



**UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA**



**DIPARTIMENTO  
DI INGEGNERIA  
DELL'INFORMAZIONE**

**DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE  
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN  
BIOINGEGNERIA**

**“MEMBRANE IBRIDE PER UN CUORE ARTIFICIALE TOTALE  
INNOVATIVO: CARATTERIZZAZIONE E FORMULAZIONE DI UN  
MODELLO COSTITUTIVO”**

**RELATORE: Prof. Andrea Bagno**

**LAUREANDO: Roberto Gemelli**

**CORRELATORE: Prof. Emanuele Luigi Carniel**

**CORRELATORE: Ing. Martina Todesco**

**ANNO ACCADEMICO 2021/2022**

**15 dicembre 2022**



*“Sometimes it is the people no one  
imagines anything of, who do the  
things no one can imagine.”*

**— Alan Turing**

# ***INDICE***

<i><b>ABSTRACT</b></i>	<b>6</b>
<i><b>GLOSSARIO</b></i>	<b>8</b>
<i><b>INTRODUZIONE</b></i>	<b>9</b>
<i><b>1 SISTEMA CARDIOVASCOLARE E DISPOSITIVI DI ASSISTENZA AL CIRCOLO</b></i>	<b>11</b>
1.1 SISTEMA CARDIOVASCOLARE	11
1.1.1 IL CUORE	12
1.2 LO SCOMPENSO CARDIACO	15
1.2.1 I TRATTAMENTI	16
1.2.2 IL TRAPIANTO DI CUORE	17
1.3 DISPOSITIVI DI ASSISTENZA AL CIRCOLO	20
1.3.1 VAD	20
1.3.2 TAH	23
<i><b>2 NUOVO CONCEPT DI CUORE ARTIFICIALE</b></i>	<b>29</b>
2.1 REQUISITI FONDAMENTALI	29
2.2 IL PROGETTO PADOVANO HEART – UP	31
2.3 EMOCOMPATIBILITÀ E MATERIALI IBRIDI	35
<i><b>3 MEMBRANE IBRIDE</b></i>	<b>37</b>
3.1 PREMESSA	37
3.2 MATERIALI E METODI	39
3.2.1 PERICARDIO	39
3.2.2 DECELLULARIZZAZIONE	41
3.2.3 PCU: IL CHRONOFLEX	44
3.2.4 HYME DPP – CFARLT	46
<i><b>4 CARATTERIZZAZIONE MECCANICA: FORMULAZIONE DI UN MODELLO COSTITUTIVO</b></i>	<b>48</b>
4.1 MATERIALI E METODI	48

---

4.1.1	TRAMA	48
4.1.2	MATLAB	50
4.1.3	ABAQUS	50
4.1.4	MODELLO COSTITUTIVO IPERELASTICO ALLA OGDEN	50
4.1.5	MODELLO VISCOLELASTICO	51
4.1.6	PROVE DI RILASSAMENTO DELLE TENSIONI	53
4.1.7	ANALISI DEI DATI	57
4.2	IDENTIFICAZIONE DI UN MODELLO COSTITUTIVO VISCO IPER-ELASTICO	63
4.2.1	CHRONOFLEX ARLT	64
4.2.2	DPP	65
4.2.3	HYME	66
4.3	DISCUSSIONE	68
<b>5</b>	<b>CARATTERIZZAZIONE BIOLOGICA: ANALISI DI CITOCOMPATIBILITÀ</b>	<b>70</b>
5.1	MATERIALI E METODI	70
5.1.1	WST	71
5.1.2	LIVE & DEAD	73
5.1.3	IMMUNOFLUORESCENZA	75
	<b>CONCLUSIONI</b>	<b>78</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>79</b>

## ***ABSTRACT***

La carenza di organi da donatori, sempre più marcata, e l'aumento del numero di pazienti con scompenso cardiaco grave, hanno portato il mondo della ricerca a sviluppare nuovi dispositivi artificiali in grado di assistere parzialmente o sostituire completamente il cuore biologico. I dispositivi attualmente in commercio sono funzionali per la sopravvivenza ma non sono in grado di garantire una elevata qualità di vita, soprattutto a causa del rumore, della scarsa biocompatibilità, e quindi della necessità di assumere un'importante terapia anticoagulante e antiaggregante, delle dimensioni elevate. Oggi l'obiettivo fondamentale è quello di sviluppare un nuovo cuore totale artificiale in grado di risolvere i problemi sopra citati.

Da qualche anno, presso l'Università di Padova si sta sviluppando un progetto di ricerca finalizzato alla creazione di un cuore totale artificiale innovativo. In questo ambito, è stato prodotto un nuovo materiale (membrana ibrida) in grado di migliorare l'emocompatibilità delle camere ventricolari. La membrana è realizzata per mezzo dell'accoppiamento di un polimero sintetico con un tessuto biologico decellularizzato, permettendo di assicurare, da un lato, adeguata resistenza meccanica e, dall'altro lato, di garantire una buona interazione con il sangue favorendo la fase di ricellularizzazione della superficie a contatto con il sangue da parte delle cellule in circolo.

In questo progetto di tesi è stato formulato un modello costitutivo visco iper-elastico in grado di descrivere correttamente il comportamento meccanico della membrana ibrida. Lo sviluppo del modello costitutivo è necessario per proseguire con lo sviluppo di simulazioni numeriche relative alla tenuta meccanica e alla funzionalità fluidodinamica del nuovo cuore artificiale.

Sono stati inoltre eseguiti test *in vitro* con cellule di mammifero per valutare l'eventuale citotossicità della membrana ibrida. I risultati hanno evidenziato una buona vitalità e proliferazione cellulare.

The increasingly marked shortage of organs from human donors and the increasing number of patients with severe heart failure have led the researchers to develop new artificial devices capable of partially assisting or completely replacing the biological heart. The commercially available devices allow patients' survival but do not guarantee a high quality of life due to noise, poor biocompatibility, and therefore the need to administer anticoagulant/antiplatelet therapy, and large dimensions. Presently, the development of a new total artificial heart capable of bypassing the above-mentioned limitations is still challenging.

A research project is under development at the University of Padua: it aims at creating an innovative total artificial heart. In this context, a new material (hybrid membrane) was produced to improve the hemocompatibility of the ventricular chambers. The membrane is made by coupling a synthetic polymer with a decellularized biological tissue, ensuring, on the one hand, adequate mechanical resistance and, on the other hand, guarantying good interactions with the blood, favoring the recellularization of the surface in contact with the blood by circulating cells.

In this thesis project, a viscohyperelastic constitutive model has been formulated: it is able to correctly describe the mechanical behavior of the hybrid membrane. The development of the constitutive model is necessary to continue with numerical simulations relating to both mechanical resistance and fluid dynamic functionality of the new artificial heart.

In vitro tests with mammalian cells were also performed to evaluate the possible cytotoxicity of the hybrid membrane. The results showed good cell viability and proliferation.

## ***GLOSSARIO***

HF	Heart Failure
TAH	Total Artificial Heart
VAD	Ventricular Assist Device
FDA	Food and Drug Administration
BTT	Bridge To Transplant
DT	Destination Therapy
HYME	Hybrid Membrane
CFARLT	Chronoflex AR Low Tack
CFAR	Chronoflex AR
NPP	Native Porcine Pericardium
NBP	Native Bovine Pericardium
DPP	Decellularized Porcine Pericardium
DBP	Decellularized Bovine Pericardium
FEM	Finite Element Method
TRAMA	Traction Machine

## ***INTRODUZIONE***

Lo scompenso cardiaco terminale, definito come condizione caratterizzata da un peggioramento delle funzioni del cuore, tale da renderlo inadeguato a pompare abbastanza sangue per soddisfare le esigenze dell'organismo, rappresenta ancora oggi una delle prime cause di morte in Italia e nel mondo. Inoltre, il numero di pazienti con malattie cardiovascolari è in continuo aumento, specialmente in seguito alla pandemia da COVID – 19 che ha visto un incremento importante di patologie cardiache durante e dopo l'infezione. I trattamenti seguono diverse direzioni e comprendono principalmente terapie mediche e l'impianto di dispositivi di assistenza al circolo come VAD e TAH; ciononostante, la soluzione migliore rimane ancora il trapianto d'organo.

La mancanza di donatori e di dispositivi meccanici, che oltre a garantire la sopravvivenza del paziente, assicurino una buona qualità di vita, sta spingendo il mondo della ricerca a progettare strumenti sempre più nuovi e migliori.

Il laboratorio di Bioingegneria Chimica dell'Università di Padova in collaborazione con altri dipartimenti e con il Centro di Cardiocirurgia "V. Gallucci" dell'Azienda Ospedale Università di Padova, da anni sta lavorando allo sviluppo di un cuore artificiale totale innovativo, in grado di presentare caratteristiche di emocompatibilità tali da non richiedere (o quanto meno da limitare) le terapie anticoagulanti/antiaggreganti, totalmente impiantabile nel maggior numero possibile di pazienti, silenzioso, e "intelligente", cioè capace di adattarsi ai bisogni del paziente.

Alla base della progettazione del nuovo dispositivo di assistenza meccanica al circolo vi è lo sviluppo di una membrana ibrida innovativa, realizzata grazie all'accoppiamento di pericardio porcino decellularizzato con un policarbonato uretano (ChronoFlex® ARLT).

Detta membrana sarà utilizzata per la realizzazione delle camere ventricolari del dispositivo ed è perciò essenziale che essa garantisca caratteristiche di compatibilità ematica e il ripopolamento cellulare della superficie a contatto con il sangue.

Questo lavoro di tesi è dedicato a due aspetti legati alla progettazione della membrana ibrida innovativa: la caratterizzazione biologica, allo scopo di valutarne la citocompatibilità, e la formulazione di un modello costitutivo in grado di descriverne correttamente il comportamento meccanico. Lo sviluppo del modello, eseguito attraverso prove di rilassamento delle tensioni, ed in particolare l'acquisizione dei parametri costitutivi, sarà fondamentale per procedere alla realizzazione di simulazioni numeriche grazie alle quali sarà possibile ottimizzare la configurazione della nuova camera ventricolare.

# ***1 SISTEMA CARDIOVASCOLARE E DISPOSITIVI DI ASSISTENZA AL CIRCOLO***

## **1.1 SISTEMA CARDIOVASCOLARE**

Il sistema cardiovascolare è l'insieme di organi che permettono al sangue di circolare nell'organismo e svolge diverse funzioni, tra cui il trasporto di sostanze nutritive e di ossigeno, allontanamento dei prodotti del catabolismo cellulare, ed in particolare anidride carbonica, termoregolazione, regolazione dell'omeostasi, e il trasporto di cellule dotate di attività fagocitaria, di cellule immunocompetenti e di anticorpi.

L'apparato cardiocircolatorio è costituito principalmente da sangue, cuore e vasi sanguigni, suddivisibili in *arterie, vene e capillari*.

La circolazione sanguigna nell'uomo viene distinta in *grande circolo* o *circolazione generale* e *piccolo circolo* o *circolazione polmonare*; entrambi iniziano e terminano a livello del cuore. Il piccolo circolo ha inizio nel ventricolo destro con il tronco polmonare, che suddividendosi nelle arterie polmonari, trasporta il sangue venoso ai polmoni; qui cede anidride carbonica e assume ossigeno, diventando sangue arterioso, e ritorna al cuore attraverso le vene polmonari, immettendosi nell'atrio sinistro.

Il grande circolo origina invece dal ventricolo sinistro mediante un tronco arterioso, l'*aorta*, che ramificandosi si distribuisce progressivamente a tutto il corpo.

A livello dei capillari il sangue arterioso cede ossigeno e sostanze nutrienti e si carica di prodotti di scarto e anidride carbonica, diventando quindi venoso e ritornando al cuore, precisamente nell'atrio destro, attraverso la *vena cava superiore, inferiore* e il

*seno coronarico*. [1] I due circoli sono intrecciati tra di loro e sono attivati dal cuore, quale pompa aspirante e premente.

### 1.1.1 IL CUORE

Il cuore (Figura 1) è l'organo principale del sistema cardiovascolare, è situato nella cavità toracica tra i due polmoni, nella zona detta *mediastino*, ed è avvolto da un sacco fibro-sieroso, il *pericardio*. Ha una forma a cono appiattito e rispetto al piano sagittale mediano è situato circa un terzo a destra e due terzi a sinistra. Ha una costituzione prevalentemente muscolare (*miocardio*) e presenta quattro cavità interne: due posterosuperiori, gli *atri* e due anteroinferiori, i *ventricoli*, rispettivamente destri e sinistri. La superficie esterna dell'organo è rivestita da una sierosa cardiaca, l'*epicardio*, mentre quella interna è costituita da una membrana biancastra e liscia detta *endocardio*. In un soggetto adulto, il diametro longitudinale che congiunge la base con il centro della punta è lungo circa 130 mm; il diametro trasversale, perpendicolare al precedente e calcolato rispetto alla base, è di circa 100 mm; mentre il diametro anteroposteriore raggiunge 50 – 60 mm. La grandezza del cuore varia in base al sesso, all'età e alle condizioni cliniche. Nell'adulto il peso è compreso tra i 280 e i 340 g nel maschio e tra i 230 e 280 g nella femmina, in generale con valori superiori si può parlare di *ipertrofia cardiaca* [1].

Le quattro cavità che compongono l'organo, atri e ventricoli, sono separate rispettivamente dai setti interatriale e interventricolare. Quattro valvole, visibili in Figura 2, sono presenti per evitare il reflusso di sangue: due *valvole atrioventricolari*, situate nell'orifizio tra gli atri e i ventricoli, dette anche valvole a lembi o a cuspidi (la valvola tricuspide, nella parte destra del cuore, e la valvola bicuspidale o mitrale, nella parte sinistra), e due *valvole arteriose*, dette anche a *nido di rondine* o *semilunari*, situate in corrispondenza della giunzione di efflusso di ciascun ventricolo e origine della rispettiva arteria: la *valvola aortica*, tra il ventricolo sinistro e l'arteria aorta, e la *valvola polmonare*, tra il ventricolo destro e l'arteria polmonare [1].

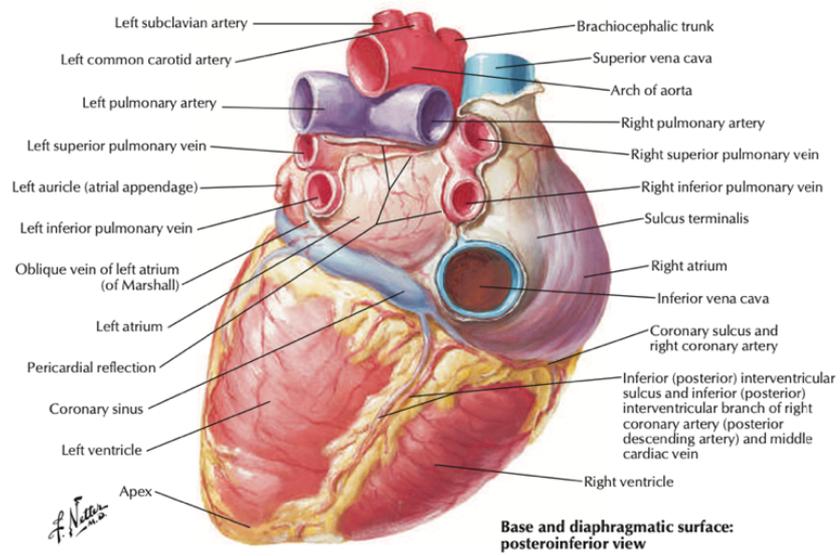


Figura 1: Il cuore. Vista posteroinferiore [2].

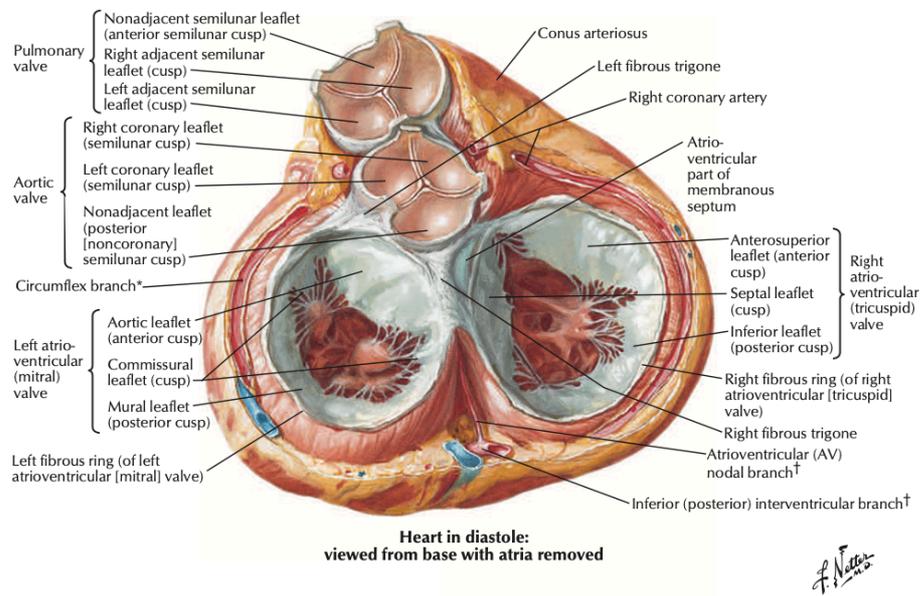


Figura 2: Vista dalla base del cuore in diastole, con atri rimossi [2].

Il meccanismo di pompa del cuore dipende da un sistema di conduzione costituito da tessuto miocardico modificato, detto *miocardio specifico*. Di questo sistema fanno parte: il nodo del seno, il nodo atrioventricolare, il fascio atrioventricolare e le sue diramazioni intraventricolari.

Il *nodo del seno o senoatriale*, situato nella parete dell'atrio destro, funziona come un vero e proprio *pacemaker*, in quanto origina e diffonde ritmicamente e autonomamente lo stimolo contrattile responsabile del battito cardiaco.

Il *nodo atrioventricolare (AV)*, situato sul lato destro della parte basale del setto interatriale, rallenta la conduzione elettrica per fare contrarre atri e ventricoli consequenzialmente [1].

Il *fascio atrioventricolare*, più comunemente conosciuto come *fascio di His*, si irradia dal nodo AV discendendo lungo il setto ventricolare e si divide in due rami, branca destra e sinistra, conducendo lo stimolo contrattile ai ventricoli [3]. Le due branche e i loro rami sono principalmente formate da cellule cardiache di conduzione, le *cellule di Purkinje*. Il sistema di conduzione completo è schematizzato in Figura 3.

Il ciclo cardiaco, o rivoluzione cardiaca, consiste invece nell'insieme dei fenomeni che avvengono tra un battito cardiaco ed un altro e dura poco meno di un secondo, circa 0.8 s. Viene diviso in due fasi principali, la *diastole* (rilassamento) e la *sistole* (contrazione), ed è caratterizzato dalla contrazione e riempimento delle camere e dall'apertura e chiusura delle valvole cardiache. Durante ogni battito, in condizioni normali, la gittata sistolica, o *stroke volume*, è di circa 70 ml e, con una frequenza di circa 75 battiti al minuto, la gittata cardiaca è di circa 5 L/min. La gittata cardiaca media oscilla tra i 5 e i 7 L/min, ma sotto sforzo può arrivare fino a 20 L/min.

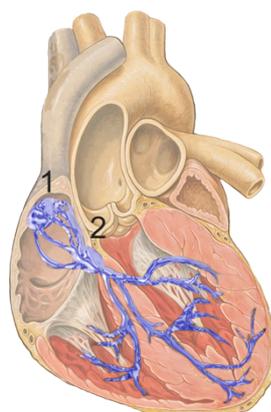


Figura 3: Il sistema di conduzione evidenziando il nodo senoatriale (1) e quello atrioventricolare (2).

## 1.2 LO SCOMPENSO CARDIACO

L'insufficienza cardiaca (HF) rappresenta la prima causa di morte in Italia e nel mondo e viene definita come una malattia multi-sistemica caratterizzata da disturbi della fisiologia cardiaca e da alterazioni funzionali e strutturali del miocardio, che influiscono negativamente sulle capacità di pompaggio del cuore [4]. Se non trattata può causare mancanza di respiro, affaticamento e stanchezza, gonfiore alle gambe, più gravemente dolore toracico e angina<sup>1</sup>, fino ad arrivare alla sindrome infartuale [5].

La gravità dello scompenso cardiaco viene classificata in base al grado di limitazione nello svolgimento dell'attività fisica: la New York Heart Association lo suddivide in quattro classi di gravità crescente [7]. La definizione delle classi si basa sui sintomi manifestati durante l'attività:

- Classe I: paziente asintomatico. L'attività fisica abituale non provoca dispnea né affaticamento.
- Classe II: scompenso cardiaco lieve. L'attività fisica moderata provoca dispnea o affaticamento.

---

<sup>1</sup> *Angina pectoris*: dolore toracico o retrosternale provocato dall'insufficiente ossigenazione del cuore a causa di una diminuzione temporanea del flusso sanguigno attraverso le arterie coronarie [6].

- Classe III: scompenso cardiaco da moderato a grave. L'attività fisica minima provoca dispnea o affaticamento.
- Classe IV: scompenso cardiaco grave. Astenia, dispnea o affaticamento presenti anche a riposo.

L'impatto dello scompenso cardiaco sulla società è ormai noto; in Italia è inquadrato come una patologia a larga prevalenza nella popolazione (circa il 2-3 % ogni anno), notevolmente maggiore se si considera un campione di individui anziani (intorno al 10-20 % nell'intervallo 70 - 80 anni) [8].

I tassi di ospedalizzazione registrati dal Ministero della Salute segnano circa 200.000 ricoveri/anno e la mortalità rimane elevata e tocca il 50 % a 2 anni nei soggetti con scompenso cardiaco grave, ed un tasso di riospedalizzazione pari al 31 %. Ne consegue quindi un costo unitario annuo per paziente di circa 11.000 euro, di cui l'85% solo per il ricovero, rappresentando l'1,4 – 2 % della spesa complessiva del Sistema Sanitario Nazionale [9]. Questo costo è destinato ad aumentare nei prossimi decenni a causa dell'invecchiamento della popolazione. È pertanto necessario promuovere delle corrette strategie di prevenzione e nuove ed efficaci terapie.

Tra il 2020 e il 2022 il numero di pazienti con patologie del sistema cardiovascolare e insufficienza cardiaca è aumentato in seguito allo svilupparsi alla pandemia da Covid – 19. Definendo la sindrome di “Long Covid” come sindrome clinica caratterizzata da sintomi che insorgono o persistono anche per settimane o mesi dopo la guarigione dal virus, si è visto un aumento nei casi di miocarditi e cardiomiopatie [10].

### **1.2.1 I TRATTAMENTI**

Il trattamento dei pazienti con insufficienza cardiaca attualmente segue diverse direzioni. La prima è la crescente convinzione che un paziente anziano, con patologie come ipertensione arteriosa, diabete mellito di tipo 2 e sindrome metabolica, abbia una maggiore probabilità di sviluppare lo scompenso cardiaco diastolico, conservando la funzione sistolica [11]. Alcuni trial clinici hanno dimostrato che in questi pazienti l'attività fisica e un controllo dei valori pressori, della glicemia e del peso corporeo

sono fondamentali nella prevenzione e nel trattamento. Fondamentali sono inoltre i trattamenti farmacologici con ACE – inibitori e beta – bloccanti, per migliorare il pompaggio del cuore; statine, per ridurre i livelli di colesterolo; diuretici, per eliminare l'eccesso di sodio ed equilibrare i livelli di potassio; anticoagulanti, per “fluidificare” il sangue e quindi ridurre il rischio di eventi tromboembolici [13]. La seconda direzione riguarda invece l'uso di trattamenti non farmacologici come la risincronizzazione cardiaca mediante l'impianto di pacemaker o defibrillatori cardiaci. Altri dispositivi di assistenza meccanica sempre più utilizzati sono i dispositivi di assistenza ventricolari (VAD) che possono essere per i singoli ventricoli o biventricolari; e il cuore artificiale totale (TAH). Il perfezionamento e la ricerca nell'ambito della progettazione e realizzazione di questi dispositivi sono essenziali per migliorare l'efficacia a lungo termine e la qualità di vita del paziente [13]. La terza direzione è collegata all'utilizzo di cellule staminali e terapie geniche per rigenerare il miocardio danneggiato. Studi scientifici hanno evidenziato come non tutte le cellule cardiache siano differenziate e che quelle staminali possono generare nuovi miociti e vasi sanguigni [12].

Nonostante le diverse e numerose terapie innovative per lo scompenso cardiaco, moltissimi giovani sono destinati a morire o a rimanere invalidi a causa di una cardiopatia grave. In questi pazienti con cardiopatia terminale la terapia di elezione, il *gold standard* della cardiocirurgia, rimane il trapianto di cuore.

### **1.2.2 IL TRAPIANTO DI CUORE**

Il trapianto di cuore è un'operazione complessa di sostituzione dell'intero organo cardiaco e rappresenta la migliore soluzione per quei pazienti affetti da insufficienza cardiaca grave. I pazienti vengono selezionati in base ad alcuni criteri di accettazione che comprendono la prognosi di sopravvivenza inferiore a 1 – 2 anni, l'età biologica inferiore ai 55 – 60 anni, assenza di ipertensione polmonare irreversibile, adeguato supporto psicosociale, assenza di alcolismo, tossicodipendenza o condizioni che potrebbero interferire con il decorso postoperatorio [13].

La procedura dura diverse ore e consiste nell'espianto sia del cuore del donatore che del ricevente, resecando gli atri a livello della parete media, lasciando integre le connessioni delle vene polmonari con l'atrio sinistro e sezionando l'aorta e l'arteria polmonare sopra le rispettive valvole semilunari. Il cuore del donatore viene quindi rimosso e fermato con una soluzione cristalloide fredda, per poi essere raffreddato in una soluzione ghiacciata.

Negli ultimi anni è inoltre possibile mantenere il cuore del donatore battente in condizioni para – fisiologiche attraverso un innovativo sistema di perfusione, l'*Organ Care System Heart TransMedics* (Figura 4), attualmente usato in pochissimi centri nel mondo, che consente di ridurre il rischio di danno ischemico.



Figure 4: l'Organ Care System Heart TransMedics.

L'impianto dell'organo in posizione ortotopica inizia con le anastomosi a livello atriale a partire dal setto interatriale, e collegando quindi il resto dei vasi [13].

Il decorso postoperatorio è caratterizzato dall'inizio della terapia immunosoppressiva, per evitare il rigetto, e dalla necessità di supporto cronotropo del nodo senoatriale nei primi giorni, solitamente con il posizionamento di un pacemaker temporaneo o con l'infusione di isoproterenolo.

Tra le complicanze del trapianto, oltre al rigetto, si può avere insufficienza renale, infezioni, neoplasie, vasculopatia.

La sopravvivenza media dell'adulto trapiantato è attualmente di 10,7 anni, con l'82 % a 1 anno e il 62 % a 5 anni. La più alta incidenza di mortalità si verifica nei primi 6 mesi post trapianto, mentre dopo il primo anno la decresce del 3,4 % ogni anno [14].

Il primo trapianto di cuore da uomo a uomo al mondo è stato eseguito dal Dr. Christiaan Barnard nel 1967 a Città del Capo, in Sud Africa; il paziente, tuttavia, morì 18 giorni dopo per una polmonite. In Italia il pioniere del trapianto di cuore fu il Prof. Vincenzo Gallucci (Figura 5) che nel 1985, presso l'Ospedale di Padova, operò il paziente Ilario Lazzari affetto da cardiomiopatia dilatativa. Lazzari morirà nel 1992 per un'infezione broncopolmonare causata da AIDS, a causa di una trasfusione di sangue infetto.

A gennaio 2022, nell'Ospedale dell'Università del Maryland (USA) è stata posta una nuova pietra miliare nella cardiocirurgia, con il primo trapianto al mondo di cuore di maiale geneticamente modificato, per diminuire le possibilità di rigetto. Il paziente, nonostante l'operazione riuscita e l'assenza di rigetto, morirà due mesi più tardi.



Figura 5: Il prof. Vincenzo Gallucci e il primo trapiantato di cuore in Italia, Ilario Lazzari.

### 1.3 DISPOSITIVI DI ASSISTENZA AL CIRCOLO

Quando la terapia medica farmacologica fallisce e il cuore non è più in grado di garantire un'adeguata portata cardiaca, si può ricorrere a dispositivi di assistenza meccanica al circolo. L'utilizzo di tali dispositivi negli ultimi decenni è aumentato notevolmente soprattutto per la carenza di donatori di cuore e per l'avanzamento tecnologico e scientifico in questo settore. Possono essere utilizzati sia come terapia definitiva (destination therapy, DT) e sia come attesa al trapianto (bridge to transplant, BTT).

Per garantire assistenza meccanica si possono applicare i dispositivi di assistenza ventricolare (VAD) e il cuore artificiale totale (TAH).

#### 1.3.1 VAD

I dispositivi di assistenza ventricolare (VAD) sono pompe meccaniche usate nei pazienti con scompenso cardiaco refrattario alla terapia medica. Possono essere supporti al solo ventricolo sinistro (LVAD) o destro (RVAD) o biventricolari (BiVAD). Il primo dispositivo fu impiantato nel 1963 dal dottor DeBakey, il quale lo inserì nel torace sinistro di un paziente connettendo l'atrio sinistro con l'arteria aortica discendente [13].

Negli anni si sono succedute diverse tecnologie, e oggi funzionano come pompe ausiliarie che generano un flusso continuo di sangue che viene prelevato dal ventricolo malato e direttamente pompato in aorta o arteria polmonare. I VAD sono alimentati da batterie collegate attraverso un cavo percutaneo in uscita dall'addome, chiamato *driveline*; il cavo consente il collegamento ad un computer, il *controller*, che gestisce il funzionamento del dispositivo e ne monitora i parametri. Le batterie ed il controller si portano in una piccola valigetta, dal peso totale di circa 1,5 Kg.

Nel corso degli ultimi decenni si sono sviluppati diverse tipologie di assistenze ventricolari, che si distinguono a seconda del flusso, delle modalità di impianto, delle dimensioni, della presenza di valvole e dal tipo di azionamento:

- La prima generazione di VAD è caratterizzata da un flusso pulsatile e di conseguenza dalla presenza di valvole cardiache, da azionamento pneumatico o elettromeccanico, da dimensioni molto grandi con un peso elevato. I dispositivi erano inoltre molto rumorosi e costituiti da un'unità motrice esterna che limitava i movimenti del paziente. Tra gli esempi di questa generazione vi sono il Thoratec pVAD (Thoratec Laboratories Corporation, CA, USA), il Novacor (World Heart Corporation, CA, USA), il LionHeart LVD2000 (Arrow International, PA, USA) e l'HeartMate IP100, VE e XVE (Thoratec Laboratories Corporation, CA, USA) [15].
- La seconda generazione è invece definita dalla presenza di flusso continuo assiale, di un rotore e da dimensioni ridotte. A questo gruppo appartengono l'HeartMate II (Thoratec Laboratories Corporation, CA, USA), il Jarvik 2000 (Jarvik Heart, NY, USA) e il DeBakey VAD (MicroMed, TX, USA) [15].
- La terza generazione di VAD include invece una pompa a flusso continuo centrifugo con una girante (*impeller*) sospesa a levitazione magnetica o idrodinamica. L'assenza di contatto meccanico riduce notevolmente il rischio di usura e di generazione di calore. Esempi di questi VAD sono il VentrAssist (Ventracor, Sydney, Australia), DuraHeart (Terumo, MI, USA), HVAD (HeartWare Corporation, FL, USA), l'EVAHEART (Sun Medical Technology Research Corporation, Negano, Japan) e l'HeartMate III (Figura 6) con tecnologia MagLev (Abbott Laboratories, IL, USA) [15][17].



Figura 6: HeartMate III di Abbott.

Tra le prospettive future dei dispositivi di assistenza ventricolare vi è sicuramente il CoreWave VAD (CoreWave, Parigi, Francia), non ancora in commercio, caratterizzato da una nuova tecnologia: la *wave membrane* (Figura 7).

La *wave membrane* è una tecnologia biomimetica ispirata al movimento ondulatorio degli animali marini. Questo movimento permette agli animali di muovere il fluido e spingerli attraverso l'acqua. Nelle pompe CoreWave, una membrana polimerica riproduce un'interazione simile ma invertita, la membrana è fissa e il fluido (il sangue) viene spinto. La pompa ha un'attuazione elettromagnetica e genera delle oscillazioni alla membrana e propaga l'onda lungo la membrana stessa permettendo la propulsione di sangue [18].

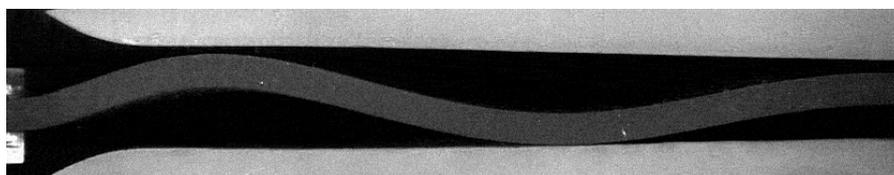


Figura 7: *Wave membrane* della CoreWave.

I criteri emodinamici per l'impianto dei VAD sono: indice cardiaco  $< 2 \text{ l/min/m}^2$ , pressione sistolica  $< 80 \text{ mmHg}$  nonostante supporto inotropo, pressione capillare polmonare  $> 20 \text{ mmHg}$  e terapia medica massimale comprendente farmaci inotropi e IABP<sup>2</sup> [16].

Gli eventi avversi correlati all'impianto di VAD sono ben conosciuti e comprendono sanguinamenti, scompenso cardiaco destro, sepsi e complicanze tromboemboliche.

### 1.3.2 TAH

Il cuore artificiale totale (TAH) è stato sviluppato come alternativa al trapianto e consiste nella sostituzione totale dell'organo con un dispositivo meccanico.

La ricerca sul cuore artificiale ha avuto inizio nel 1935 quando l'ingegnere aeronautico Charles Lindebergh realizzò la prima pompa a perfusione che consentiva la circolazione del sangue durante interventi chirurgici, dimostrando così, insieme al chirurgo Alexis Carrell, che un dispositivo totalmente realizzato dall'uomo era in grado di mantenere in vita l'organismo.

Soltanto nel 1969 però si è arrivati al primo impianto di cuore artificiale sull'essere umano; l'operazione fu eseguita su un paziente di 47 anni che rimase in vita per 3 giorni in attesa di un cuore trapiantabile. Il dispositivo è stato realizzato dai medici Domingo Liotta e Denton Cooley e prende proprio il nome di Liotta – Cooley TAH, un cuore artificiale di poliestere e silicone connesso ad un compressore esterno [20][21]. Un ulteriore passo verso il successo avvenne nel 1982 quando il fisico Robert Jarvik sviluppò ed applicò un nuovo dispositivo costituito da due pompe in poliuretano (Jarvik 7 TAH) alimentate da un compressore, pesante circa 180 Kg e così ingombrante da impedire le dimissioni del paziente, il quale morì 112 giorni dopo l'intervento.

---

<sup>2</sup> IABP (*IntraAortic Balloon Pump*), contropulsatore aortico: dispositivo meccanico per il ventricolo sinistro del cuore costituito da un catetere con palloncino che viene collocato nell'aorta ed è collegato ad un dispositivo esterno che permette di gonfiare e sgonfiare il palloncino in sincronia con l'attività del cuore; viene gonfiato durante la diastole e sgonfiato durante la sistole. Il dispositivo riduce il carico di lavoro del cuore, permettendogli di pompare più sangue.

In seguito, lo scienziato fondò la Jarvik Heart che in tempi brevi realizzò il dispositivo di assistenza ventricolare sinistra a ricarica wireless, Jarvik 2000, impiantato per la prima volta nel 2018 in Kazakistan [20].

Nel 1990 iniziò invece la realizzazione del TAH AbioCor, dall'azienda statunitense AbioMed, Inc., con sistema pulsatile elettroidraulico e in grado di pompare fino a 10 L/min di sangue e di mantenere pressioni normali nel circolo ematico. Totalmente impiantabile e costituito da una batteria ricaricabile internamente e da un sistema di controllo elettronico interno e una batteria esterna. L'utilizzo di un sistema transcutaneo di trasmissione dell'energia elettrica elimina la necessità di avere tubi o guide connesse ad una fonte esterna, riducendo in tal modo il rischio di infezioni. Fu impiantato per la prima volta nel 2001 in un paziente escluso dalla lista trapianti [19].

Bisogna però aspettare il CardioWest TAH dell'azienda SynCardia (dalla quale poi prenderà il nome) per avere il primo cuore artificiale totale approvato dall'FDA e con marchio CE. Il SynCardia, (Figura 8), è un'evoluzione del Jarvik – 7, pressoché identico ad eccezione dei tubi di trasmissione dell'aria più piccoli e di un computer portatile aggiornato. È costituito da due camere indipendenti, separate da un diaframma in poliuretano, che controllano il flusso sanguigno attraverso quattro valvole a monodisco (SynHall). Oggi è commercializzato in due versioni, quella da 70 cc, con un volume di corsa massima di 70 mL e una gittata cardiaca fino a 9.5 L/min, ed una più piccola, per donne e adolescenti, da 50 cc, con un volume di 70 mL ed una gittata di 7.5 L/min.



Figura 8: SynCardia TAH in versione 70cc (a sinistra) e 50cc (a destra).

Il SynCardia TAH, grazie alla sua elevata affidabilità, rimane uno dei cuori artificiali più impiantati al mondo, con un tasso di sopravvivenza tra il 72 e l'86% ad un anno dall'intervento.

In Italia è stato impiantato per la prima volta nell' Azienda Ospedale Università di Padova nel 2007, dal Professor Gino Gerosa; il paziente riuscì a sopravvivere per quattro anni prima di ricevere un cuore umano, diventando così la persona che ha vissuto più a lungo con un cuore artificiale totale.

Un grande passo avanti venne fatto quando, nel 2008, l'azienda francese CARMAT, grazie alla guida del cardiocirurgo Alain Carpentier, ha annunciato un innovativo cuore artificiale totale, basato su tre aspetti fondamentali [22]:

- biocompatibilità: le superfici a contatto con il sangue sono totalmente realizzate con materiali bio ed emo – compatibili, riducendo notevolmente il rischio di trombosi;
- pulsatilità: il dispositivo è dotato di due pompe elettroidrauliche che riproducono le fasi di sistole e diastole e contiene quattro valvole biologiche per regolare il flusso di sangue;
- auto – regolazione: è un dispositivo intelligente, che grazie all'integrazioni di sensori e di intelligenza artificiale, è in grado di adattarsi ai bisogni fisiologici del paziente.

Il CARMAT TAH (Figure 9 e 10) pesa circa 850 g e ha un volume di 750 mL, è stato impiantato per la prima volta nel 2013 a Parigi, in Francia, ha ricevuto l'approvazione CE nel dicembre 2020.

Se i primi prototipi erano per lo più ideati per fornire assistenza alla circolazione dall'esterno, oggi la nuova frontiera per la ricerca biomedica è rappresentata dallo sviluppo di dispositivi che mirano a sostituire permanentemente il cuore umano nella sua funzione di pompa.

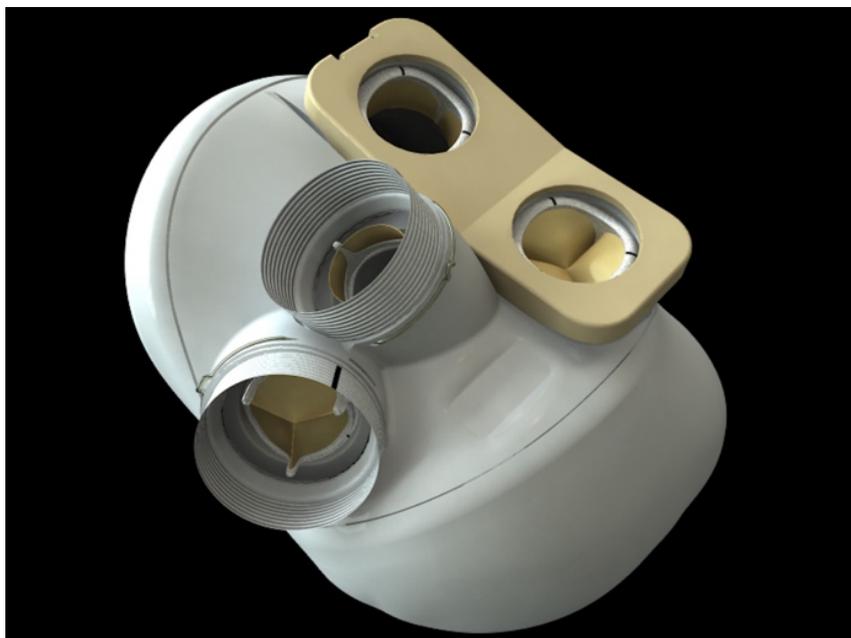


Figura 9: CARMAT TAH.

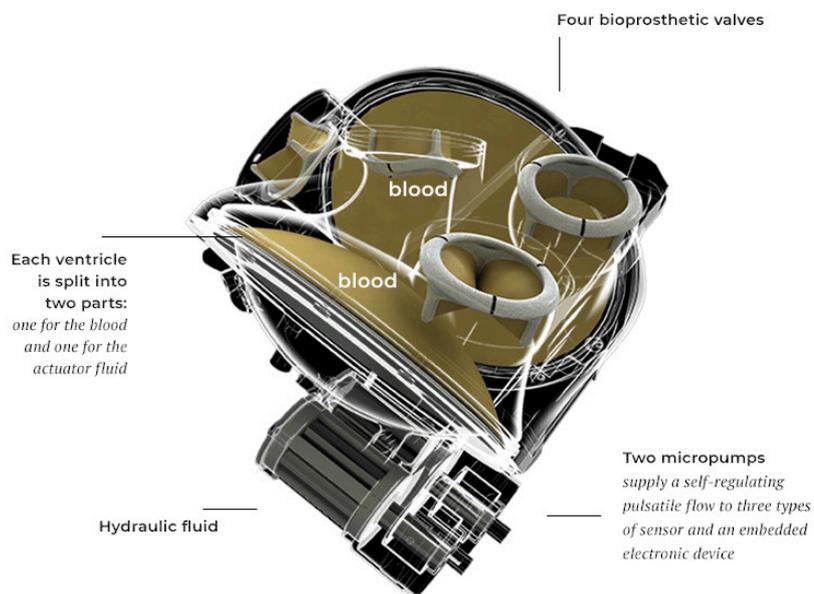


Figura 10: L'interno del cuore artificiale francese.

Le ricerche per un nuovo cuore artificiale totale che sia in grado di soddisfare requisiti come la biocompatibilità, l'efficienza di pompaggio, la totale impiantabilità, le dimensioni ed il peso adeguati, la migliore qualità di vita del paziente, stanno procedendo in tutto il mondo; ad esempio un dispositivo è in fase di realizzazione da parte dell'azienda svedese Scandinavian RealHeart AB, che ad inizio 2023 dovrebbe iniziare i primi trials clinici (Figura 11), oppure il cuore in silicone stampato in 3D dall'università di Zurigo, in Svizzera, su cui è in corso da anni una sperimentazione.

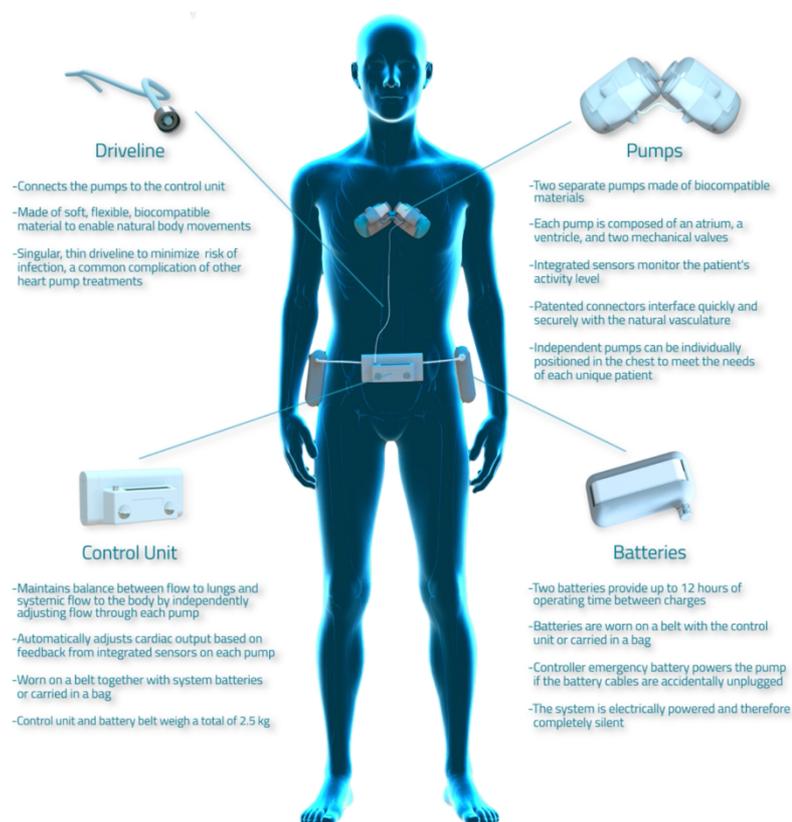


Figura 11: RealHeart TAH svedese e le sue caratteristiche principali.

I criteri di inclusione per l'impianto di un TAH sono [24]:

- pazienti inseriti in lista di attesa per il trapianto cardiaco con condizioni cliniche che possono metterli in pericolo di vita nelle 48 ore successive o che rischiano di diventare ineleggibili al trapianto;
- indice cardiaco < 90 mmHg o pressione venosa centrale > 18 mmHg e/o 2 farmaci inotropi;
- resistenze vascolari polmonari < 8 unità Wood;
- assenza di infezioni sistemiche;
- assenza di insufficienza epatica o renale;
- livello di anticorpi citotossici <10%.

## ***2 NUOVO CONCEPT DI CUORE ARTIFICIALE***

La carenza, sempre più marcata, di donatori di organi e l'aumento del numero di pazienti che soffrono di scompenso cardiaco terminale, hanno portato ad un'accelerazione nella ricerca di nuovi dispositivi artificiali in grado di assistere o sostituire completamente le funzionalità del cuore. Ad oggi, come già menzionato in precedenza, diversi gruppi di ricerca nel mondo sono al lavoro per sviluppare e realizzare un nuovo cuore artificiale totale. In questo capitolo verranno esaminati i requisiti fondamentali che devono essere richiesti ad un TAH innovativo e verrà presentato il progetto "Heart-Up" frutto della collaborazione tra il Dipartimento di Ingegneria Industriale e il centro di cardiocirurgia "V. Gallucci" dell'Università degli Studi di Padova.

### **2.1 REQUISITI FONDAMENTALI**

Le caratteristiche di progetto, da valutare in fase di realizzazione e prototipizzazione del nuovo cuore totale artificiale, devono rispondere a requisiti in termini di geometria, funzione e biocompatibilità.

Se si prende in considerazione un TAH, le componenti principali possono essere suddivise in cinque sistemi principali, come è stato evidenziato già nel 1972 da Tetsuzo Akutsu [25]:

- la fonte di energia;
- il sistema di controllo e di funzionamento;
- il sistema di conversione dell'energia;
- l'attuatore;
- le parti a contatto con il sangue.

Considerando queste componenti come essenziali, bisogna tenere conto di alcuni vincoli da imporre al dispositivo [26]:

- per quanto riguarda le dimensioni (Figura 12): l'altezza non deve superare i 120 – 130 mm, la larghezza e la profondità non devono invece andare oltre gli 80 – 90 mm;
- il peso deve essere accettabile (inferiore a 800 grammi);
- il dispositivo deve essere impiantabile in un'ampia tipologia di pazienti, con sesso ed età differenti;
- pulsatilità del flusso;
- silenzioso e totalmente impiantabile, senza necessitare di batterie esterne e *drivelines*;
- l'alimentazione deve essere integrata ed avere un'autonomia prolungata;
- la portata deve essere di almeno 6 – 8 L/min;
- applicabilità sia come BTT e sia come DT;
- microelettronica integrata e intelligente, in grado di regolare autonomamente i parametri di funzionamento, in base ai bisogni fisiologici del paziente;
- resistenza a fenomeni di fatica meccanica e alla degradazione dei materiali;
- la procedura chirurgica deve risultare semplice sia per l'impianto che per l'espianto;
- non deve necessitare di una importante terapia anticoagulante e antiaggregante, e quindi va realizzato con materiali ibridi in modo tale da garantire adeguata biocompatibilità, in particolare emocompatibilità;

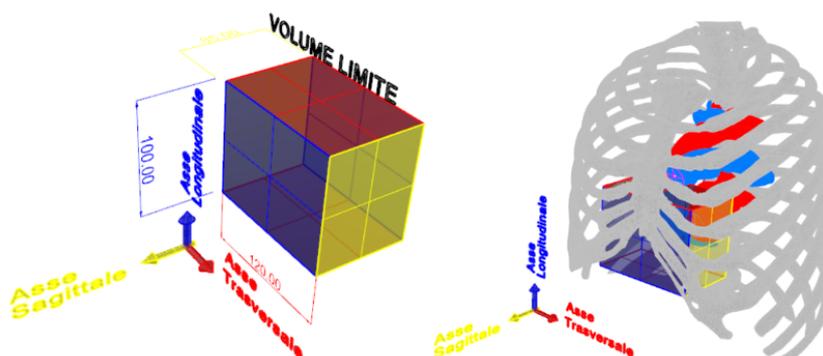


Figura 12: Ingombro stimato del TAH rispetto alla cassa toracica di un paziente tipo.

## 2.2 IL PROGETTO PADOVANO HEART – UP

L'obiettivo del progetto padovano, guidato dal cardiocirurgo Prof. Gino Gerosa, è quello di sviluppare una nuova camera ventricolare che sia in grado di soddisfare i requisiti definiti nel precedente paragrafo, e soprattutto che, oltre a garantire la sopravvivenza dei pazienti impiantati, permetta una adeguata qualità di vita.

Nelle prime fasi della ricerca sono state individuate le specifiche di progetto:

- il nuovo dispositivo deve avere un peso contenuto, al di sotto di un chilogrammo e avere un ingombro tale da garantire l'impiantabilità al più ampio numero di persone;
- deve fornire una portata media di circa 8 L/min per un numero di battiti accettabile (intorno ai 70 bpm);
- deve essere in grado di adattarsi ai bisogni fisiologici del paziente, e quindi va integrato con sensori e sistemi di intelligenza artificiale;
- deve essere azionato da un attuatore elettromagnetico;
- deve essere costituito da materiali ibridi ed emocompatibili, per garantire la compatibilità ed evitare l'uso di terapie anticoagulanti e antiaggreganti, inoltre deve prevedere l'uso di valvole cardiache biologiche (vedere paragrafo 2.3).

Nel corso degli anni sono state sviluppate diverse geometrie di camera ventricolare per valutare l'effettiva portata cardiaca. A seguito di successive correzioni, la più recente configurazione (Figure 13 e 14) è stata sviluppata presso il Dipartimento di Ingegneria Industriale dell'Università di Padova, attraverso l'utilizzo del software CAD Rhinoceros. È stata realizzata attraverso stampa 3D e colata di gomma siliconica trasparente Cristal Rubber, per poter procedere ad una prima fase di prove a banco.

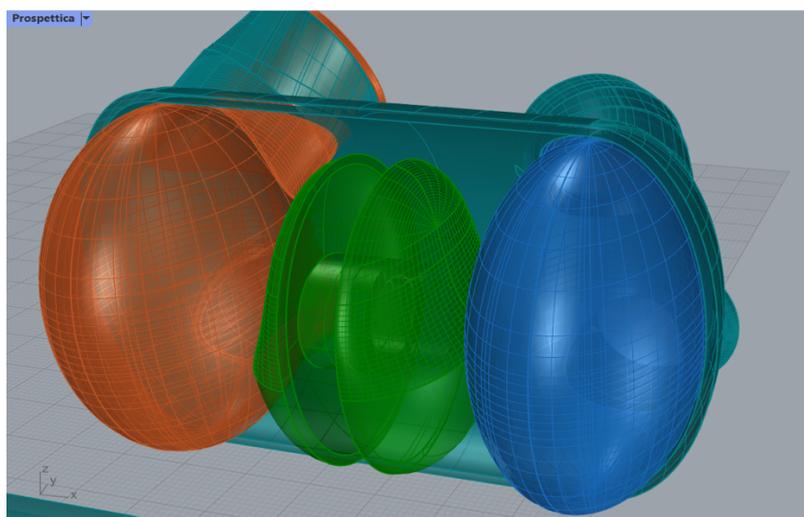


Figura 13: Render finale del prototipo di TAH, composto dalle due camere ventricolari (arancione e blu), attuttore elettromagnetico (verde) e lo *châssis* (verde acqua).

Le prove a banco, per valutare il funzionamento fluidodinamico ed in particolare misurare la portata, sono state effettuate utilizzando il *Pulse Duplicator*, modificato appositamente per la camera artificiale, in dotazione al Laboratorio di Idraulica del Dipartimento di Ingegneria Civile, Edile e Ambientale, dell'Università di Padova.

Dai primi risultati preliminari delle prove, si registra una portata di circa 4 L/min per una frequenza di 80 bpm. Saranno però necessarie prove successive per ottimizzare al meglio il sistema e la stessa camera ventricolare, in modo tale da registrare anche le pressioni in particolare all'interno della camera stessa, e avere dati più realistici e affidabili.



Figura 14: Vista dall'alto del prototipo del TAH. Si intravedono lo châssis, stampato in 3D in ABS (in rosso), la valvola cardiaca biologica di ingresso e la camera ventricolare in silicone.



Figura 15: Vista laterale del prototipo del TAH. Si vede la camera ventricolare in silicone e i connettori usati per le prove a banco.



Figura 16: Prova a banco della nuova camera ventricolare.

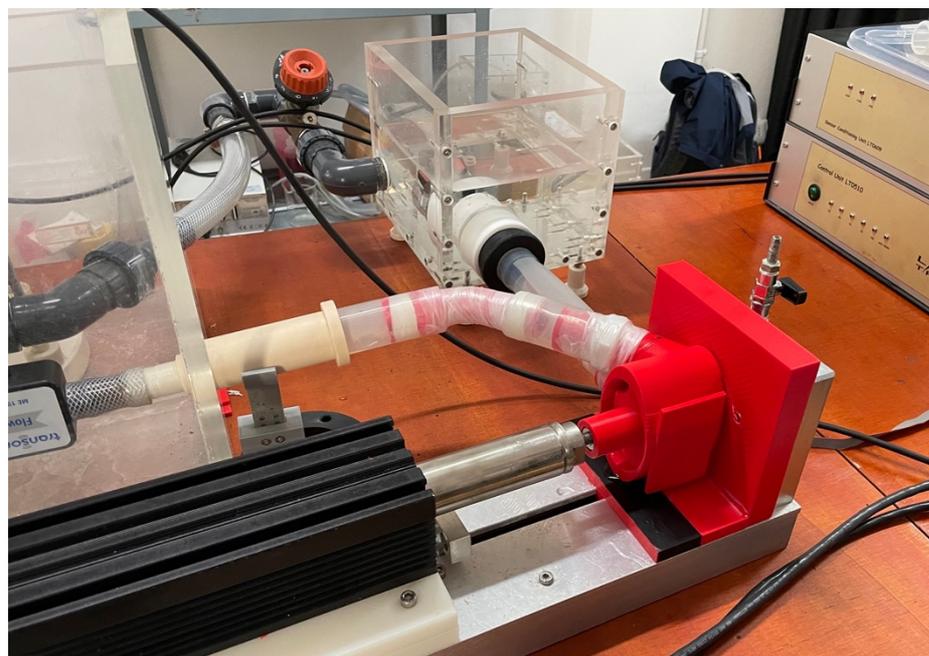


Figura 17: Il prototipo di TAH durante la prova.

### 2.3 EMOCOMPATIBILITÀ E MATERIALI IBRIDI

L'aspetto più importante da considerare quando si hanno materiali a contatto con il sangue è l'emocompatibilità. In generale, quando una superficie estranea entra in contatto con l'organismo, inevitabilmente si attiva la *Foreign Body Reaction* (FBR): si tratta di un sistema difensivo che porta allo sviluppo di processi infiammatori che possono infine dare luogo alla formazione di una capsula fibrotica. Quando poi un materiale estraneo entra in contatto con il sangue, si attivano meccanismi in cascata che possono condurre alla formazione di trombi secondo una serie di eventi quali:

1. adsorbimento di proteine plasmatiche;
2. attivazione dei sistemi di complemento e della coagulazione;
3. adesione di componenti cellulari (piastrine, monociti e granulociti);
4. formazione di fibrina.

Le norme internazionali ISO 10993 stabiliscono proprio i protocolli da seguire per la valutazione di dispositivi medici a contatto con il sangue.

L'obiettivo è quindi quello di usare materiali bio ed emo – compatibili per evitare reazioni avverse che da un lato compromettano il corretto funzionamento del dispositivo e dall'altro mettano a rischio la salute del paziente.

Uno degli aspetti maggiormente innovativi del progetto “Heart – Up” è proprio l'utilizzo di componenti ibridi, costituiti da materiali polimerici biocompatibili e tessuti biologici. Questa tecnica non è del tutto nuova, ma riprende l'utilizzo di una membrana ibrida per la realizzazione delle membrane flessibili a contatto con il sangue del cuore totale artificiale CARMAT, nella quale vengono accoppiati un polimero sintetico poliuretano e pericardio bovino trattato con glutaraldeide [27]. Questo reagente è infatti molto efficace per la riduzione dell'antigenicità e per la devitalizzazione del tessuto biologico, eliminando le cellule e sterilizzandolo, ma risulta essere citotossico e prone alla calcificazione, e di conseguenza limitandone notevolmente la durabilità del materiale

Si è quindi preferito utilizzare tessuti biologici (pericardio bovino e porcino), decellularizzati secondo un preciso protocollo che verrà descritto nel Capitolo 3, in particolare pericardio bovino e porcino, accoppiati con un policarbonato uretano.

L'utilizzo di tessuti decellularizzati, oltre ad evitare l'uso di reagenti citotossici, dovrebbe garantire anche la ricellularizzazione con cellule del paziente, una volta impiantato.

## 3 MEMBRANE IBRIDE

### 3.1 PREMESSA

Un materiale ibrido è generalmente ottenuto accoppiando un polimero sintetico con un tessuto biologico. Il primo serve a conferire resistenza meccanica al costruito, mentre il secondo a garantire adeguata biocompatibilità, e, se possibile, a promuovere la ricellularizzazione.

Presso il Laboratorio di Bioingegneria Chimica dell'Università di Padova, nel corso degli anni recenti sono state sviluppate quattro tipologie di membrane ibride, realizzate dall'accoppiamento di un policarbonato uretano, il ChronoFlex, con pericardio di origine animale decellularizzato:

- HYME DBP – CFAR: pericardio bovino decellularizzato e ChronoFlex AR;
- HYME DBP – CFARLT: pericardio bovino decellularizzato e ChronoFlex ARLT;
- HYME DPP – CFAR: pericardio porcino decellularizzato e ChronoFlex AR;
- HYME DPP – CFARLT: pericardio porcino decellularizzato e ChronoFlex ARLT.

La differenza tra i due polimeri, venduti entrambi in soluzione di dimetilacetamide 122%, risiede nel fatto che il ChronoFlex ARLT contiene microparticelle di silice (circa 9%) per renderlo meno appiccicoso.

Precedenti valutazioni di carattere meccanico e biologico hanno portato alla selezione di una sola formulazione polimerica e di un solo tipo di pericardio: ChronoFlex ARLT e pericardio porcino.

In particolare, attraverso prove meccaniche cicliche della durata di 3600 secondi, con un range di 3500 – 4500 cicli, per valutare il comportamento a fatica, sono stati determinati i valori del modulo di Young ( $E$  [MPa]), di *Failure Strain* (FS [%]) e *Ultimate Tensile Strength* (UTS [MPa]), sia delle quattro membrane ibride sia dei componenti singoli (pericardio decellularizzato, pericardio nativo e polimero).

In questo modo si è riusciti a comprendere se le HYME subiscono o meno delle variazioni delle loro proprietà meccaniche per effetto della fatica [28].

Nella Tabella 1 sono visibili i valori pre – e post – fatica, con le relative deviazioni standard, delle quattro tipologie di HYME prodotte. Come si può osservare le membrane realizzate con DPP e CFARLT non mostrano particolari differenze significative, candidandosi così come membrane più adatte alla realizzazione delle camere ventricolari [28].

	FS ± SD (PRE)	FS ± SD (POST)	UTS ± SD (PRE)	UTS ± SD (POST)	E (1-10%) ± SD (PRE)	E (1-10%) ± SD (POST)
<b>NPP</b>	75.41 ± 29.22	37.06 ± 3.70	14.14 ± 3.84	17.42 ± 6.76	16.19 ± 8.01	26.46 ± 7.83
<b>DPP</b>	100.6 ± 28.49	36.60 ± 3.93	20.21 ± 6.19	16.35 ± 4.82	13.71 ± 3.96	40.81 ± 9.22
<b>CF-AR</b>	1341.00 ± 71.70	1083 ± 69.16	20.91 ± 10.01	18.81 ± 1.24	3.88 ± 1.16	4.71 ± 0.39
<b>CF-ARLT</b>	1343.00 ± 82.78	1091 ± 84.78	23.55 ± 10.18	15.27 ± 1.80	9.19 ± 5.14	9.75 ± 1.63
<b>DPP-AR</b>	54.40 ± 13.69	47.80 ± 10.84	9.71 ± 1.70	8.70 ± 3.83	6.03 ± 2.93	8.76 ± 3.27
<b>DPP-ARLT</b>	62.33 ± 18.56	62.35 ± 5.23	10.73 ± 3.91	10.66 ± 4.44	8.76 ± 4.37	8.270 ± 3.80
<b>DBP-AR</b>	110.00 ± 34.14	65.13 ± 7.38	15.28 ± 3.73	10.60 ± 1.61	5.35 ± 2.38	4.83 ± 2.13
<b>DBP-ARLT</b>	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 1: Valori di E (al 10%), FS e UTS, pre – e post – fatica delle diverse HYME prodotte: sono evidenziate la membrana DPP – ARLT [28].

## 3.2 MATERIALI E METODI

In questo paragrafo saranno presentati i materiali e i metodi utilizzati per la realizzazione delle membrane ibride composte da DPP e CFARLT, che verranno successivamente utilizzate per la formulazione di un modello costitutivo.

### 3.2.1 PERICARDIO

Il pericardio è definito come un sacco fibroso che riveste il cuore e il peduncolo vascolare, separandolo dall'esterno (Figura 18). Il tessuto pericardico è importante per la protezione dell'organo cardiaco da agenti patogeni esterni, riducendo quindi il rischio di infezioni. Dal punto di vista morfologico, la base del pericardio poggia sulla cupola diaframmatica, la faccia anteriore si prolunga dietro ogni lato fino all'ilo del polmone, la faccia posteriore è rivolta verso la colonna vertebrale, mentre l'apice tronco abbraccia il peduncolo vascolare aderendo alla tonaca avventizia dei vasi sanguigni che lo compongono [1].

Il sacco pericardico rimane in sede per mezzo di tralci fibrosi che lo uniscono agli organi vicini, ossia grazie ai legamenti del pericardio. I *legamenti sternopericardici* si dividono in superiori ed inferiori, il primo si distacca dalla parte superiore dello sterno e si perde sulla porzione superiore del sacco, mentre il secondo origina dalla base del processo xifoideo dello sterno e si prolunga sulla parte inferiore del pericardio. I *legamenti vertebropericardici* sono rappresentati da fasci fibrosi che si diramano dalla colonna vertebrale alla parte posteriore del tessuto. Infine i *legamenti frenopericardici*, che si distinguono in anteriore e laterali, destro e sinistro, sono brevi tratti fibrosi che rinforzano l'attacco del pericardio fibroso alla fascia diaframmatica.

Dal punto di vista strutturale, il tessuto pericardico ha due strati principali: uno sieroso ed uno fibroso.

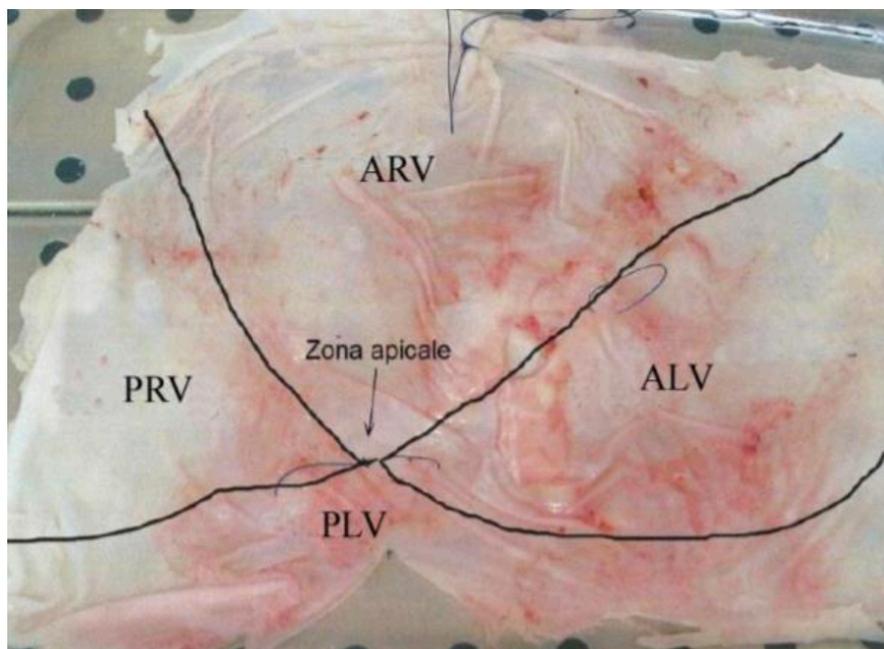


Figura 18: Tipica mappatura del pericardio porcino immediatamente dopo il prelievo dall'animale.. Si possono osservare l'apice e le quattro zone: PRV: *Posterior Right Ventricle*, PLV: *Posterior Left Ventricle*, ARV: *Anterior Right Ventricle*, ALV: *Anterior Left Ventricle*.

Lo *strato sieroso* è caratterizzato da cellule mesoteliali organizzate in modo da formare un epitelio pavimentoso semplice, ed è suddiviso in due foglietti, uno parietale ed uno viscerale, che separano la cavità cardiaca. In quest'ultima è contenuto il liquido pericardico che funge da lubrificante per gli spostamenti dell'organo durante l'attività contrattile [1].

Lo *strato fibroso*, invece, è costituito da tessuto connettivo denso, nel quale si possono identificare una componente cellulare, i fibroblasti, e una matrice extracellulare (ECM). I *fibroblasti*, che rappresentano la componente cellulare principale dei tessuti connettivi, sintetizzano e secernono le cellule della ECM: collagene (principalmente di tipo I e III), proteoglicani, glicoproteine, e i componenti macromolecolari delle fibre elastiche.

Nella ECM è possibile distinguere una *sostanza fondamentale amorfa*, che permette la diffusione delle sostanze nutritive e dei cataboliti, a cui appartengono proteoglicani e

glicoproteine; e le *proteine fibrillari*, fundamentalmente collagene ed elastina, che conferiscono elasticità e rigidità al tessuto [29].

Le proprietà biomeccaniche del pericardio, caratterizzato principalmente da un comportamento viscoelastico, non lineare e anisotropo, sono strettamente legate alla distribuzione ed orientazione dei fasci di fibre di collagene, i quali sono disposti secondo conformazioni irregolari nella matrice [26].

In Figura 19 è osservabile il comportamento delle fibre di collagene in risposta a sollecitazioni meccaniche a trazione.

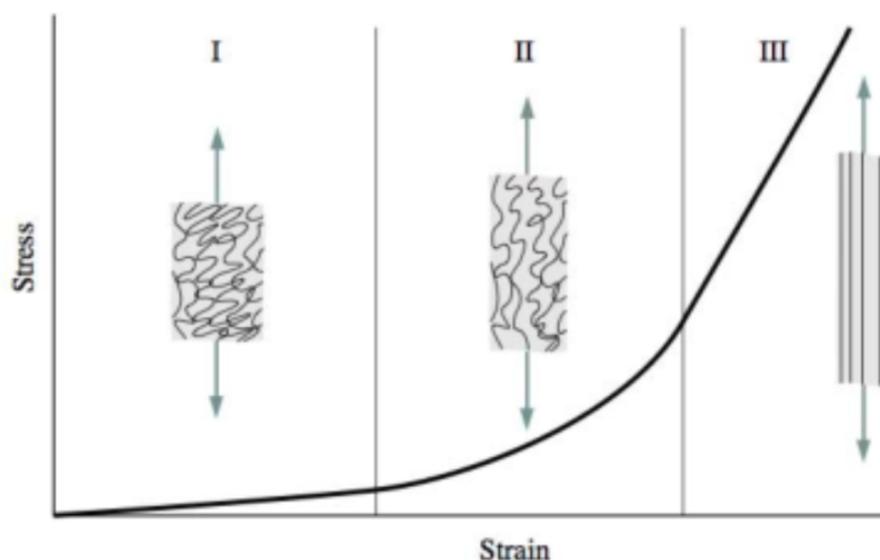


Figura 19: Comportamento meccanico del pericardio: I, regione elastinica; II, zona di transizione; III, regione collagenica.

### 3.2.2 DECELLULARIZZAZIONE

La decellularizzazione è un processo chimico – fisico che permette di isolare la matrice extracellulare di un tessuto o organo dalle sue cellule, lasciando uno scaffold di ECM, che potrà successivamente essere utilizzato per la rigenerazione di organi e tessuti bioingegnerizzati. I protocolli di decellularizzazione variano a seconda del tessuto utilizzato, ed includono una combinazione di approcci chimici, fisici ed enzimatici.

Generalmente si inizia con la lisi della membrana cellulare attraverso trattamenti fisici o soluzioni ioniche, seguite poi dalla separazione delle componenti cellulari, per mezzo di agenti enzimatici, dalla solubilizzazione delle componenti cellulari citoplasmatiche e nucleari, usando detergenti, ed infine dalla rimozione dei detriti dal tessuto [30].

Sono diversi i metodi utilizzati nei vari protocolli, in seguito sono brevemente descritti:

- **metodi fisici:** vengono utilizzati per facilitare il processo ed includono principalmente il congelamento e scongelamento, pressione diretta, sonicazione ed agitazione;
- **metodi chimici:**
  - trattamenti alcalini ed acidi. Utilizzati per solubilizzare le componenti citoplasmatiche e rimuovere gli acidi nucleici, come RNA e DNA. Ad essi appartengono l'acido acetico, peracetico, cloridrico, solforico e idrossido di ammonio;
  - detergenti non – ionici. Molto utilizzati soprattutto grazie al basso effetto sulla struttura dei tessuti. Permettono di disgregare i legami lipidi – lipidi e lipidi – proteine.<sup>[29]</sup> Uno tra i più utilizzati è stato il Triton X – 100, oggi ritirato dal mercato europeo a causa degli effetti tossici ed inquinanti;
  - detergenti ionici. Permettono la solubilizzazione di componenti citoplasmatici e delle membrane cellulare nucleari, ma tendono a denaturare le proteine, rompendo le interazioni proteine – proteine [30]. Tra questi vi sono il Triton X – 200, il sodio dodecil solfato (SDS) e il sodio desossicolato;
  - detergenti zwitteronici. Posseggono entrambe le proprietà dei detergenti ionici e non – ionici. Uno dei più utilizzati è il CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-pro-panesulfonate);
  - trattamenti ipotonici e ipertonici. Le soluzioni saline, permettendo il continuo rigonfiamento e restringimento delle cellule, portano alla lisi cellulare, sebbene non siano in grado di rimuovere i residui cellulari dal tessuto.

- **metodi biologici:**

- agenti enzimatici. Permettono di rimuovere cellule e residui nucleici. Tra questi si hanno la *nucleasi*, come la benzonase, che taglia le sequenze nucleotidiche; la tripsina, che è in grado di distruggere l'ultrastruttura del tessuto e quindi migliorare la penetrazione di altri agenti; la lipasi, e la collagenasi;
- agenti non enzimatici. Gli agenti chelanti aiutano nella dissociazione cellulare delle proteine isolando ioni metallici. Tra i più usati vi sono l'EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*) e l'EGTA (*ethylene glycol tetraacetic acid*).

Per valutare gli effetti della decellularizzazione, si ricorre ai criteri stabiliti in letteratura [31]:

- < 50 ng di dsDNA per mg di tessuto secco;
- lunghezza dei frammenti di DNA < 200 coppie di basi;
- materiale nucleare non visibile nel tessuto.

### DECELLULARIZZAZIONE DEL PERICARDIO PORCINO

Per questo progetto di tesi è stato utilizzato pericardio di origine porcina, precedentemente decellularizzato mediante il protocollo TERGICOL (Tergitol e Sodio Colato). Secondo tale procedura, il pericardio porcino viene dapprima pulito e rimuovendo i residui di grasso e tessuto connettivo. Per facilitare la rimozione della parte fibrosa, lo si immerge per un'ora e mezza in una soluzione fisiologica a 4°C in agitazione. In seguito, si comincia il trattamento come descritto in letteratura [26] [32]:

1. creazione di una soluzione di DMSO (dimetilsolfossido), IPA (inibitore della proteasi di tipo A), IPB (inibitore della proteasi di tipo B) e acqua MilliQ. In essa viene messo il pericardio e viene lasciato in agitazione per circa 6 ore;
2. lavaggio del pericardio con soluzione ipotonica per una notte;

3. si compone una soluzione di Tergitol, IPA, IPB, e acqua MilliQ, e vi si immerge il tessuto per 8 ore, mantenendo l'agitazione;
4. Nuovo lavaggio con soluzione ipotonica per una notte;
5. si immerge il pericardio in una soluzione di PBS, NaCl e Tergitol per 8 ore, in agitazione;
6. lavaggio con acqua MilliQ e Tergitol per un'ora e mezza;
7. lavaggio con soluzione salina e Tergitol per un'ora e mezza;
8. il pericardio viene messo in sodio colato, mantenendo un pH compreso tra 7.3 e 7.5, in agitazione, per 14 ore;
9. nuovi lavaggi in PBS, in soluzione NaCl e in acqua MilliQ;
10. utilizzo di Benzonase Nuclease, per 24 ore a 37°C, in agitazione;
11. quattro ulteriori lavaggi in soluzione salina, ogni 30 minuti.

L'ultima fase prevede il processo di sterilizzazione, che impiega circa 24 ore, a 37°C, e prevede l'uso di un cocktail di antibiotici e antimicotici e di acido paracetico.

Al termine del trattamento, il pericardio assume l'aspetto riportato in Figura 20.



Figura 20: Pericardio porcino decellularizzato. È possibile osservare le fibre di collagene.

### 3.2.3 PCU: IL CHRONOFLEX

I policarbonati uretani (PCU) rappresentano una nuova classe di materiali polimerici, ampiamente utilizzati in applicazioni mediche, soprattutto in dispositivi

cardiovascolari, grazie alla loro ottima compatibilità con il sangue [33]. Nonostante questo, la formazione di trombi è ancora possibile in seguito ad un contatto prolungato con il sangue, e di conseguenza nella loro applicazione reale può essere richiesta una terapia anticoagulante e antiaggregante, seppur limitata.

Tra i diversi marchi conosciuti, si è preso in considerazione il Chrono – Flex<sup>®</sup> (AdvanSource Biomaterial, Massachusetts, USA) da accoppiare al pericardio per la realizzazione della membrana ibrida. Questo polimero viene interamente sintetizzato in forma liquida, in solvente organico al 22% che può essere dimetilformammide (DMF) o dimetilacetammide (DMAC), mantenendo sempre il vantaggio intrinseco del policarbonato in termini di durabilità a lungo termine e resistenza allo stress [34]. Il Chrono – Flex<sup>®</sup> è commercializzato in due versioni, AR e AR – LT, che differiscono per la presenza, nel secondo caso, di particelle di silice (circa il 9%), che lo rendono meno appiccicoso (*low tackiness*, LT).

I PCU sono polimeri ideali in applicazioni che richiedono un'ottima resistenza alla flessione, come cuori artificiali, diaframmi o innesti vascolari [34].

L'utilizzo di un polimero con nanoparticelle di silice potrebbe avere lo scopo duplice di ridurre [35]:

- la bagnabilità: creando superfici idrofobiche ed aumentando la lavabilità del materiale con il sangue, e riducendo quindi possibili eventi trombotici;
- la permeabilità: la silice potrebbe far da barriera a molecole di gas o al plasma sanguigno.

Come spiegato nel paragrafo 3.1, si è optato per utilizzare il Chrono – Flex<sup>®</sup> AR – LT, per prestazioni migliori sia dal punto di vista meccanico che funzionale.

Per realizzare i provini di polimero per le successive prove meccaniche, si sono colati circa 20 ml di prodotto in un frame metallico di misura 50 x 50 mm<sup>2</sup>, per ottenere uno spessore finale di circa 1 mm, e sono stati riposti nel forno Vacuum Drying Oven (Figura 21) per un totale di 24 ore, ad una temperatura di 80°C e una pressione di circa -0.4 bar, al fine di rimuovere le bolle formatesi durante l'evaporazione del solvente.

Una volta estratte dal forno, sono state tagliate con un apposito strumento, per ottenere la classica forma “ad osso di cane” (Figura 22), per procedere alla successiva caratterizzazione.



Figura 21: Membrane di Chrono – Flex<sup>®</sup> AR – LT nel forno Vacuum Drying Oven.

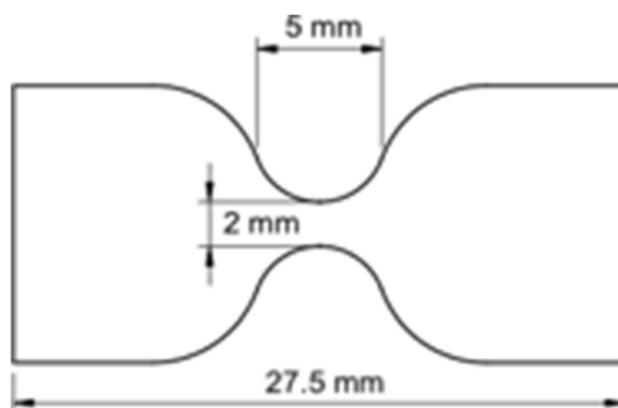


Figura 22: Quote del provino a forma di osso di cane.

### 3.2.4 HYME DPP – CFARLT

Come per la membrana polimerica in Chrono – Flex, è stato usato un frame metallico 50 x 50 mm<sup>2</sup> per realizzare il materiale.

Come primo passo è stato steso il tessuto decellularizzato sul fondo del frame metallico, in modo da avere la faccia sierosa a contatto col metallo e la faccia fibrosa esposta al polimero. La prima è più semplice da riconoscere in quanto più lucida e meno porosa. In questa maniera la parte sierosa sarà a contatto con il sangue e, una volta che la HYME verrà installata nel dispositivo, sarà ripopolata dalle cellule in circolo. Quindi è stato colato il polimero sul pericardio, usando una quantità di circa 20 ml, ed è stato riposto il tutto nel forno Vacuum Drying Oven, per circa 30 ore, ad una temperatura di 37°C ed una pressione di - 0.2 bar. È molto importante non superare i 39 - 40 °C di temperatura per non incorrere nella denaturazione delle proteine, e quindi danneggiare il tessuto biologico. A questo punto, attraverso la fustella per lo stampo, le membrane sono state tagliate a forma di “osso di cane” e sono state caratterizzate meccanicamente, come verrà descritto più dettagliatamente nel prossimo capitolo.

# ***4 CARATTERIZZAZIONE MECCANICA: FORMULAZIONE DI UN MODELLO COSTITUTIVO***

La caratterizzazione meccanica dei singoli componenti della membrana ibrida vale a dire polimero e pericardio decellularizzato, e della membrana ibrida nel suo complesso, ha il fine di formulare un modello costitutivo che sia in grado di descrivere correttamente il comportamento dei materiali, e che possa essere utilizzato per eseguire simulazioni computazionali su diverse configurazioni di camera ventricolare, per valutarne il comportamento meccanico e fluidodinamico.

In questo capitolo, dopo aver spiegato brevemente i materiali e i metodi utilizzati, verranno descritte le prove effettuate e il processo per arrivare a formulare un modello meccanico visco iper-elastico alla Ogden. La validazione del modello è stata eseguita attraverso simulazioni computazionali con il software *Abaqus/Standard*.

## **4.1 MATERIALI E METODI**

In questo paragrafo verranno descritti tutti i materiali e metodi utilizzati per le prove meccaniche, per la formulazione del modello costitutivo e per la sua validazione.

### **4.1.1 TRAMA**

Il sistema TRAMA (*Traction Machine*) è uno strumento progettato da I.R.S. (Ingegneria Ricerca Sistemi, Padova), per realizzare test meccanici monoassiali e biassiali a trazione su materiali tessuti biologici. Il sistema è dotato delle seguenti componenti [26]:

- quadro elettrico;

- quattro attuatori per eseguire le prove in trazione
- videocamera ad alta frequenza di acquisizione;
- terminale con monitor;
- software per impostare le prove e gestire la raccolta dati.

Il sistema (Figura 23) è caratterizzato da un telaio, quattro motori stepper dotati ciascuno di quattro organi di trasmissione, quattro slitte che permettono la deformazione del provino in trazione, quattro celle di carico per la misura della forza applicata, e quattro pinze (o rosti) per stabilizzare e bloccare il provino. La capacità massima della cella di carico è di 50 N, l'escursione massima delle slitte è di 48 mm con i rostri e 32 mm con le pinze.

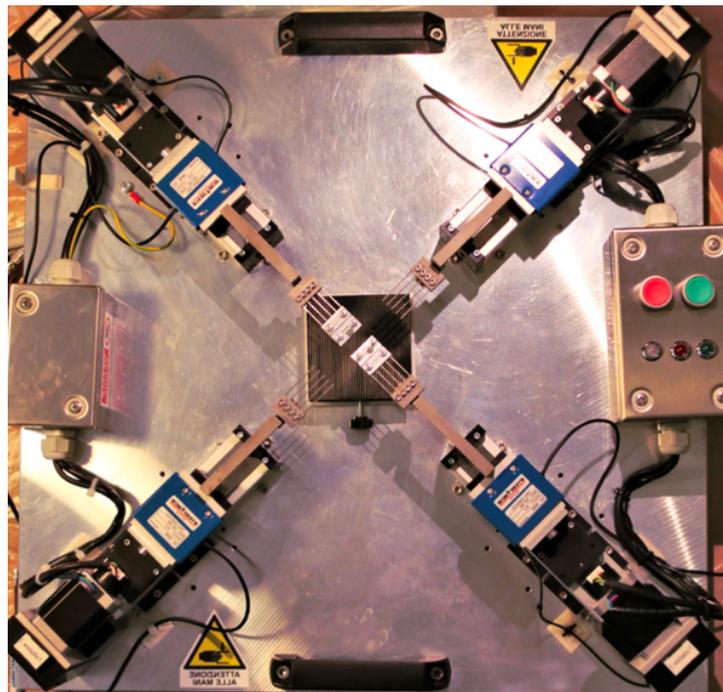


Figura 23: Vista dall'alto del sistema TRAMA.

#### 4.1.2 MATLAB

MatLab (abbreviazione di *Matrix Laboratory*) è una piattaforma di programmazione e calcolo numerico utilizzata per l'analisi di dati, lo sviluppo di algoritmi e la creazione di modelli. Per questo lavoro di tesi, MatLab è stato principalmente utilizzato per l'analisi dei dati delle prove di rilassamento delle tensioni e per ottenere i parametri viscoelastici del modello, attraverso la funzione *Curve Fitting Tool*.

#### 4.1.3 ABAQUS

Abaqus è un software di calcolo computazionale, per la modellazione e l'analisi agli elementi finiti. Permette di realizzare simulazioni computazionali ingegneristiche più o meno complesse. L'analisi completa consiste in tre steps principali: il *pre-processing* o *modeling*, che permette di preparare il file di input; il *processing* o *finite element analysis*, che comprende la preparazione e la simulazione da eseguire, ed infine il *post processing*, che permette di analizzare i risultati. In questo lavoro Abaqus è stato utilizzato per generare i parametri costitutivi del modello iperelastico e per validare il modello finale, confrontando i dati sperimentali con quelli numerici.

#### 4.1.4 MODELLO COSTITUTIVO IPERELASTICO ALLA OGDEN

L'iperelasticità permette di descrivere il comportamento elastico non lineare esibito da molteplici materiali in condizioni di grandi spostamenti e grandi deformazioni. I modelli iperelastici sono di conseguenza utili nella interpretazione del comportamento meccanico di materiali elastomerici e tessuti biologici. Per definire e identificare un modello costitutivo iperelastico bisogna innanzitutto specificare la funzione densità di energia di deformazione, per unità di volume di riferimento (nella configurazione iniziale) in funzione della deformazione; e successivamente ricavare il set di parametri costitutivi.

Ronald Rivlin e Melvin Mooney sono stati i primi a sviluppare modelli iperelastici, il modello Neo-Hookiano e quello alla Mooney Rivlin. Da allora sono stati sviluppati altri modelli, come quello alla Ogden, il modello di Arruda-Boyce e quello di Yeoh.

In questo progetto di tesi è stato inizialmente utilizzato il modello alla Ogden incomprimibile ad un parametro ( $N = 1$ ), già implementato nel software di simulazione FE *Abaqus*. Nella sezione “*Material*” e “*Evaluate*” è possibile, infatti, inserire i dati di tensione e deformazione di prove meccaniche, ottenendo i parametri costitutivi per il potenziale di energia di deformazione, ed eventuali instabilità presenti.

La funzione di densità dell’energia di deformazione del modello alla Ogden, in funzione delle deformazioni principali, implementata in *Abaqus*, è definita come segue:

$$W(\lambda_1, \lambda_2) = \sum_{i=1}^N \frac{\mu_i}{\alpha_i} (\bar{\lambda}_1^{\alpha_i} + \bar{\lambda}_2^{\alpha_i} - 3) + \sum_{k=1}^N \frac{1}{D_k} (J - 1)^{2k}$$

$\bar{\lambda}_i$  sono le deformazioni principali deviatoriche, con  $\bar{\lambda}_i = J^{-\frac{1}{3}} \lambda_i$ , dove  $\lambda_i$  sono le deformazioni principali;

$N$  è l’ordine del modello;

$\mu_i$  e  $\alpha_i$  sono i parametri del modello;

$D_k$  è il parametro di comprimibilità usato per descrivere la variazione di volume.

Nel caso di modello incomprimibile  $D_k = 0$ .

#### 4.1.5 MODELLO VISCOELASTICO

La viscoelasticità è una caratteristica dei materiali che mostrano proprietà meccaniche tempo dipendenti. Il comportamento viscoelastico è tipico di gomme, polimeri e in particolare tessuti biologici. Il comportamento di questi materiali non può essere descritto dalla sola teoria dell’elasticità lineare o della plasticità [34], in quanto è necessario introdurre nella formulazione costitutiva termini tempo – dipendenti.

La viscoelasticità viene caratterizzata da prove meccaniche di *creep*, mantenendo la tensione costante e valutando come varia la deformazione nel tempo, e di *stress relaxation*, mantenendo invece la deformazione costante e osservando come varia la tensione del tempo.

I materiali viscoelastici possono essere caratterizzati utilizzando modelli reologici costituiti da molle e pistoni, tra di loro collegati in serie ed in parallelo. I modelli reologici più comuni sono:

- modello di Maxwell. (Figura 24) il modello più semplice e caratterizzato dalla serie tra una molla e un pistone. Tuttavia, questa rappresentazione non è adatta alla modellazione di materiali per lunghi periodi di tempo, dato che non pone limiti a quanto può estendersi il pistone [36];
- modello di Kelvin – Voigt. (Figura 25) questo modello è rappresentato dalla molla e il pistone disposti in parallelo. In questo caso l'estensione è la stessa in entrambi gli elementi e la forza totale è quindi divisa tra essi [36];
- Modello Solido Lineare. (Figura 26) è il modello più complesso e che combina entrambi i modelli sopracitati, viene utilizzato per descrivere la maggior parte dei materiali viscoelastici. È composto da una molla in parallelo con una molla e un pistone disposti in serie [36];

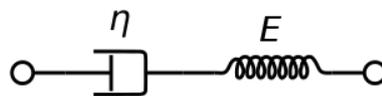


Figura 24: Modello di Maxwell.

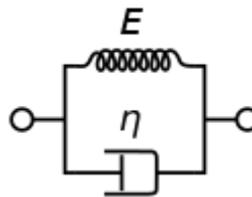


Figura 25: Modello di Kelvin - Voigt.

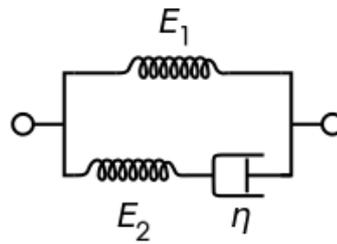


Figura 26: Modello Solido Lineare Standard.

Come anticipato il modello iperelastico viene utilizzato per descrivere la risposta meccanica all'equilibrio, mentre per descrivere i fenomeni di natura tempo – dipendente sono stati introdotti i rami viscosi.

L'equazione utilizzata per rappresentare i fenomeni viscoelastici, che verrà successivamente inserita nel *cftool* di Matlab per ottenere i parametri costitutivi, è la seguente:

$$\sigma_{norm} = (1 - \gamma_1 - \gamma_2) + \gamma_1 \exp\left[-\frac{t}{\tau_1}\right] + \gamma_2 \exp\left[-\frac{t}{\tau_2}\right] \quad (\text{Eq. 1})$$

$\sigma_{norm}$  è la tensione normalizzata;

$\gamma_1$  è la rigidità relativa del primo ramo;

$\gamma_2$  è la rigidità relativa del secondo ramo;

$\tau_1$  è il tempo di rilassamento del primo ramo;

$\tau_2$  è il tempo di rilassamento del secondo ramo.

I parametri viscoelastici che si otterranno saranno quindi  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\tau_1$  e  $\tau_2$ .

#### 4.1.6 PROVE DI RILASSAMENTO DELLE TENSIONI

Come anticipato, per formulare il modello costitutivo in grado di descrivere il comportamento dei materiali, sono state eseguite prove di rilassamento delle tensioni in riferimento a diversi livelli deformativi. Per ciascuna prova è stato previsto un tempo

di dieci minuti. Prima di eseguire i test meccanici, sono state fatte alcune assunzioni fondamentali:

- tutte le prove, anche quelle del solo polimero, sono state condotte in immersione in acqua distillata, per avere dati omogenei;
- considerando che per avvolgere la camera ventricolare artificiale verranno utilizzati più lembi pericardici, si è deciso di trascurare la direzione delle fibre di collagene, portando quindi ad una maggior variabilità dei dati;
- i provini sono stati tagliati e testati indipendentemente dalla direzione delle fibre;
- è stato utilizzato lo stesso protocollo di prove per tutti i materiali

Il protocollo scelto ed utilizzato per eseguire le prove di rilassamento delle tensioni è caratterizzato da sette steps di deformazione, con una pausa di 600 secondi ciascuno, ad una velocità di 1 mm/s.

Per il ChronoFlex ARLT gli step sono: 10%, 20%, 30% 40%, 50%,100%, 200%, mentre sia per il pericardio porcino decellularizzato che per la membrana ibrida sono: 10%, 20%, 30% 40%, 50%, 60%, 70%, in quanto si era constatato da prove precedenti che il tessuto biologico non è in grado di sostenere deformazioni superiori.

Prima di iniziare ad effettuare i test, sono stati misurati gli spessori dei provini, in prossimità della lunghezza utile, successivamente è stato impostato il sistema TRAMA e si è proceduti alle prove meccaniche monoassiali (Figure 27 e 28).

Gli spessori dei provini dei tre materiali sono indicati nella Tabella 2.

<b>ChronoFlex ARLT</b>	<b>SPESSORI [mm]</b>	<b>DPP</b>	<b>SPESSORI [mm]</b>	<b>HYME</b>	<b>SPESSORI [mm]</b>
C1	0.745	C1	0.157	C1	0.935
C2	0.723	C2	0.207	C2	1.145
C3	0.965	C3	0.107	C3	1.136
C4	1.347	C4	0.177	C4	1.430
C5	1.363	C5	0.157	C5	1.609
C6	1.268	C6	0.161	C6	1.399
C7	0.805	C7	0.213	C7	1.111
C8	0.814	C8	0.123	C8	1.073
C9	0.720	C9	0.172		
C10	0.825	C10	0.149		
C11	0.683	C11	0.182		
C12	0.681	C12	0.182		
C13	0.755	C13	0.145		
C14	0.780	C14	0.220		
		C15	0.144		
		C16	0.167		
		C17	0.193		
		C18	0.198		

Tabella 2: Gli spessori dei tre materiali Chronoflex ARLT, DPP e HYME.

Il numero di provini di HYME risulta minore a causa della mancanza di tessuto decellularizzato disponibile per la produzione delle membrane.

I campioni evidenziati in rosso rappresentano provini che si sono rotti prematuramente oppure dati non correttamente registrati da TRAMA, e sono stati quindi scartati in fase di analisi.



Figura 27: Setup per la prova in immersione della membrana HYME.



Figura 28: Dettaglio relativo alla prova in immersione del ChronoFlex ARLT.

#### 4.1.7 ANALISI DEI DATI

L'analisi dei dati è stata eseguita attraverso il software MatLab. È stato creato uno *script* ad hoc per ogni materiale, raggruppando prima i dati e successivamente analizzandoli e ottenendo i relativi grafici tensione – deformazione.

Ai fini della caratterizzazione della risposta iperelastica di equilibrio sono state prese in considerazione curve di tensione – deformazione (*stress – strain*) ottenute considerando i diversi livelli deformativi testati ed i rispettivi valori di tensione al termine del processo di rilassamento. Successivamente, sono state divise e mediate le curve di rilassamento per ogni step deformativo e quindi normalizzate e mediate per ottenere la curva finale di rilassamento delle tensioni di ogni materiale.

Nei prossimi paragrafi saranno visualizzate le curve generate per ogni materiale testato.

### CHRONOFLEX AR – LT

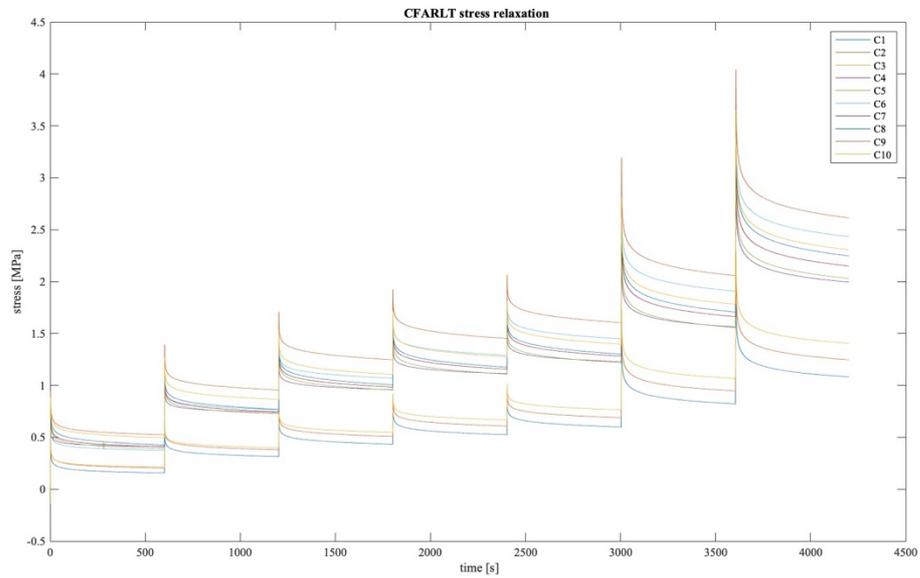


Figura 29: Andamenti relativi al rilassamento delle tensioni per CFARLT, nei sette step deformativi, di tutti i campioni analizzati.

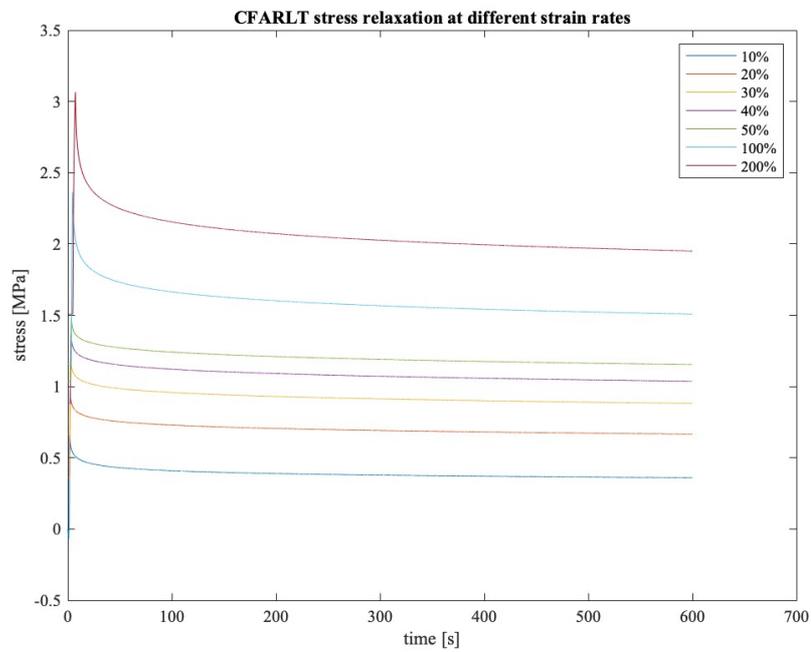


Figura 30: Andamenti relativi al rilassamento delle tensioni per CFARLT nei sette step deformativi.

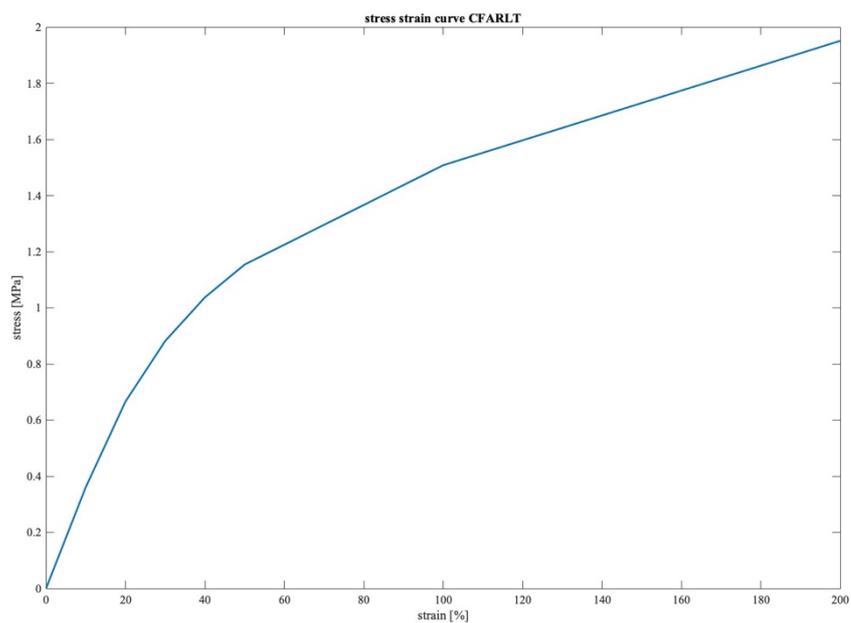


Figura 31: Curva tensione – deformazione di CFARLT.

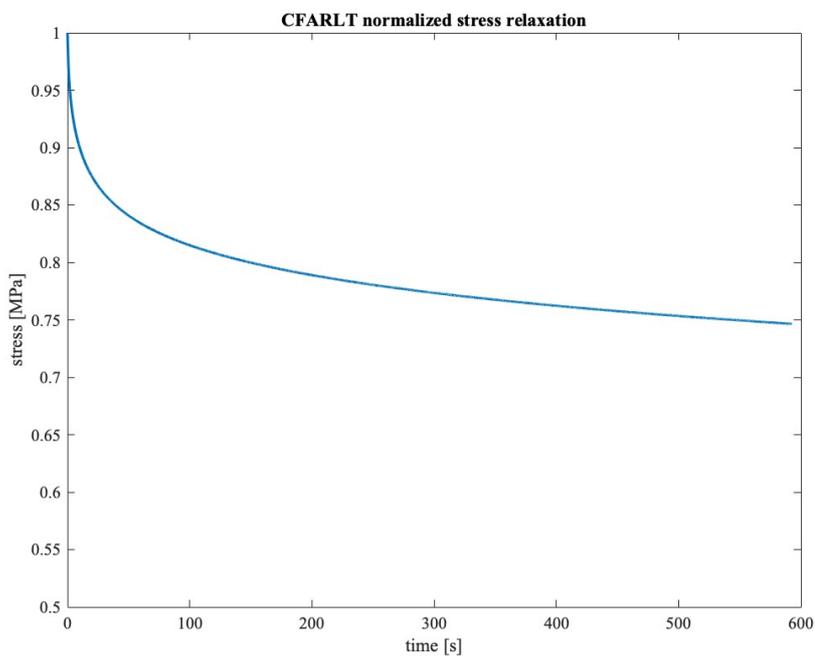


Figura 32: Curva di rilassamento normalizzata di CFARLT. Si può osservare come il polimero abbia un rilassamento circa del 25%.

### PERICARDIO PORCINO DECELLULARIZZATO

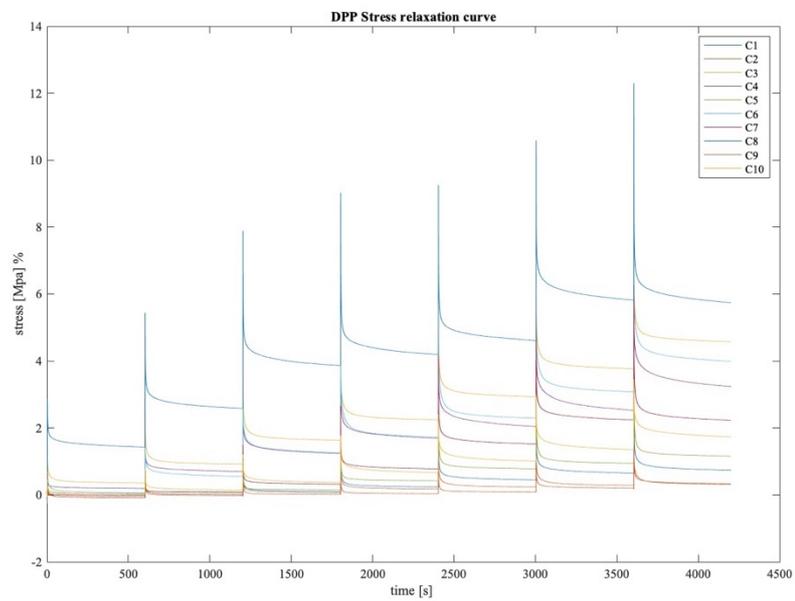


Figura 33: Andamenti relativi al rilassamento delle tensioni per DPP, nei sette step deformativi, di tutti i campioni analizzati.

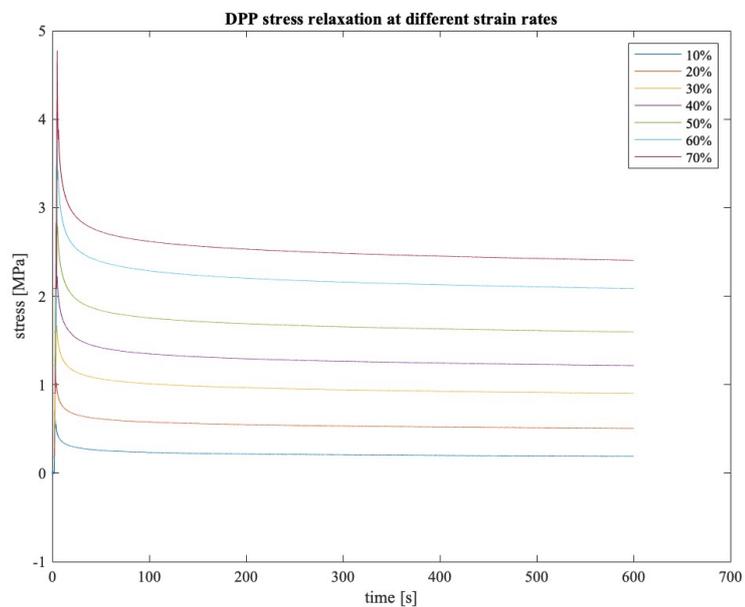


Figura 34: Andamenti relativi al rilassamento delle tensioni per DPP nei sette step deformativi.

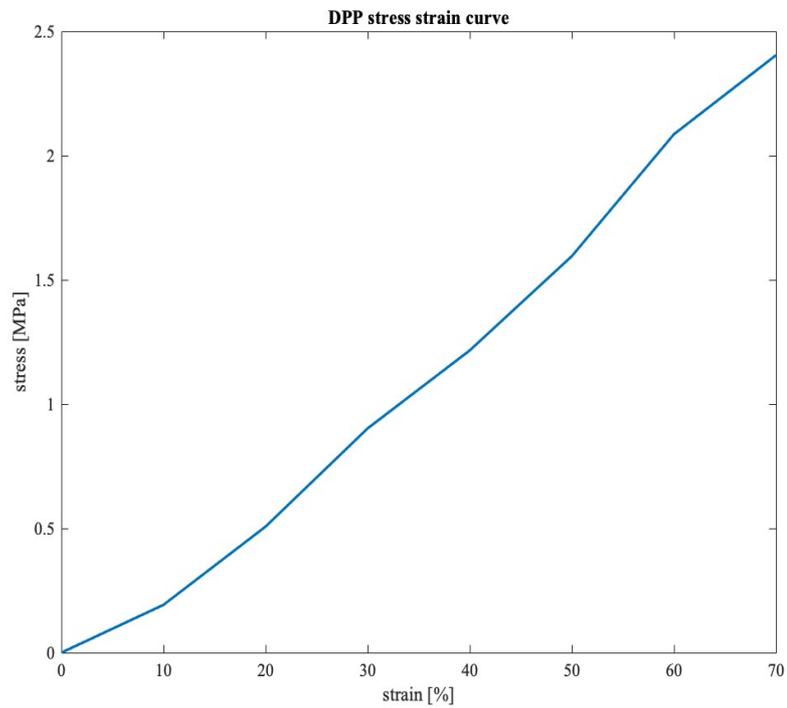


Figura 35: Curva tensione – deformazione di DPP.

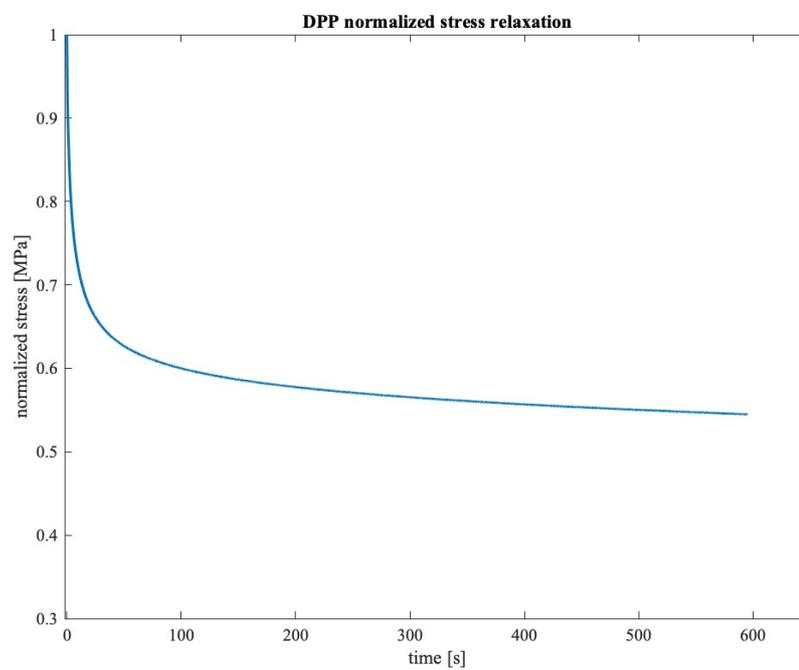


Figura 36: Curva di rilassamento normalizzata di DPP. Si può osservare come il tessuto abbia un rilassamento di circa 45%.

### HYME DPP – CFARLT

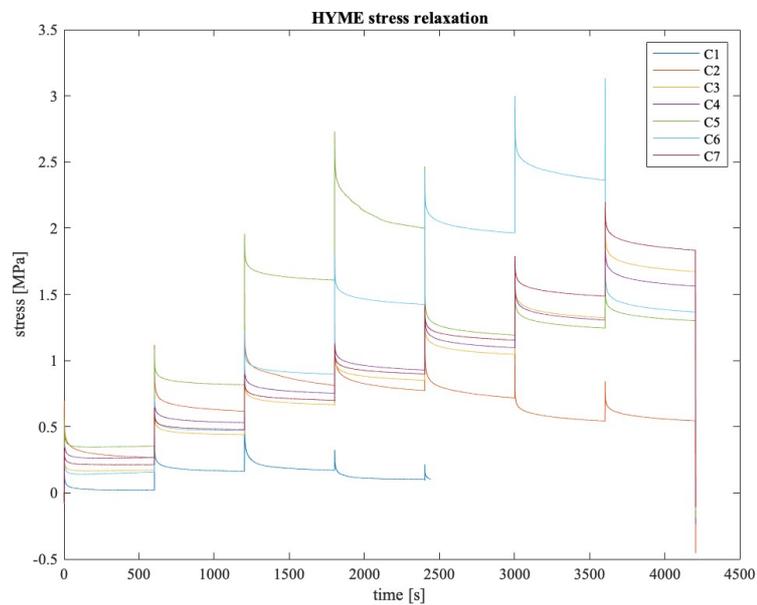


Figura 37: Andamenti relativi al rilassamento delle tensioni di HYME, nei sette step deformativi, per tutti i campioni. L'interruzione delle curve è dovuta alla rottura prematura del provino, ed in particolare del pericardio.

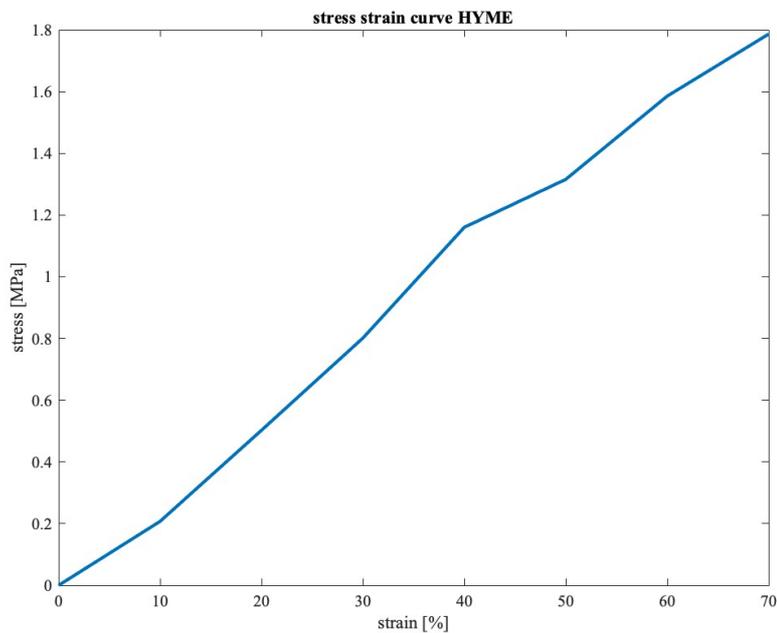


Figura 38: Curva tensione – deformazione di HYME.

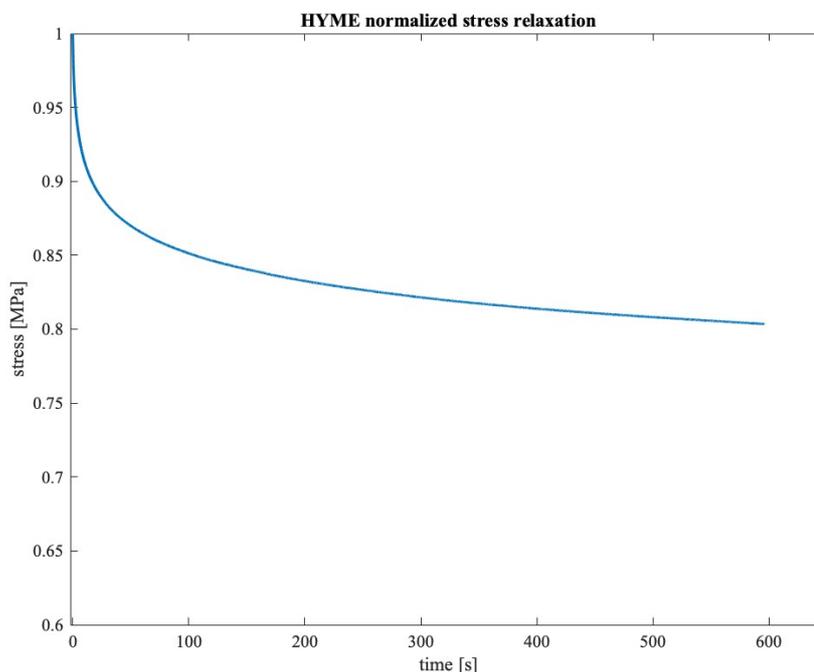


Figura 39: Curva di rilassamento normalizzata di HYME. Si può osservare come la membrana abbia un rilassamento circa del 20%, inferiore quindi ad entrambi i materiali singoli.

## 4.2 IDENTIFICAZIONE DI UN MODELLO COSTITUTIVO VISCO IPER-ELASTICO

In questo paragrafo verrà mostrato come si è arrivati alla formulazione di un modello costitutivo visco iperelastico per il polimero ed il tessuto biologico, e la relativa validazione di essi e della membrana ibrida, considerata come accoppiamento tra i due materiali.

Analizzando le curve mostrate nel paragrafo precedente relative alla viscoelasticità e allo *stress – strain*, si osserva il tipico comportamento meccanico a trazione di un polimero e di un tessuto biologico. Come anticipato, per la viscoelasticità si è utilizzato il tool di MatLab “*Curve Fitting*”, inserendo la curva di rilassamento normalizzata e fittando i dati con l’Equazione 1, ottenendo quindi i parametri costitutivi viscoelastici  $\gamma_1, \gamma_2, \tau_1$  e  $\tau_2$ . Per l’iperelasticità, invece, si è deciso di utilizzare il modello di Ogden incomprimibile ad un parametro ( $N = 1$ ), implementato direttamente nel software

Abaqus, ottenendo così i coefficienti costitutivi,  $\mu_i$  e  $\alpha_i$ , e anche possibili instabilità, non presenti nel modello proposto.

Per la validazione del modello si è proceduto a comparare i dati sperimentali con quelli numerici, ottenuti dalle simulazioni computazionali della membrana ibrida. È stato creato un provino CAD, a forma di osso di cane, come quello utilizzato durante le prove meccaniche, definito come accoppiamento tra il polimero ed il tessuto, e sono stati assegnati i parametri costitutivi ottenuti in precedenza. Si è quindi potuto valutare l'effettiva affidabilità del modello costitutivo proposto.

Nei prossimi paragrafi sono riportate le curve e i parametri costitutivi ottenuti del polimero e del tessuto, ed il processo di validazione relativo al loro accoppiato.

#### 4.2.1 CHRONOFLEX ARLT VISCOELASTICITÀ

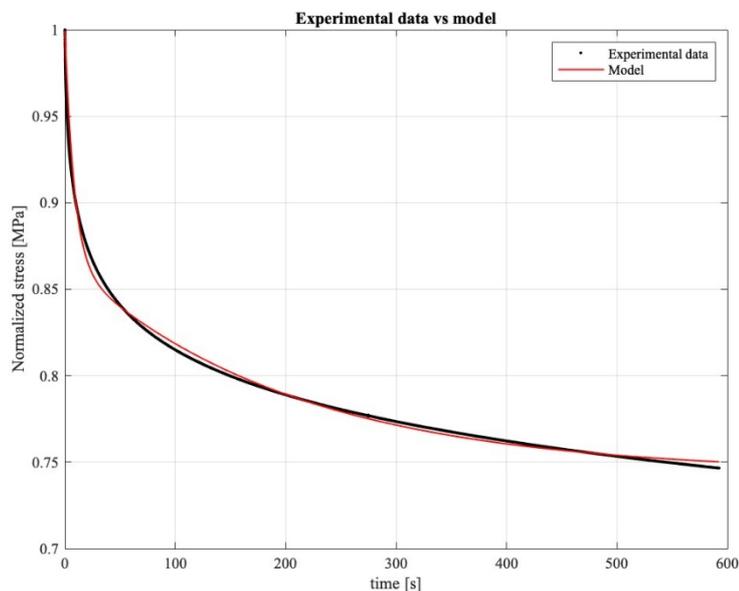


Figura 40: Curve fitting CFARLT in MatLab.

$\gamma_1$	$\gamma_2$	$\tau_1$ [s]	$\tau_2$ [s]
0.13	0.12	8.33	201.76

Tabella 3: Parametri costitutivi viscoelastici per CFARLT.

IPERELASTICITÀ

$\mu_i$ [MPa]	$\alpha_i$
1.36	0.64

Tabella 4: Parametri costitutivi iperelastici per CFARLT.

## 4.2.2 DPP

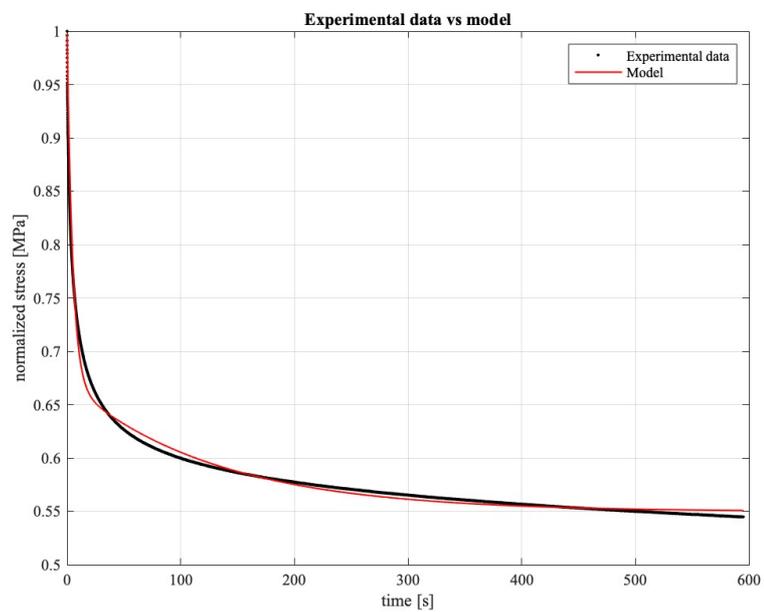
VISCOELASTICITÀ

Figura 41: Curve fitting DPP in MatLab.

$\gamma_1$	$\gamma_2$	$\tau_1$ [s]	$\tau_1$ [s]
0.33	0.12	4.89	128.19

Tabella 5: Parametri costitutivi viscoelastici di DPP.

### IPERELASTICITÀ

$\mu_i$ [MPa]	$\alpha_i$
0.75	5.24

Tabella 6: Parametri costitutivi iperelastici di DPP.

#### 4.2.3 HYME

Come anticipato, la membrana ibrida è stata considerata come l'incollaggio tra il polimero ed il pericardio decellularizzato, e non come materiale unico. Pertanto, è stato creato in Abaqus un provino costituito dai due materiali (Figura 49), incollati attraverso il comando *Tie*.

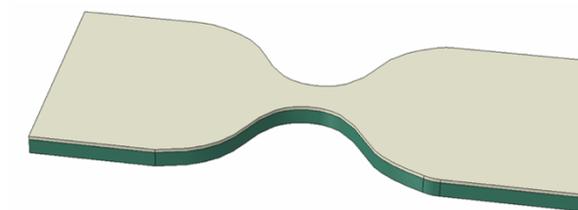


Figura 42: Modello CAD del provino, costituito dai due materiali, in grigio il DPP e in verde il CFARLT.

## VALIDAZIONE

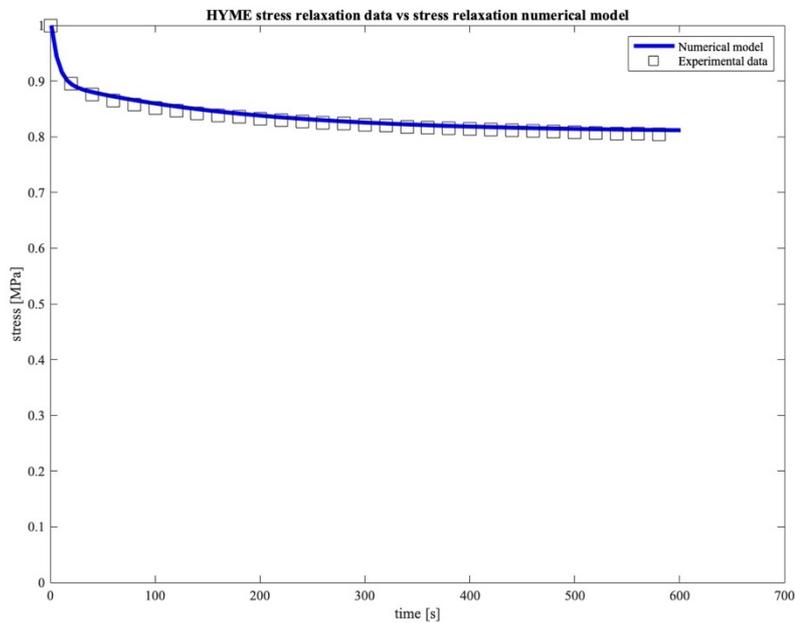


Figura 43: Validazione del modello di viscoelasticità per HYME. Curva di rilassamento delle tensioni del modello numerico in confronto con quella sperimentale campionata.

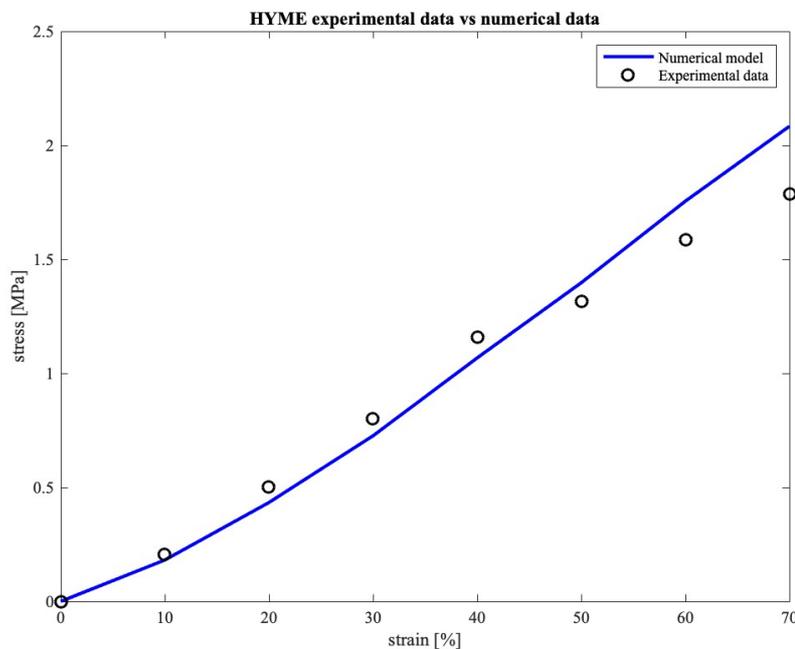


Figura 44: Validazione stress – strain per HYME.

### 4.3 DISCUSSIONE

L'obiettivo di formulare un modello costitutivo per i materiali analizzati è quello di poter sviluppare dei modelli numerici ad elementi finiti per diverse geometrie di camera ventricolare, in modo tale da valutare non solo la resistenza meccanica ed i punti di maggior sforzo, ma anche la fluidodinamica e l'interazione fluido – struttura.

Il modello costitutivo sviluppato ha dimostrato di essere adatto a descrivere correttamente il comportamento non solo del polimero e del pericardio, ma anche e soprattutto della membrana ibrida definita dal loro accoppiamento. Dai risultati si può notare un buon andamento e un buon *fit* delle curve numeriche con i dati sperimentali, all'interno della distribuzione statistica dei dati sperimentali.

Si sottolinea, come il modello proposto descrive in generale il comportamento dei materiali, in particolare del tessuto biologico e della membrana.

È utile inoltre osservare come tutti e tre i materiali abbiano un comportamento estremamente simile fino al 30% di deformazione, come mostrato in Figura 45; in particolar modo il pericardio e la membrana mostrano andamenti sovrapponibili. Si consideri infatti che per la camera ventricolare realizzata in HYME, durante le contrazioni della sistole, e le dilatazioni della diastole, non si vuole assolutamente superare un valore di deformazione pari a circa il 20 – 25%, per evitare probabili rotture del pericardio.

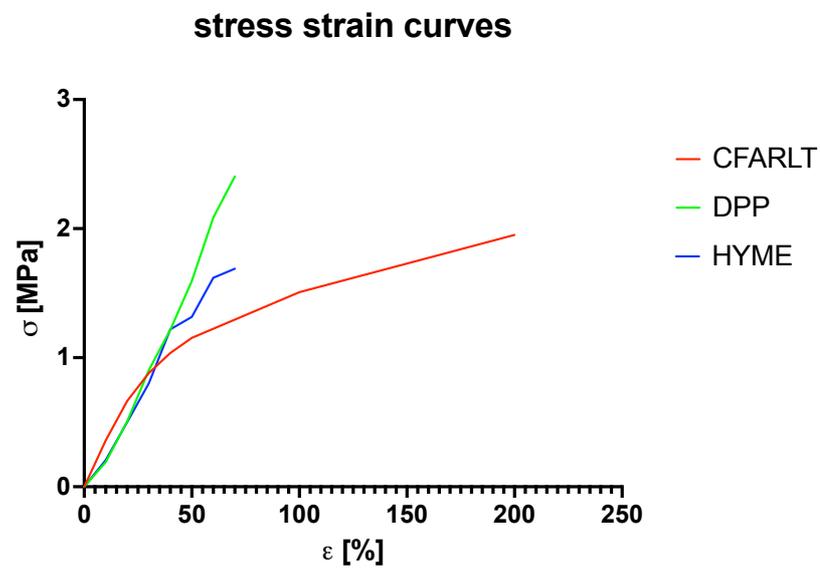


Figure 45: Andamento tensione - deformazione dei tre materiali analizzati.

## ***5 CARATTERIZZAZIONE BIOLOGICA: ANALISI DI CITOCOMPATIBILITÀ***

L'analisi di citocompatibilità di materiali innovativi permette di valutarne la citotossicità, esaminando se l'interazione con l'ambiente biologico provoca la morte o l'alterazione delle funzioni delle cellule. In generale i biomateriali, infatti, devono possedere caratteristiche tali da consentire la proliferazione delle cellule, senza recare danno al tessuto circostante e all'organismo.

In questa seconda parte del progetto, svolto presso il Laboratorio nella Torre della Ricerca della Fondazione Città della Speranza di Padova, è stata valutata la citotossicità *in vitro* delle membrane ibride composte da pericardio porcino decellularizzato e ChronoFlex AR e ARLT, e del solo pericardio usato come materiale di controllo. Sono state utilizzate cellule HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*), derivanti dall'endotelio delle vene del cordone ombelicale; sono state condotte valutazioni sul comportamento cellulare in base a tre differenti tecniche, l'analisi metabolica WST, il Live & Dead (LD) e l'analisi di immunofluorescenza (IF).

### **5.1 MATERIALI E METODI**

Di seguito vengono presentati i materiali ed i metodi utilizzati per l'analisi di citocompatibilità e rappresentati i grafici e le immagini ricavate dalle analisi eseguite. Come già menzionato, per i test di citotossicità sono state utilizzate cellule HUVEC precedentemente incubate a 37°C in mezzo di coltura (DMEM), contenente 20% di FBS (*Fetal Bovine Serum*) e 1% di Penicillina – Streptomina. Le cellule, coltivate all'interno di un flask T75, sono state quindi contate per valutarne la densità (1.405.000 cellule/ml), per procedere successivamente alla semina sui materiali da testare.

Utilizzando piastre multipozzetto da 24, sono stati collocati i campioni di membrana ibrida (DPP AR e DPP ARLT) e il tessuto (DPP) da testare, secondo gli schemi in Figura 46.

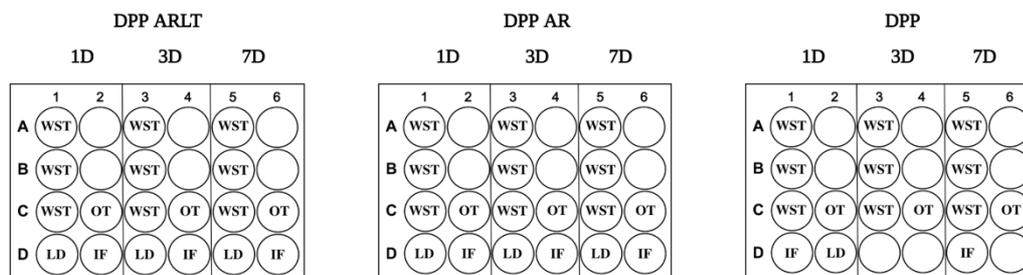


Figura 46: Schema di posizionamento dei materiali da testare per la citotossicità, utilizzando le tre tecniche WST, LD, e IF. OT (*Only Tissue*) rappresenta il solo tessuto/materiale non coltivato e viene utilizzato come controllo. Inoltre, per il DPP si è deciso di analizzare solo il primo giorno per il Live/Dead e il primo e settimo giorno per l'immunofluorescenza.

### 5.1.1 WST

Per analizzare la vitalità e la proliferazione delle cellule coltivate sulle membrane ibride è stato utilizzato un kit di analisi di citotossicità WST – 1 (Boster Bio, Pleasanton, California). Ogni pozzetto è stato riempito con 180  $\mu$ l di mezzo di coltura e 20  $\mu$ l di WST – 1.

Il principio di questo test consiste nel registrare l'attività metabolica delle cellule, direttamente proporzionale alla concentrazione di prodotto di analisi.

Si è quindi passati alla lettura dell'assorbanza, a 1, 3 e 7 giorni di incubazione, (anche conosciuta come densità ottica, OD), a 450 nm con un lettore di micropiastre (Spark 10M Tecan, Tecan, Mannedorf, Svizzera), per valutare la vitalità cellulare. In Figura 47 sono rappresentati i valori di densità ottica misurati per diversi materiali citati, insieme ad altri materiali di controllo precedentemente testati (CF AR e ARLT); in Figura 48, invece, viene evidenziata l'analisi WST della sola membrana ibrida di DPP e CFARLT, sottolineando una crescita costante dell'attività metabolica delle cellule tra 1 e 7 giorni.

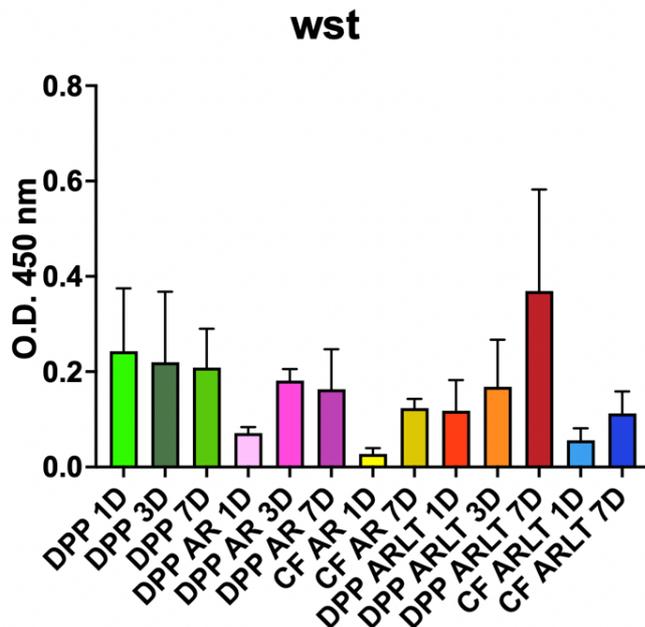


Figura 47: Analisi WST: valori di densità ottica (OD) a 450 nm per i diversi materiali testati.

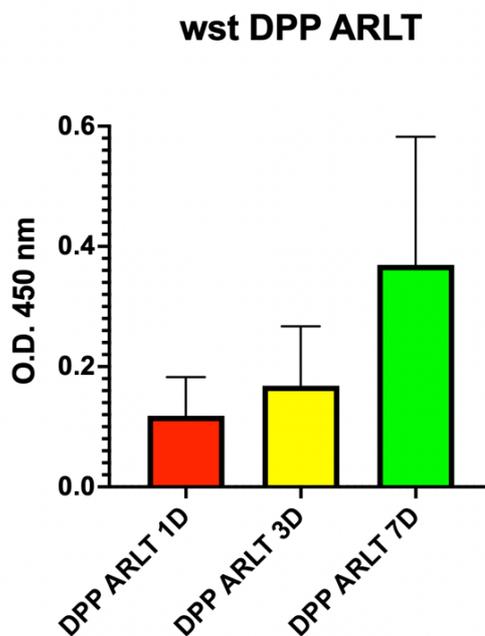


Figura 48: Analisi WST sulla membrana ibrida DPP ARLT a 1, 3 e 7 giorni.

### 5.1.2 LIVE & DEAD

Il secondo test effettuato per valutare la vitalità cellulare è il *live and dead*, che permette di riconoscere le cellule vive da quelle morte; è stato utilizzato il kit di citotossicità e vitalità Live & Dead fornito dall'azienda Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts) (Figura 49). Una volta preparato il mezzo di coltura con i coloranti fluorescenti, i provini seminati sono stati lasciati nell'incubatore a 37 °C per 45 minuti. Successivamente, il mezzo è stato rimosso ed utilizzato per ricavare immagini epifluorescenti, attraverso l'uso del microscopio Leica AF6000 (Leica Micro – Systems, Wetzlar, Germany). Le analisi sono state eseguite ad 1, 3 e 7 giorni di incubazione. Dalle immagini si possono osservare le cellule vive colorate in verde dal colorante fluorescente, la calceina AM, le cellule morte colorate in rosso dall'Ethidium homodimer – 1, mentre i nuclei cellulari sono colorati in ciano dall'Hoechst.

In tutti i casi si rilevano poche cellule morte, rispetto ad una evidente crescita nel tempo del numero di cellule vive, in particolare sulla membrana composta da DPP e ChronoFlex ARLT.

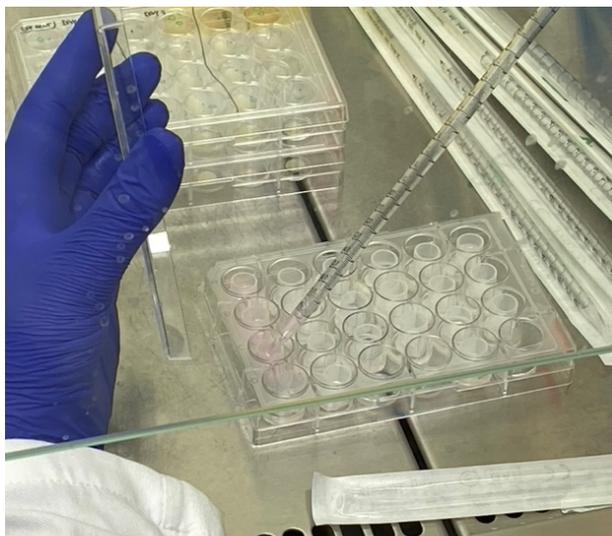


Figura 49: Riempimento dei pozzetti per le analisi Live/Dead.

In Figura 50 sono visibili le immagini ad epifluorescenza delle cellule vive e morte su DPP, DPP AR e DPP ARLT, mentre in Figura 51 si evidenziano i nuclei cellulari. L'analisi *post – imaging* è stata eseguita con il software Fiji per migliorare la visualizzazione delle immagini.

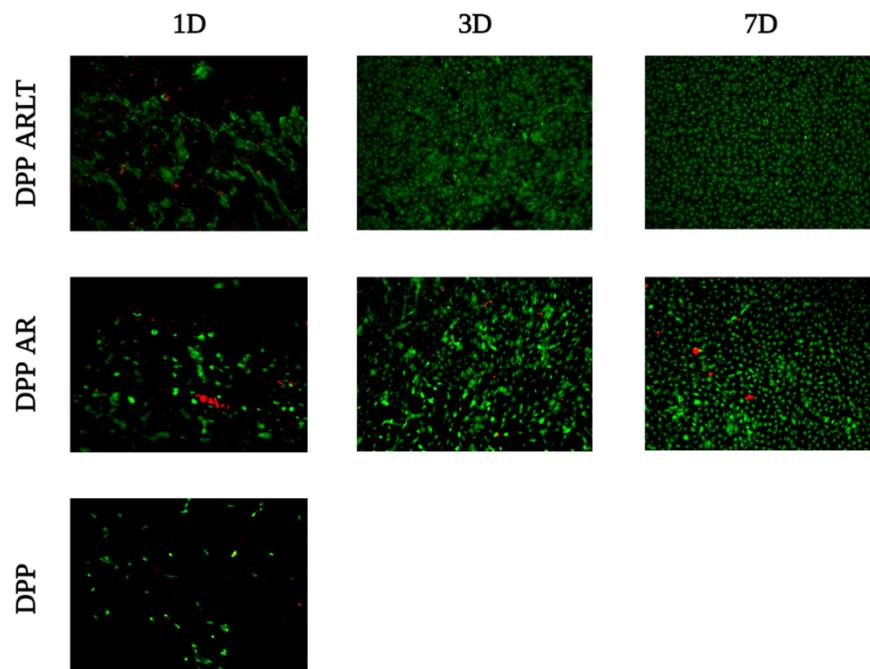


Figura 50: Analisi Live/Dead: in verde sono evidenziate le cellule vive ed in rosso quelle morte.

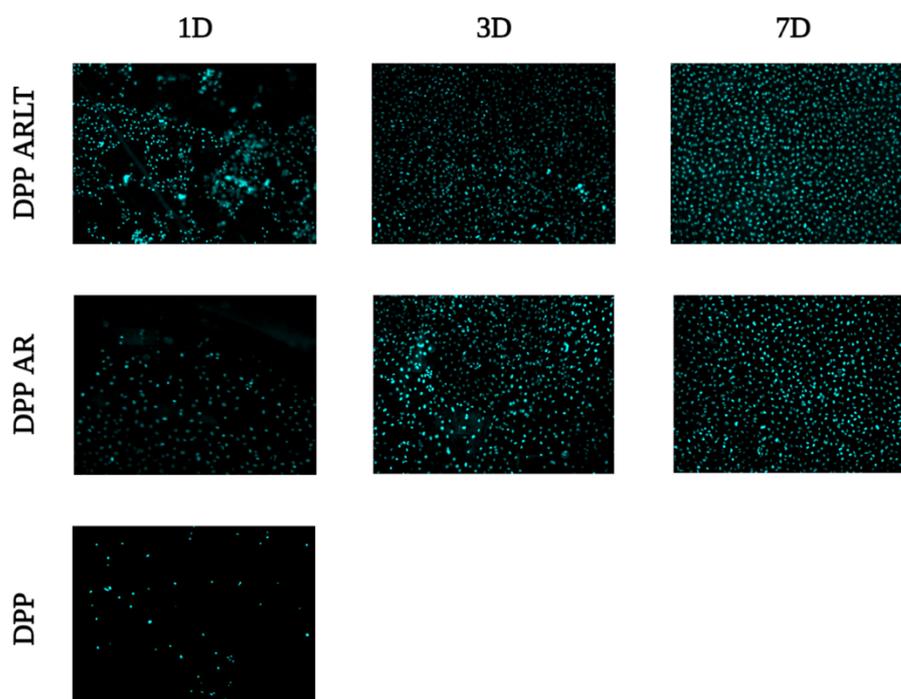


Figura 51: Analisi Live/Dead: in blu sono evidenziati i nuclei cellulari.

### 5.1.3 IMMUNOFLUORESCENZA

L'analisi di immunofluorescenza è stata eseguita per valutare la presenza/assenza dei nuclei cellulari e analizzare la composizione della ECM e la sua integrità strutturale.

I provini di tessuto sono stati fissati in 4% v/v di paraformaldeide (PFA) per 5 minuti e poi risciacquati con PBS (*Phosphate Buffered Saline*) per tre volte.

Successivamente sono stati incubati, sempre per 1, 3 e 7 giorni, con due fluorofori, la falloidina e il DAPI, per permettere rispettivamente la colorazione dei filamenti di actina (in fucsia) e dei nuclei (in ciano). Le immagini sono state acquisite tramite un microscopio ad epifluorescenza Leica AF6000 (Leica Micro – Systems, Wetzlar, Germany), e sono state quindi analizzate attraverso il software di *post – imaging* Fiji. Le immagini sono osservabili in Figura 52.

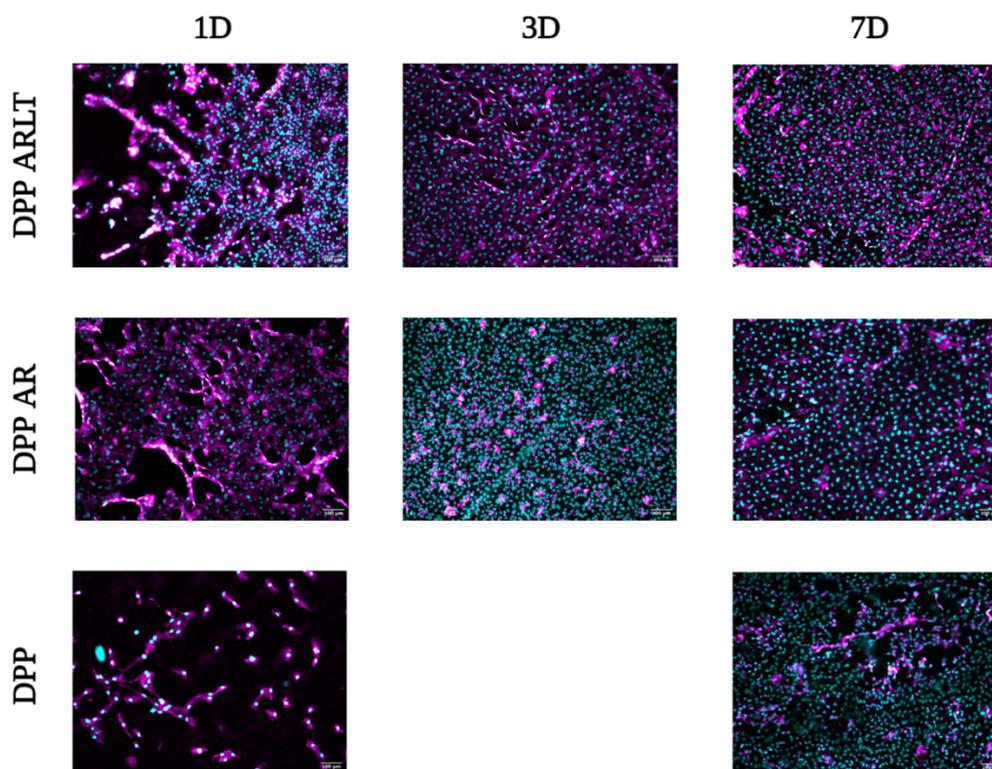


Figura 52: Analisi ad immunofluorescenza delle membrane ibride e del tessuto DPP (solo al primo e settimo giorno). In ciano sono evidenziati i nuclei cellulari, mentre in magenta i filamenti di actina delle cellule.

## 5.2 DISCUSSIONE

La caratterizzazione biologica è indispensabile per tutti quei biomateriali destinati all'impianto nell'organismo e quindi al diretto contatto con i tessuti biologici. Lo standard internazionale ISO 10993 (*Biological evaluation of medical devices*), parte 5 (*Tests for in vitro cytotoxicity*) descrive i metodi ed i test da realizzare per valutare la citotossicità *in vitro* di materiali e dispositivi medici. Sono metodi che prevedono l'incubazione di cellule in coltura a contatto con un dispositivo e/o l'esposizione delle cellule a estratti di un dispositivo sia direttamente che per diffusione. Questi metodi sono stati progettati per determinare la risposta biologica delle cellule di mammifero *in vitro*, utilizzando indicatori biologici appropriati [37].

L'obiettivo di queste analisi è stato quello di verificare se la membrana ibrida, destinata alla realizzazione delle camere ventricolari del nuovo cuore totale artificiale, presenti

un'adeguata citocompatibilità. I test condotti mettono in evidenza una buona risposta biologica nei materiali testati, in particolare da parte della membrana ibrida DPP ARLT, con una crescente proliferazione di cellule nel tempo, rispetto alla presenza di poche cellule morte.

Il prossimo passo essenziale sarà procedere con prove *in vivo*, per testare la calcificazione, l'irritabilità ed effetti locali dopo l'impianto su modello animale.

## ***CONCLUSIONI***

Lo sviluppo di un nuovo cuore totale artificiale è cruciale per far fronte al numero crescente di pazienti con scompenso cardiaco terminale e alla grave carenza di donatori di organi. L'obiettivo della ricerca è quello di ottenere un dispositivo innovativo efficiente, che sia in grado di risolvere le limitazioni dei cuori totali artificiali attualmente disponibili in commercio.

Con il presente progetto di tesi ha avuto un duplice obiettivo: da un lato formulare un modello costitutivo in grado di descrivere il comportamento meccanico dei materiali che rivestiranno la camera ventricolare del cuore totale artificiale in fase di sviluppo presso l'Università di Padova, dall'altro analizzare la citotossicità della membrana ibrida utilizzando cellule di mammifero con buoni risultati sulla sopravvivenza e sulla proliferazione cellulare.

Il prossimo passo sarà quello di realizzare delle simulazioni numeriche FSI (*Fluid Structure Interaction*) per poter valutare il comportamento fluidodinamico della camera ventricolare nonché la sua resistenza meccanica, potendo quindi comparare diverse geometrie e scegliere quella più performante.

Dal punto di vista delle prove a banco, sarà necessario adattare il Pulse Duplicator alla camera ventricolare, calibrando i sensori per cercare di ottenere risultati affidabili in condizioni più vicine a quelle fisiologiche; sarà poi essenziale migliorare la geometria e il metodo di prototipizzazione della camera ventricolare.

In ambito biologico, si stanno attualmente eseguendo prove *in vivo* su modello animale per valutare fenomeni di calcificazione ed irritabilità delle membrane ibride; saranno poi necessarie ulteriori prove di emocompatibilità.

## ***BIBLIOGRAFIA***

- [1] Anastasi G. et al., *Trattato di anatomia umana*, Vol. 1, Edi-Ermes, 2010
- [2] Netter F. H., *Atlas of human anatomy*, 7<sup>a</sup> ed., Elsevir, 2018
- [3] Hurst J. W., *Il cuore*, 12<sup>a</sup> ed., McGraw-Hill, 2009
- [4] Felker G. M., Mann D. L., *Heart failure. A companion to Braunwald's heart disease*, 4<sup>a</sup> ed., Elsevir, 2020
- [5] McDonagh T. A., Gardner R. S., Clark A. L., Dargle H., *Oxford textbook of heart failure*, Oxford, 2011
- [6] Beasley A. W., *A Story oh heartache: the understanding of Angina Pectoris in the pre-surgical period*, J. R. Coll. Physicians Edinb., 2011
- [7] Dolgin M., New York Heart Association, *Nomenclatura e criteri per la diagnosi delle malattie del cuore e dei grossi vasi*, 7<sup>a</sup> ed., Little, Brown, Boston, 1994
- [8] Di Pasquale G., *Lo scompenso cardiaco a 360 gradi*, Vol. 9, Italian Journal of Medicine, 2021
- [9] Corrao G., Maggioni A. P., *Inquadramento epidemiologico dello scompenso cardiaco*, G. Ital. Cardiol., Vol. 15, 2014
- [10] <https://www.hopkinsmedicine.org/health/conditions-and-diseases/coronavirus/heart-problems-after-covid19>
- [11] Redfield M. M. et al., *Burden of systolic and diastolic ventricular dysfunction in the community. Appreciating the scope of the heart failure epidemic*, JAMA, 2003
- [12] Nadal – Ginard B. et al., *A matter of life and death: cardiac myocyte apoptosis and regeneration*, J Clin. Invest., 2003
- [13] Fuster v. et al., *Il Cuore*, 11<sup>a</sup> ed., Hurst, Malesci, 2005
- [14] McCartney S. L. et al., *Long term outcomes and management of the heart transplantrRecipient*, Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol., 2017
- [15] Jooli H., Trumble D. R., *Cardiac Assist Devices: early concepts, current technologies, and future innovations*, Bioengineering Journal, 2019

- [16] Delgado D. H. et al., *Mechanical circulatory assistance. State of the art*, Circulation, 2002
- [17] <https://www.cardiovascular.abbott/us/en/hcp/products/heart-failure/left-ventricular-assist-devices/heartmate-3/about.html>
- [18] <https://www.corwave.com>
- [19] Arabia F. A., *Update on the total artificial heart*, J. Cardiovasc. Surg., 2001
- [20] Samak M. et al., *Past and present of total artificial heart therapy: A Success Story*, Medical Science Monitor Basic Research, 2015
- [21] Johnson K. E. et al., *Registry report. Use of total artificial hearts: summary of world experience*, ANSAIO Journal, 1992
- [22] <https://www.carmatsa.com>
- [23] Copeland J. G. et al., *The CardioWest total artificial heart as a bridge to transplantation*, Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg., 2000
- [24] Akutsu T., *Components of artificial hearts*, Bull. N. Y. Acad. Med., 1972
- [25] Zardin C., *Tesi di laurea magistrale: Realizzazione e caratterizzazione di un materiale emocompatibile per la produzione di dispositivi di assistenza meccanica al circolo*, Università degli Studi di Padova, 2020
- [26] Richez U. et al., *Hemocompatibility and safety of the Carmat total artificial heart hybrid membranes*, Heliyon, 2019
- [27] Martella A., *Tesi di laurea magistrale, Caratterizzazione meccanica di membrane ibride per la produzione di camere ventricolari di un nuovo cuore artificiale totale*, Università degli Studi di Padova, 2022
- [28] Simionescu D. T. et al., *The Biosynthesis of proteoglycans and interstitial collagens by bovine pericardial fibroblasts*, Exp. Cell. Res., 1991
- [29] Gilbert T. W. et al., *Decellularization of tissues and organs*, Biomaterials, 2006
- [30] Crapo P. M. et al., *An overview of tissue and whole organ decellularization process*, Biomaterials, 2011
- [31] Todesco M. et al., *A new detergent for the effective decellularization of bovine and porcine pericardium*, Biomimetics, 2022

- [32] Piegat A. et al., Thermoplastic elastomers: materials for heart assist devices, *Polim. Med.*, 2016
- [33] [http://www.advbiomaterials.com/products/polycarbonate/chronoflex\\_ar.html](http://www.advbiomaterials.com/products/polycarbonate/chronoflex_ar.html)
- [34] Pruitt L. A. et al., *Mechanics of biomaterials*, Cambridge university press, 2011
- [35] Marcano A. et al., *Barrier behavior of biomedical polyurethanes: relationship of structure, morphology and properties*, *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 2008
- [36] Dunn L., *Introduction to viscoelasticity in polymers and its impact on rolling resistance in pneumatic tires*, *International Journal of squiggly and Wobbly Materials*, 2019
- [37] International Standard, ISO 10993 – 5, *Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*, 2009