



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**



DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**“Scaffold a base poliuretanică nell'ingegneria tissutale del sistema
cardiovascolare”**

Relatore: Prof. Andrea Bagno

Laureando: Matteo Dalla Chiara

ANNO ACCADEMICO 2022 – 2023

Data di laurea 16 Marzo 2023

Indice

Abstract	4
Introduzione	5
Capitolo 1	6
I poliuretani e applicazioni	6
1.1 Derivazione e sintesi dei poliuretani	6
1.2 Struttura e proprietà	6
1.3 Applicazioni.....	7
1.3.1 <i>Prodotti di poliuretano espansi</i>	7
1.3.2 <i>Poliuretani elastomerici termoplastici</i>	10
1.4 Sostenibilità	10
Capitolo 2	12
PU per applicazioni in ambito biomedico	12
2.1 Ambito Biomedicale.....	12
2.2 PU ibridi	13
2.2.1 <i>Trasportatori di eugenolo</i>	14
2.2.2 <i>Fibre di PU combinate con Clopidogrel</i>	14
2.3 PU a base biologica	14
2.3.1 <i>Innovazioni di PU biologici</i>	15
2.4 <i>Scaffold</i>	16
2.4.1 <i>Scaffold per la riparazione di tessuti cartilaginei</i>	18
2.4.2 <i>Scaffold per la riparazione di tessuti ossei</i>	19
Capitolo 3	21
PU nell'ingegneria tissutale	21
3.1 Sistema cardiovascolare	21
3.1.1 <i>Il sangue</i>	22
3.1.2 <i>La coagulazione</i>	22
3.2 <i>Tissue engineering</i>	23
3.3 Proprietà degli scaffold.....	24
3.4 Elettrofilatura.....	25
3.4.1 <i>Fibre nell'ambito biomedico</i>	26
3.4.2 <i>Sistemi multistrato</i>	27
3.5 <i>Scaffold</i> cardiaci creati con fibre di PU	27
3.6 Degradazione nell'organismo	29
3.6.1 <i>Degradazione per idrolisi</i>	29

3.6.2 <i>Degradazione enzimatica</i>	30
3.6.3 <i>Degradazione ossidativa e meccanica</i>	30
3.7 Problematiche relative alle protesi cardiovascolari	30
Capitolo 4	32
Casi di studio	32
4.1 Esperimenti in vitro	32
4.1.1 <i>Estrusione in vitro</i>	32
4.1.2 <i>Elettrofilatura in vitro</i>	34
4.2 Esperimenti in vivo.....	36
4.2.1 <i>Elettrofilatura in vivo</i>	36
Conclusioni.....	39
Bibliografia.....	40

Abstract

L'ingegneria tessutale è una branca della medicina moderna in pieno sviluppo. Essa prevede l'utilizzo di materiali biocompatibili che fungono da supporto tridimensionale nella ricostruzione dei tessuti lesionati o malati.

In questo lavoro di tesi si vuole evidenziare come i polimeri poliuretanicici (PU) siano estremamente utili nella creazione di *scaffold* in ambito cardiovascolare.

Nel sistema cardiovascolare, le valvole cardiache e i vasi sanguigni sono costantemente sottoposti a carichi meccanici ciclici dovuti alla pulsazione cardiaca: i PU dimostrano ottime proprietà fisiche, meccaniche e chimiche e risultano idonei al contatto con i tessuti umani in quando sono biocompatibili; inoltre, è possibile controllarne la cinetica di degradazione a seguito della quale vengono rilasciati sottoprodotti con bassa tossicità.

Oltre ad avere ottime proprietà generali, i PU possono fornire un substrato per la adesione, proliferazione e differenziazione di cellule staminali.

La tecnica maggiormente utilizzata per la creazione di *scaffold* che garantisce il miglior sviluppo di tessuto è *l'electrospinning*. Tale tecnica riesce a formare una struttura fibrosa molto simile alla matrice extracellulare, con una porosità controllabile per favorire la colonizzazione da parte delle cellule

In questa tesina vengono presentati vari casi di studio, *in vitro* e *in vivo*, in cui si segnalano gli ottimi risultati ottenuti tramite strutture di PU realizzate mediante elettrofilatura.

Introduzione

La guarigione delle ferite rappresenta un importante ambito di ricerca nel campo biomedico. L'ingegneria tissutale, settore in rapido sviluppo, è alla ricerca di nuovi materiali in grado di favorire la guarigione, in maniera efficace ed efficiente, di lesioni di diversa origine. Si tratta di materiale che non solo devono garantire un'alta biocompatibilità ma devono essere anche capaci di interagire in modo favorevole con i tessuti biologici. Inoltre, l'aspetto economico, la facilità di manifattura e il recupero delle materie prime sono fattori fondamentali da considerare, soprattutto nella produzione su ampia scala.

I poliuretani rappresentano una famiglia di polimeri versatile e promettente, che può essere utilizzata in diverse forme (ad esempio, schiume, rivestimenti e adesivi) e in molteplici settori, tra cui quello medico-scientifico. Questi materiali, descritti per la prima volta nella letteratura scientifica da Otto Bayer nel 1937, sono stati originariamente utilizzati per scopi militari durante la Seconda Guerra Mondiale, ma ora trovano impiego in molti altri contesti, grazie alla loro capacità di adattarsi alle esigenze dell'applicazione finale.

In particolare, i poliuretani sono molto utili per la creazione di *scaffold* e *hydrogels*, che sono fondamentali per la ricerca scientifica perché sono in grado di riprodurre alcune caratteristiche dei tessuti umani. Grazie alla loro versatilità, i poliuretani sono stati utilizzati anche per migliorare la rigenerazione tissutale, aumentando i risultati della ricerca in vitro e in vivo in favore di una migliore qualità di vita delle persone, riducendo le complicanze post-chirurgiche e promuovendo una guarigione più rapida ed efficace.

Le proprietà dei poliuretani non si limitano alla loro versatilità: questi polimeri sono anche caratterizzati da una buona emocompatibilità e dalla capacità di interagire con altri materiali, siano essi organici o inorganici. Inoltre, i poliuretani possono essere modificati in superficie per promuovere l'adesione e la proliferazione cellulare anche nel caso di *scaffold* dedicati alla rigenerazione dei tessuti lesionati.

Capitolo 1

I poliuretani e applicazioni

1.1 Derivazione e sintesi dei poliuretani

I poliuretani, comunemente noti come PU, sono polimeri di condensazione/addizione la cui catena è costituita da legami uretanici.

Le materie prime da cui si possono ottenere sono principalmente i prodotti del processo petrolchimico della raffinazione del carbone e del petrolio greggio, utilizzando sottoprodotti di natura vegetale (biomasse lignocellulosiche) da cui si estrae la lignina.

Fino ad oggi, in letteratura, sono state presentate molteplici reazioni di sintesi per poliuretani. Nonostante questo, quella principale e maggiormente utilizzata è tramite la poliaddizione di un monomero di poliolo (un alcool: $\text{HOCH}_2(\text{CHOH})_n\text{CH}_2\text{OH}$) e un monomero di diisocianato ($\text{R} - \text{N} = \text{C} = \text{O}$). Il punto chiave di questo processo è l'alta reattività del gruppo isocianato con l'idrogeno nei composti attivi, i quali sono caratterizzati da: idrossili, acqua, acidi carbossilici e anidridi.

Gli isocianati in quanto elettrofili possono reagire con gli alcoli per formare gli uretani; la reazione è esotermica e viene catalizzata dalle ammine terziarie, le quali sono basi [1].

I due gruppi funzionali che vengono maggiormente utilizzati su scala industriale sono il MDI (metilendifenil diisocianato) e il TDI (toluene diisocianato), con l'aggiunta di additivi che fungono da catalizzatore (Figura 1.1)

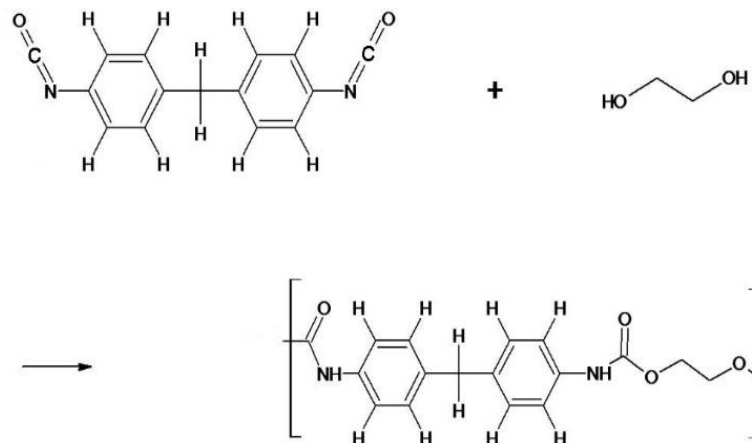


Figura 1.1: reazione chimica tra isocianato (in alto a sinistra) e poliolo (in alto a destra) per la sintesi di poliuretano.

1.2 Struttura e proprietà

La struttura dei poliuretani può variare da polimeri reticolati rigidi (PU termoindurenti) ed elastomeri con catene lineari e flessibili (PU termoplastici). I primi sono caratterizzati da

reticoli uniti da legami covalenti, mentre i PU termoplastici sono organizzati in fibre singole allineate.

Combinando in modo differente le numerose tipologie di isocianati e polioli, tramite l'aggiunta di additivi, si possono sintetizzare poliuretani con proprietà completamente differenti tra loro, ottenendo quindi polimeri termoplastici, termoindurenti, flessibili, rigidi, solidi e schiume.

Al giorno d'oggi, grazie ai progressi nelle tecnologie di produzione, si è in grado di creare dei poliuretani con proprietà specifiche e mirate al loro utilizzo, attraverso diverse tecniche che ne modificano la morfologia superficiale e la struttura.

1.3 Applicazioni

In ragione delle molteplicità di strutture e caratteristiche che si possono ottenere durante il processo di sintesi, i PU sono adatti all'utilizzo in moltissimi ambiti: dall'edilizia all'abbigliamento, dal settore automobilistico a quello biomedicale (circa il 3%). La produzione annuale di PU è stata stimata nel 2015 a circa 18 milioni di tonnellate.

1.3.1 Prodotti di poliuretano espansi

Il termine espanso fa riferimento a materiali nei quali è presente aria delimitata in celle o da pareti. Gli espansi poliuretanici sono talvolta chiamati schiume poliuretatiche, e sono prodotti aggiungendo piccole quantità di acqua, in quanto l'isocianato essendo poco solubile reagisce molto velocemente solo in presenza di alte temperature. A temperatura ambiente e in assenza di catalizzatore la reazione è molto lenta. Quest'ultima, favorita da temperature adeguate, potrebbe evolvere in una risposta violenta. Tale processo può avvenire mediante due meccanismi: il primo e il più importante viene utilizzato come metodo per espandere le schiume poliuretatiche, ed è rappresentato dai seguenti step:



L'anidride carbonica rilasciata rappresenta proprio l'agente espandente (Figura 1.2).

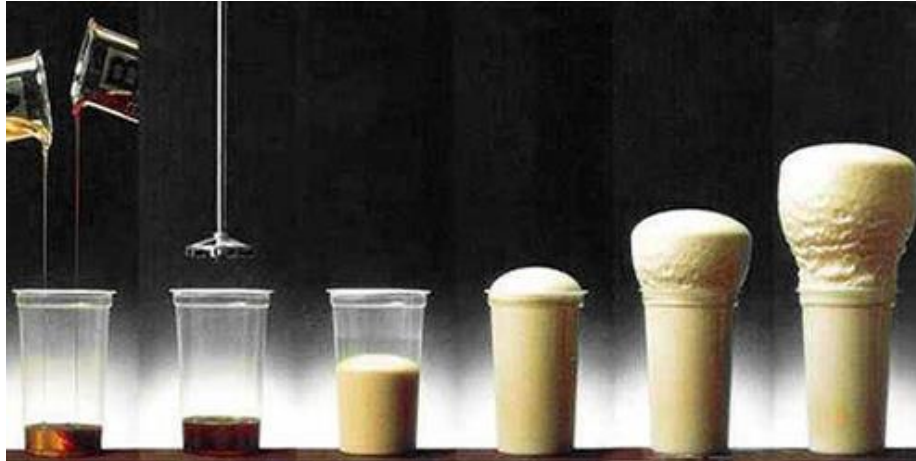


Figura 1.2: esempio di produzione di una schiuma poliuretanic.

Il secondo, detto soffiaggio fisico, utilizza un liquido bassobollente come per esempio il pentano, che si miscela con il poliolo. La reazione è esotermica, il calore prodotto permette al pentano di evaporare creando la schiuma.

Le schiume di PU sono caratterizzate da una bassa densità, per cui la loro massa è bassa e il volume occupato è maggiore rispetto ad altri materiali costituiti dal medesimo polimero.

Le schiume sono suddivise in due categorie:

- schiume poliuretantiche rigide;
- schiume poliuretantiche flessibili.

Le prime sono caratterizzate da una porosità di tipo chiuso, infatti, il gas rimane incluso nelle celle. Gli agenti espandenti non vengono solamente utilizzati come tali, ma influiscono direttamente sulle proprietà meccaniche dell'oggetto, rendendolo più o meno flessibile. Per questo la scelta dell'espandente dipende dall'applicazione finale del materiale, e spesso si utilizza in combinazione con un agente fisico (ad esempio un gas) e un agente chimico (solitamente CO₂ derivante dalla reazione tra isocianato e acqua).

La densità degli espansi rigidi è compresa tra 25 e 60 Kg/m³, è possibile realizzare schiume con valori di densità che raggiungono i 200 Kg/m³ [2]. Con l'aumentare della densità crescono i parametri delle proprietà meccaniche, quali: resistenza a trazione, resistenza a compressione e modulo elastico, quest'ultime sono importanti per le applicazioni in cui è richiesto il supporto di carichi.

Le schiume rigide vengono principalmente usate nell'industria e nel settore edile per la loro ottima capacità di isolamento termico, con range di sopportazione di temperature che variano dai -40°C ai 100°C e di isolamento acustico. Le schiume rigide sono tipicamente utilizzate in

elettrodomestici, quali i frigoriferi, in pannelli di isolamento termico e nell'isolamento di tubazioni idrauliche.

Gli espansi poliuretanicici flessibili, a differenza delle schiume rigide, sono caratterizzati da una morfologia a celle aperte e interconnesse, il cui volume è riempito al 99% da aria. Le proprietà meccaniche di questi materiali sono determinate da: reagenti, formulazione scelta e densità apparente. La densità è generalmente compresa tra 20 e 40 Kg/m³. Per specifici campi di applicazione, è possibile produrre schiume ultraleggere, attorno i 16 kg/m³ oppure ultraspesanti, attorno i 130 kg/m³. La scelta della densità è determinata dalla tipologia di utilizzo del prodotto ed è una proprietà importante delle schiume flessibili in quanto può essere controllata. Il settore maggiormente coinvolto nell'utilizzo di una schiuma poliuretanicica flessibile è quello dell'arredamento infatti, un esempio, sono i materassi e i cuscini in *memory foam*.

La vasta gamma di proprietà e il continuo sviluppo di nuove tipologie di espansi, hanno reso questi materiali indispensabili per molteplici applicazioni (Tabella 1.1). Questi costituiscono il 67% dell'uso del poliuretano a livello globale [3]. Ad esempio, schiume flessibili, sono impiegate nel settore dell'arredamento (materassi, cuscini, tappeti), nel settore automobilistico (riempitivi, isolanti acustici), a livello industriale (materiali per l'imballaggio) e per l'isolamento termico. Esistono, inoltre, numerosi ambiti di applicazione per i quali sono necessarie schiume con particolari requisiti tecnici che vengono prodotte in bassi volumi. Queste applicazioni richiedono pori di dimensioni e struttura controllate, particolari caratteristiche di porosità e specifiche proprietà meccaniche. Un esempio è la produzione di scaffold per il *soft tissue engineering*.

Usi	Ragioni
Cuscini	Bassa densità, flessibilità, resistenza a fatica
Suole delle scarpe	Flessibilità, resistenza all'abrasione, durabilità
Pannelli da costruzione	Isolamento termico, resistenza, durabilità
Valvole cardiache artificiali	Flessibilità e stabilità.
Equipaggiamento elettrico	Isolamento elettrico, durezza, resistenza a oli

Tabella 1.1: oggetti in poliuretano e loro proprietà.

1.3.2 Poliuretani elastomerici termoplastici

I PU elastomerici, spesso costituiti da copolimeri e caratterizzati da una forma lineare, sono composti da due fasi: una morbida che corrisponde al poliolo, ed una più rigida che è determinata dall'isocianato. La prima, denominata *soft segment*, è responsabile del comportamento elastico; la seconda, detta *hard segment*, influisce sulla resistenza meccanica. Il rapporto di peso tra queste due fasi determina le caratteristiche meccaniche e strutturali del materiale finale. Questa particolare composizione segmentata del PU elastomerico dà la possibilità che se ne faccia uso all'interno dell'ambito medico in quanto è estremamente compatibile con i tessuti (per esempio il sangue e i muscoli). Inoltre, permette la facilitazione della regolazione dell'assorbimento di proteine sulla superficie del polimero e previene l'attivazione delle piastrine, di conseguenza la formazione della fibrina, evitando la formazione di coaguli.

I PU elastomerici possono avere un comportamento sia elastico sia viscoelastico, il quale permette loro un'ottima flessibilità. Questi ultimi sono ampiamente sfruttati per formare piccole tubazioni e *stent*. Possiedono una buona resistenza all'abrasione, un elevato indice di allungamento a trazione e trasparenza. Peculiarità dei polimeri termoplastici è la possibilità di riciclarli, in quanto è possibile fonderli e nella fase liquida e rimodellarne la forma.

1.4 Sostenibilità

La produzione massiva di plastiche rappresenta di per sé un problema per la salvaguardia dell'ambiente, in quanto, sono materiali con tempi di degradazione estremamente lunghi, risultanti un pericolo per il pianeta.

La possibilità di utilizzare i polimeri che derivano direttamente da materiali biologici rende particolarmente efficiente il loro impiego. Tutte le industrie, negli ultimi decenni, si stanno spostando verso un mondo più sostenibile.

Un problema che sorge durante il processo produzione dei PU, è l'alta tossicità dovuta dall'utilizzo e dalla provenienza degli isocianati. Per far fronte a questo inconveniente [4], grazie ad uno studio condotto da Yang et al si è iniziato ad utilizzare la farina di legno e lignocellulosa nel processo di formazione della schiuma poliuretanic; rimpiazzando, quindi, i polioli tradizionali ricavati dal processo petrolchimico. La schiuma ottenuta risulta più gradevole e liscia al tatto a parità di tempi di produzione; inoltre le proprietà meccaniche sono risultate simili a quelle della schiuma prodotta con materie prime inorganiche, rendendo i PU bio ottimi per l'uso quotidiano.

La possibilità di poter ricreare dei PU con materiali ecosostenibili e con costi contenuti apre un nuovo fronte nell'industrie nelle quali sarà possibile produrre oggetti più facilmente riciclabili [5].

Capitolo 2

PU per applicazioni in ambito biomedico

2.1 Ambito Biomedicale

Sebbene i materiali in poliuretano siano stati scoperti alla fine degli anni 30 del 1900, il primo utilizzo registrato in ambito biomedicale è stato nel 1950. Questo fu una schiuma di poliestere-uretano usata per il rivestimento di una protesi mammaria. In tempi brevi, il suo utilizzo venne ampliato e nel giro di pochi anni venne sviluppata una schiuma a base poliuretanicca che permise di ricoprire il ruolo di *gap filler* e di agente immobilizzante per una frattura ossea. Questa cambiò radicalmente l'approccio verso lesioni di questa tipologia che in precedenza necessitavano interventi invasivi. La capacità di sintetizzare il polimero in miscele liquide, quindi, si dimostrò estremamente utile per la creazione di biomateriali iniettabili.

I PU nell'ambito della medicina moderna sono divisibili in due gruppi in base alla loro struttura chimica: i biodegradabili e i bioinerti.

Come si evince dal nome, gli oggetti in poliuretano biodegradabile comprendono tutti quei materiali che una volta svolto il loro compito vengono smaltiti dall'organismo senza lasciare residui. Affinché possano comportarsi in tale maniera devono avere delle determinate caratteristiche; ovvero essere biocompatibili e presentare il giusto equilibrio tra idrofobicità e idrofilicità.

I materiali bioinerti, invece, sono in grado di stare a contatto diretto con i vari tessuti senza scatenare alcun tipo di risposta infiammatoria. A differenza di quelli biodegradabili, svolgono il loro compito senza degradare nel tempo.

Come anticipato, i PU sono utilizzati in molti campi della medicina. Infatti, sono largamente sfruttati nella chirurgia plastica, in ortopedia, in odontoiatria, in chirurgia vascolare e nel *tissue engineering*. Un esempio di utilizzo è riportato in Rigira 2.1.

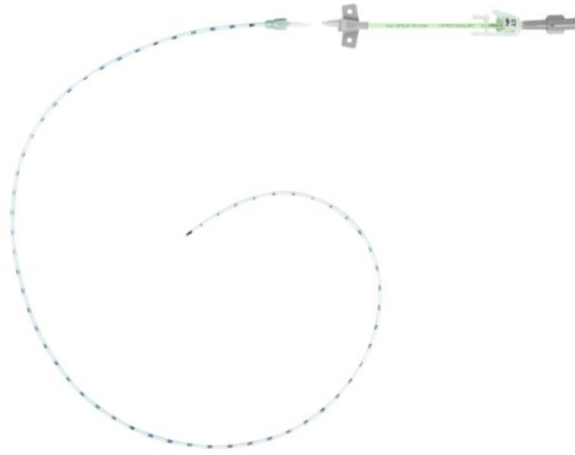


Figura 2.1: catetere picc in poliuretano.

Un esempio dell'impiego di PU in ambito medico è la ricostruzione di parti del tessuto tegumentario. In base alla gravità del danno, la guarigione di questo tessuto necessita di tempo, che può variare da alcuni giorni ad alcuni mesi nei casi più gravi. Per diminuire le tempistiche e aumentare la qualità della guarigione sono stati implementati materiali, detti *graf*. Questi sono innesti a base poliuretaniche che vengono posizionati a ridosso della lesione. Essi consistono in una matrice di poliuretano in cui sono inserite frazioni di oli vegetali e derivati della chitina. Le sostanze incluse nella matrice di poliuretano vengono rilasciate nel tempo migliorando la guarigione del tessuto; questo comportamento li rende assimilabili agli *hydrogels* che hanno ottime proprietà rigenerative.

Un'alta percentuale d'impiego dei PU avviene nei sistemi di somministrazione di farmaci, in quanto è stato dimostrato che strutture di poliuretano con questo scopo hanno migliorato gli effetti delle terapie per il rilascio di medicinali nell'organismo. Un esempio è l'inserimento di antibiotici come la ciprofloxacina (che contiene atomi di fluoro) all'interno di una struttura poliuretaniche e il suo rilascio tramite la biodegradazione di quest'ultimo. Questa tipologia di dispositivi è destinata ad un uso di breve durata, per esempio l'eliminazione di un'infezione localizzata.

2.2 PU ibridi

Come descritto in precedenza, le caratteristiche dei prodotti in poliuretano dipendono dal tipo di isocianato e poliolo che vengono utilizzati per la loro sintesi. Una peculiarità di questo polimero è la capacità di combinarlo con diverse sostanze, come cellule e proteine, per migliorarne le caratteristiche meccaniche e la biocompatibilità delle protesi.

2.2.1 Trasportatori di eugenolo

L'eugenolo, detto EU, è un estratto vegetale di fenilpropene ricavato dall'albero di chiodi di garofano. È utilizzato su ampia scala nell'ambito biomedico e nell'industria chimica. [6]

Uno studio in vitro ha dimostrato come un polimero ibrido di PU e innesti di EU nella sua struttura, possa migliorare i trattamenti chemioterapici, in quanto il composto è in grado di comportarsi da adiuvante. Un altro studio ha messo in evidenza come i trasportatori di EU a base di PU siano in grado di rallentare la crescita di cellule cancerogene nella cavità orale; infatti, nello studio è stato messo in evidenza l'arresto degli effetti inibitori sulla respirazione mitocondriale.

Dimostrate le capacità antinfiammatorie e antisettiche dell'eugenolo, combinate con l'alta reperibilità della materia prima e i bassi costi di produzione, i composti di poliuretano e di eugenolo sono l'avanguardia di nuovi trattamenti dell'ambito oncologico [7].

2.2.2 Fibre di PU combinate con Clopidogrel

Il clopidogrel è un farmaco e principio attivo, il cui ruolo è di antiaggregante piastrinico, utilizzato per prevenire trombi e malattie cardiovascolari come infarto del miocardio e ictus.

Un qualsiasi materiale a contatto col sistema circolatorio, anche per la semplice chiusura di una ferita superficiale, se non trattato rischia di attivare il processo della coagulazione. Affinché questo non accada si ricorre al rivestimento degli oggetti con anticoagulanti. Siano essi *graft*, *stent*, o protesi (per esempio valvole cardiache).

Il rivestimento di questi strumenti può essere svolto da fibre poliuretatiche intrise di clopidogrel, permettendo una maggior tromboresistenza e maggior emocompatibilità, lasciando inalterate le loro proprietà meccaniche [8].

2.3 PU a base biologica

Negli ultimi decenni, la ricerca si è focalizzata sullo sviluppo di architetture composte da macromolecole a base biologica. Per questo l'implementazione di biomateriali in poliuretano è aumentata a dismisura, in quanto la loro realizzazione deriva da una fonte rinnovabile, infatti, è possibile integrare il poliuretano con catene di derivazione biologica le cui risorse principali sono i lipidi, i polisaccaridi, le proteine vegetali e animali.

In letteratura è presente uno studio in cui delle micromolecole di PU sono state combinate con l'amido per formare un composto termoplastico con ottime capacità meccaniche [9].

Il vantaggio di questa tipologia di PU è la capacità del polimero di stare a contatto col tessuto di un organismo. Per questo, un parametro fondamentale da tenere in considerazione è l'ottima capacità di adesione cellulare, che avviene tramite proteine. Un altro vantaggio di questi materiali è la capacità di decomporsi senza rilasciare sostanze tossiche e senza alterare il metabolismo delle cellule adiacenti, questo è possibile in quanto la loro degradazione può avvenire facilmente per idrolisi o per azione enzimatica, facendo sì che vengano messe in circolazione molecole già presenti all'interno nell'organismo.

Uno studio presente in letteratura riporta come i poliuretani sintetizzati con isocianati alifatici diano luogo in vitro e in vivo a prodotti di degradazione non citotossici, mentre l'utilizzo di isocianati aromatici risulta potenzialmente cancerogeno in alcune circostanze. Questo venne notato agli inizi del 1980 quando vennero ritirate dal commercio delle protesi mammarie di silicone rivestite con una schiuma poliuretanicca. L'espanso era usato per ricoprire la protesi in quanto impediva la formazione di tessuto cicatriziale attorno ad essa, ma negli anni successivi si dimostrò che la degradazione superficiale della schiuma poliuretanicca comportava il rilascio di sostanze cancerogene.

Un esempio di proteina che viene utilizzata insieme al poliuretano è il collagene, che permette una miglior integrazione con i tessuti e con la ECM.

2.3.1 Innovazioni di PU biologici

Le più recenti applicazioni di materiali in poliuretano a base biologica si focalizza sulla capacità di ricreare strutture che siano in grado di adattarsi e rispondere a stimoli esterni. Questi materiali, detti *shape-memory PUs* (SMPU), sono in grado di mantenere inalterate le loro caratteristiche fisiche e cambiare la loro forma in adeguate circostanze (Figura 2.2). Sono ritrovabili principalmente nell'ambito odontoiatrico e chirurgico, per esempio gli *stent* [10].

Negli ultimi anni sta incrementando il loro utilizzo anche nell'ambito del *tissue engineering*, in quanto hanno il potenziale di rimpiazzare le leghe metalliche. Rispetto a quest'ultime hanno costi di produzione inferiori, una minor densità e una minore resistenza alla deformazione.

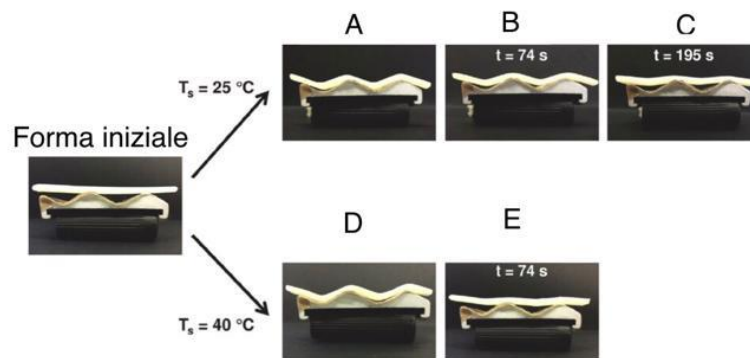


Figura 2.2: foto di un SMPU che evidenzia il ritorno alla sua forma originale dopo essere stato deformato (in A e D). Dopo 74 secondi, si osserva a temperatura ambiente un leggero ritorno verso le condizioni iniziali (B) mentre a 40°C torna direttamente alla forma iniziale. A 25°C il tempo per tornare alla forma di partenza è di 195 secondi.

La malleabilità dei SMPU permette l'aumento della chirurgia non invasiva, in quanto è possibile far tornare il polimero alla sua forma originaria tramite diversi stimoli, tra cui: l'acqua, campi magnetici, e infine il metodo più utilizzato, l'aumento della temperatura. È stato riportato in letteratura uno studio in cui una membrana di SMPU è stata inserita a contatto con un batterio (*P. aeruginosa*) per sei settimane a 37°C in cui la sua massa è diminuita di circa il 30%. Questo dato ci permette di pensare ad una propensione per un utilizzo a lungo termine di questi materiali innovativi.

2.4 Scaffold

Si definisce *scaffold* una struttura tridimensionale, di origine naturale o artificiale, sulla quale vengono seminate e coltivate cellule, al fine di generare un costrutto biologico funzionale.

Lo scaffold è alla base dell'ingegneria tissutale, in quanto il suo scopo è quello di creare un supporto ad un tessuto durante la sua rigenerazione, quando malato o lesionato. Gli *scaffold* sono l'avanguardia per tutto il settore medico in quanto danno la possibilità di ricevere cure efficienti. Considerando che solo a gennaio del 2018, negli Stati Uniti, la richiesta di un trapianto di organi era di circa 115000 pazienti, di cui solo 34769 hanno potuto ottenere un trapianto eseguito con successo.

Affinché lo scaffold abbia un effetto efficace deve presentare determinate caratteristiche; ovvero deve:

- essere biocompatibile
- essere biorisorbibile
- presentare un'elevata porosità (oltre il 90%)

La biocompatibilità è necessaria perché una volta a contatto con un tessuto, la struttura polimerica non deve scatenare una risposta infiammatoria; deve garantire una superficie tale per cui la proliferazione cellulare sia soddisfacente.

La biorisorbibilità serve in quanto terminato lo scopo per cui è stato impiantato dev'essere completamente degradabile senza rilasciare sostanze tossiche nell'organismo. L'alta presenza di pori è fondamentale per la ricostruzione dei tessuti lesionati e la facilitazione dell'angiogenesi

I PU soddisfano tutti questi requisiti sopra elencati e possiedono altre proprietà, come una bassa citotossicità, un'alta permeabilità all'ossigeno e un'alta trombo-resistività. La combinazione di questi attributi li rendono ottimi materiali per la produzione di *scaffold*. I pregi dei materiali poliuretanicici sono il motivo per cui vengono manipolati ed implementati in modo da ottenere *scaffold* biomimetici. La vasta replicabilità dei tessuti tramite i PU è messa in evidenza nella Figura 2.3.

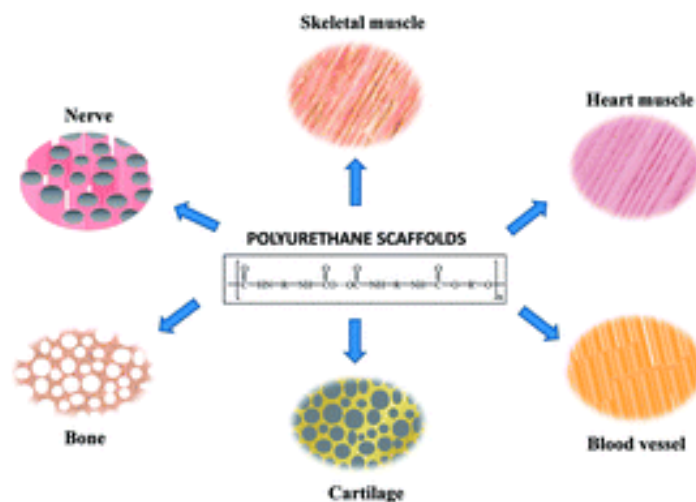


Figura 2.3: tipologia di tessuti replicabili da scaffold in poliuretano.

Lo scopo dello *scaffold* ne determina la forma e il suo sviluppo nello spazio (Figura 2.4).

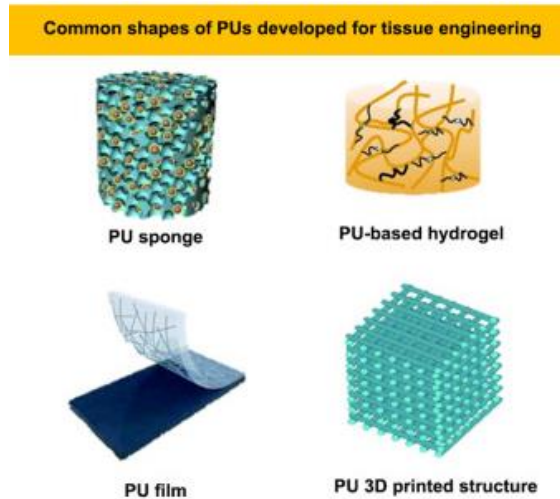


Figura 2.4: forme che può assumere uno *scaffold*.

2.4.1 Scaffold per la riparazione di tessuti cartilaginei

Il processo di guarigione spontanea della cartilagine è uno dei più lenti dell'organismo umano e ciò è dovuto alla scarsa vascolarizzazione del tessuto. Tuttavia, per far fronte a questa problematica è stata sviluppata una struttura tridimensionale a base di poliuretano e collagene. Il collagene è una proteina fibrosa con qualità strutturali che costituisce l'architettura della matrice extracellulare; per questo motivo rappresenta poco meno di un terzo (30%) delle proteine dell'intero organismo, svolgendo funzioni specifiche nella pelle, nei legamenti, nei tendini e nella cartilagine.

Gli *scaffold* di PU e collagene si sono rivelati molto efficienti nella guarigione di lesioni subite dai tessuti cartilaginei. Nonostante l'alta porosità ricreabile, essa è insufficiente per ottenere risultati che comportano una riparazione adeguata negli stadi iniziali. L'utilizzo del collagene permette l'inserimento di microsferi di chitosano, riempite con fattori di crescita, consentendo il raggiungimento di buoni risultati.

Un esempio di utilizzo di poliuretano e collagene è rappresentato nella Figura 2.5, dove sono evidenziati il meccanismo e la struttura di un *graft*. Quest'ultimo permette una maggiore biocompatibilità, una miglior adesione e crescita cellulare [11].

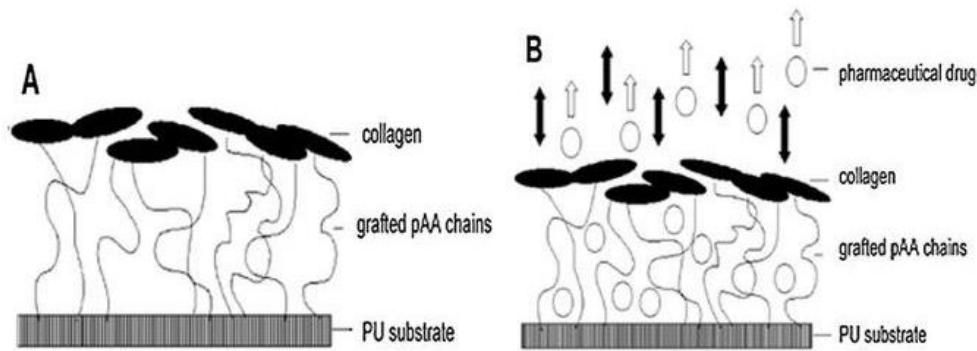


Figura 2.5: Esempio schematizzato di come interagiscono il graft di poliuretano e collagene (A). In (B) è evidenziato lo spazio in cui vengono inseriti i medicinali.

2.4.2 Scaffold per la riparazione di tessuti ossei

Data la grande quantità di pazienti che subiscono lesioni alle ossa, a causa di traumi, tumori ed altre malattie, la ricerca è in costante sviluppo per poter rispondere in maniera efficiente alla richiesta di un valido mezzo per la rigenerazione del tessuto osseo.

Le terapie più utilizzate, fino ad ora, per riparare il tessuto osseo danneggiato sono il trapianto autologo (*autograft*) e gli allotrapianti (*allografts*). Il primo è considerato il più valido, in quanto è ottenibile un'ottima osteoconduttività e nessuna immunogenicità, viene però preso in considerazione soltanto se il paziente non presenta malattie al tessuto osseo. Il secondo metodo invece, non presenta difetti a livello meccanico, ma è maggiore il rischio di contrarre malattie o di avere un rigetto del tessuto donato per immunogenicità.

Per far fronte ai disagi comportati da questi due metodi, si è sviluppata una soluzione che ha alla base la biointegrazione, al posto della biodegradazione. Per biointegrazione, si intende quel processo in cui la superficie della protesi o del biomateriale si allaccia al tessuto vivo indipendentemente dal metodo d'unione. Questo comporta la degradazione dello *scaffold* in tempi molto lunghi, man mano che esso viene rimpiazzato dal tessuto autologo, senza risultare citotossico.

La difficoltà nel ricreare una struttura tridimensionale che possa rimpiazzare il tessuto osseo, è la capacità di replicare le proprietà fisico-meccanico di quest'ultimo.

Gli *scaffold* composti da una schiuma poliuretana sono i più usati per rimpiazzare il tessuto osseo. Questa scelta è dovuta alla capacità di quest'ultimi di ricreare un ambiente con un'elevata porosità, tale da garantire la proliferazione cellulare, incrementare la differenziazione di osteoblasti e stimolare la calcificazione di cellule stromali del midollo osseo [12].

Dopo un trattamento chimico detto biomineralizzazione (Figura 2.6), lo *scaffold* prodotto permette la sostituzione del tessuto lesionato senza comportare evidenti controindicazioni.

La biomineralizzazione è il processo in cui gli organismi viventi producono minerali, spesso per indurire tessuti già formati e ispessiti. Questo meccanismo è necessario per la produzione del tessuto osseo, della dentatura e dell'esoscheletro di alcuni animali.

I principi chiave della biomineralizzazione sono proteine e peptidi specifici che insieme a fosfati e carbonati facilitano o innescano direttamente la produzione di minerali [13] [14].

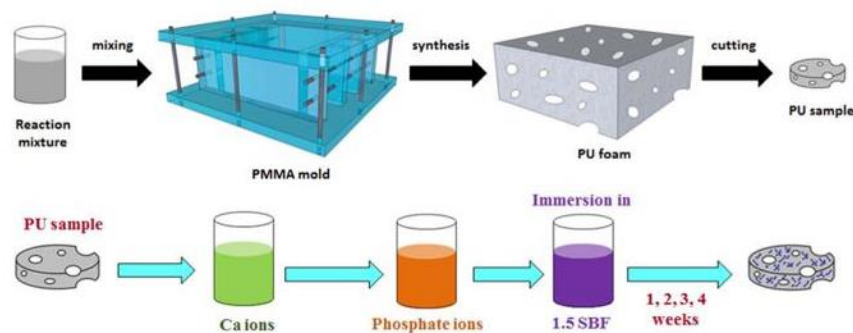


Figura 2.6: Nella parte superiore è evidenziata la formazione della schiuma di PU. Nella parte inferiore è evidenziata la biomineralizzazione.

Capitolo 3

PU nell'ingegneria tissutale

3.1 Sistema cardiovascolare

Per un chiaro approccio all'applicazione di scaffold nel sistema cardiovascolare bisogna comprendere come esso è strutturato. L'apparato cardiovascolare è costituito da un sistema chiuso organizzato in due circuiti in cui scorre il sangue, che è mosso dall'azione propulsoria del cuore.

Le due parti in cui è suddiviso l'apparato circolatorio sono la circolazione polmonare e quella sistemica. La prima, che inizia dal ventricolo destro, porta il sangue ricco di anidride carbonica fino ai polmoni dove si carica di ossigeno e ritorna all'atrio sinistro del cuore. La seconda, invece, parte dal ventricolo sinistro e distribuisce all'organismo il sangue ossigenato; una volta ceduto l'ossigeno, il sangue si carica di anidride carbonica per poi tornare al cuore nell'atrio destro.

Il motore di questo complesso sistema è il cuore, un muscolo ancorato ad uno scheletro fibroso e rivestito da una membrana detta pericardio. Il cuore è suddiviso in quattro camere: atrio e ventricolo destri, atrio e ventricolo sinistri. La parte destra e sinistra costituiscono due pompe volumetriche che si occupano rispettivamente del pompaggio del sangue nel sistema polmonare e sistemico.

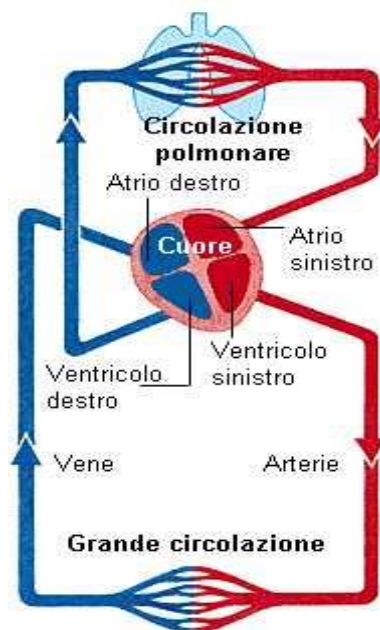


Figura 3.1: rappresentazione schematica delle circolazioni polmonare e sistemica.

3.1.1 Il sangue

Il sangue, un tessuto connettivo, è formato da una componente liquida e una solida. La prima è il plasma, costituisce circa il 55% del sangue ed è composto quasi interamente da acqua. Presenta un colore tendente al giallo, e contiene disciolte molte proteine come l'albumina e le immunoglobuline. La parte restante, detta frazione corpuscolare, è formata da diverse componenti: gli eritrociti (circa il 43%), i leucociti (1%) e le piastrine (meno del 1%).

Tra le funzioni del sangue non c'è solo il compito di trasportare sostanze nutrienti e ossigeno ai tessuti, ma rientrano anche tra i suoi compiti la rimozione dell'anidride carbonica, il trasporto di prodotti di rifiuto, la termoregolazione e la regolazione del pH.

Gli eritrociti derivano da cellule staminali ematopoietiche pluripotenti formate nello stroma del midollo osseo. I globuli rossi, cellule prive di nucleo ma ricche di emoglobina, hanno una forma a disco biconcavo che facilita gli scambi gassosi: questa funzione è svolta dall'emoglobina, proteina che ha pigmentazione rossa ed è in grado di legarsi reversibilmente all'ossigeno e all'anidride carbonica.

L'elemento corpuscolare più piccolo presente nel sangue è determinato dalle piastrine, anch'esse prive di nucleo. Le piastrine (dette anche trombociti), costituite da frammenti di citoplasma avvolti da membrana, derivano dalla frammentazione di grandi cellule (megacariociti). Il ruolo dei trombociti sta alla base del processo di coagulazione del sangue. Essi costituiscono la maggior parte della massa del coagulo e rilasciano la serotonina che stimola la vasocostrizione.

Le piastrine non aderiscono direttamente alla parete dei vasi ma si attaccano o al tessuto connettivo, accidentalmente esposto al sangue, o a superfici estranee al vaso.

3.1.2 La coagulazione

Una lesione ad un vaso sanguigno comporta l'esposizione del sangue al collagene, il quale è presente nel tessuto sub-endoteliale. Questo evento fa sì che si attivino tre tipi di processi concomitanti: la vaso costrizione (per diminuire la fuoriuscita del sangue), il deposito di una rete proteica di fibrina ed un tappo piastrinico. La coagulazione è attivabile per via intrinseca ed estrinseca. Entrambe hanno lo scopo di trasformare il fibrinogeno, disciolto nel sangue, in fibrina, attraverso un enzima chiamato trombina. La fibrina, che è un gel insolubile, insieme alle piastrine, forma un coagulo con lo scopo di arrestare l'emorragia. Successivamente, viene riassorbito tramite un altro enzima denominato plasmina, che deriva dal plasminogeno e determina la fibrinolisi.

3.2 Tissue engineering

Il *tissue engineering* (TE) è un campo della medicina moderna in via di sviluppo basato sull'utilizzo di cellule, materiali biocompatibili (*scaffold*) e fattori biochimici e viene utilizzato per sviluppare sostituti autologhi di tessuti e organi. Il TE è un settore che coinvolge almeno 14 mila persone (dato del 2011) producendo circa 4 miliardi di dollari [15].

Il primo passo verso l'ingegneria tissutale è stato tramite l'introduzione di tecniche per l'applicazione di *graft* cutanei.

La possibilità di poter ricreare il tessuto nativo su ampia scala ha portato molteplici opportunità di applicazione in tutto l'ambito medico. Il processo su cui si basa lo sviluppo del TE spesso integra una serie di aspetti e diversi componenti (Figura 3.2):

- impiego di cellule;
- fabbricazione dello scaffold;
- incubazione dello scaffold con le cellule impiantate;
- integrazione del tessuto ingegnerizzato nel paziente.

Il primo aspetto, l'utilizzo delle cellule, in particolare quelle del paziente risulta essere una parte molto critica del processo del TE a causa della difficoltà nell'ottenere un elevato numero di cellule idonee. Una soluzione alla scarsa disponibilità delle cellule estraibili sono le cellule staminali: queste hanno un elevato rateo di proliferazione e l'abilità di differenziarsi in cellule diverse (pluripotenza).

L'ambiente in cui si sviluppano le cellule è fondamentale affinché il trattamento sia proficuo. Lo *scaffold* deve permettere la riproduzione cellulare e la formazione di un *network* vascolare. Per questo, vengono utilizzati fattori di crescita che promuovono lo sviluppo cellulare e l'angiogenesi. La formazione di nuovi vasi è cruciale per un adeguato apporto di sangue e di nutrienti al tessuto ingegnerizzato.

L'ultima e più importante considerazione da fare sul TE è l'impianto dello *scaffold* sul paziente. L'innesto ingegnerizzato non deve infatti evocare reazioni avverse né di rigetto.

Durante il processo di colonizzazione delle cellule il tessuto inizia la produzione della matrice extracellulare che avvolge le cellule e promuove la formazione del nuovo tessuto garantendone la stabilità. Questa matrice extracellulare può essere fornita dallo *scaffold* stesso, oppure stimolata dalle cellule circostanti [16].

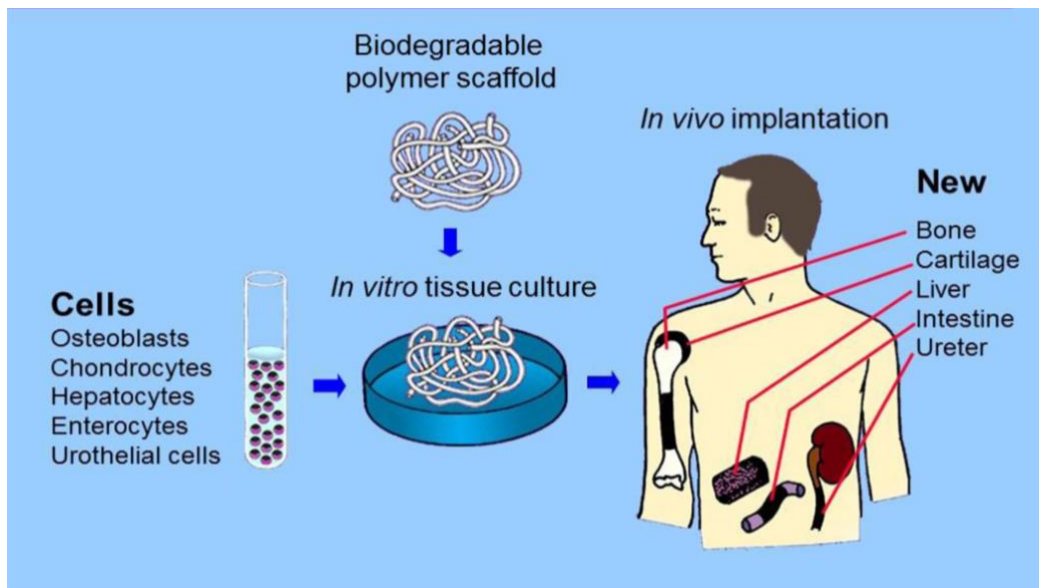


Figura 3.2: rappresentazione schematica di elementi e aspetti del TE.

3.3 Proprietà degli scaffold

Data la complessità del sistema cardiovascolare, la carenza di donatori e l'alta percentuale di infezioni, è necessario che gli *scaffold*, utilizzati per i trattamenti di rigenerazione tissutale, siano in grado di assicurare proprietà chimico-fisiche specifiche, garantendo una ripresa efficiente del tessuto. Oltre a possedere le caratteristiche comuni a tutti gli scaffold, come la biodegradabilità, la biocompatibilità e il biomimetismo, le strutture adibite al sistema cardiovascolare devono essere create in modo da poter replicare la ECM nella geometria, nelle proprietà meccaniche e nell'interazione diretta tra le cellule. Lo *scaffold*, inoltre, dev'essere in grado di degradarsi in modo tale da non rilasciare prodotti tossici durante la sua eliminazione [17].

La porosità dello *scaffold* dev'essere tale da permettere l'adesione e la proliferazione cellulare e, contemporaneamente, la vascolarizzazione per l'apporto di ossigeno e nutrienti. I pori, invece, non possono essere eccessivamente grandi, poiché le cellule endoteliali non sono in grado di occupare uno spazio maggiore al loro diametro. Infatti, la dimensione delle cellule endoteliali e le cellule del miocardio si aggirano rispettivamente tra $8\div 12\ \mu\text{m}$ e $10\div 100\ \mu\text{m}$. La dimensione dei pori, quindi, dovrebbe essere compresa tra le decine e le centinaia di micrometri per ottenere un risultato ottimale.

I parametri meccanici devono essere scelti con cura, in quanto lo *scaffold* sarebbe soggetto a pressioni e tensioni dovute al normale ciclo cardiaco. Infatti, deve resistere alle forze di contrazione ed espansione prodotte dal cuore. È importante considerare che la trazione e lo sforzo a cui sono sottoposti i muscoli cardiaci si aggira rispettivamente attorno ai 3-15 kPa e

22-90%. Per questo motivo, la scelta del materiale più conveniente per gli *scaffold* posti nel sistema cardiaco tende verso il poliuretano in virtù delle sue proprietà elastomeriche. La combinazione dei segmenti duri e morbidi permettono ai PU un comportamento meccanico che risulta ottimale nella sostituzione di vene e arterie. Considerando la possibilità di poter produrre fibre poliuretatiche, si evidenziano altri vantaggi come, ad esempio, una resistenza alla trazione circonferenziale comparabile a quella dei vasi sanguigni. (Lo *scaffold* deve presentare una geometria anisotropa per poter interagire meglio con il tessuto nativo).

Per poter implementare l'integrazione dello *scaffold* non basta migliorarne la composizione chimica, ma serve valutarne anche l'aspetto topografico della superficie e la sua architettura. In letteratura è stato riportato, da Fathi-Karkan et al [18], un esempio di come la modifica della forma spaziale della protesi abbia diminuito l'attivazione delle piastrine. Inoltre, una texture nell'ordine inferiore ai micrometri permette di diminuire l'adesione delle cellule batteriche indipendentemente dallo stato tensionale.

3.4 Elettrofilatura

Una tecnica particolarmente conveniente per la produzione di *scaffold* per tessuti estremamente come i vasi sanguigni, è l'elettrofilatura, meglio conosciuta come *electrospinning*. Scoperta alla fine dell'800 ma descritta matematicamente circa nel 1960 da Geoffrey Taylor, è una tecnica che rende possibile la produzione di fibre polimeriche con diametri variabili, da millimetri a nanometri, lasciando inalterate le proprietà meccaniche del polimero alla base.

L'ampio utilizzo di questa tecnica è dovuto alla possibilità di fruirne anche su scala industriale mantenendo i costi di produzione ridotti rispetto alle altre metodologie per la produzione di materiali polimerici.

L'elettrofilatura si basa sull'applicazione di un intenso campo elettrico ad una soluzione polimerica tra un ugello e un collettore, entrambi di metallo, applicando una tensione tra i 10 e i 20 kV [19].

La differenza di potenziale viene aumentata in modo tale che le forze elettrostatiche agenti su una goccia del polimero uscente dall'ugello siano maggiori della tensione superficiale del fluido, facendo sì che un sottilissimo getto di fluido arrivi rapidamente al collettore.

Mentre il fluido filiforme viaggia verso il collettore, il solvente evapora lasciando depositare sulla piastra una fibra solida. Si possono ottenere due tipi di arrangiamenti di fibre (Figura 3.3) che dipendono dalla forma e dal movimento del collettore. Queste possono essere

allineate se si utilizza un collettore cilindrico rotante, oppure utilizzando una piastra statica ottenendo un effetto randomico.

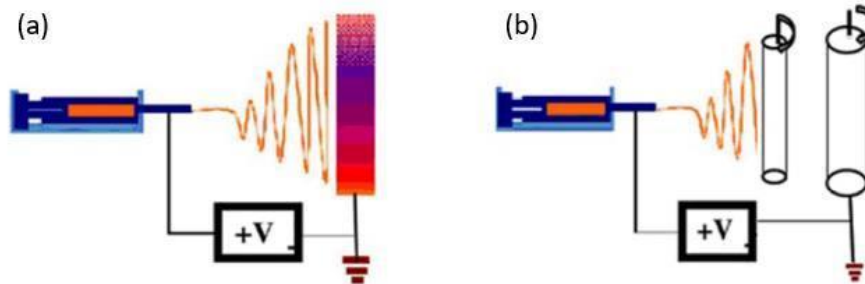


Figura 3.3: schematizzazione dell'elettrofilatura su collettore: (a) statico, (b) rotante.

Le proprietà fisiche e meccaniche delle fibre che si vogliono ottenere dipendono da tre fattori: le proprietà della soluzione, le condizioni ambientali, e i parametri di processo. Ad esempio, la soluzione ha una sua viscosità, concentrazione, conduttività, peso molecolare, tensione superficiale, momento dipolare e costante dielettrica; queste sono tutte variabili che dipendono dal tipo di polimero selezionato. Per condizioni ambientali si intendono l'umidità, la temperatura. Infine, i parametri di processo includono la portata del fluido, il campo elettrico, la distanza tra collettore e ugello, e le rispettive forme.

3.4.1 Fibre nell'ambito biomedico

Le nanofibre polimeriche possono essere utilizzate come sistemi per il rilascio controllato di farmaci. L'inclusione avviene miscelando direttamente le molecole bioattive nella soluzione polimerica prima di iniziare l'elettrofilatura.

Le strutture che si formano presentano elevata porosità, con le dimensioni dei pori variabili e una interconnessione tra di essi riconducibili a quelle delle membrane basali. Inoltre, presentano un elevato rapporto tra superficie e volume. La possibilità di controllare la quantità e le dimensioni dei pori rende molto versatile questa tecnica. Se le dimensioni delle celle sono inferiori ai 50 μm , risultano più difficoltosi i trasferimenti cellulari all'interno della struttura.

Per evitare che la struttura sia troppo compatta e di conseguenza inefficiente, sono stati implementati diversi metodi di produzione, tra cui l'alternanza di strati composti da microfibre e da nanofibre. Il più efficace è l'inserimento di particelle sacrificali idrosolubili (il più comunemente utilizzato è l'ossido di polietilene) [20], che possono essere tolte tramite un lavaggio con acqua, lasciando nello *scaffold* le cavità necessarie per la cellularizzazione.

Uno studio [21] sulla produzione di fibre vascolari in PU condotto da He et al ha dimostrato come la scelta di questo polimero sia ottimale per la creazione di *scaffold* per il sistema vascolare in quanto sono state ottenute matrici con una porosità di circa il 60% in grado di permettere una buona infiltrazione cellulare senza compromettere le proprietà meccaniche. Tra queste figurano un carico di punta di 16.5 N, una resistenza alla trazione di 5.85 Mpa e un allungamento a rottura del 295.4%.

Un aumento delle porosità potrebbe favorire l'infiltrazione cellulare ma potrebbe causare una drastica riduzione delle proprietà meccaniche.

3.4.2 Sistemi multistrato

Come detto in precedenza, una scelta promettente per la produzione di matrici tramite *electrospinning* è la composizione di *scaffold* o *graft* attraverso più strati sovrapposti di fibre di PU che sono assimilabili alla composizione stratificata di alcuni tessuti biologici.

La composizione multistrato del *graft* permette l'inserimento di molecole bioattive e cellule tra uno strato e l'altro. Inoltre, si può considerare un enorme vantaggio la facilità di modificare la soluzione polimerica durante l'elettrofilatura per poter formare strati del medesimo polimero ma con proprietà diverse [22].

In letteratura è presente una ricerca di Han et al [23] in cui è stato prodotto un *graft* formato da tre strati, progettato per il rilascio nel tempo e nello spazio di fattori di crescita per una rapida endotelializzazione.

3.5 Scaffold cardiaci creati con fibre di PU

Per far fronte all'aumento di malattie e difetti cardiaci (circa 8000 bambini all'anno ne sono affetti solo negli Stati Uniti), l'ingegneria tissutale è in grado di fornire approcci innovativi in costante sviluppo. Considerando che la causa principale di decessi nel mondo è data da infarto del miocardio, si ricercano soluzioni sempre meno invasive e più efficaci. Data la limitata capacità di autorigenerazione del muscolo cardiaco, la ricerca si basa su *scaffold* bioattivi che incentivano la rigenerazione tramite substrati ricoperti di fattori di crescita e cellule staminali autologhe. Un efficiente metodo è stato studiato da Beck et al tramite cerotti a base poliuretanic [24].

I cerotti, detti anche *patch*, vengono comunemente applicati sul setto atriale oppure quello ventricolare, entrambe zone composte da cellule cardiache contrattili. Quelli già in commercio risultano ideali per impianti di breve durata (spesso composti o rivestiti da Dacron) in quanto

dopo lunghi periodi tende a formarsi tessuto cicatriziale attorno al materiale, per via della dell'organismo. Il tessuto cicatriziale risulta poco contrattile e la sua conduttività viene limitata, aumentando nel tempo il rischio di arresto cardiaco.

Onde evitare la formazione di tessuti inadeguati, la soluzione è un cerotto che sia in grado di incentivare la formazione del tessuto nativo. Di conseguenza deve permettere l'infiltrazione cellulare, il rimodellamento e l'integrazione con il cuore. La scelta ideale ricade sugli *scaffold* composti da fibre di PU, indirizzando la ricerca verso l'ingegneria tessutale di *graft* vascolari. I *patch* cardiaci devono avere uno spessore almeno di qualche millimetro per poter svolgere in maniera ottimale la loro funzione. Poiché nutrienti e ossigeno devono diffondere attraverso il cerotto cardiaco, lo spessore deve essere inferiore a 400-500 micron. Pertanto, la ricerca si sta concentrando sul rendere maggiormente permeabile i *patch* attraverso l'inserimento nello *scaffold* di un network vascolare composto da una co-coltura di cellule endoteliali e fibroblasti con i cardiomiociti. Un'altra soluzione per aumentare la permeabilità all'ossigeno è l'organizzazione di tubi cavi e microporosi all'interno della struttura multistrato (Figura 3.4).

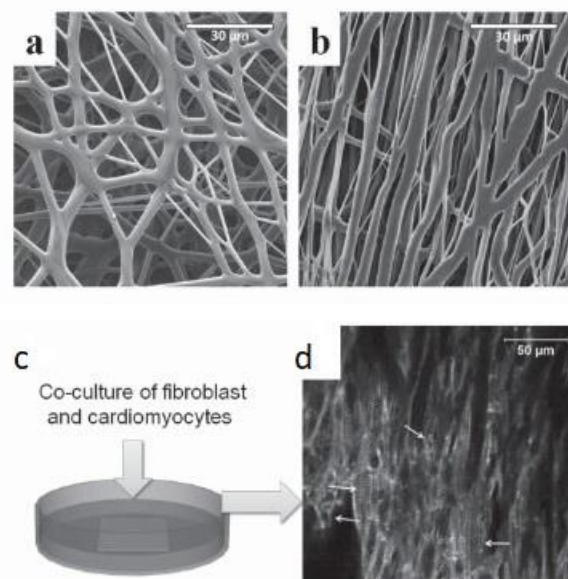


Figura 3.4: formazione del tessuto cardiaco su *scaffold* di PU elettrofilato. Sono riportate le immagini ricavate dal SEM (microscopio elettronico a scansione) di fibre con orientazione randomica in (a) e allineate in (b). In (c) è presente una co-coltura di fibroblasti e cardiomiociti. In (d) si vede come l'immagine immunofluorescente risalta la co-coltura e come essa promuove il cambiamento morfologico delle cellule ad una forma allungata e la formazione di sarcomeri.

Come affermato in precedenza, affinché gli *scaffold* siano funzionali nel sistema cardiaco devono permettere la sopravvivenza cellulare e promuovere la differenziazione nei diversi fenotipi specifici. In tal caso si può funzionalizzare il polimero con molecole come la fibronectina, che incentiva l'adesione cellulare. L'inserimento di altri materiali nello *scaffold*,

ad esempio nanotubi in carbonio [25], lo rendono maggiormente conduttivo, promuovendo anche la differenziazione delle cellule staminali mesenchimali senza la necessità di stimoli elettrici. Con queste premesse, le strutture tridimensionali create permettono la sopravvivenza cellulare e la differenziazione in cardiomiociti inducendo una possibile rigenerazione del tessuto cardiaco organizzato in modo tale da poter garantire la trasmissione di segnali elettrici e contrazioni sincronizzate. La morfologia e l'orientazione del tessuto cardiaco è altrettanto imitabile con l'*electrospinning*.

3.6 Degradazione nell'organismo

Inseguito all'inserimento di una protesi poliuretanica durante un intervento chirurgico si attivano molteplici processi. Inizialmente avviene l'interazione delle cellule e delle proteine con il biomateriale. In questa fase entra in funzione il sistema immunitario che reagisce all'impianto, secondo ciò che viene indicato come reazione da corpo estraneo. Questo scatena a cascata una serie di reazioni, quali: il processo di guarigione della lesione e l'infiammazione.

La degradazione dello *scaffold* deve essere controllata, affinché svolga appieno il suo ruolo. In vivo la biodegradazione dev'essere coordinata in maniera che perda almeno il 30%¹ della sua massa nei primi sei mesi dall'innesto. Si suppone che questa cinetica di degradazione permetta la proliferazione delle cellule vascolari e del network della ECM, in modo che siano in grado di avere un supporto meccanico adeguato.

La degradazione dello scaffold può avvenire per:

- idrolisi
- degradazione enzimatica
- degradazione ossidativa
- degradazione meccanica

3.6.1 Degradazione per idrolisi

I processi di degradazione possono avvenire in modo spontaneo, perciò è necessario che non si attivino in momenti indesiderati. Per prevenire l'idrolisi si può aumentare la presenza di gruppi di metilici nelle catene polimeriche. L'effetto opposto si può ottenere tramite un

¹ La percentuale di massa rimanente (Mr) viene calcolata tramite la formula: $Mr \% = (Mf / Mi) * 100$, dove Mf e Mi sono rispettivamente massa finale e massa iniziale dello *scaffold*.

rivestimento di componenti della ECM, come l'acido ialuronico, che conferiscono allo *scaffold* maggior idrofilicità [26].

3.6.2 Degradazione enzimatica

L'azione enzimatica è estremamente importante da considerare quando si utilizzano materiali in PU nell'ambito biomedicale. La risposta infiammatoria agli impianti costituiti da PU produce esterasi. Infatti, l'enzima maggiormente attivo nella degradazione di questo polimero è il colesterolo esterasi [27].

3.6.3 Degradazione ossidativa e meccanica

La presenza di crepe indica un fallimento della protesi e ne determinano l'estrazione. Queste si presentano tendenzialmente a causa dei processi ossidativi nell'organismo e le elevate forze di taglio dovute all'energia meccanica accumulata durante l'utilizzo.

L'ossidazione è dovuta al rilascio di perossido di idrogeno delle cellule infiammatorie. La biodegradazione tramite ossidazione può essere accelerata tramite il processo $H_2O_2/CoCl_2$ e il radicale ($\bullet OH$)

3.7 Problematiche relative alle protesi cardiovascolari

Le cellule endoteliali vascolari hanno un ruolo fondamentale nel controllo delle funzioni vascolari; infatti, hanno la capacità di sintetizzare molecole che possono prevenire la coagulazione. Inoltre, possono permettere il rilascio di attivatori del plasminogeno che, in presenza di fibrina, promuovono la fibrinolisi.

In seguito ad un innesto di un vaso sanguigno sintetico, si presenta una situazione in cui è ritrovabile un'elevata resistenza distale, un basso afflusso di sangue polmonare e altri fattori che possono portare ad una stenosi del lume o ad un piccolo intasamento del *graft* stesso. Per questa ragione, è di fondamentale importanza che dopo l'inserimento della protesi si formi uno strato di cellule endoteliali che possano sopportare la normale portata del sangue e mantenere una pervietà a lungo termine del vaso sintetico - nonostante lo strato di tessuto composto dalle cellule endoteliali vascolari tendenzialmente si forma a circa un paio di centimetri dall'anastomosi [28].

Una delle cause principali del fallimento di un *graft* vascolare è la trombogenicità di quest'ultimo. Per questo, la scelta del materiale è estremamente importante e, nonostante i PU abbiano una trombogenicità molto bassa, è necessario in alcuni casi includere molecole anticoagulanti direttamente nel polimero oppure un rivestimento ad *hoc* di anticoagulanti sulla

superficie più interna della protesi. Il farmaco che meglio si adatta a questo ruolo è l'eparina, un glicosaminoglicano altamente solfatato che inibisce l'azione della trombina e del fattore coagulante Xa².

² Il fattore Xa, fondamentale nel processo di coagulazione, converte la prototrombina in trombina. Basta una molecola di Xa per crearne mille di trombina.

Capitolo 4

Casi di studio

4.1 Esperimenti in vitro

4.1.1 Estrusione in vitro

Un interessante caso di studio, dove viene evidenziata la versatilità in ambito biomedicale dell'utilizzo di PU come sostituti delle leghe metalliche, è stato pubblicato da Ajili et al. [29]. Questa ricerca si fonda sullo studio di *stent* SMPU (descritti precedentemente al paragrafo 2.3.1) nel sistema cardiovascolare. La criticità dell'esperimento è di far espandere l'impianto, oppure riportarlo alla sua forma originale, tramite la variazione della temperatura. L'obiettivo dello studio è riuscire a deformare il materiale nel range della temperatura corporea lasciando inalterata la sua biocompatibilità. È stata utilizzata una miscela di poliuretano e policaprolattone³.

Questi due materiali conferiscono allo *stent* il cosiddetto effetto di memoria di forma (*shape memory effect*). La temperatura di fusione dei cristalli di PCL è 60 °C, quando si raggiunge quest'ultima si ottiene una diminuzione dei cristalli di PCL e un aumento del contenuto di PU. Questo fa sì che il materiale torni alla sua forma iniziale, in quanto lo sforzo elastico è considerato la forza motrice dell'effetto *shape memory*, esso infatti è generato durante la deformazione della matrice poliuretanic, facendo in modo che si formino i cristalli di PCL.

La valutazione dell'effetto *shape memory* (Figura 4.1), e di conseguenza, anche la prova di resistenza a trazione e a compressione, è stata effettuata creando lo *stent* tramite estrusione a forma di spirale (Figura 4.2).

³ Il policaprolattone (PCL) è un polimero semicristallino sintetico biodegradabile.

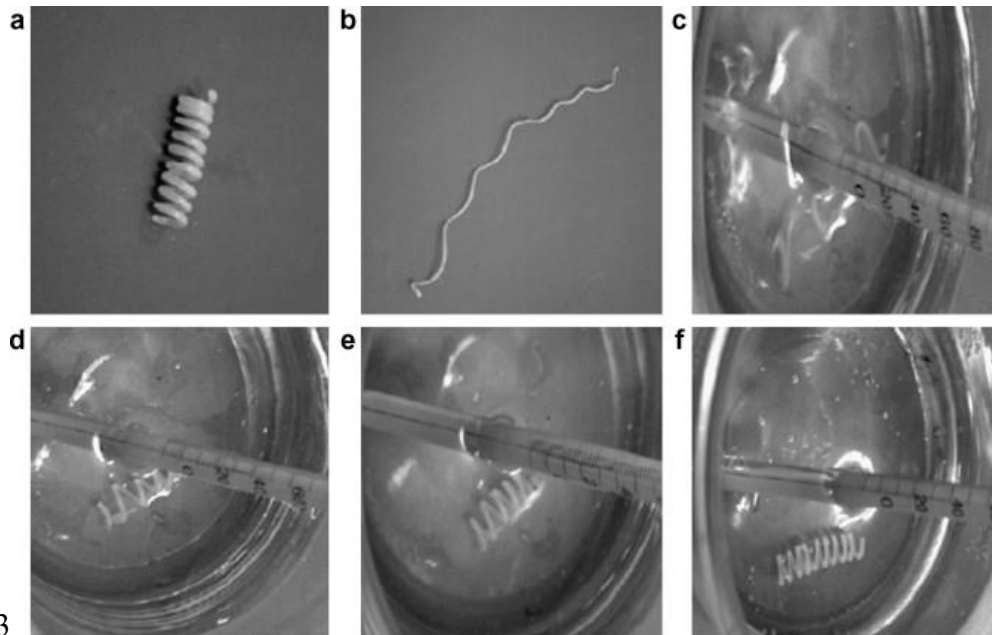


Figura 4.1: ciclo del *shape memory effect*: (a) forma originale dello *stent*; (b) forma assunta a temperatura ambiente; da (c) a (f) recupero della forma iniziale in soluzione a 37 °C in circa 10 secondi.

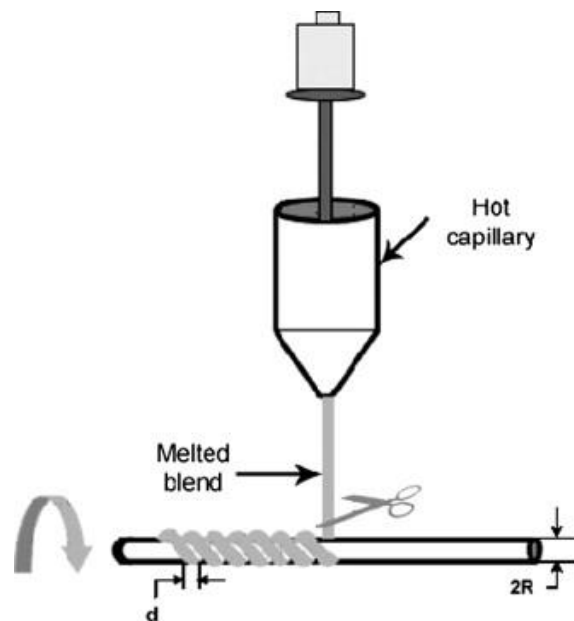


Figura 4.2: creazione dello *stent* tramite estrusione della miscela polimerica. Il diametro dello *stent* (d) corrisponde a 0.8 mm, e con un raggio (R) della vite di 3 mm.

Per stimare la biocompatibilità della miscela polimerica sono stati utilizzati dei fibroblasti, e ne è stata valutata la crescita e la proliferazione in un periodo di sette giorni. La composizione della miscela è pari ad un rapporto 70/30 PU/PCL per ottenere un efficiente sviluppo delle cellule seminate, in quanto con questa composizione si è verificato un aumento della densità cellulare.

Lo *stent* è poi stato compresso ed inserito all'interno di una vena femorale umana a temperatura ambiente. Successivamente, la vena è stata inserita in un recipiente a 37 °C e si è potuto notare l'aumento di dimensione del vaso dovuto al recupero della dimensione iniziale dello *stent*.

Per riprodurre il tessuto vascolare è necessario scegliere adeguatamente il tipo di cellule. Per tale ragione sono state utilizzate cellule staminali mesenchimali del midollo osseo. La superficie prodotta dalla miscela di PU e PCL è risultata compatibile con le cellule staminali, favorendone sia la proliferazione, sia l'adesione.

In conclusione, la miscela polimerica PU/PCL risulta favorire lo sviluppo cellulare e presenta un ottimo grado di biocompatibilità.

Un'ulteriore ricerca che ha permesso di valutare la funzionalità degli *scaffold* in PU, è stata realizzata da Boffito et al [30]. Lo studio ha per obiettivo lo sviluppo di uno *scaffold* in grado di permettere la crescita di cellule cardiache primitive. È stata fabbricata una struttura tridimensionale tramite estrusione della miscela poliuretanicca in modo da formare due strati con una struttura a griglia omogenea.

Le cellule cardiache primitive sono state prelevate dal tessuto cardiaco proveniente dagli atri di cuori patologici di 22 pazienti che presentavano insufficienza cardiaca terminale, dovuta alla cardiomiopatia ischemica. È stata valutata la crescita delle cellule su un periodo di 7, 14 e 21 giorni. Nelle prime 24 ore dalla semina delle cellule, esse aderiscono alla superficie della struttura tridimensionale. Nella prima settimana non ci sono stati sviluppi particolari, ma dopo 14 giorni tutti i pori e filamenti dello *scaffold* risultavano completamente ricoperti dalle cellule. Successivamente ai 14 giorni le cellule dimostravano una ridotta capacità di continuare il processo di proliferazione [31].

È possibile risolvere questo limite rendendo biomimetica la superficie del materiale, ad esempio tramite un trattamento al plasma che permetta di incentivare la crescita cellulare.

Dopo i 21 giorni dalla semina e con il trattamento al plasma, si è presentato un aumento della densità cellulare; inoltre, si è apprezzata una diminuzione dell'apoptosi delle cellule cardiache primitive.

4.1.2 Elettrofilatura *in vitro*

Come detto in precedenza, l'*electrospinning* è una tecnica che offre molti vantaggi nella creazione di *scaffold* in ambito cardiovascolare. Uno studio di Tondnevis et al [32] ha unito le qualità delle nanofibre poliuretanicche (che sono in grado di replicare la morfologia della

matrice extracellulare e hanno una natura anisotropa) alla conduttività elettrica e termica di nanotubi in carbonio, formati da un solo strato di grafene [33].

I nanotubi in carbonio offrono qualità eccezionali per la combinazione con i PU, in quanto hanno ottime qualità meccaniche e la capacità di legarsi alle biomolecole. La loro conduttività elettrica fa sì che vengano sfruttati nell'ingegnerizzazione di tessuti cardiovascolari in quanto influenzano e incentivano in modo drastico lo sviluppo di cardiomiociti e mioblasti [34]. Inoltre, per favorire l'adesione cellulare e la degradazione del dispositivo, è stata integrata una componente biologica, ovvero la gelatina.

Nello studio di Tondnevis sono stati impostati i parametri rappresentati nella Tabella 4.1 per l'elettrofilatura della matrice poliuretanic.

Voltaggio (kV)	Distanza tra collettore e ugello (cm)	Soluzione somministrata all'ora (mL/ora)	Rotazione del collettore (giri/min)	Umidità (%)	Temperatura (°C)
18	12	0.3	1800	10	25

Tabella 4.1: parametri considerati per l'elettrofilatura durata 4 ore.

Sono state scelte cinque tipologie di miscele per creare gli *scaffold*: la prima corrisponde alle sole fibre di PU, la seconda è composta da PU e gelatina, la terza da PU e nanotubi in carbonio, la quarta e la quinta sono composte da tutti e tre gli elementi, rispettivamente con un rapporto di 80/20 e 70/30 di PU/gelatina.

Su ciascuno degli *scaffold* sono stati seminati mioblasti miocardici e cellule endoteliali e ne è stata valutata la proliferazione ad intervalli di 12 ore, 1 giorno, 3 giorni e infine 7 giorni.

L'andamento dello sviluppo dei due tipi di cellule è risultato quasi identico nel tempo per ciascun tipo di *scaffold*. Al primo e secondo punto temporale non sono state notate grandi differenze nella crescita cellulare. Dopo i 3 giorni c'è stato uno sviluppo drastico: rispetto agli altri scaffold, su quelli di PU-gelatina-nanotubi si è vista una crescita che è passata dal 120% al 400%. Infine, nell'ultimo punto temporale (7 giorni), lo *scaffold* composto dai tre elementi con un rapporto di PU/gelatina pari a 70/30 era completamente ricoperto da uno strato di cellule endoteliali, visibile in Figura 4.3. Questo risultato è considerato come un traguardo di estrema importanza per l'ingegneria tissutale [35] [25].

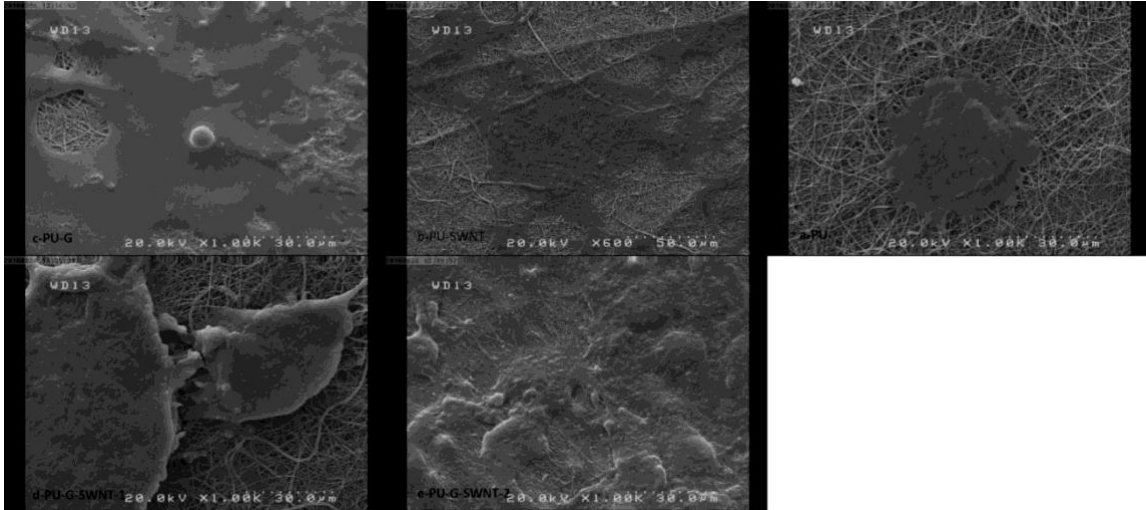


Figura 4.3: formazione del tessuto endoteliale al settimo giorno su ciascun *scaffold*. Rispettivamente da sinistra verso destra e dall'alto al basso: PU, PU-nanotubi, PU-gelatina, PU-gelatina-nanotubi-1, PU-gelatina-nanotubi-2 [36].

4.2 Esperimenti in vivo

4.2.1 Elettrofilatura in vivo

Per verificare la biocompatibilità e stabilità di alcuni *graft* vascolari, preparati tramite *electrospinning*, Hu et al [37] hanno condotto una ricerca in cui hanno impiantato dei *graft* composti da nanofibre poliuretaniche (Figura 4.4) nell'aorta addominale di 48 cani. I cani sono stati monitorati ogni 4 settimane, fino ad un periodo massimo di 24.

Ad ogni monitoraggio è stato fatto un controllo sulla pervietà dell'impianto tramite eco-color-doppler e palpazione manuale.

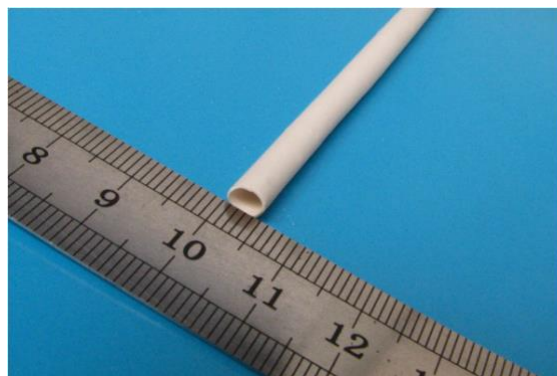


Figura 4.4: Graft vascolare poliuretanicco con diametro di 4 mm.

Dopo 24 settimane si è svolto un esame istologico per valutare la funzionalità del *graft*. Il dispositivo impiantato di PU è risultato biocompatibile, nonostante la superficie esterna

presentasse un sottile rivestimento di tessuto fibroso. All'interno di quest'ultimi si è constatata la formazione della tonaca intima⁴ già al secondo step di controllo (8° settimana post operazione). Alla 24° settimana la crescita dell'endotelio è apparsa completa, con la presenza della tonaca intima e della tonaca media; inoltre c'è stata un'assenza di iperplasia neointimale. L'endotelizzazione del *graft* di PU ha avuto ottimi risultati come si evince dalla Figura 4.5. Il comportamento estremamente simile ad un vaso sanguigno si suppone sia dato dalla struttura nanofibrosa che pare in grado di simulare la matrice extracellulare, facilitando la proliferazione delle cellule endoteliali.

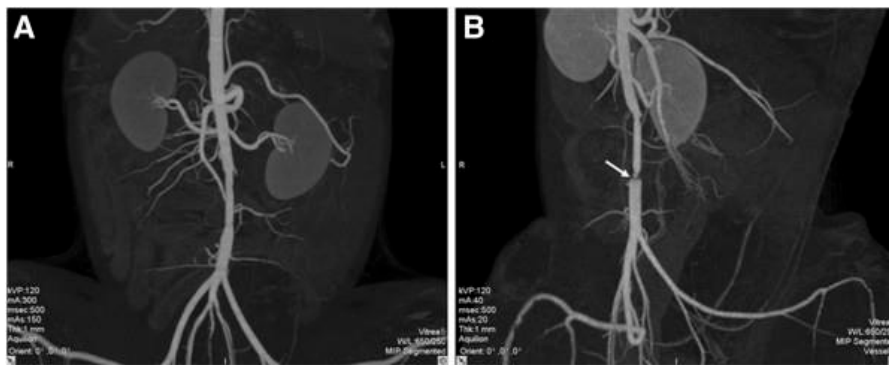


Figura 4.5: In A *graft* poliuretano dopo 24 settimane dall'innesto. Si apprezzano assenza di stenosi e ottima pervietà.
In B *graft* non poliuretano che nonostante presenti pervietà mostra una chiara stenosi indicata con la freccia.

Un esperimento in vivo svolto da Bergmeister et al [38], ha previsto l'inserimento di un *graft*, prodotto tramite elettrofilatura, sull'aorta infrarenale di 40 ratti maschi. I risultati dell'esperimento risultano promettenti dal momento che in tutti i punti temporali il *graft* è rimasto stabile e ha presentato pervietà nel 95% dei casi. Dopo la prima settimana dall'innesto, sulla superficie luminale sono state notate delle cellule staminali. A un mese dall'operazione la superficie era ricoperta da cellule endoteliali. Al terzo mese si sono osservate tracce di fibroblasti e miociti sulle pareti del *graft*. Al sesto mese si è manifestata una riduzione cellulare e un aumento delle celle vuote: si suppone che questo sia dovuto alla morte cellulare e dalla scarsa capacità di penetrazione delle sostanze nutritive nella parte più interna del *graft*. Una soluzione ipotizzabile è l'aumento della porosità, rendendo più efficace lo scambio con i prodotti di scarto. La diminuzione spaziale delle celle dipende principalmente da due fattori: la concentrazione di PU e la velocità di rotazione del collettore cilindrico nell'elettrofilatura; questo perché una concentrazione maggiore implica un aumento del diametro delle fibre, la cui conseguenza è un aumento volumetrico che permette alle fibre

⁴ strato più interno di un vaso sanguigno.

di occupare più spazio riducendo nel complesso le porosità dello *scaffold*. La velocità di rotazione del cilindro stabilisce l'orientazione delle fibre. Entro un certo range di velocità, quest'ultime risulteranno disposte linearmente (presentando migliori proprietà meccaniche) aumentando la densità. Riducendo gli spazi tra di esse, si riducono però le dimensioni dei pori. Al di fuori dal range di velocità di linearizzazione delle fibre, si otterranno più spazi vuoti. La diretta conseguenza è l'aumento delle celle libere, che permetteranno un'infiltrazione cellulare maggiore ma una lieve riduzione delle proprietà meccaniche. Per poter ottenere uno *scaffold* che sia in grado di resistere nell'organismo a lungo termine sarà necessario trovare un punto di equilibrio tra la concentrazione della soluzione poliuretanica e la rotazione del collettore cilindrico (attorno 1000 giri/minuto, come si vede in Figura 4.6).

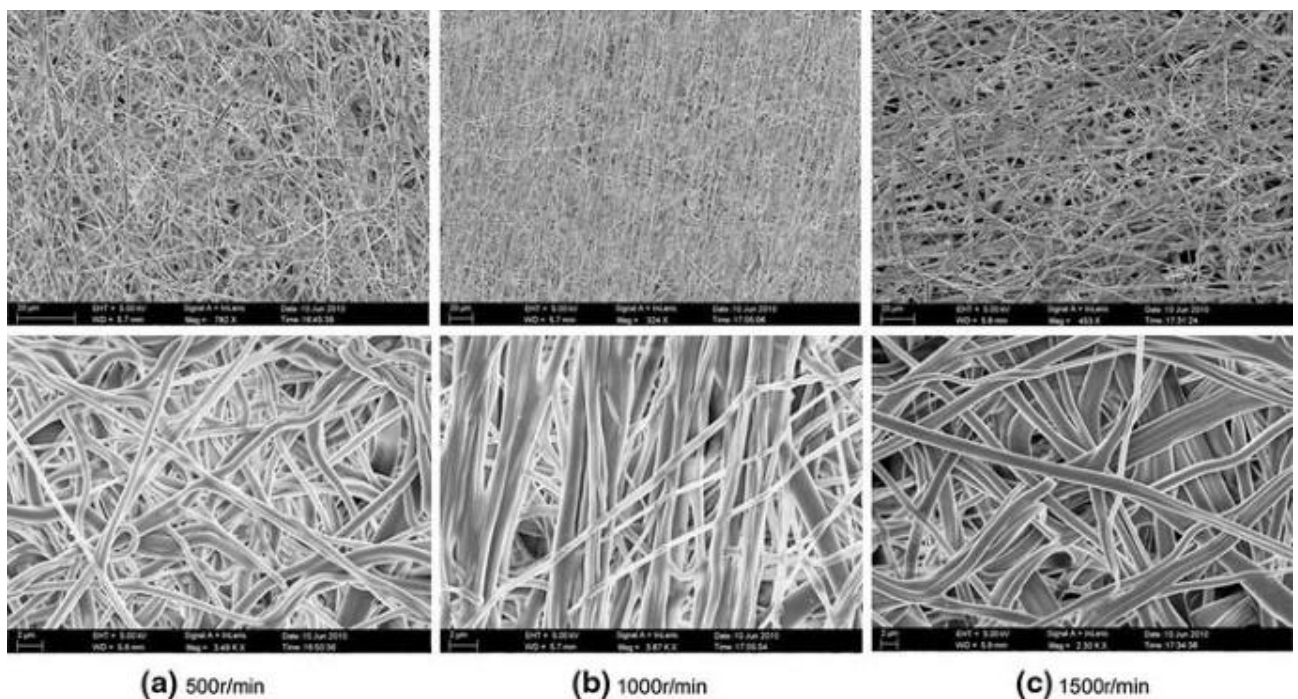


Figura 4.6: Differenza nella struttura di uno *scaffold* prodotto tramite *electrospinning* a velocità di rotazione differenti del collettore. (a) 500 giri al minuto (b) 1000 giri al minuto (c) 1500 giri al minuto.

Conclusioni

Tra le principali cause di morte, quelle con maggiore incidenza soprattutto nei paesi occidentali sono dovute alle cardiopatie. Per questo motivo il presente elaborato ha voluto fare chiarezza sull'utilizzo dei poliuretani nell'ingegneria tissutale in ambito cardiovascolare, evidenziando i vantaggi della creazione di *scaffold* dedicati.

I poliuretani sono in generale polimeri molto versatili, con ottime proprietà meccaniche, termiche e chimiche; infatti, negli ultimi decenni sono stati ampiamente sfruttati in molti ambiti per la creazione di materiali performanti.

Gli *scaffold* composti da miscele poliuretaniche risultano estremamente compatibili con il tessuto sanguigno.

L'enorme vantaggio che viene fornito da parte di questa famiglia di polimeri è la loro versatilità, che li rende utili alla fabbricazione di molti dispositivi, da quelli per il rilascio controllato di farmaci agli scaffold per ingegneria tissutale. Tutte queste applicazioni sono ampiamente documentate in letteratura

Anche il metodo di produzione dei PU sta subendo miglioramenti, in quanto è possibile formare *scaffold* sempre più simili al tessuto nativo. Un esempio è l'*electrospinning* che ha reso possibile la creazione di strutture in grado di comportarsi analogamente ai vasi sanguigni. Gli *scaffold* sono caratterizzati da un'elevata porosità che incentiva lo scambio dei nutrienti tra le cellule, in modo da favorirne la vitalità.

Dagli studi *in vitro* è emerso come gli *scaffold* a base poliuretaniche offrano un ottimo ambiente per la proliferazione delle cellule, portando alla formazione del nuovo tessuto. Inoltre, se le superfici del materiale vengono funzionalizzate con fattori di crescita, ne risultano favorite alcune funzioni cellulari.

Negli studi *in vivo* si è visto che nel breve termine gli innesti poliuretaniche garantiscono una adeguata pervietà, ma sul lungo termine c'è il rischio che si formino trombi e/o tessuto fibroso. Ulteriori valutazioni su modelli animali di taglia medio grande potranno permettere di valutare l'effettiva funzionalità di questi innesti e quindi la loro applicabilità all'uomo. In tutti i casi, date le premesse, si può affermare che l'utilizzo dei PU per la produzione di dispositivi in ambito cardiovascolare possa verosimilmente risultare efficace, a beneficio della salute delle persone malate.

Bibliografia

1. Brereton, G., Emanuel, R.M., Jr, Lomax, R., Pennington, K., Ryan, T., Tebbe, H., Timm, M., Ware, P., Winkler, K., Yuan, T., Zhu, Z., Adam, N., Avar, G., Blankenheim, H., Friederichs, W., Giersig, M., Weigand, E., Halfmann, M., Wittbecker, F.-W., Larimer, D.-R., Maier, U., Meyer-Ahrens, S., Noble, K.-L. and Wussow, H.-G. (2023). Polyurethanes. In Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry.
2. M. de Souza, F., Kahol, P. K., Gupta, R. K. (2021). Polyurethane Chemistry: Renewable Polyols and Isocyanates. Washington, American Chemical Society, 1-24.
3. Rusu, L. C., Ardelean, L. C., Jitariu, A. A., Miu, C. A., & Streian, C. G. (2020). An Insight into the Structural Diversity and Clinical Applicability of Polyurethanes in Biomedicine. *Polymers*, 12(5), 1197.
4. Yang, W.; Han, Y.; Zhang, W.; Zhang, D. (2021). High-Strength and Low-Cost Biobased Polyurethane Foam Composites Enhanced by Poplar Wood Powder Liquefaction. *Polymers*, 13, 2999.
5. Oliver, K., Hatice, M., Michael A. R. M., *Green Chem.*, 2013,15, 1431-1455.
6. Kerosenewala, J., Vaidya, P., Ozarkar, V., Shirapure, Y., More, A.P., (2022). Eugenol: extraction, properties and its applications on incorporation with polymers and resins -- a review. *Polymer Bulletin*.
7. Aburel, O. M., Pavel, I. Z., Dănilă, M. D., Lelcu, T., Roi, A., Lighezan, R., Muntean, D. M., & Rusu, L. C. (2021). Pleiotropic Effects of Eugenol: The Good, the Bad, and the Unknown. *Oxidative medicine and cellular longevity*. Volume 2021, Article ID 3165159, Hindawi.
8. Shitole, A. A., Giram, P. S., Raut, P. W., Rade, P. P., Khandwekar, A. P., Sharma, N., & Garnaik, B. (2019). Clopidogrel eluting electrospun polyurethane/polyethylene glycol thromboresistant, hemocompatible nanofibrous scaffolds. *Journal of biomaterials applications*, 33(10), 1327–1347.
9. Tai, N. L., Ghasemlou, M., Adhikari, R., & Adhikari, B. (2021). Starch-based isocyanate- and non-isocyanate polyurethane hybrids: A review on synthesis, performance and biodegradation. *Carbohydrate polymers*, 265:118029.
10. Wendels, S., & Avérous, L. (2020). Biobased polyurethanes for biomedical applications. *Bioactive materials*, 6(4), 1083–1106.

11. Zuber, M., Zia, F., Zia, K. M., Tabasum, S., Salman, M., & Sultan, N. (2015). Collagen based polyurethanes—A review of recent advances and perspective. *International journal of biological macromolecules*, 80, 366–374.
12. Ghasroldasht, M. M., Mastrogiacomo, M., Akbarian, F., & Rezaeian, A. (2022). Polyurethane and polyurethane/hydroxyapatite scaffold in a three-dimensional culture system. *Cell biology international*, 46(12), 2041–2049.
13. Meskinfam, M., Bertoldi, S., Albanese, N., Cerri, A., Tanzi, M. C., Imani, R., Baheiraei, N., Farokhi, M., & Farè, S. (2018). Polyurethane foam/nano hydroxyapatite composite as a suitable scaffold for bone tissue regeneration. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 82, 130–140.
14. Skinner, H. C. W., Ehrlich, H., (2014). 10.4-Biomineralization *Treatise on Geochemistry (Second Edition) Elsevier, Volume 10*, 105-162.
15. Langer, R., & Vacanti, J. (2016). Advances in tissue engineering. *Journal of pediatric surgery*, 51(1), 8–12.
16. Berthiaume, F., Maguire, T. J., Yarmush, M. L., (2011). Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2, 403-430.
17. Pina, S., Ribeiro, V. P., Marques, C. F., Maia, F. R., Silva, T. H., Reis, R. L., & Oliveira, J. M. (2019). Scaffolding Strategies for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications. *Materials (Basel, Switzerland)*, 12(11), 1824.
18. Fathi-Karkan, S., Banimohamad-Shotorbani, B., Saghati, S., Rahbarghazi, R., & Davaran, S. (2022). A critical review of fibrous polyurethane-based vascular tissue engineering scaffolds. *Journal of biological engineering*, 16(1), 6.
19. Kucinska-Lipka, J., Gubanska, I., Janik, H., Sienkiewicz, M., (2015). Fabrication of polyurethane and polyurethane based composite fibres by the electrospinning technique for soft tissue engineering of cardiovascular system, *Materials Science and Engineering: C, Volume 46*, 166-176.
20. Beck, E. C., Jarrell, D. K., Lyons, A. C., Vanderslice, E. J., VeDepo, M. C., & Jacot, J. G. (2021). Assessment of electrospun cardiac patches made with sacrificial particles and polyurethane-polycaprolactone blends. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 109(11), 2154–2163.
21. He, W., Hu, Z., Xu, A., Liu, R., Yin, H., Wang, J., & Wang, S. (2013). The preparation and performance of a new polyurethane vascular prosthesis. *Cell biochemistry and biophysics*, 66(3), 855–866.

22. Rickel, A. P., Deng, X., Engebretson, D., Hong, Z., (2021). Electrospun nanofiber scaffold for vascular tissue engineering, *Materials Science and Engineering: C, Materials for biological applications* 129, 112373.
23. Han, F., Jia, X., Dai, D., Yang, X., Zhao, J., Zhao, Y., Fan, Y., Yuan X., (2013). Performance of a multilayered small-diameter vascular scaffold dual-loaded with VEGF and PDGF, *Biomaterials*, Volume 34, Issue 30, 7302-7313.
24. Beck, E. C., Jarrell, D. K., Lyons, A. C., Vanderslice, E. J., VeDepo, M. C., & Jacot, J. G. (2021). Assessment of electrospun cardiac patches made with sacrificial particles and polyurethane-polycaprolactone blends. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 109(11), 2154–2163.
25. Tondnevis, F., Keshvari, H., & Mohandesi, J. A. (2020). Fabrication, characterization, and in vitro evaluation of electrospun polyurethane-gelatin-carbon nanotube scaffolds for cardiovascular tissue engineering applications. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, 108(5), 2276–2293.
26. Weinberg, C. B., & Bell, E. (1986). A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science (New York, N.Y.)*, 231(4736), 397–400.
27. Magnin, A., Pollet, E., & Avérous, L. (2021). Characterization of the enzymatic degradation of polyurethanes. *Methods in enzymology*, 648, 317–336.
28. Luo, X. J., & Wu, G. Y. (2001). The development on small-caliber prosthetic graft. *Chin J clin Thorac cardiovasc Surg*, 8, 193-6.
29. Ajili, S. H., Ebrahimi, N. G., Soleimani, M. (2009). Polyurethane/polycaprolactane blend with shape memory effect as a proposed material for cardiovascular implants, *Acta Biomaterialia*, Volume 5, Issue 5, Pages 1519-1530.
30. Boffito, M., Di Meglio, F., Mozetic, P., Giannitelli, S. M., Carmagnola, I., Castaldo, C., et al. (2018) Surface functionalization of polyurethane scaffolds mimicking the myocardial microenvironment to support cardiac primitive cells. *PLoS ONE* 13(7).
31. Chiono, V., Mozetic, P., Boffito, M., Sartori, S., Gioffredi, E., Silvestri, A., Rainer, A., Giannitelli, S. M., Trombetta, M., Nurzynska, D., Di Mehlio, F., Castaldo, C., Miraglia, R. Montagnini, S., Ciardelli, G., (2014). Interface Focus, Polyurethane-based scaffolds for myocardial tissue engineering. *Interface focus*, 4(1), 20130045.
32. Tondnevis, F., Keshvari, H. & Mohandesi, J.A., (2019). Physico-mechanical and in vitro characterization of electrically conductive electrospun nanofibers of poly urethane/single walled carbon nano tube by great endothelial cells adhesion for vascular tissue engineering. *J Polym Res* 26, 256.

33. Baughman, R. H., Zakhidov, A. A., & de Heer, W. A. (2002). Carbon nanotubes--the route toward applications. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5582), 787–792.
34. Zhang, Y., Bai, Y., & Yan, B. (2010). Functionalized carbon nanotubes for potential medicinal applications. *Drug discovery today*, 15(11-12), 428–435.
35. Luketich, S. K., Cosentino, F., Di Giuseppe, M., Menallo, G., Nasello, G., Livreri, P., Wagner, W. R., & D'Amore, A., (2022). Engineering in-plane mechanics of electrospun polyurethane scaffolds for cardiovascular tissue applications. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 128, 105126.
36. Safikhani, M., Zamanian, A., Ghorbani, F., Asefnejad, A. & Shahrezaee, M. (2017). Bi-layered electrospun nanofibrous polyurethane-gelatin scaffold with targeted heparin release profiles for tissue engineering applications. *Journal of Polymer Engineering*, 37(9), 933-941.
37. Hu, Z. J., Li, Z. L., Hu, L. Y., He, W., Liu, R. M., Qin, Y. S., & Wang, S. M. (2012). The in vivo performance of small-caliber nanofibrous polyurethane vascular grafts. *BMC cardiovascular disorders*, 12, 115.
38. Bergmeister, H., Grasl, C., Walter, I., Plasenzotti, R., Stoiber, M., Schreiber, C., Losert, U., Weigel, G. and Schima, H. (2012), Electrospun Small-Diameter Polyurethane Vascular Grafts: Ingrowth and Differentiation of Vascular-Specific Host Cells. *Artificial Organs*, 36: 54-61.
39. Janik, H., & Marzec, M. (2015). A review: fabrication of porous polyurethane scaffolds. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 48, 586–591.
40. Xu, C., Okpokwasili, C., Huang, Y., Shi, X., Wu, J., Liao, J., Tang, L., & Hong, Y. (2020). Optimizing Anisotropic Polyurethane Scaffolds to Mechanically Match with Native Myocardium. *ACS biomaterials science & engineering*, 6(5).
41. Rickel, A. P., Deng, X., Engebretson, D., & Hong, Z. (2021). Electrospun nanofiber scaffold for vascular tissue engineering. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 129, 112373.
42. Naureen, B., Haseeb, A. S. M. A., Basirun, W. J., & Muhamad, F. (2021). Recent advances in tissue engineering scaffolds based on polyurethane and modified polyurethane. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 118, 111228.
43. Piegat, A., Fray, M. E. (2016). Thermoplastic Elastomers: Materials for Heart Assist Devices. *Polimery w medycynie*, 46(1), 79–87.

44. Courtney, T., Sacks, M. S., Stankus, J., Guan, J., Wagner, W. R., (2006). Design and analysis of tissue engineering scaffolds that mimic soft tissue mechanical anisotropy, *Biomaterials*, Volume 27, Issue 19, 3631-3638.
45. Shin, M., Ishii, O., Sueda, T., Vacanti, J. P., (2006). Contractile cardiac grafts using a novel nanofibrous mesh, *Biomaterials*, Volume 25, Issue 17, 3717-3723.