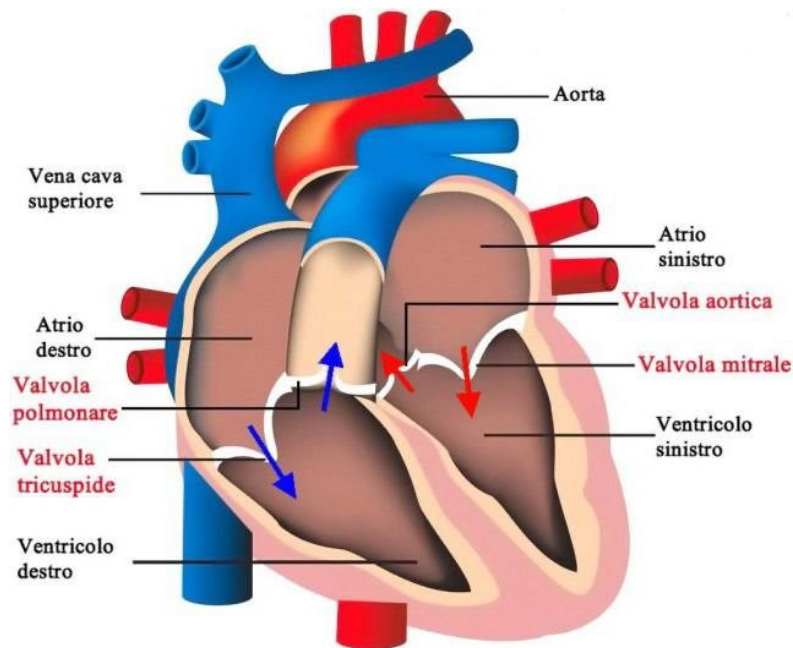


Figura 1.1: Anatomia del cuore in cui vengono specificate le quattro camere cardiache, le quattro valvole e i vasi sanguigni in entrata e in uscita dall'organo.

L'insieme di questa membrana sierosa e dell'epicardio forma il pericardio che funge da guaina per il cuore con funzioni di difesa contro infezioni che potrebbero comprometterne la funzione cardiaca.

Nel pericardio si notano due strati differenti, uno sieroso e uno fibroso, separati dal liquido pericardico. Il pericardio sieroso è più interno ed aderisce al cuore e si distingue in foglietto parietale e foglietto viscerale, mentre esternamente si pone il pericardio fibroso.

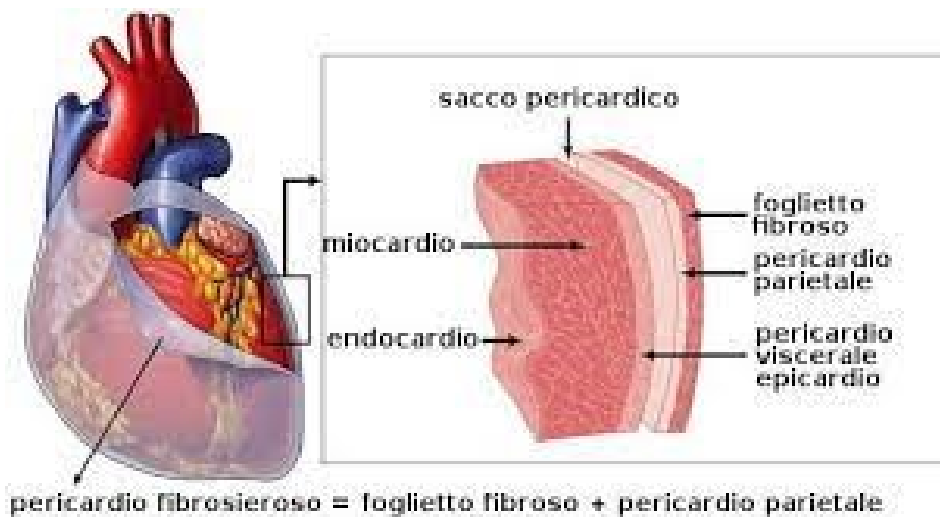


Figura 1.2: Rappresentazione degli strati della parete del cuore.

1.2 GENERAZIONE DELLO STIMOLO CARDIACO

In condizioni fisiologiche lo stimolo per l'inizio del ciclo cardiaco ha origine nel nodo seno-atriale, localizzato nell'atrio destro. In questo sito sono presenti cellule specializzate in grado di generare lo stimolo elettrico propagandolo in tutte le regioni del cuore (Figura 1.3).

Il nodo seno-atriale dà luogo alla contrazione atriale, poi seguentemente l'impulso viene diffuso verso il basso fino al nodo atrio-ventricolare, posto tra atri e ventricoli, dove comunicando con il fascio di His dà inizio alla contrazione ventricolare. Una volta conclusa la contrazione del muscolo cardiaco lo stimolo elettrico si estingue.

Ad ogni contrazione del cuore corrisponde la generazione di un battito cardiaco che darà origine al ritmo sinusale.

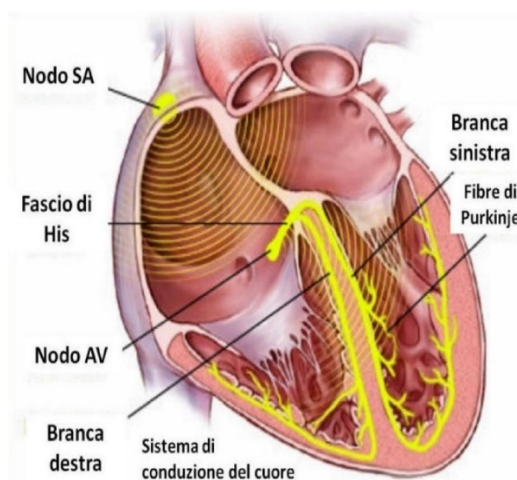


Figura 1.3: Generazione e trasmissione dell'impulso elettrico cardiaco.

1.3 APPARATO CARDIOCIRCOLATORIO

Durante il ciclo cardiaco sono presenti due fasi fondamentali che si alternano: sistole e diastole. Sono entrambe fasi spontanee rispettivamente di contrazione e rilassamento del muscolo cardiaco. Durante la sistole, i ventricoli, in modo sincrono, si restringono inducendo il passaggio di sangue verso i polmoni e il resto dell'organismo; in fase di diastole i ventricoli accumulano sangue proveniente dagli atri.

Il sistema cardiocircolatorio prevede nei mammiferi e quindi negli uomini una doppia circolazione costituita da due circuiti posti in serie l'uno all'altro: piccola e grande circolazione (Figura 1.4).

La piccola circolazione, o circolazione polmonare, permette la comunicazione tra il cuore e i polmoni con lo scopo di ossigenare il sangue proveniente dalla periferia dell'organismo ricco di CO_2 . La grande circolazione, o circolazione sistemica, porta il sangue ossigenato dalla circolazione polmonare verso tutti i tessuti e organi del corpo. Lungo il percorso i vasi si diramano verso i distretti periferici e diminuiscono di sezione fino a diventare capillari. Questa variazione di sezione consente la permeabilità dei vasi facilitando gli scambi con le cellule che ricevono l'ossigeno e cedono anidride carbonica.

Nei tessuti arriva quindi sangue arterioso e ricco di ossigeno ed esce sangue venoso deossigenato e ricco di anidride carbonica e cataboliti.

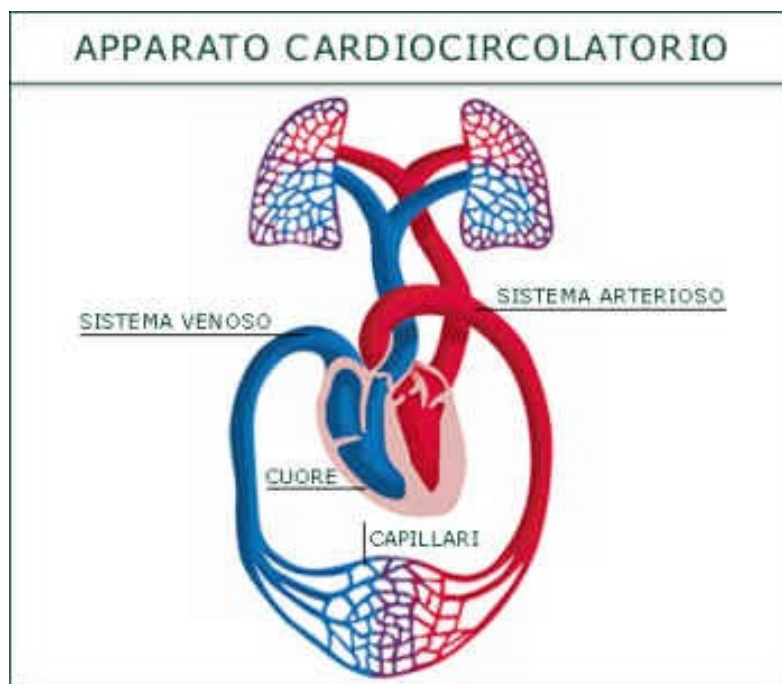


Figura 1.4: Circolazione polmonare (in blu) e circolazione sistemica (in rosso).

Si intuisce pertanto una differenza sostanziale tra arterie e vene, che però non dipende dal loro contenuto, ma dalla direzionalità del flusso di sangue al loro interno; infatti, le arterie seguono una circolazione centrifuga che uscendo dai ventricoli arriva ai polmoni, mentre le vene seguono un flusso centripeto che dagli organi giunge al cuore.

1.4 GRANDEZZE CARDIACHE FONDAMENTALI

Nella presente analisi, le grandezze fondamentali a cui si è maggiormente interessati sono la frequenza cardiaca, lo stroke volume e la pressione arteriosa.

La frequenza cardiaca indica il numero di volte che viene eseguito il ciclo cardiaco in 60 secondi. In condizioni fisiologiche il numero di battiti al minuto varia tra 60 e 100 (Figura 1.5). Questa grandezza è fortemente legata alla generazione dell'impulso elettrico e quindi al sistema nervoso. Complessivamente il sistema nervoso agisce da ostacolo o da stimolatore del battito cardiaco; infatti, il sistema parasimpatico governa situazioni di quiete, come la digestione o l'accumulo di energia, mentre il sistema simpatico agisce in parallelo alle emozioni, presiedendo a situazioni di emergenza, eccitazione o attività fisica.

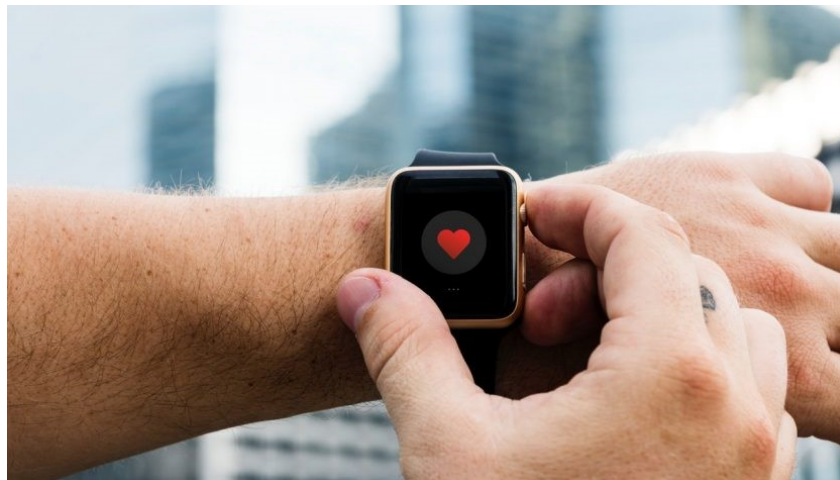


Figura 1.5: Dispositivo indossabile per la misurazione del battito cardiaco.

L'altra grandezza fondamentale introdotta è lo stroke volume (SV), ossia il volume di sangue eiettato dal ventricolo in un battito. Lo stroke volume moltiplicato per la frequenza cardiaca fornisce il valore del cardiac output (CO), il volume di sangue che fuoriesce dal cuore in un minuto. In media, per un adulto di 70 chilogrammi con SV di 70 millilitri, la portata di sangue è pari a 5 litri al minuto.

Lo stroke volume dipende da tre variabili: precarico (preload), contrattilità e postcarico (postload). Il precarico è determinato dal volume ventricolare a fine diastole che è connesso

con il ritorno venoso di sangue. Maggiore è il ritorno venoso e maggiore sarà il volume immagazzinato nel ventricolo che di conseguenza porterà ad incrementare il valore di volume eiettato a fine sistole. La relazione tra volume a fine diastole e stroke volume viene descritta dalla legge di Starling, la quale determina l'energia di contrazione del miocardio in termini proporzionali alla lunghezza delle fibre cardiache.

La contrattilità miocardica è la capacità spontanea del muscolo cardiaco di contrarsi, rappresenta il lavoro generato durante la contrazione cardiaca a parità di precarico, postcarico e frequenza cardiaca, ed è il principale parametro che fornisce informazioni sulla funzionalità cardiaca. Infine, il postcarico è la resistenza offerta dalla circolazione sistemica; infatti, i vasi generano una pressione che si oppone alla gittata cardiaca.

Questa resistenza è determinata dal lume dei vasi sanguigni periferici, nei quali ad un diametro minore corrisponde una maggiore resistenza.

La pressione sanguigna è un ulteriore dato che fornisce informazioni sulla salute del paziente, questa grandezza si riferisce alla pressione arteriosa. Alla misurazione corrispondono due valori, il primo è la pressione arteriosa sistolica che viene rilevata nel momento in cui il cuore si contrae, mentre il secondo valore è la pressione arteriosa diastolica che coincide con l'istante di rilassamento delle camere ventricolari.

Si considera ottimale una pressione arteriosa sistolica che non superi i 120 mmHg e una pressione arteriosa diastolica che sia circa 80 mmHg.

A meno di patologie, per mantenere il valore di pressione sanguigna all'interno del range desiderabile è opportuno seguire alcune semplici regole. Ad esempio, limitare l'uso di sale e caffè, mangiare molta frutta e verdura e non fumare sono alcuni dei consigli da seguire per avere una buona salute.

1.5 PATOLOGIE CARDIACHE

Il cuore è un organo che può essere soggetto a diverse patologie più o meno gravi. Il livello più grave è rappresentato dallo scompenso terminale cardiaco e quindi da un'insufficienza cardiaca grave che ne impedisce la funzione.

L'insufficienza si sviluppa quando la contrazione o il rilassamento del cuore sono inadeguati, può quindi essere sistolica o diastolica a seconda della fase cardiaca in cui si manifesta.

L'insufficienza cardiaca sistolica avviene durante la contrazione del cuore ed è causata dall'incapacità del miocardio di contrarsi normalmente non riuscendo ad espellere completamente il sangue (Figura 1.6). In questi casi viene riscontrata una maggiore capienza

dei ventricoli a cui corrisponde una minore frazione di eiezione, nonché una minor efficienza nella fase di pompaggio.

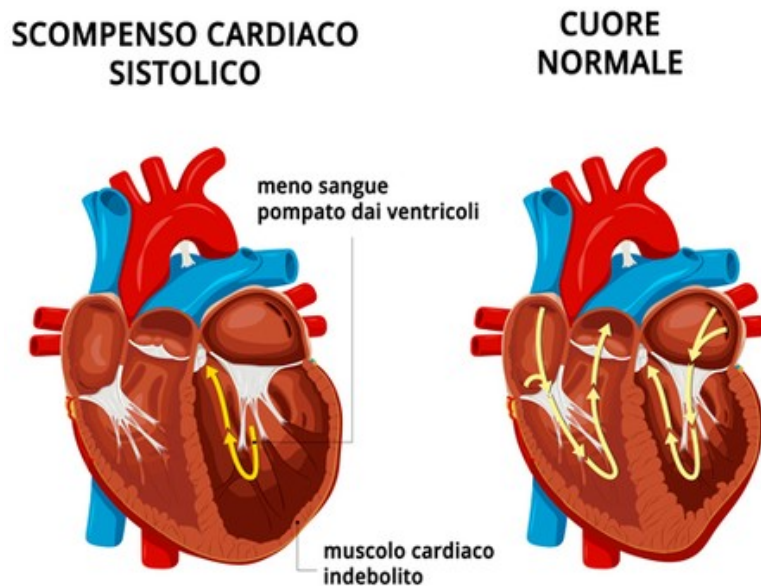


Figura 1.6: Insufficienza cardiaca sistolica: si nota un ingrandimento della camera ventricolare.

L'insufficienza cardiaca diastolica si presenta nel corso del rilassamento ventricolare ed è dovuta ad una disfunzione nel riempimento fisiologico delle camere, in genere è causata dall'irrigidimento o dall'ispessimento del muscolo cardiaco (Figura 1.7). L'effetto è una congestione cardiaca determinata dall'accumulo di sangue negli atri, nei vasi sanguigni polmonari.

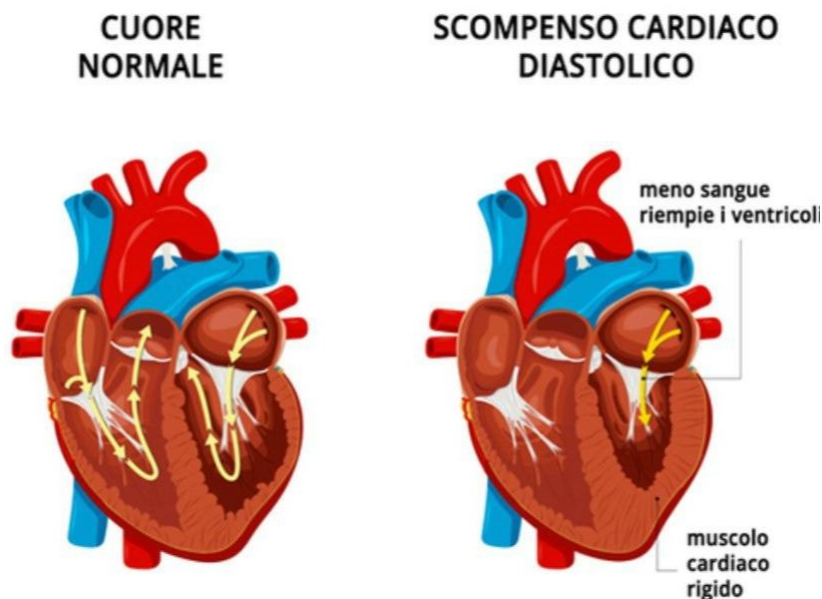


Figura 1.7: Insufficienza cardiaca diastolica: si nota un ispessimento della parete ventricolare.

Ci sono vari fattori che possono determinare un fallimento del cuore e i principali sono: coronaropatie, cardiomiopatie dilatative su base ischemica o idiopatica, difetti delle valvole cardiache e difetti congeniti del cuore.

Le coronaropatie sono legate al mancato apporto fisiologico di sangue e ossigeno delle arterie coronarie verso il miocardio, ciò porta alla necrosi del tessuto contrattile, il quale viene poi sostituito da tessuto cicatriziale incapace di svolgere la fisiologica funzione di pompa.

Le cardiomiopatie invece si riferiscono a patologie, come l'ipertrofia, che portano all'alterazione delle caratteristiche e delle funzioni del miocardio.

I difetti delle valvole cardiache sono invece associati alla non perfetta chiusura o apertura delle valvole durante il ciclo cardiaco provocando un maggiore lavoro compiuto dal cuore per apportare all'interno dell'organismo le medesime quantità di sangue che si avrebbero in condizioni fisiologiche (Figura 1.8).

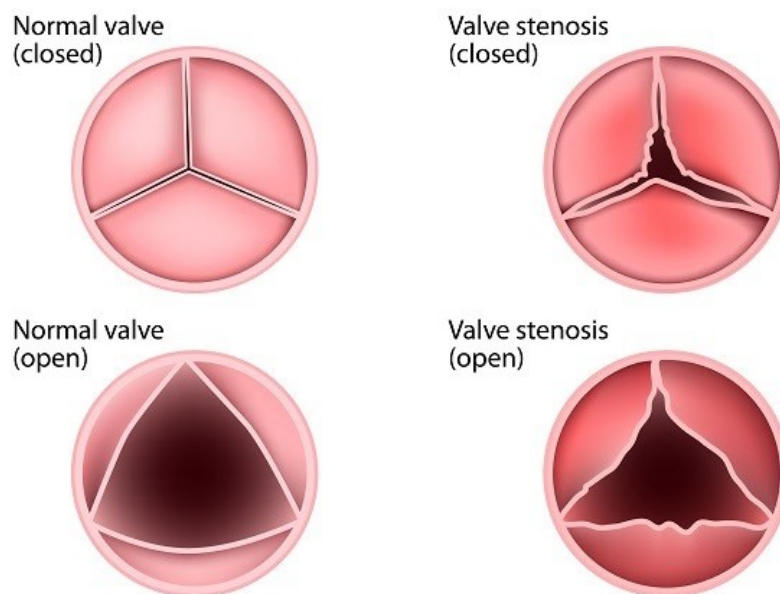


Figura 1.8: Sul lato sinistro è rappresentata, durante le due fasi di chiusura e apertura, una valvola normofunzionante. Sul lato destro è raffigurata una valvola patologica, ciò che si nota è un'imperfetta chiusura e apertura dei lembi valvolari.

Questo fenomeno viene chiamato overload; il cuore subisce un sovraccarico di lavoro e deve adattarsi a questa nuova condizione attraverso meccanismi di compensazione.

CAPITOLO 2: SOLUZIONI AL FALLIMENTO CARDIACO E DISPOSITIVI DI ASSISTENZA AL CIRCOLO

Lo scompenso cardiaco acuto è una patologia grave che ha la necessità di essere gestita e trattata con tempistiche ridotte onde evitare la morte prematura del paziente. Sicuramente qualsiasi sia la soluzione terapeutica trovata, essa non sarà mai del tutto equivalente al cuore nativo sano. Il paziente deve essere reso consapevole del nuovo stile di vita che andrà ad intraprendere e delle terapie immunosoppressive, antiaggreganti e anticoagulanti che dovrà assumere (e dei loro possibili effetti collaterali).

2.1 TRAPIANTO DI UN CUORE BIOLOGICO

Nel caso di grave scompenso cardiaco, la terapia di elezione rimane il trapianto di cuore biologico da donatore: il prelievo dell'organo viene eseguito da un individuo in stato di morte cerebrale quando non vi sia opposizione alla donazione. Il trapianto di cuore biologico rappresenta la miglior terapia per trattare insufficienze cardiache avanzate legate a cardiomiopatie, coronaropatie o gravi malattie delle valvole cardiache.

Il primo trapianto di cuore è stato eseguito in Sud Africa dal Prof. Christiaan Barnard nel 1967 (Figura 2.1).

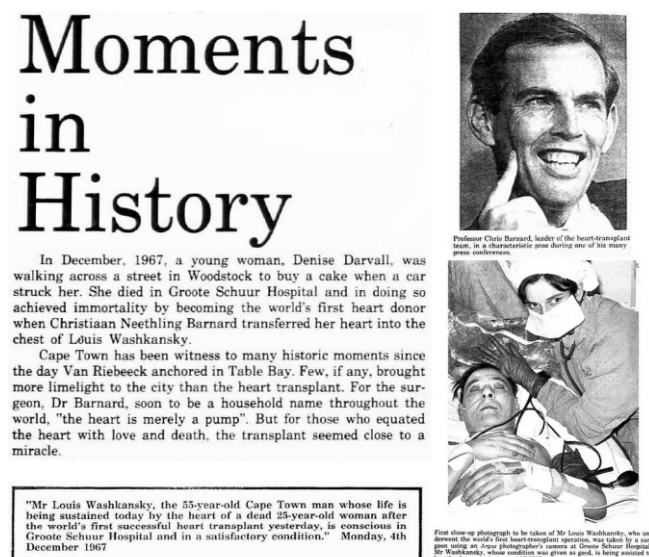


Figura 2.1: Articolo di giornale del 1967 che riporta il successo del primo trapianto di cuore.

L'intervento andò a buon fine anche se il paziente morì pochi giorni dopo a causa di una polmonite legata ad una scarsa attività del sistema immunitario, compromessa dai farmaci immunosoppressori.

In Italia il primo trapianto di cuore risale al 1985 e fu effettuato dal Prof. Vincenzo Maria Gallucci a Padova.

Ad oggi, ricevere un cuore per il trapianto non è affatto semplice; infatti, il cuore viene assegnato ai pazienti in lista di attesa in condizioni più gravi. La scelta viene eseguita quindi seguendo la lista nazionale di urgenze di cuore, gestita dal Centro Nazionale Trapianti, in cui viene assegnata priorità ai pazienti portatori di dispositivi di assistenza meccanica. Per essere eletti come potenziali riceventi di organo bisogna che siano soddisfatti i criteri di compatibilità del gruppo sanguigno e del peso donatore/ricevente.

Il cuore donato deve poter essere prelevato poche ore prima dell'intervento e conservato in condizioni di sterilità e bassa temperatura.

Grazie all'invenzione dell'"Heart in a box" (Figura 2.2) si è riusciti ad estendere la conservazione dell'organo fuori dall'organismo da quattro a dodici ore.



Figura 2.2: Heart in a box. A sinistra il dispositivo come si presenta in sala operatoria, a destra sono descritte le componenti.

Questo dispositivo è un sistema portatile di perfusione e monitoraggio, progettato per mantenere il cuore di un donatore in uno stato metabolicamente attivo, simile a quello umano. Nel momento in cui il cuore da donatore è reso disponibile, allora il ricevente viene messo in anestesia generale e in circolazione extracorporea.

Nel 2019 sono stati 246 gli interventi di trapianto di cuore in Italia, dove la prevalenza di pazienti (44.7%) aveva un'età compresa tra i 41 e i 60 anni con un, mentre il 31.1% dei riceventi aveva un'età media nel range 61-75 anni mostrando un progressivo aumento dell'età dei pazienti candidati al trapianto cardiaco; infine, il 6.9% è dedicato alla classe 0-17 anni e rappresenta la quota più contenuta.

Nel 2020, nonostante le difficoltà legate all'emergenza sanitaria da SARS-CoV-2, il numero di trapianti di cuore, riportato dal Centro Nazionale Trapianti (CNT), è stato di 238, mostrando

solo una lieve diminuzione percentuale (-3.2%), mentre l'anno precedente (2021) si è riscontrato un aumento di trapianti rispetto al periodo precedente alla pandemia con ben 251 interventi.

La scoperta di numerosi farmaci ha consentito la personalizzazione della terapia da applicare in base alle risposte del singolo paziente, in particolare negli ultimi dieci anni si è visto un incrementare delle percentuali di sopravvivenza a cinque anni dal 70% al 88% [3].

Un esempio è l'uso della ciclosporina come medicinale antirigetto grazie al principio attivo che è dotato di azione immunosoppressiva e antinfiammatoria.

I pazienti successivamente all'intervento sono tenuti a svolgere un follow up che prevede inizialmente incontri ogni tre giorni, per poi passare a incontri mensili e infine se dovessero stare bene a tre o quattro volte all'anno. L'obiettivo di questa pratica è tenere monitorata la salute del paziente e controllare possibili effetti collaterali dei farmaci assunti ed eventualmente adeguare la terapia [4].

2.2: SOLUZIONI MECCANICHE PER L'ASSISTENZA AL CIRCOLO COME ALTERNATIVE AL TRAPIANTO DI CUORE

In Italia, e nel mondo, essendovi una evidente disparità tra il numero di donatori di organo e il numero di pazienti che necessitano di trapianto, le liste d'attesa sono ancora troppo lunghe.

C'è dunque la necessità di trovare delle alternative al trapianto d'organo al fine di dare una speranza di sopravvivenza alla popolazione colpita da scompenso cardiaco, garantendo nel contempo una qualità di vita adeguata.

In Italia nel 2021 sono 8.291 le persone che attendono di ricevere un organo, di cui il 7.9% è in lista per un cuore, con tempi d'attesa medi di un anno e un mese [5]. Tali tempistiche possono risultare non compatibili con la vita del paziente, la cui sopravvivenza può essere unicamente garantita da un dispositivo meccanico concepito come *bridge to transplantation* (BTT soluzione di ponte al trapianto). Anche per i pazienti non eleggibili al trapianto, per motivi d'età o di coesistenza di altre patologie che abbasserebbero in modo eccessivo le percentuali di riuscita dell'intervento, si può valutare l'applicazione di dispositivi meccanici anche come soluzioni definitive (DT, *destination therapy*): si tratta di dispositivi di assistenza ventricolare (VAD) e cuori totali artificiali (TAH).

2.2.1: VAD (Ventricular Assist Device)

VAD è l'acronimo di *Ventricular Assist Device* (Figura 2.3) e identifica un dispositivo per l'assistenza ventricolare che spesso viene concepito come *bridge to transplantation* (BTT).

Il VAD è una pompa meccanica che viene collocata in cascata rispetto al ventricolo (soprattutto al sinistro) e che ha il compito di sostenere il cuore nella sua funzione. Esistono dispositivi caratterizzati da meccanismi di attuazione diversi, con diverso ingombro e peso.

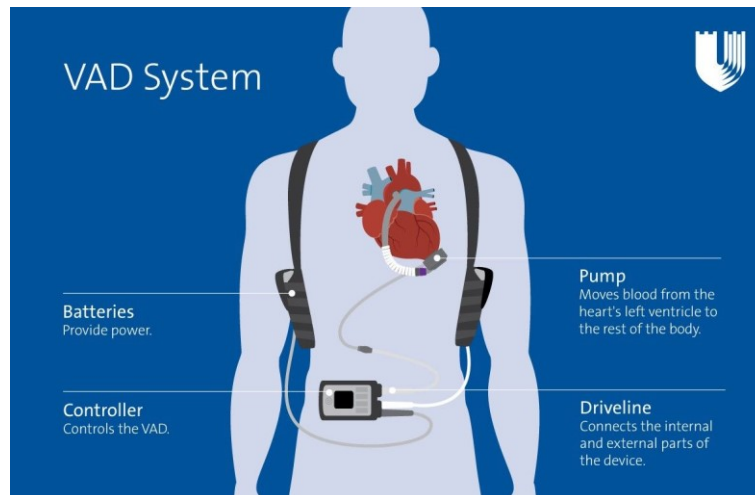


Figura 2.3: VAD Dispositivo di Assistenza Ventricolare.

Una peculiarità di questi dispositivi è che talvolta sono in grado talvolta di far recuperare la funzionalità al ventricolo che stanno supportando. Questa opzione viene definita “bridge to recovery” (BTR) ed è consentita dal dispositivo installato che, diminuendo il lavoro del miocardio, consente un potenziale recupero dell’attività ventricolare.

Per le persone non elegibili al trapianto i VAD possono considerarsi come *destination therapy* (DT).

L’intervento comporta necessariamente una risincronizzazione del battito che viene effettuata tramite pacemaker con il ritmo cardiaco proveniente dal lato destro del cuore.

L’applicazione di ognuno di questi dispositivi comporta l’uso sistematico di anticoagulanti per prevenire fenomeni tromboembolici.

2.2.2: TAH (Total Artificial Heart)

Il cuore totale artificiale (TAH) è un dispositivo meccanico impiantabile nel corpo in grado di sostituire totalmente e replicare le funzionalità di un cuore biologico.

I pazienti sono candidabili all’impianto del TAH se esclusi dall’impianto di un VAD; quindi, il numero di potenziali riceventi è ridotto rispetto a quello dei VAD.

Il cuore totale artificiale è un’opzione per pazienti con scompenso bi-ventricolare e i criteri di inclusione per questa tipologia di intervento sono molteplici [6]:

- appartenenza alla quarta classe del NYHA (*New York Heart Association*);

- età compresa tra i 18 e 59 anni;
- area della superficie corporea (BSA)¹ > 1.7 m²;
- indice cardiaco² < 2.0 L/m² al minuto;
- frazione di eiezione (EF)³ < 20/30 % [7];
- compatibilità anatomica verificata tramite combinazione di modellazione 3D e immagini TAC;

I criteri di esclusione sono:

- resistenza vascolare polmonare⁴ > 640 dyn s/cm⁵;
- creatinina nel siero⁵ > 5 mg/dL;
- cirrosi con bilirubina > 5 mg/dL;
- infezioni sistemiche in corso.

Il TAH può essere utilizzato sia come DT, se il paziente per motivi d'età o per un aggravarsi di patologie co-esistenti non sia in grado di poter ricevere un trapianto di cuore, oppure come BTT se invece le condizioni del paziente permettano l'intervento.

L'operazione di innesto di un TAH è molto complessa: si inizia ponendo il paziente in anestesia totale e in circolazione extra-corporea, si procede con la sternotomia, vengono poi rimossi i ventricoli e i lembi valvolari, mantenendo gli atri per facilitare l'applicazione del dispositivo.

2.3: TAH: STORIA E STATO DELL'ARTE

L'impianto di un cuore totale artificiale è considerato una strategia accettabile come soluzione alla mancata disponibilità di cuori da donatore ed è il risultato di anni di studi e di sperimentazioni prima sul mondo animale e poi sull'uomo.

Il primo trapianto di cuore totale artificiale nell'uomo risale al 1969, venne eseguito dal Dr. Denton Cooley e dal Dr. Domingo Liotta (Figura 2.4), il quale diede il nome poi allo stesso dispositivo, The Liotta Heart. In questo caso lo scopo era di mantenere in vita il paziente (per 64 ore), in attesa di ricevere un cuore biologico. Dopo 32 ore, il paziente iniziò a manifestare

¹ BSA: parametro antropometrico che rappresenta la massa metabolica che esclude i tessuti adiposi.

² Indice cardiaco: parametro emodinamico cardiovascolare che si ottiene dividendo la gittata cardiaca per l'area della superficie corporea (BSA).

³ EF: rapporto tra sangue espulso dal ventricolo durante la sistole e volume di sangue terminata la diastole; questo parametro consente di valutare l'efficacia della funzione di pompa del cuore e quindi della contrattilità miocardica.

⁴ Resistenza vascolare polmonare: è la resistenza al flusso che deve essere superata per spingere il sangue nel sistema circolatorio, in particolare in questo caso si riferisce alla resistenza generata dall'arteria polmonare.

⁵ La creatinina è il prodotto del catabolismo del creatinfosfato, molecola necessaria per la contrazione muscolare.

la presenza di diversi problemi post-operatori come emolisi e un progressivo fallimento della funzione renale per poi morire di sepsi [8].

Il Liotta Heart fu concepito come BTT, mentre il primo utilizzo di TAH come DT risale al 1982; fu progettato dai ricercatori dell'Università dello Utah e permise la sopravvivenza del paziente a 112 giorni [9].

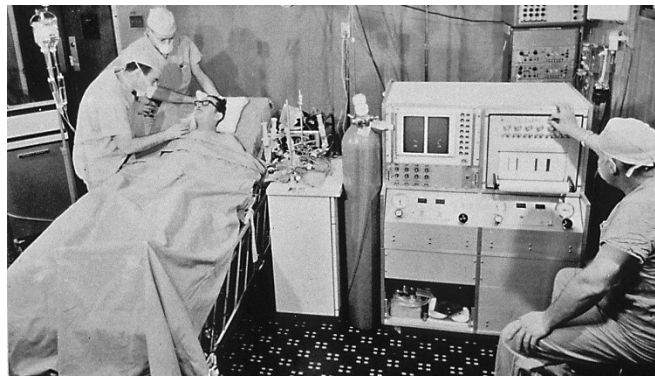


Figura 2.4: Immagine relativa al 1969, anno in cui venne effettuato il primo impianto di TAH su uomo.

Al 2007 invece risale il primo impianto di cuore artificiale in Italia, svolto dal Professor Gino Gerosa all'Ospedale di Padova e durato 13 ore, il dispositivo in questione era il Syncardia (Syncardia, Tucson, Arizona) [10].

Il rapido avanzamento delle conoscenze in ambito medico ed ingegneristico ha permesso di migliorare progressivamente questi dispositivi, rendendoli sempre più affidabili e performanti. Inizialmente i risultati legati all'affidabilità dei cuori totali artificiali non erano rassicuranti, ciò era l'effetto di una limitata conoscenza sui biomateriali e su una non chiara definizione del termine biocompatibilità.

Ad oggi sono solo due i cuori totali artificiali disponibili nel mercato è ristretto, ciò è dovuto a certificazioni di conformità non facili da ottenere.

Le due più importanti certificazioni che un dispositivo deve conseguire sono quelle rilasciate da FDA (*Food and Drug Administration*) per entrare nel mercato americano e da CEN (*European Committee for Standardization*) per il mercato europeo (Figura 2.5).



Figura 2.5: A sinistra è riportato il logo di FDA, mentre a destra il logo CEN.

FDA e CEN definiscono i requisiti standard che le aziende produttrici devono rispettare affinché i propri prodotti possano essere immessi nel mercato.

I cuori totali artificiali approvati FDA e CEN sono l'Abiocor (Abiomed, Danvers, Massachusetts) e il Syncardia, mentre solo per il mercato europeo è disponibile l'Aeson, prodotto di proprietà dell'azienda francese Carmat (Velizy, France).

La prima pompa biventricolare, impiantata con successo e utilizzata come cuore totale artificiale, è stata il Liotta TAH (Figura 2.6) che utilizzava una pompa a diaframma creata in silicone e Dacron. Camere ventricolari, cuffie atriali e condotti di uscita erano rivestiti di Dacron per promuovere la formazione di PNI⁶.



Figura 2.6: Liotta TAH, prototipo del primo cuore totale artificiale impiantato su uomo.

Il Liotta TAH era dotato di quattro valvole protesiche monoleaflets con disco di polietilene nell'anello interno di titanio. L'ampia area dell'orifizio e la bassa incidenza di eventi tromboembolici sono stati i fattori determinati per la scelta di queste valvole.

⁶ Tessuto cicatriziale formato da miofibroblasti, nuovi capillari, collagene e cellule dell'infiammazione.

Una volta espantato, nel cuore artificiale le superfici interne hanno mostrato un layer di fibrina con intrappolate cellule del sangue e una completa assenza di formazioni trombotiche. È stata però riscontrata un'emolisi precoce come causa delle prestazioni insoddisfacenti delle valvole cardiache e della rugosità del Dacron come rivestimento per le superfici a contatto con il sangue. Il primo cuore totale inserito su un essere vivente è stato Akutsu Modello III (Figura 2.7) nel 1964; l'impianto venne eseguito su un cane dallo stesso Akutsu che diede poi il nome al TAH.

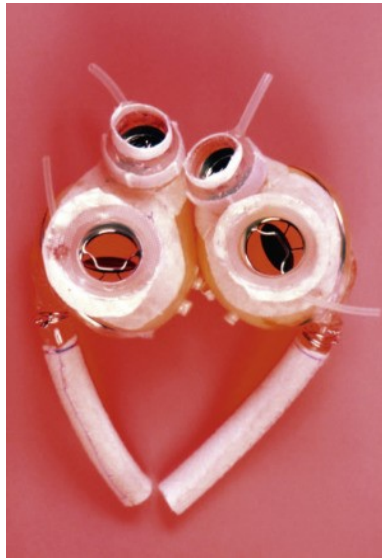


Figura 2.7: Akutsu Modello III.

Il primo prototipo non ebbe successo a causa dei fenomeni trombotici dovuti dalle cuciture a contatto con il sangue, così nel 1977 venne realizzato un nuovo dispositivo caratterizzato da una membrana che escludesse la presenza di discontinuità; il materiale scelto per questo scopo fu l'Avcothane 51, ovvero un polietere uretano con proprietà elastomeriche in grado di assicurare una buona compatibilità con il sangue. Solo nel 1981 venne impiantato nell'uomo questo modello di cuore artificiale concepito come BTT.

L'Akutsu III combinava due pompe pneumatiche, quattro valvole monodisco con il disco in carbonio pirolitico, mentre silicone e velluto erano utilizzati rispettivamente per i connettori e le cuffie atriali. Gli innesti vascolari erano realizzati in Dacron poroso trattato con plasma autologo e la comunicazione del dispositivo con l'esterno avveniva attraverso tubi percutanei. La fonte di energia primaria era data dall'alimentazione standard, mentre il pacco batterie era riservato a situazioni d'emergenza.

Il primo TAH completamente approvato ad uso clinico fu il Syncardia (Figura 2.8) dell'azienda CardioWest Technologies (Tucson, Arizona). I progetti relativi a tale cuore totale artificiale ricalcavano molto quelli realizzati per i diversi modelli di un ulteriore TAH: il Jarvik. Infatti,

CardioWest nei primi anni del 1990 acquistò i diritti e le tecnologie di Symbion Inc (proprietaria dei modelli Jarvik).

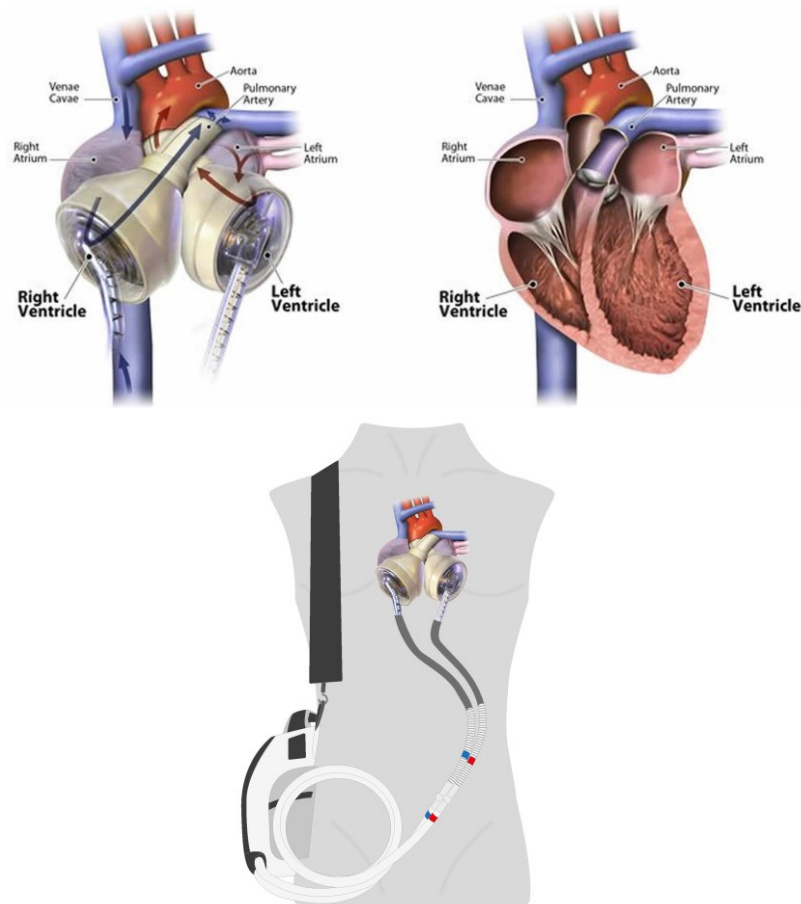


Figura 2.8: In alto è illustrato il confronto tra TAH e cuore biologico, in basso una simulazione dell'impianto su uomo.

Con il passaggio di proprietà e l'acquisizione dell'azienda, CardioWest rinominò l'ultimo modello sviluppato in precedenza, passando così dal Jarvik 7 al Syncradia. Il TAH ricevette l'approvazione FDA nel 2004 e CE nel 2006 come BTT, nel 2012 venne certificato anche come DT.

Un grande vantaggio di questo dispositivo è che si presenta in due versioni, 50 cc e 70 cc, estendendo così la possibilità di impianto anche agli adolescenti e alle donne.

Questo dispositivo è composto da camere ventricolari in poliuretano segmentato liscio, cuffie atriali e connettore rapido in policarbonato, innesti vascolari in Dacron e valvole ventricolari monodisco in carbonio pirolitico marchate Medtronic-Hall.

Le fasi di sistole e diastole sono indipendenti, il flusso è pulsatile e viene azionato in modo pneumatico.

Nonostante l'uso di anticoagulanti, uno studio ha considerato un follow-up superiore ad un anno mostrando la presenza di eventi tromboembolici nel 19% dei pazienti [11].

AbioCor TAH (Figura 2.9), prodotto nel 1988 da Abiomed, è la prima pompa meccanica pensata e sviluppata specificatamente per eliminare i rischi di infezioni causati dai cavi percutanei presenti per l'alimentazione elettrica del dispositivo. Grazie al trasferimento di energia transcutaneo (TET) il dispositivo può essere inserito completamente all'interno dell'organismo ed è caratterizzato da quattro camere ventricolari, quattro valvole con tre dischi (three leaflets) in polietere uretano (Angioflex) con un meccanismo di attuazione centrifuga.



Figura 2.9: Abiocor TAH.

Abiocor presenta un elevato peso che ne limita l'applicabilità e un'efficienza di trasmissione energetica molto bassa (circa del 30%), con conseguente surriscaldamento delle batterie e potenziale rischio di ustione per il paziente.

Solo nel 2006 Abiocor TAH ha ricevuto l'approvazione FDA come DT.

Il dispositivo più recente, che però ad oggi ha ricevuto esclusivamente la certificazione CE, è Aeson (Figura 2.10) dell'Azienda francese CARMAT e rappresenta il primo tentativo di incorporare all'interno di un TAH una membrana ibrida.

La membrana ibrida è un fattore determinante per incrementare l'emocompatibilità del dispositivo, consentendo una terapia anticoagulante ridotta grazie alla diminuzione di eventi tromboembolici [12,13]. Le membrane vengono chiamate ibride perché ottenute attraverso l'accoppiamento di due materiali distinti, uno biologico (pericardio bovino trattato con glutaraldeide) per fornire proprietà di compatibilità con il sangue, e un secondo materiale polimerico classificato come (policarbonato uretano) per conferire caratteristiche meccaniche adatte al funzionamento delle camere ventricolari. Il dispositivo ha un'attuazione

elettroidraulica che garantisce un flusso pulsatile con fase di sistole e diastole alternate tra le due camere ventricolari; il flusso unidirezionale è assicurato dalla presenza di quattro valvole biologiche [14].

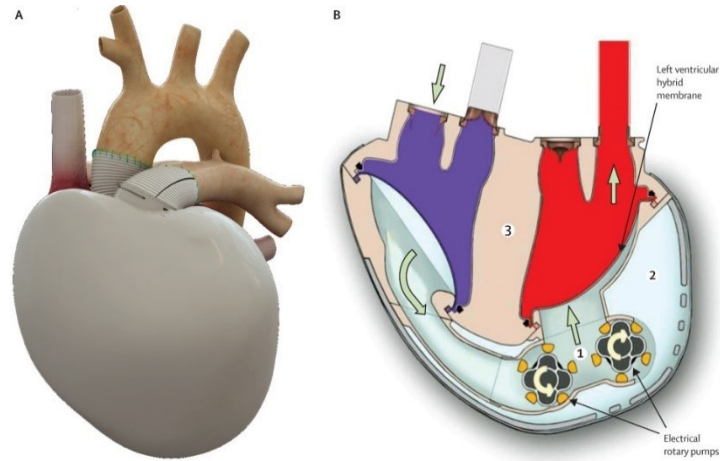


Figura 2.10: Aeson visto esternamente nell'immagine a sinistra e internamente a destra.

Attualmente l'azienda francese sta cercando di procedere con la fase di ricerca e sperimentazione affinché il TAH riesca a ricevere anche la certificazione FDA.

CAPITOLO 3: REQUISITI FONDAMENTALI PER LA REALIZZAZIONE DI UN TAH E PROGETTO PADOVANO

“The heart is merely a pump” è la frase che amava pronunciare il Dottor Barnard, al quale si deve ciò che all’epoca poteva considerarsi un miracolo: il primo trapianto di cuore.

A livello funzionale in effetti il cuore può essere approssimato ad una pompa che consente al sangue di giungere in tutti i tessuti. Quando il cuore nativo non svolge più correttamente la sua funzione, si rende necessario il trapianto d’organo: le alternative al trapianto d’organo sono limitate agli attuali dispositivi di assistenza al circolo, in particolare ai cuori totali artificiali.

In generale il TAH non può essere visto semplicemente come una pompa, ma come un dispositivo che combina diverse tecnologie per emulare il funzionamento di un cuore nativo.

Le componenti fondamentali di un TAH sono:

- fonte di energia: si tratta di energia elettrica o meccanica; in passato si cercò di utilizzare come fonte energetica anche l’energia nucleare, ma per motivi legati principalmente alla dispersione di calore e alla radioattività l’idea non si concretizzò;
- sistema di conversione dell’energia: sistema in grado di convertire l’energia proveniente dalla sorgente in lavoro utile per lo svolgimento delle fasi di sistole e diastole. Il sistema può essere elettromagnetico, elettroidraulico o pneumatico;
- attuatore: elemento fondamentale, collegato al sistema di conversione, consente di comprimere e rilasciare ciclicamente le camere ventricolari;
- parti a contatto con il sangue: le componenti del TAH a diretto contatto con il sangue sono: le camere ventricolari, le valvole cardiache protesiche, gli innesti vascolari, le cuffie atriali. L’emocompatibilità è una caratteristica fondamentale per tutte queste componenti;
- sistema di controllo: deve svolgere un controllo dei parametri vitali del paziente ed adattare il funzionamento del TAH alle necessità del paziente.

3.1: SPECIFICHE DI PROGETTO PER UN TAH

Le specifiche da valutare in fase di progettazione per un dispositivo di questa complessità sono numerose e legate a diversi aspetti e vincoli.

Il primo vincolo è quello dimensionale: il volume a disposizione per impiantare un dispositivo nel torace di un paziente è all’incirca pari a quello di un parallelepipedo lungo 8.5 cm lungo l’asse sagittale, 12 cm lungo l’asse trasversale e 10 cm per l’asse longitudinale (Figura 3.1). In realtà, si tende a contenere quanto più possibile le dimensioni del TAH per consentirne l’innesto anche in pazienti di piccola corporatura.

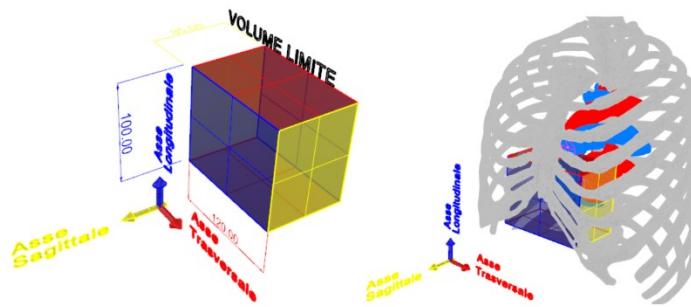


Figura 3.1: Stima approssimata dell'ingombro di un TAH.

Il peso è un altro vincolo fondamentale: l'obiettivo è di rimanere al di sotto del chilogrammo per l'intero dispositivo.

Il TAH deve garantire una portata pari a quella fisiologica, quindi circa 6-8 L/min; nel caso di flusso pulsatile si può prevedere un numero di battiti al minuto all'interno del range 80-120. In diversi modelli di TAH del passato, ad esempio nel Syncardia, la frequenza del battito non era regolabile, ma veniva fissata a priori; oggi invece si pensa ad un dispositivo che permetta la regolazione automatica dei battiti cardiaci al minuto attraverso algoritmi di controllo in grado di stimare le richieste metaboliche del paziente sulla base del monitoraggio di alcuni parametri fisiologici.

Un altro aspetto da considerare è l'impiantabilità, totale o parziale: essa non solo determina la struttura e il numero di componenti del TAH, ma anche la facilità/difficoltà di applicazione in sede chirurgica.

Il dispositivo deve essere utilizzato sia come DT che come BTT: peraltro, le due diverse destinazioni comportano verifiche a diversi livelli per l'approvazione al commercio.

Affinché l'impianto di TAH non provochi una risposta avversa, il dispositivo deve mostrare un'ottima biocompatibilità e in particolare elevata emocompatibilità; perciò, la scelta e il trattamento dei materiali da utilizzare devono essere molto accurati. Si può ad esempio fare ricorso a materiali ibridi, ottenuti accoppiando materiali polimerici a materiali biologici, al fine di incrementare l'emocompatibilità delle superfici del TAH a diretto contatto con il sangue: questa è una soluzione che diverse aziende stanno seguendo. Dal punto di vista clinico, l'aumento dell'emocompatibilità permette di contenere (sperabilmente di evitare del tutto) la terapia anticoagulante che, se non correttamente calibrata, può portare a sanguinamenti nel tratto gastrointestinale o problemi renali.

L'emocompatibilità di un TAH non è però solo legata alla composizione e alle caratteristiche delle superfici a diretto contatto con il sangue: dipende anche dalla configurazione delle camere ventricolari e, conseguentemente, dalla emodinamica: fenomeni di turbolenza e di ristagno di

sangue possono influire in modo sostanziale sulla complessiva emocompatibilità del dispositivo.

Il corretto funzionamento del TAH richiede un opportuno sistema di automazione estremamente affidabile per evitare problemi di malfunzionamento del software [13].

Il progetto di un TAH deve considerare la durabilità di tutte le componenti: l'obiettivo è che il dispositivo garantisca resistenza a fenomeni di fatica meccanica e di degradazione dei materiali per almeno 5 anni. Deve pertanto essere valutata la presenza di un numero minimo di componenti meccanici in contatto reciproco per ridurre i fenomeni di attrito e il rischio di malfunzionamenti del dispositivo.

Alla base del progetto di un TAH deve esserci un'idea innovativa e originale che consenta di brevettare il dispositivo. D'altra parte, è necessario essere consapevoli già in fase di progetto dei requisiti funzionali imposti dalle normative FDA e ISO per acquisire, quando sarà possibile, le autorizzazioni al commercio.

Infine, il costo complessivo del TAH è un fattore cruciale per poter competere con i prodotti già presenti in commercio.

3.2: IL PROGETTO PADOVANO

Il progetto padovano si pone l'obiettivo di realizzare un TAH innovativo, che prende il nome di HEART-UP, con caratteristiche migliori rispetto ai dispositivi già presenti nel mercato mondiale. Questo progetto, almeno per la parte relativa allo sviluppo dei materiali con i quali realizzare le camere ventricolari, è stato inserito nel programma L.I.F.E.L.A.B. (Living Innovative Fully Engineered Long Lasting Advanced Bioreplacements), finanziato dal consorzio CORIS (Consorzio per la ricerca sanitaria) per promuovere e sostenere la ricerca scientifica in ambito sanitario (Figura 3.2). In particolare, il progetto L.I.F.E.L.A.B. mira a sviluppare nuove soluzioni terapeutiche per il trattamento dell'insufficienza di tessuti e organi, attraverso la collaborazione di diversi gruppi all'interno dell'Università e dell'Azienda Ospedaliera di Padova che si occupano di Medicina Rigenerativa [14]. Lo scopo di L.I.F.E.L.A.B. è di sviluppare nuovi strumenti per il trattamento di malattie allo stadio terminale, rigenerando interi organi e ricostruendo tessuti.

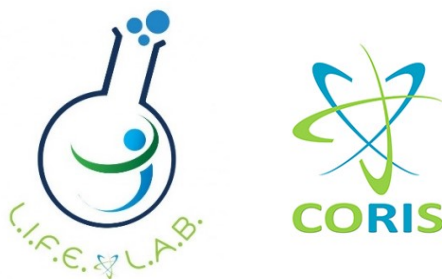


Figura 3.2: A sinistra il logo del programma L.I.F.E.L.A.B., a destra il logo del consorzio CORIS finanziatore del progetto.

Sino ad oggi, grazie ad una prima fase di ricerca, il progetto padovano ha dato alla luce alcuni prototipi di TAH, tutti ispirati a requisiti comuni che discendono dalle specifiche di progetto.

Nel dettaglio il TAH:

- deve presentare un peso contenuto al di sotto del chilogrammo e un ingombro volumetrico tale da renderlo impiantabile nel più ampio numero di un numero di pazienti, anche donne e adolescenti;
- deve fornire una portata media di 8 L/min (minima 6 L/min) lavorando con pressioni fisiologiche ad una frequenza di battito non superiore ai 70/80 bpm;
- deve essere azionato da un attuatore di tipo elettromagnetico per permettere la contrazione sincrona delle camere ventricolari destra e sinistra;
- deve possedere elevata emocompatibilità, assicurata dall'impiego di materiali ibridi.

L'idea di utilizzare membrane ibride per incrementare la compatibilità con il sangue del dispositivo non è nuova; infatti, il Carmat (vedi Capitolo 2) presenta camere ventricolari nelle quali sono presenti membrane flessibili ottenute accoppiando materiale polimerico e pericardio bovino trattato con glutaraldeide. La glutaraldeide viene utilizzata perché riduce notevolmente l'immunogenicità, limita la risposta avversa da parte dell'organismo ricevente e infine consente di stabilizzare il tessuto. D'altra parte, l'utilizzo della glutaraldeide può essere causa di effetti citotossici e di calcificazione del materiale biologico [15]: ciò limita la durabilità del dispositivo.

Uno degli aspetti maggiormente innovativi del progetto padovano è proprio legato al fatto che il tessuto biologico (pericardio bovino o porcino) con il quale si intende realizzare la superficie di contatto con il sangue, non viene trattato con glutaraldeide, ma viene decellularizzato. La decellularizzazione con procedura TriCol ha il vantaggio di evitare l'uso di glutaraldeide, di eliminare dal tessuto in modo efficace le componenti cellulari e nucleari riducendone il potenziale immunogenico e rendendolo pronò alla ricellularizzazione in vivo.

In Figura 3.3 si vede l'ultimo prototipo sviluppato da Nicolò Fabio Perra nel suo lavoro di tesi presso il Dipartimento di Ingegneria Industriale dell'Università degli Studi di Padova [16]. Una volta realizzato il TAH, è stato portato a banco per svolgere alcune prove preliminari, in particolare per eseguire le seguenti verifiche: prove idrauliche di tenuta dei raccordi, prove di funzionalità del sistema, misura del picco di forza necessario per la contrazione ventricolare, misure di portata in condizioni simil-fisiologiche (Figura 3.4).

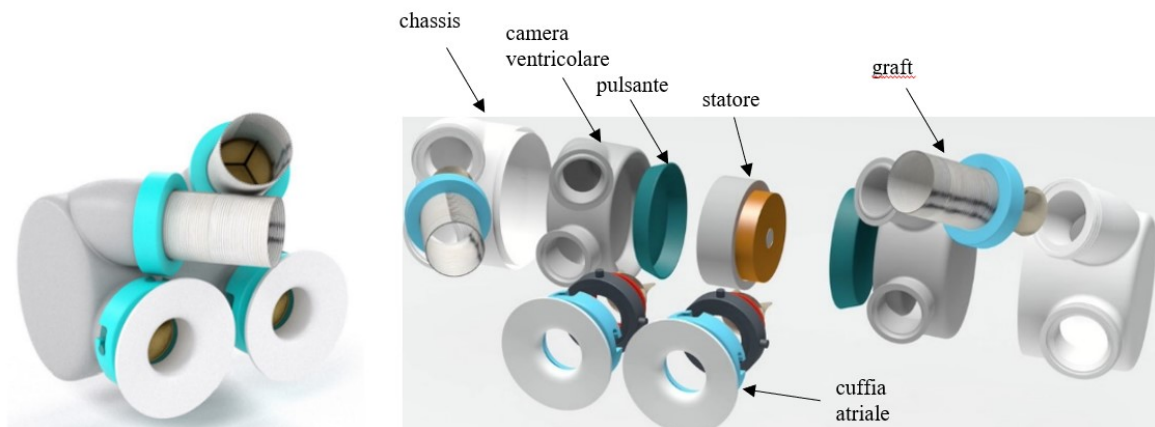


Figura 3.3: Vista di insieme ed esplosa del prototipo di HEART-UP sviluppato presso il Dipartimento di Ingegneria Industriale.

Le prove sperimentali hanno evidenziato un importante traguardo: il dispositivo riesce a trasferire un volume di fluido dal serbatoio di aspirazione a quello di mandata, vincendo una contropressione pari a 100 mmHg.



Figura 3.4: Setup per la prova idraulica.

Le prove a banco hanno rivelato la necessità di apportare diverse variazioni al progetto che sono ad oggi in fase di implementazione: esse riguardano principalmente la configurazione delle camere ventricolari e le connessioni al circuito idraulico.

CAPITOLO 4: MATERIALI E METODI

4.1: MATERIALI E APPARECCHIATURE UTILIZZATE PER LA REALIZZAZIONE DI MEMBRANE IBRIDE

4.1.1: ChronoFlex® AR e ARLT (CF AR e CF ARLT)

Il ChronoFlex® (CF) è un polimero di origine sintetica, prodotto da AdvanceSource Biomaterials (Wilmington, Massachusetts, USA): in particolare si tratta di policarbonato uretano aromatico (PCU) che viene utilizzato per la realizzazione delle membrane ibride in virtù della sua dichiarata emocompatibilità.

In generale, i PCU hanno un comportamento elastomerico e vengono ampiamente utilizzati per la loro biostabilità, per le ottime proprietà meccaniche e per un'elevata biocompatibilità.

La biocompatibilità per un materiale sintetico è un requisito fondamentale se l'uso previsto è in ambito biomedicale; numerosi studi sono stati condotti sul ChronoFlex® per comprendere se l'applicazione interna all'organismo di questo biomateriale fosse potenzialmente pericolosa per il paziente. I risultati ottenuti attraverso test *in vitro* e *in vivo* da diversi gruppi di ricerca sono rassicuranti: le analisi SEM e FTIR-ATR hanno mostrato, su campioni estratti da animali con un follow-up di 6 mesi, una totale assenza di microfessurazioni sulla superficie del polimero, accompagnata da un'immutata composizione chimica dello stesso [17].

Altri test sono stati svolti per studiare la generazione di fenomeni trombogenici dovuti all'adesione piastrinica (e di altre componenti del sangue) e il potenziale emolitico, entrambi fenomeni causati dal diretto contatto del sangue con il biomateriale. L'esito di questi test ha permesso di evincere che il ChronoFlex® presenta caratteristiche di biocompatibilità ed emocompatibilità eccellenti, risultando il biomateriale meno trombogenico testato che provoca un'adesione piastrinica simile a quella che si genera sulla superficie interna sana di un'arteria; tuttavia, il fenomeno dell'emolisi si genera seppur in modo limitato rispetto a tutti i biomateriali provati [18].

In uso clinico i PCU come il ChronoFlex® vengono impiegati per la creazione di scaffold nelle tecniche di ingegneria tissutale, grazie all'intrinseca capacità di essere funzionalizzati con biomolecole, generando la colonizzazione sulla superficie del biomateriale.

Il ChronoFlex®, nella realizzazione delle camere ventricolari, fornisce un adeguato supporto strutturale al tessuto biologico con cui è accoppiato, migliorando le proprietà meccaniche del prodotto finale.

Il polimero viene fornito in soluzione al 22% in dimetilacetammide (DMAc); grazie alla relativamente elevata temperatura di ebollizione del solvente, è possibile evitare fenomeni di bubbling e di skinning, rispettivamente legati alla formazione di bolle e di microfratture superficiali.

In linea di principio, la DMAc può essere rimossa facendola evaporare tra 40° C e 110° C; data però la necessità di non causare danni ai tessuti biologici per effetto della degradazione o denaturazione delle componenti proteiche, si è scelto di non superare i 40°C [17].

Il ChronoFlex® è disponibile in commercio in due formulazioni, ChronoFlex® AR e ChronoFlex® ARLT (CF AR e CF ARLT), che differiscono per la presenza nella seconda di microparticelle di silice (9%) che conferiscono al materiale una bassa adesività, giustificando l'acronimo LT (Low Tack). L'aggiunta di microparticelle di silice riduce la permeabilità del polimero al passaggio di molecole di piccole dimensioni; inoltre, la silice diminuisce la bagnabilità grazie alla creazione di una superficie idrofobica, che favorisce la lavabilità del materiale anche a contatto con il sangue, diminuendo la probabilità di eventi trombotici [19].

Sono state prodotte membrane dei due polimeri per studiarne in particolare il comportamento a fatica. Le membrane sono ottenute attraverso la tecnica di *solution casting* [17], che permette di controllare lo spessore della membrana in modo dipendente dalla quantità di polimero utilizzato. Il polimero colato su frame metallici, polimerizzando, non genera direzioni preferenziali e mantiene il carattere isotropo (Figura 4.1).

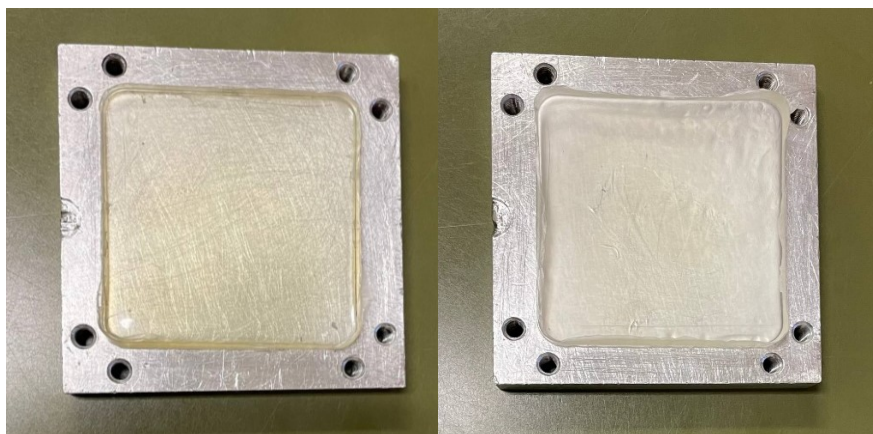


Figura 4.1: Membrane di ChronoFlex®: a sinistra CFAR, a destra CFARLT.

Lo spessore desiderato delle membrane esclusivamente polimeriche è di circa 1 millimetro ed è ottenuto colando nei frame metallici 15 ml di ChronoFlex® [20]: ciò nonostante non tutte le membrane ottenute mostrano uno spessore del tutto uniforme a causa di inevitabili disomogeneità nel processo di colata.

Dopo la fase di colata sui frame metallici, si pongono le membrane all'interno del forno da laboratorio Raypa Vacuum drying oven EV-50 per circa 24 ore, tempo necessario affinché il solvente evapori ad una temperatura di circa 80° C e pressione pari a -0.8 bar.

Una volta estratte dal forno, le membrane vengono tagliate, con un opportuno strumento, ad “osso di cane” ottenendo i campioni di materiale per la successiva caratterizzazione meccanica (Figura 4.2).

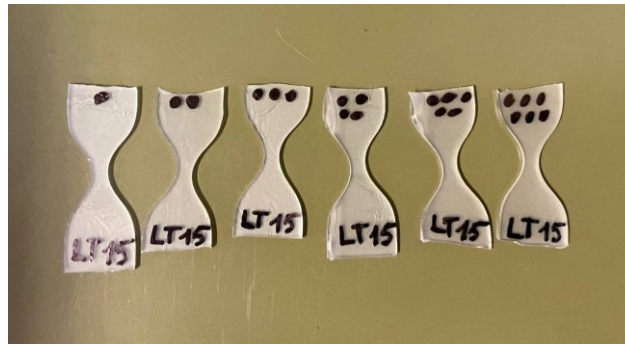


Figura 4.2: Provini di ChronoFlex® ARLT a forma di “osso di cane”.

4.1.2: Pericardio bovino e porcino nativo

I pericardi nativi, di origine bovina e porcina, rispettivamente rappresentati dagli acronimi NBP e NPP, sono necessari per la realizzazione delle membrane ibride. Per lo studio svolto in questa tesi si è voluto caratterizzare in termini meccanici i due tessuti: di conseguenza alcune membrane pericardiche sono state testate ancor prima di essere decellularizzate.

Il pericardio viene fornito grazie ad accordi con due macelli locali (scrivere quali macelli), che forniscono parte del cuore dell'animale; in laboratorio si procede poi con l'identificazione e l'estrazione del pericardio. Al fine di riconoscere una determinata orientazione delle fibre di collagene, che controllano le proprietà meccaniche, è necessario avere particolare cura nella selezione della regione di pericardio d'interesse. Per il bovino si considera il pericardio corrispondente al ventricolo sinistro anteriore, mentre per il suino la regione relativa al ventricolo anteriore destro.

Una volta prelevato il pericardio, bisogna procedere con la fase di pulitura e quindi di rimozione del grasso e delle impurità dalla superficie.

Il pericardio, poi, viene consegnato in soluzione con antimicotici e antibiotici e portato nel laboratorio del Dipartimento di Ingegneria Industriale (DII) per poterne ricavare i campioni da testare. I lembi di pericardio risultano caratterizzati da direzioni preferenziali delle fibre collageniche; di conseguenza è necessario riconoscerne l'orientazione per procedere con la fase di taglio dei campioni (Figura 4.3).

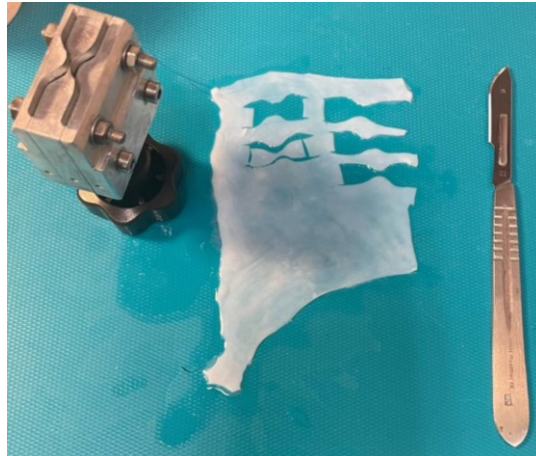


Figura 4.3: Pericardio bovino nativo durante la fase di taglio dei campioni ad “osso di cane”.

4.1.3: Pericardio bovino, porcino decellularizzato e metodo di decellularizzazione

Il pericardio bovino decellularizzato (DBP) e il pericardio porcino decellularizzato (DPP) sono indispensabili per la produzione delle membrane ibride, quindi parte del pericardio nativo, viene destinato alla procedura di decellularizzazione. Tuttavia, alcuni campioni di pericardio nativo vengono utilizzati per prove meccaniche affinché si possa valutarne il comportamento meccanico.

L’obiettivo della decellularizzazione è di rimuovere tutte le componenti cellulari e nucleari per prevenire reazioni immunitarie e infiammatorie, riducendo al minimo gli effetti negativi che potrebbero riflettersi sulla composizione, sull’attività biologica e sulla continuità delle proprietà meccaniche della matrice extracellulare (ECM) rimanente.

Fino a qualche anno fa la procedura di decellularizzazione veniva chiamata TRICOL perché combinava l’uso del detergente Triton X-100 al sodio colato; l’abolizione nel 2012 dell’uso del Triton X-100 come detergente, da parte dell’agenzia europea per le sostanze chimiche (ECHA), ha generato la necessità di trovare una nuova procedura con le medesime caratteristiche.

Ora la nuova tecnica di decellularizzazione si chiama TERGICOL perché alterna detergenti non ionici a detergenti ionici, rispettivamente Tergitol e sodio colato.

Il processo TERGICOL combina metodi fisici, enzimatici, chimici e meccanici. Questo metodo si avvale dell’uso di inibitori di proteasi per prevenire fenomeni di danneggiamento dell’ECM, di DMSO⁷ per facilitare la penetrazione cellulare delle soluzioni ipertoniche e ipotoniche, permettendo la lisi cellulare per shock osmotico. In questa procedura vengono impiegati dapprima il Tergitol e successivamente il sodio colato.

⁷ DMSO: dimetilsolfossido, è un composto organico appartenente alla categoria dei solfossidi.

Il Tergitol, essendo un detergente non ionico, interrompe le interazioni tra DNA e proteine, lipidi e proteine e tra lipidi e lipidi; i detergenti ionici quali il sodio colato servono per solubilizzare le membrane cellulari e nucleari, inducendo la denaturazione delle proteine. Infine, l'utilizzo di specifici solventi è necessario per lisare le cellule per disidratazione e rimuovere i lipidi.

Dopo la decellularizzazione, si procede con un trattamento enzimatico, tramite Benzonase™, fondamentale per scindere le sequenze degli acidi nucleici e rimuovere i nucleotidi dopo la lisi cellulare.

Ci sono tre condizioni che determinano se il processo di decellularizzazione sia avvenuto efficacemente [21]:

- il quantitativo di dsDNA⁸, per peso di ECM disidratata, deve essere minore di 50 ng/mg;
- la lunghezza dei frammenti di DNA deve essere minore di 200 bp (paia di basi);
- l'analisi istologica deve dare evidenza dell'assenza di nuclei cellulari visibili nei tessuti trattati.

Terminato il trattamento enzimatico è consigliata una fase di sterilizzazione per evitare la crescita di batteri e/o funghi e garantire un'opportuna conservazione del tessuto biologico.

La sterilizzazione viene svolta utilizzando soluzioni in cui sono presenti antibiotici e antimicotici, per ridurre il rischio di contaminazioni microbiche, e acido peracetico utilizzato come agente disinfettante oltre che per rimuovere gli acidi nucleici residui.

Una volta terminato il protocollo di decellularizzazione, con l'ausilio di una fustella e del bisturi si passa alla fase di taglio per realizzare i campioni che verranno utilizzati per i test meccanici (Figura 4.4).

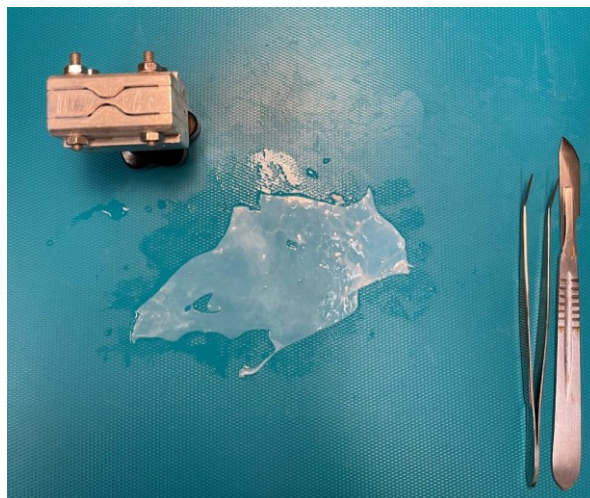


Figura 4.4: Pericardio porcino decellularizzato.

⁸ dsDNA: double stranded DNA, cioè DNA a doppio filamento.

4.1.4: Membrane ibride

Per materiali ibridi si intendono sistemi creati da componenti di almeno due classi distinte di molecole: questa combinazione sinergica di due o più tipologie di materiali è in grado di produrre nuovi materiali con proprietà innovative [22].

La realizzazione delle camere ventricolari è fortemente legata alla ricerca di materiali ibridi con un elevato grado di emocompatibilità, per evitare reazioni avverse, quali emolisi, infiammazione e trombosi, e che resistano a deformazioni cicliche continue.



Figura 4.5: esempio di membrane ibride ottenute accoppiando pericardio bovino decellularizzato e ChronoFlex®. A sinistra è presente CFAR mentre a destra il CFARLT.

Il ruolo di queste membrane ibride è quello di resistere a fenomeni di fatica generati dall'alternanza delle fasi di sistole e diastole. Fissando 80 battiti al minuto, il cuore svolge il ciclo cardiaco per 115200 volte in un giorno, evidenziando la necessità di considerare materiali che, oltre a fornire un'adeguata emocompatibilità, garantiscano ottime proprietà meccaniche e di resistenza alla fatica.

In tal senso le membrane ibride prevedono l'utilizzo di un policarbonato uretano che conferisce supporto strutturale, e del pericardio decellularizzato che incrementa la biocompatibilità e l'emocompatibilità utili al contenimento della terapia anticoagulante da somministrare al paziente.

La realizzazione di membrane ibride (Hybrid Membrane, HYME) è stata ottenuta accoppiando ChronoFlex®, in entrambe le formulazioni, e pericardio decellularizzato, bovino e porcino.

Sono state così create quattro tipologie di membrane ibride:

- CF AR e DPP;
- CF ARLT e DPP;
- CF AR e DBP;
- CF ARLT e DBP.

Ogni membrana è ottenuta ponendo sul frame metallico, a diretto contatto con la superficie, il pericardio sieroso, rendendo disponibile la parte fibrosa ad accogliere la colata di polimero.

Terminata la fase di assemblaggio delle singole componenti, si portano i frame metallici all'interno del forno, dove dovranno stare per circa 30 ore a 39°C e ad una pressione di -0.2 bar.

La temperatura del forno è cautelativa e non supera i 39°C perché le proteine contenute all'interno del pericardio potrebbero denaturarsi, riducendone le proprietà meccaniche.

Infine, analogamente alle membrane precedenti, tramite la fustella e il bisturi si ottengono i campioni per la caratterizzazione meccanica del materiale (Figura 4.6).

I campioni saranno ottenuti tagliando la membrana lungo le direzioni preferenziali di cui è caratterizzato il pericardio, in modo da testare i provini lungo la direzione di maggiore resistenza.

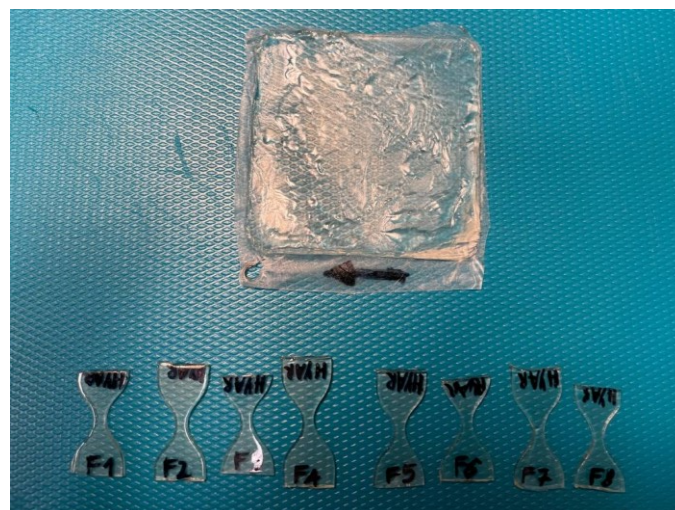


Figura 4.6: Provini di HYME. La freccia indica la direzione delle fibre di collagene nel pericardio.

4.1.5: Forno Vacuum Drying Oven

Il forno da laboratorio utilizzato per la creazione delle diverse tipologie di membrane è il Raypa Vacuum drying oven EV-50 (RAYPA R. Espinar S. L., Barcellona, Spagna). I parametri da selezionare, tramite un display posto frontalmente, sono temperatura, pressione e possibilità di impostare un timer (Figura 4.7). Il range di temperatura è 35-200°C, mentre per la pressione può variare da 0 a -1 bar, con la possibilità di creare il vuoto grazie all'utilizzo di una pompa esterna connessa in uscita al forno.



Figura 4.7: Forno Vacuum Drying Oven.

4.1.6: TRAMA

TRAMA (TRAction MACHine) è il sistema utilizzato, all'interno del laboratorio di Bioingegneria Chimica, per caratterizzare meccanicamente i biomateriali (Figura 4.8).

Il sistema è composto da quattro attuatori lineari posti ortogonalmente per consentire prove di trazione uniassiali e biassiali con una velocità massima di 50 mm/s.

Gli attuatori sono connessi, nella parte iniziale, a delle celle di carico da 50 N e a dei motori che consentono uno spostamento massimo complessivo, lungo una direzione, di 70 mm. All'estremità degli attuatori sono collegati dei bracci di ancoraggio sul cui apice è presente una base di aggrappaggio dove verranno posizionati i campioni.

Le celle di carico sono in grado di misurare la forza applicata al campione durante la deformazione imposta dal movimento degli attuatori. Alla base di ogni attuatore è posto un sensore mobile di fine corsa (segnale di HOME), utile a far terminare il movimento della slitta al riconoscimento del segnale di stop, al fine di evitare lo scontro tra i carrelli.

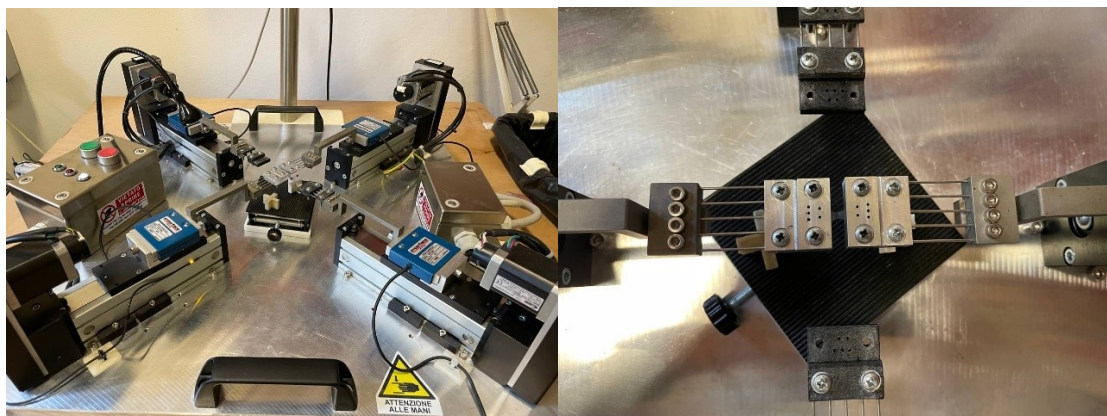


Figura 4.8: Sistema TRAMA: a sinistra la vista totale, a destra il dettaglio degli aggrappaggi.

Il sistema di campionamento dei segnali arriva fino a 1000 Hz, consentendo un'elevata precisione nell'acquisizione di dati. TRAMA è inoltre equipaggiato con un sensore di temperatura e con una videocamera che permette, oltre alla visualizzazione in diretta della prova, anche di memorizzare filmati con un limite massimo di 150 fps.

Il settaggio di tutti i parametri è consentito grazie al software LabVIEW installato nel computer e che gestisce direttamente il sistema meccanico.

TRAMA permette di eseguire prove di trazione mono- e biassiali con lo scopo di misurare tensione e deformazione a rottura (UTS e FS) e di comprendere il comportamento a fatica di un materiale per un numero fissato di cicli.

Il software consente di impostare i parametri delle prove e memorizzarli in procedure che possono essere richiamate di volta in volta definendo: entità e velocità della deformazione, numero di cicli o durata della prova.

Di norma, dopo aver montato il campione tra gli aggrappaggi, viene eseguita una fase di pretensionamento allo scopo di mantenere ciascun campione in una configurazione orizzontale. Al termine della prova, TRAMA fornisce un file .csv che presenta i dati registrati dal sistema di acquisizione in colonne: in particolare la tabella generata avrà 15 colonne che identificano le variabili analizzate e un numero di righe che evidentemente dipende dalla durata della prova e dalla frequenza di acquisizione dei dati.

4.1.7: *MatLab®*

Il software utilizzato per l'analisi dei dati è *MatLab®* (Mathworks, Natick, MA, USA).

Il file prodotto da TRAMA viene importato in formato .csv nell'ambiente di lavoro *MatLab®* e successivamente elaborato per ottenere i parametri desiderati e utili per lo scopo di questo lavoro. Per la prova di rilassamento delle tensioni è stato impiegato il ToolBox di *MatLab®* *cftool*, che permette la creazione di curve e la stima di parametri partendo da dei vettori come dati di input.

4.1.8: *Altra strumentazione*

Per misurare lo spessore dei campioni è stato adoperato lo spessimetro Quick ABSOLUTE Digmatic Serie 547 (Mitutoyo Italiana Srl, Milano, Italia) che ha una risoluzione di 0.001 mm (Figura 4.9). Per la misurazione dello spessore di provini di origine biologica è stato necessario l'utilizzo di vetrini per evitare lo schiacciamento del pericardio; il valore finale è stato poi ricavato sottraendo lo spessore dei vetrini impiegati.

L'utilizzo del calibro manuale è stato fondamentale per misurare la lunghezza iniziale del campione una volta pretensionato.

Inoltre, per la realizzazione delle membrane polimeriche e ibride sono stati necessari i frame metallici per procedere con la fase di *solution casting*.

La fustella è stata utilizzata al fine di tagliare le membrane in campioni che avessero la medesima forma ad “osso di cane” e le medesime dimensioni (Figura 4.10).

Il taglio delle membrane biologiche non è risultato sempre facile, di conseguenza è stato utilizzato il bisturi per avere un taglio netto delle estremità.



Figura 4.9: Spessimetro digitale Quick ABSOLUTE Digmatic Serie 547.

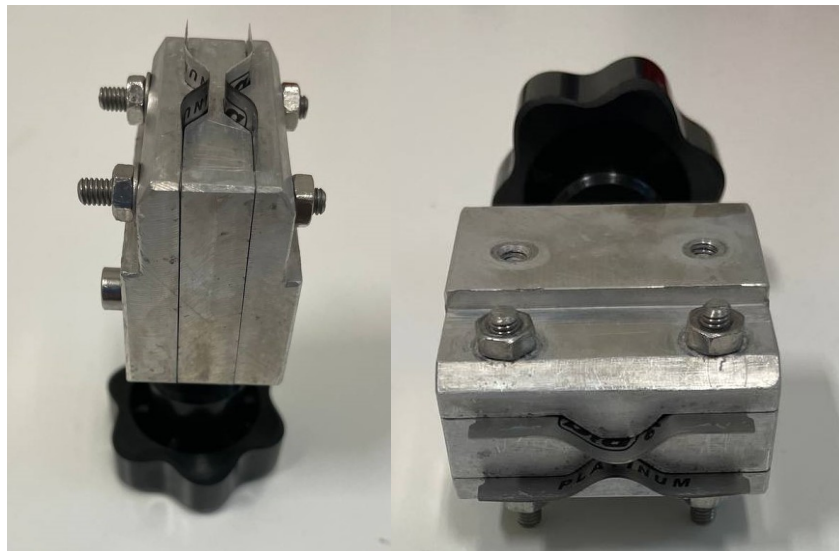


Figura 4.10: Fustella per il taglio delle membrane.

4.2: METODI

4.2.1: Pretensionamento

Ogni prova meccanica svolta è caratterizzata da uno step iniziale di pretensionamento per evitare fenomeni di avvallamento del provino.

La tensione a cui bisogna sottoporre il campione è modificabile dall'operatore: in coerenza con prove precedenti su materiali analoghi, si è scelto di impostare valori di tensione di 0.5 N per il materiale polimerico e 0.1 N per i test con pericardio e HYME [23] (Figura 4.11).

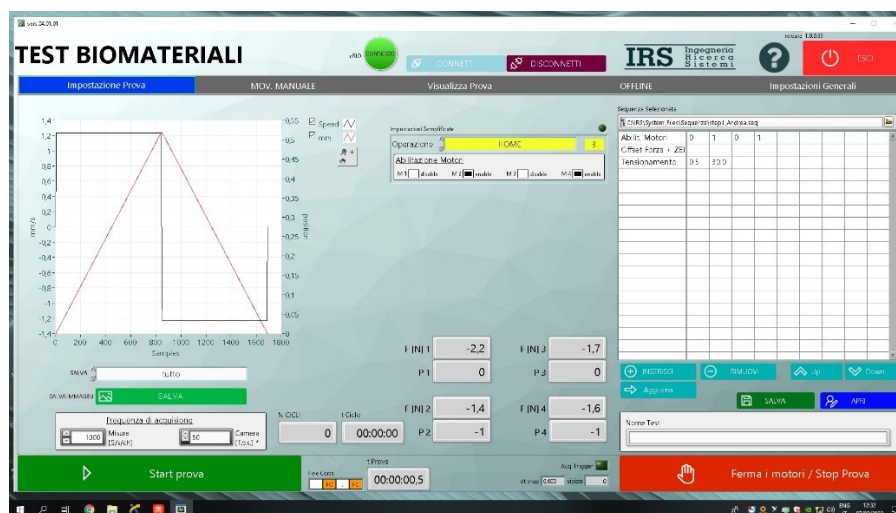


Figura 4.11: Protocollo di pretensionamento.

4.2.2: Comportamento a fatica

Per la caratterizzazione di un materiale le prove meccaniche sul comportamento a fatica sono indispensabili per valutare la resistenza meccanica a seguito di ripetuti cicli di carico-scarico. Le prove a fatica sono state realizzate imponendo una durata complessiva di 3600 secondi, una frequenza di esecuzione dei cicli di 1.3 Hz, ed una deformazione pari al 20% della lunghezza iniziale dopo pretensionamento del provino (Figura 4.12).

La scelta dell'intervallo di deformazione deriva da stime effettuate con un modello a parametri concentrati sviluppato al Politecnico di Milano: si è visto che la deformazione di un cuore nativo è in media del 20%, con picchi che arrivano fino al 30% durante la fase di sistole [24].

La scelta della frequenza dei cicli deriva invece dalla previsione di azionare le camere ventricolari a 80 bpm: mantenendo una velocità di deformazione di 1.3 mm/s, la frequenza varia nel range 1-1.3 Hz.

Ogni test meccanico è stato svolto su sei campioni per avere dati che, una volta elaborati, fossero statisticamente robusti.

Per la membrana ibrida ottenuta accoppiando ChronoFlex® a pericardio porcino sono state svolte le prove meccaniche per tre campioni a causa della mancata disponibilità di pericardio porcino.

Le prove a fatica svolte su membrane che avessero una componente biologica sono state eseguite immergendo il provino in soluzione salina al 0.9 % di NaCl per evitare la disidratazione del pericardio (Figura 4.13).

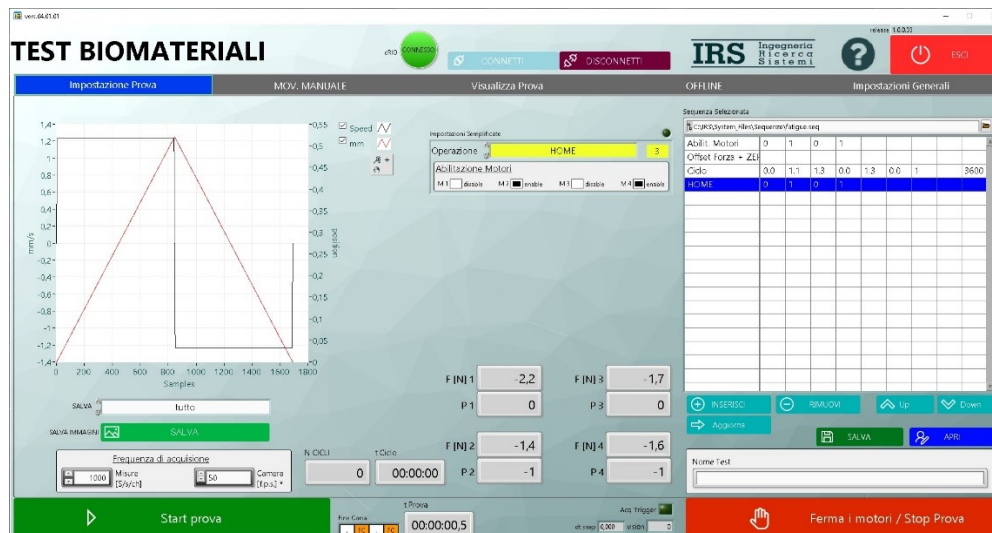


Figura 4.12: Protocollo utilizzato per studiare il comportamento a fatica.

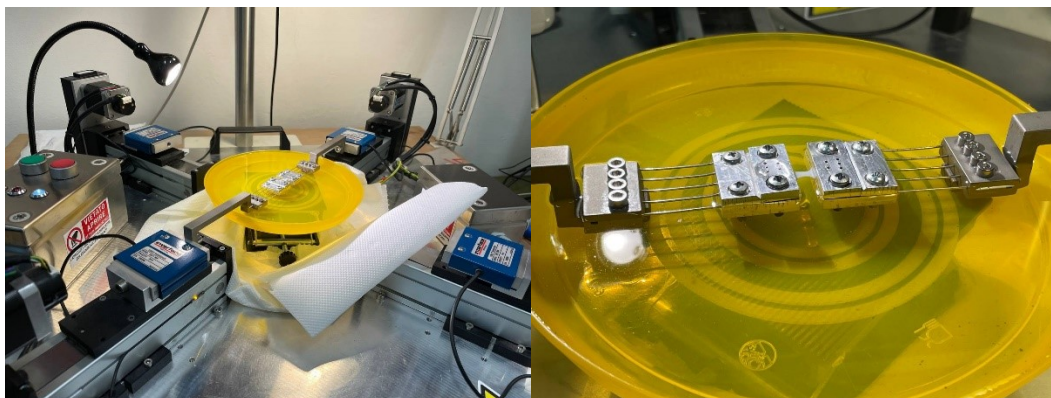


Figura 4.13: Setup per le prove in immersione.

4.2.3: Rilassamento delle tensioni

Lo studio del rilassamento delle tensioni, eseguito secondo un protocollo specifico (Figura 4.14), permette la ulteriore caratterizzazione dei materiali in esame e la successiva formulazione di un modello costitutivo.

Il rilassamento delle tensioni è un test meccanico che valuta i valori di tensione generati dai campioni quando si impone loro una deformazione indipendente dal tempo.

La deformazione impostata al campione è sempre del 20% e la durata delle prove è di 2700 secondi (45 minuti). TRAMA permette di deformare il materiale e poi impostare una pausa, acquisendo nel tempo i dati relativi al rilassamento delle tensioni. Come nel caso precedente, al termine della prova, gli attuatori tornano nella configurazione di HOME e il sistema è pronto ad una nuova prova.

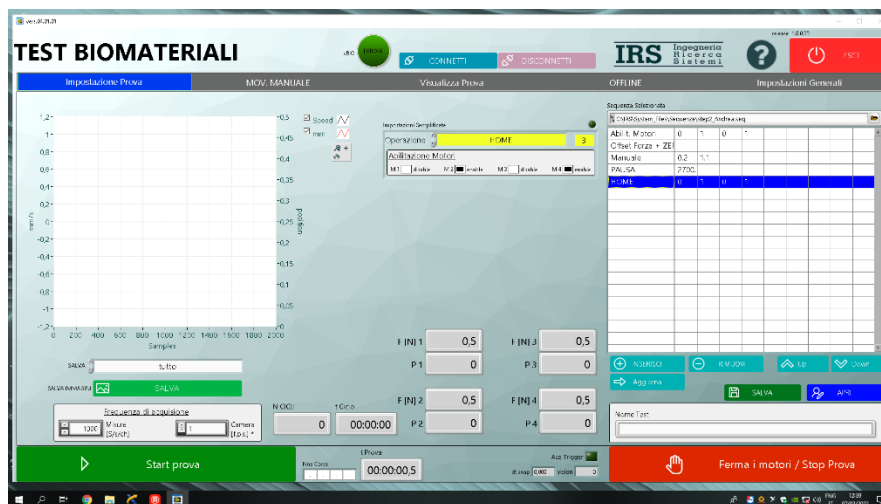


Figura 4.14: Protocollo per lo studio del rilassamento delle tensioni.

Analogamente al comportamento a fatica, le prove sono state svolte su sei campioni per ogni tipo di materiale ad eccezione delle membrane ibride con pericardio porcino per le quali sono stati utilizzati tre campioni; anche in questo caso, i provini in cui era presente il pericardio sono stati immersi in soluzione fisiologica (0.9% di NaCl) per evitare la disidratazione.

Successivamente sono stati eseguiti dei fit dei dati ottenuti durante le prove per mezzo di un modello meccanico viscoelastico. Tutte le membrane studiate sono caratterizzate da un comportamento viscoelastico; perciò, il modello considerato per stimare i parametri che caratterizzano le curve ottenute, è il modello di Maxwell generalizzato con tre rami viscosi come si vede in Figura 4.15.

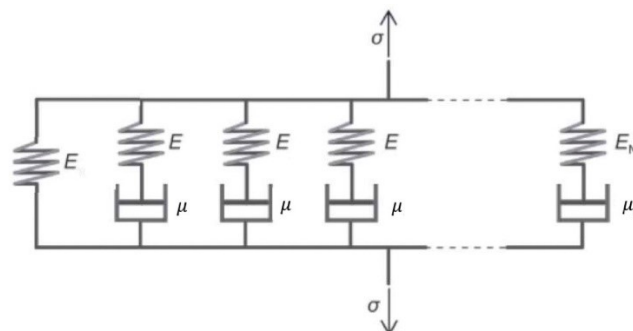


Figura 4.15: Modello di Maxwell generalizzato con N rami viscosi.

Il modello è espresso con l'equazione matematica:

$$E(t) = E_1 e^{-\frac{t}{\mathcal{T}_1}} + E_2 e^{-\frac{t}{\mathcal{T}_2}} + E_3 e^{-\frac{t}{\mathcal{T}_3}} + E_4 .$$

L'obiettivo sarà stimare i valori relativi al modulo di rigidezza E_i e dei tempi di rilassamento \mathcal{T}_i grazie al ToolBox di *MatLab*® *cftool*.

I tempi di rilassamento \mathcal{T}_i sono stati stimati da *cftool*, ma conoscendo la viscosità del materiale potrebbero essere ottenuti dividendo la viscosità (μ_i) per il modulo di rigidezza E_i .

E_4 è la rigidezza del materiale del solo ramo elastico che corrisponde alla condizione in cui il contributo dei rami viscosi è assente.

CAPITOLO 5: RISULTATI E DISCUSSIONE

5.1: COMPORTAMENTO A FATICA

Ciascun campione (pericardio nativo e decellularizzato, bovino e porcino; membrane polimeriche; membrane ibride) è stato sottoposto ad una prova a fatica della durata di 3600 secondi, durante la quale il provino era immerso in soluzione salina per prevenirne la disidratazione. In ogni test il campione è stato sottoposto ad un numero di cicli compreso in un range 3500-4500, permettendo di caratterizzare i materiali in modo tale da determinarne il comportamento una volta sottoposti a cicli di carico/scarico.

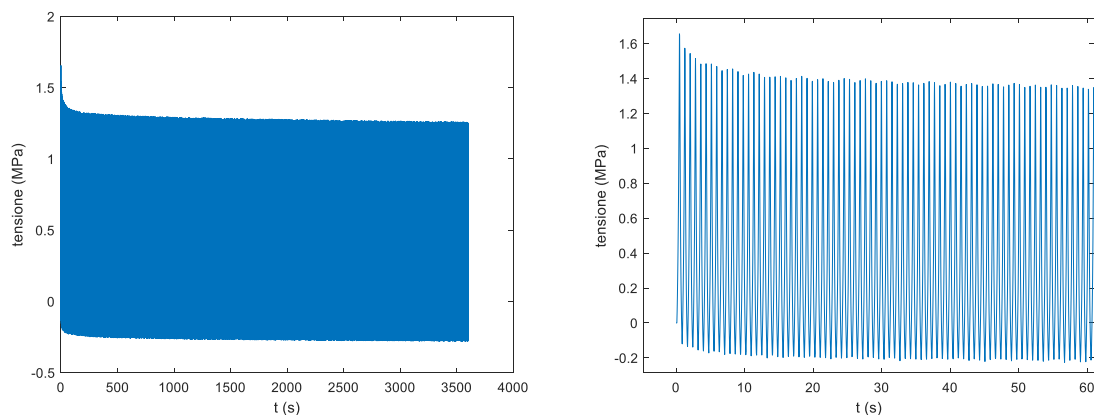


Figura 5.1: Rappresentazione del grafico tensione-tempo relativo ad una prova a fatica per DBP-AR (sinistra). Ingrandimento del grafico negli istanti iniziali (destra).

Il grafico tensione-tempo ha permesso di individuare il picco di tensione presente ad ogni ciclo di carico-scarico. Lo scopo è evidenziare se durante la prova il valore di tensione si mantiene costante nel tempo.

In Figura 5.2 è riportato l'andamento della tensione rilevato per i tessuti NPP, DPP, NBP, DBP e per i polimeri CF AR e CF ARLT. Si può notare un andamento asintotico che viene raggiunto dopo 2000 cicli; nel ChronoFlex®, per entrambe le formulazioni, l'effetto è più evidente rispetto al tessuto biologico che mostra invece dei valori di tensione maggiori rispetto al polimero, con un comportamento che si discosta tra le due classi di materiali.

Il valore associato ai picchi di tensione, se diviso per la deformazione imposta ai campioni, fornisce il modulo di Young istantaneo e di conseguenza la rigidità del materiale.

Dai grafici si evince che il comportamento del ChronoFlex® è differente per le due formulazioni, contraddistinte dalla assenza/presenza di microparticelle di silice. In particolare, il CF ARLT manifesta dei picchi maggiori di tensione, e quindi una maggiore rigidità, rispetto al CF AR. I dati forniti dalla Tabella 5.1 confermano quanto appena detto: infatti, il CF ARLT

mostra un picco di tensione pari a 1.66 MPa che, con una decrescita del 18.41%, si porta al valore asintotico di 1.35 MPa; il CF AR parte da un valore di picco di 0.74 MPa e arriva all'asintoto con un valore di 0.58 MPa e con una decrescita percentuale pari a 21.50%.

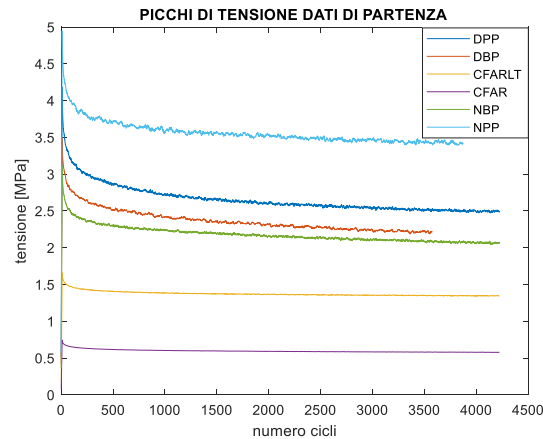


Figura 5.2: Andamento dei valori di tensione relativi ai materiali di partenza.

Per il tessuto biologico si nota un comportamento alquanto simile tra pericardio bovino nativo e decellularizzato, mentre per il pericardio porcino la differenza è più netta. NPP con un valore di picco di 4.94 MPa e un valore asintotico di 3.46 MPa risulta avere una maggiore rigidità rispetto al DPP e a tutte le membrane coinvolte nello studio.

In Figura 5.2 si nota che tutti i materiali sotto esame mostrano un comportamento viscoelastico. Il pericardio è caratterizzato da una maggiore componente viscosa, che termina con tempi più prolungati rispetto al ChronoFlex®, giustificando la presenza di curve più ‘morbide’ per arrivare al valore asintotico.

Il comportamento viscoelastico contraddistingue anche le HYME come rappresentato in Figura 5.3.

| | Picco max [MPa] | Asintoto [MPa] | % decrescita |
|----------|-----------------|----------------|--------------|
| NBP | 3.10 | 2.10 | 32.22 |
| NPP | 4.94 | 3.46 | 29.97 |
| DBP | 3.49 | 2.25 | 35.51 |
| DPP | 4.18 | 2.53 | 39.26 |
| CF-AR | 0.74 | 0.58 | 21.50 |
| CF-ARLT | 1.66 | 1.35 | 18.41 |
| DBP AR | 1.35 | 1.10 | 17.97 |
| DBP ARLT | 0.84 | 0.72 | 13.77 |
| DPP AR | 1.88 | 1.44 | 23.54 |
| DPP ARLT | 2.02 | 1.40 | 30.84 |

Tabella 5.1: Valori di picco massimo di tensione, asintoto e percentuale di decrescita di tutte le membrane.

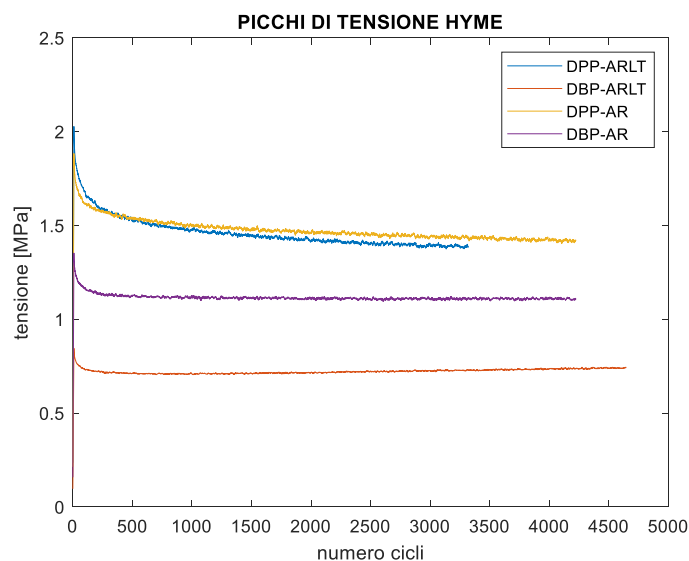


Figura 5.3: Andamento dei valori di tensione relativi alle HYME.

Coerentemente con i dati di rigidità del solo pericardio, dedotti dai grafici in Figura 5.2, si nota che le membrane ibride in cui è coinvolto il pericardio porcino presentano una maggiore rigidità rispetto a quelle in cui è presente il pericardio bovino. Il comportamento delle HYME dove è presente il DPP sono quasi sovrapponibili e si discostano dal comportamento di quelle in cui è presente DBP.

Dai dati in Tabella 5.1 e dai grafici in Figura 5.3 si può vedere come i range di lavoro di HYME siano simili a quelli relativi del ChronoFlex®, con valori nell'intervallo 0.5-2 MPa; ciò vuol dire che per le membrane ibride è il polimero a determinare il comportamento meccanico, fornendo così la resistenza meccanica desiderata.

Dopo i test a fatica, ogni provino è stato portato a rottura per studiare gli effetti della fatica su parametri biomeccanici come FS, UTS ed E. Il protocollo è stato applicato all'analisi dei seguenti materiali: NPP, DPP, CF AR DPP, CF ARLT DPP, CF ARLT e CF AR.

I dati ottenuti portando i provini a rottura dopo le prove cicliche sono stati confrontati con i risultati ottenuti nei provini in cui è stata svolta la sola prova a rottura. I dati relativi a quest'ultime prove sono stati ricavati da tesi di laurea prodotte precedentemente presso il laboratorio di Bioingegneria Chimica dell'Università di Padova.

Per identificare eventuali differenze significative nei valori misurati, è stata fatta un'analisi statistica mediante *t-test* in cui il valore del *p-value* associato ha la seguente convenzione:

- ns. $p > 0.05$;
- * : $p \leq 0.05$;
- ** : $p \leq 0.01$;
- *** : $p \leq 0.001$;

- **** : $p \leq 0.0001$.

Come si può notare in Figura 5.4 (A) vi è una differenza statisticamente significativa tra i valori di FS registrati nelle prove pre-fatica e in quelle post-fatica, eccetto che nel materiale realizzato accoppiando DPP con CF AR e CF ARLT. I materiali analizzati e sottoposti a fatica risultano avere una resistenza minore all'allungamento.

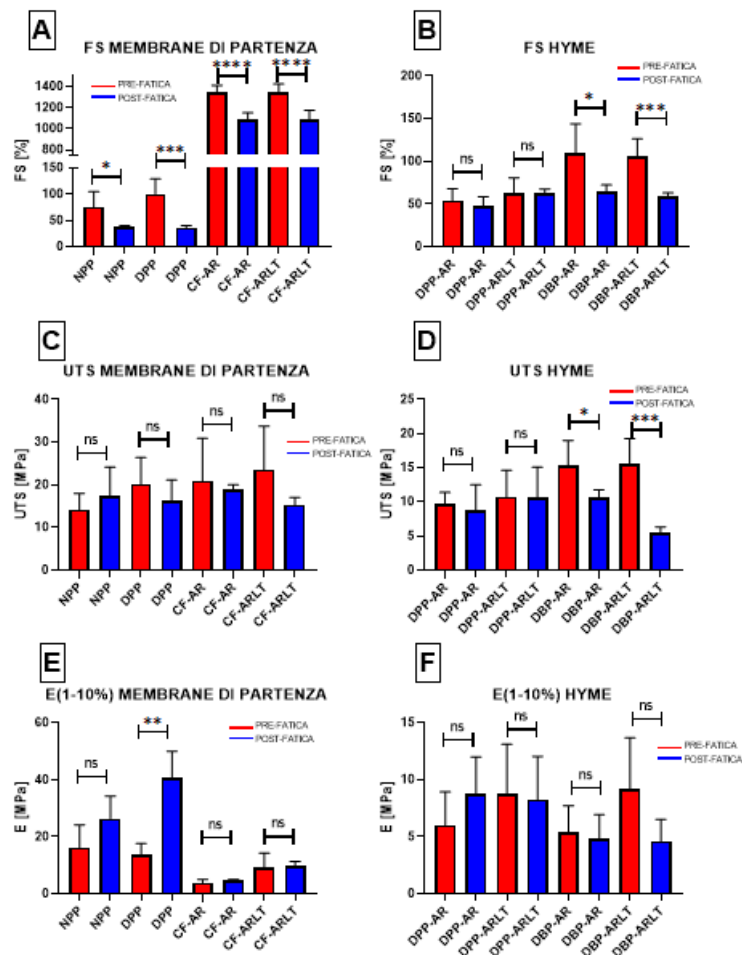


Figura 5.4: Valori di FS, UTS ed E relativi a tutti i materiali analizzati. Sul lato sinistro si trovano i materiali di partenza, sul lato destro le Hyme.

I valori di UTS (Figura 5.4 (B)) invece, non mostrano differenze significative e questo è un aspetto positivo perché vuol dire che le membrane per potersi rompere necessitano della medesima tensione, evidenziando che la fatica non incide sulle prestazioni dei materiali.

In Figura 5.4 (E) si nota che la rigidità dei campioni post-fatica presenta un trend in aumento che risulta essere significativo esclusivamente per il DPP.

I test a fatica sul materiale biologico portano a diminuire l'entropia interna del campione in modo da distribuire lungo una direzione preferenziale le fibre di collagene; ciò giustifica, nel DPP, un aumento della rigidità del materiale.

Equivalentemente sono stati effettuati gli stessi confronti sulle HYME. L'analisi delle singole componenti di cui sono formate le membrane ibride è utile per capire se i materiali di partenza sono adatti all'uso previsto e per comprendere se le HYME subiscono o meno una diminuzione delle proprietà meccaniche come effetto della fatica.

Come si nota in Figura 5.4 (B), le HYME ottenute da ChronoFlex® e DPP non evidenziano differenze in FS pre e post-fatica, mentre le membrane che con ChronoFlex® e DBP mostrano una differenza importante sulla deformazione a rottura successiva ai test a fatica.

Analizzando i valori di UTS in Figura 5.4 (D), per HYME con ChronoFlex® e DPP non si notano differenze significative; per ChronoFlex® e DBP invece sono presenti evidenti differenze. Il modulo E in tutte le HYME non mostra particolari differenze, esibendo una analoga rigidità a rottura dopo i test a fatica (F).

Nella Tabella 5.2 si trovano i valori corrispondenti agli istogrammi di Figura 5.4.

| | FS ± SD | FS ± SD | UTS ± SD | UTS ± SD | E (1-10%) ± SD | E (1-10%) ± SD |
|----------|-----------------|---------------|---------------|--------------|----------------|----------------|
| NPP | 75.41 ± 29.22 | 37.06 ± 3.70 | 14.14 ± 3.84 | 17.42 ± 6.76 | 16.19 ± 8.01 | 26.46 ± 7.83 |
| DPP | 100.6 ± 28.49 | 36.60 ± 3.93 | 20.21 ± 6.19 | 16.35 ± 4.82 | 13.71 ± 3.96 | 40.81 ± 9.22 |
| CF-AR | 1341.00 ± 71.70 | 1083 ± 69.16 | 20.91 ± 10.01 | 18.81 ± 1.24 | 3.88 ± 1.16 | 4.71 ± 0.39 |
| CF-ARLT | 1343.00 ± 82.78 | 1091 ± 84.78 | 23.55 ± 10.18 | 15.27 ± 1.80 | 9.19 ± 5.14 | 9.75 ± 1.63 |
| DPP-AR | 54.40 ± 13.69 | 47.80 ± 10.84 | 9.71 ± 1.70 | 8.70 ± 3.83 | 6.03 ± 2.93 | 8.76 ± 3.27 |
| DPP-ARLT | 62.33 ± 18.56 | 62.35 ± 5.23 | 10.73 ± 3.91 | 10.66 ± 4.44 | 8.76 ± 4.37 | 8.270 ± 3.80 |
| DBP-AR | 110.00 ± 34.14 | 65.13 ± 7.38 | 15.28 ± 3.73 | 10.60 ± 1.61 | 5.35 ± 2.38 | 4.83 ± 2.13 |
| DBP-ARLT | 106.00 ± 20.62 | 58.50 ± 4.82 | 15.54 ± 3.73 | 5.47 ± 0.87 | 9.17 ± 4.54 | 4.60 ± 1.94 |

Tabella 5.2: Valori di FS, UTS ed E pre-fatica e post-fatica.

I dati relativi a FS, UTS e E sottolineano un comportamento differente tra HYME, in particolare si evince come la tipologia di pericardio utilizzato sia discriminante. Infatti, le membrane ibride con ChronoFlex® e DBP esibiscono una perdita importante di proprietà meccaniche come effetto della fatica. HYME costituite da ChronoFlex® e DPP per FS, UTS ed E non dimostrano differenze significative, candidandosi come membrane adatte alla realizzazione delle camere ventricolari di cui sarà composto HEART-UP, il nuovo TAH in fase di prototipazione presso il Dipartimento di Ingegneria Industriale.

5.2: RILASSAMENTO DELLE TENSIONI

Il rilassamento delle tensioni è un effetto misurabile mediante prova meccanica che va a valutare i valori di tensione nel tempo durante l'applicazione di una deformazione costante (Figura 5.5). La deformazione imposta in tutte le prove e per tutti i materiali è del 20% rispetto alla lunghezza iniziale del campione.

L'obiettivo dell'analisi del rilassamento delle tensioni è trovare un modello meccanico che possa simulare il comportamento delle membrane di interesse. Per questo scopo si è utilizzato *cftool* del software *MatLab*®, strumento necessario per svolgere il fit dei dati e stimare i parametri che caratterizzano il modello.

Tutti i materiali analizzati mostrano un comportamento viscoelastico (Figura 5.6), con particolare risalto per le membrane composte da pericardio. Le evidenze, infatti, mostrano che i materiali biologici hanno un comportamento meccanico tipicamente viscoelastico.

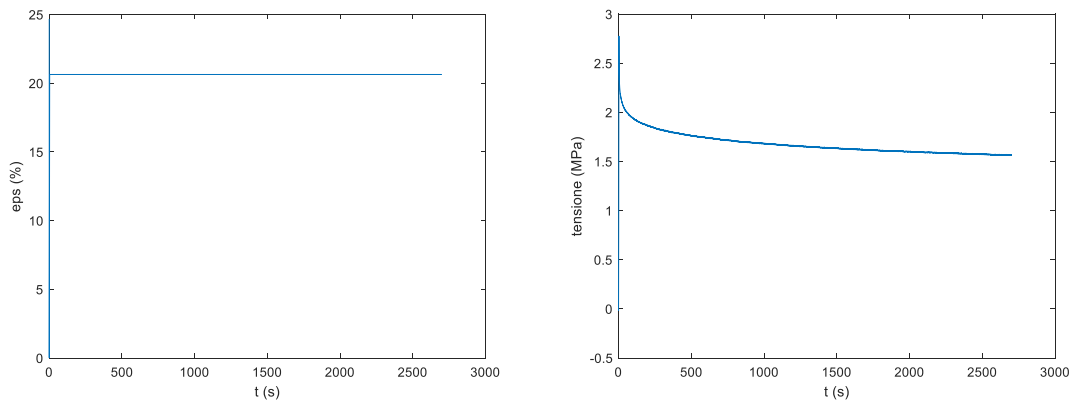


Figura 5.5: Rappresentazione del comportamento viscoelastico del DPP. A sinistra è impostata costante la deformazione ad un valore del 20.64%, a destra è riportato il comportamento associato al rilassamento delle tensioni.

Il modello di Maxwell generalizzato descritto da tre rami viscosi è identificato con l'equazione matematica:

$$E(t) = E_1 e^{-\frac{t}{\mathcal{T}_1}} + E_2 e^{-\frac{t}{\mathcal{T}_2}} + E_3 e^{-\frac{t}{\mathcal{T}_3}} + E_4 .$$

La descrizione dei parametri stimati è presente nel Capitolo 4, paragrafo 4.2.3.

I dati forniti dal Toolbox di *MatLab*® *cftool* sono riportati nella Tabella 5.3.

| | E_1 [MPa] | \mathcal{T}_1 [s] | E_2 [MPa] | \mathcal{T}_2 [s] | E_3 [Mpa] | \mathcal{T}_3 [s] | E_4 [Mpa] | R-square |
|----------|-------------|---------------------|-------------|---------------------|-------------|---------------------|-------------|----------|
| NBP | 79.97 | 2.61 | 79.96 | 2.61 | 7.04 | 137.00 | 8.82 | 0.98 |
| NPP | 97.47 | 2.46 | 99.97 | 2.46 | 16.79 | 53.52 | 21.24 | 0.97 |
| DBP | 99.26 | 2.46 | 99.18 | 2.44 | 9.13 | 144.02 | 9.06 | 0.97 |
| DPP | 146.10 | 2.46 | 149.90 | 2.46 | 13.39 | 54.05 | 15.01 | 0.97 |
| CF-AR | 95.01 | 1.02 | 77.50 | 1.10 | 11.99 | 5.87 | 4.20 | 0.97 |
| CF-ARLT | 149.10 | 1.95 | 129.98 | 1.95 | 5.31 | 31.50 | 5.34 | 0.99 |
| DBP AR | 146.10 | 1.95 | 95.72 | 1.95 | 1.64 | 146.94 | 4.33 | 0.99 |
| DBP ARLT | 28.7 | 3.56 | 6.75 | 2.32 | 10.51 | 2.29 | 4.30 | 0.98 |
| DPP AR | 55.12 | 1.09 | 100.23 | 2.77 | 6.86 | 20.29 | 9.09 | 0.98 |
| DPP ARLT | 98.31 | 1.92 | 99.61 | 1.92 | 20.43 | 5.37 | 4.09 | 0.98 |

Tabella 5.3: Valori di E e tempi di rilassamento \mathcal{T} che caratterizzano le membrane studiate.

Le curve generate sostituendo i valori stimati all'interno dell'equazione di Maxwell sono riportate in Figura 5.6.

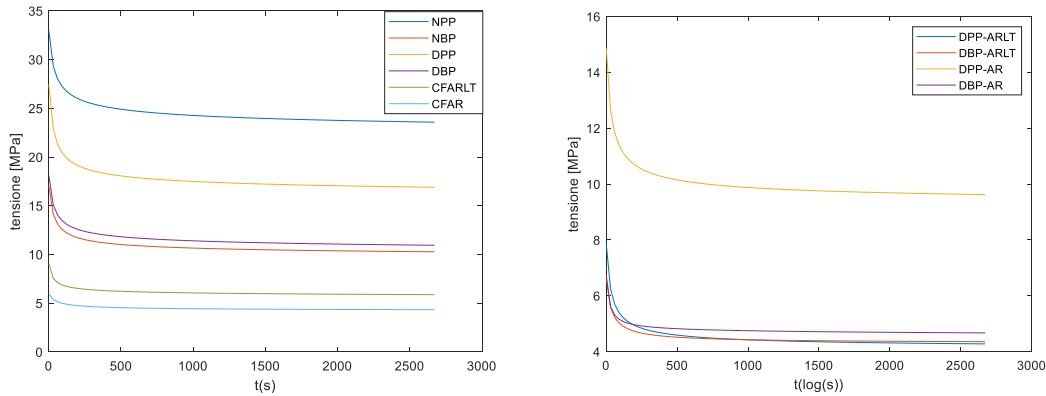


Figura 5.6: Fit dei dati ottenuti sostituendo i valori di Tabella 5.3 all'interno dell'equazione di Maxwell. A sinistra le curve delle membrane di partenza, a destra delle HYME.

Per ottenere le curve sono stati campionati i valori di tensione ogni 30 secondi generando dei vettori di tensione. I vettori di output sono stati divisi per la deformazione imposta ottenendo un nuovo array di valori associati al modulo di rigidità E . Successivamente fornendo a *cftool*, come input, il vettore delle rigidità e dei tempi, sono state create le curve di tutte le membrane. Un esempio di fit dei dati è presente in Figura 5.7, dove si vede la curva generata dal modello sovrapposta ai dati sperimentali. Tutti gli altri grafici vengono riportati in Appendice.

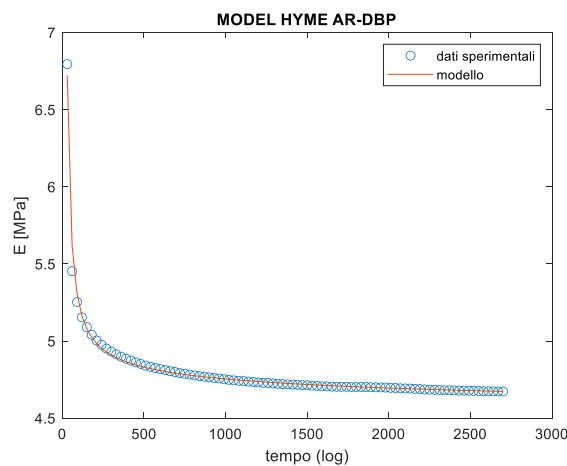


Figura 5.7: Esempio di dati da modello vs dati sperimentali per HYME DBP AR.

I valori stimati tramite il fit dei dati saranno implementati poi sul software Abaqus per realizzare un modello meccanico costitutivo non solo per il test di rilassamento delle tensioni ma in generale per definire il comportamento meccanico delle membrane d'interesse.

CAPITOLO 6: CONCLUSIONI

L' *organ shortage* è un problema attuale che induce ormai troppe persone, con gravi patologie cardiache, a sostenere tempi d'attesa molto lunghi rendendo evidente la necessità di cercare valide alternative al trapianto d'organi. Tra le possibili alternative terapeutiche vi sono i sistemi meccanici di assistenza al circolo: VAD e TAH, concepiti sia come BTT che come DT.

Il Progetto Padovano ha lo scopo di progettare un nuovo TAH con caratteristiche migliori rispetto a quelli in commercio.

L'emocompatibilità e la resistenza meccanica sono proprietà fondamentali per garantire il corretto funzionamento del TAH. Queste caratteristiche sono fornite dalle camere ventricolari, realizzate con membrane ibride (HYME) ottenute accoppiando un poliuretano carbonato (ChronoFlex®) con pericardio animale decellularizzato. Il ChronoFlex® è utilizzato per fornire alle camere ventricolari caratteristiche di resistenza meccanica, mentre il pericardio decellularizzato serve per incrementare l'emocompatibilità delle superfici a diretto contatto con il sangue del paziente: ciò consentirà se non di eliminare, quantomeno di ridurre la terapia anticoagulante, e conseguentemente gli effetti indesiderati ad essa associati.

Lo scopo di questa tesi è la caratterizzazione meccanica delle HYME, le quali si differenziano per la formulazione di ChronoFlex®, AR o ARLT (a seconda che non contenga o contenga microparticelle di silice), e per il pericardio decellularizzato (porcino o bovino). In particolare, si è interessati a valutare il comportamento a fatica delle membrane che sono destinate a cicli di contrazione ed espansione.

Sulla base dei dati sperimentali si può affermare che le HYME, composte da ChronoFlex® e DPP, risentano meno dell'effetto di fatica, candidandosi come membrane utili alla realizzazione delle camere ventricolari per il nuovo TAH. In particolare, il confronto delle proprietà meccaniche effettuato su campioni pre e post-fatica evidenziano che HYME formate da ChronoFlex® ARLT e DPP sono le membrane che oltre a non manifestare differenze significative nei parametri di interesse (E, FS, UTS), mantengono caratteristiche meccaniche adeguate rispetto all'impiego previsto.

In futuro sarà interessante valutare gli effetti del comportamento a fatica sulle HYME con prove di durata maggiore a 60 minuti e con deformazioni maggiori al 20%. Inoltre, la formulazione di un modello costitutivo risulterà necessaria per sviluppare simulazioni numeriche utili a stimare il comportamento delle camere ventricolari realizzate secondo configurazioni alternative.

APENDICE

Di seguito sono mostrati i fit dei dati sperimentali con le curve ottenute da modello (vedi Capitolo 5, paragrafo 5.2).

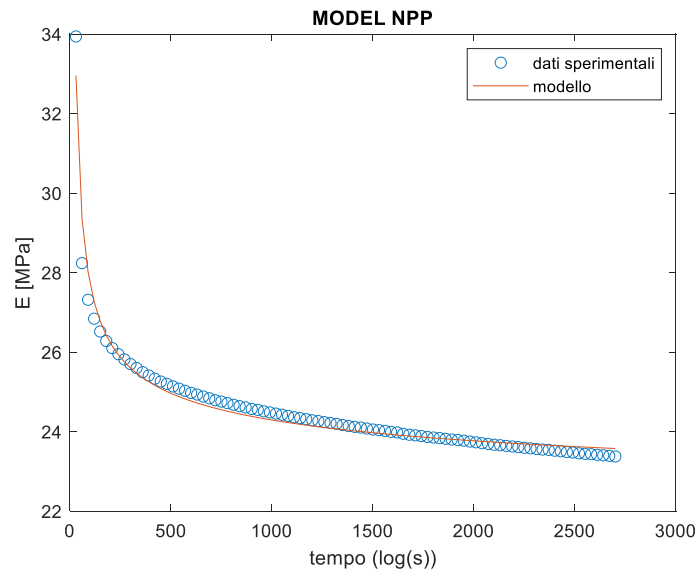


Figura A1: Dati da modello vs dati sperimentali per NPP.

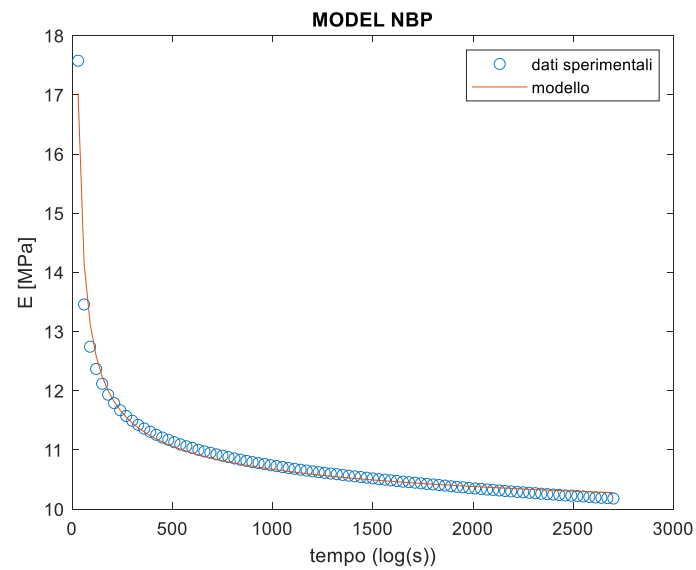


Figura A2: Dati da modello vs dati sperimentali per NBP.

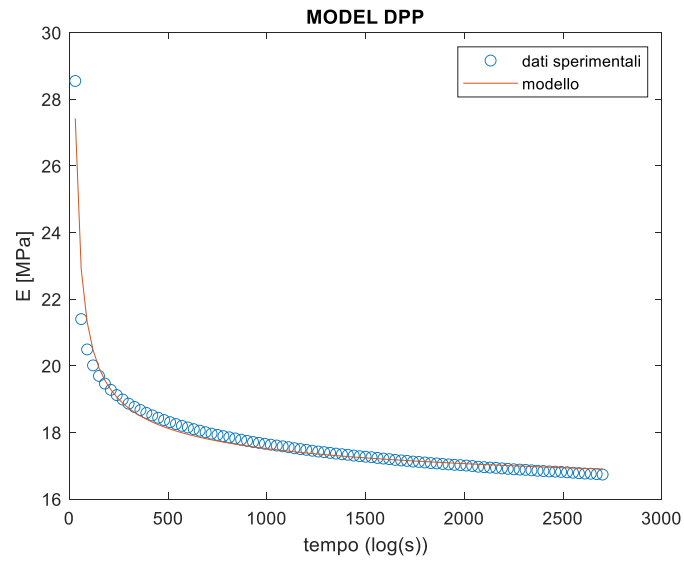


Figura A3: Dati da modello vs dati sperimentali per DPP.

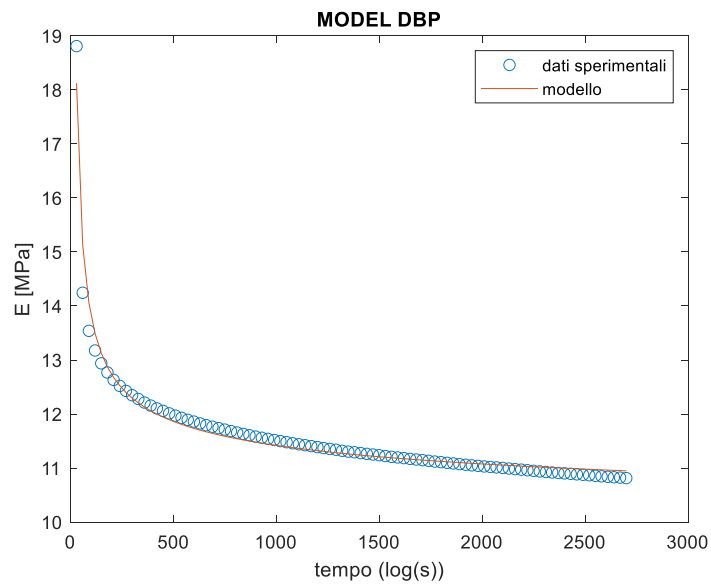


Figura A4: Dati da modello vs dati sperimentali per DBP.

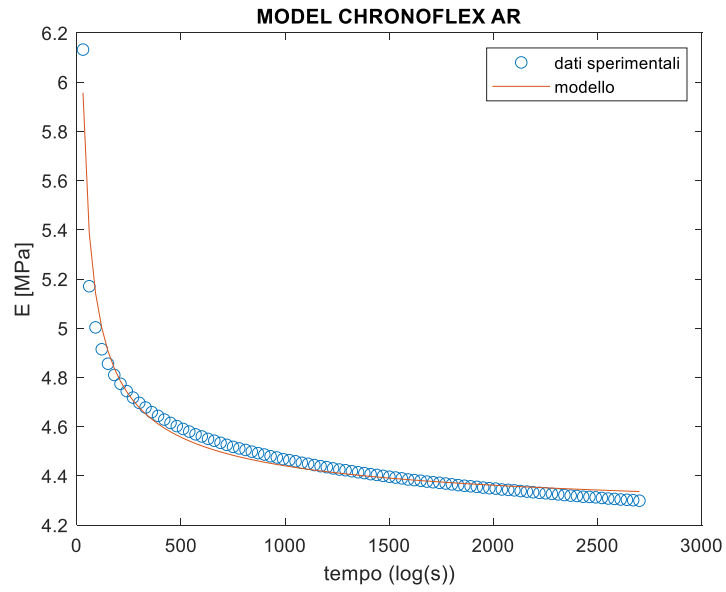


Figura A5: Dati da modello vs dati sperimentali per CF-AR.

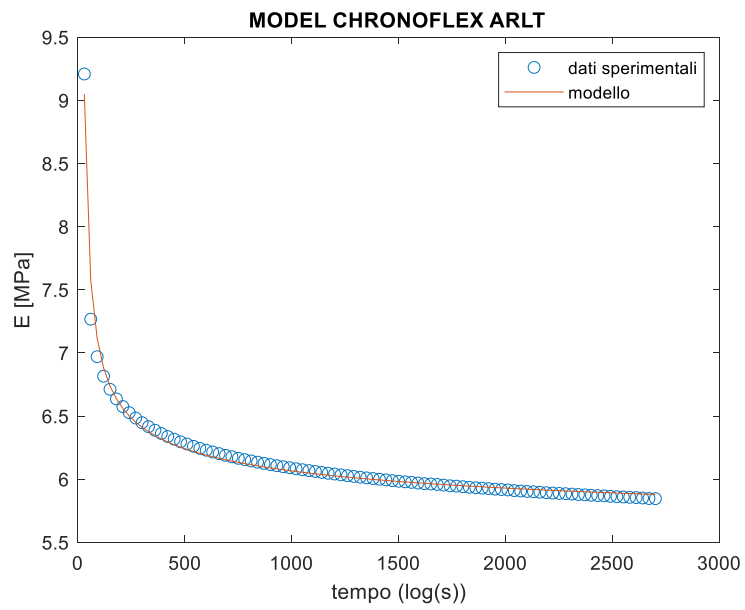


Figura A6: Dati da modello vs dati sperimentali per CF-ARLT.

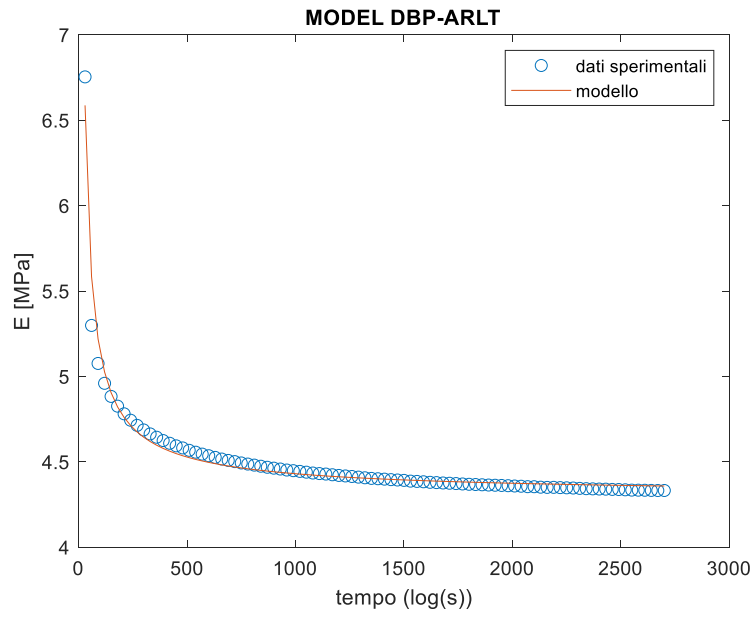


Figura A7: Dati da modello vs dati sperimentali per DBP-ARLT.

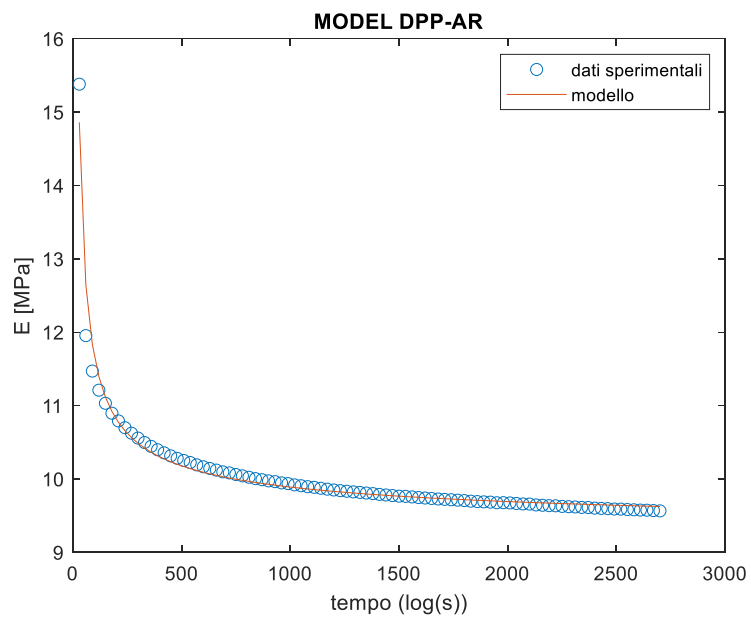


Figura A8: Dati da modello vs dati sperimentali per DPP-AR.

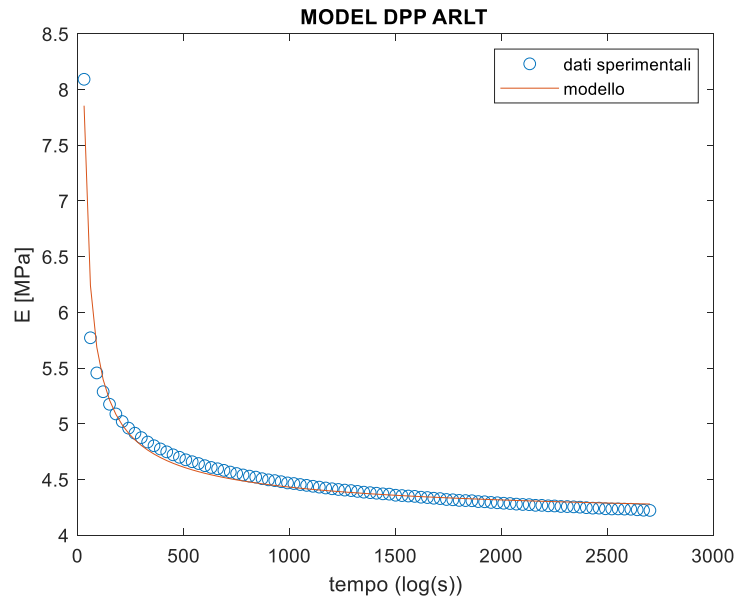


Figura A9: Dati da modello vs dati sperimentali per DPP-ARLT.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Fiocca S. *Fondamenti di anatomia e fisiologia umana*. Sorbona, 2000, pp. 189–277.
- [2] Smadja DM, Susen S, Rauch A, Cholley B, Latrémouille C, Duveau D, Zilberstein L, Méléard D, Boughenou MF, Belle EV, Gaussem P, Capel A, Jansen P, Carpentier A. *The Carmat Bioprosthetic Total Artificial Heart Is Associated With Early Hemostatic Recovery and no Acquired von Willebrand Syndrome in Calves*. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2017 Oct;31(5):1595-1602. doi: 10.1053/j.jvca.2017.02.184. Epub 2017 Mar 1. PMID: 28648774.
- [3] Centro Nazionale Trapianti, *Donazioni e trapianti di organi e tessuti, Rapporto 2019*.
- [3] ospedalebambinogesu, *trapianti di cuore vivere oltre 32 anni con un organo donato, 2018*.
- [4] <https://www.trapianti.salute.gov.it/trapianti/homeCnt.jsp>
- [5] Carpentier A, Latrémouille C, Cholley B, Smadja DM, Roussel JC, Boissier E, Trochu JN, Gueffet JP, Treillot M, Bizouarn P, Méléard D, Boughenou MF, Ponzio O, Grimmé M, Capel A, Jansen P, Hagée A, Desnos M, Fabiani JN, Duveau D. *First clinical use of a bioprosthetic total artificial heart: report of two cases*. *Lancet*. 2015 Oct 17;386(10003):1556-63. doi: 10.1016/S0140-6736(15)60511-6. Epub 2015 Jul 28. PMID: 26231456.
- [6] Gray NA Jr, Selzman CH. *Current status of the total artificial heart*. *Am Heart J*. 2006 Jul;152(1):4-10. doi: 10.1016/j.ahj.2005.10.024. PMID: 16824826.
- [7] Cooley DA, Liotta D, Hallman GL, Bloodwell RD, Leachman RD, Milam JD. *Orthotopic cardiac prosthesis for two-staged cardiac replacement*. *Am J Cardiol*. 1969 Nov;24(5):723-30. doi: 10.1016/0002-9149(69)90460-3. PMID: 4899910.
- [8] Barker LE. *The total artificial heart*. *AACN Clin Issues Crit Care Nurs*. 1991 Aug;2(3):587-97.
- [9] Corriere della sera. *Un cuore tutto artificiale. Primo impianto in Italia*.
- [10] Torregrossa G, Morshuis M, Varghese R, Hosseinian L, Vida V, Tarzia V, Loforte A, Duveau D, Arabia F, Leprince P, Kasirajan V, Beyersdorf F, Musumeci F, Hetzer R, Krabatsch T, Gummert J,

Copeland J, Gerosa G. *Results with SynCardia total artificial heart beyond 1 year*. ASAIO J. 2014 Nov-Dec;60(6):626-34. doi: 10.1097/MAT.000000000000132. PMID: 25158888.

[11] Jansen P, van Oeveren W, Capel A, Carpentier A. In vitro haemocompatibility of a novel bioprosthetic total artificial heart. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2012 Jun;41(6): e166-72. doi: 10.1093/ejcts/ezs187. Epub 2012 Apr 4. PMID: 22491668.

[12] Smadja DM, Saubaméa B, Susen S, Kindo M, Bruneval P, Van Belle E, Jansen P, Roussel JC, Latrémouille C, Carpentier A. *Bioprosthetic Total Artificial Heart Induces a Profile of Acquired Hemocompatibility With Membranes Recellularization*. *J Am Coll Cardiol*. 2017 Jul 18;70(3):404-406. doi: 10.1016/j.jacc.2017.05.021. PMID: 28705324.

[13] Dal Sasso E, Bagno A, Scuri STG, Gerosa G, Iop L. *The Biocompatibility Challenges in the Total Artificial Heart Evolution*. *Annu Rev Biomed Eng*. 2019 Jun 4; 21:85-110. doi: 10.1146/annurev-bioeng-060418-052432. Epub 2019 Feb 22. PMID: 30795701.

[14] <https://www.corisveneto.com>.

[15] Lopez-Moya M, Melgar-Lesmes P, Kolandaivelu K, de la Torre Hernández JM, Edelman ER, Balcells M. *Optimizing Glutaraldehyde-Fixed Tissue Heart Valves with Chondroitin Sulfate Hydrogel for Endothelialization and Shielding against Deterioration*. *Biomacromolecules*. 2018 Apr 9;19(4):1234-1244. doi: 10.1021/acs.biomac.8b00077. Epub 2018 Mar 20. PMID: 29539266; PMCID: PMC6198652.

[16] Perra NF, *Progettazione e sviluppo di un cuore totale artificiale*, Tesi di Laurea Magistrale in Bioingegneria, Università degli Studi di Padova, AA- 2020/2021.

[17] Reed AM, Potter J, Szycher M. *A solution grade biostable polyurethane elastomer: ChronoFlex AR*. *J Biomater Appl*. 1994 Jan;8(3):210-36. doi: 10.1177/088532829400800303. PMID: 817663.

[18] Bélanger MC, Marois Y, Roy R, Mehri Y, Wagner E, Zhang Z, King MW, Yang M, Hahn C, Guidoin R. *Selection of a polyurethane membrane for the manufacture of ventricles for a totally implantable artificial heart: blood compatibility and biocompatibility studies*. *Artif Organs*. 2000 Nov;24(11):879-88. doi: 10.1046/j.1525-1594.2000.06504.x. PMID: 11119076.

[19] Marcano A, Fatyeyeva K, Koun M, Dubuis P, Grimme M, Marais S, *Barrier behavior of biomedical polyurethanes: relationship of structure, morphology and properties*, *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 2008, 8, 3324-3334.

[20] Candela V, *Realizzazione e caratterizzazione di una membrana ibrida per la costruzione di camere ventricolari di un cuore totale artificiale*, Tesi di Laurea Magistrale in Ingegneria dei Materiali, Università degli Studi di Padova, AA 2018/2019.

[21] Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. *An overview of tissue and whole organ decellularization processes*. *Biomaterials*. 2011 Apr;32(12):3233-43. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.057. Epub 2011 Feb 5. PMID: 21296410; PMCID: PMC3084613.

[22] Kopeček J, Yang J. *Smart self-assembled hybrid hydrogel biomaterials*. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2012 Jul 23;51(30):7396-417. doi: 10.1002/anie.201201040. PMID: 22806947; PMCID: PMC4599370.

[23] Zardin C, *Realizzazione e caratterizzazione di un materiale emocompatibile per la produzione di dispositivi di assistenza meccanica al circolo*, Tesi di Laurea Magistrale in Bioingegneria, Università degli studi di Padova, AA 2019/2020.

[24] Airoidi P, Bulgarello E, Formaggia L, *Implementazione in C++ di un modello a parametri concentrati di dinamica cardiaca*, 2013, Pages 47.

[25] Pignatello R., *Biomaterials science and engineering*, IntechOpen, 2011.

[26] Bagno A, Di Bello C, *Biomateriali. Dalla scienza dei materiali alle applicazioni cliniche*, Patron Editore, 2016.

RINGRAZIAMENTI

‘Grazie mille’ credo siano state le parole più ripetute durante questa fantastica esperienza di tesi. Sono due parole tanto semplici quanto dirette, ma sono rivolte a quelle persone che ti aiutano e che donano consigli per il tuo futuro.

Al di là dei ruoli che si ricoprono in un qualsiasi ambiente, siamo persone, e qua, durante questa esperienza, ho trovato persone fantastiche sempre pronte ad aiutarmi e a completa disposizione. Voglio ringraziare il Professore Andrea Bagno, che oltre ad essere un docente in grado di trasmettere la propria passione a noi studenti, in primis a me, si è reso sempre disponibile per trovare una soluzione agli ostacoli incontrati durante il percorso, ma soprattutto mi ha dato la possibilità di lavorare per un progetto unico e ambizioso come quello dell’HEART-UP; mi sento estremamente orgoglioso di aver partecipato e contribuito a questo lavoro.

Tengo le dita incrociate sperando che in un futuro prossimo venga messo alla luce questo nuovo TAH e che possa migliorare la vita delle persone meno fortunate.

Un grazie speciale a Martina Todesco per essermi stata sempre accanto quando non ero in grado di risolvere problemi in modo autonomo, la ringrazio per essersi resa sempre disponibile nel fornirmi i pericardi, evitandomi così di andare al macello e mettere mano a cose che mi avrebbero un po’ impressionato.

Inoltre, voglio ringraziare Martina per essersi messa sempre al mio pari, dote non comune data l’esperienza lavorativa che ci differenzia; in questo modo mi ha dato l’opportunità di crescere, di confrontarmi con lei, facendomi sentire parte di questo importante progetto.

Ringrazio la mia famiglia che mi ha sempre sostenuto in questi anni di Università, non mi ha mai messo pressioni, che talvolta possono risultare più distruttive che costruttive, e che mi ha fatto sentire orgoglioso per quello che stavo studiando.

Ringrazio tutti i miei amici, senza i quali tutto il percorso accademico sarebbe stato più pesante, in particolare ringrazio Alessandro, Paolo e Giacomo con cui ho condiviso ogni giorno durante questo periodo di tesi e che si sono mostrati sempre pronti ad aiutarmi, consigliarmi e a scherzare, facendomi passare velocemente questa permanenza nei laboratori di Ingegneria.