



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**



DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**SVILUPPO DI PROTESI VALVOLARI CARDIACHE MEDIANTE
L'APPROCCIO DELL'INGENERIA DEI TESSUTI**

Relatore: Prof.ssa Silvia Todros

Laureanda: Carlotta Vignaga

ANNO ACCADEMICO 2021 – 2022

Data di laurea 19 luglio 2022

INDICE

ABSTRACT

INTRODUZIONE

1. IL MUSCOLO CARDIACO

1.1 ANATOMIA DEL MUSCOLO CARDIACO

2. LE VALVOLE CARDIACHE

2.1 ANATOMIA E FUNZIONAMENTO DELLE VALVOLE CARDIACHE

2.1.1 VENTRICOLO DESTRO: ORIFIZI E VALVOLE

2.1.2 VENTRICOLO SINISTRO: ORIFIZI E VALVOLE

2.2 VALVULOPATIE

3. PROTESI VALVOLARI CARDIACHE

3.1 VALVOLE CARDIACHE MECCANICHE

3.1.1 Valvole cardiache *caged ball*

3.1.2 Valvole cardiache *tilting disc*

3.1.3 Valvole cardiache *bileaflet*

3.2 VALVOLE CARDIACHE BIOLOGICHE

4. PROTESI VALVOLARI CARDIACHE OTTENUTE MEDIANTE TECNICHE DI INGEGNERIA TISSUTALE

4.1 TEHV

4.2 SUBSTRATI PER LA PROGETTAZIONE DI VALVOLE CARDIACHE

INGEGNERIZZATE

4.2.1 STENTED-TEHV CON SCAFFOLD ELASTOMERICO

4.2.2 TEHV CON SCAFFOLD POLIMERICO RIPOPOLATO CON CELLULE

DERIVANTI DA CORDONE OMBELICALE VASCOLARIZZATO CRIOCONSERVATO

4.3 DECELLULARIZZAZIONE DEI SUBSTRATI BIOLOGICI

4.4 RICELLULARIZZAZIONE DEI SUBSTRATI

4.5 RUOLO DEI BIOREATTORI NELL'INGEGNERIA TISSUTALE

4.5.1 Bioreattori statici

4.5.2 Bioreattori dinamici

4.5.3 Effetti di parametri non fisiologici sulla ricellularizzazione delle valvole cardiache

5. 3D BIOPRINTING PER LA REALIZZAZIONE DI TESSUTI FUNZIONALI E LA NUOVA PROSPETTIVA DELLA MEDICINA RIGENERATIVA

5.1 PRINCIPALI METODI DI BIOSTAMPA 3D

5.2 PROTESI VALVOLARI CARDIACHE OTTENUTE MEDIANTE TECNICHE DI STAMPA 3D

CONCLUSIONI

BIBLIOGRAFIA

ABSTRACT

Questo lavoro di tesi nasce dalla volontà di approfondire il nuovo e promettente approccio dell'Ingegneria Tissutale, identificata con l'acronimo TE (*Tissue Engineering*), branca dell'ingegneria che combina principi fisici e ingegneristici con le scienze della vita al fine di realizzare tessuti e organi funzionanti in grado di simulare i corrispettivi costrutti biologici, per ripristinare, sostituire o migliorare le funzionalità di tessuti o organi danneggiati.

In particolare, il focus di questa ricerca è l'applicazione di questa branca dell'ingegneria alla realizzazione di protesi valvolari cardiache, ponendo particolare attenzione agli aspetti innovativi di questa tecnologia, allo scopo di superare i limiti delle protesi valvolari cardiache realizzate tramite i metodi tradizionali.

Nella prima parte, vengono descritti il muscolo cardiaco, nel suo complesso, e le valvole cardiache nello specifico, analizzando poi le possibili patologie a cui possono andare incontro e che comportano in ultima analisi una loro sostituzione.

Vengono quindi riportate le tipologie di protesi valvolari cardiache tradizionali, meccaniche e biologiche, sottolineandone i rispettivi pregi e difetti: le valvole meccaniche risultano vantaggiose in termini di durevolezza, ma costringono il paziente ad una terapia anticoagulante a vita, a causa del loro potenziale trombotico; le valvole biologiche, al contrario, presentano un basso potenziale trombotico e non richiedono la somministrazione di una terapia anticoagulante a lungo termine, ma la loro durata è nettamente inferiore rispetto a quella delle valvole meccaniche, tanto che spesso comportano complicazioni a 10-15 anni dall'impianto con necessaria sostituzione.

In questo elaborato, nello specifico, si analizza l'applicazione della TEHV (*Tissue Engineering of Heart Valve*), ingegneria tissutale della valvola cardiaca, che definisce l'applicazione delle tecniche di ingegneria tissutale alla progettazione di valvole cardiache. Nel dettaglio, vengono valutati i substrati utilizzati nella realizzazione di valvole cardiache ingegnerizzate, la loro decellularizzazione e ricellularizzazione e il ruolo svolto dai bioreattori nell'applicazione di queste tecniche, fornendo due esempi concreti di realizzazione di TEHV: stented-TEHV con scaffold elastomerico e TEHV con scaffold polimerico ripopolato con cellule derivanti da cordone ombelicale vascolarizzato crioconservato.

Infine, si riporta qualche cenno relativo alle diverse tecniche di biostampa (*Bioprinting*), una tra le più recenti e promettenti tecniche di ingegneria tissutale che consente di generare strati di cellule preservando il funzionamento di queste nella formazione di tessuti organici, con imprescindibile riferimento al mondo della medicina rigenerativa.

È soprattutto in ambito pediatrico, dove vi è una significativa necessità di sostituzione di valvole cardiache e le valvole protesiche sia meccaniche che biologiche non risultano essere in grado di

crescere e maturare con il paziente una volta impiantate, che le valvole ingegnerizzate risultano essere un'ottima soluzione. Una valvola cardiaca ingegnerizzata, infatti, una volta impiantata nel paziente, risulta essere un organo vivente a tutti gli effetti, in grado di rispondere alla crescita e ai processi fisiologici analogamente ad una valvola cardiaca nativa.

In conclusione, questo nuovo approccio della TEHV evidenzia come sia possibile realizzare nuove strutture metabolicamente attive e anatomicamente funzionanti in grado di sostituire le corrispettive strutture anatomiche malfunzionanti, superando i limiti dei costrutti protesici attualmente in uso.

1. IL MUSCOLO CARDIACO

1.1 ANATOMIA DEL MUSCOLO CARDIACO

Il cuore (Figura 1) è l'organo centrale del sistema cardiovascolare. È un organo muscolare, cavo, impari e paramediano che, grazie alle sue contrazioni ritmiche, funge da pompa, permettendo la circolazione del sangue all'interno dei vasi sanguigni. È collocato nella cavità toracica, nel mediastino medio o anteroinferiore, tra le due logge pleuropolmonari, ed è avvolto da un sacco fibroso detto pericardio. Presenta la forma di un cono leggermente appiattito in senso anteroposteriore con la base rivolta in alto, a destra e all'indietro, mentre l'apice in basso, a sinistra e in avanti.

Il muscolo cardiaco, in relazione alla sua forma, presenta a livello macroscopico: una faccia anteriore, chiamata faccia sternocostale; una faccia posteroinferiore, chiamata faccia diaframmatica, che poggia sul centro tendineo del diaframma; una base, formata esclusivamente dalla faccia posteriore dei due atri, verso la quale convergono i vasi; un apice o punta, corrispondente all'apice del ventricolo sinistro e due margini, uno destro e uno sinistro, i quali delimitano rispettivamente a destra e a sinistra il graduale passaggio tra la faccia sternocostale e la faccia diaframmatica [1].

Sulla superficie esterna il cuore è attraversato da solchi che delimitano le cavità che lo compongono: il solco coronarico (o atrioventricolare), che separa la porzione atriale da quella ventricolare, dividendo quindi in due la faccia sternocostale; il solco interatriale, che separa l'atrio destro da quello sinistro; i solchi interventricolari anteriore e posteriore, che segnano il limite tra i due ventricoli sulla faccia sternocostale e il solco terminale, che divide le due vene cave dall'auricola destra, piccola estroflessione dell'atrio destro che abbraccia il tratto iniziale dell'arteria aorta.

Dal punto di vista microscopico, la parete del muscolo cardiaco appare costituita da tre tonache sovrapposte: l'endocardio, il miocardio e il pericardio, dall'interno all'esterno rispettivamente.

L'endocardio riveste la superficie interna di tutte le cavità cardiache risalendo sulle corde tendinee e sulle valvole semilunari e atrioventricolari, ed è costituito da un sottile strato di cellule endoteliali appoggiato su uno strato di tessuto connettivo sottoendoteliale. Il tessuto connettivo dell'endocardio è composto da numerose fibre elastiche e collagene, contiene inoltre vasi sanguigni e particolari fibre muscolari cardiache – fibre di Purkinje [1] – che presentano una conducibilità maggiore dei comuni cardiomiociti.

Il miocardio è la tonaca maggiormente presente in termini di spessore ed è costituito da muscolo striato cardiaco. È organizzato in modo tale da formare due sistemi indipendenti, uno per gli atri e uno per i ventricoli, separati dall'interposizione dello scheletro fibroso sul quale si inseriscono le cellule muscolari. Il miocardio presenta uno spessore differente in rapporto alla forza contrattile che ogni cavità deve esercitare per la propulsione del sangue. Di conseguenza, la parete degli atri risulta

più sottile di quella dei ventricoli e la parete del ventricolo sinistro è tre volte più spessa di quella del ventricolo destro.

Il pericardio, infine, è il sacco fibrosiero che contiene il cuore e l'origine dei grossi vasi. Presenta una parte esterna, connettivale, il pericardio fibroso, e una interna, il pericardio sieroso.

Internamente, il muscolo cardiaco risulta suddiviso in quattro cavità: due posterosuperiori, gli atri destro e sinistro separati dal setto interatriale, e due anteroinferiori, i ventricoli destro e sinistro separati dal setto interventricolare. Ogni atrio è collegato al ventricolo sottostante per mezzo dell'orifizio atrioventricolare dotato di un sistema valvolare che consente il deflusso di sangue nella direzione che va dall'atrio al ventricolo, e non viceversa.

Le due metà del cuore non comunicano tra loro, ma sono separate da un setto, di natura principalmente muscolare, denominato superiormente setto interatriale, dato che separa tra loro i due atri, e inferiormente setto interventricolare, dato che divide i due ventricoli.

Le vene confluiscono negli atri, mentre dai ventricoli si dipartono le arterie, all'origine delle quali vi sono le valvole semilunari che consentono il flusso di sangue dai ventricoli alle rispettive arterie e non viceversa.

Il cuore è irrorato dalle due arterie coronarie, destra e sinistra, le quali costituiscono il circolo coronarico. Queste arterie e le loro ramificazioni principali decorrono sulla superficie esterna del cuore, ricoperte dall'epicardio (foglietto viscerale del pericardio sieroso, costituito da un singolo strato di cellule pavimentose che poggiano su una membrana connettivale che aderisce esternamente al miocardio), accolte nei solchi coronarico e interventricolare. Originano dall'aorta ascendente. Il sangue refluo, invece, proveniente dalla circolazione coronarica, viene raccolto da tre sistemi venosi: seno coronarico, vene cardiache anteriori e vene minime [1].

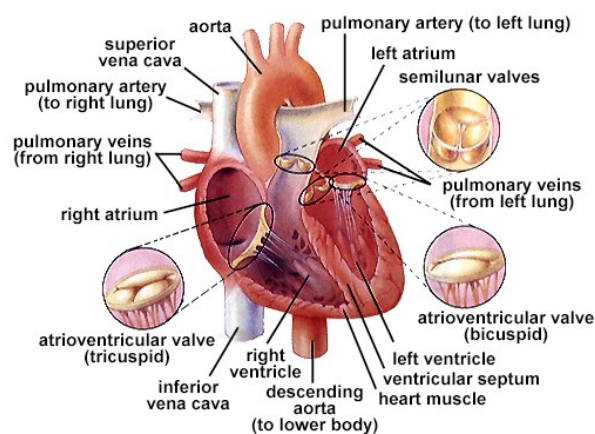


Figura 1: Cuore e valvole cardiache [2].

2. LE VALVOLE CARDIACHE

2.1 ANATOMIA E FUNZIONAMENTO DELLE VALVOLE CARDIACHE

Le valvole cardiache (Figura 2) sono le strutture anatomiche che separano tra loro le cavità cardiache, atri e ventricoli, e questi ultimi dai grandi vasi, aorta e arteria polmonare. Esse sono quattro e hanno la caratteristica di aprirsi e chiudersi in modo coordinato rispetto al battito cardiaco, garantendo così un flusso sanguigno unidirezionale. Le due valvole atrioventricolari sono collocate a livello delle aperture tra atri e ventricoli; le due valvole semilunari sono localizzate all'origine dell'arteria polmonare e dell'arteria aorta nel ventricolo destro e sinistro, rispettivamente.

2.1.1 VENTRICOLO DESTRO: ORIFIZI E VALVOLE

L'atrio destro comunica con il ventricolo destro grazie all'orifizio atrioventricolare destro, provvisto di una valvola, la valvola atrioventricolare destra, formata da tre lembi o cuspidi valvolari, denominata valvola tricuspide [1]. Le tre cuspidi hanno forma triangolare e sono distinte, per la posizione che occupano, in cuspidi settale o mediale, cuspidi anteriore e cuspidi posteriore. I lembi valvolari con la loro base si fissano al contorno dell'orifizio e i margini liberi danno inserzione alle corde tendinee. Sempre a livello della base del muscolo cardiaco, considerando le cavità del ventricolo destro, si osserva l'orifizio del tronco polmonare, posto anteriormente e più in alto rispetto al precedente, munito di un apparato valvolare costituito da tre valvole semilunari a forma di nido di rondine, con la concavità rivolta verso l'alto. Il margine libero di ciascuna valvola, chiamato lunula, presenta nel suo punto centrale un piccolo rigonfiamento, detto nodulo delle valvole semilunari, il quale consente la completa chiusura dell'orifizio durante la fase di diastole ventricolare. Nel loro insieme le tre valvole semilunari, anteriore, destra e sinistra, formano la valvola polmonare. La valvola polmonare, posta tra il ventricolo destro e l'arteria polmonare, ha la funzione di assicurare che il sangue non ossigenato non fluisca indietro.

2.1.2 VENTRICOLO SINISTRO: ORIFIZI E VALVOLE

In modo analogo a quanto accade a livello dell'atrio destro, l'atrio sinistro comunica con il ventricolo sottostante per mezzo dell'orifizio atrioventricolare sinistro, dotato della valvola atrioventricolare sinistra, costituita da due cuspidi o lembi valvolari affrontati, chiamata per questo valvola bicuspidi o mitrale. I due lembi valvolari hanno forma trapezoidale e sono distinti, per la loro posizione, in un lembo anteriore e in un lembo posteriore. Come avviene per i lembi della valvola tricuspide, essi hanno un margine aderente che si colloca sul contorno dell'orifizio atrioventricolare e un margine libero rivolto verso la cavità del ventricolo sinistro, al quale aderiscono le corde tendinee dei muscoli

papillari. L'altro orifizio presente alla base del ventricolo sinistro è l'orifizio aortico, mediante il quale il ventricolo comunica, rispettivamente con l'atrio sovrastante e con l'aorta. Quest'ultimo è provvisto di tre valvole semilunari aortiche con morfologia e modalità d'inserzione simili alle valvole dell'orifizio del tronco polmonare, le quali presentano anch'esse sul loro margine libero un piccolo rigonfiamento, denominato sempre nodulo delle valvole semilunari. Complessivamente tali valvole semilunari formano la valvola aortica [1].

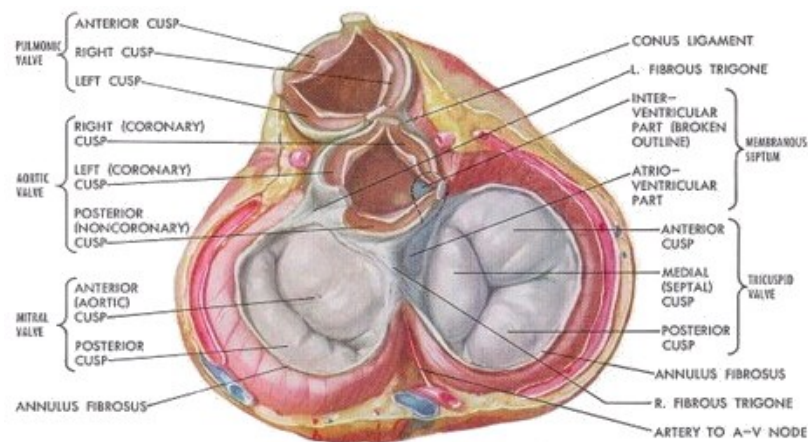


Figura 2: Valvole cardiache durante la fase di sistole ventricolare [3]

2.2 VALVULOPATIE

Le malattie delle valvole cardiache si definiscono valvulopatie e sono importanti patologie a carico dell'apparato cardiovascolare che spesso comportano la sostituzione chirurgica della valvola danneggiata con un dispositivo protesico. Le valvole cardiache possono diventare stenotiche o insufficienti, con alterazioni emodinamiche che si verificano molto prima dell'insorgenza dei sintomi. Con il termine stenosi si intende l'incompleta apertura della valvola in esame e il sangue è costretto a scorrere attraverso un orifizio più piccolo rispetto alla norma; con insufficienza si indica invece l'incompleta chiusura della valvola in esame e parte del sangue torna indietro attraverso la valvola che dovrebbe essere chiusa per impedire il reflusso. Nella maggior parte dei casi, stenosi o insufficienza si verificano isolate nelle singole valvole, ma talvolta possono coesistere causando malattie valvolari multiple, e una stessa valvola può quindi essere sia stenotica che insufficiente (stenoinsufficienza).

Le patologie delle valvole cardiache comprendono:

- Insufficienza aortica: insufficienza della valvola aortica che causa un reflusso di sangue dall'aorta al ventricolo sinistro durante la fase di diastole ventricolare.

- Stenosi aortica: restringimento della valvola aortica che ostruisce il passaggio del flusso ematico dal ventricolo sinistro all'aorta ascendente durante la fase di sistole.
- Insufficienza mitralica: insufficienza della valvola mitrale che determina un reflusso di sangue dal ventricolo sinistro all'atrio sinistro durante la sistole ventricolare.
- Stenosi mitralica: restringimento dell'orifizio mitralico che ostacola il passaggio di sangue dall'atrio sinistro al ventricolo sinistro.
- Insufficienza polmonare: insufficienza della valvola polmonare che determina un reflusso di sangue dall'arteria polmonare nel ventricolo destro durante la diastole ventricolare.
- Stenosi polmonare: restringimento del diametro della valvola polmonare che causa ostruzione al passaggio di sangue dal ventricolo destro all'arteria polmonare durante la fase di sistole.
- Insufficienza tricuspide: insufficienza della valvola tricuspide che comporta un passaggio di sangue dal ventricolo destro all'atrio destro durante la fase di sistole.
- Stenosi tricuspide: restringimento dell'orifizio della valvola tricuspide che ostruisce il passaggio di sangue dall'atrio destro al ventricolo destro.

Le valvulopatie possono essere presenti sin dalla nascita, cioè congenite, oppure insorgere nel corso della vita, e in questo caso sono dette acquisite. L'origine delle valvulopatie acquisite può essere degenerativa, se dovuta a usura delle strutture valvolari; infettiva, in presenza di endocardite¹; ischemica, se è in corso un infarto del miocardio acuto; traumatica; secondaria a cospicua dilatazione del ventricolo e/o dei grandi vasi. La gestione di una patologia valvolare spesso richiede solo un controllo periodico, senza trattamento attivo per molti anni. In generale, né lo stile di vita, né i farmaci comportano modifiche alla naturale evoluzione delle valvulopatie, che solitamente sono caratterizzate da una fase anche molto lunga di completa asintomaticità.

Laddove, però, una valvulopatia insorga in modo acuto su una valvola fino a quel momento funzionante, ad esempio a causa di traumi, infarto miocardico o endocardite con perforazione dei lembi valvolari, il quadro clinico si complica notevolmente. Le conseguenze delle patologie valvolari dipendono dal tipo di anomalia, stenosi o insufficienza, e dalla sua gravità; in generale, la conseguenza estrema di ogni valvulopatia è lo scompenso cardiaco.

Le malattie delle valvole del settore sinistro del cuore, valvole mitrale e aortica, sono molto più frequenti rispetto a quelle delle valvole del settore destro, tricuspide e polmonare, dove vige un regime pressorio più basso.

¹ Infezione dell'endocardio e delle valvole cardiache, di solito di natura batterica.

Sebbene la terapia farmacologica (con l'utilizzo di farmaci quali diuretici, ACE-inibitori, antiaritmici, vasodilatatori, antiaggreganti e anticoagulanti) abbia l'obiettivo di rallentare la progressione e/o di controllare la sintomatologia delle patologie congenite e acquisite a lenta evoluzione, o di contribuire alla stabilizzazione clinica delle valvulopatie acute, l'unico trattamento risolutivo delle valvulopatie è la terapia chirurgica, che consiste nella riparazione o sostituzione della valvola danneggiata con un equivalente protesico.

Da qualche anno, inoltre, nel caso di pazienti anziani o pazienti che non tollerano un intervento chirurgico a cuore aperto, si può intervenire su una valvola aortica stenotica anche per via endovascolare, attraverso un intervento denominato *Transcatheter Aortic Valve Implantation*, TAVI (Trattamento percutaneo della valvulopatia aortica). Quest'ultimo consiste nell'applicazione di una protesi valvolare sulla valvola patologica, precedentemente dilatata.

In presenza di stenosi, le valvole stenotiche possono anche essere dilatate mediante valvuloplastica, procedura che prevede l'inserimento e il posizionamento di un catetere con palloncino in corrispondenza della valvola, e quindi gonfiato per dilatarla [4].

3. PROTESI VALVOLARI CARDIACHE

Quando le valvole cardiache sono danneggiate al punto da non essere più riparabili, si procede, tramite intervento chirurgico, alla rimozione e alla sostituzione di queste ultime con protesi valvolari cardiache che ne simulino il comportamento.

La protesi valvolare cardiaca ideale dovrebbe avere le seguenti caratteristiche: essere in grado di aprirsi e chiudersi passivamente seguendo i livelli pressori a monte e a valle e farlo in tempi estremamente rapidi; non provocare durante l'apertura perdite di pressione al flusso ematico che la attraversa e durante la chiusura impedire eventuali reflussi; mantenere inalterate le sue caratteristiche chimico-fisiche e meccaniche per un lasso temporale pari all'aspettativa di vita del paziente; non causare né coagulazione né emolisi né alterazioni del sangue e dei tessuti circostanti in generale; essere almeno in parte radiopaca in modo da consentire il controllo del suo funzionamento tramite radiografia; essere dimensionalmente adatta alle taglie dei diversi portatori e infine essere facilmente impiantabile e silenziosa.

Attualmente, due tipi di protesi valvolari cardiache sono maggiormente utilizzate: le protesi valvolari meccaniche e le protesi valvolari biologiche, che si differenziano per il differente profilo emodinamico, la diversa durezza, l'effettiva area orificiale e la trombogenicità.

3.1 VALVOLE CARDIACHE MECCANICHE

Le protesi valvolari meccaniche sono più antiche in termini di data di utilizzo. Esse sono realizzate principalmente con materiali metallici, polimerici e carbonio, tutti materiali in grado di non deformarsi eccessivamente a seguito di sollecitazioni meccaniche.

Il principale vantaggio delle valvole meccaniche è dovuto alla loro maggiore durevolezza rispetto alle protesi valvolari biologiche (hanno una durata di circa 20-30 anni), ma costringono il paziente ad una terapia anticoagulante a vita, essendo potenzialmente trombogeniche.

Le tre componenti principali che compongono una protesi valvolare meccanica sono: l'occlusore, la parte mobile della protesi, che deve aprirsi e chiudersi senza interferenze e assecondare gli sbalzi pressori del flusso ematico; l'*housing*, ovvero l'alloggiamento, struttura che contiene l'occlusore e ne coordina il movimento, solitamente costituito da un anello di metallo rivestito in carbonio pirolitico, materiale altamente emocompatibile; e il *sewing ring* o anello di sutura, punto di ancoraggio tra la protesi e i tessuti del ricevente.

A seconda della diversa tipologia di occlusore, si possono distinguere tre tipi di valvole meccaniche: *caged-ball*, *single-tilting-disk* e *bileaflet-tilting-disk*.

Le protesi valvolari meccaniche presentano anche una diversa conformazione a seconda delle caratteristiche del flusso sanguigno che le attraversa: quelle con il flusso ematico periferico, cioè lungo il bordo interno della valvola; e quelle con il flusso ematico centrale, al centro della valvola [5].

3.1.1 VALVOLE CARDIACHE CAGED-BALL

Le protesi valvolari *caged-ball* (Starr-Edwards, Smelof-Cutter) [9], a palla ingabbiata, presentano un elemento centrale di chiusura e il flusso di sangue che le attraversa è di tipo periferico. Esse sono composte da un anello metallico e tre o quattro elementi simmetrici che vanno a costituire una gabbia chiusa. I materiali metallici impiegati per l'anello rigido e le gabbie sono solitamente leghe Co-Cr-Mo-Ni (nome commerciale Stellite 21®) e leghe di Ti. L'anello metallico è poi ricoperto dall'anello di sutura realizzato in PTFE (Politetrafluoroetilene, Teflon®) o PET (Polietilenteraftalato, Dacron®), resine acetaliche (Delrin®). L'occlusore a palla è in gomma siliconica (Silastic®) impregnata di solfato di bario che la rende radiopaca.

Questa tipologia di valvola, sebbene di notevole resistenza strutturale e durevolezza, è ormai completamente superata a causa di una serie di problemi non irrilevanti. Le criticità che presenta sono legate a importanti fenomeni di emolisi e trombosi, a causa delle forze di entità rilevanti che si accompagnano alla chiusura; a fenomeni di elevata caduta di pressione, dal momento che la posizione

centrale della palla crea occlusione del flusso; inoltre, a livello morfologico, l'altezza decisamente più elevata rispetto ad una valvola naturale rende difficoltoso l'impatto.

La presenza della palla a valle del lume valvolare, infatti, disturba fortemente la fluidodinamica a valvola aperta; fatto che, in aggiunta alla presenza delle strutture metalliche della gabbia, è potenzialmente trombogenico soprattutto nelle zone di ristagno del sangue. Questa tipologia di valvola, soprattutto in posizione aortica, produce un effetto di stenosi in quanto l'aorta, a valle del lume valvolare, risulta potenzialmente ostruita dalla palla. In posizione mitrale, invece, la gabbia della valvola molto alta in direzione assiale, può urtare le parti interne del ventricolo causando alterazioni nei fenomeni di conduzione elettrica dell'impulso cardiaco e quindi, in ultima analisi, alterazioni al ritmo cardiaco. Altra problematica presentata da questa valvola è legata alla dimensione del diametro della palla, superiore alla sede della gabbia. Questo fa sì che, alla chiusura, la palla si appoggia sulla sede della gabbia, diventando potenziale causa di emolisi per schiacciamento meccanico dei globuli rossi che rimangono intrappolati tra palla e sede della gabbia.

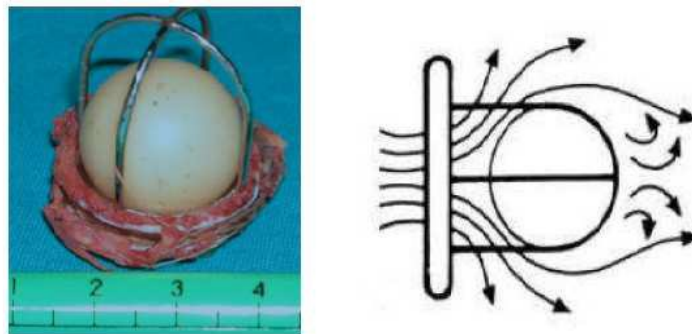


Figura 3: a sinistra, valvola *caged-ball* espantata a 30 anni dall'intervento; a destra, corrispondente ricostruzione del flusso ematico [5].

3.1.2 VALVOLE CARDIACHE TILTING DISC

Le protesi valvolari *tilting disc* [9], a disco oscillante, sono state realizzate per superare alcune delle criticità presentate dalle protesi a palla ingabbiata.

Queste sono costituite da un disco centrale, realizzato principalmente in grafite su cui viene depositato carbonio pirolitico, vincolato a pressione all'interno di un anello circolare mediante due gambetti. Questi ultimi sono solidali ad un anello rigido metallico coassiale con un anello flessibile esterno, in materiale polimerico, che agevola la sutura ai tessuti molli perivalvolari.

Le valvole a disco oscillante presentano notevoli vantaggi rispetto alle prime valvole a palla ingabbiata; esse riducono, senza annullarla, la distorsione del flusso sanguigno e, inoltre, il carbonio pirolitico, avendo ottime proprietà anticoagulanti, può essere finito con superficie molto liscia e

lucidata per promuovere in tal modo la riduzione dei fenomeni di turbolenza, ottenere un effetto antitrombogenico e una buona resistenza all'usura.

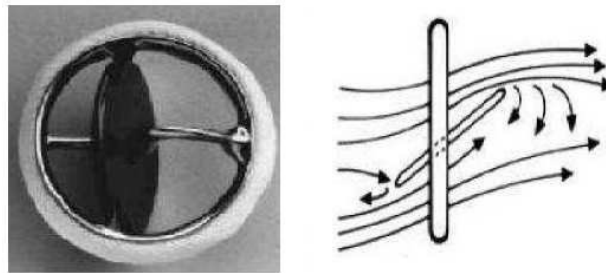


Figura 4: a sinistra, prima valvola *tilting-disc* (Bjork-Shiley, 1967); a destra, corrispondente ricostruzione del flusso ematico [5].

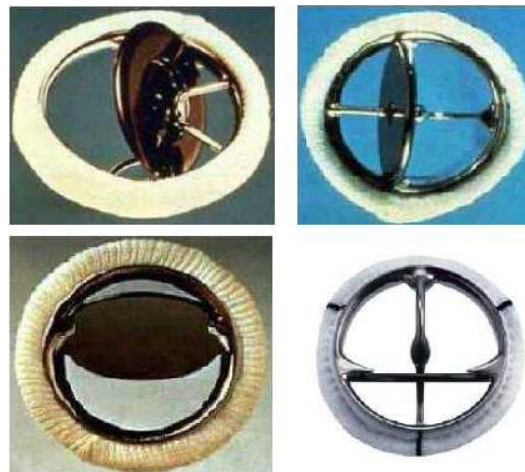


Figura 5: quattro esempi di valvole *tilting-disc*. Da sinistra a destra e dall'alto in basso: modello Bjork-Shiley; modello Lillehei-Kaster; modello Omniscience; modello Medtronic-Hall [5].

3.1.3 VALVOLE CARDIACHE BILEAFLET

Le protesi valvolari *bileaflet* [9], a due emidischi, presentano come elemento mobile due emidischi incernierati al posto del singolo disco oscillante, motivo di notevole miglioramento a livello delle caratteristiche del flusso ematico che le attraversa, molto simili a quelle fisiologiche.

Il disco è costituito da un'anima in grafite impregnata di tungsteno (5-10% in peso) che rende il disco radiopaco, con rivestimento in carbonio pirolitico. L'anello di sutura è realizzato il velluto di Dacron®.

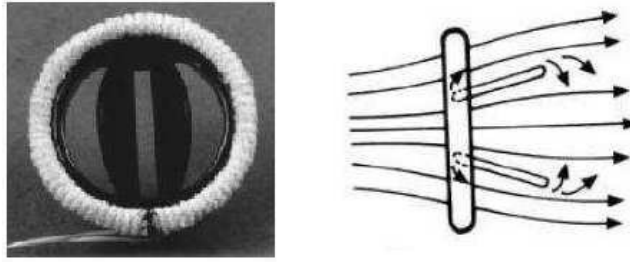


Figura 6: a sinistra, modello di valvola cardiaca *bileaflet*; a destra, corrispondente ricostruzione del flusso ematico [5].

Due possibili esempi di protesi valvolari cardiache meccaniche a due emidischi commercializzate sono la valvola St. Jude Regent e la valvola Sorin Bicarbon Overline.

Le valvole St. Jude Medical (St. Paul, Minnesota, USA) sono le più impiantate nel mondo e rappresentano il “gold standard” come termine di paragone delle prestazioni con altre protesi valvolari; furono impiantate per la prima volta nel 1977. Housing e leaflets sono in grafite, con aggiunta di tungsteno per garantirne la radio-opacità, e il rivestimento è in carbonio pirolitico.

Il modello Regent, utilizzato per la prima volta nel 2000, presenta ottima emocompatibilità e stabilità strutturale come i modelli precedenti, a cui si aggiunge un miglioramento dal punto di vista fluidodinamico. L’anello di sutura, realizzato in PET o PTFE, presenta ottime caratteristiche di flessibilità; aspetto molto importante soprattutto in ambito pediatrico, dove la presenza di protesi di piccole dimensioni è limitata. La struttura della valvola è rappresentata in Figura 7.

Le protesi valvolari della Sorin Biomedica (Saluggia, Italia) in mercato dal 1990, hanno marchio CE, ma non sono ancora state approvate dalla *Food and Drug Administration*. I leaflets di questa valvola sono caratterizzati da uno strato di carbonio pirolitico depositato su un substrato di grafite radio-opaca; l’housing è in lega di titanio (Ti6Al4V) rivestito in Carbofilm™, sottile film di carbonio con struttura analoga a quella del carbonio pirolitico degli occlusori. La lega di titanio presenta ottime caratteristiche di rigidità, in modo da evitare possibili deformazioni dopo l’impianto; il film in carbonio conferisce caratteristiche di biocompatibilità al substrato, senza modificarne le proprietà fisiche e strutturali. L’anello di sutura è realizzato in PET, rivestito in Carbofilm™ nelle zone a contatto con il sangue ed assemblato su un anello di resina acetica che si inserisce in un’apposita scanalatura ricavata sull’housing. Si comprende quindi come le caratteristiche principali di questa valvola siano gli elementi mobili concavo-convessi e la totale sopra-anularità rispetto al ring di sutura. La struttura della valvola è rappresentata in Figura 8.



Figura 7: modello St. Jude Regent [5].



Figura 8: modello Sorin Bicarbon Overline [5].

3.2 VALVOLE CARDIACHE BIOLOGICHE

Le protesi valvolari cardiache biologiche possono essere realizzate utilizzando tessuti animali, in particolare tessuto valvolare prelevato da maiale, valvole porcine, o pericardio di origine bovina, in questo caso si parla di valvole di origine eterologa (*eterograft*); oppure utilizzando valvole umane aortiche prelevate da cadavere, e parliamo allora di valvole di origine omologa (*homograft*).

Le valvole porcine, entrate nell'uso clinico nei primi anni '70, vengono prelevate intatte dal cuore di maiale e successivamente possono essere montate o meno su un supporto rigido, generalmente metallico (lega di cobalto e nichel radiopaca ricoperto da un tessuto poroso di teflon) o polimerico; le prime sono denominate *stented*, mentre le seconde *stentless*.

Esempi di protesi valvolari porcine sono: Hancock, montata su un supporto in polipropilene ricoperto da uno strato di Dacron per avere ottime qualità emodinamiche; Medtronic-Intact, l'unica bioprotesi porcina ottenuta tramite fissazione con glutaraldeide a pressione zero per preservare l'anatomia e le funzioni meccaniche proprie del tessuto valvolare naturale; Medtronic-Mosaic, nella realizzazione della quale si mantiene una pressione di fissazione elevata a livello della radice aortica e una di 0 mmHg a livello dei lembi con l'obiettivo di conservare l'architettura dei lembi valvolari e di migliorare le performance emodinamiche mantenendo la geometria della radice aortica.

Le protesi valvolari di origine bovina sono ottenute a partire dall'assemblaggio di tre lembi di pericardio, in seguito montati su un telaio ultraleggero ricoperto da un panno di PTFE. Il trattamento chimico di fissazione del pericardio è simile a quello usato per le valvole porcine. Il pericardio bovino è strutturalmente differente dal tessuto costituente sia la valvola aortica naturale che quella porcina; è un materiale isotropo costituito da identici strati di collagene orientati parallelamente alla superficie, che vengono cross-linkati immergendo il foglietto pericardico in una soluzione di glutaraldeide e un

amminoacido adibito allo svolgimento della funzione di cross-link. Su tutto lo spessore del pericardio è distribuita elastina, con densità crescente andando verso l'esterno della superficie.

Entrambe queste due tipologie di valvole, al fine di aumentare la resistenza del tessuto alla degradazione chimica ed enzimatica e di ridurre l'immunogenicità del tessuto stesso, vengono pretrattate con glutaraldeide, come già accennato sopra nel caso delle valvole pericardiche.

Dopo il fissaggio, la glutaraldeide residua viene estratta, a cui segue un processo di detossicazione; successivamente, vengono applicati una serie di trattamenti anticalcificanti. Il trattamento con glutaraldeide, reagente chimico non costoso e solubile in acqua presente nella matrice dopo il trattamento, può però comportare seri problemi quali citotossicità, risposta infiammatoria e calcificazione; impedisce, inoltre, la riendotelizzazione ostacolando l'integrazione del dispositivo.

Nel caso di protesi valvolari derivanti da cadavere umano, queste sono sottoposte a crioconservazione, ed è proprio il protocollo di crioconservazione adottato, assieme al tempo intercorso tra il prelievo e l'impianto ed eventuali sbalzi di temperatura in fase di preparazione, che influenzano drasticamente la qualità della valvola stessa. I principali motivi di insuccesso di questa tipologia di valvole sono dovuti al progressivo deterioramento per rottura e perforazioni delle cuspidi a lungo termine, alla difficile e scarsa possibilità di reperimento e alle complicate tecniche di impianto.

Le protesi biologiche hanno complessivamente un basso potenziale trombogenico, motivo per cui la terapia anticoagulante a lungo termine non è richiesta per i pazienti che le ricevono; la loro durata è però minore rispetto a quella delle protesi valvolari meccaniche, spesso infatti comportano complicazioni dopo 10-15 anni dall'impianto e devono, perciò, essere sostituite. Il limite principale delle valvole biologiche è legato al possibile rigetto per effetto della risposta immunitaria del ricevente, devono perciò essere decellularizzate per eliminare dalla matrice tutte le cellule del donatore; questo trattamento altera però i tessuti, modificando le caratteristiche funzionali della matrice extra-cellulare, modificandone le proprietà biochimiche e biomeccaniche. Di conseguenza, queste protesi tendono ad andare incontro a processi degenerativi e di calcificazione che portano, nel tempo, al loro malfunzionamento [5].

Le valvole biologiche sono quindi preferibili in pazienti anziani o con un'aspettativa di vita inferiore ai 10 o 15 anni, durata di una protesi biologica, o che non possono affrontare una terapia anticoagulante a vita [25].

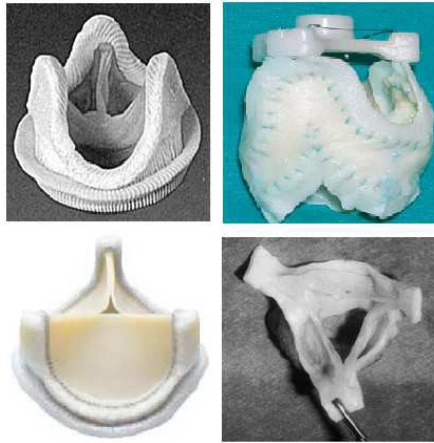


Figura 9: in alto a sinistra, protesi porcina *stented*; in alto a destra, protesi porcina *stentless*: modello Biocor; in basso a sinistra: protesi modello Carpentier-Edwards in pericardio bovino; in basso a destra, valvola aortica prelevata da cadavere [5].

4. PROTESI VALVOLARI CARDIACHE OTTENUTE MEDIANTE TECNICHE DI INGEGNERIA TISSUTALE

L'ingegneria tissutale, come disciplina a sé stante, è sorprendentemente antica. Il termine “*tissue engineering*”, ingegneria tissutale, è stato coniato per la prima volta da Fung nell'Ottobre del 1987 durante un workshop della *Natural Science Foundation* a Washington, DC.

I diversi approcci all'ingegneria tissutale hanno iniziato a comparire in maniera indipendente già durante gli anni '60, quando avanzate tecnologie di coltura dei tessuti venivano usate per moltiplicare cellule epiteliali. A metà degli anni '70, il lavoro di Rheinwald e Green presso l'MIT (Massachusetts Institute of Technology) ha posto le basi per la progettazione di innesti cutanei (*skin grafting*) tramite tessuti coltivati e ripopolati con cheratinociti autologhi.

L'ingegneria tissutale è stata definita in diversi modi, sia semplici che complessi. Una delle definizioni più semplici è quella che si trova nel “*The Biomedical Engineering Handbook*”, che la definisce come “applicazione di principi scientifici alla progettazione, costruzione, modificazione, crescita e mantenimento di tessuti viventi” (“*The application of scientific principles to the design, construction, modification, growth and maintenance of living tissue*”) [21].

Una definizione più complessa è invece quella fornita nel “*World Technology Panel Report*”, frutto della collaborazione di NIH, FDA (*Food and Drug Administration*) e altri enti governativi che afferma: “l'ingegneria tissutale è una tecnica interdisciplinare che applica i principi e i metodi dell'ingegneria e delle scienze biologiche con l'obiettivo di comprendere le relazioni fondamentali tra struttura e funzione nei tessuti sani e malati dei mammiferi e di sviluppare sostituti biologici in

grado di ripristinare, mantenere o migliorarne le funzioni” (“*The application of principles and methods of engineering and life sciences to obtain a fundamental understanding of structure-function relationships in novel and pathological mammalian tissues and the development of biological substitutes to restore, maintain or improve tissue function*” [22]) [6].

Questa tecnica assume un’importanza notevole in ambito di medicina rigenerativa, definita dai National Institutes of Health (NIH) come il processo per creare tessuti viventi adatti alla riparazione o alla sostituzione di organi e tessuti le cui funzioni sono venute meno a causa dell’invecchiamento, delle malattie, dei danni o dei difetti congeniti. In particolare, lo scopo è quello di ricreare in vitro tessuti e organi con le caratteristiche tipiche del ricevente, in modo da non rendere più necessaria la presenza di donatori esterni, minimizzando così i rischi di incompatibilità e di rigetto, essendo le strutture biologiche fabbricate in vitro completamente funzionali e funzionanti.

Per realizzare questi costrutti biologici bisogna seguire alcuni passaggi fondamentali:

- costruire uno scaffold² per l’adesione e la crescita delle cellule;
- prelevare cellule sane dal paziente e coltivarle in attesa della successiva semina;
- identificare specifici segnali biochimici che regolino le funzioni cellulari;
- seminare le cellule sullo scaffold e sottoporre il tutto ad un periodo di incubazione all’interno di un bioreattore [7].

L’ingegneria tissutale, nel suo complesso, richiede notevoli sforzi per combinare principi fisici e ingegneristici alle scienze della vita allo scopo di ripristinare, sostituire o migliorare le funzionalità di tessuti o organi danneggiati. Diversi ambiti scientifici, quali ad esempio la biologia cellulare ed evolutiva, associati alle tecnologie avanzate, come la stampa 3D (*3D bioprinting*), costituiscono le fondamenta dell’ingegneria tissutale avanzata [8].

4.1 TEHV

L’acronimo TEHV sta per *Tissue Engineering of Heart Valve*, ingegneria tissutale della valvola cardiaca, e definisce l’applicazione delle tecniche di ingegneria tissutale alla progettazione di valvole cardiache.

Di fatto, quest’ultima consiste nella manipolazione di cellule e molecole biologiche al fine di realizzare nuove strutture metabolicamente attive e anatomicamente funzionanti, in grado di sostituire le corrispettive strutture malformate o non funzionanti.

² Struttura tridimensionale, naturale o artificiale sulla quale vengono seminate e fatte crescere le cellule al fine di ottenere un costrutto biologico funzionale.

Proprio per i limiti delle diverse protesi valvolari ora in uso, descritti nel capitolo precedente, il nuovo approccio della TE (*Tissue Engineering*) per la progettazione di sostituti valvolari cardiaci risulta essere di notevole interesse e necessità.

Questi limiti risultano particolarmente importanti in ambito pediatrico, nel quale vi è una significativa necessità di sostituzione di valvole cardiache; le disfunzioni cardiache congenite sono infatti presenti in circa l'1% dei neonati e più di un terzo di queste riguardano la valvola aortica o polmonare. In questo caso, però, le valvole protesiche sia meccaniche che biologiche non sono in grado di crescere e maturare con il ricevente una volta impiantate; motivo per cui questi pazienti hanno bisogno di continui interventi per impiantare valvole di dimensioni via via maggiori [9].

Le valvole cardiache ingegnerizzate sembrano essere un'ottima soluzione per trattare patologie valvolari; una valvola cardiaca ingegnerizzata, una volta impiantata nel paziente, risulta essere un organo vivente a tutti gli effetti, in grado di rispondere alla crescita e ai processi fisiologici analogamente ad una valvola cardiaca nativa. La semina di cellule e la ripopolazione di substrati di valvole cardiache prive di cellule, biologici e polimerici, sembrano essere processi promettenti al fine di ottenere una vera e propria valvola "vivente" [10].

I due principali approcci utilizzati negli scorsi 10 o 15 anni nell'ambito della TE sono chiamati rigenerazione (*regeneration*) e ripopolazione (*repopulation*): il primo prevede l'impianto di una matrice riassorbibile in grado di modellarsi in vivo e produrre, quindi, una valvola cardiaca funzionale composta da cellule e proteine del tessuto connettivo del ricevente; il secondo consiste, invece, nell'impianto di un'intera valvola porcina precedentemente trattata e decellularizzata, lasciando solamente una matrice di tessuto connettivo intatta e meccanicamente sana. In questo caso ci si aspetta che le cellule del paziente ripopolino e rivitalizzino la matrice priva di cellule, dando luogo ad un tessuto vivente che possiede già la microstruttura necessaria per le specifiche funzioni da svolgere e perfettamente idoneo in termini di durabilità [6].

La valvola cardiaca sostitutiva ideale da essere impiantata in vivo deve rispettare alcuni requisiti minimi: deve essere biocompatibile, cioè non interagire in maniera dannosa con l'organismo, e meccanicamente resistente a sforzi di taglio e flessione, riproducendo tutte le caratteristiche del tessuto da sostituire. Sia per i substrati polimerici che biologici il risultato ottimale sarebbe la completa degradazione e successivo riassorbimento del tessuto, senza generazione di prodotti tossici. È stato appurato che diversi stimoli biomeccanici hanno un impatto significativo sul comportamento delle cellule, compreso il differenziamento in vitro, motivo per cui un contesto emodinamico il più possibile simile a quello fisiologico, ottenibile attraverso specifici bioreattori, è in grado di promuovere notevolmente lo sviluppo di nuovi tessuti. L'utilizzo di bioreattori dinamici per la realizzazione di TEHV si è rivelato fondamentale nel migliorare la penetrazione delle cellule

all'interno della matrice, rispetto ad una condizione statica. Questi dati sono dovuti sia agli stimoli meccanici a cui le cellule sono soggette, sia al movimento del fluido miscelatore responsabile di una più profonda perfusione dei tessuti ingegnerizzati, in termini di gas e nutrienti. L'abilità dei bioreattori di simulare il flusso sanguigno e il regime pressorio fisiologico è un aspetto cruciale per ottimizzare le interazioni cellula-cellula e cellula-substrato, le quali portano ad un'espressione genica molto simile a quella osservata in vivo [10].

4.2 SUBSTRATI PER LA PROGETTAZIONE DI VALVOLE CARDIACHE INGEGNERIZZATE

Come già affermato nel paragrafo precedente, il primo passo per la realizzazione di costrutti biologici ingegnerizzati consiste nella costruzione di un substrato, o scaffold, sul quale possano aderire e crescere le cellule. Per la realizzazione di questi scaffolds, deve essere fatta una scelta in merito all'utilizzo di materiali sintetici o naturali.

I primi sono realizzati principalmente con materiali polimerici biodegradabili e biorisorbibili, quali ad esempio PLA e PGA³, ed offrono la possibilità di variare facilmente la composizione per ottenere determinate caratteristiche funzionali e consentire una migliore funzionalizzazione con specifici segnali molecolari in grado di promuovere l'adesione e la crescita cellulare. Tuttavia, essi presentano un'elevata trombogenicità e difficoltà tecniche dovute alla non sempre facile processabilità.

I substrati biologici permettono di ovviare queste difficoltà, dal momento che contengono già al loro interno fattori di crescita e segnali molecolari che promuovono l'attività delle cellule; queste strutture, però, devono essere sottoposte a trattamenti di decellularizzazione, al fine di eliminare completamente le cellule del donatore, il che comporta il rischio di alterare la composizione e le proprietà dello scaffold stesso. Gli scaffolds naturali possono essere formati dai costituenti puri della matrice extra cellulare (collagene e fibrina), biologici di origine non valvolare (pericardio ad esempio) o biologici di origine valvolare (allograft e xenograft⁴).

In entrambi i casi, lo scaffold, sia biologico che sintetico, deve garantire un'adeguata adesione cellulare, non deve essere citotossico, deve possedere un'opportuna porosità e prestarsi come supporto meccanico per lo sviluppo del tessuto, con un profilo di degradazione noto e controllato.

³ Acido polilattico e acido poliglicolico, rispettivamente.

⁴ Allograft sta per allotrapianto e indica un sostituto biologico proveniente da individui della stessa specie; xenograft sta per xenotrapianto e indica un sostituto biologico proveniente da individui di specie differenti.

4.2.1 STENTED-TEHV CON SCAFFOLD ELASTOMERICO

A titolo di esempio, si riporta la realizzazione di una protesi valvolare cardiaca ingegnerizzata stented, con scaffold realizzato in materiale elastomerico e stent in metallo biodegradabile. L'obiettivo di questo studio è stato quello di realizzare una valvola cardiaca che non desse problemi di trombosi nel corso del suo utilizzo, esaminandone l'integrità microstrutturale, la funzionalità emodinamica e la biocompatibilità.

Il progetto consiste in una valvola cardiaca ingegnerizzata avente come scaffold un elastomero poliuretano (*polycarbonate urethane urea, PCUU*), che simuli il più possibile la microstruttura e la funzione della valvola nativa. La funzionalità in vivo di questa valvola cardiaca è stata esaminata in un modello animale porcino.

Le valvole a tre lembi (*trileaflet*) ottenute per *elettrospinning*⁵ dell'elastomero, sono state successivamente montate su uno stent biodegradabile in lega di magnesio AZ31 utilizzando suture in 5-0 propilene distribuite in 6 punti differenti, come si può notare in Figura 10.

In uno studio di Coyan et al. [11], cinque maiali del peso di 80 kg provenienti dallo Yorkshire sono stati sottoposti all'impianto di questa valvola in posizione polmonare. La funzionalità della valvola ingegnerizzata è stata valutata, tramite ecocardiografia, subito dopo l'impianto e dopo 1, 4, 8 e 12 ore da quest'ultimo; una volta espantate, le valvole (visibili in Figura 12.A) sono state sottoposte a test meccanici biassiali e monitorate tramite microscopio a scansione elettronica per un'ulteriore analisi dal punto di vista strutturale e della formazione di trombi.

L'applicazione di queste *stented-TEHV* biodegradabili potrebbe essere estesa a tutte le posizioni delle diverse valvole cardiache, con il fine ultimo di realizzare un costrutto in grado di sostituire perfettamente quello nativo, con ottime caratteristiche in termini di durabilità e non trombogenicità. Dai risultati ottenuti è stato possibile affermare che l'impianto si è concluso con successo in tutti e cinque gli animali.

Dopo l'intervento, in tutti e cinque i casi è stato riscontrato un normale funzionamento dei leaflets valvolari, senza alcun sintomo di insufficienza, e un picco di velocità media attorno ai 2 m/s. Dall'analisi al microscopio a scansione elettronica, è stato notato che tutti i leaflets delle valvole cardiache ingegnerizzate hanno mantenuto inalterata la loro architettura microstrutturale senza segni di attivazione piastrinica o di trombosi.

Un'evidenza microscopica di deposizione di fibrina è stata riscontrata solo su due dei cinque stent, ma non nelle TEHVs (Figura 12.C). Dall'analisi dei costrutti ingegnerizzati in seguito a prove

⁵ L'elettrofilatura (detta anche filatura elettrostatica o *electrospinning*) è un efficace processo produttivo elettrodinamico utilizzato sia industrialmente sia a livello di ricerca laboratoriale per la produzione di fibre con diametri estremamente ridotti, tipicamente inferiori al micron, fino a pochi nanometri.

meccaniche biassiali, è stato inoltre rilevato che le fibre delle TEHVs non presentavano alcun segno di degradazione funzionale o ultrastrutturale.

È quindi stato possibile concludere che una protesi valvolare cardiaca con scaffold realizzato in materiale elastomerico è funzionale per la sostituzione in situ di una valvola cardiaca polmonare patologica e, oltre a ciò, elimina eventuali possibilità di trombosi a livello dei lembi valvolari [11].

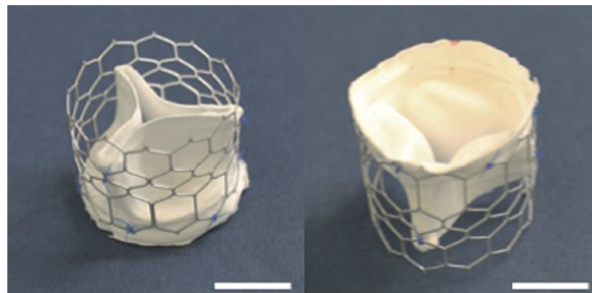


Figura 10: Valvola polmonare ingegnerizzata in PCUU montata su stent biodegradabile in lega metallica di magnesio AZ31.

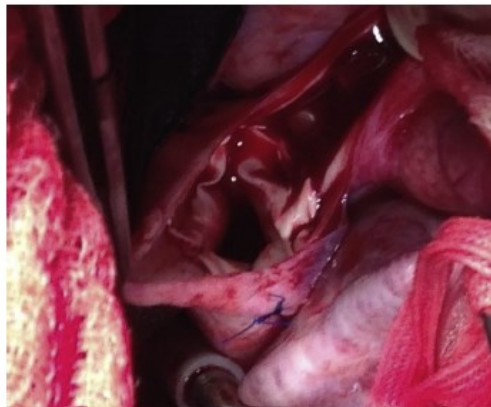


Figura 11: Fotografia della valvola cardiaca polmonare ingegnerizzata suturata in posizione opportuna tramite suture in 4-0 polipropilene, dopo la rimozione della valvola polmonare nativa.

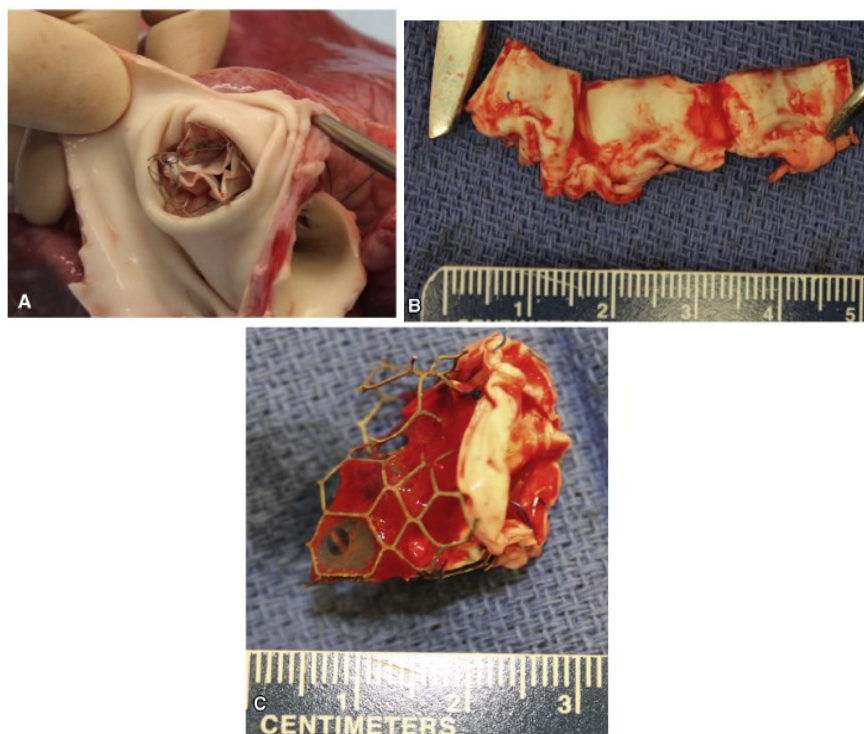


Figura 12: A. Espianto della valvola polmonare in PCUU dopo 12 ore di studio in vivo; B. Lembi valvolari della valvola in PCUU dopo la rimozione dallo stent e prima di lavaggio e fissazione istologica; C. Stent in lega di magnesio con formazione di strati di fibrina dopo l'espianto in seguito a 12 ore di valutazione funzionale in vivo. Non è stata identificata alcuna ostruzione della valvola dovuta a questa scoperta.

4.2.2 TEHV CON SCAFFOLD POLIMERICO RIPOPOLATO CON CELLULE DERIVANTI DA CORDONE OMBELICALE VASCULARIZZATO CRIOCONSERVATO

Come già sottolineato nei paragrafi precedenti, una valvola cardiaca ingegnerizzata autologa con la potenzialità di crescere e rimodellarsi sembra essere un concetto molto promettente nell'ambito della chirurgia cardiovascolare pediatrica; concetto mancante se si osservano le attuali protesi valvolari cardiache.

Si riporta qui uno studio di Hoerstrup et al. [12] che ha analizzato l'impatto di cellule umane del cordone ombelicale crioconservate (*cryopreserved human umbilical cord cells*, CHUCCs) nella fabbricazione di valvole cardiache ingegnerizzate per pazienti pediatrici con lesioni cardiache congenite diagnosticate prima della nascita tramite ecocardiografia, in modo da consentire la sostituzione della valvola cardiaca patologica durante i primi anni di vita.

Cellule delle pareti vascolari di cordone ombelicale umano sono state isolate da segmenti di cordoni ombelicali e coltivate per circa tre o quattro settimane, finché non è stato ottenuto un numero di cellule sufficiente, e in seguito crioconservate per dodici settimane in una banca di cellule.

Trascorse dodici settimane, le cellule crioconservate sono state espanse in coltura e analizzate dal punto di vista di istologia, immunochimica e metodi di proliferazione.

Gli scaffolds di queste protesi valvolari a tre lembi sono stati ottenuti mediante un polimero poroso e biodegradabile, il P4HB, (poli-4-idrossibutirrato) e successivamente seminati con CHUCCs. Il P4HB è un poliidrossialcanoato, polimero poliestere termoplastico sintetizzato da vari generi di batteri attraverso la fermentazione di zuccheri o lipidi. I costrutti ingegnerizzati sono stati in tutto dieci. Cinque valvole cardiache sono state lasciate crescere per sette giorni in un *pulse duplicator*, bioreattore dinamico che simula il flusso pulsatile e il regime pressorio cardiaco (il primo è stato gradualmente incrementato da 300 a 500 mL/minuto, il secondo da 5 a 15 mmHg); mentre le altre cinque sono state lasciate maturare e crescere in condizioni statiche, anch'esse per sette giorni. Dopo la maturazione all'interno del bioreattore, generalmente si auspica che la protesi valvolare ingegnerizzata sia pronta per essere impiantata come sostituto autologo della valvola dello stesso paziente.

Al termine dei sette giorni, sono stati analizzati i costrutti ingegnerizzati da molteplici punti di vista, tra cui: istologia, immunochimica, microscopia elettronica, analisi funzionale, biomeccanica e biochimica. Dopo la maturazione nel bioreattore, a livello macroscopico, le valvole cardiache espianate aprivano e chiudevano correttamente e sembravano essere intatte. Tutte le valvole cardiache mostravano una superficie gialla lucida sia all'interno che all'esterno dello scaffold della valvola. In termini macroscopici, non è stata evidenziata alcuna differenza tra i costrutti maturati nel sistema statico e quelli condizionati nel sistema dinamico.

A partire dalle cellule crioconservate è stato ottenuto un numero di cellule appropriato per realizzare protesi valvolari ingegnerizzate; da un solo cordone ombelicale sono state ottenute un numero di cellule tre volte maggiore a quello necessario per fabbricare un solo costrutto ingegnerizzato, il che teoricamente offre la possibilità di generare altri costrutti in altri momenti. Il processo di condizionamento in vitro non ha dato alcun tipo di problema, e dopo sette giorni non sono state riscontrate né perdita né contaminazione del bioreattore a flusso pulsatile.

È stato riscontrato che le cellule provenienti da cordone ombelicale sono rimaste vitali e funzionanti dopo le dodici settimane di crioconservazione e hanno mostrato avere una morfologia simile a quella dei miofibroblasti⁶, anche tramite l'analisi con marcatori α -actinina⁷ e fibroblasto specifici.

L'istologia delle TEHVs ha evidenziato la formazione di tessuto stratificato, incluso tessuto connettivo tra l'interno e l'esterno dello scaffold poroso. Dall'analisi al microscopio elettronico è

⁶ Il miofibroblasto è un tipo cellulare del tessuto connettivo intermedio tra fibroblasto e fibra muscolare liscia; produce sostanza fondamentale, collagene, fibre elastiche e fibronectina. Contiene fibrille di actina e di miosina. Ha capacità contrattili come la muscolatura liscia.

⁷ L' α -actinina (o alfa-actinina) è una proteina di legame, particolarmente abbondante in sarcomeri dei muscoli scheletrici.

stato notato che le cellule sono cresciute all'interno dei pori ed hanno formato uno strato di tessuto durante la maturazione nel bioreattore a flusso pulsatile.

L'analisi biochimica ha mostrato un incremento di formazione di matrice extracellulare nei costrutti esposti al flusso pulsatile, rispetto a quelli analizzati in condizioni statiche.

L'analisi funzionale ha dimostrato un incremento fisiologico della concentrazione di Ca^{2+} intracellulare nelle cellule ricoltivate e nei costrutti condizionati, in seguito a stimolazione con istamina. Questo dimostra come le cellule siano ancora vitali e funzionali dopo coltura, crioconservazione, ricoltivazione e condizionamento in vitro.

Una limitazione di questo studio è legata al fatto che non sono state seminate cellule endoteliali sui costrutti; una copertura di tessuto endoteliale funzionale avrebbe indubbiamente effetti benefici in una valvola cardiaca ingegnerizzata.

In conclusione, quindi, lo studio ha dimostrato la realizzazione in vitro di valvole cardiache vitali e funzionali tramite l'utilizzo di CHUCCs e di un sistema di coltura biomimetico a flusso pulsatile. Le cellule del cordone ombelicale hanno presentato ottime proprietà di crescita e maturazione, e altrettanto eccellenti abilità di formazione di tessuto in vitro.

Tutti questi risultati suggeriscono il potenziale beneficio di istituire banche di cellule umane autologhe per pazienti pediatriche, a cui sono state diagnosticate patologie congenite ancor prima della nascita, e che quindi necessiteranno interventi chirurgici di sostituzione di valvole cardiache nei primi anni della loro vita [12].

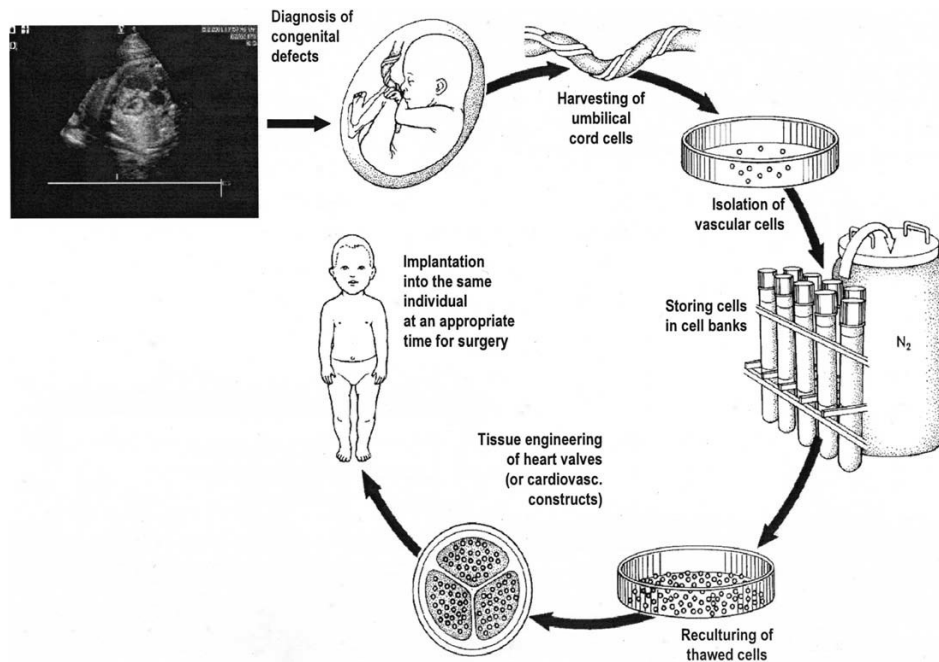


Figura 13: Fabbricazione di una valvola cardiaca autologa tramite l'ingegneria tissutale. L'ecografia fetale diagnostica patologie cardiovascolari congenite del feto; cellule di cordone ombelicale vengono isolate, espanse in vitro e crioconservate. Al momento dell'intervento chirurgico le cellule crioconservate vengono ricoltivate e seminate in uno scaffold polimerico; il costrutto viene poi trasferito all'interno di un bioreattore dinamico e fatto crescere in vitro. Dopo la maturazione nel bioreattore, la valvola cardiaca ingegnerizzata potrà essere impiantata come valvola cardiaca autologa nello stesso paziente.

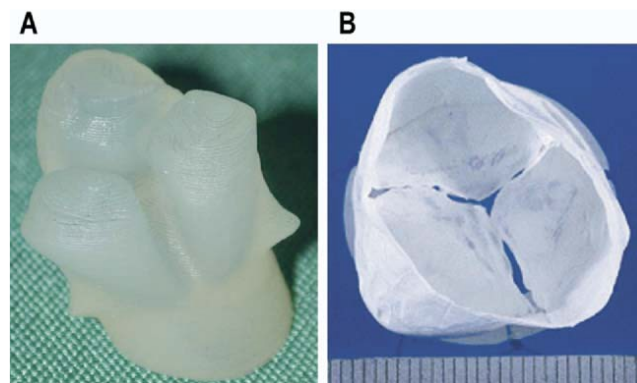


Figura 14: (A) Ricostruzione tridimensionale del modello stereolitografico dall'interno di un homograft aortico. (B) Scaffold della valvola cardiaca a tre lembi in P4HB, incluso il seno aortico (visto dal lato aortico) fabbricato da un modello stereolitografico.

4.3 DECELLULARIZZAZIONE DEI SUBSTRATI BIOLOGICI

Per decellularizzare i substrati biologici, sia xenogenici che allogenici, esistono diversi trattamenti, che si differenziano tra loro per l'efficacia nel rimuovere cellule e detriti cellulari, per la preservazione di struttura e funzione della MEC e per la suscettibilità alla semina cellulare.

Tutti i metodi, però, devono soddisfare requisiti considerati imprescindibili: devono rimuovere totalmente le cellule valvolari, i loro residui cellulari e i loro epitopi antigenici; devono conservare la struttura della MEC, la cui integrità influenza la corretta funzione valvolare; devono produrre uno scaffold adatto alla ricellularizzazione, che conservi una struttura tridimensionale e la membrana basale ed elimini i residui citotossici di detergente, così da garantire la replicazione e la crescita cellulare.

Un protocollo di decellularizzazione solitamente consta di metodi fisici, chimici ed enzimatici combinati tra loro, e le fasi in cui si articola sono: lisi delle membrane cellulari, con l'utilizzo di metodi fisici o soluzioni iper/ipotoniche; separazione delle componenti della MEC con metodo enzimatico; solubilizzazione del citoplasma e delle componenti nucleari usando detergenti non ionici o zwitterionici; estrazione finale dei residui cellulari dal tessuto usando detergenti ionici.

Tutti questi passaggi possono essere accompagnati all'agitazione meccanica, per aumentarne l'efficacia. È da sottolineare, però, che gli agenti per l'estrazione delle cellule possono essere dannosi per la matrice extracellulare, possono degradare o denaturare proteine della MEC o lasciare residui tossici; è quindi importante valutare accuratamente la combinazione delle varie fasi del processo, la scelta dei detergenti e la durata dei tempi di lavaggio.

Esempi di metodi fisici sono il congelamento, la sonicazione⁸, l'agitazione meccanica e l'applicazione diretta di pressione.

In riferimento ai metodi chimici, alcuni acidi e alcali vengono utilizzati per solubilizzare i componenti citoplasmatici delle cellule e per rimuovere gli acidi nucleici, RNA e DNA ad esempio. Ad esempio, l'acido acetico, l'acido paraacetico, l'acido idroclorico, l'acido sulfidrico e l'idrossido di ammonio sono in grado di distruggere efficacemente le membrane cellulari e gli organelli intracellulari. I detergenti sono molecole che presentano regioni polari e non polari che consentono loro di agire come surfattanti; grazie alla loro struttura riescono ad abbassare la tensione superficiale e a formare micelle ad una specifica concentrazione per ogni detergente, solubilizzando così le molecole idrofobiche. Si differenziano in ionici e non ionici. L'utilizzo di soluzioni ipotoniche o ipertoniche nei processi di decellularizzazione è volto ad aumentare l'azione dei detergenti. Agenti chelanti come l'EDTA (*Ethylene Diamine Tetraacetic Acid*) facilitano la rimozione del materiale cellulare dal tessuto.

⁸ Si intende l'utilizzo di onde acustiche ultrasoniche dove si presenta l'esigenza di disintegrare delle cellule, omogeneizzare, emulsionare, degasare e disperdere prodotti.

I metodi enzimatici comprendono la digestione con proteasi e nucleasi. Tra gli enzimi proteolitici di maggiore interesse si cita la tripsina, che è in grado di rompere legami tra le cellule che popolano la MEC facilitandone il distacco, e di distruggere i legami tra i vari componenti della matrice, creando così una struttura più aperta e favorevole al lavaggio cellulare. Spesso vengono aggiunti alle soluzioni in cui è immerso il tessuto degli inibitori di proteasi (quali aprotonina, benzamidina, PMSF⁹, IA¹⁰, NEM¹¹), le quali possono danneggiare la struttura della matrice nativa dello scaffold, determinandone alterazioni nel comportamento meccanico/emodinamico e nel potenziale di ripopolamento delle valvole [13].

4.4 RICELLULARIZZAZIONE DEI SUBSTRATI

Tra gli ultimi passaggi necessari per la realizzazione di un tessuto ingegnerizzato vi è la semina delle cellule sullo scaffold, passaggio cruciale soprattutto per la scelta della tipologia di cellule da utilizzare: se cellule differenziate tessuto-specifiche (come le cellule endoteliali e/o le cellule muscolari lisce) o cellule staminali (autologhe o allogene).

Dagli studi più recenti, le cellule preferibili sembrano essere le cellule staminali, in virtù della loro capacità di differenziarsi in vari tipi cellulari, risultando essere molto più utili nel tentativo di ricreare in vitro i costrutti desiderati. Le cellule staminali presentano però diversi svantaggi, primo tra tutti il fatto che le loro proprietà e potenzialità non sono ancora completamente note. A ciò si aggiungono sia la difficoltà nel coltivarle ed espanderle in vitro, che l'ingente quantità di problemi etici legati soprattutto all'eventuale utilizzo di cellule staminali embrionali [14].

Nella TE e TEHV vengono comunemente utilizzate cellule non-parenchimali, come i fibroblasti e le cellule endoteliali, che aumentano il fenotipo delle cellule parenchimali, cioè la tipologia di cellule responsabile della funzione specifica dell'organo, e contribuiscono all'organizzazione dell'architettura cellulare del tessuto.

Le cellule endoteliali sono necessarie per la creazione di una barriera antitrombotica per la matrice decellularizzata ed assicurano sia che il flusso sanguigno in vivo sia confinato allo spazio vascolare, sia che le cellule parenchimali siano protette dallo *shear stress*¹².

L'altro tipo di cellule non-parenchimali importanti nell'ambito della TE sono i fibroblasti, che secernono e rimodellano la MEC ed aumentano la funzione cellulare parenchimale in coltura; sono

⁹ Phenylmethanesulfonyl.

¹⁰ Iodoacetamide.

¹¹ N-Ethylmaleimide.

¹² Lo shear stress o sforzo di taglio è uno degli sforzi elementari cui può essere soggetto un corpo, insieme allo sforzo normale, e si misura pertanto in Pa. Nei materiali solidi lo sforzo di taglio è uno stato di tensione in cui la forma di un materiale tende a cambiare (di solito per forze interne di scorrimento trasversali) senza cambiamenti di volume (nel caso di materiali elasto-lineari e isotropi).

questi ultimi, in combinazione con cellule endoteliali e mesenchimali, ad essere stati utilizzati nella TEHV.

Due sono gli approcci essenziali per il ripopolamento di uno scaffold, naturale o sintetico: la semina in vitro o la rigenerazione tissutale guidata (*Tissue Guided Regeneration*).

Il primo approccio è l'approccio tradizionalmente usato nella TE, e prevede, prima dell'impianto in vivo, la semina in vitro dello scaffold sviluppato con le cellule scelte. Queste ultime vengono seminate sul substrato, dove sono presenti segnali maturativi appropriati, quali fattori di crescita e citochine, che ne favoriscono l'attecchimento e la proliferazione. Lo scaffold seminato viene successivamente introdotto all'interno di un bioreattore per favorire la formazione di tessuto, la sua organizzazione e funzione. All'interno del bioreattore, il tessuto viene solitamente esposto ad un condizionamento meccanico che simuli quanto più possibile le condizioni fisiologiche.

Nel caso particolare di protesi valvolari cardiache, all'interno del bioreattore vengono riprodotte le condizioni fisiologiche proprie dell'apparato cardiocircolatorio, lo shear stress ad esempio rappresenta uno stimolo critico durante la coltura delle cellule nel bioreattore. In seguito, il costrutto ingegnerizzato viene impiantato in vivo, dove dovrebbe crescere e rimodellarsi.

La rigenerazione tissutale guidata, invece, prevede l'impianto in vivo di uno scaffold non seminato, contenente tutte le informazioni biologiche necessarie ad indurre l'entrata in circolo e ad attrarre le cellule progenitrici endogene circolanti (sia endoteliali che mesenchimali) o quelle del tessuto circostante del ricevente. Queste ultime dovrebbero poi essere in grado di colonizzare il substrato e differenziarsi nei fenotipi cellulari nativi, ripopolandolo completamente. Il ruolo del bioreattore in questo caso è svolto dall'organismo del ricevente, con i suoi segnali biomeccanici e citochinici endogeni. L'assenza di cellule preseminate, in questo caso, minimizza e semplifica notevolmente il processo di fabbricazione di una TEHV. Un'ipotesi rappresentativa per il ripopolamento di una valvola cardiaca ingegnerizzata da cellule endogene è presente in Figura 15.

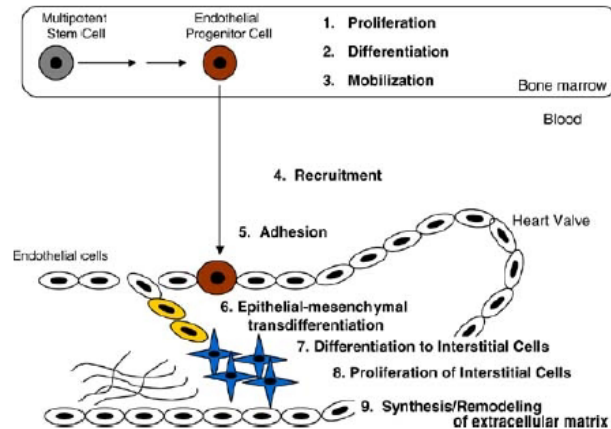


Figura 15: I processi chiave per il ripopolamento di una TEHV da cellule endogene comprendono la proliferazione, il differenziamento e la mobilizzazione di cellule progenitrici endoteliali circolanti dal midollo osseo, a cui segue il passaggio nel sangue e l'adesione alla valvola. In seguito, le cellule reclutate possono differenziarsi in cellule mesenchimali e infine in cellule interstiziali che sintetizzano e rimodellano la MEC [15]

4.5 RUOLO DEI BIOREATTORI NELL'INGEGNERIA TISSUTALE

Vesely I., in *Heart valve tissue engineering* [6], riporta che una TEHV, più che essere un dispositivo che attenua una patologia, è un dispositivo curativo: un sostituto vivente per una componente patologica della nostra fisiologia. L'uso dei bioreattori per le TEHVs sembra essere uno strumento potente per raggiungere questo risultato.

Il termine "bioreattore" indica un sistema in grado di simulare l'ambiente fisiologico per creare, condizionare fisicamente e testare cellule, tessuti, precursori, strutture di supporto e organi in vitro; può essere utilizzato per identificare molteplici strumenti per molteplici scopi sia nel campo della medicina che delle scienze della vita. In generale, un bioreattore è un sistema che simula l'ambiente fisiologico e permette il controllo delle singole variabili in esame così da poter creare, condizionare e testare cellule, tessuti, organi e supporti in vitro.

Sebbene ne esistano di differenti tipologie, tutti i bioreattori devono svolgere almeno una delle seguenti funzioni:

- garantire la sopravvivenza dell'impianto attraverso l'apporto e il mantenimento di concentrazioni specifiche di nutrienti e gas;
- mantenere una distribuzione uniforme delle cellule sul supporto tridimensionale;
- somministrare adeguati stimoli per preparare il tessuto alle condizioni biologiche in vivo.

A questo si aggiunge la capacità di mantenere le sue funzionalità per un periodo di tempo sufficiente allo sviluppo tessutale sullo scaffold (fino a 3-4 mesi).

I bioreattori devono assicurare la sopravvivenza dei vari grafts in essi contenuti, provvedere ad un continuo apporto di sostanze nutritive e ossigeno, oltre che consentirne la diffusione verso l'interno dell'impianto, e infine provvedere all'allontanamento dei prodotti del metabolismo.

Un bioreattore per TEHV è un dispositivo in grado di riprodurre l'ambiente biologico e fisiologico del cuore e del sistema circolatorio.

Bioreattori funzionali devono mantenere la vitalità degli organi ingegnerizzati utilizzando sistemi di condizionamento sia meccanici che biochimici. I requisiti alla base dei processi di coltura cellulare includono il controllo nel tempo di O₂ e CO₂ disciolti, il controllo di pH, temperatura, concentrazione di nutrienti, forma d'onda del flusso e pressione fisiologica.

Queste ultime condizioni sono garantite unicamente dai bioreattori "dinamici", strutturati per mantenere in condizioni fisiologiche il mezzo/terreno di coltura al di sotto del flusso pulsatile che stimola la pressione in vivo (80-120 mmHg per la circolazione sistemica; 20-40 mmHg per la circolazione polmonare), la frequenza cardiaca (60-100 battiti/min (bpm)) e la gittata sistolica (50-60 ml).

Per ottenere ciò, sono solitamente utilizzate pompe peristaltiche, centrifughe o pneumatiche, accompagnate da generatori di forme d'onda programmabili per ricreare il flusso cardiaco fisiologico. Inoltre, si dovrebbe porre particolare attenzione alla riproduzione delle proprietà elastiche proprie che i vasi sanguigni presentano in vivo, caratteristica solitamente raggiunta implementando il macchinario con una camera in grado di riprodurre il sistema di carico elastico cui le arterie sono sottoposte in vivo, responsabile del ritardo e della forma dell'onda di pressione.

Al contrario, i bioreattori cosiddetti "statici", seppur garantendo condizioni ottimali per la coltura delle cellule, non sono in grado di fornire la ricircolazione del mezzo di coltura.

Nel corso degli scorsi anni, bioreattori monouso sono entrati a far parte delle comuni pratiche cliniche e precliniche in misura considerevole. Questa nuova categoria di apparecchi è principalmente realizzata in plastiche approvate dalla FDA (*Food and Drug Administration*), cui si aggiungono sensori usa e getta per pH, metaboliti e gas disciolti.

Semplice gestione, minore incidenza di contaminazione e riduzione del tempo di alcuni processi, come ad esempio la sterilizzazione, sono alcuni tra i principali vantaggi di questi dispositivi [10].

Le tipologie di bioreattori sono molteplici e diverse, a seconda che questi debbano essere progettati rispettando le specifiche ambientali (condizioni necessarie alla sopravvivenza delle cellule), le specifiche funzionali (stimoli meccanici specifici sul costrutto) e le specifiche utente (per poter essere utilizzati da personale non tecnico).

4.5.1 BIOREATTORI STATICI

Sono i bioreattori più semplici, costituiti da un contenitore all'interno del quale viene inserito il mezzo di coltura e l'impianto ingegnerizzato. L'ambiente interno che può essere ricreato può essere statico o anche parzialmente dinamico, in questo caso realizzato grazie ad un agitatore meccanico. Un bioreattore statico soddisfa completamente le specifiche ambientali, garantisce infatti la crescita e la sopravvivenza del tessuto; ma non le specifiche funzionali, non si riescono infatti a produrre sollecitazioni meccaniche adeguate.

I più semplici esempi di bioreattori appartenenti a questa categoria sono le piastre di Petri o piastre a piatti multipli (*multiwell plates*), recipienti piatti di vetro o plastica solitamente di forma cilindrica, sulle quali viene coltivato il substrato precedentemente decellularizzato (biologico o polimerico) e seminato con cellule. Diverse colture cellulari sono state analizzate sia in ambienti di microgravità che in ambienti caratterizzati da assenza totale di gravità, tramite l'utilizzo di specifici bioreattori per esaminare l'attività e la proliferazione dei microrganismi.

4.5.2 BIOREATTORI DINAMICI

Questa tipologia di bioreattori permette di imporre una maggiore varietà di sollecitazioni meccaniche al tessuto ingegnerizzato. Duplicatori di impulso (*pulse duplicators*¹³) e strumenti per la coltura di tessuti e organi (*organ tissue culture machines*) sono i principali esempi di bioreattori nel campo delle TEHV_s [10].

Mentre i duplicatori di impulso sono principalmente usati per testare l'idrodinamica delle valvole commerciali, un'*organ tissue culture machine* fornisce un ambiente meccanicamente attivo per la creazione, la maturazione e il condizionamento fisico dei tessuti. Quest'ultimo dispositivo è quello che verrà identificato in seguito con il termine bioreattore.

Ogni bioreattore per la realizzazione di valvole cardiache ingegnerizzate è costituito dai seguenti elementi:

- un ventricolo, guidato da un motore (meccanico, pneumatico o elettrico) in grado di garantire regimi di pressione e flusso appropriati;
- un sistema per regolare *compliance* e resistenza;
- una camera di processo per ospitare la valvola cardiaca;
- un circuito idraulico per collegare le diverse unità;
- sonde e sensori per monitorare e aggiustare flusso, pressione, temperatura, pH, pO₂, pCO₂ e concentrazione dei metaboliti (ad esempio il glucosio);
- hardware e software per controllare il sistema nel complesso.

¹³ simulatori del flusso pulsatile cardiaco.

Solitamente questi componenti, fatta eccezione per il motore, sono costituiti da materiali polimerici (polietilene, Teflon[®], polipropilene) approvati dalla FDA; in ogni caso devono essere biocompatibili e in grado di resistere ai processi di sterilizzazione. I vari sensori, tranne le sonde di pressione, sono generalmente dispositivi monouso. Oltre a ciò, molti bioreattori hanno altre caratteristiche comuni quali la compattezza, che permette loro di essere inseriti anche in un incubatore; la possibilità di essere sterilizzati; la facile sostituzione delle parti intercambiabili e la possibilità di rimuovere (o cambiare periodicamente) il terreno di coltura.

I bioreattori TEHV dovrebbero anche permettere di impostare parametri quali volume sistolico, sforzo di taglio e numero di cicli. Le valvole ingegnerizzate dovrebbero essere visibili e monitorate durante l'intera procedura. Spesso questi dispositivi possono essere programmati come dei *pulse duplicators* dotati di un sistema di controllo in feedback che agisce sulla forma d'onda del flusso in modo da poter controbilanciare le eventuali variazioni di pressione registrate dai sensori e garantire un andamento il più possibile costante durante tutta la durata dell'esperimento.

Un costrutto ingegnerizzato impiantabile richiede un ambiente dinamico pulsatile per la sua maturazione, condizione necessaria per migliorare le proprietà meccaniche dello scaffold.

I prototipi di bioreattori più avanzati presentano pistoni pneumatici, che sono maggiormente adatti alla riproduzione della fisiologia cardiaca. A causa della relazione fortemente non lineare tra la natura pulsatile e la pressione del flusso sanguigno nella circolazione sistemica, chi progetta i bioreattori ha sviluppato specifici meccanismi per la messa a punto indipendente di questi parametri. Il regime di flusso in avanti, indietro e attraverso la TEHV è stato computato applicando l'approccio matematico Windkessel [10] al fine di ottenere un "*particle image velocimetry*", metodo ottico di misura del campo di moto di un fluido. Inoltre, per simulare al meglio le condizioni in vivo, la densità del sangue dovrebbe essere riprodotta utilizzando un mezzo di coltura con specifica viscosità, per aiutare le cuspidi valvolari a galleggiare con meno fatica [10].

Complessivamente, è stato osservato che l'applicazione di stimoli fisici nei bioreattori dinamici migliora ed accelera lo sviluppo e la maturazione dei tessuti in vitro, soprattutto per quelle strutture che sono fisiologicamente sottoposte a sollecitazioni meccaniche, elettriche e fluidodinamiche durante il loro sviluppo in vivo.

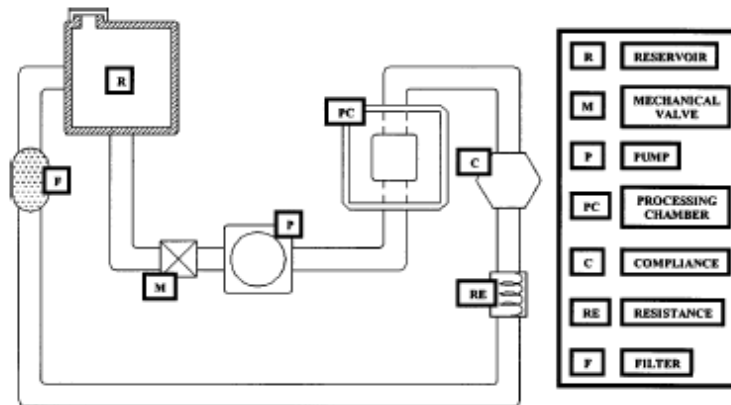


Figura 16: schema generale della struttura di un bioreattore dinamico

4.5.3 EFFETTI DI PARAMETRI NON FISIOLOGICI SULLA RICELLULARIZZAZIONE DELLE VALVOLE CARDIACHE

Come sottolineato anche nei paragrafi precedenti, molti bioreattori sono soliti utilizzare parametri fisiologici di flusso e di pressione per simulare al meglio l'ambiente circolatorio polmonare e/o sistemico, il che hanno mostrato ottimi benefici in termini di maturazione dei tessuti e riendotelizzazione. Sembra essere altrettanto logico, però, utilizzare parametri non fisiologici all'interno dei bioreattori per valutarne gli effetti in termini di stimolazione dell'infiltrazione cellulare nei substrati presenti, ad esempio nei lembi valvolari.

Per sottolineare la notevole importanza dei bioreattori e dei parametri utilizzati all'interno di questi ultimi nei processi di ingegneria tissutale, si riporta uno studio [16] che ha analizzato gli effetti di innovativi di alcuni parametri di condizionamento utilizzati all'interno di particolari bioreattori.

Per dimostrare ciò, valvole cardiache ovine sono state seminate con cellule staminali mesenchimali e coltivate in quattro differenti ambienti combinando quattro differenti parametri: sono state coltivate in condizioni di ipossia, cioè in carenza di ossigeno, e alta pressione (120 mmHg); in condizioni di normossia, che significa livello di ossigeno fisiologico, e alta pressione; in condizioni di ipossia e pressione negativa (-20 mmHg) e in condizioni di normossia e pressione negativa.

Il risultato ha rivelato che i parametri di condizionamento di un bioreattore influenzano notevolmente il grado di ricellularizzazione dello scaffold. In particolare, una condizione di ipossia incrementa l'infiltrazione cellulare nel tessuto dei lembi valvolari rispetto ad una condizione fisiologica di normossia; cellule progenitrici e cellule staminali mesenchimali coltivate in ambienti con minor concentrazione di ossigeno hanno mostrato maggiore propensione a proliferazione e migrazione cellulare. La pressione, invece, non sembra essere un parametro con effetti significativi a livello di ricellularizzazione degli scaffold.

Questo suggerisce che l'utilizzo di parametri di condizionamento non fisiologici in un bioreattore può aumentare la ricellularizzazione in vitro dei leaflets di protesi valvolari cardiache ingegnerizzate.

In questa analisi, le valvole aortiche ovine una volta prelevate, sono state crioconservate seguendo precisi protocolli. Le valvole sono state congelate alla temperatura di 1°C/min utilizzando un congelatore a velocità controllata (*2100 Series, Custom BioGenics Systems*), prima di essere poste in un cryofreezer a -180°C. In seguito, le valvole cardiache sono state decellularizzate seguendo i seguenti steps: sono state scongelate, sottoposte ad alterazioni osmotiche, trattate con due diversi detergenti (Triton X-100¹⁴ e lauroil sarcosinato di sodio¹⁵, in sequenza) e lavate con particolari enzimi (benzonasi¹⁶) per eliminare il materiale cellulare. Dopo la decellularizzazione, le valvole cardiache sono state nuovamente crioconservate usando la procedura descritta sopra e collocate a -180°C sino al momento della ricellularizzazione.

Per la semina delle TEHV sono state utilizzate cellule staminali umane, date le ottime proprietà riguardo a sintesi e caratterizzazione delle proteine se sottoposte a determinate condizioni all'interno del bioreattore. Tutte le TEHV sono state seminate con cellule staminali mesenchimali (MSCs) derivanti da midollo osseo umano. Dopo essere state prelevate, attraverso l'impiego di particolari sistemi di filtrazione, le MSCs sono state espanse in coltura suddivise in diversi gruppi, per riprodurre le diverse condizioni: le MSCs da inserire nel bioreattore che riproduce condizioni di ipossia sono state coltivate in condizioni di ipossia (7% O₂, 5% CO₂, 37°C); mentre quelle da inserire nel bioreattore che riproduce condizioni di normossia, sono state coltivate nelle medesime condizioni del bioreattore (21% O₂, 5% CO₂, 37°C). Le prime cellule hanno mostrato raggiungere confluenza più velocemente rispetto alle seconde.

Successivamente, le valvole precedentemente crioconservate sono state scongelate e suture in impalcature di tessuto. 10 milioni di cellule appartenenti all'appropriato gruppo di MSCs, sono state seminate nel lumen della valvola, precedentemente montato in una camera di un bioreattore statico contenente 200 mL di fluidi valvolari (DMEM F12 (Life Technologies) e 10% human serum (Sigma-Aldrich)).

Sono state utilizzate tre valvole cardiache per ognuno dei quattro gruppi caratterizzati dai diversi parametri di condizionamento: Hyp/HighP, Norm/HighP, Hyp/NegP, Norm/NegP.

¹⁴ Il Triton X-100 è un tensioattivo non ionico che ha un gruppo idrofilo di ossido di polietilene (in media ha 9,5 unità di ossido di etilene) e un gruppo lipofilo o idrofobico. Il gruppo idrocarbonico è del tipo 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenil. È uno dei prodotti presenti nella gamma di detergenti "Pluronic" commercializzati dalla BASF. A seguito di possibile tossicità, tale detergente è stato progressivamente abbandonato dai più recenti protocolli di decellularizzazione.

¹⁵ Il lauroil sarcosinato di sodio, liquido limpido privo di colore, è un tensioattivo anionico. Ha un'elevata stabilità al pH grazie al legame ammidico. Ha forti proprietà schiumogene anche in presenza di grandi concentrazioni di emollienti.

¹⁶ La benzonasi è una endonucleasi geneticamente modificata *Serratia marcescens*. Questo enzima è prodotto in *E. coli* ospiti in scala industriale. La benzonasi è in grado di scindere DNA a doppio filamento, DNA lineare, DNA circolare e RNA a filamento singolo.

Dopo la semina delle cellule, tutte le valvole sono state sottoposte a 24 ore di coltura statica (37°C, 5% CO₂) per permettere l'adesione cellulare, e in seguito trasferite in una camera sterile e monouso di un bioreattore pulsatile contenente 500 mL di fluidi valvolari. Nel bioreattore vi era un attuatore in grado di creare profili ciclici di pressione positiva e negativa all'interno della camera stessa.

I parametri di condizionamento sono stati applicati per due settimane; le valvole dei gruppi Hyp sono state coltivate in un ambiente con concentrazione di O₂ pari al 7%, mentre quelle dei gruppi Norm in un ambiente con concentrazione di O₂ pari al 21% (la concentrazione di CO₂ era 5% in entrambi i casi, e così anche la temperatura a 37°C). Le valvole dei gruppi ad alta pressione sono state sottoposte per un giorno a pressione ciclica negativa (da -20 a 5 mmHg), poi per un giorno a pressione ciclica leggermente positiva (da -5 a 20 mmHg) e infine per 14 giorni a pressione ciclica positiva (da -5 a 120 mmHg). Le valvole dei gruppi a pressione negativa sono state sottoposte a 16 giorni di pressione ciclica negativa (da -20 a 5 mmHg).

I risultati ottenuti dimostrano che il processo di decellularizzazione ha rimosso completamente tutte le cellule dalle valvole cardiache native, preservando al contempo l'architettura della matrice extracellulare.

Dall'analisi istologica è emerso che i quattro differenti protocolli di condizionamento del bioreattore hanno portato a differenti gradi di ricellularizzazione, come anticipato sopra, quantificati dalla densità cellulare nel tessuto dei lembi valvolari. Le valvole dei gruppi Hyp/HighP e Hyp/NegP hanno mostrato un maggior incremento del processo di ricellularizzazione dei leaflets valvolari, in particolare nella punta (terzo distale), rispetto alle valvole degli altri due gruppi.

A livello di fenotipo cellulare e analisi biochimica, le valvole dei diversi gruppi non hanno presentato differenze degne di nota.

Una limitazione di questo studio è dovuta al limitato numero di costrutti analizzati; infatti, solamente 12 valvole cardiache sono state processate, 3 per ogni gruppo, fornendo quindi in totale 9 leaflets analizzabili; oltre al fatto che non vengono considerati tutti gli aspetti di variabilità biologica e legata all'età che possono influenzare il processo di ricellularizzazione di un substrato.

Nonostante ciò, un approccio innovativo di questo tipo dimostra come l'utilizzo di parametri di condizionamento non fisiologici all'interno di un bioreattore, porti notevoli vantaggi a livello di ricellularizzazione di scaffolds di costrutti ingegnerizzati [16].

5. BIOPRINTING PER LA REALIZZAZIONE DI TESSUTI FUNZIONALI E LA NUOVA PROSPETTIVA DELLA MEDICINA RIGENERATIVA

La biostampa (*bioprinting*) è una tra le più recenti e promettenti tecniche di ingegneria tissutale, e rappresenta il processo che consente di generare strati di cellule preservando il funzionamento delle stesse per formare tessuti organici.

Durante la Conferenza Internazionale sul bioprinting e sulla Biofabbricazione, tenutasi a Bordeaux nel 2009, la biostampa è stata definita come segue: “*Bioprinting can be defined as the use of computer-aided transfer processes for patterning and assembling living and non-living materials with a prescribed 2D or 3D organization in order to produce bioengineered structures serving in regenerative medicine, pharmacokinetic and basic cell biology studies.*” [17].

L’obiettivo del bioprinting è quindi di produrre una struttura o un tessuto ingegnerizzato da poter impiegare direttamente sul paziente per riparare o sostituire tessuti danneggiati o come materiale da utilizzare per test e studi biologici e farmacologici, impiegando software e hardware appositi per la progettazione di schemi e strutture in 2D e 3D.

Per gli organi più semplici o per strutture cartilaginee come le orecchie o la trachea, la biostampa 3D utilizza degli scaffold disegnati con software di modellazione CAD (*Computer-Aided Design*) e stampati in 3D usando materiali biocompatibili, sui quali verranno poi seminate le cellule, il “bioinchiostro”, che andranno a costituire l’organo o tessuto.

Per gli organi più complessi costituiti da moltissime cellule diverse, occorre stampare direttamente e contemporaneamente scaffold e tessuti. Il processo che viene adottato in questo caso è simile alla stampa inkjet 2D, dove molteplici “foglietti” 2D vengono stampati uno sull’altro (*layer by layer*) fino alla formazione di una complessa struttura 3D.

Parlando di 3D bioprinting, è naturale introdurre il concetto di medicina rigenerativa: la Medicina Rigenerativa (MR) è una branca della medicina relativamente nuova e fortemente interdisciplinare focalizzata sulla riparazione, rigenerazione e sostituzione di cellule, tessuti o organi per ripristinare funzionalità fisiologiche compromesse da cause quali difetti congeniti, malattie, traumi o invecchiamento. La medicina rigenerativa fa uso di una combinazione di diversi approcci tecnologici che la rendono differente e molto più complessa rispetto ad un approccio tradizionale basato esclusivamente sul trapianto di organi. Può essere suddivisa in diversi settori caratterizzati da soluzioni terapeutiche e metodologie differenti, tra cui l’ingegneria dei tessuti che fa uso di una combinazione di cellule e materiali artificiali per produrre in laboratorio costrutti ingegnerizzati impiantabili [18].

La stampa tridimensionale (3D) ha le sue radici nella stampa di polimeri, che iniziò con l'invenzione della stereolitografia¹⁷ nel 1986, ad opera di Charles Hull. La stampa di polimeri ha dato avvio a diverse branche della stampa 3D, inclusa la biostampa.

Nel 1998, Klebe utilizzò una tecnologia cosiddetta “*cytoscribing*” per il micro-posizionamento in due dimensioni (2D) di proteine per creare modelli 2D.

Negli anni '90, gli scienziati iniziarono a sviluppare tecniche di stampa 2D con cellule viventi utilizzando queste tecniche di micro-posizionamento, che hanno reso possibile la fabbricazione di tessuti complessi. Una maggiore svolta in questo senso arrivò nel 2000, quando Thomas Boland modificò una stampante inkjet per stampare cellule in un disco di Petri, dando così origine alla prima biostampante.

Ad Anthony Atala del “*Wake Forest Institute of Regenerative Medicine*” si attribuisce il primo caso di organo completamente stampato, un rene miniaturizzato, nel 2002 [23].

Nel 2008 è stato scoperto il concetto di sferoidi tissutali, che ha dato avvio alla rapida generazione di tessuti e organi impiantando sferoidi in appositi substrati. Nello stesso anno, Object Geometries Ltd. ha sviluppato un'idea di stampa multilaterale, che ha velocemente incrementato i potenziali sviluppi nella biostampa.

Nel 2009, la prima biostampa in commercio è stata “Novogen MMX” realizzata da Organovo, con la quale sono stati realizzati costrutti vascolari privi di scaffold.

Da questo momento, diverse biostampanti sono state realizzate al fine di stampare diversi un vasto range di tessuti, da tessuto cartilagineo e tessuto osseo fino a tessuto muscolare e interi organi, come il fegato. Tutti questi sviluppi sono accomunati dallo stesso obiettivo comune, ossia quello di combinare cellule e biomateriali per la fabbricazione di tessuti. Questo consente l'accurata disposizione di cellule con elevata risoluzione ed è, pertanto, un metodo promettente sia in ambito di sistemi di screening dei farmaci che di fabbricazione di tessuti per la medicina rigenerativa.

La biostampa, come già anticipato in precedenza, se abbinata a tecnologie *Computer-Aided Design* (CAD) o *Computer-Aided Manufacturing* (CAM), consente l'utilizzo di immagini paziente-specifiche per sviluppare tessuti e organi anatomicamente funzionali e di appropriate dimensioni volumetriche per il singolo paziente. Per questo motivo, dunque, nel campo della biostampa è richiesta una vasta diversità di conoscenze e una varietà di concetti che spaziano in diversi ambiti, per trovare una risposta all'attuale carenza di organi da trapiantare e ai loro effetti collaterali.

Per realizzare costrutti attraverso tecniche di biostampa, i maggiori ed essenziali componenti sono:

¹⁷ La stereolitografia è una tecnica che permette di realizzare singoli oggetti tridimensionali a partire direttamente da dati digitali elaborati da un software CAD/CAM impiegando particolari resine fotosensibili solidificate tramite una sorgente UV.

- Bioink: bioinchiostro costituito da gocce di singole cellule o aggregati cellulari che vengono depositati “*layer-by-layer*” in modo alternato contemporaneamente alla biocarta;
- Biopaper: biocarta, la base su cui depositare il bioinchiostro strato dopo strato, con cui poi quest’ultimo si fonderà per dare vita al costrutto desiderato;
- Bioprinter: dispositivo per l’erogazione e la deposizione del bioinchiostro “*drop-on-demand*”, ovvero solamente dove e quando il computer dice di stampare, per poter creare un modello più fedele possibile all’originale;
- Bioreattore: ambiente in cui far maturare e crescere i costrutti, oltre che mantenerli poi in vita.

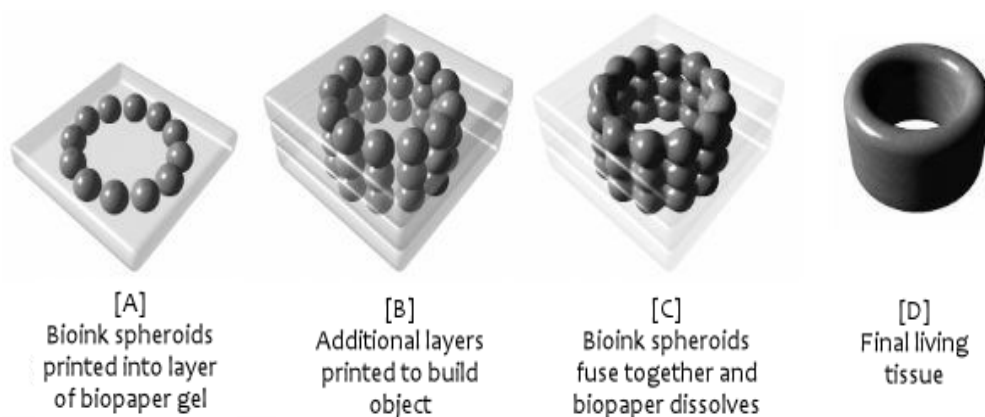


Figura 17: Schematizzazione del processo di realizzazione di un tessuto ingegnerizzato tramite deposizione *layer-by-layer* [24].

5.1 PRINCIPALI METODI DI BIOSTAMPA 3D

Per la fabbricazione di tessuti possono essere utilizzate tre modalità di biostampa: *Ink-jet Based Bioprinting*, *Laser Assisted Bioprinting*, *Solenoid Valve Based Printing* [24].

La prima modalità, il cosiddetto “*Ink-jet Bioprinting*”, adattamento del tradizionale processo di stampa a getto d’inchiostro (ink-jet), di fatto consiste nella precisa deposizione di gocce di bioinchiostro, di dimensioni variabili, sul biopaper, seguendo un modello digitale preciso.

Le metodologie di stampa ink-jet sono principalmente due: CIJ (*Continuous Ink-Jet*) e DOD (*Drop-on-Demand*). Il primo consiste in un flusso continuo di goccioline che fuoriesce da un ugello microscopico sotto pressione e viene deviato sul substrato grazie alla presenza di un campo elettrico. Nei punti in cui non è richiesta la deposizione del bioink secondo il modello digitale, le goccioline scorrono in una sorta di grondaia e vengono raccolte per essere riutilizzate in seguito. Nel secondo metodo, invece, le goccioline di bioink sono emesse dall’ugello in risposta ad una pressione impulsiva solo quando il modello lo richiede. Quest’ultima tecnica di biostampa potrebbe essere ulteriormente

suddivisa a seconda che il meccanismo di attuazione della goccia di bioink sia dovuto ad un effetto termico (si parla di *Thermal DOD*), oppure ad un effetto piezoelettrico (si parla di *Piezoelectric DOD*).

Complessivamente, la tecnica ink-jet permette di stampare specie cellulari differenti, biomateriali o loro combinazioni attraverso diverse testine di stampa in un unico processo di fabbricazione, consentendo così la fabbricazione di complessi costrutti multicellulari.

Il secondo metodo di biostampa è la tecnologia di stampa a laser, LAB (*Laser-Assisted Bioprinting*), che consiste in un processo di scrittura diretta, senza contatto.

Questi sistemi sono caratterizzati da tre componenti principali: una sorgente laser impulsiva (gli impulsi laser usati come sorgente di energia hanno la durata del nanosecondo, con lunghezze d'onda prossime all'UV), un "nastro" donatore che contiene le cellule sospese in un gel e un substrato ricevente su cui vengono depositate le cellule, montato su una base con motorizzazione triassiale posizionata sotto il nastro ad una distanza che va da 700 a 2000 μm . Il nastro è costituito da una piastra di vetro o quarzo, trasparente alle lunghezze d'onda degli impulsi laser, con un lato rivestito da bioink termosensibile incapsulato in un sottile strato di hydrogel. Lo scaffold ricevente è rivestito soltanto con un biopolimero a bassa viscosità, ad esempio hydrogel, per attutire l'impatto delle cellule, favorirne la loro adesione e mantenere intatta la struttura del costrutto. Affinché le cellule raggiungano il substrato, l'impulso laser viene focalizzato tramite lenti sul vetrino del nastro donatore che contiene le cellule sospese in gel, creando una bolla di vapore che genera onde d'urto che spingono le cellule. È possibile una stampa di diversi tipi di cellule sul substrato ricevente tramite una propulsione selettiva di cellule differenti dal vetrino donatore.

La tecnologia di stampa laser, così come quella ink-jet, prevede che la deposizione del bioinchiostro avvenga contemporaneamente alla stampa del biopaper, permettendo la realizzazione di costrutti di tessuto tridimensionali. Questi costrutti vengono ottenuti grazie alla contemporanea scrittura laser e fotopolimerizzazione dell'hydrogel: la struttura tridimensionale che si ottiene è il risultato di un processo ripetuto per più cicli, che consiste nel depositare le cellule, mediante un fascio laser seguendo uno schema preciso su un substrato ricevente; successivamente, si procede con la stampa di hydrogel sulla cima della superficie di ciascuna cellula. Poiché l'oggetto di lavoro sono cellule viventi e biomateriali, è importante controllare che la radiazione utilizzata non comporti alterazioni nel materiale biologico a causa della potenziale denaturazione del DNA da parte di radiazioni UV, valutando accuratamente durata, intensità e frequenza dell'impulso per evitare un eccessivo surriscaldamento cellulare, e qualità del fascio laser e delle lenti focali per contenere la divergenza.

La terza modalità, *Solenoid Valve Based Bioprinting*, ovvero la stampa a valvole solenoidi, fa uso di valvole a comando elettromagnetico. Gli elementi che costituiscono un sistema di questo tipo sono:

un serbatoio di fluido; un dispositivo di erogazione, basato su valvole solenoidi con volumi di bioinchiostro tra 1 nL e 5 pL; elementi riscaldanti che controllino la temperatura della testina dell'ugello; collegamenti al sistema di controllo e una sorgente di gas inerte. L'elettrovalvola funziona similmente ad un rubinetto comandato elettricamente: il dispositivo meccanico di apertura e chiusura, simile ad una membrana, viene alzato o abbassato consentendo o impedendo la fuoriuscita del bioinchiostro, e viene attivato da un solenoide. Quest'ultimo, percorso da corrente, genera un campo magnetico che solleva l'elemento meccanico occludente, tipicamente metallico, consentendo l'apertura o la chiusura della valvola. È poi il sistema di controllo che, stabilendo frequenza e durata degli impulsi elettrici inviati, permette la stampa DOD. Per poter realizzare un costrutto eterogeneo stampando contemporaneamente molteplici materiali, prelevati dai propri serbatoi, si può utilizzare un sistema ad ugelli multipli.

Questo sistema è in grado di accettare polimeri viscosi, come collagene e 1-2% di alginato di sodio, dato che non comporta problematiche relative al surriscaldamento. Una rappresentazione di questo sistema di bioprinting si può vedere in Figura 18 [19].

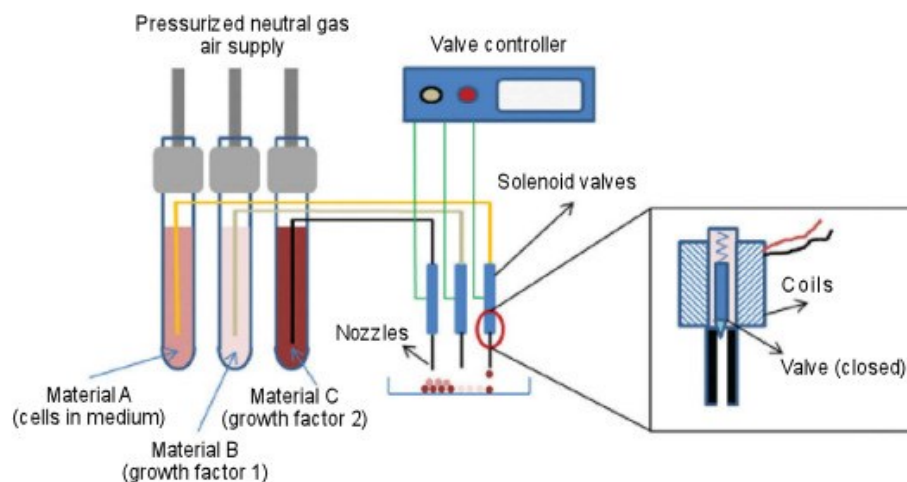


Figura 18: Solenoid Valve Based Bioprinting [24].

5.2 PROTESI VALVOLARI CARDIACHE OTTENUTE MEDIANTE TECNICHE DI STAMPA 3D

Le tecniche di 3D Bioprinting sono tra le più utilizzate nel campo della Tissue Engineering per la realizzazione di costrutti tissutali funzionali. In questo paragrafo si presenta un'applicazione di queste tecniche nel caso specifico di realizzazione di protesi valvolari cardiache; in particolare si tratta di un approccio per fabbricare una valvola aortica paziente-specifica in materiale polimerico fibrorinforzato.

Le geometrie delle valvole e le architetture dei leaflets valvolari fibro-rinforzati cercano di simulare quelli delle valvole native e i materiali utilizzati cercano di ricreare specifiche proprietà che caratterizzano i costrutti biologici nativi. I progetti vengono dapprima testati per valutare la risposta a tensioni e deformazioni a cui va incontro normalmente una valvola, e successivamente le valvole fabbricate vengono testate in vitro per mostrare le eccellenti proprietà idrodinamiche.

Per comprendere l'architettura di questo costrutto ingegnerizzato si propone prima una breve descrizione della struttura della valvola aortica biologica che deve essere riprodotta.

Le valvole aortiche native hanno sviluppato specifici lembi valvolari con struttura multistrato per rispondere al meglio ai carichi meccanici e dinamici cui sono sottoposte durante il ciclo cardiaco. Questi includono sforzi di taglio (*shear stresses*) dovuti al flusso sanguigno quando la valvola è aperta in fase di sistole, sforzi flessionali (*flexural stresses*) indotti dalla pressione transvalvolare durante l'apertura e la chiusura, e infine sforzi di trazione (*tensile stresses*) quando la valvola è chiusa in fase di diastole [20]. La soluzione biologica per minimizzare questi sforzi dovuti alle complesse condizioni di carico è quella di utilizzare leaflets costituiti da tre strati: strato ventricolare, spongiosa e fibrosa [20]. La fibrosa contiene fasci di fibre di collagene allineati in modo circolare, mentre lo strato ventricolare è formato da collagene ed elastina molto estensibile. Questi due strati sono separati dalla spongiosa, che contiene glicosamminoglicani vagamente connessi da proteine fibrose. In fase di diastole, quando le valvole sono chiuse, la bassa pressione al ventricolo tira le fibre di elastina in direzione radiale entro lo strato ventricolare. Questo fenomeno genera alti sforzi nel leaflet, che vengono compensati dai fasci di fibre di collagene. Nel momento in cui la pressione del ventricolo aumenta ancora in fase di sistole, gli sforzi di trazione nello strato ventricolare riportano il leaflet alla sua configurazione iniziale meno estesa, con conseguente corrugamento dello strato fibrosa. Questo corrugamento è facilitato dall'elevata compliance dello strato intermedio di spongiosa. Questa architettura riduce gli sforzi sviluppati attraverso il lembo valvolare, prevenendo quindi la degradazione a lungo termine della valvola biologica [20]. Si veda Figura 19 A, B, C.

Replicare questo elegante meccanismo in valvole cardiache ingegnerizzate può, potenzialmente, incrementare la loro durata e funzione biologica, cercando di regolare la distribuzione delle tensioni per minimizzare il possibile danno causato da fatica e provvedere a segnali meccanici di cui le cellule hanno bisogno per rimanere in vita e attive nei costrutti ingegnerizzati.

In questo paragrafo si presenta un processo ibrido, multi-assiale e additivo di bioprinting per la fabbricazione digitale di una valvola cardiaca sostitutiva in materiale polimerico completamente personalizzabile rispetto all'anatomia del paziente, con leaflets rinforzati attraverso architetture di fibre biostampate.

Il materiale polimerico scelto è il silicone, per il suo comportamento simile al tessuto nativo e per la sua nota biocompatibilità. Per questo, inizialmente le parti del costrutto in silicone possono essere utilizzate come modello per studiare il comportamento di valvole ingegnerizzate che intendono simulare la morfologia e le funzionalità biologiche di un sistema nativo paziente-specifico, ed eventualmente in seguito come vere e proprie valvole cardiache sintetiche impiantabili.

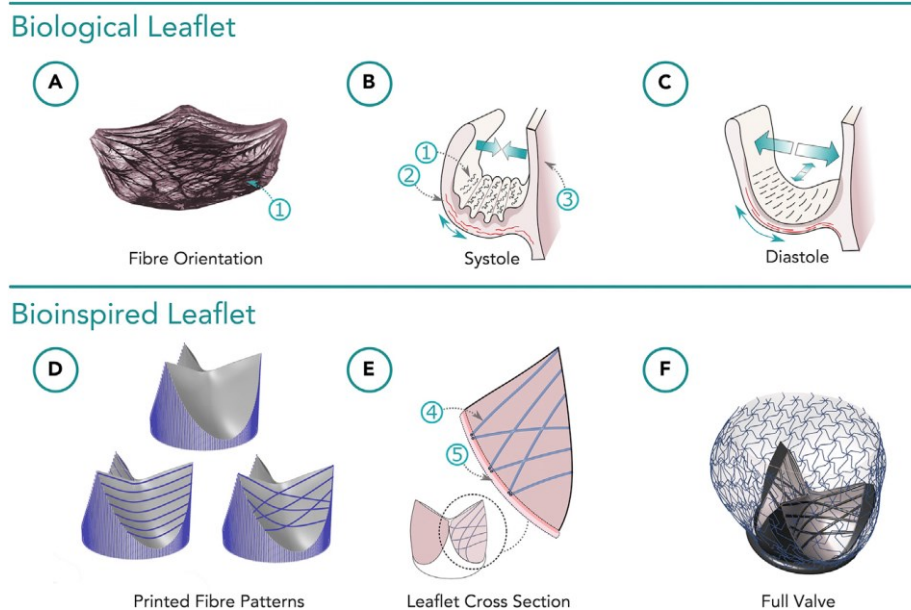


Figura 19: A) Design dei leaflets della valvola biologica nativa che mostra l'allineamento delle fibre sul leaflet stesso; B) e C) Schematizzazione del comportamento delle fibre di elastina e di collagene durante le fasi di sistole e diastole, rispettivamente; D) Scaffold della valvola cardiaca sintetica; E) Architettura del leaflet biostampato; F) Geometria della radice aortica paziente-specifica. Etichette numeriche: 1. Fibre di collagene; 2. Fibre di elastina; 3. Radice aortica; 4. Fibre di silicone hard; 5. Leaflet in silicone soft. [20]

A livello del dispositivo, l'architettura di questi costrutti combina la tradizionale geometria a tre lembi valvolari (*trileaflet*) con una membrana esterna di forma complessa che ricalca l'anatomia della radice aortica¹⁸ del paziente. La geometria di larga scala, invece, garantisce compatibilità anatomica con la valvola del paziente; l'architettura del leaflet consente l'implementazione di una struttura biostampata a strati che simula quella della naturale valvola aortica. Per ricreare l'effetto elastico dello strato ventricolare viene utilizzato un silicone biocompatibile di media durezza (*Shore 43 A*). Questo strato sottostante è decorato con strisce di silicone di maggior durezza (*Shore 37 A*) orientate secondo le direzioni che meglio ricalcano l'anatomia dei fasci di fibre dello strato di fibrosa. Questa semplice architettura sintetica, anche se non simula alla perfezione l'esatta organizzazione e composizione chimica dei tessuti nativi, riproduce fedelmente l'architettura meccanica dei leaflets biologici. La membrana esterna del dispositivo, inoltre, è rinforzata con una rete in materiale polimerico auxetico,

¹⁸ La radice aortica è il tratto in uscita del ventricolo sinistro che contiene i lembi della valvola aortica e che collega il ventricolo sinistro all'aorta, l'arteria principale del cuore.

che riproduce le proprietà meccaniche della radice aortica. Per una rappresentazione grafica, si faccia riferimento alla Figura 19 D, E, F.

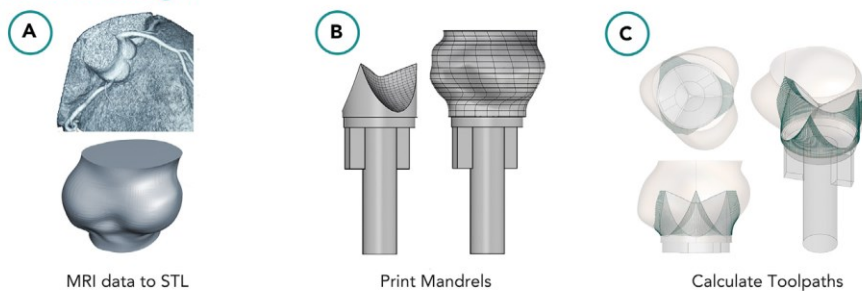
Il processo utilizzato per realizzare questi costrutti è un processo additivo multi-materiale, che permette la spruzzatura, e un processo di stampa 3D ad estrusione (*extrusion-based*) di siliconi fotosensibili con proprietà meccaniche regolabili.

La protesi valvolare aortica ingegnerizzata paziente-specifica viene realizzata attraverso i seguenti steps, Figura 20:

1. realizzazione di un'immagine 3D dell'anatomia dell'aorta tramite tomografia computerizzata (CT, *Computed Tomography*) non invasiva o risonanza magnetica (MRI, *Magnetic Resonance Imaging*);
2. realizzazione di un costrutto sostitutivo della valvola cardiaca sulla base dell'immagine ottenuta al punto 1;
3. realizzazione della protesi completa tramite l'utilizzo di biostampa *extrusion-based* o di spruzzatura.

La protesi completa è ottenuta depositando progressivamente materiale su un perno, che ricalca la forma della valvola cardiaca e della radice aortica. Spruzzare una soluzione di resina di silicone su un perno che presenta la geometria di una valvola cardiaca porta innanzitutto alla formazione di tre leaflets di spessore controllato e uniforme (Figura 20.D). Un bioink monomero viene poi depositato tramite DIW (*Direct Ink Writing*) per ricreare sia le righe di silicone sui leaflets che i più sottili triangoli tra questi (Figura 20.E). Il perno e la valvola vengono poi estesi alla geometria della radice aortica dello specifico paziente tramite sovrastampa con un cappuccio temporaneo e removibile. La rete dello stent in materiale polimerico auxetico è realizzata tramite 3D scanning della superficie, calcolando specifici tool paths che possano tassellare quella particolare superficie e poi, attraverso estrusione DIW, viene prodotta la struttura adattabile che simula i contorni ondulati dell'aorta del paziente (Figura 20.F).

Mandrel Design



Fabrication

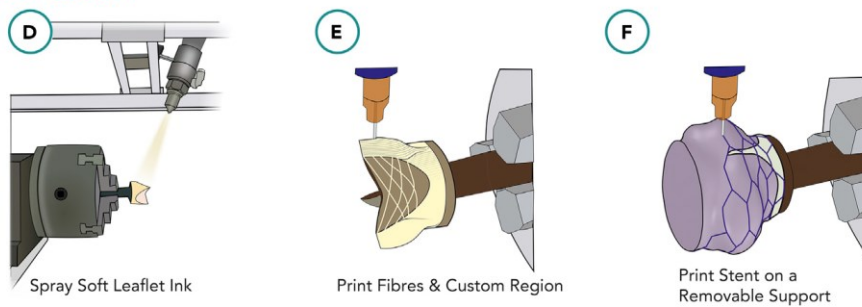


Figura 20: A) Immagine di radice aortica ottenuta tramite CT e convertita in rappresentazione digitale; B) Due perni: uno rappresenta la superficie interna della valvola, l'altro il punto di incontro con la radice aortica; C) La valvola è virtualmente posizionata nell'anatomia della radice aortica del paziente e i leaflets sono costruiti per incontrare la geometria della radice; D) Il perno della valvola viene spruzzato con un inchiostro di silicone soft per creare i leaflets; E) Rafforzamento delle fibre e triangoli tra i leaflets ottenuti tramite direct ink writing; F) Temporaneo cappuccio che simula la geometria della radice aortica viene sovra-stampato sulla superficie della valvola e nel complesso si ottiene una struttura tipo stent stampata, prima che il cappuccio venga rimosso. [20]

Una volta realizzato il costrutto, il ciclo cardiaco è stato simulato tramite analisi computazionale ad elementi finiti, applicando una pressione statica e uniforme sulla superficie dell'intera valvola nella direzione dello scorrimento del flusso sanguigno. Regolando attentamente l'evoluzione temporale della pressione applicata in un range fisiologicamente rilevante, queste simulazioni possono effettivamente riprodurre le fasi sistolica (apertura) e diastolica (chiusura) del ciclo cardiaco. Il livello di apertura della valvola in queste simulazioni è stato quantificato utilizzando come parametro l'area geometrica dell'orifizio (*GOA, Geometrical Orifice Area*) misurata nel tempo.

Si può affermare che queste simulazioni, seppur statiche, forniscono importanti informazioni in merito alla distribuzione della tensione nei lembi valvolari durante il ciclo cardiaco.

L'analisi computazionale suggerisce che l'architettura delle fibre proposta offre un effettivo aiuto nel sintonizzare la distribuzione della tensione attraverso il leaflet e potenzialmente incrementa la longevità della valvola.

In Figura 21 si possono osservare i risultati ottenuti tramite l'analisi computazionale del comportamento della valvola cardiaca sottoposta alle condizioni proprie del ciclo cardiaco, per leaflets con diverse architetture.

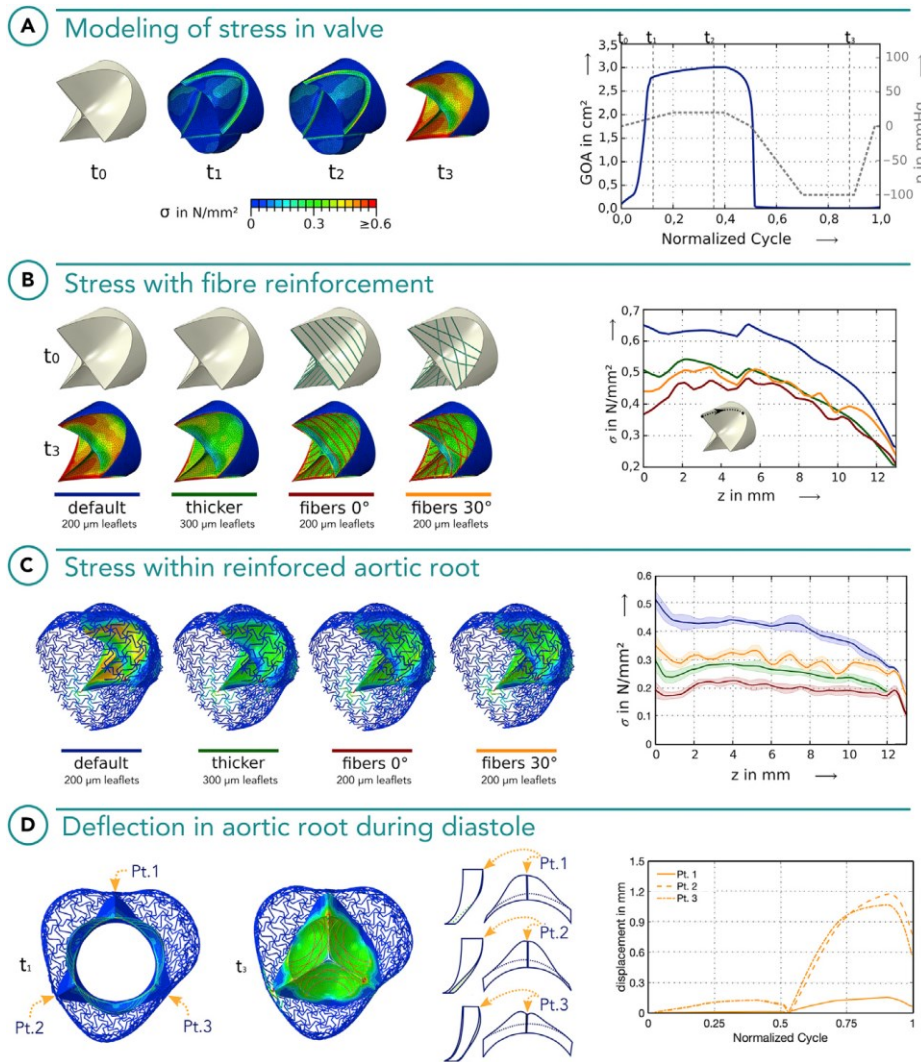


Figura 21: A) Istantanee che mostrano la distribuzione delle tensioni e GOA della valvola in un ciclo cardiaco simulato. Il ciclo cardiaco è simulato imponendo la pressione transvalvolare indicata nei leaflets di una valvola non rinforzata. I vari colori indicano le tensioni di Von Mises. B) Distribuzione delle tensioni nelle valvole con differenti architetture in fase di diastole. Il grafico riporta le tensioni lungo la linea immaginaria indicata nel modellino. C) Stessa tensione imposta nei leaflets ma con la presenza di una membrana in materiale auxetico e triangoli inter-leaflet più sottili che si estendono dalla valvola all'aorta. Le regioni sfumate del grafico evidenziano la variazione dovuta alle asimmetrie ora presenti. D) Deflessione dei tre angoli durante un ciclo cardiaco fisiologico. I dati sono mostrati solo per la valvola con fibre a 30°. [20]

Dal punto di vista del processo di realizzazione, per ottenere materialmente le protesi valvolari valutate inizialmente nello studio computazionale, è stato esplorato un processo di manifattura multimateriale additivo. Il processo è stato implementato utilizzando una scansione ottenuta tramite CT di una valvola aortica (fornita da Strait Access Technologies, Cape Town, South Africa). Le valvole che simulano questa anatomia sono state realizzate utilizzando polisilossani e sostanze chimiche che danno come risultato un silicone rigido, medio o morbido, seguendo una polimerizzazione UV-triggered (MedaSil 40, 73, and 80; Spectroplast, Zurich, Switzerland).

Questi materiali sono conformi agli standard di biocompatibilità per quanto riguarda i parametri di citotossicità, irritazione e sensibilizzazione della pelle.

I due perni che riproducono la forma della valvola cardiaca (Mandrel I) e della radice aortica (Mandrel II) sono stati fabbricati tramite stampa 3D stereolitografica utilizzando resine acriliche standard. Si veda Figura 22 per gli steps specifici.

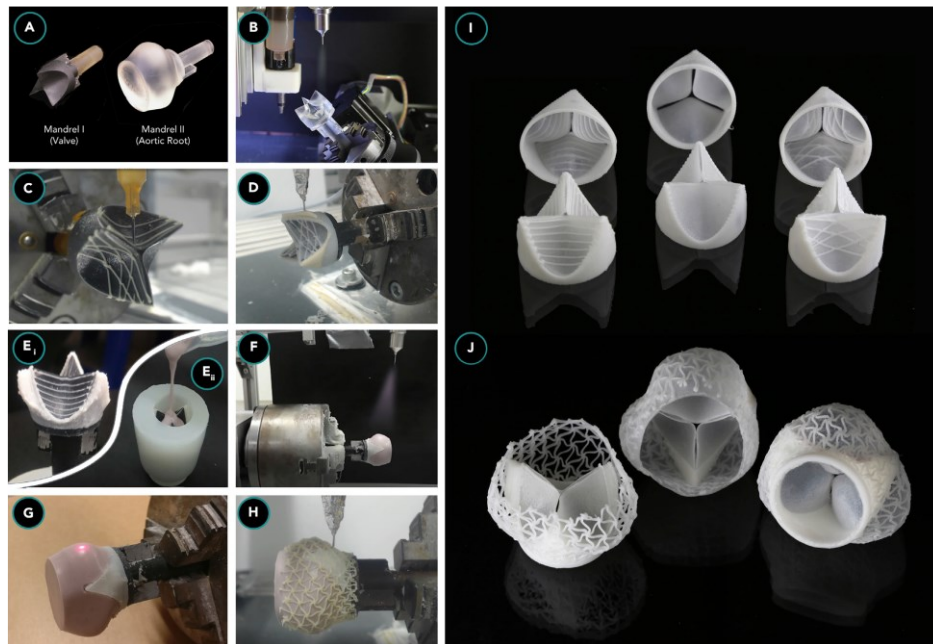


Figura 22: A) Dopo la ricostruzione dell'anatomia del recipiente della radice aortica da dati ottenuti con CT/RMI, due perni di supporto sono progettati e stampati in 3D attraverso stereolitografia. B) Il perno che simula la valvola cardiaca è montato in un setup di manifattura additiva ibrido, dove strati di silicone soft vengono spruzzati sopra, generando così i leaflets. C) Patterns rigidi di rafforzamento vengono disegnati in CAD (computer-aided design) e stampati sui leaflets precedentemente spruzzati. D) e E) I triangoli inter-leaflet personalizzati vengono stampati per ricalcare le geometrie paziente-specifiche. F) Una membrana di silicone viene spruzzata. G) e H) La superficie esterna viene misurata con un laser e infine il pattern esachirale auxetico viene stampato sulla superficie. I) Sezioni di valvola con diverse tipologie di rafforzamento. J) Sistema completo di sostituzione della valvola cardiaca comprendente leaflets e radice aortica sintetica. [20]

Le protesi valvolari cardiache realizzate sono state infine caratterizzate in termini di performance emodinamica, misurando in vitro la risposta al ciclo cardiaco in un *pulse duplicator* (bioreattore dinamico). Questi test sono stati svolti in condizioni fisiologiche utilizzando un flusso di 5L/min in media e applicando una frequenza cardiaca di 70 battiti per minuto. Il flusso era guidato da una pressione di 100 mmHg imposta attraverso la valvola utilizzando una macchina pulsatile (PD2010; ViVibro, Victoria, BC, Canada).

Sono state testate tre diverse tipologie di protesi valvolari con leaflets spessi 200 μm : non rinforzata, rinforzata con fibre a 0° , rinforzata con fibre a 30° . Istantanee di queste sono state scattate in diverse condizioni: stato diastolico completamente chiuso (0 ms), 120 ms dopo l'apertura, stato sistolico completamente aperto (300 ms). La geometria delle valvole in queste istantanee evidenzia una buona corrispondenza con la forma prevista dalla simulazione delle rispettive architetture (Figura 23.B).

Tutte le valvole esaminate hanno mostrato comportamento emodinamico simile all'interno del bioreattore a flusso pulsatile. È evidente dalla portata di flusso (flow rate) e dal GOA, che tutte le valvole reagiscono rapidamente ai cambiamenti di pressione transvalvolare, portando a veloci fenomeni di apertura e chiusura (Figura 23.D). Le valvole con i leaflets rinforzati fluttuano molto meno rispetto a quelle meno strutturate durante l'apertura.

I parametri che sono stati utilizzati per quantificare meglio il comportamento emodinamico delle architetture delle tre valvole e comparare le loro performances con i valori standard sono i seguenti due: l'area effettiva dell'orifizio (EOA, *Effective Orifice Area*) e il volume relativo del rigurgito (RV, *Regurgitation Volume*). Il primo è stato calcolato a partire dalla portata totale di flusso misurata per quantificare il livello di apertura della valvola durante la fase di sistole, mentre il secondo è stato ottenuto integrando il flusso retrogrado nel tempo trascorso durante la fase di diastole.

Le architetture delle tre valvole aortiche polimeriche soddisfano i requisiti, in termini di performance, richiesti per una protesi valvolare cardiaca aortica sottoposta a test in un *pulse duplicator*. Con valori di EOA di circa 2 cm^2 , tutte le valvole erano in grado di aprirsi due volte, ovvero quanto richiesto per garantire un sufficiente flusso transvalvolare. Analogamente, i valori di reflusso misurati sono circa tre o quattro volte più bassi rispetto al 20% necessario per minimizzare il reflusso durante la fase in cui le valvole sono chiuse.

Altre prove cui sono state sottoposte le protesi ingegnerizzate hanno anche permesso di affermare che le valvole biostampate in silicone sono in grado di sopportare circa 40 milioni di cicli se sottoposte a condizioni accelerate.

Questo evidenzia le enormi potenzialità di queste valvole laddove impiantate, e della tecnologia che ha permesso di realizzarle.

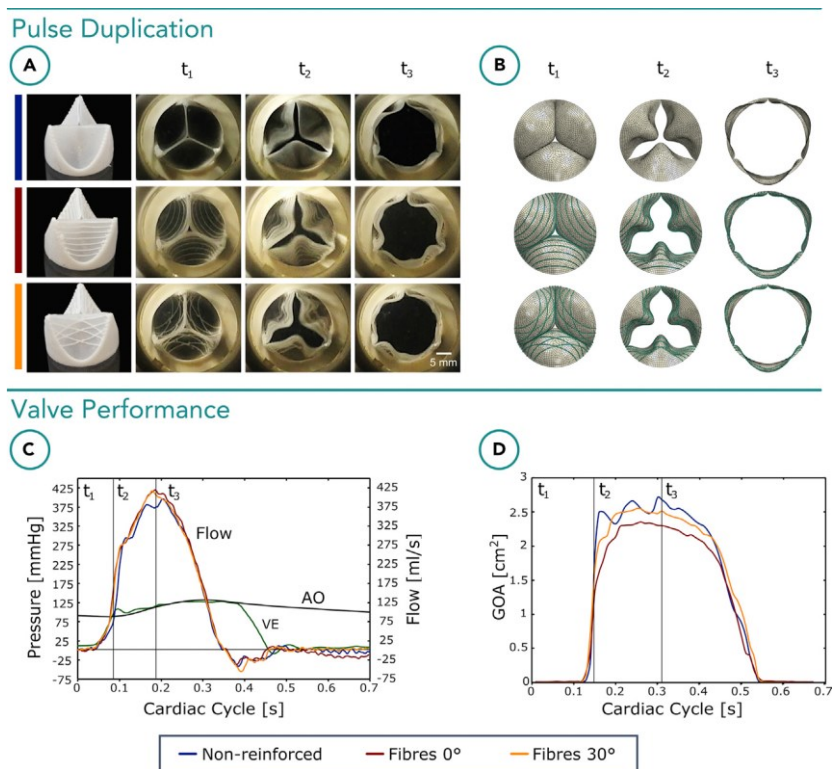


Figura 23: A) Immagini rappresentative del ciclo di apertura della valvola, partendo da quando è completamente chiusa in fase di diastole, poi metà aperta nel passaggio tra diastole e sistole e infine completamente aperta in fase di sistole. B) L'apertura osservata in questi esperimenti è conforme alle istantanee ottenute tramite simulazione FEA delle architetture delle singole valvole. C) Curve rappresentative del flusso emodinamico e della variazione di pressione per una delle valvole. Sono mostrate anche la pressione aortica (AO) e la pressione ventricolare (VE). D) Apertura geometrica dell'orifizio per le differenti valvole durante un ciclo cardiaco. [20]

Per concludere, è possibile affermare che questo tipo di costruito ingegnerizzato paziente-specifico è stato un successo. La geometria della radice aortica può essere riprodotta su larga scala ricalcando perfettamente l'anatomia del paziente, per prevenire la perdita paravalvolare. La realizzazione personalizzata dei lembi valvolari garantisce l'implementazione di architetture con fibre biostampate che replicano il design delle valvole native.

Le simulazioni a computer mostrano che questa architettura arricchita da fibre riduce drasticamente la massima tensione sviluppata sul leaflet durante la fase di diastole. Questo comporta la possibilità di un effettivo controllo sulla distribuzione delle tensioni attraverso il leaflet per incrementare la longevità della protesi valvolare. Le prove in vitro hanno dimostrato eccellenti performance emodinamiche di questi costrutti in condizioni di pressione fisiologica.

Nel complesso, quindi, questa tecnologia di realizzazione offre una notevole possibilità per creare costrutti protesici ingegnerizzati e impiantabili che simulino il più possibile la complessa architettura e le molteplici funzionalità delle loro controparti biologiche [20].

CONCLUSIONI

La nuova prospettiva dell'Ingegneria dei Tessuti ridefinisce l'approccio alla realizzazione di dispositivi protesici e, nello specifico, la TEHV (*Tissue Engineering of Heart Valve*), ingegneria tissutale della valvola cardiaca, propone una via alternativa alla realizzazione di protesi valvolari cardiache, superando i limiti presentati dalle protesi sin d'ora utilizzate.

Le valvole cardiache ingegnerizzate risultano essere la soluzione ottimale per non dover sottoporre il paziente ad una terapia anticoagulante a vita, alla quale sarebbe sottoposto se si utilizzasse una protesi valvolare meccanica, ma anche per non dover sottoporre il paziente stesso a ripetuti interventi di sostituzione della protesi durante il corso della vita, problema che si porrebbe in caso di utilizzo di una protesi valvolare biologica, di durata solitamente non maggiore ai 10-15 anni.

Le protesi valvolari cardiache ottenute mediante le innovative tecniche di ingegneria dei tessuti sono un valido rimedio soprattutto in chirurgia pediatrica, dove sono necessari dispositivi protesici in grado di crescere e maturare con il paziente; tali dispositivi sono infatti organi viventi a tutti gli effetti che, una volta impiantati, sono in grado di crescere e rispondere ai processi fisiologici allo stesso modo di una valvola nativa.

Gli esempi di applicazione e realizzazione di TEHV forniti, quali la stented-TEHV con scaffold elastomerico e la TEHV con scaffold polimerico ripopolato con cellule derivanti da cordone ombelicale vascolarizzato crioconservato, esemplificano l'importanza di questa nuova branca a cavallo tra la medicina e l'ingegneria, che si prospetta avere un futuro interessante, conducendo auspicabilmente alla realizzazione di interi organi artificiali, ma a tutti gli effetti biocompatibili e biofunzionali.

Volendo fornire qualche numero, attualmente più di 8 mila sono gli italiani in lista d'attesa per uno o più trapianti d'organo, per un totale che supera i 20 mila interventi necessari. Negli Stati Uniti, ogni dieci minuti, un nuovo nome si aggiunge alla lista e le donazioni non riescono a tenere il passo della domanda, causando innumerevoli decessi nell'attesa e incentivando, di conseguenza, il mercato nero degli organi.

L'interesse per queste nuove tecniche ingegneristiche, che mi ha spinto a scegliere questo argomento come argomento di tesi, è senza dubbio incrementato studiando e analizzando nello specifico tali tematiche.

Oggi credo di poter affermare che uno tra i miei sogni e obiettivi sarebbe proprio quello di poter contribuire, un giorno, alla realizzazione di interi organi ingegnerizzati, al momento ancora in fase di studio e trials clinici, regalando a quante più persone possibile una nuova vita senza la paura e l'incertezza delle note liste di attesa per i trapianti.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Barbatelli G., Bertoni L., Boccafoschi F., Bosetti M., Carini F., *Anatomia Umana – Fondamenti*, Edi.Ermes, 2018.
- [2] Baldaccini N.E., Capanna E., Franzoni M.F., *Anatomia Comparata*, Antonio Delfino Editore, 2005.
- [3] Netter F., *Atlas of Human Anatomy*, Masson Publ, Milano, 2005.
- [4] <https://www.msmanuals.com/it-it/professionale/disturbi-dell-apparato-cardiovascolare/disturbi-valvolari/panoramica-sulle-patologie-valvolari-cardiache> - ultima consultazione Febbraio 2022
- [5] Cambi A., *Classificazione di formazioni trombotiche su valvole cardiache meccaniche bileaflet*, Tesi di Laurea Specialistica in Bioingegneria, A.A 2009/2010.
- [6] Vesely I., *Heart Valve Tissue Engineering*, Circulation Research, 14 Ottobre 2005. <http://ahajournals.org> – ultima consultazione Febbraio 2022.
- [7] Mantero S., Remuzzi A., Raimondi M. T., Ahluwalia A., *Fondamenti di ingegneria dei tessuti per la medicina rigenerativa*, Patron Editore, 2009.
- [8] Shafiee A., Atala A., *Tissue Engineering: Toward a New Era of Medicine*, Annual Review of Medicine, med.annualreviews.org, article's doi: 10.1146/annurev-med-102715-092331.
- [9] Gagliano O., *Fonocardiografia nell'ultrasuono per la valutazione funzionale di dispositivi protesici cardiaci*, Tesi di Laurea Specialistica in Bioingegneria, A.A. 2010/11.
- [10] Gandaglia A., Bagno A., Naso F., Spina M., Gerosa G., *Cells, scaffolds and bioreactors for tissue-engineered heart valves: a journey from basic concepts to contemporary developmental innovations*, Elsevier B.V., 2010. <https://academic.oup.com/ejcts/article/39/4/523/524541>
- [11] Cohan G.N., D'Amore A., Matsumura Y., Pedersen D.D., Luketich S.K., Shanov V., Katz W.E., David T.E., Wagner W.R., Badhwar V., *In vivo functional assessment of a novel degradable metal*

and elastomeric scaffold-based tissue engineered heart valve, The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2018.09.128>

[12] Sodian R., Leuders C., Kraemer L., Kuebler W., Shakibaei M., Reichart B., Daebritz S., Hetzer R., *Tissue Engineering of Autologous Human Heart Valves Using Cryopreserved Vascular Umbilical Cord Cells*, The Society of Thoracic Surgeon, 2006. doi:10.1016/j.athoracsur.2005.12.073

[13] Gastaldello A., *Ingegneria Tissutale delle Valvole Cardiache: valutazione di metodi di decellularizzazione e semine cellulari su Pericardio Bovino e Porcino*, Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze mediche, cliniche e sperimentali.

[14] Barron V., Lyons E., Stenson-Cox C., McHugh P.E., Pandit A., *Bioreactors for Cardiovascular Cell and Tissue Growth: A Review*, Annals of Biomedical Engineering, 2003.

[15] Mendelson K., Schoen F.J., *Heart valve tissue engineering: Concepts, approaches, progress, and challenges*, Annals of Biomedical Engineering, 2006.

[16] VeDepo M.C., Buse E.E., Paul A., Converse G.L., Hopkins R.A., *Non-physiologic Bioreactor Processing Conditions for Heart Valve Tissue Engineering*, Biomedical Engineering Society, 2019. <https://doi.org/10.1007/s13239-019-00438-x>

[17] Guillemot F., Mironov V., Nakamura M., *Bioprinting is coming of age: report from the International Conference on Bioprinting and Biofabrication in Bordeaux*, Biofabrication, 2010.

[18] Milani P., *Medicina Rigenerativa e Nanomateriali*, <http://www.agorascienza.it>

[19] Zhang L.G., Fisher J.P., Leong K.W., *3D Bioprinting and Nanotechnology in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Elsevier, 2015.

[20] Coulter F.B., Schaffner M., Faber J.A., Rafsanjani A., Smith R., Appa H., Zilla P., Bezuidenhout D., Studart A.R., *Bioinspired Heart Valve Prosthesis Made by Silicone Additive Manufacturing*, Coulter et al., Matter, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.matt.2019.05.013>.

[21] Berthiaume F, Yarmush ML. Tissue engineering. In: Bronzino JD, ed. The Biomedical Engineering Handbook. Boca Raton, Fla: CRC Press Inc; 1995:1556 –1566.

[22] McIntire LV, Greisler HP, Griffith L, Johnson PC, Mooney DJ, Mrksich M, Parenteau NL, Smith D. WTEC Panel Report on Tissue Engineering Research. Baltimore, Md: Loyola College; 2002.

[23] Leberfinger Ashley N., Dinda Shantanab, Wu Yang, Koduru Srinivas V., Ozbolat Veli, Ravnicec Dino J., Ozbolat Ibrahim T., *Bioprinting functional tissues*, 2019 Acta Biomaterialia Inc. Published by Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.01.009>.

[24] Giovanelli A., Bioprinting: stato dell'arte ed applicazioni biomediche, Elaborato in Ingegneria Clinica, Corso di Laurea in ingegneria biomedica, Alma Mater Studiorum – Università di Bologna, A.A. 2014/15.

[25] Centro E. Piaggio, Bioengineering and robotics research center, *Protesi valvolari*. https://www.centropiaggio.unipi.it/sites/default/files/course/material/2019-05-20_-_protesi_valvolari.pdf.