

Università degli Studi di Padova

Scuola di Ingegneria

Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione

Dipartimento di Ingegneria Industriale

Corso di Laurea Magistrale in Bioingegneria

Tesi di Laurea Magistrale

**Caratterizzazione di pericardio bovino
decellularizzato funzionalizzato con peptidi
autoassemblanti**

Relatore: Prof. Andrea Bagno

Correlatore: Prof. Gino Gerosa

Correlatore: Dott.ssa Paola Aguiari

Correlatore: Prof. ssa Monica Dettin

Laureanda: Sara Luisa Brigo

Anno Accademico: 2015/2016

INTRODUZIONE

Le cardiopatie valvolari rappresentano ad oggi un'importante causa di mortalità nel mondo, determinando circa 20000 decessi all'anno.

L'intervento di sostituzione valvolare è spesso l'unica soluzione per i malati, e sebbene l'innovazione tecnologica e le nuove procedure chirurgiche abbiano portato ad un aumento della sopravvivenza e della qualità della vita, circa il 60% dei pazienti sottoposti all'intervento chirurgico sviluppano nei 10 anni successivi all'impianto, una serie di complicanze strettamente correlate alla protesi impiantata.

Le protesi valvolari attualmente disponibili, meccaniche (MHVs) o biologiche (BHV), presentano diverse limitazioni costituite prevalentemente dalla necessità di far uso di terapia anticoagulante (per le MHVs) e dalla limitata durata nel tempo legata a fenomeni di deterioramenti strutturali e calcificazioni (per le BHVs).

Negli ultimi 30 anni, le nuove conoscenze sulla fisiologia e la biomeccanica delle valvole cardiache hanno permesso alla bioingegneria e alla biologia di dedicarsi allo sviluppo delle "valvole ingegnerizzate", ovvero valvole sostitutive in grado di riprodurre le native mantenendo non solo la struttura ma anche la vitalità dei componenti cellulari.

La creazione di una valvola di questo tipo, dotata di adeguata funzionalità, è sicuramente una sfida di grande impatto che coinvolge diversi settori, dalla medicina alla chimica, alla bioingegneria e alla biologia, determinando la necessità di individuare dapprima un opportuno scaffold che riproduca la struttura della valvola cardiaca sulla quale procedere poi al ripopolamento cellulare in vitro e/o in vivo. A tale scopo, si può fare convenientemente ricorso al pericardio animale, in particolare bovino, che - opportunamente trattato - è già ampiamente utilizzato per la produzione di sostituti valvolare biologici.

È in questo contesto che si inserisce il presente lavoro sperimentale che ha visto la collaborazione del Laboratorio di Medicina Cardiovascolare e Rigenerativa e del Laboratorio di Bioingegneria Chimica dell'Università di Padova.

L'obiettivo della tesi è la caratterizzazione biologica e biomeccanica del pericardio bovino decellularizzato arricchito con tre peptidi autoassemblanti di tipo I in grado di penetrare e autoaggregare all'interno della matrice del tessuto. Si ritiene infatti che

l'applicazione di sequenze peptidiche capaci di autoaggregazione possa conferire al tessuto biologico prestazioni più favorevoli rispetto allo stesso tessuto decellularizzato e trattato con glutaraldeide, agente reticolante che, pur se estesamente impiegato, risulta potenzialmente citotossico e dispone la valvola protesica a degenerazione calcifica.

Lo sviluppo del lavoro ha richiesto dapprima una fase di analisi dello stato dell'arte e della letteratura scientifica disponibile sull'argomento e successivamente una fase sperimentale che verrà dettagliatamente presentata nel seguito.

Sinossi

Nel *primo capitolo* vengono descritti gli aspetti anatomici, le caratteristiche istologiche e funzionali del pericardio.

Si procede poi nel *secondo capitolo* a fornire alcune note sull'anatomia, la fisiologia e le caratteristiche biomeccaniche del cuore e delle valvole cardiache, focalizzandosi in particolare sugli aspetti relativi alla valvola aortica.

Il *terzo capitolo* sposta l'attenzione sull'aspetto più prettamente medico chirurgico del problema, presentando gli aspetti fondamentali delle cardiopatie valvolari, con relative strategie di trattamento.

Dal *capitolo quarto* in poi vengono presentate le tipologie di protesi commercialmente disponibili, dedicando particolare attenzione alle protesi meccaniche, alle bioprotesi e ai sostituiti percutanei che dal 2002 figurano come alternativa minimamente invasiva per i pazienti esclusi dalla chirurgia tradizionale.

Il capitolo *quinto* presenta invece i fondamenti dell'ingegneria tissutale e della realizzazione delle valvole cardiache ingegnerizzate e descrive le tecniche di trattamento dei tessuti utilizzate per gli scaffold valvolari e le fasi successive di validazione dei protocolli. Un paragrafo è poi dedicato ai peptidi autoassemblanti, alla loro peculiarità di *self-assembly*, alle proprietà biomeccaniche e biologiche che ne conseguono e al loro utilizzo in ambito biomedico.

Dal capitolo *sesto* in poi è descritta l'attività sperimentale e i protocolli seguiti e messi a punto per la gelificazione dei peptidi entro la matrice di pericardio bovino nonché i test biomolecolari, le indagini fisiche e le prove biomeccaniche condotte sui campioni di tessuto.

Infine, il capitolo *settimo* espone i risultati complessivamente ottenuti.

Indice

I.ASPETTI ANATOMICI, ISTOLOGICI E FUNZIONALI DEL PERICARDIO	1
1.1 PERICARDIO SIEROSO.....	2
1.2 PERICARDIO FIBROSO	3
1.3 ASPETTI FISIOLGICI E FUNZIONALI DEL PERICARDIO.....	4
<i>1.3.1 Limitazione dei movimenti cardiaci</i>	<i>5</i>
<i>1.3.2 Influenza del pericardio sulla dinamica cardiaca.....</i>	<i>5</i>
<i>1.3.3 Lubrificazione e protezione meccanica.....</i>	<i>6</i>
1.4 ISTOLOGIA DEL PERICARDIO	6
1.5 NOTE SUL COMPORTAMENTO MECCANICO DI TESSUTI MOLLI	11
<i>1.5.1 Non linearità per geometria e non linearità per materiale</i>	<i>12</i>
<i>1.5.2 Anisotropia.....</i>	<i>12</i>
<i>1.5.3 Viscoelasticità</i>	<i>12</i>
<i>1.5.4 Comportamento meccanico del tessuto pericardico bovino.....</i>	<i>14</i>
1.6 APPLICAZIONI DEL PERICARDIO COME BIOMATERIALE.....	19
II.ASPETTI ANATOMICI, BIOMECCANICI E FUNZIONALI DEL CUORE E DELLA VALVOLA AORTICA	21
2.1 FUNZIONAMENTO DELLE VALVOLE CARDIACHE	22
2.2 VALVOLA AORTICA: ANATOMIA, ISTOLOGIA E BIOMECCANICA.....	24
<i>2.2.1 Anatomia dei lembi valvolari aortici.....</i>	<i>24</i>
<i>2.2.2 Istologia dei lembi valvolari aortici.....</i>	<i>26</i>
<i>2.2.3 Aspetti biomeccanici della valvola aortica</i>	<i>27</i>
III.PATOLOGIE DELLE VALVOLE CARDIACHE E TRATTAMENTO	31
3.1 EZIOLOGIA E FATTORI DI RISCHIO DELLA PATOLOGIA VALVOLARE STENOTICA.....	32
3.2 SINTOMI E DIAGNOSI	34
3.3 TERAPIA E TRATTAMENTO.....	34
<i>3.3.1 Sostituzione valvolare</i>	<i>35</i>
<i>3.3.2 Valvuloplastica.....</i>	<i>35</i>
IV.PROTESI VALVOLARI.....	- 37 -
4.1 ASPETTI IDEALI PER UN SOSTITUTO VALVOLARE.....	- 39 -

4.2 PROTESI VALVOLARI MECCANICHE (MHVS).....	- 40 -
4.3 PROTESI VALVOLARI BIOLOGICHE (BHVS)	- 42 -
4.3.1 <i>Il pericardio nella protesica valvolare cardiaca.....</i>	<i>- 44 -</i>
4.4 SOSTITUTI PERCUTANEI	- 45 -
4.4.1 <i>Edwards SAPIEN.....</i>	<i>- 48 -</i>
4.4.2 <i>Medtronic CoreValve.....</i>	<i>- 50 -</i>
V.L'INGEGNERIA TESSUTALE PER LA REALIZZAZIONE DI VALVOLE CARDIACHE INGEGNERIZZATE	- 53 -
5.1 SCAFFOLD BIOLOGICI DECELLULARIZZATI DI ORIGINE NON VALVOLARE.....	- 55 -
5.1.1 <i>Pericardio bovino come scaffold di origine non valvolare</i>	<i>- 56 -</i>
5.2 TECNICHE DI DECELLULARIZZAZIONE DEI TESSUTI BIOLOGICI	- 58 -
5.2.1 <i>Metodi chimici.....</i>	<i>- 59 -</i>
5.2.2 <i>Metodi enzimatici.....</i>	<i>- 60 -</i>
5.2.3 <i>Metodi fisici.....</i>	<i>- 60 -</i>
5.2.4 <i>Indagine e validazione del protocollo di decellularizzazione</i>	<i>- 60 -</i>
5.3 SCAFFOLDS ARRICCHITI DA PEPTIDI AUTOASSEMBLANTI	- 62 -
5.3.1 <i>Proprietà cellulari e biologiche degli idrogel.....</i>	<i>- 67 -</i>
5.3.2 <i>Proprietà biomeccaniche degli idrogel.....</i>	<i>- 69 -</i>
5.3.3 <i>Applicazione biomedica degli idrogel ottenuti da peptidi autoassemblanti.....</i>	<i>- 71 -</i>
SCOPO DELLO STUDIO	73
VI.MATERIALI E METODI.....	75
6.1 PREPARAZIONE DEL PERICARDIO BOVINO DECELLULARIZZATO	75
6.1.1 <i>Decellularizzazione TRICOL</i>	<i>76</i>
6.2 PEPTIDI UTILIZZATI PER IL TRATTAMENTO DEL PERICARDIO.....	78
6.3 OTTENIMENTO DEI CAMPIONI PER I TEST SPERIMENTALI	80
6.3.1 <i>Campioni per i test biomeccanici.....</i>	<i>80</i>
6.3.2 <i>Campioni per i test biologici.....</i>	<i>81</i>
6.3.3 <i>Campioni per le analisi delle proprietà fisiche.....</i>	<i>81</i>
6.3.4 <i>Trattamento dei campioni con EAK, EAbuK e EAK-CYS</i>	<i>82</i>
6.4 TEST BIOMECCANICI.....	84
6.4.1 <i>Il sistema Bose ElectroForce® per la caratterizzazione meccanica del tessuto</i>	<i>84</i>
6.4.2 <i>Il sistema Win Test</i>	<i>85</i>
6.4.3 <i>Configurazione del sistema per le prove di trazione UTS.....</i>	<i>86</i>

6.4.4 <i>Elaborazione dei dati acquisiti durante la prova</i>	86
6.5 ANALISI STATISTICHE DEI RISULTATI OTTENUTI	88
6.6 CARATTERIZZAZIONE BIOLOGICA	88
6.6.1 <i>Le hBM-MSC</i>	88
6.6.2 <i>Semina</i>	88
6.6.3 <i>Saggio di proliferazione cellulare</i>	89
6.6.4 <i>Valutazione della citotossicità</i>	90
6.7 ANALISI ISTOLOGICHE	93
6.7.1 <i>Ottimizzazione del protocollo di congelamento</i>	93
6.7.2 <i>Inclusione</i>	94
6.7.3 <i>Sezionamento</i>	94
6.7.4 <i>Colorazioni istologiche</i>	94
6.7.5 <i>Acquisizione ed elaborazione delle immagini</i>	94
6.8 ANALISI DELLE PROPRIETÀ FISICHE	94
6.8.1 <i>Misurazione dell'area dei campioni</i>	94
6.8.2 <i>Misurazione dello spessore dei campioni</i>	95
6.8.3 <i>Misurazione del contenuto d'acqua dei campioni</i>	96
VII. RISULTATI E DISCUSSIONE	97
7.1 TEST BIOMECCANICI	97
7.1.1 <i>Curve di carico</i>	97
7.1.2 <i>Moduli elastici E_1 ed E_2</i>	100
7.1.3 <i>Tensione ultima a rottura</i>	102
7.1.4 <i>Elongazione massima</i>	104
7.2 CARATTERIZZAZIONE BIOLOGICA	105
7.2.1 <i>Test MTS – Saggio di proliferazione cellulare</i>	105
7.2.2 <i>Test LDH – Saggio di citotossicità</i>	108
7.2.3 <i>Analisi istologiche</i>	111
7.3 ANALISI DELLE PROPRIETÀ FISICHE DEL TESSUTO	113
7.3.1 <i>Misurazione dell'area dei tessuti sottoposti a diversi trattamenti</i>	113
7.3.2 <i>Misurazione dello spessore dei tessuti sottoposti a diversi trattamenti</i>	115
7.3.3 <i>Misurazione del contenuto d'acqua dei campioni</i>	118
CONCLUSIONI	123
APPENDICE	125
BIBLIOGRAFIA	137

Indice delle figure

Figura 1: Posizione del cuore nel torace. Ai lati del cuore si trovano i polmoni, che occupano le cavità pleuriche. Lo spazio tra le due cavità è definito mediastino. Il cuore ha un orientamento obliquo, nel mediastino, ed è circondato dal pericardio.....	2
Figura 2: Immagine del sacco pericardico che avvolge il cuore sino alle terminazioni di aorta, vene cave e vene polmonari. Ingrandimento della parete pericardica con suddivisione in strati.	2
Figura 3: Visione laterale della cavità toracica con dettaglio sui legamenti vertebro-pericardici, sterno-pericardici, freno-pericardici e xifo-pericardici.	4
Figura 4: Sezione trasversale del pericardio parietale. E' possibile distinguere il foglietto parietale sieroso (S), quello fibroso (F), lo strato adiposo (A) e l'epipericardio a contatto con la pleura parietale.....	7
Figura 5: Rappresentazione semplificata della composizione e della struttura della ECM	8
Figura 6: A) stiramento di un reticolo di molecole di elastina; ogni molecola può espandersi e contrarsi consentendo l'allungamento e l'accorciamento dell'intero complesso; B) micrografia elettronica a scansione di un reticolo di fibre di elastina [5]	9
Figura 7: Struttura del collagene: dalla singole catene polipeptidiche alla fibrille.....	10
Figura 8: Esempi di modelli reologici per descrivere i fenomeni di viscoelasticità nei materiali. Tutti i modelli sono ottenuti dalla combinazione di elementi elastici e smorzatori viscosi.....	13
Figura 9: La descrizione del fenomeno del creep varia in relazione al modello reologico considerato: a) modello di Maxwell; b) modello di Voigt; c) modello di Kelvin.....	13
Figura 10: La descrizione del fenomeno del rilassamento delle tensioni varia in relazione al modello reologico considerato: a) modello di Maxwell; b) modello di Voigt; c) modello di Kelvin.....	14
Figura 11: Curva rappresentativa del comportamento meccanico del pericardio bovino [8]	15
Figura 12: Risposta tenso-deformativa del tessuto di pericardio sollecitata con tre diverse velocità di deformazione lungo la direzione orizzontale. Lo strain rate riportato in figura è espresso in % min ⁻¹ . [8].....	16
Figura 13: I campioni circonferenziali (C) mostrano una resistenza alla trazione superiore rispetto a quelli ottenuti in direzione longitudinale (A) [10].	17
Figura 14: Vector plots rappresentativi dell'orientamento prevalente delle fibre di collagene rispettivamente nelle regioni destra e sinistra del pericardio bovino [19].....	18
Figura 15: Risultati dei test biassiali condotti sui campioni isolati dalla regione destra e sinistra del pericardio bovino e sottoposti a test lungo la direzione circonferenziale e longitudinale [19].	18
Figura 16: Rappresentazione schematica delle quattro valvole cardiache.....	22
Figura 17: Valvole cardiache. Durante la sistole la valvola tricuspide e quella bicuspidale sono chiuse per evitare il rigurgito di sangue dai ventricoli agli atri. Durante la diastole le valvole atrioventricolari si aprono e le valvole semilunari si chiudono per evitare il flusso retrogrado nei ventricoli.....	23

Figura 18: Rappresentazione della radice aortica e dell'aorta ascendente. Si distinguono l'anello fibroso, la giunzione senotubulare, i seni di Valsalva, i lembi, le commissure e i triangoli intercommissurali.	24
Figura 19: Anatomia della valvola semilunare aortica.	25
Figura 20: A) Dettaglio istologico delle cuspidi aortiche in cui è evidente l'architettura laminare. B) Sezione del lembo valvolare, distinzione degli strati e relativa distribuzione delle componenti.	26
Figura 21: A) Struttura 4-layered della valvola aortica a tre lembi. Si distinguono l'endotelio, la spongiosa, la fibrosa e la tunica ventricolare. B) Visione trasversale dei lembi aortici rivolti verso l'aorta e verso il ventricolo. Dal lato aortico il lembo mostra un arrangiamento circolare delle fibre di collagene; dal lato ventricolare si osserva invece una disposizione radiale delle fibre di elastina [28].	27
Figura 22: Relazione stress-strain per il lembo aortico in condizioni fisiologiche.	28
Figura 23: Rappresentazione semplificata della configurazione del lembo valvolare aortico in sistole e in diastole.	29
Figura 24: Rappresentazione schematica delle forze esercitate sui lembi valvolari nella fase di diastole e di sistole [33].	30
Figura 25 Rappresentazione schematica delle cardiopatie valvolari.	31
Figura 26: Rappresentazione schematica di apertura e chiusura di una valvola aortica sana e di una valvola aortica stenotica.	33
Figura 27: Grafico che riporta le percentuali relative alle cause del manifestarsi della patologia stenotica.	34
Figura 28: Diagrammi che riportano la tendenza nella scelta del tipo di protesi valvolare in USA tra il 1992 e il 2002 [34].	38
Figura 29: Il grafico mostra la crescita del numero totale di procedure di AVR dal 1994 al 2013. Si evidenzia l'aumento del numero di valvole biologiche impiantate e la progressiva crescita dell'approccio TAVI rispetto all'AVR realizzata con MHV [35].	39
Figura 30: Rappresentazione schematica di una valvola caged-ball, comportamento in eiezione e rilascio ventricolare e indicazioni sul tipo di flusso prodotto da una valvola di questo tipo.	40
Figura 31: Rappresentazione schematica di una valvola single tilting-disc, comportamento in eiezione e rilascio ventricolare e indicazioni sul tipo di flusso prodotto da una valvola di questo tipo.	41
Figura 32: Rappresentazione schematica di una valvola bileaflet, comportamento in eiezione e rilascio ventricolare e indicazioni sul tipo di flusso prodotto da una valvola di questo tipo.	41
Figura 33: Esempi di protesi meccaniche: A) protesi caged-ball, Starr-Edwards; B) protesi single-tilting disk, Medtronic Hall; C) protesi bileaflet.	42
Figura 34: Esempi di protesi biologiche: A) protesi aortica porcina; B) protesi in pericardio bovino; C) homograft aortico decellularizzato.	43
Figura 35: Esempi di tre valvole cardiache realizzate in pericardio bovino. A) Ionescu-Shiley (1971); B) Perimount Carpentier-Edwards (1982); C) Sorin Mitroflow (1982).	45
Figura 36: Diagramma che mostra la percentuale di interventi TAVI effettuati in Europa.	45
Figura 37: Immagine schematica che evidenzia le tre vie di accesso per il posizionamento della TAVI. Da sinistra: approccio transfemorale, approccio transapicale e approccio transaortico.	46

Figura 38: Approccio transfemorale per il posizionamento della valvola. La valvola viene schiacciata all'interno di un catetere che viene posizionato nell'annulus aortico attraverso l'ingresso femorale. Il palloncino presente sul catetere viene gonfiato espandendo la valvola e successivamente rimosso per lasciare la valvola sostitutiva in sede nativa.	46 -
Figura 39: Esempi di dispositivo di rilascio per TAVI. A) RetroFlex 3 Delivery system balloon expanding per valvole Edward Sapien 23 e 26 mm; B) Medtronic Valve System self expanding.....	47 -
Figura 40: Istologia del tessuto pericardico con effetti dello stent sulle fibre di collagene. X= struttura danneggiata e rottura delle fibre di collagene superficiali. Y= rottura delle fibre di collagene negli strati più profondi del tessuto [41]	48 -
Figura 41: Evoluzione della valvola Edwards SAPIEN (A) Valvola SAPIEN; (B) Valvola	50 -
Figura 42: A sinistra: Medtronic CoreValve; a destra: Evolut R valve. Pictures provided by Medtronic.....	51 -
Figura 43: a) Edwards SAPIEN XT (Edwards Lifesciences), b) schematizzazione del posizionamento del dispositivo nella radice aortica e c) relativa aortografia, d) Medtronic COREVALVE (Medtronic), e) schematizzazione del posizionamento del dispositivo nella radice aortica e f) relativa aortografia [45].....	52 -
Figura 44: Rappresentazione schematica dell'ingegneria tessutale valvolare basata su cellule autologhe. (1) isolamento ed espansione delle cellule autologhe attraverso le tecniche di coltura cellulare; (2) semina delle cellule su scaffold biodegradabile; (3) condizionamento meccanico nel bioreattore; (4) impianto della TEHV	54 -
Figura 45: Raggruppamento dei 20 amminoacidi in gruppi sulla base di alcune caratteristiche come polarità e carica.....	63 -
Figura 46: (A) Rappresentazione schematica del self-assembling del peptide EAK16-II attraverso interazioni idrofobiche e legami ionico-complementari. (B) In soluzione acquosa il peptide forma β -sheets che, grazie a interazioni ioniche e ad interazioni idrofobiche, assemblano dando origine a strutture tridimensionali.	64 -
Figura 47: Immagini AFM del peptide RADA16-I (PuraMatrix) osservato a diverse scale: (A) $5 \times 5 \mu\text{m}^2$; (B) $2 \times 2 \mu\text{m}^2$; (C) $1 \times 1 \mu\text{m}^2$	65 -
Figura 48: Esempi di peptidi autoassemblanti di diverse classi e conformazione fibrillare microscopica [59].....	66 -
Figura 49: Tabella dei tipi cellulari che mostrano adesione agli idrogel ottenuti dal self-assembling [66]...-	68 -
Figura 50: I gruppi sulfidrilici di due residui di cistina vengono ossidati per formare un legame disolfuro. -	71 -
Figura 51: Applicazioni biomediche degli idrogel e riferimenti in letteratura scientifica.	71 -
Figura 52: Self-assembling del peptide EAK. Formazione di strutture tridimensionali grazie alla formazione di legami idrofobici e ionici tra i β sheets. [76]	79
Figura 53: A) I dischetti di tessuto pericardico per la misura del contenuto d'acqua sono disposti su una Petri. Si osservano campioni in triplicato per ciascuna condizione da testare. B) I campioni di PBD vengono posti su un Petri per la misurazione di spessore ed area.....	82

Figura 54: Componenti del sistema Bose planar biaxial TestBench: A) celle di carico; B) grips.....	85
Figura 55: Interfaccia del software WinTest	85
Figura 56: Schema delle condizioni della piastra da 96 pozzetti messa a punto per il saggio MTS.....	90
Figura 57: Schema delle condizioni della piastra da 96 pozzetti messa a punto per il saggio LDH.....	91
Figura 58: Interfaccia del software ImageJ utilizzato per misurare l'area dei campioni.....	95
Figura 59: Spessimetro digitale Mitutoyo 547-401 Absolute Digimatic Thickness Gauge utilizzato per la misurazione dello spessore dei campioni.....	96
Figura 60: Curve tenso-deformative per i campioni TRICOL.....	97
Figura 61: Curve tenso-deformative per i campioni GA	98
Figura 62: Curve tenso-deformative per i campioni EAK.....	98
Figura 63: Curve tenso-deformative per i campioni EAbuK.....	99
Figura 64: Curve tenso-deformative per i campioni EAK-CYS.....	99
Figura 65: Modulo elastico E1 dei campioni di pericardio bovino sottoposti ai vari trattamenti. (* indica la significatività nei confronti di TRICOL e GA con $p < 0.05$).....	100
Figura 66: Modulo elastico E2 dei campioni di pericardio bovino sottoposti ai vari trattamenti.	101
Figura 67: Tensione ultima a rottura (UTS) per i campioni di pericardio bovino sottoposti ai vari trattamenti.	102
Figura 68: Elongazione massima per i campioni di pericardio bovino trattati.	104
Figura 69: Saggio MTS. Nel grafico viene riportato l'andamento dell'assorbanza per i timepoints fissati e per i vari gruppi di trattamento. La lettura dell'assorbanza è direttamente correlata alla valutazione della proliferazione cellulare sul tessuto.	106
Figura 70: Curva di calibrazione per la lettura della piastra LDH dei campioni relativi a 6,24, 48 h. Nel grafico vengono riportate anche l'equazione della retta di regressione e il coefficiente R^2	108
Figura 71: Istogramma rappresentativo dell'attività LDH per i diversi tipi di trattamento e ai timepoints considerati.	109
Figura 72: Mantenimento dell'integrità della ECM dopo trattamento con saccarosio al 60% durante la procedura di congelamento. A) PBD B) PBD trattato con SAP DAbuK. Ingrandimento 20x.	111
Figura 73: Valutazione istologica dei campioni H&E su criosezioni di PBD non trattato (A e B), trattato con peptide EAK (C,D), trattato con peptide EAbuK (E,F), trattato con peptide EAK-CYS (G,H), trattato con GA (I,L) dopo 72h dalla semina con hBM-MS. Ingrandimento 20x (A,C,E,G,I), 40x (B,D,F,H,L).....	112
Figura 74: Istogramma che riporta la media e SD dei valori di area per i vari gruppi di trattamento.	114
Figura 75: Istogramma che mostra il decremento in percentuale dell'area del campione.....	114
Figura 76: Istogramma di confronto che mostra lo spessore medio dei campioni per ogni gruppo di trattamento. (* = p-value < 0.05)	117
Figura 77: Istogramma che mostra il contenuto d'acqua nei campioni trattati.	120

Indice delle tabelle

Tabella 1: Principali tipi di collagene con proprietà meccaniche qualitative e distribuzione nei tessuti....	11
Tabella 2: Tensione a rottura di tessuti biologici studiati per la protesica valvolare.	57
Tabella 3: Elenco dei metodi di decellularizzazione più utilizzati per la preparazione dello scaffold. .	59
Tabella 4: Valori medi, deviazioni standard ed errore standard per il modulo elastico E1 sulla base della tipologia di trattamento.	100
Tabella 5: Risultati del t-test condotto per valutare la significatività delle differenze tra valori del modulo elastico E1. La sottolineatura evidenzia i p-value inferiori alla soglia di significatività (p-value<0.05).	100
Tabella 6: Valori medi, deviazioni standard ed errore standard per il modulo elastico E2 sulla base della tipologia di trattamento.	101
Tabella 7: Risultati del t-test condotto per valutare la significatività delle differenze tra i valori del modulo elastico E2. La sottolineatura evidenzia i p-value inferiori alla soglia di significatività (p-value<0.05).	101
Tabella 8: Valori medi, deviazioni standard ed errore standard per l'UTS sulla base della tipologia di trattamento.	103
Tabella 9: Risultati del t-test condotto per valutare la significatività delle differenze tra i valori di UTS.	103
Tabella 10: Valori medi, deviazioni standard ed errore standard per i valori di elongazione massima sulla base delle varie tipologie di trattamento.	104
Tabella 11: Risultati del t-test condotto per valutare la significatività delle differenze tra i valori di elongazione massima. La sottolineatura evidenzia i p-value inferiori alla soglia di significatività	104
Tabella 12: Valori medi di assorbanza registrati per ogni timepoint e per gruppo di trattamento.....	105
Tabella 13: Deviazioni standard per i valori di assorbanza registrati per ogni timepoint e per gruppo di trattamento.	106
Tabella 14: Risultati del t-test condotto per valutare eventuali differenze nella proliferazione cellulare per i diversi timepoints e sui diversi scaffold.....	107
Tabella 15: Analisi statistica di significatività volta ad evidenziare eventuali differenze nel comportamento cellulare considerando singolarmente ogni gruppo di trattamento ai vari timepoints (ANOVA a una via).....	108
Tabella 16: In tabella si riportano i valori medi e le deviazioni standard dell'attività dell'LDH per i campioni t = 6, 24, 48 e 72 h.....	109

Tabella 17: Analisi statistica di significatività volta ad evidenziare eventuali differenze nell'attività dell'LDH considerando singolarmente ogni gruppo di trattamento ai vari timepoints (ANOVA a una via).	110
Tabella 18: Tabella che riporta le misure di area di ciascuno dei 5 campioni trattati. Si riportano anche la media e la deviazione standard per i singoli gruppi di trattamento.	114
Tabella 19: Decremento percentuale in termini di area di campioni trattati con i peptidi rispetto ai campioni decellularizzati di riferimento.	114
Tabella 20: Risultati del t-test condotto sulle misurazioni di area dei campioni suddivisi per gruppo di trattamento. La sottolineatura evidenzia i p-value significativi.	115
Tabella 21: Misurazioni dello spessore relativo ai campioni di pericardio bovino decellularizzato prima della gelificazione del peptide.....	116
Tabella 22: Misurazione dello spessore dei campioni di pericardio bovino decellularizzato trattato con 0.6 % GA	116
Tabella 23: Misurazione dello spessore dei campioni di pericardio bovino decellularizzato dopo la gelificazione dei peptidi.....	117
Tabella 24: Tabella riassuntiva che riporta la media e la deviazione standard dello spessore per i gruppi di trattamento.	117
Tabella 25: Risultati dei t-test condotto sulle misurazioni degli spessori dei campioni suddivisi per gruppo di trattamento. La sottolineatura evidenzia i p-value significativi perché inferiori alla soglia (p-value < 0.05).....	118
Tabella 26: Pesi idratati (gr) dei campioni trattati.	119
Tabella 27: Pesi dei campioni dopo la liofilizzazione (gr).	119
Tabella 28: Contenuto d'acqua percentuale dei campioni suddivisi sulla base del trattamento.....	120
Tabella 29: In tabella sono riportati i p-value per valutare la significatività delle differenze tra campioni sottoposti a diversi trattamenti. La sottolineatura evidenzia i p-value significativi perché inferiori alla soglia (p-value < 0.05)	121

I. ASPETTI ANATOMICI, ISTOLOGICI E FUNZIONALI DEL PERICARDIO

Il cuore è un organo muscolare di forma quasi conica, leggermente asimmetrica, che si trova nella cavità toracica ed è in grado di contrarsi e distendersi per consentire la circolazione del sangue in tutto il corpo.

Esso è completamente avvolto dal *pericardio*, una sacca fibrosa che lo sostiene all'interno del mediastino, inguainando anche i tratti del tronco polmonare, dell'aorta, delle terminazioni delle vene cave (superiore ed inferiore) e delle vene polmonari.

Forma e dimensioni del pericardio corrispondono a quelle del cuore e permettono il movimento dell'organo in relazione ai cambiamenti volumetrici in fase sistolica e diastolica.

Nel soggetto adulto, in particolare, il sacco pericardico presenta una altezza di 12-14 cm, una larghezza massima di 13-14 cm e uno spessore variabile dai 10 mm nella zona della base ai 6-7 mm nella regione apicale.

Morfologicamente il sacco pericardico è suddivisibile in quattro regioni: base, faccia anteriore, faccia posteriore e apice.

La *base* è collocata sulla cupola diaframmatica e segue il diaframma nell'atto della respirazione; la *faccia anteriore* è convessa e si prolunga sino in prossimità dei polmoni su entrambi i lati. In ultimo, la *faccia posteriore* è rivolta verso la colonna vertebrale, all'incirca all'altezza della quinta o sesta vertebra toracica, mentre l'*apice* abbraccia il peduncolo vascolare (*Figura 1, Figura 2*) [1].

Il pericardio è costituito da due strati con caratteristiche profondamente differenti che verranno presentati in dettaglio nei prossimi paragrafi.

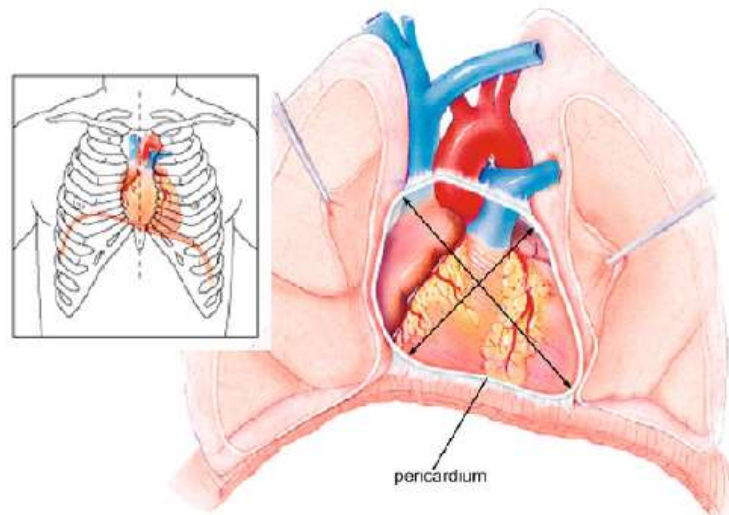


Figura 1: Posizione del cuore nel torace. Ai lati del cuore si trovano i polmoni, che occupano le cavità pleuriche. Lo spazio tra le due cavità è definito mediastino. Il cuore ha un orientamento obliquo, nel mediastino, ed è circondato dal pericardio.

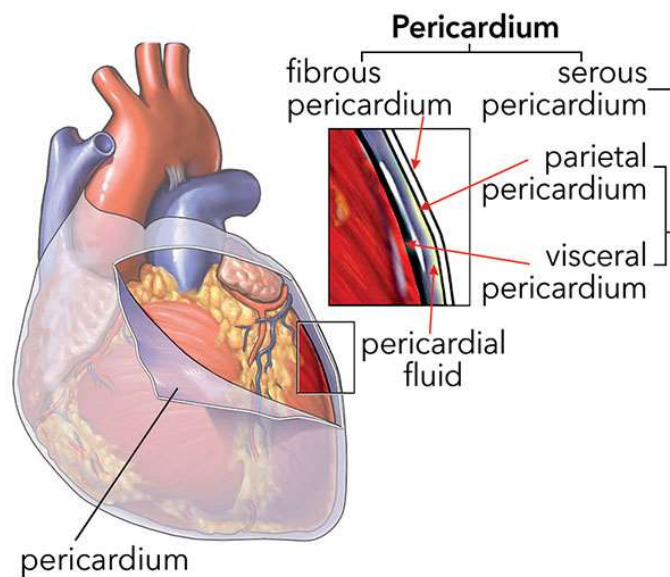


Figura 2: Immagine del sacco pericardico che avvolge il cuore sino alle terminazioni di aorta, vene cave e vene polmonari. Ingrandimento della parete pericardica con suddivisione in strati.

1.1 Pericardio sieroso

Il pericardio sieroso è il sacco chiuso esterno che circonda il cuore, costituito da un foglietto parietale ed uno viscerale (epicardio), in continuità solo attorno ai vasi.

Il foglietto parietale è molto sottile e tappezza la faccia interna del pericardio fibroso senza possibilità di venire separato da quest'ultima.

Esso è costituito da cellule mesoteliali piatte (o cubiche) sostenute da uno strato di tessuto connettivo ricco di collagene ed elastina, in continuità con il tessuto del pericardio fibroso.

Il foglietto viscerale invece riveste esternamente il miocardio, ed è formato da uno strato di cellule mesoteliali appiattite collocate al di sopra di uno strato di tessuto connettivo. Questo strato, ricco di fibre elastiche e provvisto di una rete capillare e nervosa ben definita, forma inoltre due guaine distinte intorno all'aorta e al tronco polmonare e alle terminazioni nervose assicurando l'indipendenza dei movimenti dei tronchi arteriosi rispetto ad atri e vene.

Tra i due foglietti, in condizioni fisiologiche, è presente spazio riempito di un liquido, detto liquido pericardico, che permette ai foglietti di scivolare l'uno sull'altro liberamente e senza frizione.

1.2 Pericardio fibroso

Il pericardio fibroso è un invece un sacco sottile, resistente ed inestensibile, la cui forma riproduce quella del cuore. Esso presenta una forma conica, con l'asse maggiore orientato come quello del cuore e la base che avvolge i grossi vasi venosi ed arteriosi.

Il pericardio fibroso è caratterizzato da una colorazione bianca perlacea e mentre la faccia interna della lamina ha continuità con lo strato di sostegno della lamina parietale del pericardio, la sua faccia esterna è rivestita dall'epipericardio ed unita alla pleura mediante uno strato di tessuto connettivo lasso ed adiposo.

Foglietto parietale del pericardio sieroso, pericardio fibroso e epipericardio formano il pericardio parietale.

Come già detto, nell'uomo il sacco pericardico aderisce direttamente al diaframma mediante il tessuto connettivo lasso a livello periferico, mentre nella regione centrale si riconoscono formazioni fibrose che si fondono in una connessione più intima.

Per quanto riguarda i mammiferi, il pericardio è mantenuto separato dal diaframma mediante una porzione di mediastino, nel quale si trova il legamento freno-pericardico.

La presenza di legamenti sterno-pericardici, che uniscono il sacco pericardico allo sterno, è peculiarità dell'uomo, dei bovini e del maiale.

La presenza di tralci fibrosi permette di unire in modo efficace la base del cuore ed il pericardio alle pareti degli organi toracici, consentendo al cuore di essere sospeso nella regione mediastinica in modo solido ma al contempo elastico, fissato allo sterno, al diaframma e alla colonna vertebrale (*Figura 3*).

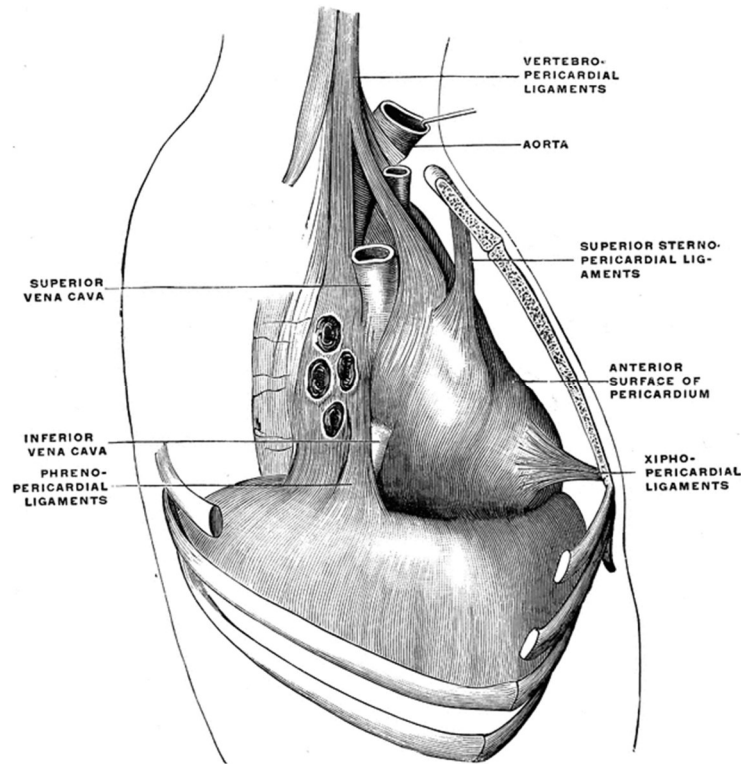


Figura 3: Visione laterale della cavità toracica con dettaglio sui legamenti vertebro-pericardici, sterno-pericardici, freno-pericardici e xifo-pericardici.

E' necessario evidenziare che, qualora si esegua la dissezione del pericardio, ciò che effettivamente si è in grado di asportare dal cuore sono solamente lo strato fibroso e il foglietto parietale ad esso unito, mentre il foglietto viscerale rimane adeso alla superficie cardiaca.

1.3 Aspetti fisiologici e funzionali del pericardio

Il contributo del pericardio alla regolazione della dinamica cardiaca è sicuramente modesto, tuttavia la sua funzione fisiologica può risultare apprezzabile se ci si concentra su alcuni aspetti principali come la *limitazione dei movimenti del cuore* all'interno del mediastino, la *modificazione delle caratteristiche dinamiche delle quattro cavità cardiache* e la *lubrificazione e protezione meccanica* della superficie esterna del cuore.

Queste funzioni possono assumere rilevanza notevole in condizioni patologiche, mentre la loro effettiva importanza in condizioni normali non è ancora stata accertata. La maggior parte degli studi che si sono occupati della dinamica cardiaca, infatti, non si sono mai focalizzati sul ruolo del pericardio, perché spesso alcune operazioni eseguite direttamente sul cuore sacrificano l'integrità del tessuto.

Anche qualora il tessuto dovesse essere recuperato e successivamente suturato, infatti non sarebbe possibile garantire che le sue proprietà e le caratteristiche funzionali rimangano inalterate e ne consentano una caratterizzazione affidabile.

Nel prosieguo si analizzeranno brevemente gli aspetti funzionali del pericardio sopra citati.

1.3.1 Limitazione dei movimenti cardiaci

In assenza del pericardio, il cuore rimarrebbe sospeso nella cavità toracica, vincolato soltanto dalle sue inserzioni con i grossi vasi e di conseguenza la sua posizione diverrebbe continuamente variabile per effetto della postura e dei movimenti degli altri organi [2].

Il pericardio invece, essendo ancorato a sterno, mediastino e diaframma, consente di mantenere fissa la posizione dell'organo.

1.3.2 Influenza del pericardio sulla dinamica cardiaca

L'influenza del pericardio sulla dinamica cardiaca è sicuramente l'aspetto su cui concentrare la maggiore attenzione.

In letteratura sono numerosi gli studi volti a definire se in condizioni normali il cuore riempia completamente il sacco pericardico oppure si muova liberamente all'interno di esso. Questa considerazione è fondamentale anche per determinare con esattezza la distensibilità delle cavità cardiache. L'impiego di precisi misuratori per le distanze fra le pareti del cuore ha comunque consentito di stabilire con sicurezza che il sacco pericardico è sempre completamente pieno alla fine della diastole, tanto che anche la più piccola variazione di pressione all'interno dei ventricoli viene riprodotta da una identica variazione di pressione nel liquido pericardico. Poiché la *compliance* del pericardio è comunque assai ridotta al disopra di un certo volume di distensione, questo fa intuire che, se effettivamente anche in condizioni normali il cuore riempie la cavità pericardica, ogni distensione dei ventricoli è fortemente limitata [3].

Le caratteristiche del pericardio consistono quindi in una ridotta distensibilità per variazioni brusche di lunghezza delle fibre e in una straordinaria adattabilità di fronte a

variazioni lente. Queste proprietà si traducono nella possibilità che il pericardio eserciti effettivamente una costante azione passiva di controllo sul riempimento delle camere ventricolari, prevenendone una distensione non fisiologica e consentendo di mantenere un volume complessivo fisso alla fine della diastole, ripartendo fra le quattro cavità eventuali differenze di riempimento.

1.3.3 Lubrificazione e protezione meccanica

Come è stato precedentemente descritto, lo spazio pericardico contiene una piccola quantità di liquido (10-15 ml) di composizione molto simile al plasma.

Il liquido pericardico si ricambia rapidamente: esso viene per lo più filtrato dalla superficie epicardica e riassorbito dai capillari a livello della base del cuore.

Le funzioni che si possono attribuire al liquido pericardico sono essenzialmente quella di diminuire l'attrito fra il foglietto parietale e quello viscerale e quella di ammortizzare eventuali traumi che possono essere imposti sulla gabbia toracica.

1.4 Istologia del pericardio

Dal punto di vista istologico, il pericardio è costituito da tre strati (*Figura 4*):

- *strato sieroso*: è il più interno ed è formato da cellule mesoteliali;
- *strato fibroso intermedio*: costituito da tessuto connettivo contenente strati orientati di fibrille di collagene e fibre di elastina;
- *epipericardio*: lo strato più esterno, formato da fasci di collagene che formano il legamento sterno-pericardico.

Lo *strato sieroso* è formato da cellule mesoteliali di forma esagonale o poligonale che concorrono a formare un epitelio pavimentoso senza però mostrare una orientazione prevalente. Le cellule mesoteliali tendono a sovrapposti, garantendo la stabilità meccanica e permettendo le variazioni della configurazione della superficie. La superficie libera è inoltre coperta da uno strato sottile di liquido.

Lo *strato fibroso* invece è costituito prevalentemente da tessuto connettivo denso in cui si individua la matrice extracellulare (*ECM*) ed i pericardiociti che secernono e sintetizzano i componenti della *ECM*, in particolare collagene (nel caso del pericardio di tipo *I* e *III*), proteoglicani, glicoproteine e componenti delle fibre elastiche.

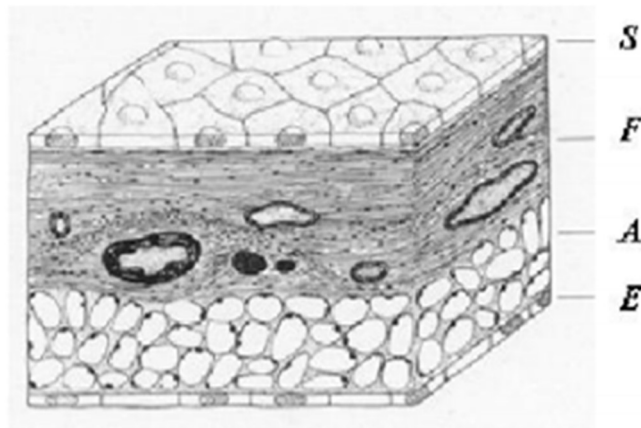


Figura 4: Sezione trasversale del pericardio parietale. E' possibile distinguere il foglietto parietale sieroso (S), quello fibroso (F), lo strato adiposo (A) e l'epipericardio a contatto con la pleura parietale.

Nello strato fibroso è possibile individuare, oltre a piccoli vasi, anche la presenza di diversi strati di fibre di collagene orientati in maniera differente. Le fibre di collagene immediatamente sottostanti le cellule mesoteliali appaiono infatti orientate secondo l'asse cefalo-caudale, mentre gli strati più profondi mostrano un pattern diversificato, con i fasci ondulati che si sviluppano in varie direzioni.

Questo arrangiamento fibrillare è finalizzato alla funzionalità del tessuto e quindi al suo allungamento, in maniera tale che anche una leggera tensione possa portare ad un allungamento limitato e mediato dalla progressiva distensione delle fibre di collagene. Le fibre di elastina, invece, sono generalmente molto sottili (meno di 2 μm di diametro) e frequentemente orientate perpendicolarmente alle fibre di collagene.

Infine, il *tessuto epipericardico* contiene fibre di collagene ed elastina, cellule adipose, strutture nervose e vasi sanguigni [4].

Matrice extracellulare (ECM)

Una porzione notevole del volume dei tessuti è costituita dallo spazio extracellulare riempito, per la maggior parte, da una sostanza complessa nella quale vengono trattenute quantità rilevanti di liquido interstiziale (*Figura 5*)

La ECM non ha solamente ruolo di stabilizzazione strutturale dei tessuti, ma fornisce altresì un substrato utile per la crescita ed il differenziamento cellulare e permette il transito di fluidi, molecole e nutrienti verso le cellule che sono in stretto contatto con essa.

Nella fattispecie, ciò che caratterizza ogni singolo tessuto non è solo la composizione chimica e biologica, ma anche l'orientazione delle fibre e l'architettura della matrice che porta a proprietà meccaniche e biologiche anche significativamente differenti.

Le due classi principali di macromolecole extracellulari che compongono la matrice sono i glicosamminoglicani (GAG) e le proteine fibrose.

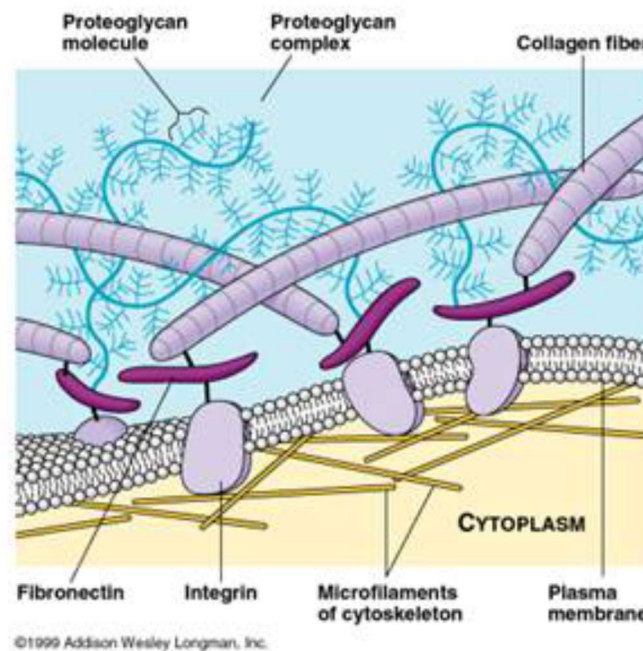


Figura 5: Rappresentazione semplificata della composizione e della struttura della ECM

I GAG sono polimeri lineari non ramificati costituiti dalla ripetizione di monomeri formati da due unità di natura glucidica (disaccaridi). La più semplice molecola di glicosamminoglicano è l'acido ialuronico che, alla luce della sua natura particolarmente idratata, gioca un ruolo biologico importante nella resistenza a compressione dei tessuti e delle articolazioni.

Fatta eccezione per l'acido ialuronico, i GAG sono legati covalentemente a proteine per formare i proteoglicani (PG) nei quali i polisaccaridi rappresentano oltre il 95% del complesso. Con la loro architettura complessa, i PG conferiscono ai tessuti connettivi le caratteristiche di viscoelasticità. Le proteine fibrose invece sono distinguibili in un gruppo con funzione prevalentemente strutturale (collagene ed elastina) ed un gruppo con funzione prevalentemente adesiva (fibronectina e laminine). Il loro complesso forma un reticolo di legami trasversali che conferiscono consistenza e resistenza alla ECM.

La sostanza fondamentale o sostanza amorfa

La sostanza fondamentale a livello macroscopico si presenta come un liquido con caratteristiche di viscosità nella quale sono immerse le cellule e le fibre del tessuto connettivo. A livello microscopico, invece, la sostanza intercellulare amorfa è una rete tridimensionale formata da GAG, glicoproteine e aggregati di proteoglicani.

La struttura e la composizione della sostanza fondamentale consente di rendere la matrice permeabile ai nutrienti cellulari grazie alla capacità di legare molecole d'acqua. Essa si occupa inoltre della connessione di diverse strutture fibrose provvedendo al loro orientamento spaziale e ostacolando la diffusione di patogeni all'interno dei tessuti.

Elastina

L'altra proteina fibrosa che costituisce la ECM è l'elastina. Nella sua struttura primaria sono presenti, oltre alla prolina, anche amminoacidi idrofobici (*alanina, valina, leucina, glicina*) e solo in piccola parte l'idrossiprolina. Amminoacidi come la desmosina, la isodesmosina e la lisino-norleucina servono invece per la reticolazione.

L'elastina assume una configurazione *random coil* caratterizzata da catene con avvolgimento disordinato collegate tra loro da legami reticolari. Una struttura del genere consente alle fibre di estendersi e poi tornare alla posizione di partenza, a seconda della sollecitazione a cui sono sottoposte.

La reticolazione e la presenza abbondante di amminoacidi idrofobici rendono l'elastina una delle proteine più insolubili.

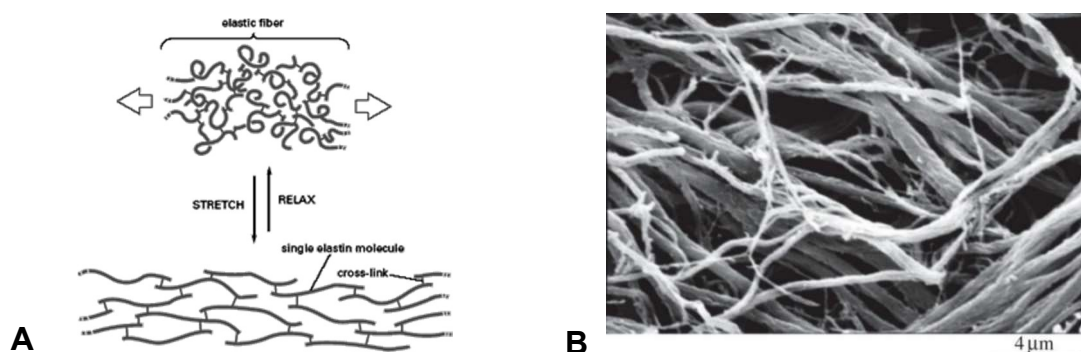


Figura 6: A) stiramento di un reticolo di molecole di elastina; ogni molecola può espandersi e contrarsi consentendo l'allungamento e l'accorciamento dell'intero complesso; B) micrografia elettronica a scansione di un reticolo di fibre di elastina [5]

Collagene

Il collagene costituisce circa il 25% di tutte le proteine del corpo umano e svolge funzioni di supporto e collegamento. Esso è prodotto dai fibroblasti ed è costituito da catene polipeptidiche, dette catene α , strettamente intrecciate a tripla elica compatta. La struttura primaria delle singole catene è composta da oltre mille amminoacidi ed è caratterizzata dalla ripetizione di numerose triplette *Gly-Pro-Hyp*.

La glicina (*Gly*) si colloca, date le sue piccole dimensioni, all'interno della tripla elica, mentre prolina (*Pro*) e idrossiprolina (*Hyp*) favoriscono l'avvolgimento a spirale delle catene. Ogni filamento assume una struttura caratterizzata da un'elica sinistrorsa e tre filamenti elicoidali di questo genere si organizzano a super-elica destrorsa, costituendo il tropocollagene, precursore del collagene stesso.

In virtù degli avvolgimenti elicoidali, le fibre di collagene appaiono al microscopio come strutture ondulate di larghezza e lunghezza variabile, costituite da sub-unità che prendono il nome di fibrille (*Figura 7*). All'interno di ogni fibra di collagene le fibrille hanno generalmente un diametro uniforme dai 15 ai 30 nm che può però arrivare sino a 250 nm nel caso di tessuto connettivo denso o di altri tessuti che sono sottoposti a carichi notevoli.

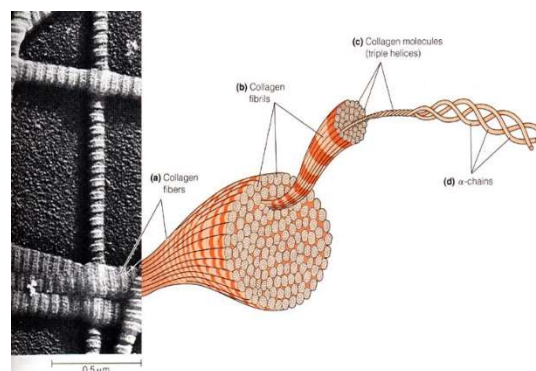


Figura 7: Struttura del collagene: dalla singole catene polipeptidiche alla fibrille.

Osservando le fibrille di collagene al microscopio a trasmissione, esse presentano sequenze di striature trasversali che si ripetono per tutta la lunghezza dovute proprio alla microstruttura del collagene: ciascuna fibrilla infatti è composta da molecole di tropocollagene (di lunghezza 300 nm e diametro 1,5 nm) sfasate tra loro da *hole zone* di circa 40 nm.

In natura esistono oltre 25 tipi di collagene, tutti caratterizzati dalla presenza di triple eliche, che mostrano però notevoli differenze dal punto di vista della funzione

fisiologica e del comportamento biomeccanico. In *Tabella 1* viene riportato un dettaglio dei principali tipi di collagene, con indicazione della distribuzione, delle proprietà meccaniche e dell'organizzazione strutturale nell'organismo.

Tipo	Distribuzione	Proprietà	Organizzazione
I	Derma, tendini, legamenti, osso, dentina, cemento	Resistenza alla trazione	Fibre spesse con andamento parallelo o intrecciato con bande periodiche ben evidenti
II	Cartilagine, disco intervertebrale, corpo vitreo	Resistenza alla compressione	Fibre sottili
III	Tessuto reticolare, connettivo lasso che riveste la muscolatura liscia	Connessioni strutturali	Fibre sottili che rivestono altri tessuti o che formano trame in molti organi
IV	Lamina basale	Impalacatura della membrana basale	Non forma bande

Tabella 1: Principali tipi di collagene con proprietà meccaniche qualitative e distribuzione nei tessuti

Poiché la determinazione della quantità e della distribuzione nel tessuto dei componenti sopra citati è imprescindibile per stabilirne le proprietà meccaniche, è doveroso ricordare il l'impegno di Naimark et al. in [6] nel correlare struttura e proprietà viscoelastiche del tessuto pericardico di quattro differenti specie animali attraverso test meccanici, analisi biochimiche ed osservazioni istologiche.

Nel pericardio bovino, in particolare, la componente collagenica è per il 90% di tipo I, mentre il rimanente 10% è costituito da collagene di tipo III, come confermato anche nello studio di Schoen [7].

1.5 Note sul comportamento meccanico di tessuti molli

La maggior parte dei tessuti molli esibiscono alcune caratteristiche biomeccaniche comuni, quali la non linearità (per geometria e per materiale), l'anisotropia e la viscoelasticità.

Nel seguito verranno descritti brevemente questi aspetti.

1.5.1 Non linearità per geometria e non linearità per materiale

Nell'ipotesi di deformazioni infinitesime e di piccoli gradienti di spostamento, la formulazione cinematica del processo deformativo per il tessuto è da considerarsi lineare, viceversa si parla di *non linearità per geometria*.

I tessuti molli, che normalmente sviluppano deformazioni finite, non si prestano dunque ad una descrizione lineare dello stato tenso-deformativo, bensì manifestano una condizione di non linearità accoppiata per materiale e per geometria.

Nel caso dei materiali biologici, la non linearità è strettamente correlata alla struttura del collagene, che presenta configurazioni più o meno *crimped* a seconda del carico che viene applicato al biomateriale stesso: in genere le fibre di collagene presentano un andamento ondulato, che progressivamente scompare quando il tessuto viene posto in trazione.

1.5.2 Anisotropia

Gli aspetti di simmetria del materiale dipendono dalla configurazione strutturale del materiale stesso. Nel caso specifico dei tessuti biologici, l'organizzazione microstrutturale deriva dalla disposizione di collagene ed elastina all'interno della ECM e dalla loro mutua interazione. In generale dunque, dal momento che gli stati di tensione che si sviluppano fisiologicamente nei tessuti di questo tipo sono molto variabili in termini di direzione e di intensità, il risultato è che la disposizione delle componenti fibrose è molto complessa e si traduce in un comportamento tessutale molto diverso a seconda della direzione considerata.

1.5.3 Viscoelasticità

Le interazioni tra la componente idratata (ad esempio i proteoglicani) e le componenti fibrose della matrice conferiscono ai tessuti le cosiddette proprietà viscoelastiche.

Si parla di viscoelasticità qualora ci si riferisca ad una dipendenza dello stato tensionale non solo dal livello deformativo corrente, ma anche dalla pregressa storia di carico.

Le caratteristiche viscoelastiche di un materiale si manifestano principalmente in tre fenomeni denominati creep, rilassamento delle tensioni e isteresi.

Accanto a questi è doveroso evidenziare anche la dipendenza della rigidità del materiale dalla velocità di deformazione ad esso applicata.

In letteratura esistono diversi modelli ottenuti dalle combinazioni di elementi elastici e smorzatori viscosi messi a punto proprio per descrivere il comportamento reologico dei materiali biologici.

In *Figura 8* si mostrano i tre modelli più utilizzati: modello di Maxwell, modello di Voigt e modello di Kelvin.

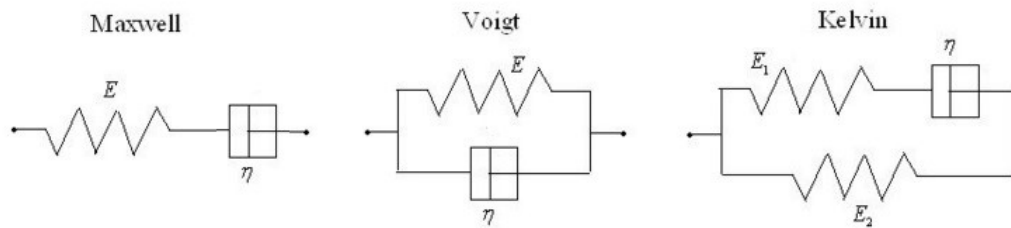


Figura 8: Esempi di modelli reologici per descrivere i fenomeni di viscoelasticità nei materiali. Tutti i modelli sono ottenuti dalla combinazione di elementi elastici e smorzatori viscosi.

Creep

Il fenomeno del creep si manifesta con una lenta e continua variazione dello stato deformativo in presenza dell'applicazione di una tensione costante.

In *Figura 9* sono rappresentate le risposte deformative all'applicazione di una tensione costante descritte dai tre modelli reologici sopra citati.

E' evidente come l'utilizzo di un modello piuttosto che un altro consenta di descrivere in maniera più o meno precisa lo sviluppo del fenomeno.

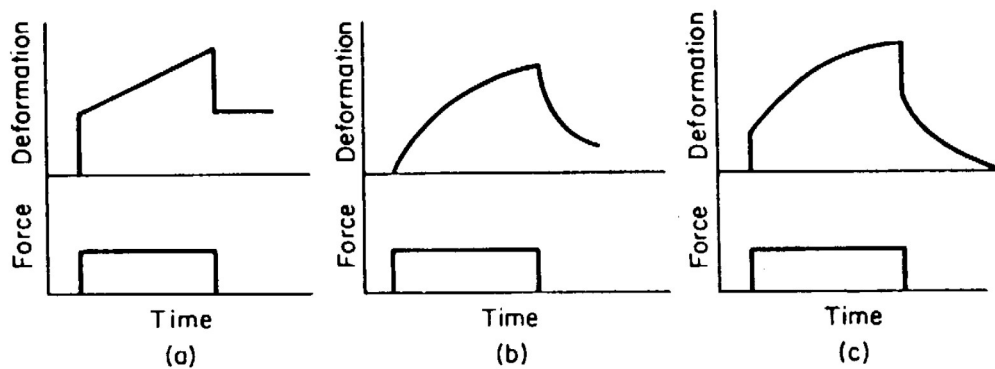


Figura 9: La descrizione del fenomeno del creep varia in relazione al modello reologico considerato: a) modello di Maxwell; b) modello di Voigt; c) modello di Kelvin

Rilassamento delle tensioni

Il rilassamento delle tensioni è invece il processo di variazione dello stato di tensione in relazione all'applicazione di uno stato di deformazione mantenuto costante.

La tensione assume il valore massimo in corrispondenza dell'istante iniziale e poi decade con andamento esponenziale nel tempo.

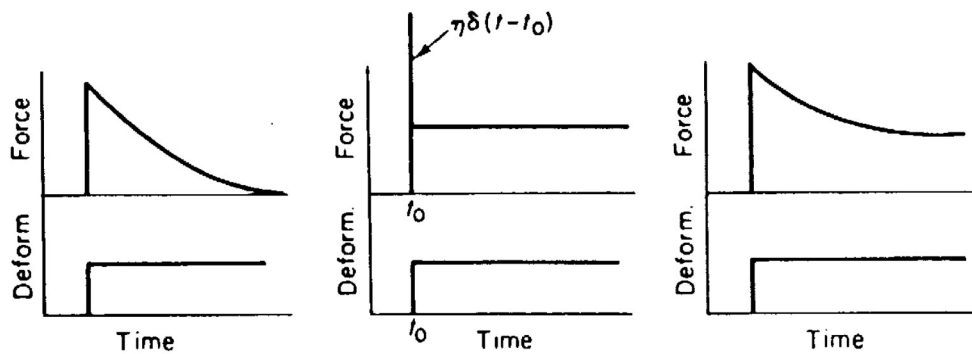


Figura 10: La descrizione del fenomeno del rilassamento delle tensioni varia in relazione al modello reologico considerato: a) modello di Maxwell; b) modello di Voigt; c) modello di Kelvin

Isteresi

Il fenomeno di isteresi è un processo di dissipazione di energia che si manifesta in un materiale soggetto ad un processo di carico/scarico.

L'ampiezza dell'isteresi è strettamente connessa con la natura del materiale ed è variabile al variare delle proprietà di questo.

1.5.4 Comportamento meccanico del tessuto pericardico bovino

Diversi sono i riferimenti in letteratura ([8], [9], [10]) che illustrano come gli aspetti siano condivisi anche dal comportamento biomeccanico del tessuto pericardico.

Adja Radjeman et al. in [8] sottopongono il tessuto a test di trazione monoassiali a rottura ed evidenziano come la curva di carico che ne deriva presenti dapprima una resistenza alla trazione ridotta (regione O-P della curva in *Figura 11*) che progressivamente aumenta al crescere dei valori percentuali di deformazione (regione P-Q).

Una volta superato il punto Q (*“transition point”*) la relazione tenso-deformativa assume un andamento lineare (Q-R), sino a quando la deformazione supera il valore corrispondente all'ascissa del punto R della curva. Nella regione R-S, infatti, la curva torna a presentare nuovamente una regione non lineare, con una diminuzione della pendenza sino a raggiungere la rottura del provino, in corrispondenza del punto S.

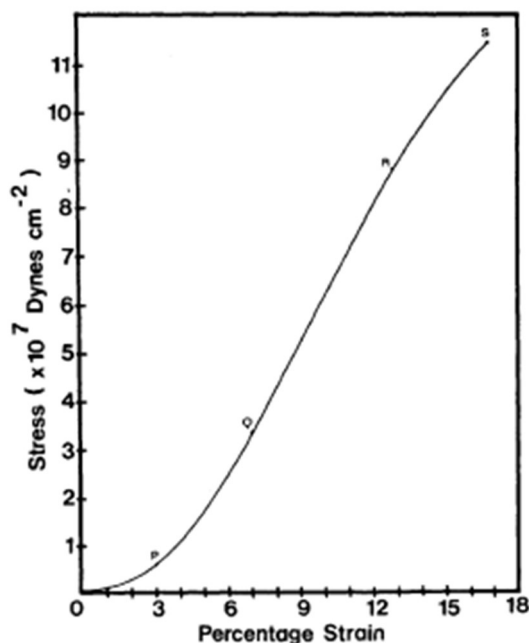


Figura 11: Curva rappresentativa del comportamento meccanico del pericardio bovino [8]

Un andamento della curva tenso-deformativa di questo tipo è motivato dall'arrangiamento microstrutturale e dall'interazione delle componenti fibrose (collagene ed elastina), che non sono in grado rispondere alla sollecitazione finchè non sono distese ed allineate.

Poiché le fibre elastiche rispondono immediatamente all'applicazione del carico e sono in grado di trasmetterlo subitaneamente, la regione iniziale non lineare della curva (O-P) è da considerarsi dominata dal comportamento della componente elastinica.

In questa fase si osserva lo sviluppo di grandi deformazioni anche in relazione a piccoli aumenti di stati tensionali.

Successivamente, all'aumentare del carico applicato e della deformazione, la componente collagenica si stende ed allinea progressivamente in direzione del carico ed è in grado di offrire resistenza meccanica al tessuto.

La viscoelasticità tissutale è stata anch'essa indagata in [8], conducendo test meccanici variando la velocità di deformazione. I risultati ottenuti da questo tipo di prove hanno evidenziato che il comportamento del tessuto varia in relazione allo *strain-rate* ed in particolare mostra una bassa rigidità per basse velocità di variazione dello *strain*, mentre diventa più rigido all'aumentare della velocità di variazione della deformazione (Figura 12).

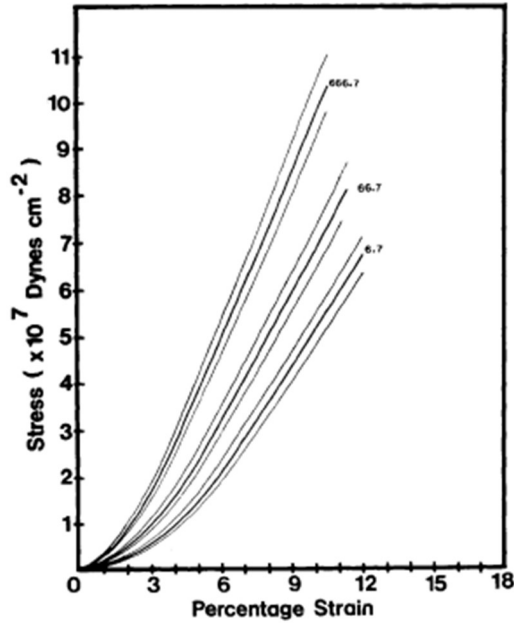


Figura 12: Risposta tenso-deformativa del tessuto di pericardio sollecitato con tre diverse velocità di deformazione lungo la direzione orizzontale. Lo strain rate riportato in figura è espresso in % min⁻¹. [8]

Se il comportamento biomeccanico non lineare del tessuto e le caratteristiche di viscoelasticità sono condivise, l'anisotropia tissutale è invece una questione su cui il dibattito è stato sempre acceso e i dati riportati in letteratura non sono concordi.

I primi test di insufflazione condotti da Hilderbrandt et al [11], nel 1969, sembrano portare a concludere che il pericardio bovino sia un materiale tendenzialmente isotropo, seppur con alcune caratteristiche di anisotropia non ben specificate.

Studi sperimentali successivi, sviluppati sulla base di test monoassiali su tessuto nativo, suggeriscono invece che il materiale sia isotropo [12], moderatamente anisotropo [13] ed anisotropo ([14], [8]; [15]).

I risultati ottenuti da test meccanici biassiali, concordano tutti invece sulla natura anisotropa del tessuto ([16]; [17]; [18]).

La motivazione delle contraddizioni evidenziate è legata prettamente all'assenza di informazioni sugli assi di simmetria del tessuto che ha portato notevoli difficoltà nel condurre test meccanici per valutare questi aspetti. [10]

Oltre ai test di trazione, l'anisotropia del tessuto è stata valutata attraverso indagini di natura ottica prettamente qualitative (Zioupos et. al [10] ; Sacks et al. [19]).

I risultati ottenuti da Zioupos hanno mostrato che il pericardio bovino presenta una maggiore estensibilità ed una maggior resistenza alla trazione (Figura 13) in direzione circonferenziale piuttosto che longitudinale confermando che il comportamento

meccanico significativamente differente del tessuto a seconda della direzione considerata sia da imputare alla distribuzione non uniforme delle componenti fibrose nel tessuto.

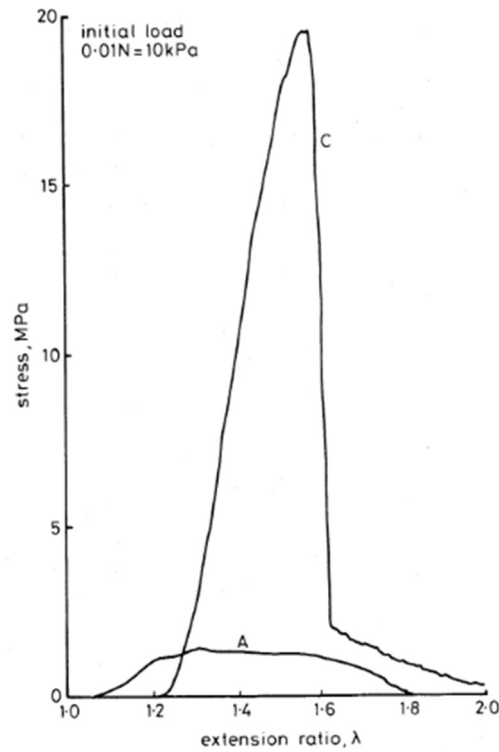


Figura 13: I campioni circolari (C) mostrano una resistenza alla trazione superiore rispetto a quelli ottenuti in direzione longitudinale (A) [10].

Considerazioni simili sulla architettura fibrillare del pericardio bovino e sulle implicazioni meccaniche sono state presentate anche da Sacks in [19].

In Figura 14 si riportano i risultati relativi alla quantificazione dell'orientazione prevalente delle fibre di collagene ottenuta mediante SALS (Small-Angle Light Scattering) rispettivamente nella regione destra e sinistra della faccia superiore del pericardio bovino.

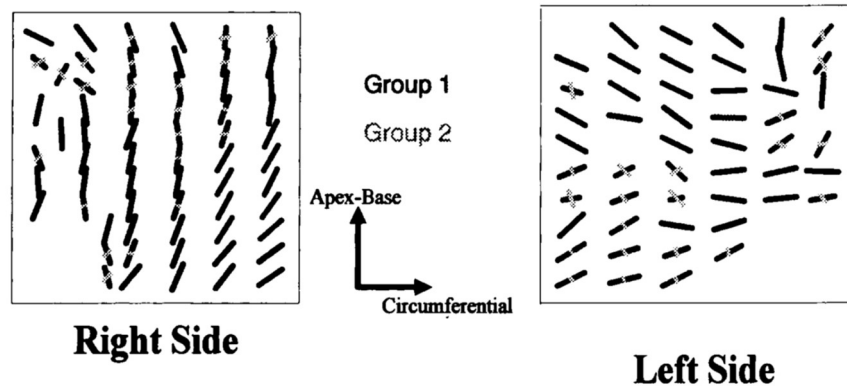


Figura 14: Vector plots rappresentativi dell'orientamento prevalente delle fibre di collagene rispettivamente nelle regioni destra e sinistra del pericardio bovino [19].

La regione sinistra del sacco pericardico appare più omogenea, con fibre di collagene orientate prevalentemente in direzione circonferenziale, mentre nella regione destra si evidenzia una maggior variabilità nell'architettura fibrillare.

Queste evidenze hanno dimostrato avere dirette implicazioni sui risultati dei test biassiali condotti sui campioni isolati dalle due regioni (Figura 15).

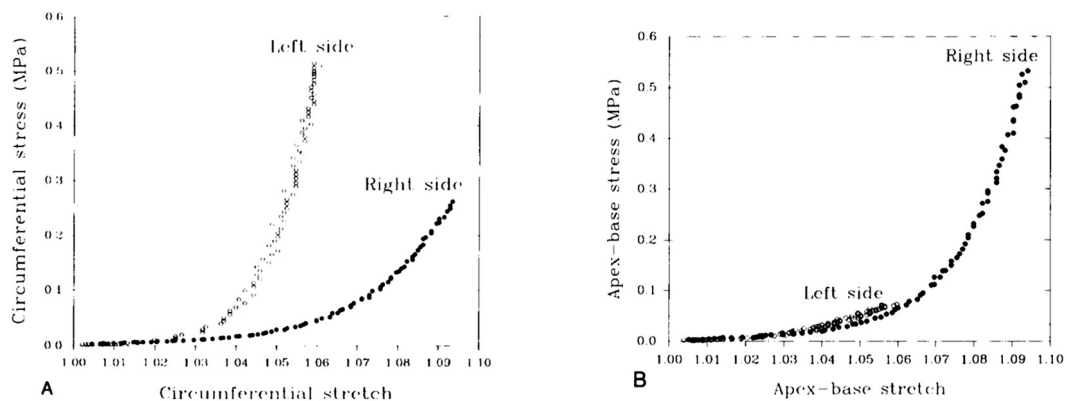


Figura 15: Risultati dei test biassiali condotti sui campioni isolati dalla regione destra e sinistra del pericardio bovino e sottoposti a test lungo la direzione circonferenziale e longitudinale [19].

Entrambi i gruppi di campioni mostrano chiaramente un comportamento meccanico anisotropo, con i campioni isolati dalla regione destra che raggiungono deformazioni maggiori rispetto a quelli isolati dalla regione di sinistra per i medesimi livelli tensionali.

I campioni ottenuti dalla porzione sinistra del sacco inoltre sperimentano tensioni maggiori se sottoposti a test lungo la direzione circonferenziale, piuttosto che lungo la direzione longitudinale, viceversa per i campioni ottenuti dalla regione di destra.

Correlando i dati meccanici con le osservazioni riportate in *Figura 14* è possibile dunque dire che c'è consistenza e concordanza tra le due evidenze sperimentali e che il pericardio manifesta un comportamento meccanico corredato da una maggior rigidezza in relazione alla direzione di allineamento preferenziale delle fibre di collagene confermando l'ipotesi di anisotropia.

1.6 Applicazioni del pericardio come biomateriale

Il pericardio di diversi mammiferi (bovino, porcino, ovino, equino) è ampiamente diffuso come biomateriale a scopo chirurgico e sperimentale. Pur essendo uno dei materiali d'elezione per le applicazioni in chirurgia cardiovascolare e cardiocirurgia, è doveroso segnalare come in letteratura si riportino lavori scientifici che hanno testato il pericardio anche in altri ambiti.

In otorinolaringologia ed in chirurgia maxillo-facciale, per esempio, il pericardio bovino liofilizzato è stato utilizzato nella correzione delle deformità nasali [20] o nella ricostruzione post trauma in zona orbito-zigomatica [21]. Nella chirurgia toracica, invece, strips di pericardio bovino hanno trovato applicazione nel trattamento chirurgico dell'enfisema polmonare [22], mentre nella chirurgia addominale il pericardio bovino viene utilizzato per la produzione di patch per la sutura chirurgica nel caso del trattamento di ernie o laparocèle.

Anche la chirurgia ortodontica fa uso di questo tessuto per le ricostruzioni gengivali, così come la neurochirurgia sfrutta il pericardio bovino ed ovino per la riparazione della dura madre in seguito a malattie alle meningi o traumi di natura meccanica [23].

Sebbene, come visto finora, il pericardio trovi applicazioni in quasi tutte le branche chirurgiche, nella cardiocirurgia rimane il suo impiego prevalente. In quest'ambito, ad esempio, il patch pericardico può essere utilizzato in pazienti pediatrici per la cura di cardiopatie congenite oppure per la correzione chirurgica di anomalie delle arterie coronarie.

In ultimo, dal punto di vista cardiovascolare, il pericardio bovino è il materiale principe per la costruzione dei lembi valvolari di bioprotesi valvolari cardiache, sia tradizionali che percutanee. Tali valvole sono costruite ex-novo a partire dal tessuto pericardico animale, previa selezione di regioni e porzioni specifiche del tessuto intero.

Le zone del pericardio bovino scelte per la costruzione di protesi valvolari cardiache devono presentare uniformità di orientamento e di distribuzione del collagene ed uno

spessore tissutale costante, dal momento che la marcata anisotropia tissutale porta a notevoli variazioni delle proprietà meccaniche dello stesso [24].

Le protesi realizzate con questo tessuto presentano una apertura del lembi più completa e simmetrica rispetto a quelle realizzate in pericardio porcino, con conseguenti vantaggi nell'emodinamica. Inoltre, la maggior percentuale di collagene presente nel tessuto bovino può portare ad un miglioramento della durata della valvola stessa [25], dal momento che test meccanici hanno misurato un valore di carico a rottura e di modulo elastico superiori per il pericardio bovino piuttosto che per il porcino [26] .

Per la sua effettiva applicazione clinica il pericardio tuttavia deve preliminarmente essere decellularizzato, mantenendo integra la ECM, per evitare il manifestarsi di una risposta immunitaria o di rigetto. La scelta della procedura di decellularizzazione è fondamentale per le proprietà meccaniche e per questo motivo va valutata attentamente a seconda della applicazione finale.

II. ASPETTI ANATOMICI, BIOMECCANICI E FUNZIONALI DEL CUORE E DELLA VALVOLA AORTICA

Il cuore, con la sua contrazione e la dilatazione, riesce a pompare dai 5 ai 6 lt di sangue al minuto irrorando così tutto il corpo attraverso i vasi sanguigni. Esso è costituito da quattro camere, rispettivamente due a destra e due a sinistra, separate da una parete muscolare denominata setto.

Tra le camere cardiache, quelle sottoposte a maggior carico propulsivo sono i ventricoli e tra questi in particolare il sinistro, che proprio per questo motivo presenta uno spessore in genere notevolmente maggiore del ventricolo destro.

Il flusso ematico in ingresso ed in uscita dal cuore è regolato da quattro valvole (tricuspide, polmonare, mitrale e aortica) che durante la vita dell'individuo si aprono e chiudono più di 3 miliardi di volte.

Le formazioni di tessuto connettivo localizzate sul piano valvolare cardiaco rappresentano il cosiddetto scheletro fibroso del cuore, ossia un insieme di fibre collagene e di fibre elastiche in grado di rimanere fisse durante i movimenti del cuore, dei lembi valvolari e delle arterie.

E' evidente già solo dall'osservazione degli orifizi valvolari nello scheletro fibroso che le quattro valvole sono strettamente connesse dal punto di vista funzionale (*Figura 16*).

La valvola tricuspide è collocata tra l'atrio e il ventricolo destro, la polmonare tra il l'arteria polmonare e il ventricolo destro, la mitrale tra l'atrio e il ventricolo sinistro e la valvola aortica tra ventricolo sinistro e l'aorta. Le conformazione anatomica fa sì che la valvola aortica e quella polmonare siano anche chiamate *semilunari (SL)*, per via dei lembi a forma di semiluna, mentre la valvola mitrale e tricuspide siano anche dette valvole *atrioventricolari (AV)*.

Mentre le valvole atrioventricolari, ancorate al miocardio attraverso i muscoli papillari e le corde tendinee, sono in grado di rispondere alla contrazione cardiaca; le valvole semilunari non sono regolate da muscolatura, ma si aprono in relazione al gradiente pressorio monte-valle per consentire il passaggio ematico.

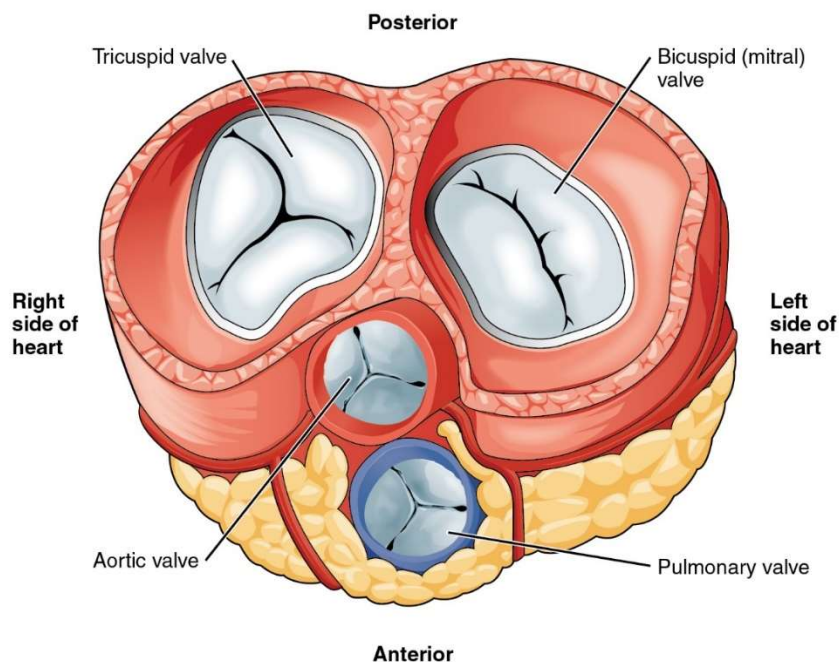


Figura 16: Rappresentazione schematica delle quattro valvole cardiache

Le valvole consentono il flusso sanguigno in un'unica direzione: il sangue, povero di ossigeno, ritorna dalla periferia al cuore attraverso le vene cave che si affacciano nell'atrio destro e poi, attraverso la valvola tricuspide, raggiunge il ventricolo destro. Dal ventricolo destro, attraverso la valvola polmonare, il sangue va in arteria polmonare e da questa ai polmoni, dove viene ossigenato. A questo punto, attraverso le vene polmonari il flusso ematico passa all'atrio sinistro e poi al ventricolo sottostante, da cui, attraverso la valvola aortica, ritorna alla circolazione sistemica.

Poiché per il cuore si distinguono una fase di eiezione e una fase di riempimento, è possibile evidenziare che durante l'eiezione ventricolare la valvola aortica e la valvola polmonare rimangono aperte, mentre quella mitrale e la tricuspide chiuse mentre durante il riempimento avviene il contrario.

2.1 Funzionamento delle valvole cardiache

Le valvole cardiache sono costituite da lembi flessibili e resistenti, di tessuto fibroso rivestito di endotelio. I lembi valvolari sono passivi ed è l'orientamento delle valvole ad assicurare l'unidirezionalità del flusso.

In un cuore normale, durante il riempimento ventricolare, i lembi valvolari sono chiusi a formare una specie di imbuto per il passaggio del sangue dagli atri ai ventricoli (*Figura 17*).

Il ciclo cardiaco, definito come la serie di eventi che si verificano dall'inizio di un battito all'inizio di quello successivo, è suddivisibile in:

- a) sistole atriale;
- b) diastole atriale;
- c) contrazione ventricolare;
- d) rilascio ventricolare

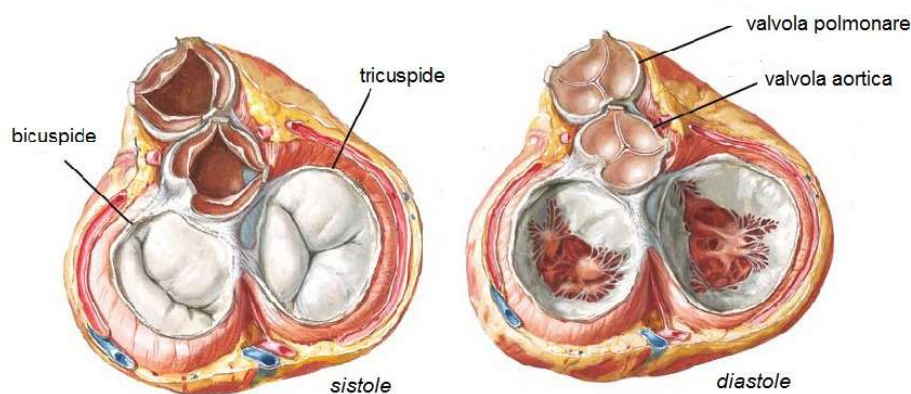


Figura 17: Valvole cardiache. Durante la sistole la valvola tricuspidale e quella bicuspidale sono chiuse per evitare il rigurgito di sangue dai ventricoli agli atri. Durante la diastole le valvole atrioventricolari si aprono e le valvole semilunari si chiudono per evitare il flusso retrogrado nei ventricoli.

Durante la sistole atriale gli atri si contraggono e la forza di contrazione spinge il sangue attraverso le valvole atrioventricolari aperte nei due ventricoli. Le valvole semilunari invece rimangono chiuse e consentono un riempimento efficace dei ventricoli.

Successivamente, la pressione ventricolare aumenta, causando dapprima la chiusura delle valvole atrioventricolari e poi l'apertura delle valvole semilunari. Il sangue viene spinto nel circolo sistemico attraverso l'aorta e la valvola aortica. Durante la fase diastolica si ha la chiusura delle valvole semilunari, in modo che il sangue presente nell'arteria polmonare e in aorta non retroceda nei ventricoli, mentre le valvole AV sono ancora aperte perché la pressione degli atri non supera quella dei ventricoli.

Per alcune particolari caratteristiche fisiologiche, quali ad esempio un lume di minore dimensione in fase di apertura, le valvole SL sono caratterizzate da una velocità di eiezione molto superiore rispetto a quella che si verifica nelle valvole AV.

Proprio a causa della rapidità della chiusura e dell'eiezione, i margini delle valvole semilunari sono dunque soggetti ad un danneggiamento maggiore rispetto a quello subito dai lembi delle valvole atrioventricolari.

Nel paragrafo successivo, in particolare, saranno valutati gli aspetti anatomici, biomeccanici ed istologici della valvola aortica.

2.2 Valvola aortica: anatomia, istologia e biomeccanica

La valvola aortica è a tutti gli effetti parte della radice aortica (*Figura 18*) che connette il cuore con la circolazione sistemica e gioca un ruolo dominante nel sistema cardiovascolare, mantenendo sia la perfusione coronarica che il flusso laminare nel sistema vascolare [27]. In particolare, la radice aortica connette il ventricolo sinistro e l'aorta ascendente e comprende differenti strutture: anello fibroso, commissure, triangoli intercommissurali, seni di Valsalva, lembi e giunzione senotubulare.

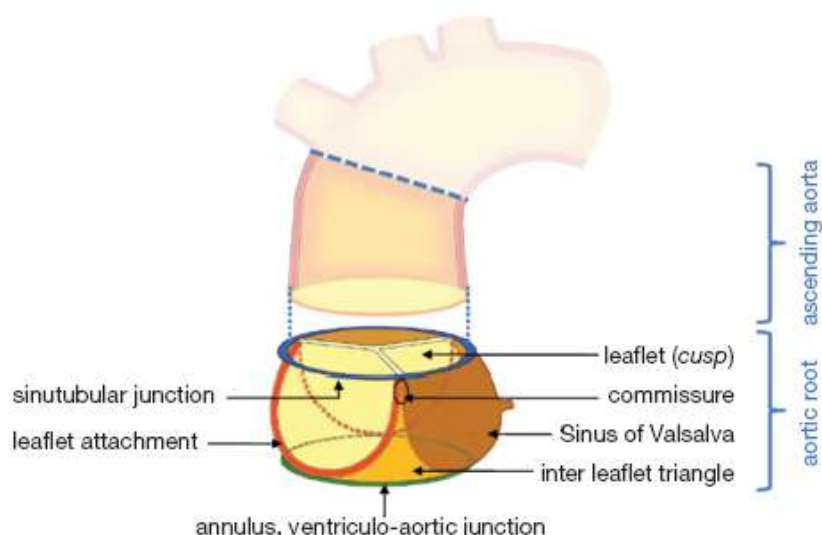


Figura 18: Rappresentazione della radice aortica e dell'aorta ascendente. Si distinguono l'anello fibroso, la giunzione senotubulare, i seni di Valsalva, i lembi, le commissure e i triangoli intercommissurali.

Ciascuna struttura, pur essendo caratterizzata da un proprio profilo istologico ed anatomico, è in grado di interagire strettamente con le altre per garantire la complessiva funzionalità dell'organo.

2.2.1 Anatomia dei lembi valvolari aortici

I lembi, o cuspidi, si fissano mediante i margini concavi in parte sulla superficie aortica e in parte sulle strutture di sostegno del ventricolo. Sia la funzione e l'anatomia della

valvola dipendono a tutti gli effetti dalla inserzione semilunare dei lembi che forma un anello fibroso non completo, in discontinuità con lo scheletro fibroso del cuore. Questa struttura elastica consente i cambiamenti di diametro dell'*annulus* durante il ciclo cardiaco.

Ciascun lembo, visto dall'aorta durante la diastole, appare formato da una porzione visibile dalla parte ventricolare, sopposta a pressione, e un'altra porzione, orizzontale, che coapta durante la diastole formando l'angolo di 120° tra i lembi.

I lembi si aprono nei seni arteriosi durante la sistole e collassano in diastole aiutati dalla colonna di sangue che sostengono. La completa chiusura dei lembi, che previene il rigurgito durante la diastole, è garantita dalla presenza dei noduli di Aranzio come è possibile osservare in *Figura 19*.

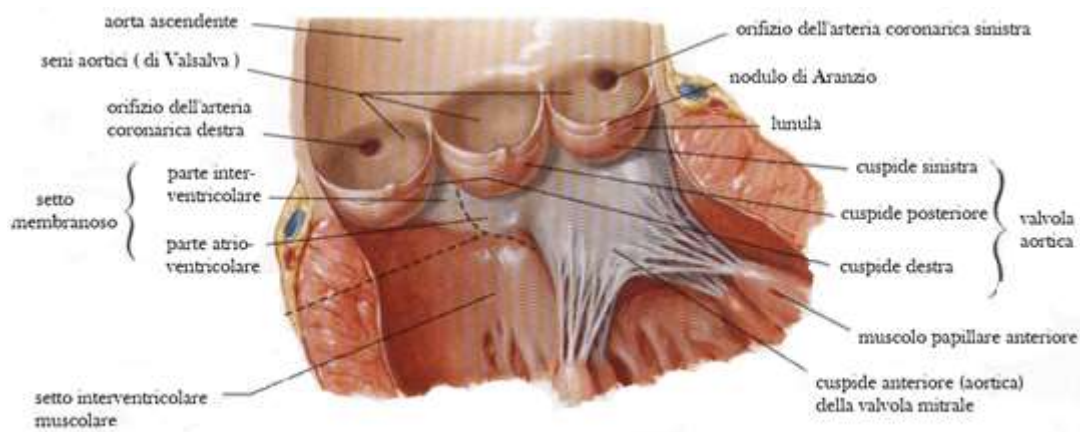


Figura 19: Anatomia della valvola semilunare aortica.

Nel punto in cui i lembi si avvicinano parallelamente l'uno all'altro, invece, si trovano le commissure che corrispondono agli apici dei triangoli che si trovano a livello della giunzione sino-tubulare. La giunzione limita superiormente i seni di Valsalva, fondamentali nel meccanismo di chiusura della valvola.

A livello funzionale una valvola tricuspide come quella aortica è la valvola ideale perché la lunghezza dei margini liberi dei suoi lembi ($6R$) è circa coincidente con la circonferenza dell'aorta ($2\pi R$) in maniera tale da ottenere sia la completa apertura nella sistole che un flusso ematico senza la distorsione che si manifesta nel caso di valvole bicuspidi e quadricuspidi.

2.2.2 Istologia dei lembi valvolari aortici

I lembi valvolari aortici sono costituiti istologicamente da quattro strati ben differenziati (Figura 20): l'endotelio, che è in continuità con lo strato endoteliale dell'aorta e con l'endocardio del ventricolo sinistro; la tunica fibrosa; la tunica spongiosa e la tunica ventricolare, ciascuna composta da differenti quantità di collagene, elastina e GAG.

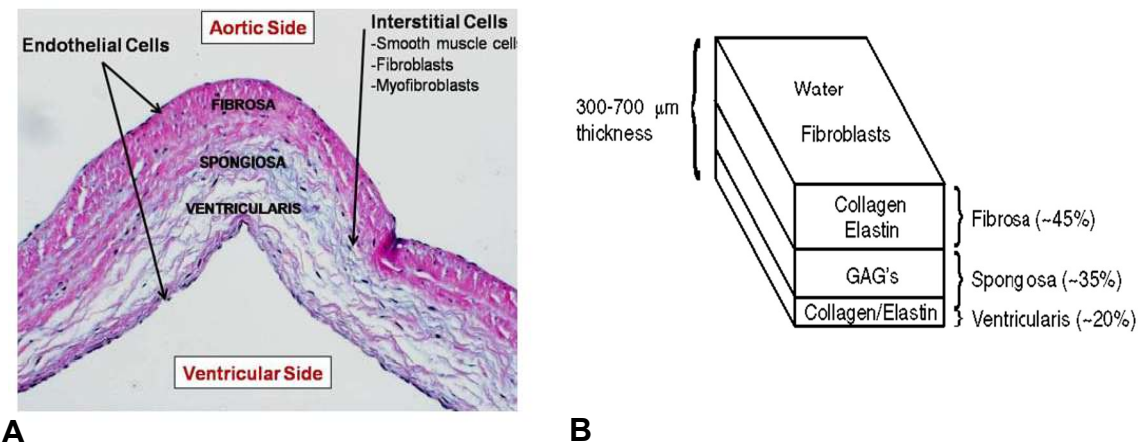


Figura 20: A) Dettaglio istologico delle cuspidi aortiche in cui è evidente l'architettura laminare.

B) Sezione del lembo valvolare, distinzione degli strati e relativa distribuzione delle componenti.

Nell'adulto le cuspidi aortiche sono formate per circa il 55% di collagene e per il 13% di elastina.

La tunica fibrosa, lo strato rivolto verso l'aorta, è costituita fondamentalmente da fibroblasti e fibre di collagene che la rendono meccanicamente resistente ed adatta a sostenere gli sforzi pressori.

La lamina spongiosa ha quindi la capacità di assorbire ed attenuare lo stress diastolico e l'eventuale assenza dei mucopolisaccaridi e dell'idratazione interferisce in maniera notevole con la morfometria e le caratteristiche fisiche del lembo stesso provocando una diminuzione dello spessore dei lembi del 20% e un aumento della rigidità del 60% associabili ad un precoce deterioramento valvolare.

I componenti di GAG e acqua della tunica spongiosa permettono inoltre lo scivolamento delle tuniche fibrosa e ventricolare.

La lamina ventricolare, esposta al ventricolo e di spessore inferiore alle altre due lamine, è formata invece prevalentemente da fibre elastiche, disposte perpendicolarmente a quelle di collagene che si presentano qui in configurazione più disorganizzata rispetto a quelle della tunica fibrosa.

Come si mostra in *Figura 21* le fibre di collagene dal lato aortico si dispongono in direzione circonferenziale. A livello funzionale, questo particolare arrangemento è motivato dal tentativo di offrire la minor resistenza possibile all'apertura dei lembi sia durante la sistole che durante la diastole.

Cellule ed ECM, come componenti principali dei lembi valvolari, rendono possibili le grandi deformazioni che fisiologicamente il lembo subisce durante il ciclo cardiaco.

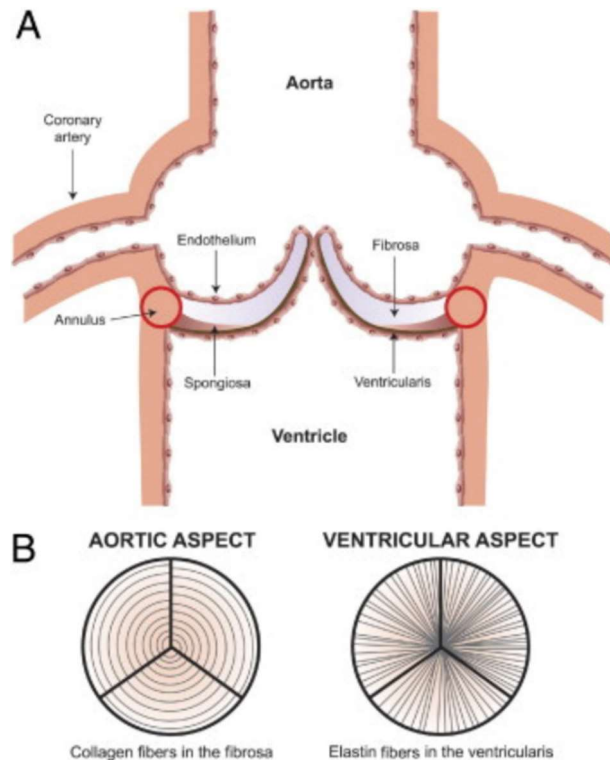


Figura 21: A) Struttura 4-layered della valvola aortica a tre lembi. Si distinguono l'endotelio, la spongiosa, la fibrosa e la tunica ventricolare. B) Visione trasversale dei lembi aortici rivolti verso l'aorta e verso il ventricolo. Dal lato aortico il lembo mostra un arrangemento circolare delle fibre di collagene; dal lato ventricolare si osserva invece una disposizione radiale delle fibre di elastina [28]

2.2.3 Aspetti biomeccanici della valvola aortica

Come detto precedentemente, i costituenti dei lembi aortici concorrono a sostenere gli *shear stress* e le continue sollecitazioni relative alle diverse fasi del ciclo cardiaco. È interessante sottolineare come Sacks et al, discutendo il comportamento dei tessuti valvolari in [29] e in [30] riconoscono la necessità che il tessuto sia in grado di rispondere a diverse situazioni che si verificano durante il ciclo cardiaco, in particolare:

- 1) i lembi vengono sollecitati dal carico completo allo scarico completo durante ogni ciclo cardiaco, a differenza di altri tessuti connettivi – come ad esempio i vasi sanguigni - non soggetti a questa variazione;
- 2) i lembi sperimentano deformazioni notevoli e anisotrope durante la chiusura valvolare in risposta a piccoli gradienti di pressione transvalvolare;
- 3) la tensione di picco che i lembi devono essere in grado di sopportare è stimata tra i 50 e i 100 N/m²;
- 4) una volta che la valvola è chiusa, i lembi cessano di subire deformazione;
- 5) la deformazione del tessuto valvolare è molto sensibile alle deformazioni dei tessuti circostanti. In ogni ciclo cardiaco infatti tutte le strutture che costituiscono la radice aortica collaborano in maniera sinergica con l'obiettivo di alleggerire lo sforzo delle componenti più deboli, come i lembi valvolari.

Come è lecito aspettarsi, dal momento che i costituenti sono prevalentemente collagene ed elastina presenti in percentuali diverse e arrangiamenti come descritti nel paragrafo precedente, il comportamento del tessuto è anisotropo, non lineare e non omogeneo. Queste considerazioni portano a evidenziare che le proprietà di tensione-deformazione varino a seconda della direzione considerata; che la tensione vari in maniera non lineare con la deformazione e che la risposta meccanica cambi a seconda della posizione sulle superficie del lembo.

Tessuti di questo tipo manifestano dunque una curva *stress-strain* caratterizzata da tre fasi distinte, come quella riportata in *Figura 22*.

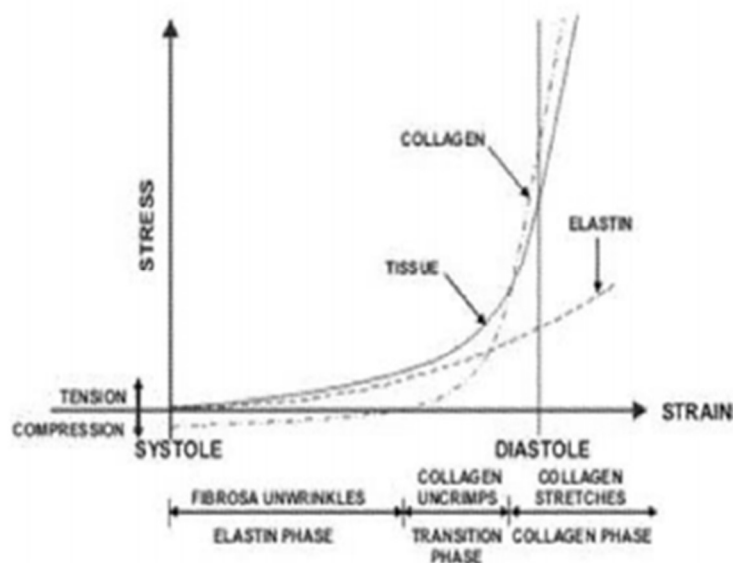


Figura 22: Relazione stress-strain per il lembo aortico in condizioni fisiologiche. Si distinguono la fase elastica, la fase di transizione e la fase del collagene [31]

Durante la prima fase (*elastic phase*), i lembi mostrano una scarsa resistenza all'allungamento mentre le fibre di collagene si svolgono progressivamente dando un contributo minimo alla trasmissione della forza.

Nella cosiddetta *transition phase*, invece, si assiste gradualmente allo stiramento ed al progressivo allineamento delle fibre di collagene che incrementa così il contributo alla trasmissione della forza;

Durante la terza fase (*collagen phase*), tutte le fibre di collagene sono srotolate e contribuiscono a sostenere il carico applicato. La pendenza della curva nell'ultima fase è ripida e costante e riflette le caratteristiche delle fibre di collagene che permettono un allungamento limitato. La fase di collagene continua oltre il range fisiologico sino al punto di rottura, in corrispondenza del quale la pendenza della curva comincia a decrescere (*failure phase*). Qualsiasi incremento del carico oltre questo punto porta il tessuto a rottura.

Applicando alle fasi di sistole e diastole i concetti generali descritti sino ad ora, ciò che accade dal punto di vista fisico è quello che viene mostrato da Shoen in [32].

Come si osserva in *Figura 23*, durante la sistole le fibre, non essendo sottoposte alla tensione, si accorciano riducendo la superficie dei lembi. Durante la diastole, invece l'*uncrimping* delle fibre permette al lembo di aumentare la superficie fino al 40%, consentendo la chiusura dell'orifizio valvolare.

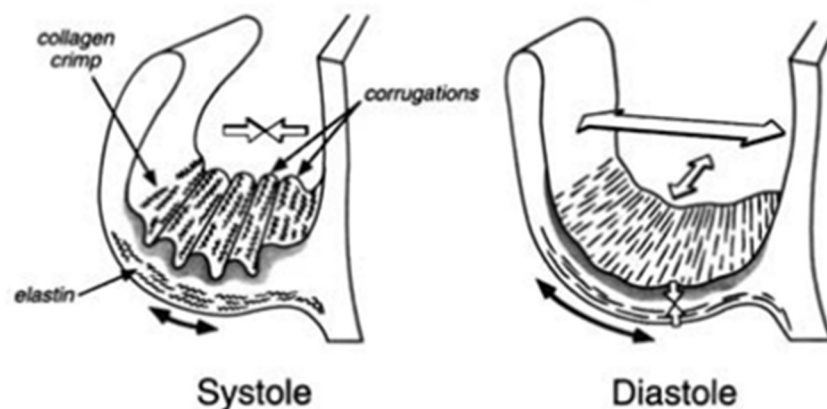


Figura 23: Rappresentazione semplificata della configurazione del lembo valvolare aortico in sistole e in diastole.

Dal punto di vista dei carichi applicati al tessuto è possibile notare che durante il ciclo cardiaco il tessuto è soggetto sia a sollecitazioni di taglio, legate al passaggio del flusso ematico (*fase sistolica*), che a sollecitazioni di trazione (*fase diastolica*) che a

sollecitazioni di flessione legate alla ciclicità delle fasi di apertura e chiusura (Figura 24) [33].

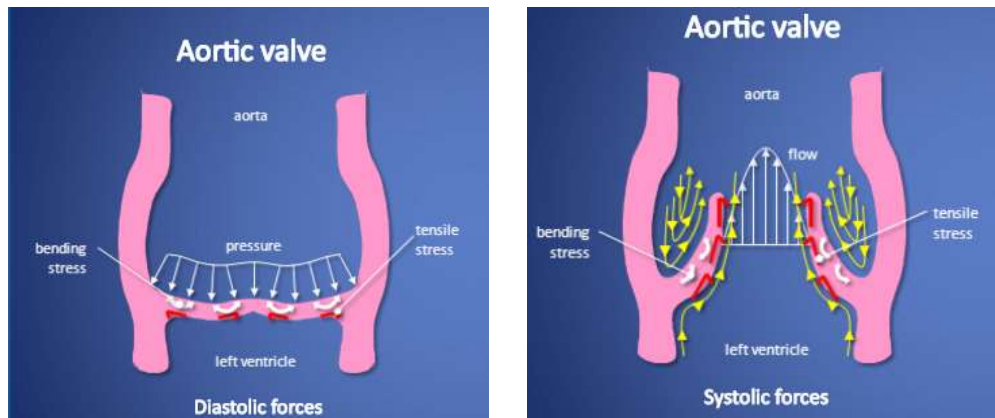


Figura 24: Rappresentazione schematica delle forze esercitate sui lembi valvolari nella fase di diastole e sistole [33]

Poichè la valvola è generalmente soggetta a deformazioni radiali molto superiori rispetto a quelle circonferenziali, ne deriva anche che l'estensibilità del tessuto debba essere maggiore in direzione radiale per garantirne la funzionalità. Questo implica che quando la valvola è aperta le fibre dei lembi progressivamente si srotolano allineandosi alla direzione del flusso sanguigno, manifestando una maggiore rigidezza e smorzando gli stress di taglio.

A valvola chiusa, invece, la sollecitazione monoassiale provoca l'orientamento delle fibre di collagene superficiali in direzione perpendicolare rispetto alla direzione di applicazione del carico.

Le fibre degli strati più interni del tessuto si allineano parallelamente alla direzione del carico contribuendo a smorzare la tensione di trazione e a rendere il tessuto più rigido.

III. PATOLOGIE DELLE VALVOLE CARDIACHE E TRATTAMENTO

Le valvole cardiache possono essere interessate dal manifestarsi di patologie quali il restringimento dell'orifizio valvolare, con conseguente limitazione della portata sanguigna eiettata dal cuore, oppure l'incompleta chiusura della valvola, che conduce alla presenza di un reflusso sanguigno in senso retrogrado e causa un incremento della pressione retrograda nel cuore e nei polmoni. Nel primo caso si parla di *stenosi* valvolare, mentre nel secondo caso si parla di *insufficienza* (Figura 25).

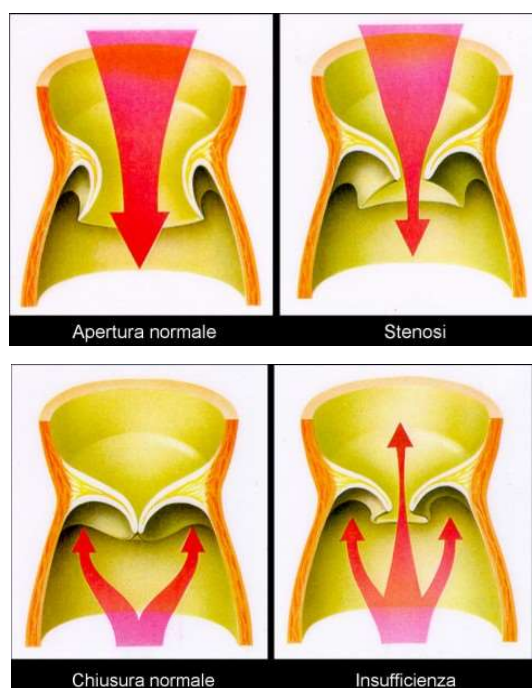


Figura 25 Rappresentazione schematica delle cardiopatie valvolari.

In alto: la valvola schematizzata a sinistra apre bene, mentre quella a destra manifesta una imperfetta apertura che causa il passaggio di una quantità di sangue minore rispetto al normale.

In basso: la valvola schematizzata a sinistra chiude bene, mentre quella a destra presenta una chiusura imperfetta che fa refluire il sangue verso il ventricolo, provocandone un sovraccarico.

Le valvulopatie possono svilupparsi allo stadio fetale ed essere dunque di natura congenita, oppure possono sopraggiungere a seguito di un trauma, di un'infezione o dell'invecchiamento.

In Europa la stenosi aortica (*AS*) e l'insufficienza mitralica (*IM*) sono i due tipi più comuni di disfunzioni valvolari, nonché quelle più pericolose per la salute dell'individuo.

Nel prosieguo del capitolo saranno descritti brevemente gli aspetti di eziologia e diagnosi della patologia stenotica a carico della valvola aortica.

3.1 Eziologia e fattori di rischio della patologia valvolare stenotica

Come detto precedentemente, la stenosi aortica è il manifestarsi di un restringimento dell'orifizio valvolare aortico che si traduce in un ostacolo per il flusso ematico diretto dal ventricolo sinistro in aorta (*Figura 26*).

Generalmente l'orifizio aortico di un individuo sano ha un'area compresa tra i 2 e i 3 cm², in relazione alla superficie corporea. Quantificando la gravità della patologia stenotica si parla di stenosi significativa per aree valvolari inferiori ad 1.5 cm² e di stenosi sintomatica per orifizi ristretti a meno di 1 cm².

Una riduzione dell'ostio valvolare superiore al 50% genera da una parte la resistenza all'eiezione ventricolare e dall'altra l'aumento della pressione intraventricolare sinistra, con il conseguente sviluppo di un gradiente pressorio tra ventricolo sinistro ed aorta la cui entità è strettamente correlata alla gravità della patologia.

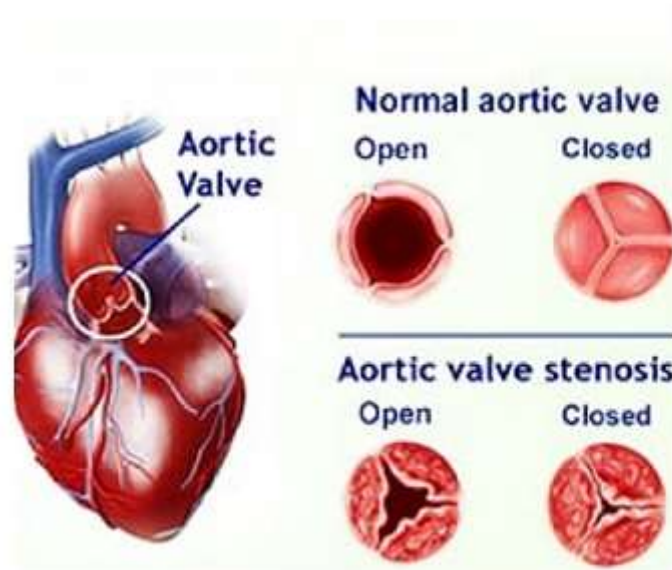


Figura 26: Rappresentazione schematica di apertura e chiusura di una valvola aortica sana e di una valvola aortica stenotica

La patologia stenotica può essere suddivisa, sulla base della sua origine (Figura 27) in:

- *patologia valvolare calcifica*: la patologia valvolare calcifica viene anche definita degenerativa o senile, perché tipica dell'anziano e legata a fenomeni infiammatori che insorgono dopo i 70 anni. Con l'invecchiamento, infatti, può verificarsi una progressiva calcificazione della valvola, dovuta al deposito di calcio sui lembi che determina la riduzione dell'area dell'orifizio valvolare.
- *patologia valvolare congenita*: di norma, la valvola semilunare ha una struttura a nido di rondine, caratterizzata dalla presenza di tre lembi sfalsati che assicurano la chiusura del vaso impedendo il reflusso di sangue nel ventricolo. La presenza, alla nascita, di una valvola semilunare aortica caratterizzata da due lembi (valvola aortica bicuspidale) può portare ad una riduzione dell'area valvolare e alla possibilità di manifestare patologia stenotica.
- *patologia valvolare legata a febbri reumatiche*: infezioni da streptococco possono causare la formazione di noduli di collagene e depositi cicatriziali sulle cuspidi valvolari. L'ispessimento tessutale che ne deriva può portare ad un restringimento dell'orifizio aortico oppure può creare una superficie ruvida particolarmente soggetta a calcificazione che con l'invecchiamento può causare lo sviluppo della patologia stenotica.

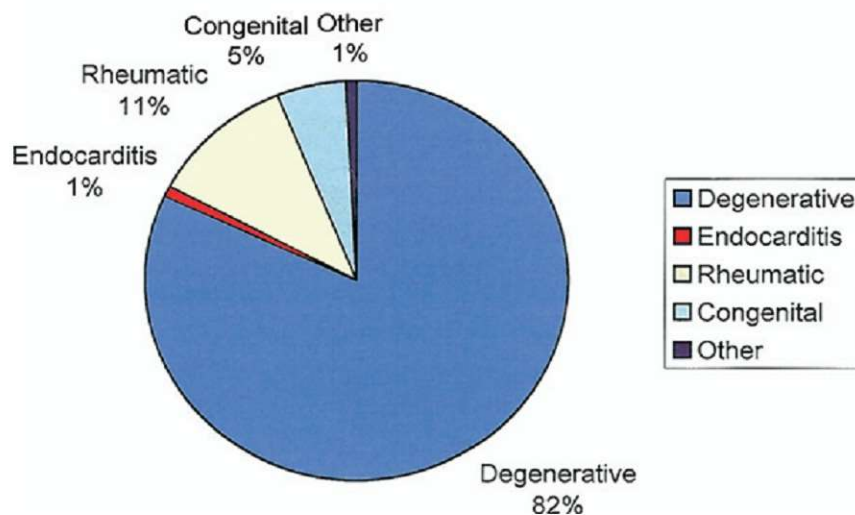


Figura 27: Grafico che riporta le percentuali relative alle cause del manifestarsi della patologia stenotica

3.2 Sintomi e diagnosi

La manifestazione della stenosi può essere di lieve, moderata o grave entità e generalmente solo nei casi più gravi dà origine ad una sintomatologia che può portare all'insufficienza cardiaca. Man mano che la gravità della patologia aumenta e che l'orifizio valvolare si restringe, dunque, si manifestano sintomi molto importanti tra cui soffio al cuore, angina pectoris, sincope e dispnea.

La stenosi aortica ha una progressione di circa $0,2 \text{ cm}^2$ all'anno, per quanto riguarda l'area valvolare e di circa 15 mmHg all'anno per quanto riguarda il gradiente pressorio. Presupposti di questo tipo rendono fondamentale una diagnosi tempestiva sfruttando esami toracici (auscultazione per individuare alterazioni nel battito cardiaco o rumori sospetti), elettrocardiogramma, radiografia toracica (adatta ad individuare mediante una indagine a raggi X la presenza di calcificazioni o di alterazioni morfologiche ventricolari), ecocardiogramma ed ecocardiografia doppler.

3.3 Terapia e trattamento

Mentre l'utilizzo sempre più diffuso di terapia antibiotica ha ridotto l'incidenza della febbre reumatica come causa della AS di carattere post-infiammatorio, l'aumento dell'età media della popolazione ha fatto sì che al giorno d'oggi la causa più frequente di AS sia la disfunzione degenerativa senile.

La scelta terapeutica d'elezione per il trattamento della stenosi aortica è di tipo chirurgico.

Non esistono infatti terapie di tipo farmacologico, se non a scopo di profilassi per eventuali manifestazioni patologiche conseguenti, quali ad esempio le endocarditi.

Nel caso di AS di lieve o moderata entità, il paziente viene tenuto sotto controllo per valutare la progressione della malattia, mentre nei casi più gravi l'intervento chirurgico si rende necessario.

3.3.1 Sostituzione valvolare

La sostituzione valvolare è a tutti gli effetti la scelta chirurgica di elezione per gli adulti nell'ambito della chirurgia valvolare per il trattamento della AS severa e sintomatica. La procedura si esegue in anestesia generale, poiché richiede un intervento a cuore aperto, con il paziente in circolazione extra-corporea.

La valvola stenotica viene sostituita con una meccanica, oppure da una biologica costruita a partire da tessuto animale o umano.

La valvola meccanica ha il vantaggio di avere una durata molto più lunga, ma impone l'utilizzo di terapie anticoagulanti a vita per prevenire fenomeni tromboembolici.

La valvola biologica, invece, è non trombogena, ma è destinata ad andare incontro, più o meno rapidamente, a processi di deterioramento, esponendo così il paziente al rischio di interventi di revisione protesica.

Le stime in Europa riportano però che circa il 30% dei pazienti affetti da stenosi grave non sono operabili a causa dell'età troppo avanzata o della presenza di condizioni che aumentano il rischio di mortalità intra o post-operatoria. Per pazienti di questo tipo, recentemente, è stata messa a punto una procedura chirurgica meno invasiva, denominata TAVI (*Transcatheter aortic valve implantation*), che prevede l'impianto della valvola aortica secondo un approccio transfemorale o transapicale. Maggiori delucidazioni su questa procedura verranno fornite nel capitolo successivo.

3.3.2 Valvuloplastica

A differenza delle procedure chirurgiche sopradescritte, la valvuloplastica è un trattamento mininvasivo, che avviene per via percutanea, destinato a pazienti pediatrici o molto anziani. Mediante un catetere si raggiunge la valvola aortica patologica e la si dilata attraverso un palloncino, come avviene per gli interventi di angioplastica.

Pur essendo un trattamento minimamente invasivo, la valvuloplastica è poco utilizzata perché connessa ad un rischio post-operatorio non indifferente.

IV. PROTESI VALVOLARI

Come accennato nel Capitolo precedente, la sostituzione valvolare aortica prevede l'utilizzo di protesi valvolari in grado di riprodurre la valvola nativa sana sia funzionalmente che biomeccanicamente.

Prima del 1950 era impensabile correggere eventuali patologie valvolari a cuore battente, così come era ancora un'utopia pensare di poter sostituire le funzioni cardiopolmonari con una macchina cuore-polmone. Il progresso medico-tecnologico degli ultimi 50 anni ha reso possibile l'intervento di sostituzione valvolare con sensibile riduzione del tasso di mortalità e miglioramento della qualità della vita nei pazienti trattati chirurgicamente

Attualmente sono disponibili diversi tipi di sostituti valvolari:

- *protesi meccaniche*, costituite da materiali sintetici (o non biologici);
- *protesi biologiche*, provenienti da tessuti biologici di specie animale;
- *homografts* ed *autografts*, valvole umane da donatore o provenienti dallo stesso individuo.

La scelta di una o dell'altra tipologia valvolare ai fini dell'intervento chirurgico sostitutivo non è equivalente; in particolare le protesi valvolari differiscono tra loro per profilo emodinamico, durata, area dell'orifizio e trombogenicità.

Le protesi valvolari meccaniche (MHVs), ad esempio, hanno una durata media di oltre 20 anni, ma comportano il rischio di complicazione di natura emorragica o tromboembolica. Questo obbliga il paziente al monitoraggio periodico dei parametri ematici ed ad una terapia anticoagulante a vita.

Al contrario, le valvole biologiche (BHV), non richiedono terapia anticoagulante, ma essendo spesso ottenute per fissazione attraverso glutaraldeide (GA), manifestano un'elevata incidenza di fenomeni di calcificazione e disfunzione che ne limitano la durata a non più di 15 anni.

Anche gli *homografts*, ossia le valvole umane prelevate da cadavere, non sono immuni da problematiche relative alla calcificazione e alla degenerazione proprie delle valvole biologiche, ma producono un profilo emodinamico migliore.

Infine, l'uso di *autograft polmonare autologo* è stato introdotto per la prima volta alla fine degli anni '60 da Ross. La valvola polmonare del paziente stesso viene utilizzata per la sostituzione della valvola aortica, mentre un homograft è usato in posizione polmonare. Poiché questo tipo di procedura implica una doppia sostituzione valvolare è preferibilmente impiegato in bambini e giovani adulti.

Un'analisi preliminare degli aspetti sopra descritti permette di comprendere come l'età sia uno dei fattori determinanti nella scelta della procedura chirurgica da adottare: per un paziente giovane, con una aspettativa di vita superiore ai 15 anni, verrà prediletto un approccio MHV, oppure la procedura di Ross; d'altra parte, un paziente anziano o un paziente con una aspettativa di vita inferiore ai 15 anni ed eventualmente l'impossibilità di assumere la terapia anticoagulante, verrà trattato con BHVs.

In generale comunque, il trend che si sta manifestando in Europa e USA è la preferenza dell'utilizzo di sostituti biologici piuttosto che quelli di natura meccanica, come mostrato in *Figura 28* e in *Figura 29*.

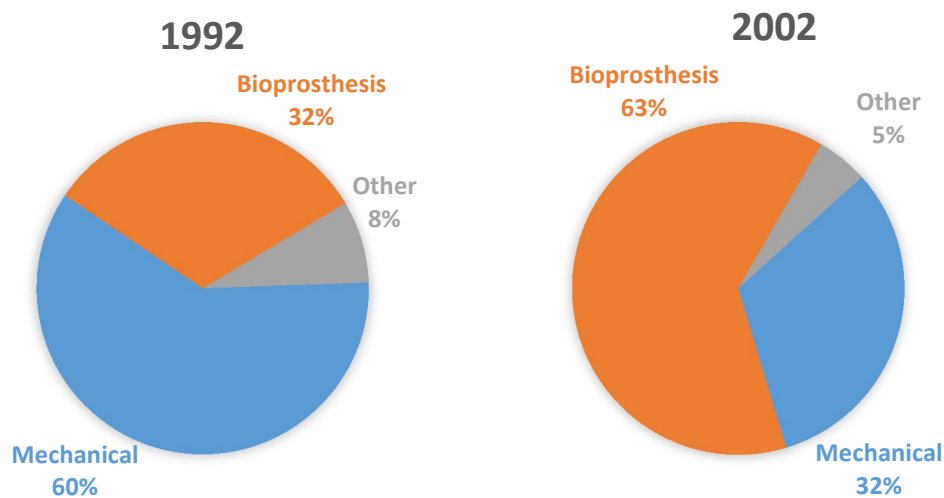


Figura 28: Diagrammi che riportano la tendenza nella scelta del tipo di protesi valvolare in USA tra il 1992 e il 2002 [34].

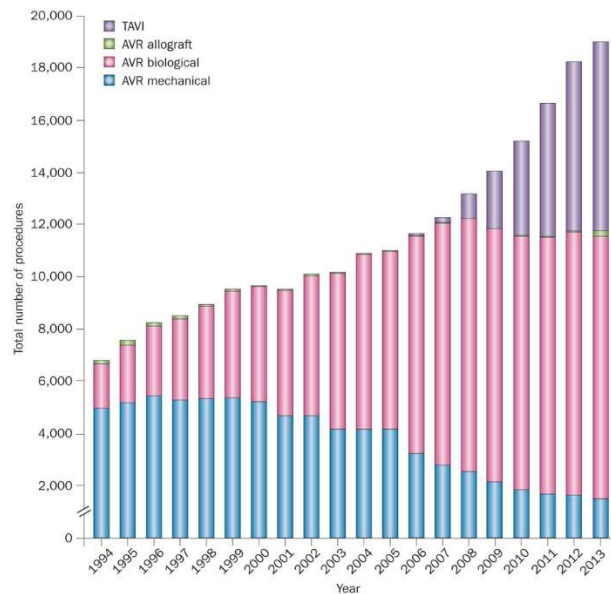


Figura 29: Il grafico mostra la crescita del numero totale di procedure di AVR dal 1994 al 2013. Si evidenzia l'aumento del numero di valvole biologiche impiantate e la progressiva crescita dell'approccio TAVI rispetto all'AVR realizzata con MHV [35]

4.1 Aspetti ideali per un sostituto valvolare

La protesi valvolare cardiaca ideale dovrebbe rispondere a requisiti piuttosto eterogenei, in virtù della complessa natura del dispositivo stesso.

Le caratteristiche di biocompatibilità e non trombogenicità sono di fondamentale importanza per poter procedere all'impianto: il dispositivo ideale non deve scatenare reazioni avverse nell'organismo o provocare il rigetto della protesi, né rendere necessaria la terapia anticoagulante.

La performance emodinamica che deve garantire un sostituto valvolare ideale è quella fisiologica, caratterizzata da un flusso laminare e da una chiusura completa durante la fase corretta del ciclo cardiaco senza che si sviluppino deterioramenti strutturali della protesi, danneggiamenti delle strutture cardiache circostanti o emolisi.

Dal punto di vista chirurgico la protesi ideale dovrebbe essere facilmente impiantabile e stabile nel sito ove viene collocata, limitando così l'invasività dell'intervento e scongiurando il rischio di dover sottoporre il paziente ad altre operazioni chirurgiche.

Un altro fattore di notevole importanza dei dispositivi sostitutivi è la loro durata nel tempo. Sempre per i motivi sopra citati e correlati alla complessità dell'intervento di sostituzione, la durata della valvola sostitutiva essere quanto più paragonabile possibile a quella della valvola nativa.

Sfortunatamente, ad oggi non esiste un dispositivo in grado di soddisfare completamente questi requisiti e tutti i sostituti valvolari attualmente disponibili presentano alcune limitazioni.

4.2 Protesi valvolari meccaniche (MHvs)

Il primo intervento di sostituzione valvolare con una valvola meccanica risale al 1961, anno in cui Albert Starr e Lowell Edwards impiantarono una valvola meccanica in un paziente con valvola mitrale danneggiata a seguito di una febbre reumatica.

La valvola meccanica utilizzata era un modello *caged-ball* (a palla ingabbiata), in cui l'occlusore era costituito da una palla di gomma siliconica in grado di attenuare gli urti, mentre la gabbia era realizzata in acciaio inossidabile. E' evidente dalla *Figura 30* che una protesi di questo tipo causa un flusso ematico differente rispetto a quello fisiologico e ciò determina un incremento del lavoro cardiaco e del salto di pressione transvalvolare.

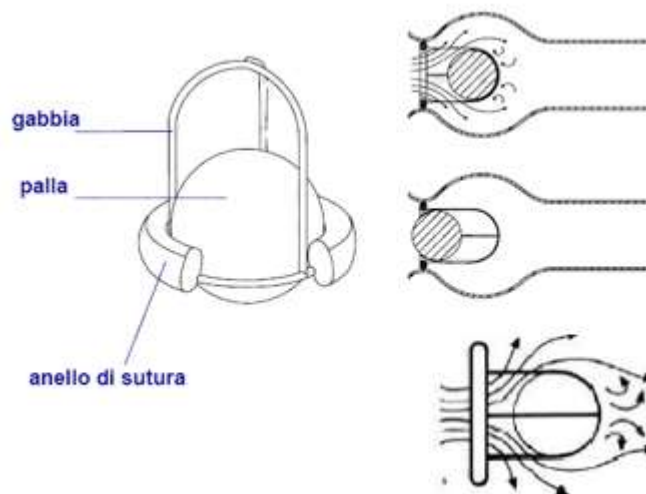


Figura 30: Rappresentazione schematica di una valvola caged-ball, comportamento in eiezione e rilascio ventricolare e indicazioni sul tipo di flusso prodotto da una valvola di questo tipo.

Le principali complicazioni emerse nella circostanza erano principalmente legate alla formazione di coaguli, all'emolisi e alla crescita anomala di tessuto fibroso con conseguente ostruzione della valvola. Tenuto debito conto di questi aspetti, il processo di design dei sostituti valvolari è divenuto negli anni sempre più importante per migliorare l'emodinamica e ridurre la trombogenicità.

Nel tentativo di perseguire questi obiettivi venne avviata, negli anni successivi, l'introduzione delle *valvole single tilting-disc* (a singolo disco oscillante) in grado di

assicurare una riduzione della distorsione del flusso ematico, dei moti turbolenti e del conseguente danneggiamento cellulare (Figura 31)

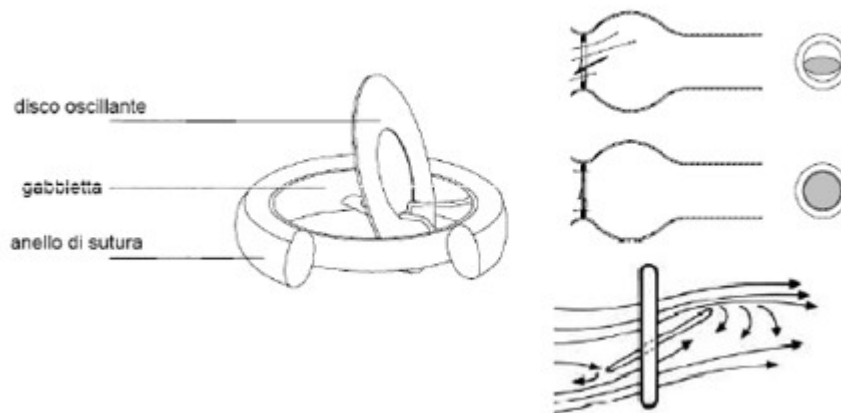


Figura 31: Rappresentazione schematica di una valvola single tilting-disc, comportamento in eiezione e rilascio ventricolare e indicazioni sul tipo di flusso prodotto da una valvola di questo tipo.

Il gradiente pressorio monte-valle della valvola permette la rotazione dell'occlusore e consente al sangue di fluire centralmente. Una decina di anni più tardi (1974), la St. Jude Medical introdusse nel mercato il primo modello di valvola *bileaflet*, che rappresenta ancora oggi a tutti gli effetti la tipologia di protesi meccanica più impiantata nel mondo. Due emidischi, che fungono da occlusore interferendo minimamente con il flusso sanguigno, consentono di riprodurre un'emodinamica simile a quella fisiologica e rendono le valvole bileaflet (Figura 32) il *gold standard* nella protesica valvolare meccanica attuale.

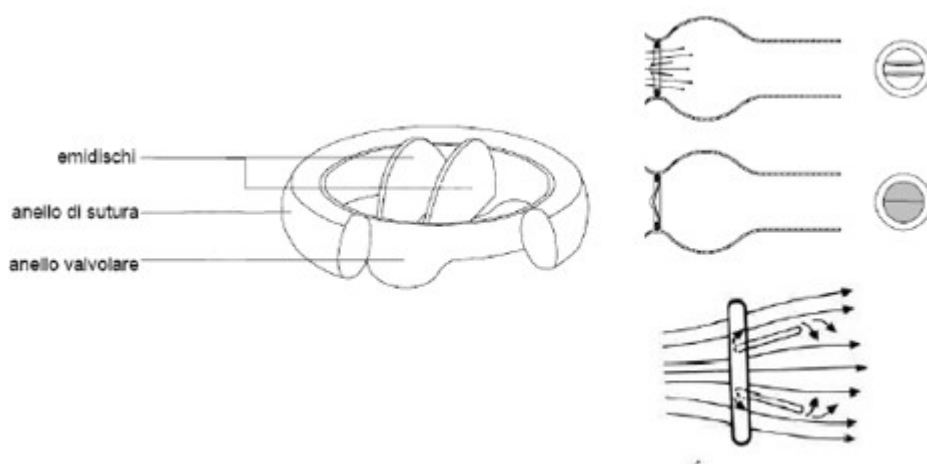


Figura 32: Rappresentazione schematica di una valvola bileaflet, comportamento in eiezione e rilascio ventricolare e indicazioni sul tipo di flusso prodotto da una valvola di questo tipo.

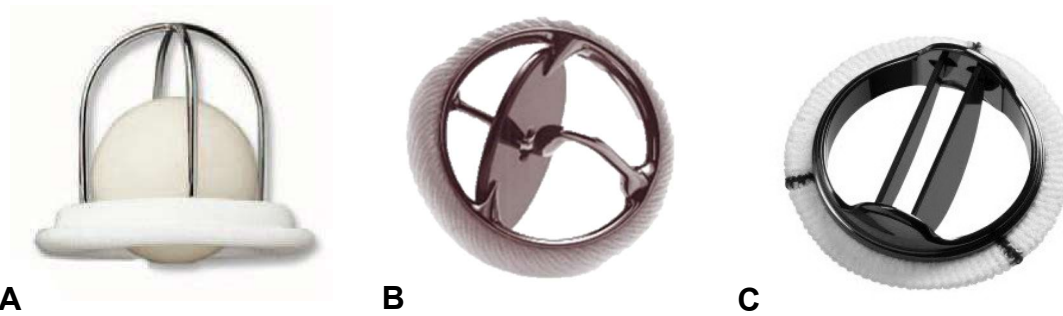


Figura 33: Esempi di protesi meccaniche: A) protesi caged-ball, Starr-Edwards; B) protesi single-tilting disk, Medtronic Hall; C) protesi bileaflet

4.3 Protesi valvolari biologiche (BHV)

La necessità di affiancare la terapia anticoagulante a vita all'impianto delle valvole meccaniche ha dato una spinta alla ricerca di sostituti valvolari che non richiedano tale terapia. Una prima classificazione distingue tre diversi gruppi di sostituzione bioprotesica:

- i. *xenografts* (letteralmente 'valvole trapiantate da una specie ad un'altra'): sono solitamente valvole aortiche porcine o valvole in tessuto pericardico bovino opportunamente trattate per rimuovere la componente cellulare;
- ii. *homografts o allografts*: valvole umane ottenute da donatore;
- iii. *autografts*: valvole cardiache ottenute prelevando tessuto dal paziente stesso durante l'intervento (pericardio, valvola polmonare..)

Le bioprotesi o le valvole biologiche tessutali sono in grado di imitare le proprietà del flusso e del materiale della valvola nativa (Figura 34).

Questa caratteristica si traduce in una minor trombogenicità ed emolisi ed una maggior compatibilità rispetto ai sostituti meccanici. A differenza degli homografts e degli autografts, che essendo di derivazione umana sono soggetti a disponibilità limitata, gli xenografts sono solitamente rappresentati da valvole aortiche porcine o valvole tricuspidi ottenute da pericardio bovino [36].



Figura 34: Esempi di protesi biologiche: A) protesi aortica porcina; B) protesi in pericardio bovino; C) homograft aortico decellularizzato

Per evitare fenomeni immunologici e ritardare la degenerazione tissutale *post-mortem* conservando nel modo migliore tutte le componenti del tessuto, i biomateriali di origine animale necessitano dell'applicazione di una serie di trattamenti chimici prima di procedere all'impianto. Il trattamento più comune è quello della fissazione con GA, impiegato da più di 40 anni e di cui si conoscono con precisione i meccanismi d'azione. Dal punto di vista meccanico la fissazione con GA causa un notevole irrigidimento del materiale e della struttura, che si traduce in un aumento degli stress a compressione e trazione e nel conseguente aumento dell'incidenza di delaminazioni, calcificazione, collassi e degenerazione della protesi, come osservato da A.C. Duncan e D. Boughner in [37].

Oltre ad alterare le proprietà biomeccaniche del tessuto, il *crosslinking* con GA rende anche lo scaffold citotossico, rendendo improbabile un ripopolamento del biomateriale dalle cellule del ricevente e di conseguenza inibendo il rimodellamento e la crescita della bioprotesi nell'ospite.

La compresenza di questi due effetti indesiderati ha fatto sì che siano stati valutati negli anni molti metodi innovativi alternativi al trattamento con GA, tra cui il processo di decellularizzazione, ampiamente applicato nell'ingegneria tissutale delle valvole cardiache (TEHV).

Un ulteriore aspetto che può essere valutato nella protesica valvolare biologica è la procedura con la quale il tessuto sostitutivo viene fissato in posizione. Gli innesti valvolari sono dunque di due tipi: *stented* o *stentless*.

I primi interventi di sostituzione valvolare aortica con innesti di valvole aortiche porcine o pericardio bovino vennero realizzati montando gli xenografts su *stent*. Gli *stent* sono strutture cilindriche a maglia metallica, oppure telai di plastica ricoperti da tessuto sintetico e fissati alla valvola sostitutiva mediante sutura.

Lo scopo dello stent è quello di mantenere in sede la valvola contribuendo anche a preservarne la struttura tridimensionale. Se da un lato l'operazione di sostituzione è resa più facile, dall'altro la sutura tra anello e valvola provoca problemi dal punto di vista emodinamico, trombogenico e di calcificazione.

Lo sviluppo delle tecniche chirurgiche ha reso possibile lo sviluppo di sostituti valvolari *stentless* che permettono di ottenere una maggior area orificiale ed una migliore anatomia ed emodinamica, diminuendo il gradiente di pressione transvalvolare come osservato nello studio comparato di Dunning et al. [38]. In questo caso la sostituzione avviene operando con due suture, una molto vicina all'orifizio valvolare e l'altra interna all'aorta in modo da evitare modifiche al gradiente pressorio.

4.3.1 Il pericardio nella protesica valvolare cardiaca

Dagli anni '80 ad oggi, accanto alle protesi di origine porcina, si sono progressivamente sviluppate le bioprotesi costituite da tessuto pericardico bovino o equino trattato mediante fissazione con GA. Bioprotesi di questa natura mostrano aspetti emodinamici migliori rispetto a gran parte delle proposte disponibili sul mercato.

La prima generazione di bioprotesi pericardiche ha mostrato sin da subito problemi di progettazione, essendo soggetta alla rottura di lembi valvolari, ed è stata ritirata dal mercato a metà degli anni '80 (*Ionescu Shiley – IS*). La seconda generazione (*Carpentier Edwards Perimount - CEP*) è stata invece a lungo considerata la migliore dal punto di vista emodinamico, ma non è immune dal processo di deterioramento per mineralizzazione delle cuspidi.

Oltre alla *CEP*, un ulteriore esempio di valvola pericardica di seconda generazione è rappresentato dalla *Mitroflow Pericardial Valve A12 (Sorin Group Inc.)*, una valvola che, pur non essendo trattata con agenti anti-mineralizzanti, ha mostrato una ridotta percentuale di fallimenti.

Attualmente le protesi utilizzate per la sostituzione valvolare aortica sono le *IS standard* e *low-profile*, le *CEP*, le *Mitroflow* e le *Sorin Pericarbon (Figura 35)*.

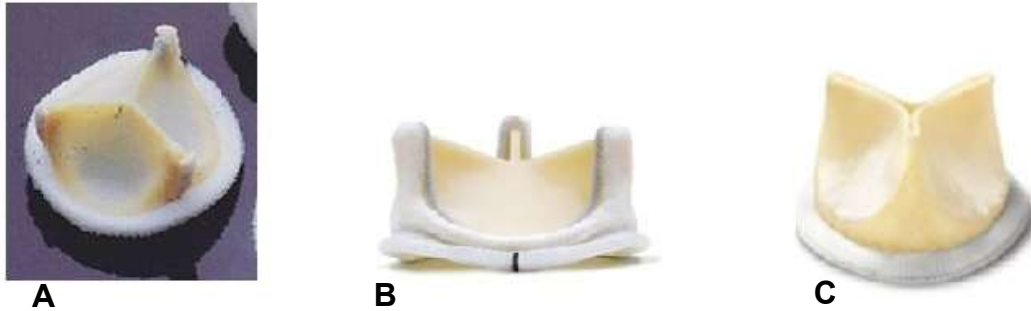


Figura 35: Esempi di tre valvole cardiache realizzate in pericardio bovino. A) Ionescu-Shiley (1971); B) Perimount Carpentier-Edwards (1982); C) Sorin Mitroflow (1982)

4.4 Sostituti percutanei

In molti pazienti di età avanzata o con presenza di comorbidità multiple, l'invasività della sostituzione valvolare aortica (AVR) è motivo di rinuncia all'intervento chirurgico, sebbene la mortalità attestata dell'intervento non superi il 2.8% nei 30 giorni successivi all'intervento.

Tuttavia, per ovviare a questo problema, dal 2002 è stata messa a punto, per i pazienti ad alto rischio, la cosiddetta TAVI. Dopo il "first man" effettuato nel 2002, la TAVI è entrata nella pratica clinica nel 2007 guadagnando grandi consensi (circa 50000 impianti in 40 nazioni). L'Italia è seconda in Europa in termini di numero di procedure TAVI effettuate, alla pari con la Francia (11% del totale), preceduta dalla Germania (43%) e seguita da Regno Unito e Irlanda (7%) (Figura 36).

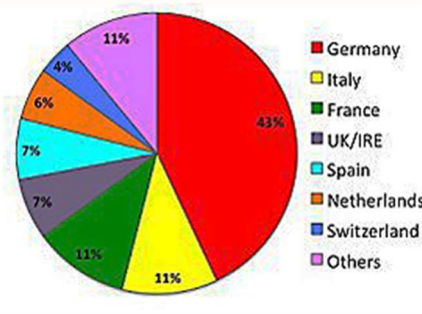


Figura 36: Diagramma che mostra la percentuale di interventi TAVI effettuati in Europa.

A differenza della AVR tradizionale, in questo caso si opera a cuore battente e non si esegue la toracotomia perché la protesi può essere impiantata passando attraverso una arteria periferica o dall'apice del ventricolo.

Le protesi cardiache TAVI sono costituite da uno stent metallico sul quale è fissata una protesi biologica simile a quelle che vengono utilizzate negli interventi a cuore aperto.

Le vie d'accesso per il posizionamento della TAVI sono sostanzialmente quattro: trans-femorale, trans-apicale, trans-ascellare e trans-aortica e dipendono dalle condizioni delle arterie periferiche e del paziente in generale (*Figura 37*)

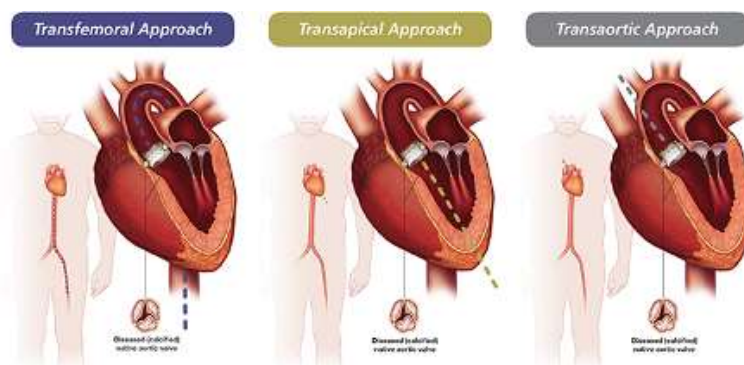


Figura 37: Immagine schematica che evidenzia le tre vie di accesso per il posizionamento della TAVI. Da sinistra: approccio transfemorale, approccio transapicale e approccio transaortico.

L'approccio retrogrado femorale è attualmente il più utilizzato e la pratica chirurgica negli ultimi anni si è notevolmente evoluta consentendo di ottenere l'accesso arterioso in modo percutaneo e senza anestesia generale (*Figura 38*).

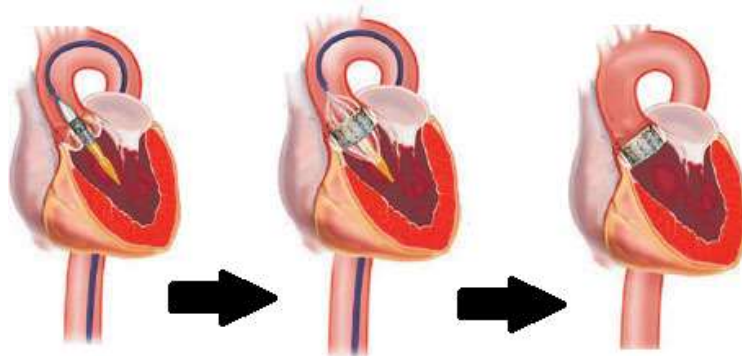


Figura 38: Approccio transfemorale per il posizionamento della valvola. La valvola viene schiacciata all'interno di un catetere che viene posizionato nell'annulus aortico attraverso l'ingresso femorale. Il palloncino presente sul catetere viene gonfiato espandendo la valvola e successivamente rimosso per lasciare la valvola sostitutiva in sede nativa.

D'altra parte, qualora per il paziente sia controindicato un intervento di questo tipo, viene utilizzato l'approccio trans-apicale in anestesia generale. Il chirurgo procede all'esposizione dell'apice cardiaco attraverso una minitoracotomia e al posizionamento della valvola in direzione anterograda, all'interno di quella nativa stenotica. Al termine della procedura il ventricolo sinistro viene suturato chirurgicamente.

Per evitare la toracotomia per la sostituzione della valvola si rende sempre necessario un processo di *crimping* della bioprotesi entro un *delivery system* che permette di rilasciarla nel sito desiderato.

La tecnologia di rilascio della valvola sostitutiva può essere di due tipi: *balloon expanding* oppure *self expanding*. Nel primo caso il rilascio avviene tramite l'espansione del palloncino che si trova sul catetere e consente un miglior ancoraggio all'annulus aortico grazie alla forza radiale espressa dallo stent; nel secondo caso il posizionamento invece avviene tramite il ritiro dell'introduttore che guida il dispositivo e l'auto-espansione dello stent.

In entrambi i casi non è prevista la rimozione della valvola aortica nativa, che viene invece utilizzata come base per il fissaggio della protesi biologica.

In Europa sono solo due i dispositivi approvati CE per la TAVI: le generazioni di valvole *Edwards SAPIEN* (Edwards Lifesciences, California, USA) e il *CoreValve ReValving System* (Medtronic, Minneapolis, USA) (*Figura 39*). [39]

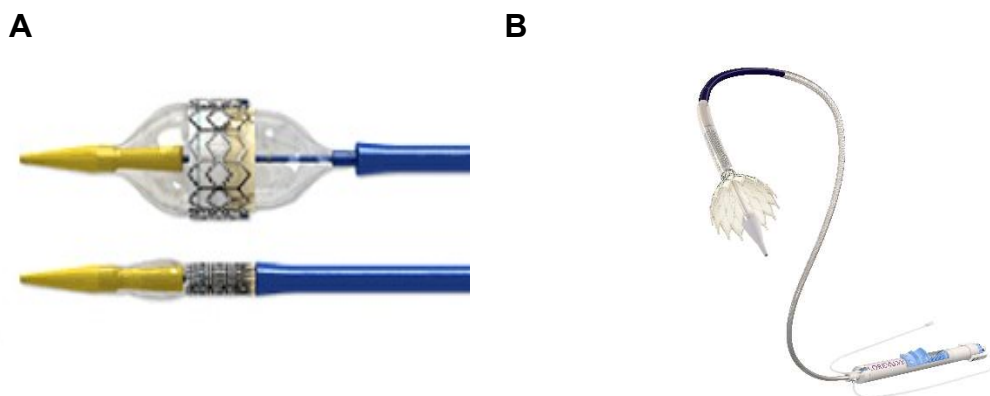


Figura 39: Esempi di dispositivo di rilascio per TAVI. A) RetroFlex 3 Delivery system balloon expanding per valvole Edward Sapien 23 e 26 mm; B) Medtronic Valve System self expanding

Il *crimping* espone i lembi valvolari ad un livello di tensione per un intervallo di tempo significativo, che dipende dalla natura e dalla difficoltà della procedura chirurgica.

Attualmente i dati a disposizione per la quantificazione dei danni risultanti da questo procedimento non sono numerosi; è tuttavia assodato che applicando sollecitazioni meccaniche ai lembi di pericardio si provochino delle interruzioni nel pattern delle fibre di collagene, con una possibile manifesta calcificazione e un conseguente fallimento precoce della protesi come riportato in [40]. .

Buhr et al. in [41], ad esempio, hanno analizzato gli effetti dell'espansione del palloncino sui lembi valvolari osservando mediante analisi istologica la rottura delle fibre di collagene del tessuto (*Figura 40*). Un approccio di questo tipo, tuttavia, non risulta sufficiente a quantificare in maniera precisa il danno indotto dal *crimping*; mentre solo l'utilizzo di tecniche di imaging o di test meccanici consentono di definirlo correttamente sia a livello spaziale che temporale.

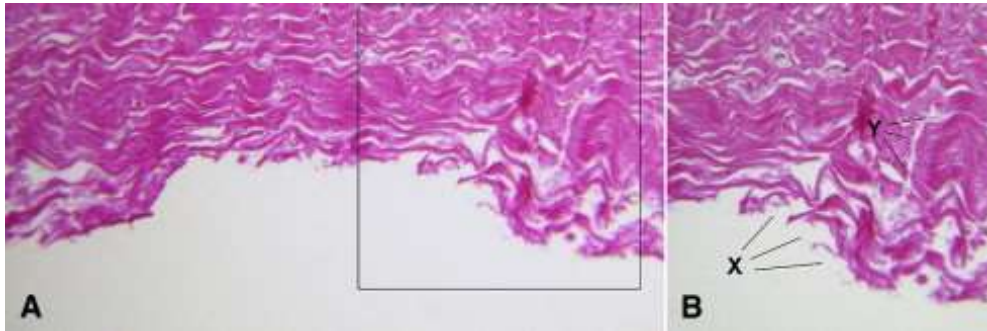


Figura 40: Istologia del tessuto pericardico con effetti dello stent sulle fibre di collagene.

X= struttura danneggiata e rottura delle fibre di collagene superficiali. Y= rottura delle fibre di collagene negli strati più profondi del tessuto [41]

4.4.1 Edwards SAPIEN

Dopo la valvola Cribier-Edwards (2002), realizzata in pericardio equino montato su stent in acciaio inox, nel 2007 fa la sua comparsa la *valvola Edwards Sapien* di prima generazione. È costituita da tre lembi in pericardio bovino, montati su uno stent in acciaio inossidabile espandibile grazie ad un palloncino. Una fascia di tessuto viene inoltre cucita allo stent in corrispondenza della porzione valvolare all'interno del ventricolo sinistro per limitare il rigurgito paravalvolare. La protesi è fissata in GA ed è stata progettata sia per l'impianto transapicale che transfemorale attraverso l'utilizzo del sistema di rilascio RetroFlex (*Figura 39*), il cui diametro varia da 22 a 24 F ($1F=0,33$ mm di diametro).

La probabilità di successo di questo dispositivo è maggiore del 90% per entrambi gli approcci chirurgici, pur essendo molto differenti i tassi di complicanze vascolari (22.9 % per impianto transfemorale vs 4.9 % per impianto transapicale) imputabili in particolar modo alle dimensioni del dispositivo di rilascio. Questa limitazione è stata superata grazie all'introduzione della valvola Edwards SAPIEN XT, che presenta una

struttura in cromo-cobalto caratterizzata da un minor numero di montanti e una struttura più aperta rispetto alla generazione precedente.

Queste innovazioni hanno permesso di mantenere la stabilità, la circolarità e la resistenza della protesi, pur consentendo contemporaneamente di realizzare un crimping più stretto per l'inserimento in cateteri di dimensioni inferiori. Pur mantenendo i lembi in pericardio bovino, essi presentano un design diverso che minimizza le sollecitazioni meccaniche, permettendo di aumentare la longevità della valvola.

Diversamente dalla SAPIEN di prima generazione, montata direttamente sul palloncino, la seconda generazione ha anche un nuovo sistema di rilascio (NOVAFLEX, Edwards Lifesciences) che permette alla valvola di essere montata sul palloncino quando si trova in aorta addominale/toracica.

Le modifiche strutturali della valvola e la progettazione del dispositivo NOVAFLEX, di diametro esterno inferiore rispetto al RetroFlex, hanno consentito di ridurre notevolmente il tasso di complicanze vascolari osservate con la versione precedente.

I limiti emersi nelle valvole di prima e seconda generazione hanno spinto la ricerca della Edwards nella direzione della SAPIEN 3, l'erede della SAPIEN XT, il cui processo di sviluppo è iniziato nel 2010 e i primi trial clinici risalgono al 2013.

La SAPIEN 3 è costituita da uno stent di cromo-cobalto su cui sono montati i 3 lembi in pericardio bovino della valvola (*Figura 41.*)

Lo stent è stato ridisegnato per ottenere un crimping ancora ridotto rispetto alla SAPIEN e alla SAPIEN XT, nonché una ulteriore diminuzione sia delle complicanze vascolari che dei leak paravalvolari.

Anche il sistema di delivery della SAPIEN 3 rappresenta un'evoluzione del catetere NOVAFLEX. Il *Commander* (Edwards Lifesciences) ha uno speciale design a punta conica che presenta dei *marker* di allineamento che guidano il posizionamento della valvola durante l'intervento. Il catetere esterno, flessibile e deformabile, inoltre, possiede un manubrio che presenta delle rotelline in grado di regolare l'inclinazione della punta del catetere, il grado di flessione e l'allineamento della valvola durante il posizionamento in modo da far avanzare o retrarre la valvola di alcuni millimetri senza forzare il sistema di delivery.

La valvola ha ricevuto il marchio CE a fine gennaio 2014, e attualmente non sono ancora disponibili dati di follow up a lungo termine per valutarne l'affidabilità e la funzionalità. Le prime esperienze sull'impianto hanno però portato dati positivi in

termini di sopravvivenza dei pazienti (oltre il 99%), di riduzione di malposizionamenti della valvola (0.3%) e di diminuzione della sua embolizzazione (0.1%).

I risultati incoraggianti sono legati senza dubbio all'introduzione delle innovazioni dei marker per il rilascio, all'aumento della lunghezza della valvola che ne facilita il posizionamento, alla riduzione delle dimensioni fino a 14-18F e alla particolare struttura con gonnellina esterna che minimizza il rigurgito paravalvolare [42].

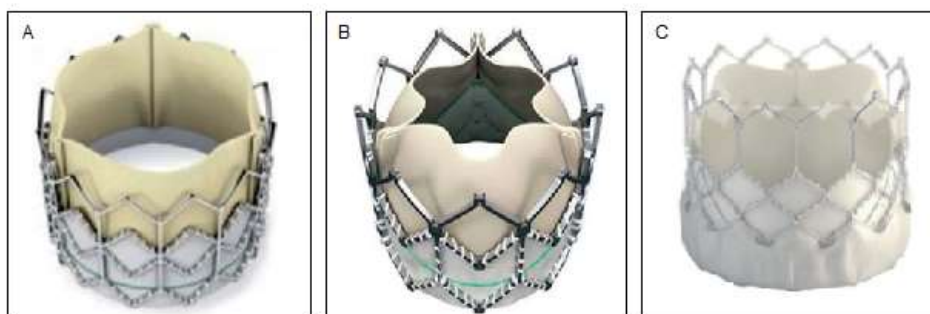


Figura 41: Evoluzione della valvola Edwards SAPIEN (A) Valvola SAPIEN; (B) Valvola SAPIEN XT; (C) Valvola SAPIEN 3

4.4.2 Medtronic CoreValve

A differenza della Edwards SAPIEN, la *Medtronic CoreValve* è una valvola autoespandibile *Figura 42* costituita da un supporto in nitinolo su cui sono fissati tre lembi in pericardio porcino e da una gonnella anch'essa in tessuto pericardico porcino. Dall'inizio della sperimentazione questa protesi ha subito varie modifiche tecnologiche fino ad arrivare alla "seconda generazione valvolare" (2012) che reca alcune innovazioni anche in merito al trattamento anti-calcificante dei lembi.

I numerosi trial clinici e i dati riportati hanno permesso di evidenziare come l'uso della *CoreValve* permetta di ottenere gradienti transvalvolari di grado minore rispetto a quelli ottenuti con una valvola *balloon-expandable*. Il dato è imputabile alla differenza di conformazione tra i due dispositivi: la valvola Edwards, infatti, viene disposta all'interno della protesi in posizione intra-anulare, mentre la *CoreValve* è posizionata al di sopra dell'annulus aortico, come efficacemente schematizzato in *Figura 43*.

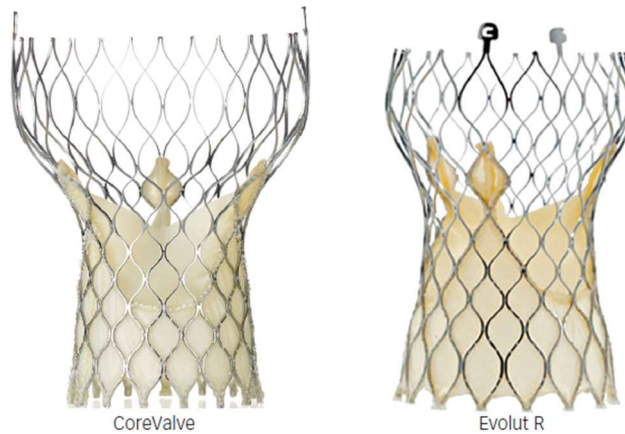


Figura 42: A sinistra: Medtronic CoreValve; a destra: Evolut R valve.
Pictures provided by Medtronic.

Nel 2015 Medtronic ha annunciato l'approvazione del nuovo dispositivo self-expanding *CoreValve Evolut R System* sia da parte della FDA che della CE [43].

Questa nuova generazione di CoreValve presenta una serie di innovazioni tra cui la possibilità di riposizionamento e di ricattura della valvola ed una notevole riduzione del calibro nel sistema di rilascio. La valvola Evolut R è stata modificata rispetto alla CoreValve aumentandone la forza radiale nel punto di contatto con l'annulus aortico, fornendo una maggiore copertura della porzione ventricolare e riducendo così il rischio dei rigurgiti paravalvolari.

Il sistema di rilascio inoltre è stato realizzato per consentire un'agevole ricattura della protesi fino a pochi millimetri dal suo completo rilascio, permettendo così un impianto più accurato. Questi aspetti offrono indubbiamente la possibilità di ricorreggere la posizione finale del rilascio, garantendo una maggior sicurezza nella procedura e riducendo le complicanze della TAVI. La diminuzione del calibro del sistema di rilascio (che esternamente non supera i 18F) permette inoltre di ridurre l'insorgenza di complicanze legate agli accessi vascolari. [44]

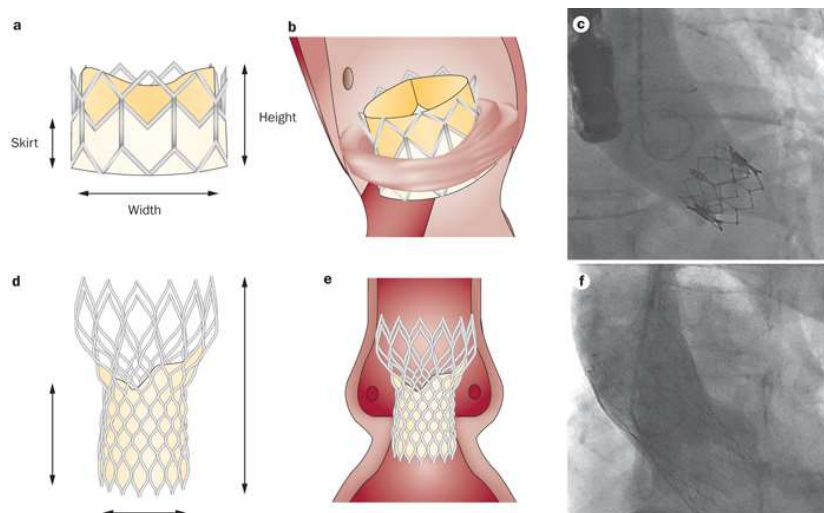


Figura 43: a) Edwards SAPIEN XT (Edwards Lifesciences), b) schematizzazione del posizionamento del dispositivo nella radice aortica e c) relativa aortografia, d) Medtronic COREVALVE (Medtronic), e) schematizzazione del posizionamento del dispositivo nella radice aortica e f) relativa aortografia [45]

Dopo la procedura di impianto TAVI il paziente deve essere monitorato in terapia intensiva per almeno 24 ore, controllando i parametri emodinamici, il ritmo cardiaco, gli accessi vascolari e la funzione renale.

Uno studio realizzato nel 2009 [46] ha avuto come obiettivo il confronto delle performance delle valvole percutanee e di quelle tradizionali dal punto di vista emodinamico. Pur mostrando risultati promettenti in merito ad area effettiva dell'orifizio valvolare e gradiente transvalvolare, l'occorrenza di rigurgito aortico subito dopo l'intervento è più presente a seguito della procedura percutanea rispetto a quella standard chirurgica.

Il trattamento percutaneo ha quindi ancora diversi ostacoli da superare per attestarsi come *gold standard* nella pratica clinica: oltre agli evidenti effetti già menzionati che il *crimping* ha sulla valvola, vi sono innegabili limiti di accesso periferico, limiti di durata, difficoltà di posizionamento e il rischio di migrazione della valvola che, a differenza delle altre tipologie protesiche, non viene suturata al tessuto miocardico, ma semplicemente posizionata in sede.

V. L'INGEGNERIA TESSUTALE PER LA REALIZZAZIONE DI VALVOLE CARDIACHE INGEGNERIZZATE

Come anticipato nel capitolo precedente, la pratica clinica odierna non utilizza tessuti viventi per il trattamento delle valvulopatie: la terapia chirurgica prevede la sostituzione della valvola malata con protesi meccaniche o biologiche. Uno dei grandi limiti di queste protesi, che si aggiunge a quelli già menzionati, è l'incapacità di rimodellarsi e crescere con il paziente.

L'assenza di "vitalità" comporta, soprattutto in ambito pediatrico, la necessità di ripetuti interventi a cuore aperto, che aumentano esponenzialmente il tasso di mortalità dei giovani pazienti. Si stima che circa l'1% dei neonati sia affetto da disfunzioni cardiache congenite che richiederebbero interventi di sostituzione con dispositivi in grado adattarsi alla crescita fisiologica dei pazienti.

Da questo punto di vista, l'ingegneria tessutale è indirizzata allo sviluppo di nuove strutture vitali che sostituiscano quelle non più funzionanti. Le valvole cardiache ingegnerizzate possono essere sviluppate a partire da approcci di tipo diverso. In primo luogo, scaffold di tipo biologico (decellularizzati) o sintetico vengono seminati *in vitro* con cellule prelevate dal paziente, condizionati in bioreattore e poi impiantati nel ricevente. Questo approccio aderisce alla definizione classica di *tissue engineering* fornita da Langer e Vacanti in [47] e descritta in *Figura 44*. L'applicazione di questo approccio è da considerarsi obsoleta in particolare in campo cardiovascolare: ad oggi la semina *in vitro* di cellule autologhe risulta essere una strada difficilmente percorribile, sia a causa delle difficoltà di standardizzazione delle procedure di coltura e di condizionamento in bioreattore, sia per la invasività del prelievo da paziente di un quantitativo congruo di cellule che si dimostrino inoltre adatte al corretto ripopolamento *in vitro* dello scaffold. Soprattutto per le valvole cardiache, ora è maggiormente

utilizzato un approccio alternativo, chiamato *Tissue-guided regeneration*, in cui il tessuto acellulare viene impiantato e ripopolato dalle cellule dell'ospite.

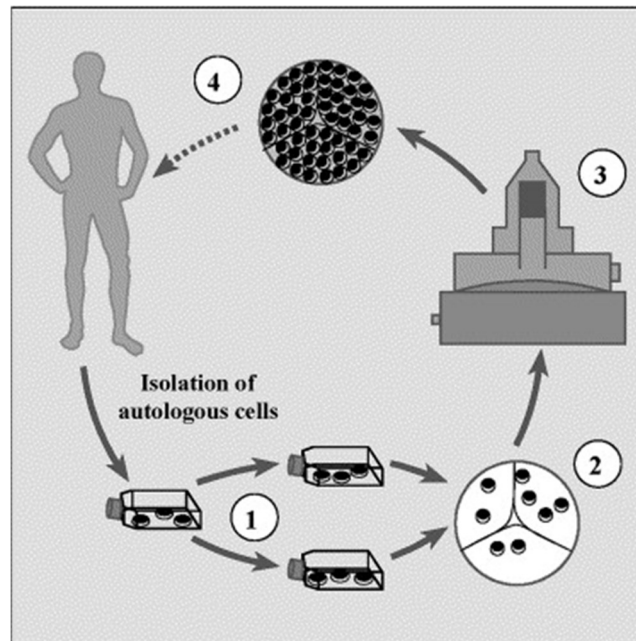


Figura 44: Rappresentazione schematica dell'ingegneria tissutale valvolare basata su cellule autologhe. (1) isolamento ed espansione delle cellule autologhe attraverso le tecniche di coltura cellulare; (2) semina delle cellule su scaffold biodegradabile; (3) condizionamento meccanico nel bioreattore; (4) impianto della TEHV

Il successo delle protesi valvolari ingegnerizzate sviluppate con ciascuno degli approcci sopra descritti dipende da una serie di requisiti piuttosto stringenti ed in particolare:

- proprietà meccaniche e performance emodinamiche comparabili a quelle della valvola nativa;
- tessuto vitale in grado di sostenere l'adesione, la proliferazione e la differenziazione delle cellule del ricevente;
- capacità di rimodellarsi e di crescere insieme al ricevente;
- durata compatibile con la vita del soggetto, senza che questo abbia la necessità di venire operato nuovamente;
- assenza di fenomeni di trombogenicità o reazioni infiammatorie.

Lo scaffold ingegnerizzato deve garantire proprietà meccaniche adatte a sostenere le condizioni dinamiche del sito di impianto per tutta la vita del paziente, mantenendo l'elasticità necessaria a consentire la chiusura ermetica durante la fase diastolica del ciclo cardiaco.

La microarchitettura di fibre di collagene ed elastina del substrato, inoltre, influenzando le proprietà meccaniche e le funzionalità biologiche, deve essere quanto più simile a quella nativa in modo da creare un ambiente adatto allo sviluppo cellulare.

Gli scaffold attualmente utilizzati nella TEHV si distinguono in:

- scaffold sintetici, ottenuti da materiali polimerici come acido polilattico (PLA) e acido poliglicolico (PGA) riconosciuti dalla FDA come materiali polimerici biocompatibili;
- scaffold biologici formati dai costituenti puri della ECM, come ad esempio il collagene, il cui utilizzo però presenta una serie di problematiche legate all'antigenicità, immunogenicità, biomeccanica e biodegradabilità [48];
- scaffold biologici decellularizzati di origine non valvolare (ad esempio il *pericardio*);
- scaffold biologici di origine valvolare (*homograft, xenograft*).

Nel prosieguo saranno descritti brevemente gli scaffold biologici decellularizzati di origine pericardica e gli scaffold basati sull'arricchimento con peptidi autoassemblanti, che sono direttamente implicati nel lavoro sperimentale svolto nell'ambito della presente tesi.

5.1 Scaffold biologici decellularizzati di origine non valvolare

Una delle matrici biologiche più utilizzata negli studi di ingegneria tissutale valvolare è il pericardio. La letteratura scientifica riporta numerosi studi sulla caratterizzazione biomeccanica del pericardio di varie specie animali, mentre gli studi sul pericardio umano sono notevolmente meno diffusi a seguito della esigua disponibilità di materiale umano, che, insieme alla reazione infiammatoria post pericardiotomia che ne altera le proprietà tissutali, è la causa della limitata applicabilità del pericardio umano come scaffold per la costruzione di valvole cardiache. L'esiguo numero di donatori e la reazione infiammatoria post pericardiotomia, che ne altera le proprietà tissutali, è la causa della limitata applicabilità del pericardio umano come scaffold per la costruzione di valvole cardiache.

A questi limiti applicativi è possibile inoltre aggiungere una osservazione di Tokuhiro Ishihara et al. riportata in [4]. L'analisi istologica condotta su pericardio umano, infatti, ha mostrato come la superficie anteriore presenti una *texture* estremamente ruvida, a

causa della presenza di fasci di fibre di collagene di grandi dimensioni. Questa caratteristica rappresenta chiaramente uno svantaggio per l'utilizzo del pericardio nella realizzazione di patch o per la costruzione di lembi valvolari, perché lo rende più predisposto a trombogenesi.

A fronte di queste considerazioni, attualmente trova maggior impiego chirurgico il pericardio animale, ed in particolare il pericardio bovino (BP) e porcino (PP).

La caratterizzazione biomeccanica del pericardio bovino e porcino è generalmente effettuata attraverso test monoassiali e biassiali, mentre il pericardio umano è stato caratterizzato prevalentemente sfruttando prove di trazione monassiale. Date le caratteristiche di viscoelasticità e anisotropia del tessuto, è semplice intuire come questa caratterizzazione non consenta di conoscere con precisione [49] tutti gli aspetti di funzionalità meccanica del tessuto.

5.1.1 Pericardio bovino come scaffold di origine non valvolare

L'utilizzo del pericardio bovino per le TEHV, come ampiamente discusso in precedenza, è ormai ampiamente consolidato. Il tessuto presenta tuttavia numerosi svantaggi nel suo utilizzo, in primis il suo aspetto di marcata anisotropia che rende necessario isolare la regione più adatta in relazione alla finalità applicativa da perseguire.

L'architettura delle fibre di collagene infatti mostra variabilità sia intraspecie che interspecie, pur mantenendo una certa tendenza in termini di parametri strutturali come la densità di fibre e i gradi di orientazione. La direzione di massima rigidità e di massima estensibilità è inoltre concorde con le direzioni preferenziali delle fibre di collagene.

Questo si ripercuote nella necessaria ricerca della regione preferenziale per il prelievo del tessuto.

Numerosi studi, nel corso degli anni, hanno mirato a stilare una serie di criteri con cui selezionare la porzione ideale di tessuto per l'applicazione protesica [50], ma ad oggi ancora non esiste uno standard, pur esistendo alcuni aspetti che meritano particolare attenzione.

Le aree selezionate per la realizzazione di bioprotesi devono essere caratterizzate da struttura e proprietà meccaniche regolari, e quindi devono avere uno spessore uniforme una limitata variabilità di direzione delle fibre di collagene, un'area sufficientemente

ampia per la costruzione di un lembo valvolare e la presenza di tessuto adiposo in quantità trascurabile.

Nel 1994, ad esempio, Sacks et al. [51] hanno riportato che la regione pericardica corrispondente al ventricolo sinistro è la più omogenea ed adatta alla selezione in virtù delle considerazioni sopracitate in termini di uniformità di spessore, minore variabilità dell'orientamento delle fibre di collagene e minor presenza di tessuto adiposo, mentre Hiester et al. in [52] riconoscono invece che la selezione del tessuto unicamente sulla base della morfologia anatomica è insufficiente e che gli studi istologici e meccanici (*Tabella 2*) sono fondamentali per valutare l'architettura del collagene e il comportamento tissutale che ne deriva [53].

Tessuto	Modulo elastico (MPa)	Autore (anno pubblicazione)
Pericardio canino	14.30 ± 2.0	Rabkin (1974)
Pericardio bovino (ventricolo destro)	9.80 ± 3.3	Garcia Pàez (1996)
Pericardio bovino (ventricolo sinistro)	12.30 ± 4.2	Garcia Pàez (1996)

Tabella 2: Tensione a rottura di tessuti biologici studiati per la protesica valvolare.

La componente cellulare presente nel tessuto xenogenico è in grado di scatenare una reazione di rigetto se non accuratamente eliminata o 'mascherata' al sistema immunitario del ricevente. Per oltre 30 anni la fissazione in GA è stata considerata il metodo ottimale per perseguire la biocompatibilità del tessuto ed il mascheramento degli epitopi che possono causare il rigetto; recentemente è stato verificato che il trattamento con GA non è in grado di mascherare completamente su valvole di origine animale i residui immunogenici presenti e potenzialmente responsabili di reazioni immunitarie avverse [54]. Attualmente però esistono procedure di decellularizzazione che sembrano costituire promettenti alternative alla fissazione in GA, di pari (o addirittura migliore) efficacia ma prive degli effetti negativi legati alla citotossicità e alla calcificazione ([55], [56]).

5.2 Tecniche di decellularizzazione dei tessuti biologici

Un metodo di decellularizzazione ottimale deve garantire non solo la rimozione completa di cellule, residui nucleici ed epitopi antigenici, ma anche la conservazione della struttura dell'ECM e l'ottenimento di un substrato adeguato per la ricellularizzazione.

Esistono diversi metodi di decellularizzazione basati su metodi fisici, chimici ed enzimatici che presentano diversi livelli di efficacia in termini di rimozione cellulare e di conservazione della ECM. E' necessario anche sottolineare che un protocollo adeguato per un tessuto proveniente da una certa specie può risultare inadatto in altre condizioni ed è quindi importante valutare il protocollo di decellularizzazione ottimale sia in relazione al tipo di tessuto ed alla sua successiva applicazione.

L'efficacia di un protocollo di decellularizzazione, come osservato in [27], dipendono da numerosi fattori: densità del tessuto, contenuto di lipidi, spessore, quantità di cellule presenti nel tessuto.

Per determinare l'efficacia di un protocollo di decellularizzazione vengono presi in considerazione i seguenti parametri:

- rimozione cellulare, in termini di eliminazione di residui di acidi nucleici e di porzioni di membrana plasmatica potenzialmente coinvolti nello scatenarsi di reazioni immunitarie e calcificazione del biomateriale.
Questo viene perseguito non solo rompendo la membrana cellulare ma anche rimuovendo con lavaggi i residui intracellulari rilasciati nel tessuto;
- mantenimento della struttura e delle componenti della ECM (collagene, elastina, GAGs, etc);
- mantenimento delle proprietà meccaniche del tessuto;
- mantenimento delle proprietà biologiche, ad esempio la capacità di indurre e supportare l'adesione, la proliferazione e l'adeguato differenziamento cellulare;
- produzione di uno scaffold non immunologico, non trombogenico e non citotossico.

In *Tabella 3* si riportano alcuni metodi attualmente utilizzati, e nel prosieguo verranno brevemente descritti vantaggi e svantaggi dei vari approcci alla decellularizzazione.

FISICI	CHIMICI	ENZIMATICI
Agitazione meccanica Congelamento/ scongelamento Sonicazione	Tripsina Endonucleasi	Acidi e basi (EDTA,EGTA) Detergenti non ionici (Triton X-100) Detergenti ionici (SDS, Triton X-200)

Tabella 3: Elenco dei metodi di decellularizzazione più utilizzati per la preparazione dello scaffold.

5.2.1 Metodi chimici

I trattamenti chimici prevedono l'utilizzo di detergenti che provocano l'idrolisi delle componenti citoplasmatiche e la degradazione degli acidi nucleici, ma possono avere anche effetti negativi sui GAG e sulle proteine come il collagene. Questo si traduce inevitabilmente in una diminuzione delle proprietà meccaniche del tessuto e dunque, per applicazioni dove le proprietà tissutali sono fondamentali, un approccio di questo tipo è particolarmente svantaggioso.

Qualora sia necessario conservare l'architettura della ECM e non agire quindi sulle proteine strutturali, si può pensare di utilizzare le soluzioni ipotoniche come agenti decellularizzanti. L'efficacia di queste soluzioni, tuttavia, è minore rispetto ad altri trattamenti e risulta quindi necessario immergere alternativamente i tessuti in soluzioni iper e ipotoniche ed effettuare diversi cicli di lavaggio.

Il trattamento del tessuto biologico con soluzioni ipotoniche (dove la concentrazione dei soluti è minore rispetto a quella nel citoplasma cellulare) causa un fenomeno osmotico di rigonfiamento delle cellule che determina la rottura della membrana plasmatica cellulare, mentre l'immersione in soluzione ipertonica (dove la concentrazione di soluto è più elevata di quella nel citoplasma) causa invece la disidratazione, contrazione e morte cellulare.

5.2.2 Metodi enzimatici

A differenza dei detergenti chimici, le tecniche di decellularizzazione di natura biologica fanno uso di enzimi di digestione e di nucleasi. In quest'ambito, uno degli enzimi più utilizzati è la tripsina. In quest'ambito, uno degli enzimi più utilizzati è la tripsina, enzima proteolitico in grado di tagliare le proteine senza particolare specificità. In questo senso, dunque, la tripsina svolge l'azione di agente decellularizzante aggredendo le proteine di membrana e provocando la lisi cellulare, ma è anche particolarmente distruttiva nei confronti delle catene polipeptidiche di elastina e collagene.

Dato che gli acidi nucleici eventualmente residui nella ECM dopo decellularizzazione incompleta sono noti agire da siti di calcificazione attraendo ioni calcio e contribuendo di conseguenza al prematuro fallimento della protesi, in alcuni protocolli di decellularizzazione viene incluso l'utilizzo di endo ed eso-nucleasi che determinano la degradazione dell'RNA e del DNA cellulari; mentre le prime catalizzano l'idrolisi dei legami interni della catena, le seconde catalizzano l'idrolisi dei legami terminali.

5.2.3 Metodi fisici

I metodi fisici per decellularizzare tessuti biologici includono variazioni di temperatura, applicazione di pressione idrostatica, agitazione meccanica, perfusione e elettroporazione.

Cicli di congelamento e scongelamento del tessuto portano alla formazione e alla successiva rottura dei cristalli di ghiaccio interni alle cellule, che provocano la lisi della membrana cellulare senza però riuscire a eliminare i contenuti intracellulari e i residui di membrana, che sono potenzialmente immunogenici.

L'agitazione meccanica e l'applicazione di pressione idrostatica sono utilizzate simultaneamente ai trattamenti chimici, per favorire la lisi cellulare e la rimozione dei residui cellulari, mentre l'elettroporazione provoca la formazione di micropori nella membrana delle cellule che portano alla morte cellulare.

5.2.4 Indagine e validazione del protocollo di decellularizzazione

Come anticipato, l'impiego di agenti utilizzati per la rimozione cellulare può essere dannoso per la matrice, che può risultare degradata o denaturata.

Ciò che diventa cruciale è dunque la scelta delle corrette concentrazioni di agenti decellularizzanti e dei tempi di esposizione del tessuto agli stessi, per minimizzare il rischio di danneggiamento della ECM.

La riuscita del protocollo di decellularizzazione viene valutata a posteriori mediante analisi del tessuto trattato. Una indagine preliminare può avvenire mediante ispezione visiva: i tessuti e gli organi decellularizzati, infatti, mostrano un colore bianco/trasparente.

Una tecnica di indagine più approfondita è quella che sfrutta l'analisi istologica: essa è infatti in grado di mettere in evidenza la struttura dei tessuti e la morfologia delle cellule che li compongono.

Le sezioni dei campioni possono quindi essere osservate al microscopio in seguito alla colorazione con agenti in grado di colorare in maniera diversa le varie componenti tissutali.

Una delle colorazioni più utilizzate come prima ispezione, per determinare la presenza di strutture nucleari al termine della decellularizzazione, è la colorazione con Ematossilina e Eosina (H&E). Mentre l'Ematossilina colora di blu/violetto le componenti cellulari cariche negativamente (nuclei, acidi nucleici, proteine di membrana), l'Eosina invece colora di rosso/rosa i componenti carichi positivamente (proteine cellulari, fibre di collagene,..) individuando in tal modo la ECM.

I nuclei cellulari possono essere anche individuati attraverso l'utilizzo di colorazioni con il DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindolo), un colorante organico fluorescente intercalante del DNA.

Il mantenimento delle componenti della matrice viene valutato, oltre che tramite l'analisi istologica, tramite saggi biochimici che prevedono la quantificazione dei componenti della matrice (collagene, elastina, GAGs..).

Come detto precedentemente, una decellularizzazione ben riuscita non solo rimuove la componente cellulare dal tessuto, ma è anche in grado di mantenere l'ECM quanto più conservata possibile, in modo da ottenere matrici in grado di sopportare i carichi meccanici a cui il tessuto nativo è fisiologicamente sottoposto.

La caratterizzazione meccanica del tessuto ha lo scopo di verificare quali proprietà del tessuto vengono conservate e quali sono alterate nel tessuto decellularizzato.

La caratterizzazione meccanica avviene generalmente attraverso prove di trazione monoassiale fino a rottura, che permettono di registrare la risposta del campione alla sollecitazione meccanica in termini di tensione (σ) e deformazione (ϵ).

Con le curve ottenute è poi possibile determinare alcuni parametri quantitativi che descrivono il comportamento della matrice tra cui il modulo elastico, lo sforzo e la deformazione a rottura.

In ultimo, affinché le tecniche di ingegneria tissutale abbiano successo per la realizzazione di tessuti applicabili in campo clinico, è fondamentale che lo scaffold risulti ben tollerato dal punto di vista biologico. Il mantenimento delle proprietà biologiche ed immunologiche del tessuto viene di norma valutato attraverso esperimenti di biologia cellulare che prevedono la semina *in vitro* del biomateriale decellularizzato con cellule di diversa origine e la successiva valutazione della citotossicità, dell'adesione, della proliferazione e del differenziamento cellulare.

L'adesione cellulare, in particolare, è mediata da diverse proteine quali *fibronectina*, *collagene*, *laminina*, *vitronectina* nella matrice cellulare. L'interazione tra i recettori cellulari che inducono trasduzione di segnale e queste proteine della matrice cellulare è fondamentale per indurre l'adesione, la crescita cellulare e la rigenerazione del tessuto. Di conseguenza la preservazione di queste proteine nel tessuto decellularizzato è di norma fondamentale per il mantenimento delle proprietà biologiche del materiale.

Ulteriori esperimenti di valutazione biologica prevedono l'eventuale impianto *in vivo* in modelli animali dello scaffold.

5.3 Scaffolds arricchiti da peptidi autoassemblanti

Come anticipato, per ottenere la rigenerazione di un tessuto danneggiato, si rende necessaria la creazione di un ambiente favorevole dal punto di vista biochimico e biomeccanico, in grado di essere quanto più simile possibile alla ECM.

Uno degli approcci più interessanti per ottenere questo risultato si basa sulla funzionalizzazione degli scaffold realizzata modificando le proprietà chimiche e morfologiche del biomateriale stesso per migliorarne la biocompatibilità, l'adesione cellulare e le interazioni cellulari.

Esistono diverse tecniche per perseguire la funzionalizzazione dei tessuti; la modalità più semplice e meno costosa è sfruttare le interazioni chimico-fisiche delle biomolecole con la superficie del materiale lasciando in contatto il biomateriale con una soluzione contenente le biomolecole.

Un'altra possibilità è quella di incorporare molecole bioattive all'interno di carriers biocompatibili e biodegradabili, cosicché queste possano essere rilasciate nel sito e possano promuovere o modulare la formazione di nuovo tessuto.

In ultimo, per perseguire la funzionalizzazione, è possibile invece incorporare proteine o peptidi nel biomateriale per facilitare l'adesione cellulare alla sua superficie in virtù delle modificazioni chimico-fisiche che avvengono.

L'arricchimento di biomateriali con peptidi autoassemblanti (*SAP*) appartiene alla terza tipologia di funzionalizzazione sopra citata ed è basato sul *self-assembly*, un processo che permette alle molecole di organizzarsi in maniera ordinata sfruttando solamente interazioni intra ed inter-molecolari.

Il design di biomateriali basati sui peptidi autoassemblanti (*SAP*), in grado dunque di sfruttare questi principi, è attualmente una delle sfide più interessanti e promettenti nell'ambito della medicina rigenerativa e dell'ingegneria tissutale [28].

I peptidi autoassemblanti sono brevi sequenze, sia di derivazione sintetica che naturale, di 8-17 amminoacidi (*Figura 45*) in grado di organizzarsi in strutture ordinate a seguito della creazione di legami non covalenti, legami a ponte di idrogeno, interazioni idrofobiche oppure legami ionici. Essendo sequenze amminoacidiche piuttosto corte essi possono essere facilmente ottenuti per sintesi chimica e successivamente purificati, manipolati o modificati - anche con opportune sequenze di adesione cellulare - per soddisfare le svariate richieste applicative in termini di resistenza meccanica, supporto all'adesione cellulare e attività biologica [30].

Il *self-assembly* (*Figura 46*) è un processo legato sia alla natura dei singoli amminoacidi che al loro posizionamento nella sequenza totale. Alla luce di questo, sarà quindi possibile ottenere una determinata struttura secondaria sfruttando la sequenza della catena amminoacidica.

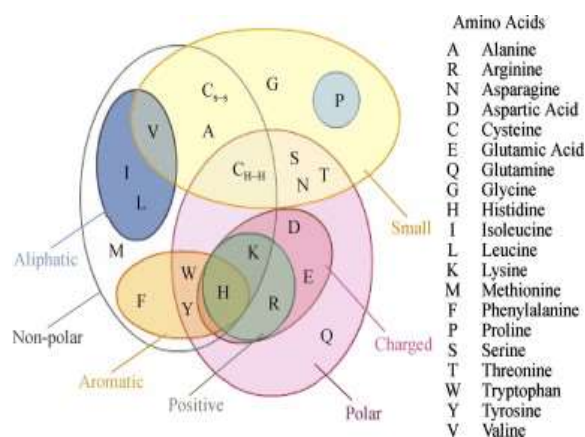


Figura 45: Raggruppamento dei 20 amminoacidi in gruppi sulla base di alcune caratteristiche come polarità e carica

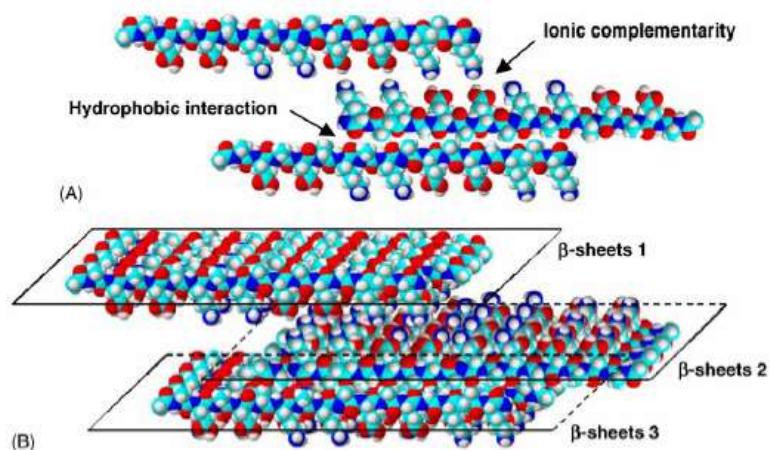


Figura 46: (A) Rappresentazione schematica del self-assembling del peptide EAK16-II attraverso interazioni idrofobiche e legami ionico-complementari. (B) In soluzione acquosa il peptide forma β -sheets che, grazie a interazioni ioniche e ad interazioni idrofobiche, assemblano dando origine a strutture tridimensionali.

Tra le molecole in grado di autoassemblare, una delle classi più interessanti, perché in grado di formare strutture 2D e 3D, è rappresentata dai peptidi ionico-complementari scoperti da Zhang et al. all'inizio degli anni '90.

La classe dei SAP può essere suddivisa in cinque tipologie principali (I, II, III, IV, V) in funzione della struttura e della finalità applicativa [57].

E' possibile distinguere quindi:

- peptidi di tipo I (o “lego molecolari”): contengono una superficie idrofila ed una idrofobica e formano β -sheets in grado di assemblarsi in strutture tridimensionali che possono essere utilizzati per la creazione di *scaffold*;
- peptidi di tipo II (o “interruttori molecolari”): modificano la loro struttura molecolare in maniera drastica in relazione a condizioni esterne (ad esempio la temperatura) e dunque la loro estrema dinamicità strutturale non garantisce un *self-assembling* ordinato come quello che manifestano i peptidi di tipo I;
- peptidi di tipo III (o “velcro-molecolari”): mostrano *self-assembling* più frequentemente sulle superfici piuttosto che tra loro, formando *monolayer* in grado di interagire a livello molecolare. Questa classe di peptidi autoassemblanti è potenzialmente impiegabile per ingegnerizzare le superfici nell'ambito della biologia e dell'ingegneria biomedica e fornisce nuove prospettive per lo studio del comportamento cellulare.
- peptidi di tipo IV: formano nanotubi o “capsule molecolari” adatte al trasporto di geni e proteine

- peptidi di tipo V: “cavità molecolari” utilizzate per la biomineralizzazione

In virtù delle proprietà sopra descritte, i peptidi più specifici per l'ingegneria tissutale sono i peptidi di tipo I.

Uno dei più noti SAP di Tipo I è il RADA16-I, che attualmente è commercializzato come PuraMatrix (Figura 47) ed è utilizzato per creare un ambiente ottimale per la coltura cellulare per studi sperimentali *in vitro* ed *in vivo* [58]. La sua composizione amminoacidica lo rende infatti molto stabile in soluzione acquosa e a 37°C anche per lunghi periodi di tempo.

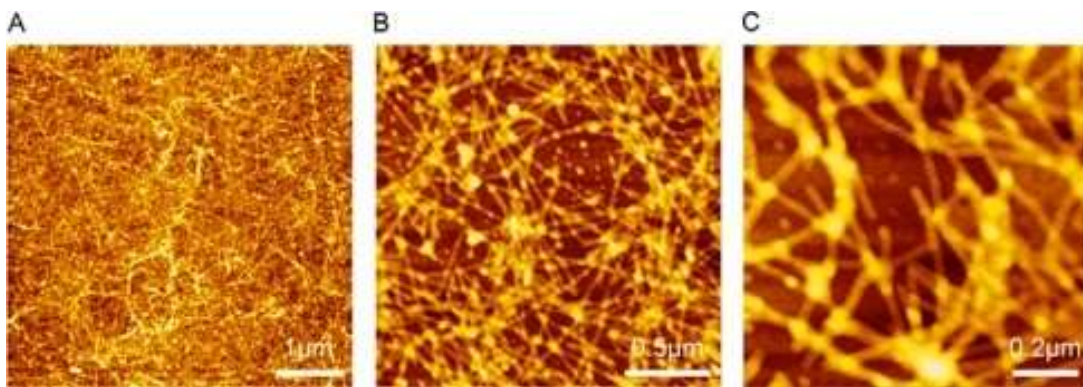


Figura 47: Immagini AFM del peptide RADA16-I (PuraMatrix) osservato a diverse scale: (A) 5x5 μm^2 ; (B) 2x2 μm^2 ; (C) 1x1 μm^2

Ciò che è possibile osservare grazie al microscopio a forza atomica (AFM) (Figura 47) è che i peptidi appartenenti a questa classe, a contatto con i sali, assumono una struttura secondaria di tipo β -sheet che grazie a interazioni ioniche, idrofobiche e di van der Waals, può assemblarsi in fibre, membrane o idrogel ad alto contenuto acquoso (>99%) in funzione della concentrazione o di altri parametri fisico-chimici.

Gli idrogel che si ottengono dal *self-assembling* sono idrofilici, non tossici, inerti, biocompatibili e caratterizzati da proprietà molto simili a quelle delle ECM in termini di microarchitettura fibrillare e di migrazione e differenziazione cellulare (Figura 48).

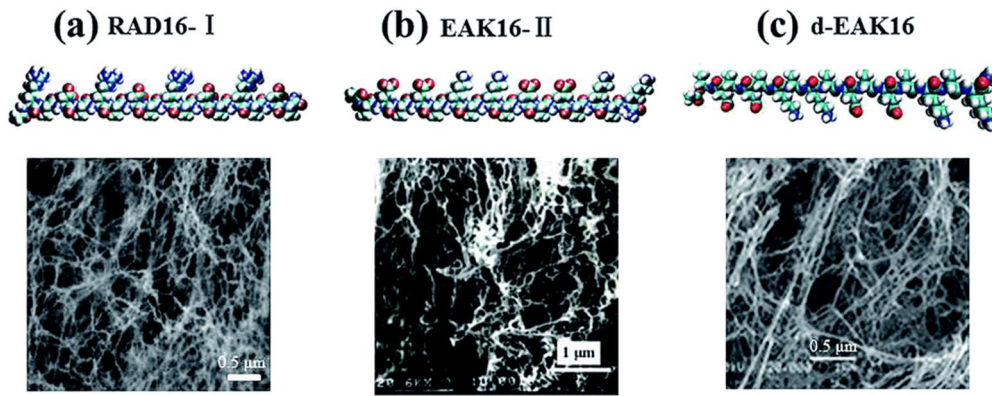


Figura 48: Esempi di peptidi autoassemblanti di diverse classi e conformazione fibrillare microscopica [59]

Un ulteriore aspetto interessante del *self-assembling* è la possibilità di agire, in fase di progetto, su alcuni parametri che influenzano direttamente la modalità di polimerizzazione del peptide a contatto con la matrice, quali ad esempio:

- a) *distribuzione della carica*: la carica può essere resa negativa, positiva oppure con disposizione irregolare; tuttavia sembra che solamente l'alternanza di carica permetta di formare macrostrutture in soluzione [60];
- b) *tipo di amminoacidi*: la sintesi peptidica può infatti avvenire *ex novo*, oppure andando a sostituire uno o più amminoacidi ad una sequenza nota. Questo si traduce non solo in una differente nanostruttura, ma anche in una differente attività cellulare di superficie (adesione, proliferazione, ..). In particolare la sostituzione dei residui di alanina con residui caratterizzati da una idrofobicità maggiore determina un incremento della tendenza al *self-assembling* e alla formazione di strutture tridimensionali;
- c) *lunghezza della catena*: è stato dimostrato che i peptidi più lunghi sono più stabili e mostrano una migliore tendenza al *self-assembling* [61];
- d) *il pH dell'ambiente in cui avviene l'aggregazione*: modificazioni della nanostruttura degli idrogel sono state osservate in funzione del pH della soluzione acquosa in cui avviene l'aggregazione, come evidenziato da Yooseong Hong et al. in [62]. In particolare, ad esempio, per valori di pH compresi tra 6.70 e 7.45 la microarchitettura del peptide ionico complementare EAK16-IV da fibrillare diventa globulare, per poi tornare progressivamente fibrillare per pH superiori a 7.5.

- e) *la purezza della sequenza*: è stato osservato che l'effetto della presenza di impurezze o di contaminazioni, anche proveniente dalla procedura di purificazione o di sintesi, può interferire con l'aggregazione;
- f) *la temperatura*: la temperatura è un agente denaturante per tutte le catene peptidiche. Per applicazioni cliniche è necessario però che la struttura secondaria della catena amminoacidica si mantenga stabile ed inalterata perlomeno per temperature paragonabili alle condizioni fisiologiche.

Zhaoyang Ye et al. in [63] hanno analizzato gli effetti della temperatura sul peptide RADA16-I constatando che il peptide in questione è in grado di mantenere l'aggregazione in β -sheets per un range di temperature comprese tra i 25 e i 70°C, mentre per temperature maggiori di 70°C la modalità di *self-assembly* si altera e il peptide forma agglomerati globulari di piccole dimensioni.

5.3.1 Proprietà cellulari e biologiche degli idrogel

Nonostante l'attenzione che viene dedicata a questa nuova tipologia di biomateriali, la letteratura scientifica è ancora carente nella valutazione della loro biocompatibilità ed immunogenicità. Gli studi sperimentali disponibili sono infatti limitati alla valutazione della crescita di cellule e tessuto in presenza degli idrogel o di altri tipi di nanostrutture ottenute dal self-assembly del peptide.

In generale gli idrogel hanno dimostrato di essere in grado di supportare l'adesione, la proliferazione e la differenziazione di diverse cellule (*Figura 49*) tra cui cellule endoteliali, osteoblasti, assoni e cellule neurali [64], epatociti e condrociti per la rigenerazione cartilaginea [65].

Cell attachment to the self-assembling peptide scaffold hydrogel	
Cell type	Cell line
Mouse fibroblast	NIH-3T3
Chicken embryo fibroblast	CEF
Chinese hamster ovary	CHO
Monkey kidney cells	Cos7
Human cervical carcinoma	HeLa
Human osteosarcoma	MG63
Human hepatocellular carcinoma	HepG2
Hamster pancreas	HIT-T15
Human embryonic kidney	HEK293
Human neuroblastoma ^a	SH-SY5Y
Rat pheochromocytoma ^a	PC12
Mouse cerebellum granule cells ^{a,b}	
Mouse and rat hippocampal cells ^{a,b}	
Rat adult neural stem cells ^{a,b}	
Rat CNS neural tissues ^{a,b}	
Rat adult liver stem cells ^b	
Rabbit cardiac myocytes ^b	
Bovine aortic endothelial cells ^b	
Bovine chondrocytes ^b (calf and adult cells)	
Human endothelial cells ^b	
Human foreskin fibroblast ^b	
Human epidermal keratinocytes ^b	

Figura 49: Tabella dei tipi cellulari che mostrano adesione agli idrogel ottenuti dal self-assembling [66]

L'applicazione biologica dei *SAP* risulta essere promettente anche perché è possibile includere alla catena polipeptidica fattori di crescita e sequenze adesive (come ad esempio la sequenza RGD) per favorire l'adesione e la proliferazione cellulare [67].

La maggior parte delle cellule, infatti, interagiscono con la ECM attraverso un meccanismo innescato dalle integrine di membrana nei confronti della sequenza RGD (*Arg-Gly-Asp*) contenuto nelle proteine fibrose della matrice.

La funzionalizzazione degli scaffold con proteine contenenti la tripletta RGD sembra dunque la strada più opportuna per favorire i processi di adesione cellulare.

Sono diversi lavori riportati in letteratura che hanno avuto come obiettivo la valutazione delle proprietà degli scaffold ottenuti da peptidi autoassemblanti ed arricchiti da opportune sequenze che favoriscano l'adesione ed il differenziamento cellulare.

Nel lavoro di Garreta et al. [68], ad esempio, è stato dimostrato che fibroblasti embrionali primari di topo coltivati in PuraMatrix sono in grado di differenziare in cellule dell'osso e che inoltre l'arricchimento del supporto con motivi funzionali come il RAD (*Arg-Ala-Asp*) incrementa il ripopolamento cellulare, l'omogeneità della distribuzione cellulare nello scaffold e anche la formazione ossea.

Nel medesimo scaffold si è inoltre dimostrato possibile incorporare diverse sequenze funzionali senza che queste alterino le proprietà di aggregazione e la formazione di nanofibre.

Un tentativo in questa direzione è stato realizzato dal gruppo di Zhang [69] che ha progettato un nuovo peptide RGDA16 includendo due unità RDG nella sequenza nota RADA16.

Lo scaffold così ottenuto è stato seminato con precursori di osteoblasti e si è dimostrato in grado di aumentare l'adesione iniziale e la proliferazione rispetto ad uno non arricchito dalle due sequenze adesive.

La sequenza RGD, tuttavia, non è stata l'unica ad essere utilizzata per accrescere il potenziale di adesione cellulare. In [70], ad esempio, sono stati impiegati anche il segnale ALK, che regola la crescita osteogenica, e il DGR, che media l'adesione dell'osteopontina, una proteina in grado di fornire, legandosi all'idrossiapatite, la struttura base dell'osso.

5.3.2 Proprietà biomeccaniche degli idrogel

Così come le proprietà biomeccaniche della ECM contribuiscono a determinare la risposta cellulare [71] fornendo un importante segnale di input ambientale, analogamente gli aspetti biomeccanici degli idrogel devono necessariamente essere presi in considerazione qualora li si voglia utilizzare in applicazioni biologiche

Come osservato da Sieminski et al. in [72], i fattori che concorrono a determinare le proprietà meccaniche (e quindi anche il comportamento cellulare in termini di differenziazione) sono senza dubbio lo spessore medio delle fibre, le proprietà meccaniche della singola fibra, il grado di reticolazione e la microstruttura (intesa come dimensione e densità della porosità). Dal punto di vista della catena amminoacidica, oltre alle interazioni molecolari, l'idrofobicità della sequenza è una caratteristica di cui tener conto dal punto di vista della formazione degli scaffold che delle relative proprietà meccaniche. L'estensione dei residui idrofobici, infatti, possono influenzare in maniera significativa non solo le proprietà meccaniche degli scaffold, ma anche la velocità del self-assembling.

Più numerosi sono i residui idrofobici nella catena amminoacidica, più risulta facile la formazione dello scaffold e questo esibisce in generale un miglioramento delle proprietà meccaniche e di gelificazione [73].

Queste osservazioni, tuttavia, non sono sufficienti per prevedere con sicurezza le proprietà meccaniche degli scaffolds ottenuti con i *SAP* perché in realtà non vi è una vera e propria correlazione diretta tra la concentrazione di peptide utilizzato, le caratteristiche di reticolazione e le proprietà meccaniche.

Ciò che dal punto di vista meccanico è possibile dire con sufficiente certezza è che l'aumento della componente idratata del tessuto, correlata alla presenza della

componente acquosa dell'idrogel, favorisce la resistenza alla compressione dello scaffold.

Dal punto di vista reologico, in generale, la concentrazione di peptide autoassemblante nelle soluzioni utilizzate per la produzione degli scaffold è così bassa da garantire una densità e una viscosità della soluzione molto simile a quella dell'acqua.

Dopo la gelificazione, all'aumentare della viscosità dell'idrogel, le proprietà reologiche continuano a mostrare una tendenza alla viscoelasticità condividendo sia il comportamento elastico con i solidi che quello viscoso con i liquidi.

Nel 1997 Leon et al. in [61] hanno valutato le proprietà meccaniche di una breve sequenza amminoacidica (EFK-8) che aggrega in β -sheets osservando al SEM (microscopio elettronico a scansione) gli effetti della gelificazione e la formazione delle nanofibre. L'osservazione al microscopio ha mostrato la formazione di un reticolo di nanofibre di diametro tra i 10 e i 30 nm, che non varia al variare della concentrazione del peptide. I filamenti formano così una matrice macroscopica piuttosto uniforme, con pori di diametro 50-200 nm, senza però mostrare un orientamento preferenziale delle fibre o un valore costante del rapporto di giunzione tra nodi. Si è dimostrato inoltre che la densità di reticolo aumenta all'aumentare della concentrazione.

La resistenza meccanica dell'idrogel, d'altra parte, è anch'essa strettamente connessa con la concentrazione del peptide in soluzione. Dall'analisi di Leon in [61] è emerso infatti che il modulo elastico delle fibre è variabile tra i 2 kPa e i 15 kPa per concentrazioni di peptide che variano dallo 0.3% all'1%.

Qualora si vogliano ottenere prestazioni meccaniche superiori, Hartgerink et al. [74] hanno dimostrato che risulta possibile aumentare il modulo elastico dell'idrogel mediante crosslinking, sfruttando, per esempio, residui di cisteina nella sequenza polipeptidica. Due gruppi -SH, posti in ambiente ossidante, infatti, possono formare un *ponte disolfuro (S-S)* (Figura 50), permettendo a due unità di cisteina poste in punti diversi della catena polipeptidica (o su due polipeptidi diversi) di legarsi tra loro, plasmando in maniera decisiva le strutture terziaria e quaternaria e portando di conseguenza alla stabilizzazione la struttura della catena.

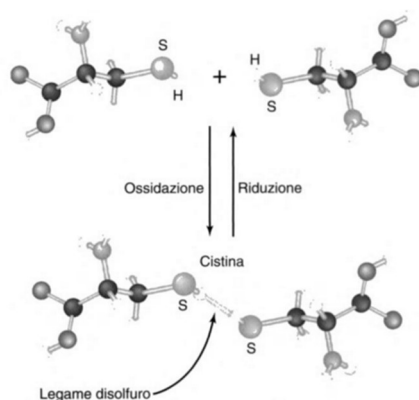


Figura 50: I gruppi sulfidrilici di due residui di cisteina vengono ossidati per formare un legame disolfuro.

5.3.3 Applicazione biomedica degli idrogel ottenuti da peptidi autoassemblanti

La letteratura scientifica riporta numerosi studi sperimentali sugli idrogel negli ultimi 15 anni, che in un'ottica di completezza vengono riportati nella tabella che segue:

Self-assembled nanostructure	Application	Reference
Hydrogel	3D scaffold to stimulate pre-osteoblast (MC3T3-E1) cell attachment and growth	(Zhang et al., 2009)
Hydrogel	Extracellular matrix to grow primary human dermal fibroblasts	(Kyle et al., 2010)
Hydrogel	Injectable delivery	(Branco et al., 2009)
Hydrogel	Therapeutic effects as a wound dressing for the treatment of deep second degree burns in rats	(Meng et al., 2009)
Hydrogel	Carrier for therapeutic proteins	(Koutsopoulos et al., 2009)
Hydrogel	Drug delivery of pyrene	(Li et al., 2009)
Hydrogel	Gene delivery	(Rea et al., 2009)
Hydrogel	Promoting axonal growth in the injured spinal cord	(Ueda et al., 2008)
Hydrogel	Cartilage tissue engineering	(Kisiday et al., 2002)
Hydrogel	Implantation of cardiac progenitor cells	(Tokunaga et al., 2010)

Figura 51: Applicazioni biomediche degli idrogel e riferimenti in letteratura scientifica.

Nella *tissue engineering*, in particolare, ciò che si osserva è che i *SAP* possono essere utilizzati da soli, generando reticoli densi di fibre che ricordano la ECM come precedentemente descritto, oppure in combinazione con biopolimeri o tessuti biologici per realizzare biomateriali che soddisfino sia i requisiti di biocompatibilità che i requisiti biomeccanici.

Questo scopo è perseguibile integrando l'idrogel nel tessuto o nel polimero, oppure sviluppando materiali ibridi attraverso la coniugazione del peptide con il polimero.

Entrambi gli approcci consentono di realizzare materiali *peptide-based* caratterizzati da proprietà cellulari e meccaniche interessanti per le applicazioni biomediche.

SCOPO DELLO STUDIO

Come discusso in precedenza, la tendenza che si sta manifestando nella sostituzione valvolare è l'utilizzo di valvole biologiche, piuttosto che dispositivi di natura meccanica.

Le bioprotesi attualmente impiegate, fissate con GA, manifestano una serie di problematiche relative alla degenerazione strutturale, alla calcificazione e alla citotossicità.

Il tentativo degli ultimi anni è quello di proporre alternative alla fissazione in glutaraldeide, decellularizzando il tessuto con agenti che non ne inficino né le proprietà biomeccaniche, né i processi cellulari coinvolti.

L'obiettivo del presente lavoro è la funzionalizzazione del tessuto pericardico bovino, utilizzato da oltre 20 anni per la realizzazione di sostituti valvolari biologici, attraverso tre diverse sequenze peptidiche autoassemblanti nell'ottica di una sua possibile applicazione per la realizzazione di scaffold biologici.

Una volta decellularizzato il pericardio bovino, secondo protocollo TRICOL, si è proceduto alla gelificazione dei peptidi auto-assemblanti sul tessuto.

Il tessuto così funzionalizzato è stato poi seminato con cellule mesenchimali provenienti dal midollo osseo umano (hBM-MSC) per verificare la citocompatibilità e la non tossicità del peptide attraverso il saggio MTS ed il saggio LDH.

Oltre ad esaminare le proprietà biomeccaniche dello scaffold, lo studio condotto si propone anche di indagarne le proprietà fisiche (spessore, area, contenuto d'acqua) e biologiche e di realizzare uno studio comparativo tra le diverse tipologie di trattamento tissutale.

VI. MATERIALI E METODI

In questo capitolo verranno descritte e discusse le metodologie utilizzate per ottenere lo scaffold di matrice acellulare arricchita con peptidi e le successive indagini per verificare l'efficacia del procedimento dal punto di vista meccanico, istologico e cellulare.

6.1 Preparazione del pericardio bovino decellularizzato

Il pericardio bovino (BP) è stato prelevato da vitelli durante la macellazione e posto in PBS (phosphate buffer saline) per il trasporto nell'apposito bio-carrier sino in laboratorio. Una volta in sede, il tessuto è stato pulito dai residui adiposi superficiali, tagliato in patch e posto in PBS in agitazione per 4 ore a +4°C prima di cominciare il processo di decellularizzazione. I campioni sono stati ottenuti dalla regione del pericardio corrispondente alla parte anteriore del ventricolo sinistro, poiché in questa zona le fibre di collagene presentano una disposizione più ordinata ed il tessuto si dimostra nel complesso più resistente [19].

Il processo di decellularizzazione utilizzato in questo lavoro sperimentale è denominato TRICOL (TRItion-X100/COLato di sodio). La procedura prevede il trattamento del campione con fasi alternate di soluzioni ipotoniche ed ipertoniche e basa l'azione decellularizzante su due detergenti, il TRITON X-100 ed il colato di sodio [56]. La procedura è stata in precedenza utilizzata nella decellularizzazione di valvole aortiche porcine ed è stata dimostrata essere in grado di rimuovere in maniera efficace la componente cellulare, i residui della membrana plasmatica xenogenici e nucleici mantenendo intatta la matrice. Inoltre la valvola porcina decellularizzata, una volta impiantata in un modello animale, ha dimostrato di essere in grado di essere ripopolata [75].

6.1.1 Decellularizzazione TRICOL

Tutte le fasi di estrazione previste dalla procedura di decellularizzazione prevedono l'impiego di soluzioni degasate contenenti sodio ascorbato 10 mM ed EDTA 5 mM.

Preliminarmente vengono preparate le seguenti soluzioni:

Phosphate buffer saline (PBS) in acqua milliQ:

137 mM NaCl;

10 mM H₂KO₄P;

2.7 mM KCl

Tampone madre A (TMA) in PBS:

100 mM Ascorbato di Na;

50 mM EDTA;

La soluzione viene portata a pH fisiologico di 7.4 e flussata con azoto ogni volta che si apre il contenitore, a causa della rapida ossidazione dell'acido ascorbico.

Inibitori di proteasi:

Gli inibitori di proteasi sono molecole in grado di inibire le proteasi cellulari rilasciate durante la decellularizzazione e preservano dunque la matrice dalla degradazione delle proteine.

Vengono preparate due soluzioni A e B.

A) 400 mM fenilmetilsulfonyl fluoride (P.M.S.F.);

1 M N- Etilmaleimide (N.E.M.)

B) 1 M benzamidina;

200 mM iodoacetammide

Gli inibitori vanno portati a volume con DMSO (dimetilsolfossido).

Soluzione fisiologica: 0.9% NaCl in acqua milliQ

Per procedere alla decellularizzazione i tessuti vengono trattati con le seguenti soluzioni:

I STEP con inibitori di proteasi: 10% TMA, 10% DMSO, 0.5% di inibitore A e 0.5% di inibitore B in acqua milliQ; 8 h sotto agitazione a + 4°C

Lavaggio con soluzione ipotonica: 10% TMA in acqua milliQ; 8 h in agitazione a + 4°C

II STEP con inibitori di proteasi: 10% TMA, 1% v/v TRITON X-100, 0.5% di inibitore A e 0.5% inibitore B in acqua milliQ; 8 h sotto agitazione a + 4°C

Lavaggio: 10% TMA, 0.1% v/v TRITON X-100 in acqua milliQ

Lavaggio con soluzione ipertonica: 10% TMA, 0.5 M NaCl, 0.1% TRITON X-100 in PBS; 8 h sotto agitazione a + 4°C.

Il lavaggio va ripetuto 2 volte.

Lavaggio: 10% TMA, 0.1% TRITON X-100 in acqua milliQ; 1.5h sotto agitazione a + 4°C

Lavaggio: 10% TMA, 0.1% TRITON X-100 in acqua milliQ; 1.5h sotto agitazione a temperatura ambiente

III STEP con aggiunta di SODIO COLATO: 10% TMA, 10 mM Sodio Colato in PBS; pH 7.4, 8 h in agitazione a temperatura ambiente.

Il lavaggio va effettuato per 2 volte

Lavaggio: PBS; 1.5 h in agitazione.

Il lavaggio va ripetuto 2 volte, la prima volta a temperatura ambiente e la seconda volta a + 4°C.

Lavaggio: soluzione fisiologica 0.9% NaCl; 30 minuti in agitazione a + 4°C

Lavaggio: soluzione fisiologica 0.9% NaCl, 10% isopropanolo; 1 h sotto agitazione a + 4°C. Il lavaggio va ripetuto 2 volte.

Digestione degli acidi nucleici

La fase finale del protocollo TRICOL prevede la digestione degli acidi nucleici mediante benzonasi, un'endonucleasi aspecifica.

I tessuti vanno posti preventivamente in equilibratura a + 4°C overnight con la soluzione in cui andrà diluita la benzonasi: Tris-HCl 50 mM e MgCl₂ 1 mM in acqua

milliQ, pH = 8. Successivamente, i campioni vengono trattati con una soluzione di benzonasi contenente 1500 unità di enzima per cm² di area da trattare in buffer di equilibratura. La soluzione viene filtrata in condizione di sterilità con un filtro (GVS, Filter Technology, USA) da 0,20 µm e i campioni vengono messi in agitazione a 37°C per 24 h.

Conservazione del tessuto

Il tessuto ottenuto dalla procedura di decellularizzazione viene dapprima posto in una soluzione 3% Pencillina-Streptomicina (PS) 3% e 1% Amfotericina B (AmB) in PBS per 24 h in agitazione a 37°C.

Al termine delle 24 h i tessuti vengono posti in 1% PS e 1% AmB in PBS e lasciati in agitazione a + 4°C.

Prima di utilizzare i campioni di tessuto per le procedure successive è necessario effettuare un lavaggio in agitazione in PBS e 1% PS per rimuovere i residui di AmB.

6.2 Peptidi utilizzati per il trattamento del pericardio

Nel presente lavoro sperimentale, il pericardio bovino decellularizzato (PBD) è stato trattato con 3 differenti peptidi autoassemblanti di tipo I dei quali in questo paragrafo viene riportata la sequenza amminoacidica, il peso molecolare e i riferimenti in letteratura sulle procedure di sintesi, purificazione e caratterizzazione.

I peptidi sono stati sintetizzati mediante il sintetizzatore automatico modello Syro I (MultisynTech, Germania) e purificati utilizzando l'evaporatore rotante (Loborota 4100-Efficien, Heidolph Instruments s.r.l, Italia) e il liofilizzatore (Lioph. Lock 4.5, Labconco, USA).

Tutte le procedure sono state svolte presso il laboratorio di Bioingegneria Chimica dell'Università di Padova sotto la supervisione della Prof.ssa Monica Dettin.

EAK16-II

Sequenza:

H-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys-NH₂

PM: 1614.83 Da

Nella conformazione β -sheet, le catene laterali dei residui amminoacidici idrofobici (alanina, Ala) vengono a posizionarsi da un lato del piano, mentre la catena di residui idrofilici (acido glutammico, Glu e lisina, Lys) sul lato opposto, generando così uno strato di catene legate da ponti a idrogeno dotato di una faccia idrofilica ed una faccia idrofobica.

Grazie alle interazioni di carattere ionico ed idrofobico, i piani di β -sheet si accatano come in un mazzo di carte, generando strutture tridimensionali come quella rappresentata in *Figura 52*.

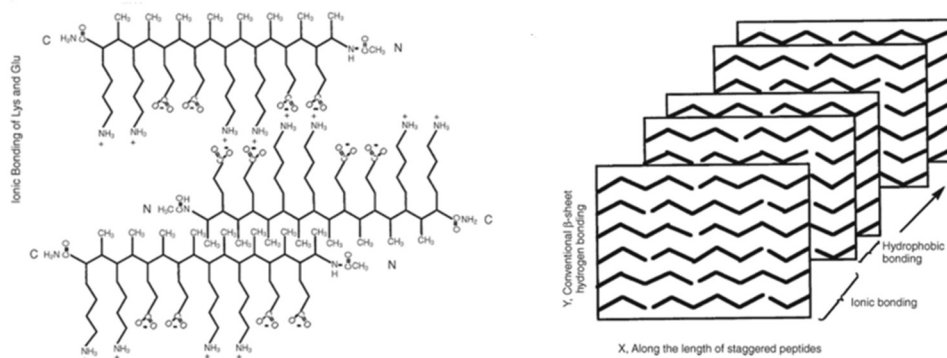


Figura 52: Self-assembly del peptide EAK. Formazione di strutture tridimensionali grazie alla formazione di legami idrofobici e ionici tra i β sheets. [76]

La sintesi, purificazione e caratterizzazione di questa sequenza è avvenuta secondo la procedura descritta in [77].

EAbuK

Sequenza:

H-Abu-Glu-Abu-Glu-Abu-Lys-Abu-Lys-Abu-Glu-Abu-Glu-Abu-Lys-Abu-Lys-NH₂

PM: 1727.05 Da

Questa sequenza amminoacidica presenta la sostituzione dell'alanina (amminoacido idrofobico) con l'acido 2-amminobutirrico, anch'esso idrofobico ma di origine non naturale.

La sostituzione non altera il *pattern* tipico dei peptidi autoassemblanti - in quanto rimane immutata l'alternanza di residui polari ed apolari e la periodicità dei residui

carichi - ma permette di valutare l'abilità dei diversi residui amminoacidici di indurre la formazione dei β -sheets e delle strutture tridimensionali

La sintesi, purificazione e caratterizzazione di questa sequenza è avvenuta secondo la procedura descritta in [77].

EAK-CYS

Sequenza:

H-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys-Cys-NH₂

PM: 1717.94 Da

Il peptide EAK-CYS presenta la stessa sequenza di 16 amminoacidi del peptide EAK, ma è stato arricchito in coda con un residuo di cisteina (CYS).

La sintesi, caratterizzazione e purificazione di questa sequenza è avvenuta secondo la procedura descritta in [78].

6.3 Ottenimento dei campioni per i test sperimentali

Per ridurre la variabilità inter-animale si è scelto di prelevare dal medesimo pericardio tutti i campioni da sottoporre alle analisi biomeccaniche, biologiche e fisiche.

6.3.1 Campioni per i test biomeccanici

Con un punch rettangolare di dimensione 2.5×0.3 cm² sono stati preparati 25 campioni di PBD orientati in direzione circonferenziale. I campioni sono stati suddivisi in 5 gruppi come di seguito:

- 5 campioni di PBD trattati con peptide EAK (indicato da qui in poi con la dicitura EAK);
- 5 campioni di PBD trattati con peptide EAbuK (indicato da qui in poi con la dicitura EAbuK);
- 5 campioni di PBD trattati con peptide EAK-CYS (indicato da qui in poi con la dicitura EAK-CYS);
- 5 campioni di PBD trattati con glutaraldeide 0.6% (indicato da qui in poi con la dicitura GA);
- 5 campioni di PBD (indicato da qui in poi con la dicitura TRICOL)

Il trattamento con GA è stato effettuato sui campioni con GA 0.6% in PBS in agitazione a temperatura ambiente al buio, per 1 ora. Successivamente, per eliminare le aldeide libere che non hanno formato cross-link con il tessuto e che potrebbero interferire con il comportamento cellulare durante la semina, sono stati effettuati 2 lavaggi da 1 ora ciascuno con Glicina 0.1 M a temperatura ambiente in agitazione. Un terzo lavaggio in Glicina 0.1 M è stato lasciato in agitazione overnight a temperatura ambiente.

6.3.2 Campioni per i test biologici

Per i test biologici dal tessuto decellularizzato sono stati tagliati campioni circolari di area 0.32 cm² tramite l'utilizzo di un punch per biopsie.

I campioni sono stati suddivisi come segue:

- 15 campioni EAK;
- 15 campioni EAbuK;
- 15 campioni EAK-CYS;
- 15 campioni GA;
- 15 campioni TRICOL

6.3.3 Campioni per le analisi delle proprietà fisiche

Le proprietà fisiche del PBD e trattato con SAP considerate in questo lavoro sono l'area, lo spessore ed il contenuto d'acqua.

Per l'indagine delle proprietà di area e spessore si sono utilizzati i campioni preparati per i test biomeccanici e descritti in precedenza, mentre per le indagini riguardanti il contenuto d'acqua sono stati ottenuti i campioni circolari di area 0.32 cm² elencati in seguito (*Figura 53*):

- 3 campioni EAK;
- 3 campioni EAbuK;
- 3 campioni EAK-CYS;
- 3 campioni TRICOL

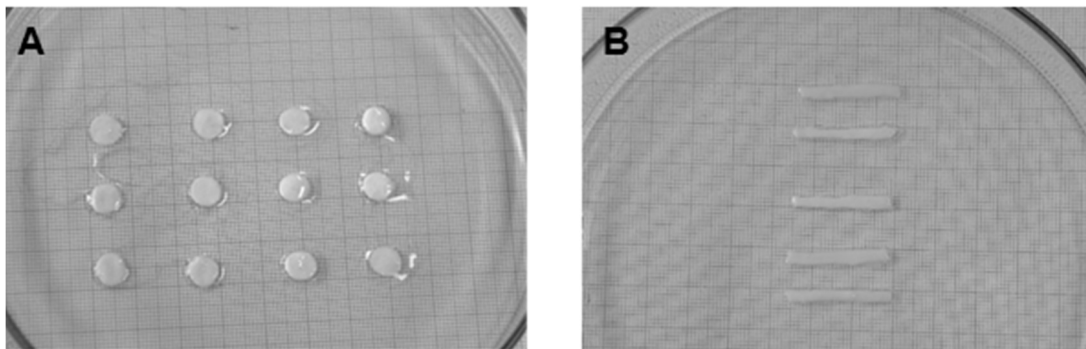


Figura 53: A) I dischetti di tessuto pericardico per la misura del contenuto d'acqua sono disposti su una Petri. Si osservano campioni in triplicato per ciascuna condizione da testare. B) I campioni di PBD vengono posti su un Petri per la misurazione di spessore ed area.

6.3.4 Trattamento dei campioni con EAK, EAbuK e EAK-CYS

I SAP utilizzati in questo lavoro di tesi gelificano in presenza di cationi monovalenti; per questo motivo prima di sottoporre i campioni alla gelificazione, questi sono lavati con acqua milliQ filtrata e 1% PS overnight per eliminare i sali presenti nel PBS che potrebbero far assemblare il peptide sulla superficie del tessuto impedendone la penetrazione all'interno.

La procedura di trattamento dei campioni di PBD con i SAP EAK, EAbuK e EAK-CYS prevede tre fasi distinte:

1. trattamento dei campioni con peptide 0.15% in una soluzione senza sali per 24 h a 37°C;
2. gelificazione del peptide tramite trattamento con una soluzione contenente sali (PBS o terreno per colture cellulari);
3. reticolazione dell'idrogel di EAK-CYS tramite ossidazione con DMSO.

In questa fase si è favorita la formazione di ponti disolfuro covalenti e *crosslink* tra i residui di gruppi sulfidrilici (-SH) dei residui di cisteina (Cys) presenti nella catena amminoacidica o in catene vicine. La stabilizzazione della struttura così condotta può risultare rilevante ai fini dei test biomeccanici successivi, come osservato in [74].

La procedura sperimentale è descritta di seguito nel dettaglio.

Le soluzioni utilizzate sono state filtrate con filtri con pori di diametro 0.22 μm (Millex-GV, Merck Millipore) e l'esperimento si è svolto in condizioni di sterilità tramite l'ausilio di una cappa biologica a flusso laminare.

Studi precedenti [79, 80] hanno osservato che per i peptidi utilizzati in questo studio, una concentrazione di peptide pari a 0.15% permette di ottenere la formazione di fibre e globuli già dopo un'ora di incubazione e che il reticolo aumenta fino a ricoprire quasi interamente la superficie del substrato a 3 giorni di incubazione. I risultati di semina cellulare dei test condotti in [79], inoltre, hanno verificato che lo scaffold con una concentrazione di peptide 0.15% favorisce l'adesione e la proliferazione cellulare a $t = 24$ ore, fino ad un valore quasi triplicato a 2 settimane. A partire da queste evidenze è stata ottenuta quindi una soluzione a concentrazione 0.15% w/v di peptide disciogliendo 1 mg di peptide in 600 μl di una soluzione 5:1 acqua milliQ/glucosio 8% con cui i campioni sono stati trattati per 24 ore a 37°C in blanda agitazione per favorire la penetrazione del peptide nel tessuto.

Il rapporto fra volume di soluzione e area del tessuto da trattare è di 375:1 (ad esempio: 120 μl di soluzione per campioni circolari di area 0.32 cm^2).

Gelificazione

Al termine delle 24 ore è stata rimossa la soluzione non penetrata. La gelificazione dei SAP è stata ottenuta tramite trattamento con il terreno per colture cellulari in seguito impiegato negli esperimenti di tipo biologico. Il terreno/medium (M) utilizzato è composto da 1% PS, 1% L-glutammina e 10% FBS (Fetal Bovine Serum) in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium). I campioni immersi in terreno sono stati sottoposti ad agitazione a 37°C per 30 minuti.

Lavaggi statici in PBS

Il terreno M è stato in seguito rimosso e i campioni hanno subito due lavaggi con PBS per eliminare eventuali tracce di peptide non gelificato. I campioni immersi in PBS sono state mantenuti in condizioni statiche a temperatura ambiente, per una durata complessiva di 2 ore.

Reticolazione

Successivamente ai lavaggi statici in PBS, per il peptide EAK-CYS si è proceduto alla reticolazione tramite trattamento con una soluzione al 20% DMSO in PBS per 3 h a temperatura ambiente e in condizioni statiche. Prima di procedere alla semina delle cellule è stato effettuato un lavaggio con PBS e 1% PS overnight per rimuovere il DMSO.

6.4 Test biomeccanici

6.4.1 Il sistema Bose ElectroForce® per la caratterizzazione meccanica del tessuto

Il sistema *Bose ElectroForce planar biaxial TestBench test instrument* è stato sviluppato dalla Bose Corporation (Eden Prairie, Minnesota, USA) per la caratterizzazione biomeccanica e la definizione di modelli costitutivi di materiali ed in particolare di biomateriali e tessuti utilizzati per applicazioni biomediche e chirurgiche.

L'hardware, affiancato dal sistema di controllo *WinTest*, è costituito da un banco di prova metallico, forato, su cui poggiano quattro attuatori lineari (due da 200 N e due da 400 N) con escursione massima di 6.25 mm ciascuno.

La presenza di quattro attuatori consente di effettuare sia prove monoassiali, che prove biassiali configurandoli a piacere e fissandoli con delle viti sulla superficie del banco di prova.

Anche le celle di carico in dotazione possono essere montate in vario modo ed i campioni per i test di trazione possono essere ancorati ai motori sfruttando le apposite *grips*.

Sia le celle che i motori fungono da sensori per rilevare rispettivamente le forze che si sviluppano durante la prova e i relativi spostamenti e sono controllabili via software durante la prova.

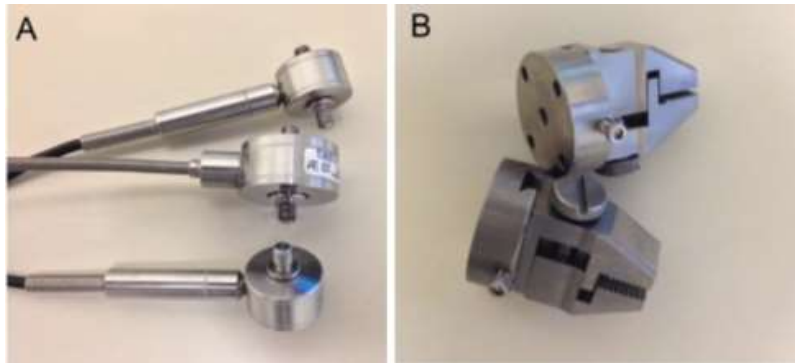


Figura 54: Componenti del sistema Bose planar biaxial TestBench: A) celle di carico; B) grips

6.4.2 Il sistema Win Test

Il sistema di controllo *WinTest* permette di interfacciare attuatori e celle di carico con il PC ed include un software e un controllore PCI elettronico, permettendo di acquisire in sincrono dati da più canali e di generare le forme d'onda desiderate da far eseguire ai motori. [81]

Il software è installato su un PC con SO Windows 7 ed è dotato di interfaccia utente che semplifica le operazioni e implementa funzionalità avanzate.

All'avvio del programma, l'interfaccia *WinTest* consente di impostare i parametri relativi alla prova e le istruzioni da impartire agli attuatori, eventualmente salvando le specifiche in un file che viene poi recuperato per qualsiasi esperimento successivo dello stesso tipo.



Figura 55: Interfaccia del software WinTest

Durante la prova, la finestra grafica di *WinTest* riporta in tempo reale gli andamenti delle grandezze misurate in funzione del tempo.

6.4.3 Configurazione del sistema per le prove di trazione UTS

Le prove di interesse per il lavoro sperimentale sono prove realizzate con configurazione monoassiale dei due attuatori contrapposti in modo da raddoppiare lo spostamento massimo totale.

Il campione da testare viene posizionato tra le due *grips* e bloccato grazie all'utilizzo di 4 quadratini di balsa che formano un "sandwich" con il tessuto, aumentando l'attrito tra *grips* e campione ed evitando scivolamenti o lacerazioni del campione a contatto con le *grips*.

In questo tipo di prove, viene misurata mediante la cella di carico, la forza che si sviluppa in seguito allo spostamento che viene imposto sul campione.

Il tipo di prova scelta per la caratterizzazione del comportamento meccanico dei campioni di pericardio è una prova di trazione sino a rottura senza preconditionamento.

La lunghezza iniziale del campione, pari alla distanza tra le *grips*, è di 5 mm. Successivamente il campione viene elongato ad una velocità costante di 0.5 mm/s, imponendo uno spostamento di 5 mm a ciascuno dei due attuatori.

6.4.4 Elaborazione dei dati acquisiti durante la prova

A prova conclusa, i file *.csv* che vengono salvati riportano i parametri relativi alla prova, con le opportune unità di misura, in termini di tempo t (sec), spostamento degli attuatori d (mm) e sollecitazione registrata dalla cella di carico F (N).

I dati vengono elaborati in *Matlab* per ricostruire l'andamento della curva tenso-deformativa e calcolarne poi alcuni parametri significativi.

In particolare, per ogni prova vengono acquisiti 2000 punti.

Tensione (σ)

Per ricavare i valori dello *stress*, espressi in *Pa*, si è proceduto a dividere i valori registrati dalla cella di carico per l'area della sezione resistente del provino, misurata come il prodotto tra la larghezza l_a e lo spessore medio s di ogni gruppo di campioni

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad \left[\frac{N}{m^2} \right]$$

dove $A = l_a \cdot s$.

Deformazione (ϵ)

I valori adimensionali della deformazione ϵ , sono invece calcolati conoscendo la lunghezza iniziale del campione l_0 e la sua lunghezza l_f finale sfruttando la formula:

$$\epsilon = \frac{l_f - l_0}{l_0} \quad [adim]$$

dove $l_f = l_0 + d$.

UTS e failure strain

Per ogni prova sono stati inoltre ottenuti l'*Ultimate tensile strength* (UTS), ovvero il valore di tensione corrispondente alla rottura del campione (individuabile come il massimo valore di tensione raggiunto durante la prova) e il corrispondente dato deformativo (*failure strain*).

Modulo elastico

Uno dei parametri che meglio caratterizzano il comportamento di un materiale è il cosiddetto modulo di Young, definito dal rapporto

$$E = \frac{\sigma}{\epsilon} \quad \left[\frac{N}{m^2} \right]$$

dove σ rappresenta lo sforzo, misurato in Pascal (Pa) e ϵ rappresenta la deformazione (adimensionale).

Per ciascuna curva di carico elaborata, attraverso ispezione visiva si sono individuate due zone di linearità nella porzione di salita.

Le pendenze delle due regioni, determinate attraverso gli stimatori lineari ai minimi quadrati, sono state considerate rappresentative dei moduli elastici E_1 ed E_2 del campione durante la prova.

6.5 Analisi statistiche dei risultati ottenuti

I dati ottenuti nel corso della tesi sono stati tutti elaborati, per i calcoli più semplici, attraverso Microsoft Excel 2013.

La validazione statistica più approfondita dei risultati ottenuti è stata invece condotta sfruttando in particolar modo il T-test e la statistica ANOVA a una e due vie implementati nel software GraphPad Prism 5.

6.6 Caratterizzazione biologica

La caratterizzazione biologica del tessuto pericardico arricchito dai SAP è stata effettuata tramite la semina di cellule mesenchimali umane da midollo osseo (hBM- MSC) e la successiva valutazione della eventuale citotossicità del biomateriale e della capacità di supportare l'adesione e proliferazione cellulare. Il PBD arricchito con SAP è stato confrontato con PBD non trattato con SAP e PBD trattato con GA.

6.6.1 Le hBM- MSC

Le cellule staminali mesenchimali utilizzate in questo studio sono state isolate dal midollo osseo di soggetti sani secondo una metodologia di proprietà della ditta produttrice (Promocell, Heidelberg, Germania). Queste cellule, dette anche mesenchimali stromali, hanno capacità di multi-potenza e auto-rinnovamento. Le hBM- MSC sono state mantenute in coltura in condizioni di sub-confluenza a 37°C, 5% CO₂ in atmosfera umidificata in fiasche per coltura cellulare (Falcon, Corning, New York, USA) in terreno standard (M: DMEM addizionato con 10% siero fetale bovino, 1% PS e 1% L-Glutammina, tutto Sigma-Aldrich).

6.6.2 Semina

Il giorno precedente la semina, i campioni circolari di tessuto nelle condizioni sperimentali da testare (6.3) sono stati posti in piastra da 96 pozzetti (di area 0.32 cm²) in PBS. Le cellule hBM- MSCs a passaggio 5 (*p5*) sono state seminate (*Figura 56 e Figura 57*) in 100 µL di terreno DMEM 10% FBS ad una densità di 15000 cellule/cm². Tre ore dopo la semina sono stati aggiunti 100 µL di terreno ottenendo un volume totale di mezzo di coltura pari a 200 µL per campione. Per verificare la biocompatibilità e la non citotossicità dei biomateriali trattati con SAP, a t = 6, 24, 48, 72 ore dalla semina si

è proceduto alle analisi biomolecolari MTS e LDH ed alle analisi istologiche volte a valutare il ripopolamento cellulare.

6.6.3 Saggio di proliferazione cellulare

Il saggio MTS (3-(4,5-dimetiltiazolo-2-il)-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-solfofenil)-2H-tetrazolio) è un saggio colorimetrico utilizzato per determinare la proliferazione cellulare basata sulla riduzione del MTS tetrazolium in formazano ad opera delle deidrogenasi, presenti nelle cellule metabolicamente attive.

Il formazano è solubile nel mezzo di coltura e può essere quantificato misurando l'assorbanza a 490-500 nm attraverso uno spettrofotometro o un lettore di piastre.

Per ciascun timepoint dell'esperimento, fatta eccezione $t=0$, la piastra è stata così composta (*Figura 56*):

- 3 campioni EAK;
- 3 campioni EAbuK;
- 3 campioni EAK-CYS;
- 3 campioni TRICOL;
- 3 campioni GA (controllo di citotossicità);
- 3 pozzetti in cui le cellule sono state seminate direttamente sul polistirene della piastra (controllo positivo, CB);
- 3 pozzetti in cui le cellule sono state seminate direttamente sul polistirene della piastra, trattati con 50% DMSO, il quale a questa concentrazione induce morte cellulare (controllo negativo, C-);
- 3 pozzetti in cui viene posto solo il medium (M)

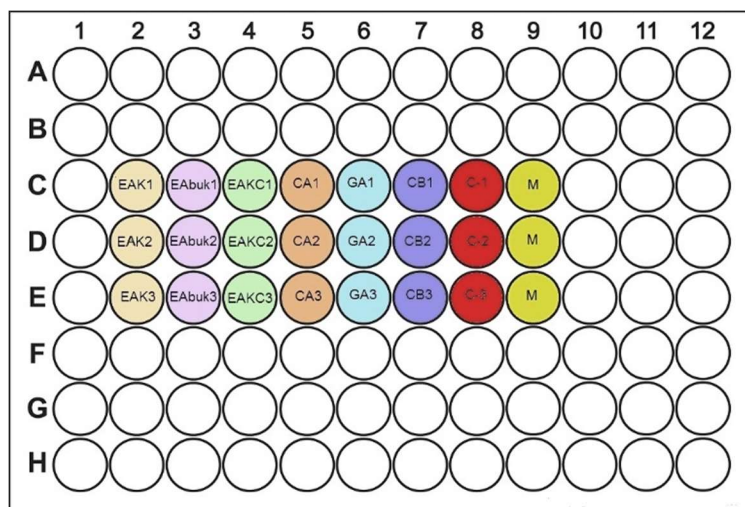


Figura 56: Schema delle condizioni della piastra da 96 pozzetti messa a punto per il saggio MTS.

Ad ogni timepoint, 100 μ L di terreno esausto vengono sostituiti con 100 μ L di terreno fresco e 20 μ L di reagente CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, USA). La piastra viene posta in incubatore (37°C e 5% CO₂) per 3h per permettere l'accumulo del formazano. Al termine delle 3h, 100 μ L di reazione presenti in ogni pozzetto vengono trasferiti in una piastra da 96 pozzetti con fondo ottico (Nunc® MicroWell™ 96 well polystyrene plates, Sigma-Aldrich) per effettuare la lettura. La lettura dell'assorbanza viene realizzata a 490 nm con il lettore di piastre FLUOstar Optima Microplate Reader (BMG Labtech, Germany), effettuando due cicli consecutivi di lettura e mediando i valori ottenuti dalle due letture per ciascun pozzetto.

L'assorbanza rilevata è correlata al numero di cellule vitali presenti sul tessuto al timepoint considerato e ci permette di determinare la proliferazione cellulare.

6.6.4 Valutazione della citotossicità

La valutazione della citotossicità dei biomateriali composti da PBD e trattati con SAP è stata realizzata attraverso la valutazione dell'attività della lattato deidrogenasi (test LDH). La lattato deidrogenasi è un enzima cellulare che, a seguito della rottura della membrana plasmatica dovuta a danni cellulari, viene rilasciato nel liquido interstiziale o nel circolo ematico o nel mezzo di coltura (per cellule coltivate in vitro). Tramite il saggio colorimetrico LDH, l'enzima rilasciato viene quantificato tramite la reazione di conversione del lattato in piruvato attraverso la riduzione del NAD⁺ in NADH ad opera

della LDH. Il NADH prodotto dalla reazione viene in seguito utilizzato dall'enzima diaforasi per ridurre il tetrazolo in formazano, che può essere quantificato attraverso uno spettrofotometro a 450 nm. La quantità di formazano prodotta è direttamente proporzionale all'LDH rilasciato nel mezzo che, per quanto detto, è indicativo della danno subito dalle cellule a contatto col biomateriale.

In questo lavoro sperimentale, per realizzare il test LDH è stata utilizzata una piastra così composta (*Figura 57*):

- 3 campioni EAK;
- 3 campioni EAbuK;
- 3 campioni EAK-CYS;
- 3 campioni PBD;
- 3 campioni GA;
- 3 campioni CB;
- 3 pozzetti di controllo con il medium (M)

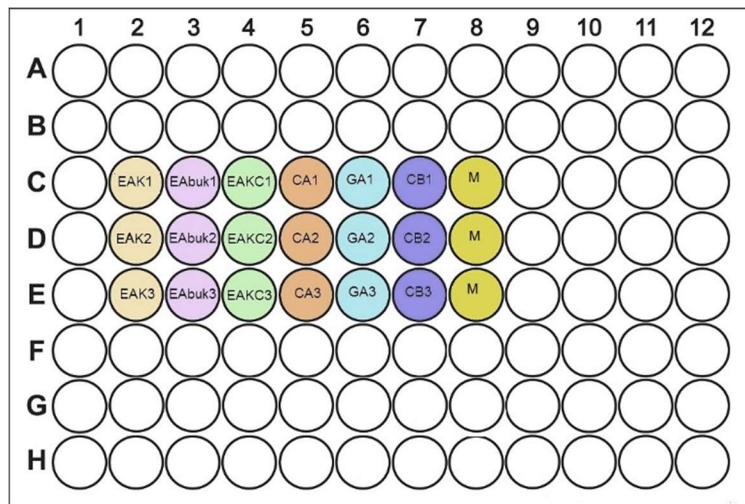


Figura 57: Schema delle condizioni della piastra da 96 pozzetti messa a punto per il saggio LDH.

Ad ogni timepoint (0, 6, 24, 48, 72 h) sono stati aspirati 15 µL di surnatante da ogni campione e sono stati aggiunti 15 µL di medium fresco per mantenere il volume del medium costante durante l'esperimento. Il campione prelevato è stato trasferito in

provette da 0,5 ml e conservato a -80°C fino al completamento della raccolta dei campioni. Il saggio LDH è stato effettuato seguendo il protocollo indicato nel kit *Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit* (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA).

Ad ogni campione ed agli standard NADH è stato aggiunto una *Master Reaction Mix* (MRM), che fornisce i reagenti e cofattori necessari per l'attività dell'enzima LDH, ovvero la riduzione del NAD⁺ in NADH, e per la conversione del tetrazolo in formazano. Per la quantificazione del NADH prodotto dalla LDH sono state eseguite letture di assorbanza a tempi stabiliti (ogni 5 minuti), ricostruendo l'attività dell'LDH nel tempo e ottenendo una curva rappresentativa della cinetica enzimatica. Le letture sono state effettuate a 3, 8, 13 e 18 minuti dopo l'aggiunta della MRM al campione.

I valori dell'attività di LDH di ciascun campione vengono così determinati attraverso la formula:

$$\text{attività dell'LDH} = \frac{B \cdot S_{df}}{(T_r) \cdot V} \quad [\text{millunità/mL}]$$

dove B esprime la quantità di NADH ($nmol$) prodotta dalla reazione e quantificata dal saggio colorimetrico tramite interpolazione con una curva di calibrazione basata su concentrazioni crescenti (0 – 12.5 nmoli) di NADH; T_r è il tempo di reazione che intercorre tra la prima lettura $T_{iniziale}$ e l'ultima T_{finale} ($minuti$); V è il volume del campione (mL) e S_{df} è il fattore di diluizione del campione.

I parametri utilizzati per il calcolo dell'attività dell'LDH durante l'esperimento sono:

- $V = 0.01$ ml;
- $S_{df} = 1$ (corrispondente al campione non diluito);
- $T_{iniziale} = 3$ minuti;
- $T_{finale} = 13$ minuti

Il T_{finale} è stato scelto come il tempo corrispondente all'ultima lettura in cui i valori di assorbanza rilevati siano ancora all'interno del range espresso dalla curva standard.

La correzione dell'errore legato allo strumento o alla variabilità del fondo in polistirene della piastra è stata realizzata sottraendo ai corrispondenti valori di assorbanza ottenuti durante la lettura dei campioni la media di tre letture differenti di tre piastre vuote.

6.7 Analisi istologiche

Per analizzare il comportamento delle hBM-MSC seminate su tessuto trattato con SAP si è proceduto all'analisi istologica mediante la colorazione Ematossilina-Eosina di criosezioni dei biomateriali dopo 72 h di semina.

Data la peculiarità del tessuto pericardico arricchito con idrogel, si è reso necessario procedere alla messa a punto di un protocollo di congelamento dei campioni di PBD trattati con SAP e seminati con cellule mesenchimali umane. Data l'esigua disponibilità di peptidi purificati utilizzati per le altre procedure presentate in questo lavoro, le prove di congelamento preliminari sono state realizzate con un peptide auto-assemblante di tipo I non purificato, anch'esso fornito dal Laboratorio di Bioingegneria Chimica dell'Università di Padova (DAbuK).

6.7.1 Ottimizzazione del protocollo di congelamento

Dal PBD sono stati ottenuti 5 campioni di tessuto sottoposti al processo di gelificazione (PBD-P) e 5 campioni di tessuto decellularizzato non trattati (PBD-NP).

Tutti i 10 campioni sono stati fissati con PFA (Paraformaldeide) 4% per 1 ora al buio a temperatura ambiente. Al termine della fissazione, i campioni sono stati trasferiti in una soluzione a diverse concentrazioni (20%, 30%, 40%, 50% e 60%) di saccarosio in PBS overnight a + 4°C. Si è poi proceduto al congelamento, al sezionamento e alla colorazione istologica Ematossilina/Eosina (descritti nei paragrafi seguenti) per determinare la concentrazione di saccarosio ottimale per il mantenimento della struttura tridimensionale del tessuto trattato con SAP.

In particolare sono stati testate le seguenti procedure di crioprotezione:

- una coppia di campioni (PBD-P1 e PBD-NP1) trattati con saccarosio 20%
- una coppia di campioni (PBD-P2 e PBD-NP2) trattati con saccarosio 30%
- una coppia di campioni (PBD-P3 e PBD-NP3) trattati con saccarosio 40%
- una coppia di campioni (PBD-P4 e PBD-NP4) trattati con saccarosio 50%
- una coppia di campioni (PBD-P5 e PBD-NP5) trattati con saccarosio 60%

Dall'analisi istologica è emerso come ottimale il trattamento con saccarosio 60% (paragrafo 7.2.3.2) che è stato in seguito impiegato per il congelamento di tutti i campioni esaminati.

6.7.2 Inclusione

Per il congelamento ciascun campione è stato posizionato in un embedding device (Bio-Optica, Milano, Italia), immerso in O.C.T Compound (Optimal Cutting Temperature, Tissue-Tek, Sakura Finetek, Netherlands) e congelato in isopentano ai fumi d'azoto.

Dopo l'inclusione i campioni sono stati conservati a -80°C fino alle successive procedure di sezionamento e analisi istologica.

6.7.3 Sezionamento

I campioni crioconservati sono stati sezionati ad uno spessore di 5 µm per le analisi istologiche utilizzando il criostato Leica CM1850 UV (Leica, Wetzlar, Germany) settato a -30°C.

6.7.4 Colorazioni istologiche

Per l'osservazione al microscopio ottico, le sezioni sono state sottoposte alla colorazione istologica Ematossilina/Eosina (H&E) (Bio-Optica, Milano, Italia).

La colorazione permette di osservare le componenti fibrose della matrice extracellulare in rosa ed i nuclei e i componenti acidi del citoplasma in viola.

Per la colorazione è stato seguito il protocollo standard contenuto nei kit.

6.7.5 Acquisizione ed elaborazione delle immagini

Le immagini istologiche sono state acquisite con microscopio ottico Olympus BX51.

6.8 Analisi delle proprietà fisiche

L'analisi delle proprietà fisiche dei campioni dopo la gelificazione dei SAP ha l'obiettivo di valutare eventuali modificazioni in termini di area, spessore e contenuto d'acqua indotte dalla penetrazione dell'idrogel nella matrice.

6.8.1 Misurazione dell'area dei campioni

I campioni di PBD preparati per le prove meccaniche come in 6.3.1 sono stati distesi su una Petri, sopra ad un foglio di carta millimetrata e fotografati con la macchina fotografica *Canon EOS50D* con macro-obiettivo *Canon EF 100 mm*, mantenendosi in posizione quanto più parallela al piano possibile.

Le immagini acquisite sono state poi esportate e valutate attraverso il software MacBiophotonics ImageJ 1.150b per tracciare i contorni dei campioni e misurarne l'area, avendo come riferimento il *cm* della carta millimetrata sotto la Petri.

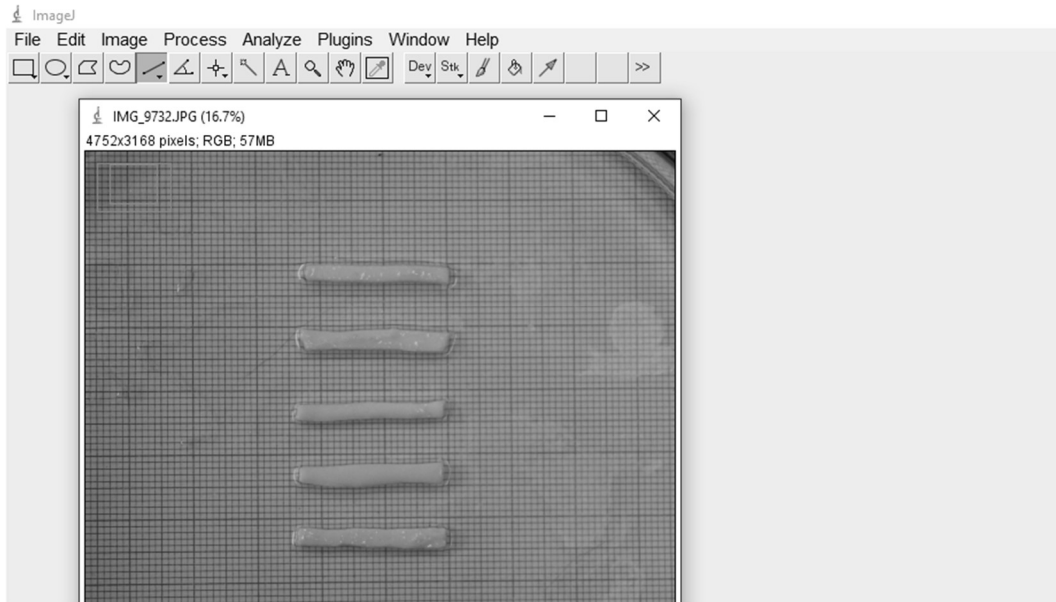


Figura 58: Interfaccia del software ImageJ utilizzato per misurare l'area dei campioni.

Assumendo l'area del campione TRICOL come riferimento (100%) è stata inoltre espressa la variazione percentuale di area tra gruppi di campioni trattati con peptidi.

6.8.2 Misurazione dello spessore dei campioni

Lo spessore dei campioni di PBD preparati per i test biomeccanici secondo la procedura in 6.3.3 è stato rilevato mediante l'utilizzo del micrometro Mitutoyo 547-401 Absolute Digimatic Thickness Gauge (HRoberts & Sons, Liverpool, UK), registrando il valore che appare sul display 10 secondi dopo il posizionamento del campione.

Lo spessore di ogni campione è stato misurato in 3 punti distinti sulla superficie, corrispondenti alle due estremità e ad un punto nella regione centrale.



Figura 59: Spessimetro digitale Mitutoyo 547-401 Absolute Digimatic Thickness Gauge utilizzato per la misurazione dello spessore dei campioni.

6.8.3 Misurazione del contenuto d'acqua dei campioni

Ciascun dischetto di PBD ottenuto per le analisi fisiche secondo quanto riportato in 6.3.3 è stato asciugato con carta Whatman, posizionato su una Petri di vetro usata come tara e pesato sulla bilancia analitica Sartorius.

Dopo 2 minuti dal posizionamento del campione ne è stato registrato il *peso idratato* (*WW*). I dischetti sono stati poi suddivisi in singole eppendorf e lasciati dapprima a -20°C per 3 ore e poi a -80°C. I campioni sono stati in seguito liofilizzati (Modulyo Freeze Dryer, Edwards) e pesati secondo quanto descritto in precedenza, ottenendo così il *peso secco* (*DW*).

Il contenuto d'acqua è stato determinato come:

$$\text{contenuto d'acqua (\%)} = 100 - (DW / WW) 100$$

VII.RISULTATI E DISCUSSIONE

7.1 Test biomeccanici

Nel seguito si riportano i risultati relativi alle prove meccaniche di trazione eseguite sui campioni preparati secondo quanto descritto in 6.3.1.

7.1.1 Curve di carico

Nel seguente paragrafo vengono riportate le curve tenso-deformative ottenute dagli esperimenti condotti sui campioni di PBD.

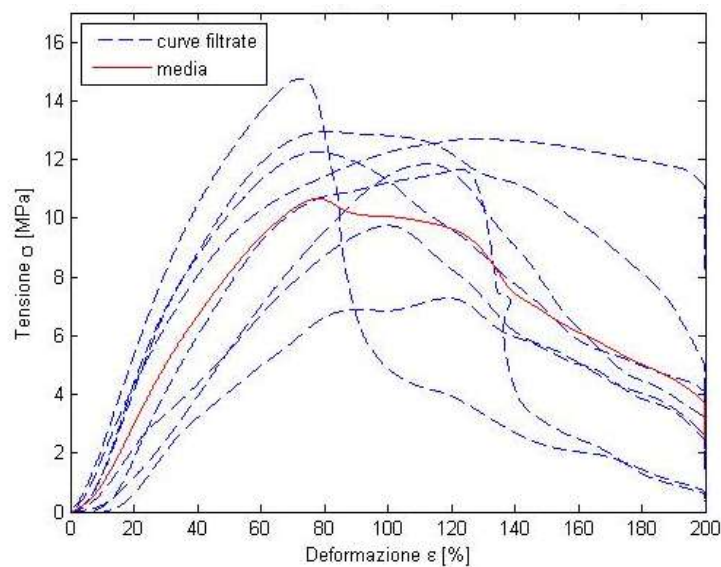


Figura 60: Curve tenso-deformative per i campioni TRICOL

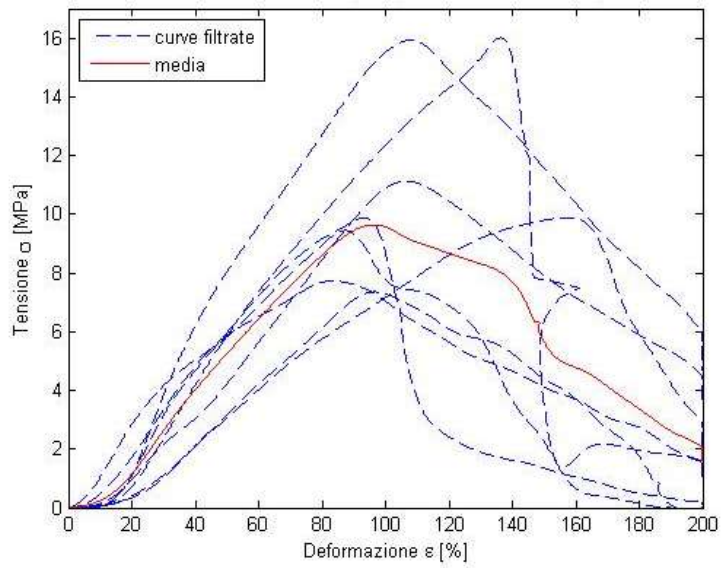


Figura 61: Curve tenso-deformative per i campioni GA

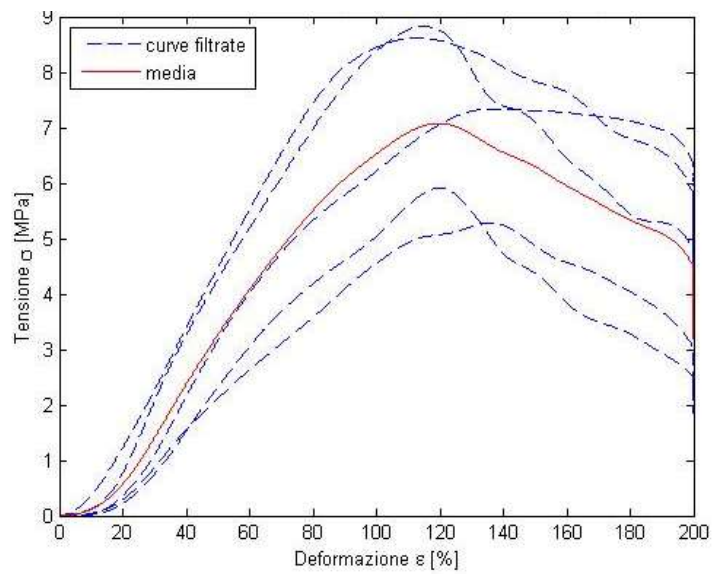


Figura 62: Curve tenso-deformative per i campioni EAK

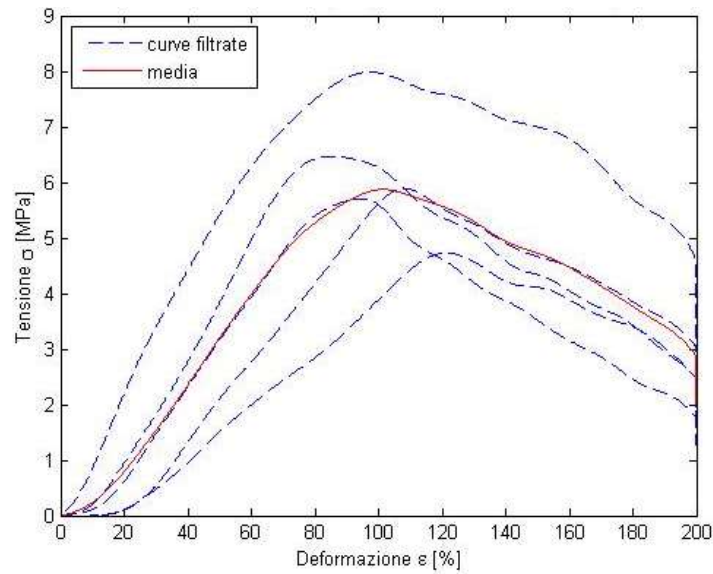


Figura 63: Curve tenso-deformative per i campioni EAbuK.

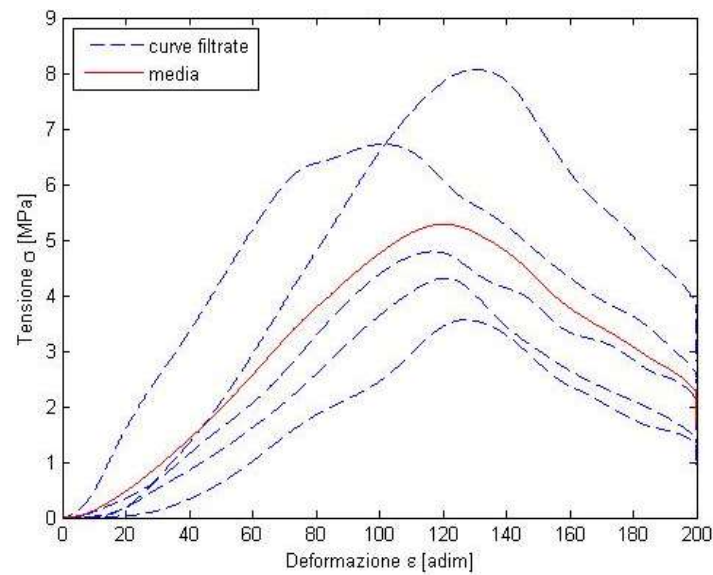


Figura 64: Curve tenso-deformative per i campioni EAK-CYS.

Una preliminare analisi qualitativa permette di osservare che in generale le curve relative ai campioni trattati con peptidi hanno un andamento più riproducibile ed uniforme rispetto a quello delle curve relative ai campioni TRICOL e a quelli trattati con GA.

7.1.2 Moduli elastici E₁ ed E₂

Nel paragrafo vengono presentati i risultati ottenuti in termini di modulo elastico E₁ ed E₂, entrambi relativi alla fase collagenica del tessuto con alcune considerazioni relative ai valori trovati.

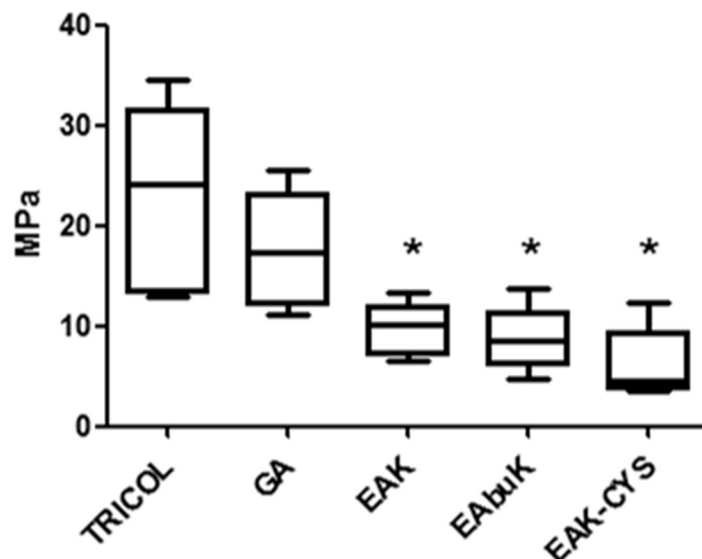


Figura 65: Modulo elastico E₁ dei campioni di pericardio bovino sottoposti ai vari trattamenti. (* indica la significatività nei confronti di TRICOL e GA con $p < 0.05$)

E ₁	TRICOL	GA	EAK	EAbuK	EAK-CYS
Media	22.72	17.50	9.66	8.71	6.10
Dev. standard	8.83	5.53	2.57	3.26	3.66
Errore std	3.12	1.95	1.15	1.46	1.64

Tabella 4: Valori medi, deviazioni standard ed errore standard per il modulo elastico E₁ sulla base della tipologia di trattamento.

	GA	EAK	EAbuK	EAK-CYS
TRICOL	0.1779	<u>0.0089</u>	<u>0.0064</u>	<u>0.0023</u>
GA		<u>0.0135</u>	<u>0.0086</u>	<u>0.0019</u>
EAK			0.6219	0.1133
EAbuK				0.2689

Tabella 5: Risultati del t-test condotto per valutare la significatività delle differenze tra valori del modulo elastico E₁. La sottolineatura evidenzia i p-value inferiori alla soglia di significatività ($p\text{-value} < 0.05$).

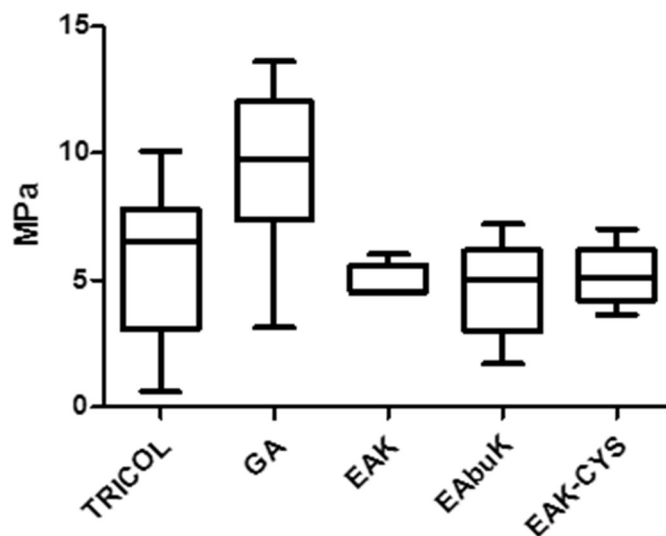


Figura 66: Modulo elastico E2 dei campioni di pericardio bovino sottoposti ai vari trattamenti.

E ₂	TRICOL	GA	EAK	EAbuK	EAK-CYS
Media	5.65	9.47	4.95	4.67	5.17
Dev. standard	3.27	3.29	0.66	1.99	1.24
Errore std	1.24	1.16	0.29	0.89	0.55

Tabella 6: Valori medi, deviazioni standard ed errore standard per il modulo elastico E2 sulla base della tipologia di trattamento.

	GA	EAK	EAbuK	EAK-CYS
TRICOL	<u>0.0429</u>	0.6510	0.5664	0.7628
GA		<u>0.0125</u>	<u>0.0141</u>	<u>0.0186</u>
EAK			0.7722	0.7354
EAbuK				0.6457

Tabella 7: Risultati del t-test condotto per valutare la significatività delle differenze tra i valori del modulo elastico E2. La sottolineatura evidenzia i p-value inferiori alla soglia di significatività (p-value < 0.05).

Si può notare (Tabella 4) che il modulo elastico E₁, rappresentativo della rigidità iniziale dei campioni, assume valori molto simili per quanto riguarda i trattamenti TRICOL e GA (p-value > 0.05).

I valori di E_1 ritrovati nei campioni trattati con i peptidi sono nel complesso significativamente differenti (p -value < 0.05) da quelli relativi ai campioni TRICOL e GA indipendentemente dal peptide utilizzato (Tabella 5).

Confrontando i valori di rigidezza ottenuti con quelli del tessuto bovino nativo di riferimento (E_1 bovino nativo = 51.38 MPa) [82] si osserva che tutti i trattamenti, indistintamente, provocano una riduzione della rigidezza iniziale dei campioni di pericardio, sebbene il dato sia più accentuato per quelli trattati con peptidi.

L'analisi dei risultati del modulo elastico E_2 , corrispondente alla seconda fase lineare, invece, non manifesta differenze significative se non per quanto riguarda i campioni trattati con GA, il cui comportamento è diverso da tutti gli altri campioni. Va d'altra parte precisato che la determinazione del modulo E_2 è soggetta a margini di incertezza causati da una maggior imprecisione nell'individuare la regione lineare della curva di carico prossima alla rottura.

7.1.3 Tensione ultima a rottura

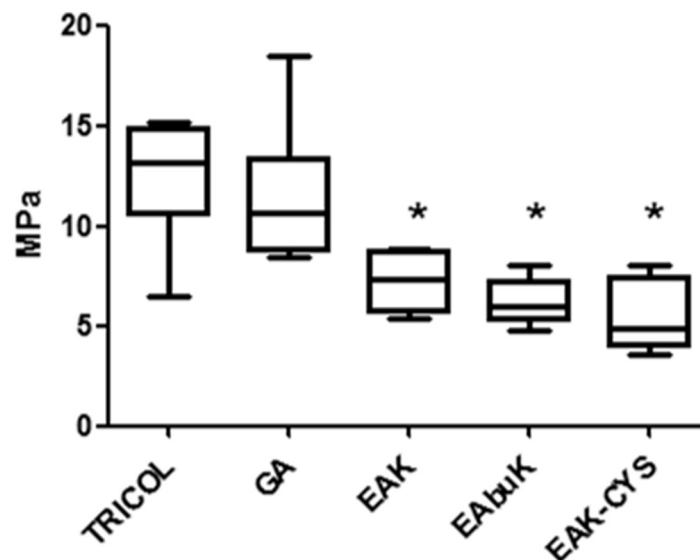


Figura 67: Tensione ultima a rottura (UTS) per i campioni di pericardio bovino sottoposti ai vari trattamenti. (* indica la significatività nei confronti di TRICOL e GA con $p < 0.05$).

UTS	TRICOL	GA	EAK	EAbuK	EAK-CYS
Media	12.38	11.41	7.21	6.18	5.52
Dev. standard	2.94	3.39	1.56	1.20	1.86
Errore std	1.04	1.20	0.69	0.54	0.83

Tabella 8: Valori medi, deviazioni standard ed errore standard per l'UTS sulla base della tipologia di trattamento.

	GA	EAK	EAbuK	EAK-CYS
TRICOL	0.5491	<u>0.0043</u>	<u>0.0010</u>	<u>0.0007</u>
GA		<u>0.0262</u>	<u>0.0074</u>	<u>0.0048</u>
EAK			0.2737	0.1584
EAbuK				0.5286

Tabella 9: Risultati del t-test condotto per valutare la significatività delle differenze tra i valori di UTS.

La sottolineatura evidenzia i p-value inferiori alla soglia di significatività ($p\text{-value} < 0.05$).

I risultati osservati in termini di moduli elastici presentati nel paragrafo precedente sono confermati dai valori di tensione ultima a rottura (Tabella 8). La rigidità maggiore dei campioni trattati con TRICOL e GA si traduce in un valore di UTS superiore per queste due tipologie di trattamento, con significatività comparabili a quelle ottenute per il modulo E_1 . Anche in termini di tensione ultima a rottura non sono infatti apprezzabili differenze significative tra i valori assunti dai campioni TRICOL e GA, mentre i $p\text{-value}$ ottenuti nel confronto tra questi trattamenti e i trattamenti con peptidi sono inferiori al 5%: le differenze tra i dati sono pertanto da considerarsi significative.

7.1.4 Elongazione massima

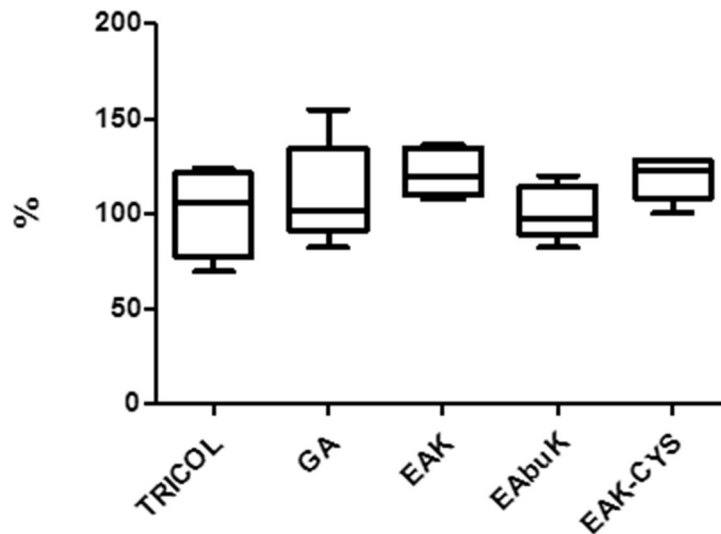


Figura 68: Elongazione massima per i campioni di pericardio bovino trattati.

Elongazione max	TRICOL	GA	EAK	EAbuK	EAK-CYS
Media	100.40	109.70	121.90	100.90	119.10
Dev. standard	21.96	25.66	12.40	14.10	11.39
Errore Std.	7.763	9.07	5.54	6.31	5.09

Tabella 10: Valori medi, deviazioni standard ed errore standard per i valori di elongazione massima sulla base delle varie tipologie di trattamento.

Elongazione max	GA	EAK	EAbuK	EAK-CYS
TRICOL	0.4488	0.0375	0.9624	0.1091
GA		0.3482	0.5021	0.4615
EAK			<u>0.0373</u>	0.7216
EAbuK				0.0554

Tabella 11: Risultati del t-test condotto per valutare la significatività delle differenze tra i valori di elongazione massima. La sottolineatura evidenzia i p-value inferiori alla soglia di significatività ($p\text{-value} < 0.05$).

Il dato deformativo corrispondente alla UTS è sostanzialmente concorde per tutti i trattamenti e si attesta intorno al 100% (Tabella 10), senza manifestare differenze significative tra i diversi trattamenti (Tabella 11).

Questo dato, combinato con i valori di rigidità precedentemente osservati, consente di affermare che il trattamento con i peptidi permette in generale al tessuto una elongazione massima molto simile a quella ottenuta con i trattamenti TRICOL e GA, ma con rigidità significativamente inferiore.

7.2 Caratterizzazione biologica

7.2.1 Test MTS – Saggio di proliferazione cellulare

L'assorbanza (*Tabella A1, Tabella A2, Tabella A3, Tabella A4, Tabella A5*) relativa ai campioni esaminati dopo 3 h dall'inizio della reazione è direttamente proporzionale al numero di cellule metabolicamente attive presenti sui biomateriali alle diverse tempistiche; i dati relativi al $t = 0$ quantificano invece la proliferazione cellulare prima dell'adesione ai biomateriali. Si riportano in *Tabella 12* e *Tabella 13* i valori medi di assorbanza e le deviazioni standard per ciascun timepoint. Da questi dati è possibile costruire le curve mostrate in *Figura 69*.

	A_{media} T=0	A_{media} T=6	A_{media} T=24	A_{media} T=48	A_{media} T=72
EAK	0.585	0.486	0.657	0.611	0.605
EAbuK	0.585	0.501	0.699	0.571	0.835
EAK-CYS	0.585	0.509	0.542	0.592	0.710
TRICOL	0.585	0.429	0.537	0.648	0.716
GA	0.585	0.570	0.581	0.549	0.706
CB	0.585	0.691	0.831	0.813	1.151
C-	0.256	0.256	0.255	0.280	0.290
MEDIUM	0.279	0.279	0.259	0.251	0.301

Tabella 12: Valori medi di assorbanza registrati per ogni timepoint e per gruppo di trattamento.

	dev. std T=0	dev. std T=6	dev. std T=24	dev. std T=48	dev. std T=72
EAK	0.038	0.028	0.1185	0.038	0.090
EAbuK	0.038	0.026	0.0553	0.025	0.056
EAK-CYS	0.038	0.025	0.0825	0.051	0.045
TRICOL	0.038	0.023	0.0493	0.049	0.178
GA	0.038	0.062	0.0402	0.128	0.031
CB	0.038	0.066	0.0889	0.020	0.025
C-	0.006	0.006	0.0018	0.029	0.007
MEDIUM	0.029	0.029	0.232	0.032	0.004

Tabella 13: Deviazioni standard per i valori di assorbanza registrati per ogni timepoint e per gruppo di trattamento.

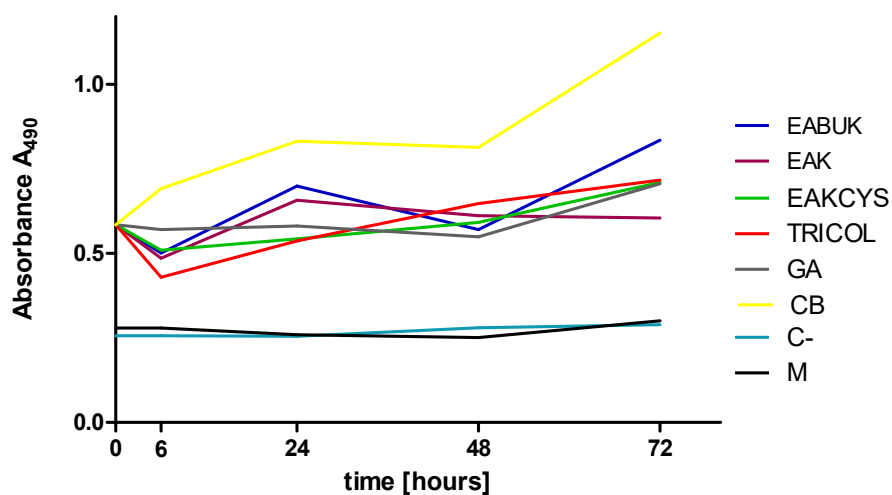


Figura 69: Saggio MTS. Nel grafico viene riportato l'andamento dell'assorbanza per i timepoints fissati e per i vari gruppi di trattamento. La lettura dell'assorbanza è direttamente correlata alla valutazione della proliferazione cellulare sul tessuto.

Una prima analisi di significatività, riportata in *Tabella 14* ha avuto l'obiettivo di valutare eventuali differenze nella proliferazione cellulare per i diversi timepoints e sui

diversi scaffold considerati. Per i risultati completi si rimanda all'Appendice (*Tabella A6, Tabella A7, Tabella A8, Tabella A9*)

	EAK	EAbuK	EAK-CYS	
TRICOL	p > 0.05	p > 0.05	p>0.05	T = 6
	p > 0.05	p > 0.05	p>0.05	T = 24
	p > 0.05	p > 0.05	p>0.05	T = 48
	p > 0.05	p > 0.05	p>0.05	T = 72

Tabella 14: Risultati del t-test condotto per valutare eventuali differenze nella proliferazione cellulare per i diversi timepoints e sui diversi scaffold.

Un'ulteriore analisi statistica è stata condotta indagando la proliferazione all'interno di ogni gruppo nel tempo. Nonostante si osservino differenze fra tempistiche ravvicinate (*Tabella 15*), il numero iniziale di cellule seminate sul biomateriale non viene modificata in modo significativo dopo 72 h di semina (0 vs 72 h) per nessuna delle condizioni analizzate. Questo dato indica che nessuno dei supporti analizzati (scaffold pericardico, scaffold pericardico trattato con GA, scaffold funzionalizzati con peptidi e polistirene) induce proliferazione di hBM-MSC a 72 h e che, quindi, il trattamento con peptidi non modifica questo andamento.

	<i>Significatività test MTS (p < 0.05)</i>							
	EAbuK	EAK	EAK-CYS	TRICOL	GA	CB	C-	M
0 vs 6	p> 0.05	p>0.05	p >0.05	p > 0.05	p> 0.05	p> 0.05	p>0.05	p>0.05
0 vs 24	p> 0.05	p>0.05	p > 0.05	p > 0.05	p> 0.05	p> 0.05	p>0.05	p>0.05
0 vs 48	p> 0.05	p>0.05	p > 0.05	p > 0.05	p> 0.05	p> 0.05	p> 0.05	p>0.05
0 vs 72	p> 0.05	p>0.05	p > 0.05	p > 0.05	p>0.05	p> 0.05	p>0.05	p>0.05
6 vs 24	p> 0.05	p>0.05	P > 0.05	p > 0.05	p> 0.05	p> 0.05	p>0.05	p>0.05
6 vs 48	p> 0.05	p>0.05	p > 0.05	p > 0.05	p> 0.05	p> 0.05	p>0.05	p>0.05
6 vs 72	<u>p< 0.05</u>	p>0.05	<u>p< 0.05</u>	p > 0.05	p> 0.05	<u>p<0.05</u>	p>0.05	p>0.05
24 vs 48	p> 0.05	p>0.05	p > 0.05	p > 0.05	p> 0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05

24 vs 72	p> 0.05	p>0.05	p> 0.05	p > 0.05	p> 0.05	<u>p<0.05</u>	p>0.05	p>0.05
48 vs 72	<u>p< 0.05</u>	p>0.05	p> 0.05	p > 0.05	p> 0.05	<u>p< 0.05</u>	p>0.05	p>0.05

Tabella 15: Analisi statistica di significatività volta ad evidenziare eventuali differenze nel comportamento cellulare considerando singolarmente ogni gruppo di trattamento ai vari timepoints (ANOVA a una via).

7.2.2 Test LDH – Saggio di citotossicità

La determinazione dell'attività dell'LDH per i campioni descritti in 6.3.2 si è basata sull'interpolazione dei dati di assorbanza presentati in *Tabella A11* e *Tabella A14* con la curva ricavata dalla lettura di concentrazioni note crescenti di NADH. La curva di calibrazione utilizzata è riportata in *Figura 70*, eliminando i valori outliers relativi ai campioni STND4 e STND5.

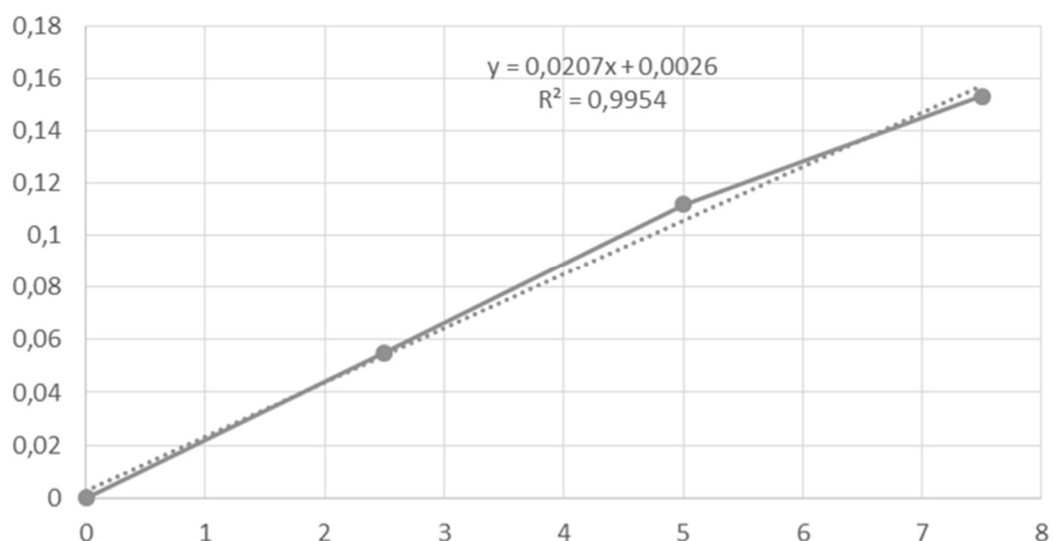


Figura 70: Curva di calibrazione per la lettura della piastra LDH dei campioni relativi a 6,24, 48 h. Nel grafico vengono riportate anche l'equazione della retta di regressione e il coefficiente R^2 .

I valori medi di attività dell'LDH rilevato alle varie tempistiche sono riportati in *Tabella 16*.

	6h		24h		48h		72h	
	media	dev. std.	media	dev. std.	media	dev. std.	media	dev. std.
EAK	87.47	18.12	109.53	17.14	114.36	39.25	55.32	3.76
EAbuK	87.15	16.83	99.44	49.91	133.20	11.81	61.94	11.42
EAK-CYS	96.49	4.89	96.33	12.81	115.49	8.93	49.06	5.67
TRICOL	90.21	15.71	124.03	9.14	107.92	10.14	49.90	5.19
GA	99.87	18.71	121.93	7.95	130.95	24.23	72.17	12.83
CB	120.81	9.13	116.82	58.07	121.77	20.53	72.65	16.97
M	106.47	19.50	130.31	8.94	124.67	12.32	88.17	14.03

Tabella 16: In tabella si riportano i valori medi e le deviazioni standard dell'attività dell'LDH per i campioni $t = 6, 24, 48$ e 72 h.

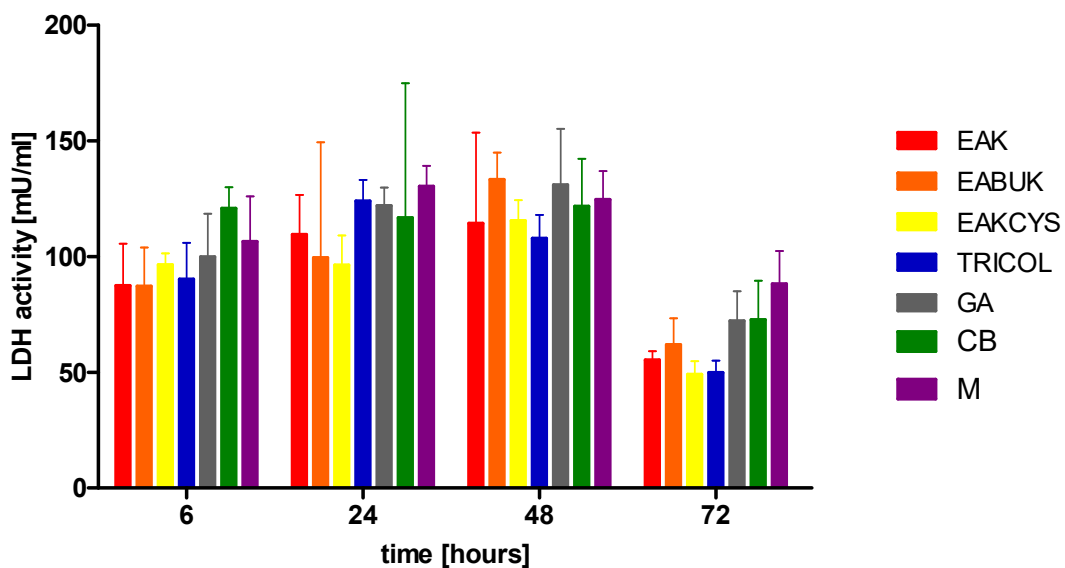


Figura 71: Istogramma rappresentativo dell'attività LDH per i diversi tipi di trattamento e ai timepoints considerati.

La validità statistica dei risultati ottenuti è stata indagata sfruttando i test statistici ANOVA ad uno e due vie in maniera analoga a quanto visto per i risultati del saggio MTS, ottenendo quindi sia un confronto tra i gruppi di trattamento che un confronto tra i valori delle letture ai diversi timepoints entro ciascun gruppo di trattamento.

In *Tabella 17* si riportano i valori di significatività emersi per i gruppi di trattamento, rimandando all'*Appendice* per i risultati completi.

	<i>Significatività test LDH(p < 0.05)</i>						
	EAbuK	EAK	EAK-CYS	TRICOL	GA	CB	M
0 vs 6	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05
0 vs 24	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05
0 vs 48	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05
0 vs 72	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05
6 vs 24	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	<u>p < 0.05</u>	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05
6 vs 48	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05
6 vs 72	p > 0.05	p > 0.05	<u>p < 0.05</u>	<u>p < 0.05</u>	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05
24 vs 48	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05
24 vs 72	p > 0.05	p > 0.05	<u>p < 0.05</u>	<u>p < 0.05</u>	p > 0.05	p > 0.05	<u>p < 0.05</u>
48 vs 72	p > 0.05	p > 0.05	<u>p < 0.05</u>	<u>p < 0.05</u>	<u>p < 0.05</u>	p > 0.05	<u>p < 0.05</u>

Tabella 17: Analisi statistica di significatività volta ad evidenziare eventuali differenze nell'attività dell'LDH considerando singolarmente ogni gruppo di trattamento ai vari timepoints (ANOVA a una via).

Come si osserva dal grafico (*Figura 71*) e dalla *Tabella 17* relativa alle significatività, il trattamento del PBD con i peptidi auto assemblanti analizzati non determina un aumento della citotossicità del biomateriale nei confronti delle hBM-MSc a nessuna delle tempistiche considerate (*Tabella 16*).

7.2.3 Analisi istologiche

In questo paragrafo vengono riportate le considerazioni relative all'analisi dei preparati istologici eseguiti sui campioni: di PBD trattati con SAP EAK, EAbuK, EAK-CYS, trattati con GA e non trattati.

7.2.3.1 Validazione del protocollo di congelamento

L'osservazione al microscopio delle sezioni ottenute dalla colorazione H&E (*Figura 72*) ha permesso di notare che il peptide autoassemblante di prova (DAbuK) è effettivamente penetrato nel tessuto, che si presenta come “riempito” e disteso nell'architettura fibrillare rispetto al tessuto non trattato con peptide.

Dato che l'evidenza sperimentale non porta a risultati particolarmente discordanti in dipendenza dalla concentrazione di saccarosio, si è deciso di scegliere la procedura che prevede l'utilizzo di saccarosio al 60% durante l'inclusione per minimizzare i rischi relativi alla formazione di cristalli nel tessuto durante il congelamento.

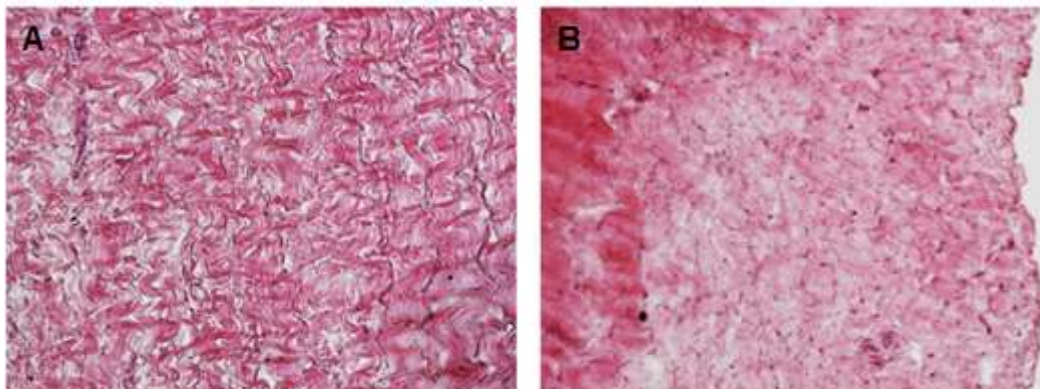


Figura 72: Mantenimento dell'integrità della ECM dopo trattamento con saccarosio al 60% durante la procedura di congelamento. A) PBD B) PBD trattato con SAP DAbuK. Ingrandimento 20x.

7.2.3.2 Colorazioni istologiche

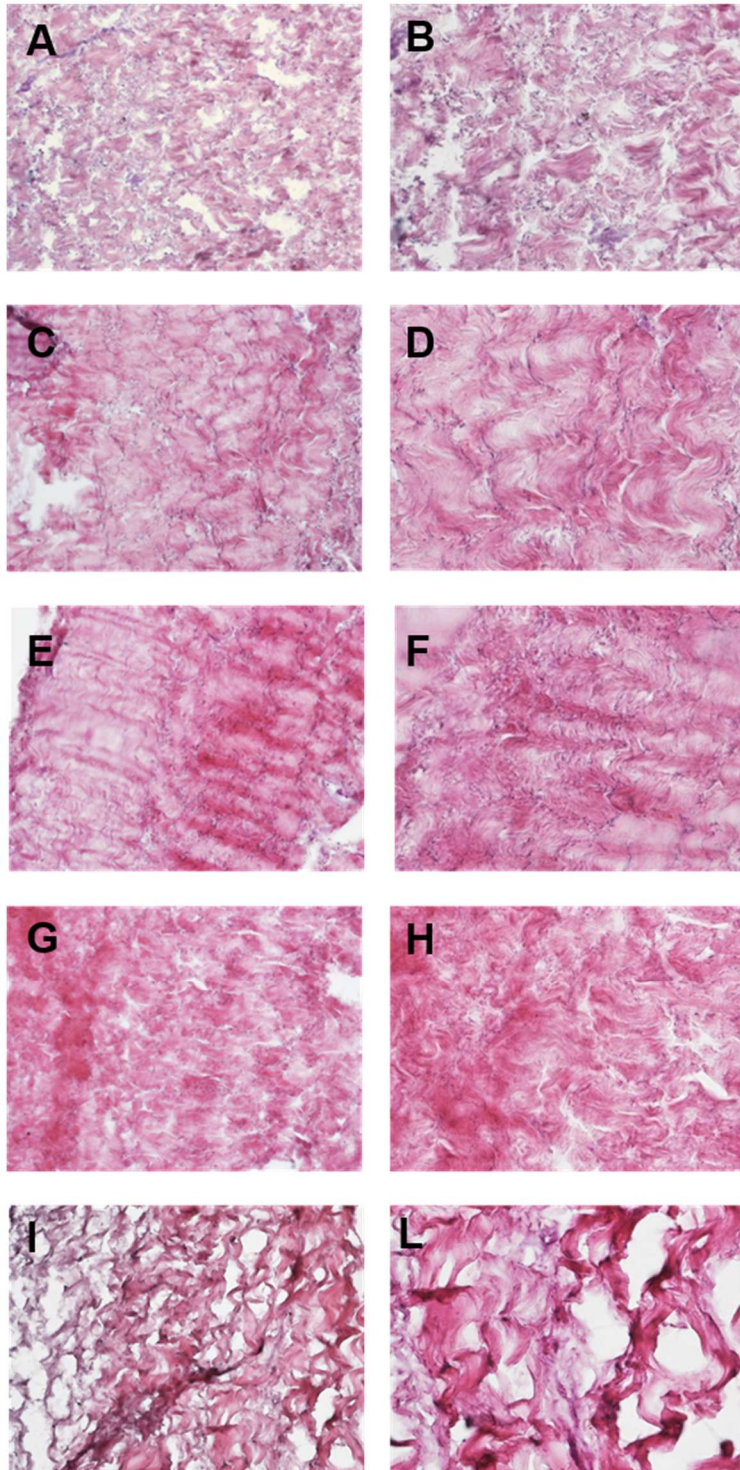


Figura 73: Valutazione istologica dei campioni H&E su criosezioni di PBD non trattato (A e B), trattato con peptide EAK (C,D), trattato con peptide EAbuK (E,F), trattato con peptide EAK-CYS (G,H), trattato con GA (I,L) dopo 72h dalla semina con hBM-MSC. Ingrandimento 20x (A,C,E,G,I), 40x (B,D,F,H,L)

L'osservazione dei preparati istologici dei biomateriali dopo 72h di semina statica con hBM-MSK ha permesso di trarre alcune conclusioni. In primo luogo, nonostante la colorazione con H&E non fornisca indicazioni sulle caratteristiche della struttura tridimensionale costruita dal peptide assemblato all'interno del tessuto pericardico, l'analisi istologica ha permesso di evidenziare (*Figura 72*) che i tre peptidi autoassemblanti di tipo I EAK, EAbuK e EAK-CYS utilizzati in questo studio sono effettivamente penetrati nel tessuto, che appare "riempito" e disteso nell'architettura fibrillare rispetto al tessuto non trattato con peptide.

Il ripopolamento con cellule umane dei biomateriali trattati con peptidi non sembra presentare differenze apprezzabili in merito al numero e alla distribuzione delle cellule determinate dal tipo di peptide utilizzato; un dato significativo risulta comunque essere quello dato dall'osservazione che, nonostante il tessuto infiltrato dall'idrogel si presenti più compatto e riempito, questo non preclude il ripopolamento da parte di cellule mesenchimali umane.

7.3 Analisi delle proprietà fisiche del tessuto

Una valutazione dell'effetto sulla ECM del pericardio decellularizzato della penetrazione dei peptidi autoassemblanti nel tessuto può essere realizzata mediante la misura dello spessore dei campioni prima e dopo la gelificazione e l'osservazione dell'area.

Discorso analogo è stato fatto per la misura dell'area dei campioni.

7.3.1 Misurazione dell'area dei tessuti sottoposti a diversi trattamenti

In *Tabella 18* si riportano i risultati delle misurazioni dell'area secondo quanto descritto in 6.3.3:

campioni	area (cm²)					media	dev. standard
TRICOL	0.75	0.712	0.72	0.851	0.862	0.779	0.072
EAK	0.782	0.704	0.706	0.671	0.696	0.7118	0.0416
EAbuK	0.588	0.717	0.591	0.686	0.705	0.6574	0.063
EAK-CYS	0.691	0.688	0.661	0.759	0.594	0.6786	0.0595

GA	0.857	0.890	0.812	0.853	0.725	0.827	0.064
-----------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Tabella 18: Tabella che riporta le misure di area di ciascuno dei 5 campioni trattati. Si riportano anche la media e la deviazione standard per i singoli gruppi di trattamento.

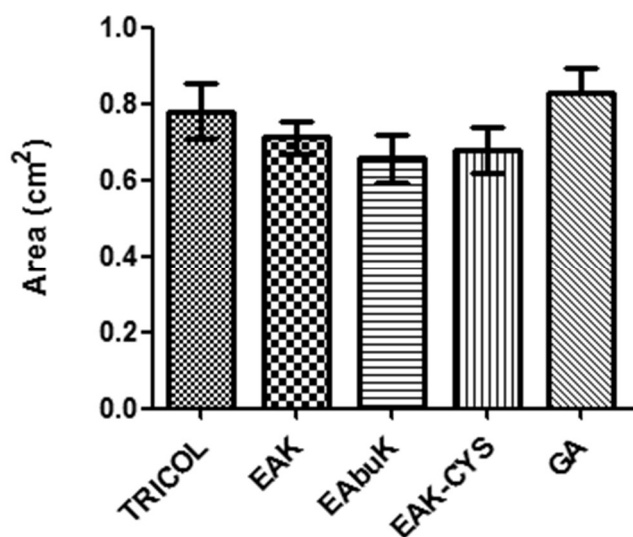


Figura 74: Istogramma che riporta la media e SD dei valori di area per i vari gruppi di trattamento.

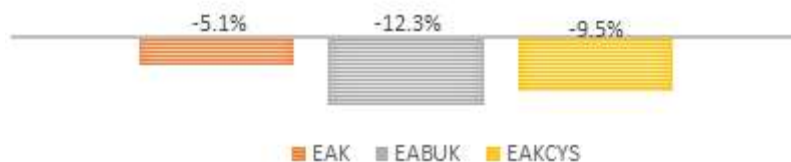


Figura 75: Istogramma che mostra il decremento in percentuale dell'area del campione..

%	TRICOL	EAK	EAbuK	EAK-CYS
area media	100	94.9	87.7	90.5
dev. standard	-	5.6	8.4	7.9

Tabella 19: Decremento percentuale in termini di area di campioni trattati con i peptidi rispetto ai campioni decellularizzati di riferimento.

L'analisi statistica di significatività condotta sui risultati ottenuti è riportata in *Tabella 20*.

	GA	EAK	EAbuK	EAK-CYS
TRICOL	0.4220	0.2011	<u>0.0197</u>	0.0811
GA		<u>0.0193</u>	<u>0.0152</u>	<u>0.0012</u>
EAK			0.2721	0.3849
EAbuK				0.6229

Tabella 20: Risultati del t-test condotto sulle misurazioni di area dei campioni suddivisi per gruppo di trattamento. La sottolineatura evidenzia i p-value significativi.

Ciò che si osserva è che l'unico decremento significativo di area del campione, rispetto al riferimento TRICOL, è correlato all'utilizzo del peptide EAbuK ($p\text{-value} < 0.05$) sul PBD.

7.3.2 Misurazione dello spessore dei tessuti sottoposti a diversi trattamenti

I dettagli relativi alle misure dello spessore dei tessuti sottoposti ai diversi trattamenti sono riportati nel seguito.

GRUPPO 1: campioni di PBD prima della gelificazione

campione	spessore (mm)			media	dev. standard
1	0.342	0.335	0.298	0.309	0.043
2	0.334	0.329	0.307		
3	0.379	0.335	0.273		
4	0.300	0.283	0.298		
5	0.272	0.268	0.286		
6	0.277	0.324	0.317		
7	0.317	0.296	0.279		
8	0.376	0.324	0.325		
9	0.319	0.301	0.344		
10	0.390	0.366	0.391		
11	0.266	0.205	0.169		
12	0.317	0.332	0.324		
13	0.331	0.291	0.314		

14	0.331	0.339	0.303		
15	0.268	0.253	0.275		

Tabella 21: Misurazione dello spessore relativo ai campioni di pericardio bovino decellularizzato prima della gelificazione del peptide.

GRUPPO 2: campioni di PBD trattato con GA

campione	spessore (mm)			media	dev. standard
1	0.283	0.380	0.329	0.379	0.084
2	0.440	0.462	0.448		
3	0.560	0.450	0.380		
4	0.419	0.214	0.275		
5	0.409	0.425	0.273		
6	0.336	0.364	0,377		

Tabella 22: Misurazione dello spessore dei campioni di pericardio bovino decellularizzato trattato con 0.6 % GA

GRUPPO 3: campioni di PBD dopo la gelificazione

I 15 campioni del *GRUPPO 1*, sono stati suddivisi in 3 sottogruppi, a seconda del peptide utilizzato, ottenendo i dati di spessore qui riportati.

peptide	campione	spessore (mm)			media	dev. standard
EAK	1	0.600	0.595	0.598	0.492	0.069
	2	0.465	0.561	0.518		
	3	0.446	0.453	0.44		
	4	0.41	0.428	0.407		
	5	0.52	0.444	0.498		
EAbuK	6	0.49	0.512	0.518	0.452	0.048
	7	0.484	0.519	0.45		
	8	0.464	0.455	0.412		
	9	0.39	0.376	0.387		
	10	0.463	0.44	0.419		
	11	0.403	0.449	0.468		

EAK-CYS	12	0.448	0.473	0.495	0.443	0.084
	13	0.415	0.486	0.503		
	14	0.569	0.501	0.495		
	15	0.239	0.299	0.406		

Tabella 23: Misurazione dello spessore dei campioni di pericardio bovino decellularizzato dopo la gelificazione dei peptidi.

campione	media (mm)	dev. standard
TRICOL	0.318	0.060
EAK	0.492	0.069
EAbuK	0.452	0.048
EAK-CYS	0.443	0.084
GA	0,379	0.084

Tabella 24: Tabella riassuntiva che riporta la media e la deviazione standard dello spessore per i gruppi di trattamento.

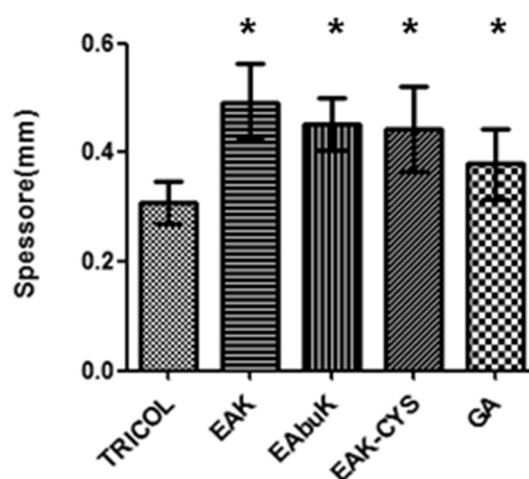


Figura 76: Istogramma di confronto che mostra lo spessore medio dei campioni per ogni gruppo di trattamento. (* = p-value < 0.05)

Ciò che si osserva è che tutti i campioni soggetti a trattamento mostrano uno spessore sensibilmente superiore rispetto allo spessore del PB di riferimento, come confermato dal t-test effettuato sui vari gruppi di trattamento riportato in *Tabella 25*.

	GA	EAK	EAbuK	EAK-CYS
TRICOL	<u>0.0284</u>	<u>0.0034</u>	<u>0.0012</u>	<u>0.0113</u>
GA		0.0781	0.0985	0.2739
EAK			0.0508	0.4102
EAbuK				0.8564

Tabella 25: Risultati dei t-test condotto sulle misurazioni degli spessori dei campioni suddivisi per gruppo di trattamento. La sottolineatura evidenzia i p-value significativi perché inferiori alla soglia ($p\text{-value} < 0.05$).

La significatività dei risultati ottenuti sui campioni trattati con peptidi autoassemblanti rispetto al tessuto di riferimento fa presupporre che l'idrogel provochi un distanziamento delle fibre di collagene che si traduce in un incremento dello spessore, ma anche in un decremento dell'area totale del campione come osservato in *Tabella 18*. D'altra parte, i risultati del t-test sui gruppi di trattamento con peptidi non sono significativi dal punto di vista dello spessore del campione e questo permette di concludere che tra i peptidi utilizzati nel lavoro sperimentale non ve ne sia effettivamente uno che renda lo spessore del tessuto sensibilmente superiore rispetto agli altri.

La conferma dell'effettiva penetrazione del peptide nel tessuto si avrà solamente con l'analisi istologica.

7.3.3 Misurazione del contenuto d'acqua dei campioni

I pesi idratati rilevati per ciascun campione prima della liofilizzazione sono riportati nella tabella che segue.

serie	campione	peso idratato (gr)	media	dev. standard
TRICOL	1	0.01951	0.02136	0.00175
	2	0.02160		
	3	0.02298		
EAK	1	0.03128	0.03078	0.00091
	2	0.02973		
	3	0.03133		
EAbuK	1	0.03436	0.03537	0.00262
	2	0.03835		
	3	0.03341		
EAK-CYS	1	0.03853	0.03427	0.00807
	2	0.03932		
	3	0.02496		

Tabella 26: Pesi idratati (gr) dei campioni trattati.

Dalla *Tabella 26* risulta evidente un incremento del peso dei campioni che hanno subito la procedura di gelificazione del peptide.

I dati ottenuti dopo la liofilizzazione, invece, sono riportati in *Tabella 27*.

serie	campione	peso secco (gr)	media	dev. standard
TRICOL	1	0.00457	0.00450	0.00015
	2	0.00460		
	3	0.00432		
EAK	1	0.00426	0.00435	0.00017
	2	0.00425		
	3	0.00455		
EAbuK	1	0.00442	0.00475	0.00029
	2	0.00497		
	3	0.00487		
EAK-CYS	1	0.00651	0.00545	0.00129
	2	0.00583		
	3	0.00402		

Tabella 27: Pesi secchi (gr) dei campioni trattati.

Con i dati di *Tabella 26* e *Tabella 27* è possibile ricavare il contenuto d'acqua presente nei campioni, correlato alla presenza del peptide autoassemblante.

Serie	Campione	Contenuto d'acqua (%)	media	dev. standard
TRICOL	1	76.6	78.8	2.3
	2	78.7		
	3	81.2		
EAK	1	86.4	85.9	0.5
	2	85.7		
	3	85.5		
EAbuK	1	87.1	86.5	1.0
	2	87.0		
	3	85.4		
EAK-CYS	1	83.1	84.1	1.0
	2	85.2		
	3	83.9		

Tabella 28: Contenuto d'acqua percentuale dei campioni suddivisi sulla base del trattamento.

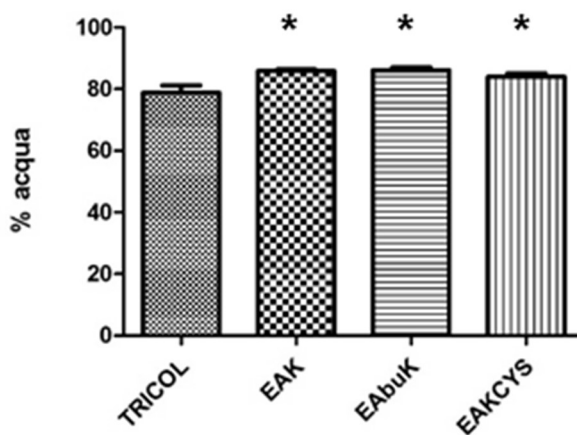


Figura 77: Istogramma che mostra il contenuto d'acqua nei campioni trattati.

(* = $p\text{-value} < 0.05$)

Per valutare la significatività dei risultati si è proceduto ad effettuare il t-test ottenendo i valori di significatività riportati in *Tabella 29*.

	EAK	EAbuK	EAK-CYS
TRICOL	<u>0.03</u>	<u>0.02</u>	<u>0.04</u>
EAK		0.35	0.08
EAbuK			<u>0.04</u>

Tabella 29: In tabella sono riportati i p-value per valutare la significatività delle differenze tra campioni sottoposti a diversi trattamenti. La sottolineatura evidenzia i p-value significativi perché inferiori alla soglia ($p\text{-value} < 0.05$)

Si osserva dunque che i campioni trattati con SAP presentano tutti indistintamente un contenuto d'acqua aumentato rispetto ai campioni TRICOL, confermando in questo modo che l'incremento di spessore osservato in *Tabella 24* è imputabile all'aumento della componente idratata del tessuto.

CONCLUSIONI

Il presente lavoro sperimentale rappresenta parte di una più ampia attività ricerca volta alla identificazione di possibili strategie per l'ottenimento di materiali idonei alla produzione di valvole cardiache biologiche ingegnerizzate.

In questo ambito, il pericardio bovino costituisce un materiale promettente, la cui applicazione clinica non può però prescindere da alcuni processi di trattamento che hanno l'obiettivo di ridurre/sopprimerne l'immunogenicità e di preservarne, per quanto possibile, la durabilità. I tipici trattamenti ai quali il tessuto viene sottoposto sono la fissazione con glutaraldeide e/o la decellularizzazione.

Il presente lavoro ha avuto come obiettivo l'arricchimento di campioni di pericardio bovino decellularizzato con tre diverse sequenze peptidiche autoassemblanti di tipo I. I campioni di pericardio decellularizzato, trattato con glutaraldeide e, in alternativa, arricchito con i peptidi autosassemblanti, sono stati sottoposti a test comparativi per misurarne le caratteristiche fisiche, biologiche e biomeccaniche.

Dalle evidenze sperimentali è emerso che la penetrazione e la gelificazione dei peptidi all'interno della matrice del tessuto non sembrano apportare modificazioni sostanziali in termini di proprietà biologiche rispetto ai campioni decellularizzati e fissati con glutaraldeide. La presenza del peptide all'interno del tessuto non si è dimostrata avere effetti negativi sulla vitalità e sulla proliferazione cellulare di cellule mesenchimali umani seminate in statico sul biomateriale per 72h. Dal punto di vista biomeccanico, la presenza dei peptidi nel tessuto ne diminuisce la rigidità pur conservando analoghi livelli di deformazione a rottura.

È da segnalare il fatto che i campioni di tessuto trattati con i peptidi autoassemblanti subiscono un significativo incremento dello spessore, correlato al maggiore contenuto d'acqua. Da un lato questo risultato può apparire svantaggioso: i dispositivi di sostituzione valvolare tendono ad avere dimensioni sempre minori per rendere le procedure chirurgiche meno invasive. Dall'altro lato, l'aumento della componente idratata potrebbe ridurre il danno arrecato al tessuto pericardico montato su stent durante la procedura di compressione (*crimping*) necessaria prima dell'introduzione transcatetere.

Questo lavoro fornisce dunque alcune indicazioni preliminari circa le proprietà biologico/cellulari e meccaniche di un biomateriale innovativo ottenuto accoppiando il pericardio bovino con sequenze peptidiche autoassemblanti.

Ciò che potrà risultare interessante, per gli sviluppi futuri della ricerca, è riuscire a valutare, attraverso tecniche di microscopia quali l'AFM, l'aspetto della reticolazione del peptide nel pericardio, in termini qualitativi e quantitativi (p. es., spessore e diametro delle fibre).

D'altra parte, dal punto di vista biologico, gli studi futuri potranno indagare non solo la morfologia cellulare ma anche gli effetti della funzionalizzazione del tessuto con peptidi contenenti sequenze segnale pro-adesive.

APPENDICE

Test MTS – Saggio di proliferazione cellulare

T=0	A₄₉₀				media	dev. standard
	0.5693	0.6413	0.5564	0.5712	0.584525	0.038

Tabella A1: Valori di assorbanza corrispondenti ai 4 pozzetti seminati per t = 0.

T=6	A₄₉₀			media	dev. standard
EAK	0.5142	0.4592	0.484	0.486	0.028
EAbuK	0.4737	0.5032	0.52555	0.501	0.026
EAK-CYS	0.4904	0.5377	0.4996	0.509	0.025
TRICOL	0.4504	0.4047	0.4329	0.429	0.023
GA	0.4994	0.6165	0.5956	0.570	0.062
CB	0.7627	0.6333	0.6774	0.691	0.066
C-	0.2632	0.2538	0.2517	0.256	0.006
MEDIUM	0.3084	0.251	0.278	0.279	0.029

Tabella A2: Valori di assorbanza corrispondenti ai campioni della piastra t = 6 h.

T=24	A₄₉₀			media	dev. standard
EAK	0.6933	0.5935	0.6846	0.657	0.055
EAbuK	0.81995	0.69465	0.583	0.699	0.119
EAK-CYS	0.5261	0.632	0.4695	0.542	0.082
TRICOL	0.5531	0.5761	0.4815	0.537	0.049
GA	0.5387	0.6189	0.5844	0.581	0.040
CB	0.8762	0.729	0.8889	0.831	0.089
C-	0.2532	0.2563	0.2562	0.255	0.002
MEDIUM	0.2449	0.2468	0.286	0.259	0.023

Tabella A3: Valori di assorbanza corrispondenti ai campioni della piastra t = 24 h.

T=48	A₄₉₀			media	dev. standard
EAK	0,6415	0,6243	0,5688	0,611	0,038
EAbuK	0.5948	0.54415	0.57295	0.571	0.025
EAK-CYS	0.5416	0.6427	0.5911	0.592	0.051
TRICOL	0.6318	0.6078	0.7029	0.648	0.049
GA	0.4461	0.6918	0.5086	0.549	0.128
CB	0.7986	0.8056	0.8361	0.813	0.020
C-	0.2575	0.2704	0.3128	0.280	0.029
MEDIUM	0.2579	0.2163	0.2784	0.251	0.032

Tabella A4: Valori di assorbanza corrispondenti ai campioni della piastra t = 48 h.

T=72	A₄₉₀			media	dev. standard
EAK	0.7084	0.5612	0.545	0.605	0.090
EAbuK	0.89795	0.81375	0.79275	0.835	0.056
EAK-CYS	0.6685	0.7033	0.7582	0.710	0.045
TRICOL	0.6619	0.9149	0.57221	0.716	0.178
GA	0.7403	0.6985	0.6789	0.706	0.031
CB	1.18	1.1357	1.1385	1.151	0.025
C-	0.297	0.2889	0.2827	0.290	0.007
MEDIUM	0.3044	0.2962	0.3018	0.301	0.004

Tabella A5: Valori di assorbanza corrispondenti ai campioni della piastra t = 72 h.

Analisi di significatività per il test MTS

T=6							
	EAK	EAbuK	EAK-CYS	GA	CB	C-	M
TRICOL	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	<u>p < 0.05</u>	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.01</u>	<u>p < 0.05</u>
EAK		p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
EAbuK			p > 0.05	p > 0.05	<u>p < 0.01</u>	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
EAK-CYS				p > 0.05	<u>p < 0.01</u>	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
GA					p > 0.05	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
CB						<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
C-							p > 0.05

Tabella A6: Risultati del t-test condotto per valutare la significatività delle differenze tra valori di assorbanza rilevate sulla piastra t = 6 h.

T=24							
	EAK	EAbuK	EAK-CYS	GA	CB	C-	M
TRICOL	p > 0.05	<u>p < 0.01</u>	p > 0.05	p > 0.05	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
EAK		p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	<u>p < 0.01</u>	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
EAbuK			p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
EAK-CYS				p > 0.05	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
GA					<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
CB						<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
C-							p > 0.05

Tabella A7: Risultati del t-test condotto per valutare la significatività delle differenze tra valori di assorbanza rilevate sulla piastra t = 24 h.

T=48							
	EAK	EAbuK	EAK-CYS	GA	CB	C-	M
TRICOL	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	<u>p < 0.01</u>	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
EAK		p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
EAbuK			p > 0.05	p > 0.05	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
EAK-CYS				p > 0.05	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
GA					<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
CB						<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
C-							p > 0.05

Tabella A8: Risultati del t-test condotto per valutare la significatività delle differenze tra valori di assorbanza rilevate sulla piastra t = 48 h.

T=72							
	EAK	EAbuK	EAK-CYS	GA	CB	C-	M
TRICOL	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
EAK		<u>p < 0.01</u>	p > 0.05	p > 0.05	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
EAbuK			p > 0.05	p > 0.05	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
EAK-CYS				p > 0.05	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
GA					<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
CB						<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
C-							p > 0.05

Tabella A9: Risultati del t-test condotto per valutare la significatività delle differenze tra valori di assorbanza rilevate sulla piastra t = 72 h.

Test LDH – Saggio di citotossicità

Piastra 6, 24, 48 h

0	EAK 6_3	TRICOL 6_2	M 6_1	EAbuK 24_3	GA 24_2	EAK 48_1	EAK- CYS48_2	CB 48_2
2.5	EAbuK 6_1	TRICOL 6_3	M 6_2	EAK-CYS 24_1	GA 24_3	EAK 48_2	TRICOL 48_1	CB 48_3
5	EAbuK 6_2	GA 6_1	M 6_3	EAK-CYS 24_2	CB 24_1	EAK 48_3	TRICOL 48_2	M 48_1
7.5	EAbuK 6_3	GA 6_2	EAK 24_1	EAK-CYS 24_3	CB 24_2	EAbuK 48_1	TRICOL 48_3	M 48_2
10	EAK-CYS 6_1	GA 6_3	EAK 24_2	TRICOL 24_1	CB 24_3	EAbuK 48_2	GA 48_1	M 48_3
12.5	EAK-CYS 6_2	CB 6_1	EAK 24_3	TRICOL 24_2	M 24_1	EAbuK 48_3	GA 48_2	
EAK 6_1	EAK-CYS 6_3	CB 6_2	EAbuK 24_1	TRICOL 24_3	M 24_2	EAK- CYS48_1	GA 48_3	
EAK 6_2	TRICOL 6_1	CB 6_3	EAbuK 24_2	GA 24_1	M 24_3	EAK- CYS48_2	CB 48_1	

Tabella A10: Disposizione dei campioni corrispondenti a $t = 6, 24$ e 48 h sulla piastra per il test LDH.

Assorbanza A ₄₅₀								
	0,184	0,164	0,211	0,102	0,236	0,188	0,263	0,212
	0,144	0,178	0,19	0,208	0,265	0,197	0,217	0,255
	0,194	0,189	0,268	0,173	0,111	0,333	0,211	0,261
	0,211	0,185	0,191	0,225	0,278	0,273	0,25	0,235
	0,197	0,254	0,236	0,246	0,344	0,257	0,269	0,286
	0,214	0,238	0,261	0,251	0,272	0,305	0,226	
0,146	0,196	0,246	0,216	0,281	0,254	0,231	0,326	
0,221	0,226	0,274	0,308	0,264	0,291	0,231	0,297	

Tabella A11: Valori di assorbanza ottenuti dalla differenza delle letture della piastra Tiniziale e Tfinale durante il saggio LDH per i campioni a $6, 24, 48$ h.

t	serie	assorbanza	NADH prodotto (nmoli)	attività LDH (mU/ml)
6	EAK	0,146	6,93	69,28
		0,221	10,55	105,51
		0,184	8,76	87,63
	EAbuK	0,144	6,83	68,31
		0,194	9,25	92,46
		0,211	10,07	100,68
	EAK-CYS	0,197	9,39	93,91
		0,214	10,21	102,13
		0,196	9,34	93,43
	TRICOL	0,226	10,79	107,92
		0,164	7,80	77,97
		0,178	8,47	84,73
	GA	0,189	9,00	90,05
		0,185	8,81	88,12
		0,254	12,14	121,45
	CB	0,238	11,37	113,72
		0,246	11,76	117,58
		0,274	13,11	131,11
	M	0,211	10,07	100,68
		0,19	9,05	90,53
		0,268	12,82	128,21
24	EAK	0,191	9,10	91,01
		0,236	11,28	112,75
		0,261	12,48	124,83
	EAbuK	0,216	10,31	103,09
		0,308	14,75	147,54
		0,102	4,79	47,91
	EAK-CYS	0,208	9,92	99,23
		0,173	8,23	82,32

		0,225	10,74	107,44
	TRICOL	0,246	11,76	117,58
		0,251	12,00	120,00
		0,281	13,45	134,49
	GA	0,264	12,63	126,28
		0,236	11,28	112,75
		0,265	12,68	126,76
	CB	0,111	5,24	52,37
		0,278	13,30	133,04
		0,344	16,51	165,06
	M	0,272	13,01	130,14
		0,254	12,14	121,45
		0,291	13,93	139,32
48	EAK	0,188	8,96	89,57
		0,197	9,39	93,91
		0,333	15,96	159,61
	EAbuK	0,273	13,06	130,63
		0,257	12,29	122,90
		0,305	14,61	146,09
	EAK-CYS	0,231	11,03	110,34
		0,231	11,03	110,34
		0,263	12,58	125,80
	TRICOL	0,217	10,36	103,57
		0,211	10,07	100,68
		0,25	11,95	119,52
	GA	0,269	12,87	128,70
		0,226	10,79	107,92
		0,326	15,62	156,23
	CB	0,297	14,22	142,22
		0,212	10,12	101,16

		0,255	12,19	121,93
	M	0,261	12,48	124,83
		0,235	11,23	112,27
		0,286	13,69	136,91

Tabella A12: Valori di assorbanza, NADH prodotto e attività LDH rilevati per ogni campione a $t = 6, 24, 48$ h.

Piastra 72 h

0	EAK 72_1	EAK-CYS 72_3	CB 72_2
2.5	EAK 72_2	TRICOL 72_1	CB 72_3
5	EAK 72_3	TRICOL 72_2	M 72_1
7.5	EAbuK 72_1	TRICOL 72_3	M 72_2
10	EAbuK 72_2	GA 72_1	M 72_3
12.5	EAbuK 72_3	GA 72_2	
	EAK-CYS 72_1	GA 72_3	
	EAK-CYS 72_2	CB 72_1	

Tabella A13: Disposizione dei campioni corrispondenti a $t = 72$ h sulla piastra per il test LDH.

Assorbanza A ₄₅₀			
	0,136	0,111	0,235
	0,131	0,135	0,141
	0,151	0,13	0,189
	0,132	0,108	0,268
	0,148	0,227	0,234
	0,193	0,164	
	0,115	0,167	
	0,14	0,186	

Tabella A14: Valori di assorbanza ottenuti dalla differenza delle letture della piastra Tiniziale e Tfinale durante il saggio LDH per i campioni a 72 h.

t	serie	assorbanza	NADH prodotto (nmoli)	attività LDH (mU/ml)
72	EAK	0,136	5,41	54,12
		0,131	5,23	52,31
		0,151	5,95	59,53
	EABUK	0,132	5,27	52,67
		0,148	5,84	58,45
		0,193	7,47	74,69
	EAKCYS	0,115	4,65	46,53
		0,14	5,56	55,56
		0,111	4,51	45,09
	TRICOL	0,135	5,38	53,75
		0,13	5,19	51,95
		0,108	4,40	44,01
	GA	0,227	8,70	86,97
		0,164	6,42	64,22
		0,167	6,53	65,31
	CB	0,186	7,22	72,17
		0,235	8,99	89,86
		0,141	5,59	55,92
	M	0,189	7,32	73,25
		0,268	10,18	101,77
		0,234	8,95	89,49
	MEDIUM		0,50	5,02
	LDH +		0,50	5,02

Tabella A15: Valori di assorbanza, NADH prodotto e attività LDH rilevati per ogni campione a t = 72 h.

Analisi di significatività per il test LDH

T=6							
	EAK	EAbuK	EAK-CYS	GA	CB	C-	M
TRICOL	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	<u>p < 0.05</u>	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.01</u>	<u>p < 0.05</u>
EAK		p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
EAbuK			p > 0.05	p > 0.05	<u>p < 0.01</u>	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
EAK-CYS				p > 0.05	<u>p < 0.01</u>	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
GA					p > 0.05	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
CB						<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
C-							p > 0.05

Tabella A16: Risultati del t-test condotto per valutare la significatività delle differenze tra valori dell'attività dell'LDH rilevati sulla piastra t = 6 h

T=24							
	EAK	EAbuK	EAK-CYS	GA	CB	C-	M
TRICOL	p > 0.05	p < 0.01	p > 0.05	p > 0.05	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
EAK		p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	<u>p < 0.01</u>	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
EAbuK			p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
EAK-CYS				p > 0.05	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
GA					<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
CB						<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
C-							p > 0.05

Tabella A17: Risultati del t-test condotto per valutare la significatività delle differenze tra valori dell'attività dell'LDH rilevati sulla piastra t = 24 h

T=48							
	EAK	EAbuK	EAK-CYS	GA	CB	C-	M
TRICOL	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	<u>p < 0.01</u>	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
EAK		p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
EAbuK			p > 0.05	p > 0.05	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
EAK-CYS				p > 0.05	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>

GA					<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
CB						<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
C-							p > 0.05

Tabella A18: Risultati del t-test condotto per valutare la significatività delle differenze tra valori dell'attività dell'LDH rilevati sulla piastra t = 48 h

T=72							
	EAK	EAbuK	EAK-CYS	GA	CB	C-	M
TRICOL	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
EAK		<u>p < 0.01</u>	p > 0.05	p > 0.05	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
EAbuK			p > 0.05	p > 0.05	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
EAK-CYS				p > 0.05	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
GA					<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
CB						<u>p < 0.001</u>	<u>p < 0.001</u>
C-							p > 0.05

Tabella A19: Risultati del t-test condotto per valutare la significatività delle differenze tra valori dell'attività dell'LDH rilevati sulla piastra t = 72 h

Bibliografia

- [1] P. A. Iaizzo, Handbook of Cardiac Anatomy, Physiology and Devices, Springer.
- [2] R. P. Vito, The role of the pericardium in cardiac mechanics, *Journal of Biomechanics* , Volume 12 , Issue 8 , 587 - 592, 1979.
- [3] R. Shabetai, L. Mangiardi, V. Bhargava, J. R. Jr. e C. Higgins, «The pericardium and cardiac function,» *Progress in Cardiovascular Diseases*, vol. Volume 22, n. Issue 22, pp. 107-134, 1979.
- [4] T. Ishihara, V. J. Ferrans, M. Jones, S. W. Boyce, O. Kawanami e W. C. Roberts, Histological an Ultrastructural features of the normal human parietal pericardium, *American Journal of Cardiology* , Volume 46 , Issue 5 , 744 - 753, 1980.
- [5] E. M. Green, J. C. Mansfield, J. S. Bell e C. P. Winlove, «The structure and micromechanics of elastic tissue,» *Interface Focus*, 2014.
- [6] W. A. Naimark, J. M. Lee e H. L. a. D. T. Cheung, «Correlation of structure and viscoelastic properties in the pericardia of four mammalian species,» *Am J. Physiol.* , vol. 263, 1992.
- [7] Schoen, «Calcification of Bovine Pericardium Used in Cardiac Valve Bioprotheses,» *AJP*, vol. 123, n. 1, pp. 134-145, 1986.
- [8] A. Radjeman, S. C. Liew e K. O. Lim, «Anisotropic lasticity of bovine pericardial tissue,» *Japanese Journal of Physiology*, vol. 35, pp. 831-840, 19985.
- [9] Zioupos e Barbenel, «Mechanics of native bovine pericardium,» *Biomaterials*, vol. 15, n. 5, pp. 366-373, 1994.
- [10] Zioupos, Barbenel e Fisher, « Mechanical and optical anisotropy of bovine pericardium,» *Medical & Biological Engineering & Computing*, vol. 30, n. Zioupos; Barbenel; Fisher, pp. 76-82, 1992.
- [11] Hilderbrandt, Fukaya e Martin, «Stress-strain relations of tissue sheets undergoing uniform two-dimensional stretch,» *J. Appl. Physiol*, vol. 27, pp. 758-762, 1969.
- [12] Lee, L. Winter, Freeman, Shabetal e Fung, «Biaxial mechanical properties of the pericardium in normal and volume overloaded dogs,» *Am. J. Physiol.*, vol. 249, pp.

H222-H230, 1985.

- [13] Lee, Haberer e Boughner, «The bovine pericardial xenografts: I. Effect of fixation in aldehyde without constraint on the tensile properties of bovine pericardium,» *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 23, pp. 457-475, 1989.
- [14] Wiegner, Bing, Borg e Cauldfield, «Mechanical and structural correlates of canine pericardium,» *Circ. Res.*, vol. 49, pp. 807-814, 1981.
- [15] Yue e Zhong, «The mechanical anisotropy of yak pericardium,» in *3rd World Biomaterials Congress*, Kyoto, 1988.
- [16] Vito, «The mechanical properties of soft tissue-I: A mechanical system for biaxial test,» *J. Biomech.*, vol. 13, pp. 947-950, 1980.
- [17] Chew, Zeger e Yin, «Determination of material properties of biological tissue: pericardium,» in *Frontiers in biomechanics*, New York, Springer, 1986, pp. 86-97.
- [18] Yin, Chew e Zeger, «An approach to quantification of biaxial tissue stress-strain data,» *J. Biomech.*, vol. 19, pp. 27-37, 1986.
- [19] Sacks, Chuong e More, «Collagen Fiber Architecture of Bovine Pericardium,» *ASAIO Journal*, pp. 632-637, 1994.
- [20] D. Bottini, B. Gnoni, G. Cagli, G. Grimaldi, V. Cervelli e G. Cervelli, «Il pericardio bovino liofilizzato (Periguard) nella correzione delle deformità nasali,» *Otorinolaringologia*, vol. 51, n. 4, pp. 145-9, 2001.
- [21] Rinna, Ungari, Saltarel, Cassoni e Reale, «Orbital floor restoration,» *J Craniofac Surg*, vol. 16, n. 6, pp. 968-72, 2005.
- [22] G. M. Allen, «Surgical Treatment of Emphysema Using Bovine Pericardium Strips,» *AORN Journal*, vol. 63, n. 2, pp. 376-380, 1996.
- [23] A. Baharuddin, B. Go, M. Firdaus e J. Abdullah, «Bovine pericardium for dural graft: clinical results in 22 patients.,» *Clin Neurol Neurosurg*, vol. 104, n. 4, pp. 342-44, 2002.
- [24] E. Remil, N. Khelil, I. D. Centa, M. B. Caroline Roques, F. Medjahed-Hamidi, F. Chaubet, D. Letourneur, E. Lansac e A. Meddahi-Pelle, *Pericardial Processing: Challenges, Outcomes and Future Prospects*, 2011.
- [25] Y. Athar, S. L. A. Zainuddin, Z. Berahim, A. Hassan, A. Sagheer e M. K. Alam,

- «Bovine Pericardium: A Highly Versatile Graft Material,» *International Medical Journal* , vol. 06, pp. 321-24, 1994.
- [26] R. Gauvin, G. Marinov, Y. Mehri, J. Klein, B. Li, D. LArouche, R. Guzman, Z. Zhang, L. Germain e R. Guidoin, «A comparative study of bovine and porcine pericardium to highlight their potential advantages to manufacture percutaneous cardiovascular implants,» *Journal of Biomaterials Applications*, 2012.
- [27] M. Misfeld e H.-H. Sievers, «Heart valve macro and microstructure,» *Phil. Trans. R. Soc. B (2007) 362, 1421–1436* , vol. 362, pp. 1421-1436, 2007.
- [28] D. Marc, B. Nicholas e N. David, «Calcific Aortic Stenosis: A Disease of the Valve and the Myocardium,» *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 60, n. 19, pp. 1854-1863, 2012.
- [29] Sacks, Schmidt e al., «On the biomechanics of heart valve function,» *Journal of Biomechanics*, vol. 42, n. 12, pp. 1804-1824, 2009.
- [30] Sacks e Yoganathan, «Heart valve function: a biomechanical perspective,» *Philosophical Transactions of the Royal Society*, vol. 362, pp. 1369-1391, 2007.
- [31] R. L. Knight, «The use of acellular matrices for the tissue engineering cardiac valves,» *Proceed Inst Mech Eng H- J Eng Med* , vol. 222, pp. 129-143, 2008.
- [32] S. F.J, «Aortic valve structure-function correlations: role of elastic fibers no longer a stretch of the imagination.,» *The Journal of heart valve disease* , vol. 6, n. 1, pp. 1-6, 1997.
- [33] *Biofluid and bioheat transfer*, University of Notre Dame.
- [34] T. S. o. T. Surgeons, «<http://www.sts.org/national-database>,» [Online].
- [35] F. W. Mohr, «Decade in review—valvular disease: Current perspectives on treatment of valvular heart disease,» *Nature Reviews Cardiology*, vol. 11, p. 637–638, 2014.
- [36] P. Singhal, A. Luk e J. Butany, «Bioprosthetic Heart Valves: Impact of implantation on Biomaterials,» *ISRN Biomaterials*, 2013.
- [37] A. C. Duncan e D. Boughner, «Effect of dynamic glutaraldehyde fixation on the viscoelastic properties of bovine pericardial tissue,» *Biomaterial*, vol. 19, pp. 777-783, 1998.

- [38] J. Dunning, R. Graham, J. Thambyrajah, M. Stewart e S. K. a. S. Hunter, «Stentless vs. stented aortic valve bioprostheses: a prospective randomized controlled trial,» *European Heart Journal* , vol. 28, pp. 2369-2374, 2007.
- [39] P. Aguiari, M. Fiorese, L. Iop, G. Gerosa e A. Bagno, «Mechanical testing of pericardium for manufacturing prosthetic heart valves,» *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery*, 2015.
- [40] Alavi, Groves e Kheradvar, «The Effects of Transcatheter Valve Crimping on Pericardial Leaflets,» *The Annals of Thoracic Surgery*, vol. 97, n. 4, pp. 1260-1266, 2014.
- [41] W. d. Buhr, S. Pfeifer, J. Slotta-Huspenina, E. Wintermantel, G. Lutter e W. A. Goetz, «Impairment of pericardial leaflet structure from balloon-expanded valved stents,» *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* , vol. 143, n. 6, p. 1417–1421, 2012.
- [42] R. D. C. Alberto e B. Sergio, «Edwards Sapien Valve: Novità e risultati a lungo termine,» *Il Giornale Italiano di Cardiologia Invasiva*, n. 4, 2014.
- [43] «<http://www.corevalve.com/evolut-r/>,» [Online].
- [44] A. S. Petronio, C. Giannini, M. Angelillis e G. Benedetti, «Medtronic CoreValve: novità e risultati a lungo termine,» *Il giornale italiano di Cardiologia Invasiva*, n. 4, 2014.
- [45] v. d. B. Robert M, N. Rutger-Jan, V. M. Nicolas e al, «New conduction abnormalities after TAVI: frequency and causes,» *Nature Reviews Cardiology*, vol. 9, pp. 454-463, 2012.
- [46] Clavel e al, «Comparison of the Hemodynamic Performance of Percutaneous and Surgical Bioprostheses for the Treatment of Severe Aortic Stenosis,» *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 53, n. 20, pp. 1883-1891, 2009.
- [47] Langer e Vacanti, «Tissue engineering,» *Science*, vol. 260, pp. 920-926, 1993.
- [48] E. Fallahirezouard, M. Ahmadipourroudposht, A. Idris e N. M. Yusof, «A review of: Application of synthetic scaffold in tissue engineering heart valves,» *Materials Science and Engineering*, vol. 48, pp. 556-565, 2015.
- [49] Pavan, Pachera, Tiengo e Natali, «Biomechanical behaviour of pericardial human

- tissue: A constitutive formulation,» *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, vol. 228, n. 9, pp. 926-34, 2014.
- [50] J. M. G. Páez, E. J. Herrero, A. Carrera, I. Millán, A. Rocha, A. Cordón, J. Salvador, N. Sainz, J. Méndez e J. L. Castillo-Olivares, «A new method for selecting calf pericardium for use in cardiac bioprostheses on the basis of morphological and mechanical criteria,» *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 12, n. 8, pp. 665-671, 2001.
- [51] M. S. Sacks, W. D. Merryman e D. E. Schmidt, «On the biomechanics of heart valve function,» *Journal of Biomechanics*, pp. 1804-1824, 2009.
- [52] E. D. Hiester e M. S. Sacks, «Optimal bovine pericardial tissue selection sites. I. Fiber architecture and tissue thickness measurements,» *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 39, p. 207–214, 1998.
- [53] J. M. Pàez e E. Jorge-Herrero, «Assessment of Pericardium in Cardiac Bioprostheses: A Review,» *Journal of Biomaterials Applications*, vol. 13, n. 351, 1999.
- [54] Naso, Gandaglia, Bottio, Tarzia, Nottle, D'Apice, Cowan, Cozzi, Galli, Lagutina, Lazzari, Iop, Spina e Gerosa, «First quantification of alpha-Gal epitope in current glutaraldehyde-fixed heart valve bioprostheses.,» *Xenotransplantation*, vol. 20, n. 4, pp. 252-61, 2013.
- [55] Aguiari, Iop, Tuladhar, Fidalgo, Naso, Spina, Gerosa e al., «A New Pericardial Decellularized Scaffold for the Manufacturing of Cardiovascular Substitutes,» *Tissue Engineering*, 2015.
- [56] Spina, Ortolani, E. Messleman, Gandaglia, Bujan e Garcia-Honduvilla, «Isolation of intact aortic valve scaffolds for heart-valve bioprostheses: Extracellular matrix structure, prevention from calcification, and cell repopulation features,» *Journal of Biomedical Materials Research A*, vol. 67, n. 4, pp. 1338-1350, 2003.
- [57] S. Zhang, «Emerging biological materials through molecular self-assembly,» *Biotechnology Advances*, vol. 20, n. 5-6, pp. 321-339, 2002.
- [58] B. Biosciences, «BD™ PuraMatrix™ Peptide Hydrogel».

- [59] X. Yuan, B. He, Z. Lv e S. Luo, «Fabrication of self assembling peptide nanofiber hydrogels for myocardial repair,» *RSC Advances*, vol. 4, n. 96, pp. 53801-53811, 2014.
- [60] B. Sitharaman, *Nanobiomaterials Handbook*, CRC Press, 2011.
- [61] Leon, Verma, Zhang, Lauffenburger e Kamm, «Mechanical properties of a self assembling oligopeptide matrix,» *Journal of Biomaterials - Polymer Science Edition*, vol. 9, n. 3, pp. 297-312, 1998.
- [62] Y. Hong, R. L. Legge, S. Zhang e a. P. Chen, «Effect of Amino Acid Sequence and pH on nanofiber formation of self assembling peptides EAK16-II and EAK16-IV,» *Biomacromolecules* 2003, 4, 1433-1442, vol. 4, pp. 1433-1442, 2003.
- [63] Ye, Zhang, Luo, Wang e al., «Temperature and pH effects on biophysical and morphological properties of self-assembling peptide RADA16-I,» *Journal of Peptide Science*, vol. 14, n. 2, pp. 152-62, 2008.
- [64] Ellis-Behnke e al., «Nano neuro knitting: Peptide nanofiber scaffold for brain repair and axon regeneration with functional return of vision,» *PNAS*, vol. 103, n. 19, p. 5054–5059, 2006.
- [65] Kisiday e al., «Self-assembling peptide hydrogel fosters chondrocyte extracellular matrix production and cell division: Implications for cartilage tissue repair,» *Pnas*, vol. 99, n. 15, p. 9996–10001, 2002.
- [66] S. Zhang, T. C. Holmes, C. M. DiPersio, R. O. Hynes, X. Su e A. Rich, «Self-complementary oligopeptide matrices support mammalian cell attachment,» *Biomaterials*, vol. 16, pp. 1385-1393 , 1995.
- [67] M. Nune, P. Kumaraswamy, U. M. Krishnan e S. Sethuraman, «Self-Assembling Peptide Nanofibrous Scaffolds for Tissue Engineering: Novel Approaches and Strategies for Effective Functional Regeneration,» *Current Protein and Peptide Science*, vol. 14, pp. 70-84, 2013.
- [68] E. Garreta, E. Genovè e S. B. C. E. Semino, «Osteogenic Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells and Mouse Embryonic Fibroblasts in a Three-Dimensional Self-Assembling Peptide Scaffold,» *Tissue Engineering* , vol. 12, n. 8, pp. 2215-2227, 2006.

- [69] F. Zhang, G.-S. Shi, L.-F. Ren, F.-Q. Hu, S.-L. Li e Z.-J. Xie, «Designer self-assembling peptide scaffold stimulates pre-osteoblast attachment, spreading and proliferation,» *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 20, n. 7, pp. 1475-1481, 2009.
- [70] A. Horii, X. Wang, F. Gelain e S. Zhang, «Biological designer self-assembling peptide nanofibers scaffolds significantly enhance osteoblast proliferation, differentiation and 3-D migration,» *PloS ONE*, vol. 2, pp. 190-199, 2007.
- [71] D. E. Discher, P. Janmey e Y.-l. Wang, «Tissue Cells Feel and Respond to the Stiffness of Their Substrate,» *Science*, vol. 310, n. 5751, pp. 1139-1143, 2005.
- [72] Sieminski, Semino, Gong e Kamm, «Primary sequence of ionic self assembling peptide gels affects endothelial cell adhesion and capillary morphogenesis,» *Wiley InterScience*, pp. 494-504, 2007.
- [73] J. E. Peter X. Ma, *Scaffolding In Tissue Engineering*, CRC Press, 2005.
- [74] J. D. Hartgerink, E. Beniash e S. I. Stupp, «Self-Assembly and Mineralization of Peptide-Amphiphile Nanofibers,» *Science*, vol. 294, n. 5547, pp. 1684-1687, 2001.
- [75] Iop, Bonetti, Naso, Rizzo, Cagnin e Bianco, «Decellularized Allogeneic Heart Valves Demonstrate Self-Regeneration Potential after a Long-Term Preclinical Evaluation,» *PLoS ONE*, vol. 9, n. 6, 2014.
- [76] *Protein and Peptide Folding, Misfolding, and Non-Folding*, Wiley.
- [77] R. Gambaretto, *Peptidi per la progettazione di biomateriali innovativi: sintesi e studi conformazionali*, 2004.
- [78] Guarise, *Caratterizzazione meccanica e morfologica di idrogeli di peptidi auto-aggreganti: effetto della reticolazione covalente [Tesi di laurea]*, 2014.
- [79] S. Bottin, «Valvole cardiache "self seeding" bioingegnerizzate: sintesi e caratterizzazione di matrici di peptidi autoassemblanti decorate con sequenze adesive e fattori di crescita.,» 2013.
- [80] A. Zamuner, «Progettazione di valvole cardiache "self seeding": peptidi autoaggreganti come "filler" per pericardio decellularizzato,» 2012.
- [81] Bose-Corporation
- [82] M. Fiorese, *Caratterizzazione meccanica del pericardio porcino e bovino per la*

- realizzazione di protesi valvolari cardiache percutanee [Tesi di laurea], 2014.
- [83] M. A. Gatzoulis, L. Swan, J. Therrien e P. George A, *Cardiopatie congenite dell'adulto: una guida pratica*, Springer, 2007.
- [84] P. M. Crapo, T. W. Gilbert e S. f. Badylak, «An overview of tissue and whole organ decellularization processes,» *Biomaterials*, vol. 32, n. 12, pp. 3233-43, 2011.
- [85] S. Zhang, F. Gelain e X. Zhao, «Designer self-assembling peptide nanofiber scaffolds for 3D tissue cell cultures,» *Seminars in Cancer Biology* , vol. 12, pp. 413-420, 2005.
- [86] X. Z. F. Pan e J. R. Lu, «Recent development of peptide self-assembly,» *Progress in Natural Science*, vol. 18, n. 6, pp. 653-660, 2008.
- [87] T. C. Holmes, «Novel peptide-based biomaterial scaffolds for tissue engineering,» *TRENDS in Biotechnology*, vol. 20, n. 1, 2002.
- [88] S. Neuenschwander e S. P. Hoerstrup, «Heart Valve Tissue Engineering,» *Transplant Immunology* , vol. 12, pp. 359-365, 2004.
- [89] J. B. Matson, R. H. Zha e S. I. Stupp, «Peptide self-assembly for crafting functional biological materials,» *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, vol. 15, pp. 225-235, 2011.
- [90] Jun, Hong, Imamura, Ha, Bechhoefer e Chen, «Self-Assembly of the Ionic Peptide EAK16: The Effect of Charge Distributions on Self-Assembly,» *Biophysical Journal*, vol. 87, n. 2, p. 1249–1259, 2004.
- [91] S. Maude, E. Ingham e A. Aggeli, «Biomimetic self-assembling peptides as scaffolds for soft tissue engineering,» *Nanomedicine* , vol. 8, n. 5, pp. 823-847, 2013.
- [92] D. Chow, M. L. Nunalee, D. W. Lim, A. J. Simnick e A. Chilkoti, «Peptide-based Biopolymers in Biomedicine and Biotechnology,» *Materials Science and Engineering R: Reports*, vol. 62, n. 4, pp. 125-155, 2008.
- [93] S. Zhang e M. Altman, «Peptide self-assembly in functional polymer science and engineering,» *Reactive and Functional Polymers*, vol. 41, n. 1-3, p. 91–102, 1999.
- [94] J. Castillo-León, K. B. Andersen e W. E. Svendsen, «Self-Assembled Peptide Nanostructures for Biomedical Applications: Advantages and Challenges,» in

Biomaterial Science and Engineering, InTech, 2011.

- [95] J. Hülsmann, K. Grün, S. E. Amouri, MareikeBarth, K. Hornung, C. Holzfuß, A. Lichtenberg e P. Akhyari, «Transplantation material bovinepericardium: biomechanical and immunogenic characteristics after decellularization vs. glutaraldehyde-fixing,» *Xenotransplantation* , vol. 19, pp. 286-297, 2012.
- [96] V. I, «Heart Valve Tissue Engineering,» *Circulation Research*, vol. 97, pp. 743-755, 2005.
- [97] Zioupos, Barbenel e Fisher, «Anisotropic elasticity and strength of glutaraldehyde fixed bovine pericardium for use in pericardial bioprosthetic valves,» *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 28, pp. 49-57, 1994.
- [98] Yang, «Favorable effects of the detergent and enzyme extraction method for preparing decellularized bovine pericardium scaffold for tissue engineered heart valves,» *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*, vol. 91B, pp. 354-361, 2009.
- [99] Dong, Wei, Yi, Gu, Kang, Liu, Li e Yi, «RGD-modified acellular bovine pericardium as a bioprosthetic scaffold for tissue engineering,» *J Mater Sci: Mater Med*, vol. 20, pp. 2327-2336, 2009.

