



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

LAUREA TRIENNALE IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**Progettazione di valvole cardiache ingegnerizzate
“self-seeding”: quantificazione dei peptidi auto-aggreganti in
matrice pericardica bovina**

Relatore: Prof. Monica Dettin

Laureanda: Mauro Cerquitella

ANNO ACCADEMICO 2012 – 2013

Abstract

Questo lavoro di tesi si è focalizzato sullo studio delle proprietà fisico-chimiche di una matrice pericardica decellularizzata bovina trattata con un peptide auto-assemblante.

Il processo di decellularizzazione, se da un lato assicura una matrice priva di determinanti antigenici, dall'altro comporta la perdita di proprietà della matrice extracellulare utili al ripopolamento cellulare dello *scaffold*.

La colonizzazione della protesi valvolare da parte delle cellule del ricevente è fondamentale per ottenere una bioprotesi "vivente" in grado di sostituire, in ogni sua funzione, la valvola nativa e capace di "crescere" con l'individuo (chirurgia pediatrica).

I peptidi auto-assemblanti ionico complementari sono in grado di formare idrogeli molto graditi alle cellule e possono essere funzionalizzati con sequenza adesive o fattori di crescita. L'idea, sviluppata in parte in questo lavoro di tesi, riguarda l'uso di peptidi auto-assemblanti quali "filler" per la matrice pericardica decellularizzata.

L'obiettivo è di creare degli *scaffold* per bioprotesi valvolari graditi alle cellule, in modo da consentirne un ripopolamento *in vivo* sia internamente sia superficialmente, apportando così notevoli miglioramenti nel campo dei sostituti valvolari.

Data la natura non omogenea del tessuto pericardico, è stata sottoposta all'indagine sia la zona isotropa sia la zona anisotropa della matrice decellularizzata.

Indice

CAPITOLO 1 – INTRODUZIONE	1
1.1 INGEGNERIA TISSUTALE.....	1
1.1.1 Le matrici.....	2
1.1.2 Le cellule nell'ingegneria tissutale.....	3
1.1.3 I materiali biomimetici e bioattivi.....	4
1.1.4 I bioreattori.....	6
1.2 FISILOGIA DEL CUORE.....	7
1.2.1 Le valvole cardiache.....	7
1.3 PROTESI VALVOLARI.....	9
1.3.1 Protesi valvolari meccaniche.....	9
1.3.2 Protesi valvolari biologiche.....	10
1.3.2.1 Autografts, Homografts, Xenografts.....	11
1.3.3 Protesi valvolari percutanee.....	14
1.4 VALVOLE CARDIACHE INGEGNERIZZATE.....	17
1.4.1 Tipologia di matrici per valvole cardiache ingegnerizzate.....	18
1.4.2 Biomolecole per valvole cardiache ingegnerizzate.....	20
1.4.2.1 I peptidi auto-assemblanti ionico complementari di Tipo I.....	20
1.4.2.2 Il peptide EAK.....	21
1.4.3 Utilizzo del pericardio come biomateriale.....	22
1.5 ADESIONE E PROLIFERAZIONE CELLULARE.....	23
1.5.1 Le sequenze adesive.....	23
1.5.2 I fattori di crescita.....	24
1.5.3 La decellularizzazione.....	24
1.5.4 Calcificazione e fissazione.....	25
1.6 SCOPO DELLA TESI.....	25
CAPITOLO 2 – MATERIALI E METODI	27
2.1 MATERIALI.....	27
2.1.1 Reagenti.....	27
2.1.2 Peptidi per il trattamento del pericardio bovino.....	28
2.1.2.1 EAbuK (carbossi terminale).....	28
2.1.2.2 EAbuk (ammide terminale).....	28
2.1.2.3 Δ 5SDF1 β T.....	28
2.1.3 Strumentazione di laboratorio.....	29
2.1.3.1 Spettrometro di massa.....	29

2.1.3.2 Cromatografia.....	29
2.1.3.3 Strumentazione per analisi biologiche.....	30
2.2 METODI	30
2.2.1 Purificazione e caratterizzazione cromatografica.....	30
2.2.2 Analisi amminoacidica	32
2.2.3 Spettrometria di massa	33
2.2.4 Spettroscopia di assorbimento UV/Vis	35
2.3 MATRICI BIOLOGICHE	36
2.3.1 Decellularizzazione mediante protocollo TRI-COL	36
2.3.2 Misurazione delle proprietà fisiche delle matrici biologiche	36
2.4 ANALISI STATISTICA.....	39
CAPITOLO 3 – PARTE SPERIMENTALE.....	41
3.1 TRATTAMENTO DI MATRICI BIOLOGICHE DECELLULARIZZATE	41
3.1.1 Analisi chimico-fisiche della matrice	43
3.2 QUANTIFICAZIONE DEI PEPTIDI IN MATRICE	46
3.2.1 Idrolisi peptidica.....	46
3.2.2 Analisi amminoacidica	46
3.2.3 Determinazione della retta di taratura di Abu	48
3.2.4 Determinazione della retta di taratura di SDF	50
3.3 ANALISI RP-HPLC DELLE SOLUZIONI RESIDUE E LAVAGGI.....	51
3.3.1 Analisi RP-HPLC degli amminoacidi ottenuti dall'idrolisi delle soluzioni di EAbuk dopo il trattamento del pericardio bovino	51
3.3.2 Analisi RP-HPLC della soluzione di SDF dopo il trattamento del pericardio bovino	53
3.3.3 Quantificazione del peptide EAbuk trattenuto nel pericardio bovino	54
3.3.4 Quantificazione del peptide SDF trattenuto nel pericardio bovino	57
CONCLUSIONI	59
BIBLIOGRAFIA.....	61
RINGRAZIAMENTI.....	65

Capitolo 1

Introduzione

1.1 Ingegneria Tissutale

L'ingegneria tissutale nasce nei primi anni '90 e si propone come valida alternativa alle tradizionali tecniche di trapianto di organi ed impianto di protesi largamente impiegate in ambito clinico per ripristinare le funzionalità di un tessuto patologico.

Nel 1998 l'ingegneria tissutale è stata definita come *“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”* [1].

Questa tecnica ricopre un ruolo fondamentale nella medicina rigenerativa, definita dai National Institutes of Health (NIH) come il processo per creare tessuti viventi adatti alla riparazione o alla sostituzione di organi o tessuti le cui funzioni sono venute meno a causa dell'invecchiamento, delle malattie e dei danni o dei difetti congeniti.

L'obiettivo della rigenerazione dei tessuti è quindi quello di favorire o innescare una reazione di rigenerazione che non può avvenire spontaneamente in un organo o tessuto irreversibilmente danneggiato.

L'ingegneria tissutale rappresenta un settore d'importante e crescente interesse medico e industriale ed è caratterizzato da una grande interdisciplinarietà che prevede la collaborazione di diverse figure professionali: gli ambiti interessati sono le scienze di base, la scienza dei biomateriali, le biotecnologie, la bioingegneria, la medicina rigenerativa e la biologia molecolare [2]. Un'importanza rilevante assume la conoscenza e lo studio per comprendere nei dettagli i meccanismi che regolano la crescita, la proliferazione e la differenziazione delle cellule e le modalità attraverso le quali, i componenti della matrice extracellulare (ECM), interagiscono con le funzioni cellulari. Studi su valvole cardiache sane, patologiche o sostituite hanno dimostrato che il principale fattore che determina la durata della valvola è l'ECM, la cui quantità e qualità dipendono dalla vitalità e funzionalità delle cellule interstiziali valvolari (VIC).

La progettazione di questi tessuti avviene attraverso l'utilizzo combinato di materiali, cellule e segnali biochimici attraverso due tipologie di approccio.

- *in vitro seeding*: il tessuto viene seminato con le cellule del paziente e nutrienti e posto in un bioreattore che simula l'ambiente biologico, creando le condizioni migliori per la crescita cellulare. Una volta ultimato il tessuto verrà poi impiantato nel paziente;
- *tissue guided regeneration (in vivo)*: in questo approccio non viene realizzata la semina cellulare *in vitro* poiché il tessuto viene direttamente impiantato nel paziente.

Per la realizzazione di nuovi costrutti biologici questa disciplina si avvale di tre elementi principali:

- le cellule: la scelta della corretta fonte cellulare è un punto cruciale per l'ingegnerizzazione di un tessuto;
- lo *scaffold*: fornisce un supporto tridimensionale alle cellule. Forma, struttura e materiali sono scelti a seconda della specifica applicazione;
- il bioreattore: costituisce il sistema di condizionamento della coltura, fornendo opportuni stimoli e mantenendo il costrutto in un ambiente sterile.

Il procedimento per ottenere un tessuto ingegnerizzato è suddiviso in sei fasi:

- fabbricazione dei supporti tridimensionali;
- prelievo ed espansione delle cellule del donatore;
- semina su *scaffold*;
- proliferazione e differenziazione cellulare in condizioni dinamiche all'interno di un bioreattore;
- impianto nel paziente;
- integrazione e adattamento dell'impianto da parte del sistema biologico.

1.1.1 Le Matrici

La matrice o *scaffold*, che conferisce la struttura tridimensionale sulla quale cresceranno le cellule può essere sia di origine sintetica (ad es. polimerica), quindi creata artificialmente, sia di origine biologica, prelevata da cadavere o da fonte animale.

Gli *scaffold* sintetici, prodotti principalmente con materiali polimerici biodegradabili e biorisorbibili (come PLA e PGA), 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. Essi presentano tuttavia un'elevata trombogenicità e difficoltà tecnica legata a una lavorabilità non ottimale.

Gli *scaffold* biologici consentono di superare queste difficoltà perché contengono già al loro interno fattori di crescita e segnali molecolari che promuovono l'attività cellulare e presentano una struttura 3D ottimale; tuttavia queste strutture devono essere sottoposte a trattamenti di decellularizzazione, per eliminare totalmente le cellule del donatore, con il rischio però di alterare la composizione e le proprietà dello *scaffold* stesso.

In ogni caso lo *scaffold*, sia biologico sia sintetico, deve garantire un'adeguata adesione cellulare, presentare citotossicità nulla, deve possedere un'opportuna porosità e prestarsi come supporto meccanico per lo sviluppo del tessuto, con un profilo di degradazione noto e controllato.

Per creare un'interazione positiva tra cellule e *scaffold*, quest'ultima è arricchita con proteine e corte sequenze peptidiche che aiutano lo sviluppo cellulare e lo guidano su tutta la matrice.

Infine, l'utilizzo di cellule del ricevente comporta uno dei vantaggi maggiori di questa tecnica.

Il tessuto seminato e impiantato, non avrà alcun tipo di problema legato alla risposta immunitaria, essendo del tutto simile a quello nativo.

1.1.2 Le cellule nell'ingegneria tissutale

Passo cruciale è la scelta della tipologia di cellule da utilizzare: cellule differenziate o staminali.

In base agli studi scientifici più recenti, tra i migliori candidati abbiamo le cellule staminali perché, con la capacità di differenziarsi in varie tipologie di cellule, possono essere molto utili per ricreare *in vitro* i costrutti desiderati. D'altro canto questa tipologia di cellule presenta vari punti a sfavore. Innanzitutto non sono ancora completamente note le proprietà e le potenzialità di queste cellule; inoltre risulta difficile coltivarle ed espanderle *in vitro* e la loro applicazione è destinata a sollevare problemi etici soprattutto per l'utilizzo eventuale di staminali embrionali.

Le cellule sono un elemento basilare per la produzione di nuovo tessuto, detta neomorfogenesi. Con questo termine si indica il processo che porta alla formazione di nuovo tessuto *in vitro*; esso si differenzia dalla morfogenesi, cioè lo sviluppo naturale delle forme e delle funzioni di un embrione. Bisogna tener presente che, affinché la neomorfogenesi abbia successo, è necessario creare un ambiente favorevole nel quale le cellule siano in grado di riprodursi e di organizzarsi e, inoltre, è indispensabile fornire loro un supporto che ne indirizzi l'organizzazione in un'opportuna architettura.

Al fine di poter guidare la crescita di un costrutto in maniera affidabile e riproducibile, sono necessari stimoli provenienti sia dallo *scaffold* sia dall'ambiente biochimico che

circonda le cellule, ricordando che non esisterà mai un equilibrio vero e proprio del sistema, ma un bilancio dinamico da controllare, monitorare e condizionare nel tempo.

1.1.3 I materiali biomimetici e bioattivi

Un biomateriale è un materiale che s'interfaccia con i sistemi biologici per valutare, trattare, aumentare o sostituire un qualunque tessuto, organo o funzione dell'organismo.

Essendo un ausilio alle funzioni fisiologiche umane, non deve presentare tracce di tossicità o scatenare risposte infiammatorie da parte del sistema immunitario del ricevente.

Nel corso degli anni, la progettazione del biomateriale ha attraversato vari stadi di sviluppo, dettati da tecniche di realizzazione sempre più raffinate e qualitativamente superiori.

Si è passati da una prima generazione di biomateriali, dove l'unico aspetto funzionale era caratterizzato dal rendere minima l'interazione chimico-fisica tra organismo e materiale (materiale bioinerte), ad una seconda generazione dove si è resa necessaria un'interazione positiva con il tessuto biologico.

Il materiale, detto bioattivo, ha una veloce capacità d'integrazione con l'ambiente fisiologico e viene gradualmente degradato dall'organismo senza causare problemi di rigetto o tossicità.

Il futuro dei biomateriali è caratterizzato da materiali di terza generazione sia bioattivi che biorisorbibili, definiti biomimetici, poiché interagiscono con i tessuti adiacenti attraverso meccanismi di riconoscimento biomolecolare [3].

La tecnica sviluppata per far colloquiare il biomateriale con l'ambiente circostante è quella di veicolare sulla superficie del materiale, dei segnali biochimici in grado di stimolare le cellule del ricevente.

La veicolazione può avvenire in tre diversi modi:

- attraverso semplice adsorbimento delle molecole poste a contatto con la superficie;
- tramite legame covalente;
- tramite trasportatori (*carrier*).
- I *carrier* sono dei vettori riassorbibili di materiale generalmente polimerico che contengono biomolecole attive. Una volta posti come rivestimento superficiale dello *scaffold*, questi trasportatori vengono degradati dall'ambiente circostante e liberano lentamente le molecole contenute nel loro interno.

Il rilascio delle biomolecole attive può essere controllato nel tempo andando semplicemente ad agire sulla struttura del *carrier* (spessore maggiore implica tempi più lunghi di degradazione).

Le molecole possono essere ancorate direttamente al materiale o attraverso l'introduzione di una molecola con funzione di spaziatore (o *spacer*), che permette di esporre meglio la biomolecola alle cellule conferendo maggiori gradi di libertà e di orientamento [4].

(figura 1.1)

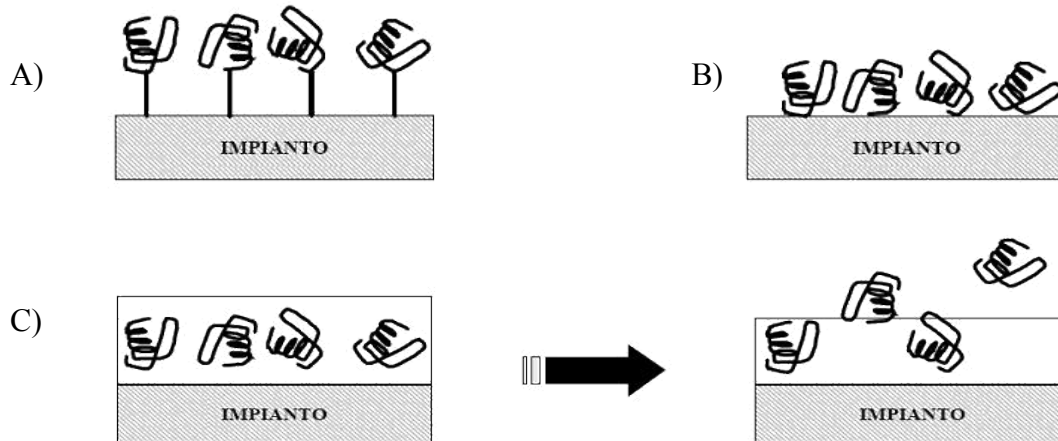


Figura 1.1 Ancoraggio mediante legame covalente con spacer (A), per adsorbimento (B) e rilascio da carrier di una proteina (C).

Facendo ricorso a tecniche d'immobilizzazione covalente specifica (figura 1.2), grazie alle quali s'inducono tutte le molecole a legarsi alla superficie utilizzando il medesimo gruppo funzionale, si può ovviare all'inconveniente determinato dal fatto che, in assenza di specifici accorgimenti, peptidi e proteine si legano ai gruppi funzionali della superficie in modo del tutto casuale, provocando un'orientazione non uniforme delle biomolecole in superficie che potrebbero quindi esporre, o meno, il sito di legame verso i recettori cellulari.

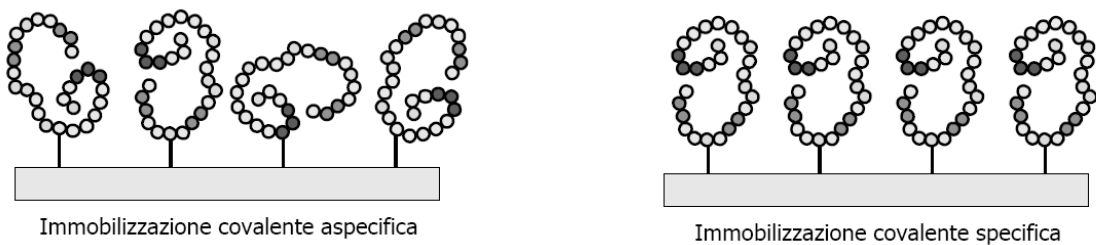


Figura 1.2 Immobilizzazione covalente aspecifica e specifica

1.1.4 I bioreattori

Il bioreattore è un dispositivo in grado di fornire un ambiente adeguato alla crescita di microorganismi, cellule o tessuti.

Esistono due tipologie di funzionamento per un bioreattore: statiche e dinamiche.

Inizialmente nell'ambito della *tissue engineering*, hanno trovato maggior impiego i bioreattori statici, nei quali le cellule sono fatte depositare e aderire allo *scaffold* semplicemente sotto l'azione del campo gravitazionale; nel corso degli anni però ha preso il sopravvento la tipologia dinamica perché consente di ricreare condizioni di esercizio più simili a quelle fisiologiche.

In entrambi i casi, comunque, i bioreattori per l'ingegneria tissutale devono garantire un ambiente sterile e altamente controllato nei parametri chimico-fisici (temperatura, pH, concentrazione di O₂ e CO₂, pressione, sforzi di taglio).

Si è 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 1.3).

Per quanto riguarda l'uso dei bioreattori nello sviluppo di tessuti per il sistema cardiovascolare, si utilizza un ambiente dinamico pulsatile, in grado di riprodurre i parametri fisiologici come il flusso di sangue arterioso e la pressione sanguigna.

Diversi studi hanno mostrato che la coltura del tessuto in un ambiente para-fisiologico aumenta l'espressione delle fondamentali funzioni cellulari e garantisce migliori proprietà meccaniche.

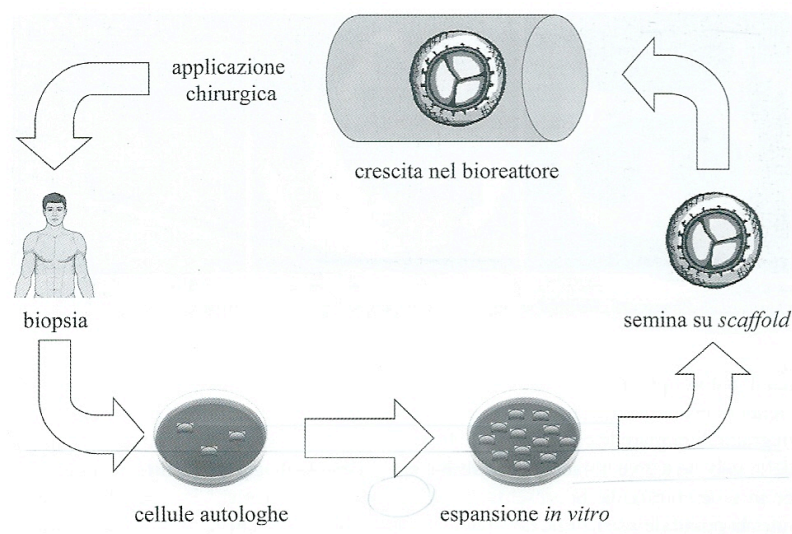


Figura 1.3 Fasi fondamentali nella ricostruzione di una valvola cardiaca con cellule autologhe.

1.2 Fisiologia del cuore

Il cuore è un organo muscolare di fondamentale importanza per il delicato equilibrio fisiologico umano.

E' posto nella cavità toracica, più precisamente nel mediastino medio dietro lo sterno e le cartilagini costali che lo proteggono.

La sua principale funzione è di pompare sangue che, grazie a una fitta rete vascolare, è in grado di raggiungere tutti i tessuti e gli organi del corpo umano, permettendo così rilascio di ossigeno e nutrienti verso gli stessi e l'allontanamento di CO₂ e delle sostanze di scarto.

Nella sua trattazione anatomica, essendo il cuore un organo cavo, possiamo distinguere quattro camere: due atri (destro e sinistro) a parete sottile e due ventricoli (destro e sinistro) di forma più allungata e con le pareti più spesse.

Il maggiore spessore è dovuto al maggior carico di lavoro svolto. Infatti nel ventricolo lo sforzo pressorio è più elevato.

Nel flusso sanguigno possiamo distinguere due tipi di circolazione.

La prima, che confluisce nell'atrio destro, viene chiamata piccola circolazione e convoglia il sangue ricco di anidride carbonica proveniente dal corpo. Passando poi per il ventricolo destro, il sangue viene pompato verso i polmoni dove rilascerà l'anidride carbonica per arricchirsi di ossigeno.

Nella seconda, chiamata grande circolazione, il sangue ossigenato proveniente dai polmoni entra nell'atrio sinistro, passa nel ventricolo sinistro e da qui pompato con forte pressione verso tutto il corpo.

E' di rilevante importanza che questo meccanismo di pompaggio segua un'unica direzione di flusso. A tutela di questo percorso, nel cuore, abbiamo quattro valvole.

Esse sia durante la contrazione (sistole) che durante il rilassamento (diastole) impediscono il reflusso sanguigno.

1.2.1 Le valvole cardiache

Le valvole cardiache sono costituite da lembi sottili, flessibili e molto resistenti di tessuto fibroso rivestito di endotelio e saldamente ancorate agli anelli valvolari che durante gli sforzi tengono le valvole in sede. Le valvole cardiache si suddividono in due tipologie: le valvole atrioventricolari e semilunari. Le valvole atrioventricolari, costituite rispettivamente da tre e due cuspidi, comprendono la *valvola tricuspide*, posta tra l'atrio destro e il ventricolo destro, e la *valvola mitrale*, tra l'atrio sinistro ed il ventricolo sinistro. Le valvole che regolano il flusso sanguigno tra ventricoli e arterie presentano, invece, tre lembi a forma di nido di rondine: la *valvola polmonare*, tra ventricolo destro e arteria polmonare, e la *valvola aortica*, tra ventricolo sinistro e aorta. In (Figura 1.4) è riportata la

struttura interna del cuore, in cui è possibile vedere le quattro valvole: *tricuspide*, *mitrale*, *aortica* e *polmonare*.

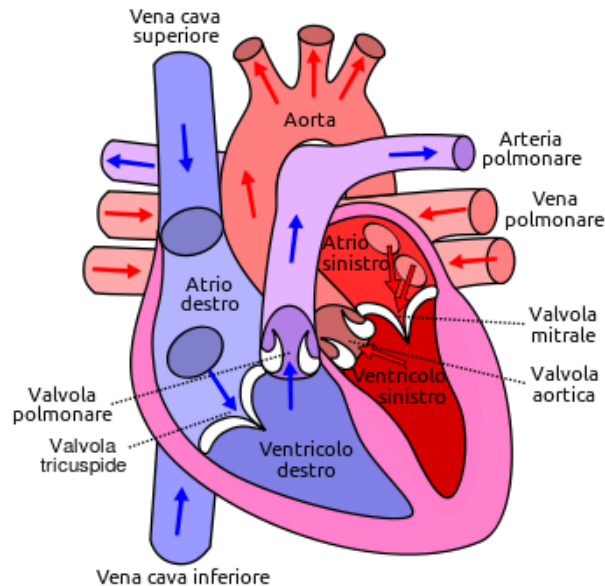


Figura 1.4 Struttura interna del cuore nella quale sono visibili le quattro valvole: *tricuspide*, *mitrale*, *aortica* e *polmonare*

Il cuore batte circa 100.000 volte al giorno, e quindi le valvole si devono aprire, richiudere e resistere alla pressione del sangue alcune centinaia di milioni di volte durante la vita di ogni persona.

Molteplici possono essere le cause di malfunzionamento di suddette valvole. Vecchiaia, malattia, malformazioni, sono tutte fonti di stress o di deficit strutturale che possono portare nel corso degli anni all'usura e all'indebolimento della valvola e nei casi più gravi, anche a insufficienza cardiaca.

Le valvole aortiche e mitraliche sono le più frequentemente colpite dai processi degenerativi e il loro malfunzionamento può generare problemi in cascata su tutto il sistema circolatorio.

Quando una valvola aumenta di spessore e si irrigidisce, cessa di aprirsi in modo corretto e il sangue trova una elevata resistenza al flusso. Questo fenomeno prende il nome di *stenosi*. Quando invece una valvola va incontro ad assottigliamento e i suoi foglietti vengono stirati, potrebbe non chiudersi più correttamente e il sangue tende a refluire. Questo fenomeno viene definito *insufficienza* o *rigurgito* valvolare. Molto spesso stenosi e insufficienza coesistono in diversa entità sulla stessa valvola, causando la *stenoinsufficienza*. Tutti i tipi di disfunzione valvolare aumentano di molto il carico lavorativo del cuore che tende a dilatarsi per compensare. Quando il cuore non riesce più a

lavorare correttamente, subentra lo scompenso cardiaco che può portare a un danno irreversibile del muscolo cardiaco.

Una valvola danneggiata irreversibilmente deve essere quindi riparata o sostituita tramite intervento chirurgico per non affaticare ulteriormente il cuore.

La terapia medica ha solo il compito di rallentare la progressione e controllare i sintomi, in modo tale che il paziente possa arrivare all'intervento chirurgico nelle migliori condizioni di stabilità clinica.

In caso di sostituzione, la valvola corrotta viene quindi rimossa e la nuova valvola artificiale viene saldamente ancorata al suo posto. Vi sono diversi tipi di protesi valvolari a disposizione del chirurgo, anche se principalmente tutte possono essere classificate in due grandi categorie: le valvole biologiche (fatte di tessuti animali) e le valvole meccaniche (fatte di materiali artificiali).

Le protesi valvolari vengono utilizzate da oltre 40 anni, e differiscono tra loro per diverse caratteristiche: il profilo emodinamico, la durata, l'effettiva area orificiale e la trombogenicità. Nel mondo il numero di protesi impiantate è intorno a 250.000 all'anno con un incremento annuale del 5-7%. Questa statistica evidenzia l'importanza che attualmente è associata alla ricerca di tecniche sempre più innovative nell'ambito dei sostituti valvolari e delle metodologie di intervento; lo scopo è migliorare il decorso post-operatorio ed eliminare la necessità di ulteriori operazioni chirurgiche dovute alla limitata durata delle bioprotesi attuali.

1.3 Protesi valvolari

1.3.1 Protesi valvolari meccaniche

Le valvole meccaniche hanno una durata media tra i venti e i trenta anni e sono caratterizzate da una bassa perdita delle funzionalità nel tempo. Questa caratteristica determina il loro impiego in pazienti giovani con un'aspettativa di vita superiore ai 10-15 anni.

Le protesi valvolari meccaniche sono formate principalmente da titanio rivestito di carbonio pirolitico.

Questo microfilm di carbonio ha la funzionalità di rendere minima la trombogenicità anche se non evita al paziente una terapia anticoagulante a vita.

Il problema principale di questo tipo di protesi rimane dunque l'alto rischio di tromboembolismo di eventi emorragici ed infezioni; inoltre è molto difficile ottenere una valvola meccanica che riproduca fedelmente la forma di una valvola nativa.

Le valvole meccaniche hanno tutte una struttura di base simile formata da tre costituenti essenziali:

- *Occluder*: generalmente formato da una o più parti rigide e mobili, ad esempio: una sfera (nelle protesi *Starr-Edwards*), un disco (nelle protesi *Bjork-Shiley*) o un “*hinged leaflet*” circolare o semicircolare (nelle protesi *Medtronic-Hall*, o *St. Jude Medical*). Deve essere in grado di aprirsi e chiudersi senza interferire con il flusso ematico e di adattarsi alle differenze di pressione;
- *Housing*: in cui è inserito l’occluder;
- *Sewing ring*: è la base o il corpo della protesi. È formato da un anello di sutura in metallo o in graffite rivestito con carbone pirolitico. Rappresenta il punto di congiunzione della protesi con i tessuti del ricevente.

Le protesi valvolari meccaniche si aprono e chiudono grazie ad un movimento passivo, che dipende dal gradiente pressorio e dai cambiamenti del flusso ematico (Figura 1.5).

Attualmente il 90% delle valvole meccaniche impiantate è del modello a doppio disco o *bileaflet* che permette un profilo emodinamico più simile a quello fisiologico [5].

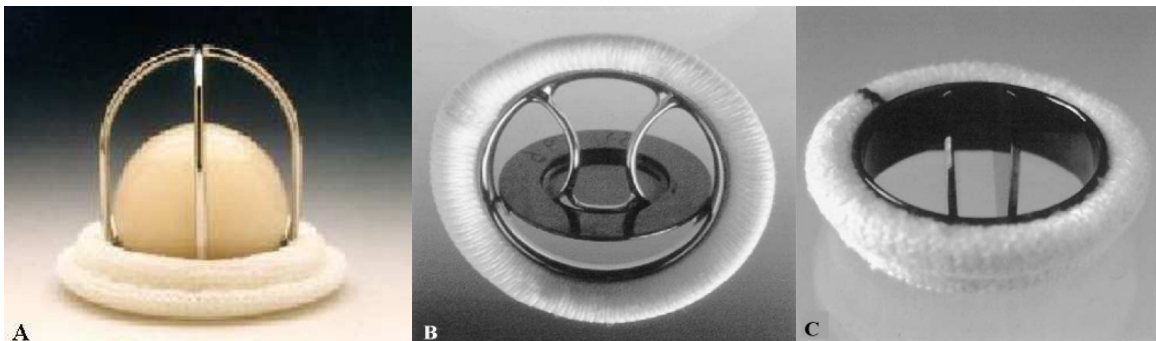


Figura 1.5 Modelli di valvole cardiache meccaniche: A) *caged-ball* (*Starr-Edwards*); B) *single-tilting-disk* (*Medtronic-Hall*); C) *bileaflet-tilting-disk* (*St. Jude Medical*)

1.3.2 Protesi valvolari biologiche

La valvola biologica ha il vantaggio di essere molto simile a quella nativa, sia sotto il profilo morfologico sia per ciò che riguarda la biocompatibilità e non richiede che il paziente sia sottoposto ad una terapia anticoagulante a vita.

Il principale svantaggio è dovuto alla loro durata. In media mantengono le caratteristiche funzionali per non più di 8-10 anni in pazienti con età inferiore ai 40 anni; fino ad arrivare a 15 anni di durata in pazienti anziani.

Questa variazione dipende dal differente metabolismo e dall'assunzione di calcio da parte del soggetto. La deposizione di calcio sui foglietti valvolari detta decalcificazione causa il loro indurimento e conseguentemente rigidità strutturale della valvola.

Un altro aspetto fondamentale sono i trattamenti ai quali vengono sottoposte queste valvole prima dell'impianto.

Per ridurre al minimo il rischio di rigetto da parte del paziente, è necessario eseguire un trattamento di decellularizzazione per eliminare dalla matrice extra-cellulare tutte le cellule del donatore.

Questo trattamento modifica le caratteristiche funzionali della matrice, riducendone in particolare le proprietà meccaniche. Per ovviare al problema, le valvole vengono trattate con glutaraldeide per produrre delle reticolazioni stabili sulla matrice ed incrementare nuovamente le proprietà meccaniche e per abbassare ulteriormente la risposta immunitaria. Nonostante ripetuti lavaggi, la glutaraldeide può rimanere in tracce all'interno della matrice trattata. Dopo l'impianto il lento rilascio dell'agente chimico può causare problemi gravi al paziente: citotossicità, risposta infiammatoria e calcificazione; inoltre impedisce la ripopolazione della matrice da parte delle cellule del ricevente.

1.3.2.1 Autografts, Homografts, Xenografts

La classificazione delle protesi valvolari biologiche viene fatta in base al tessuto biologico di cui sono costituite:

- Autografts: valvola cardiaca prelevata dal paziente stesso;
- Homografts (o allografts): valvola cardiaca umana rimossa *post mortem*;
- Heterografts (o xenografts): valvola cardiaca prelevata da specie non umane (bovine o porcine)

Gli interventi con autografts prevedono l'espanto della valvola polmonare del paziente (soggetta a stress minori) che viene impiegata per sostituire la valvola aortica, maggiormente sollecitata.

Al posto della valvola polmonare si dispone un homografts (procedimento di Ross, in Figura 1.6).

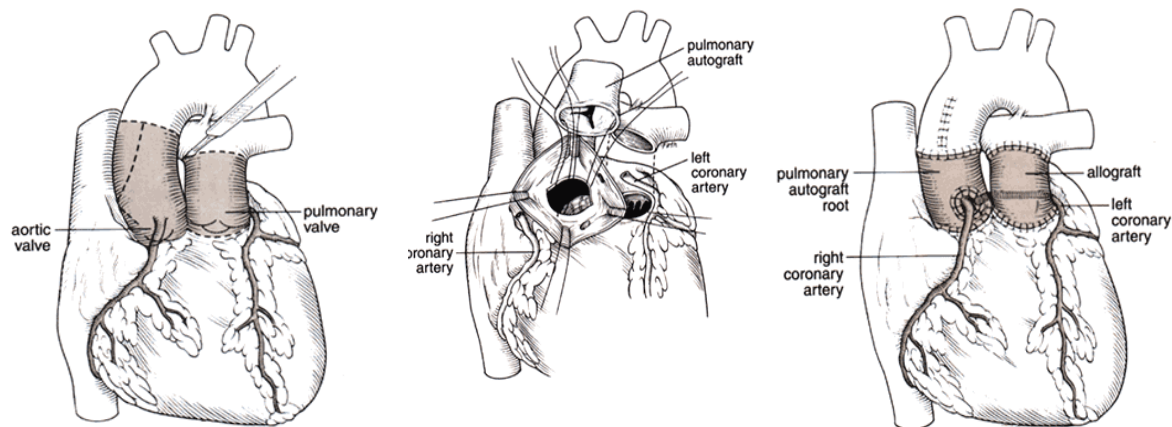


Figura 1.6 Procedura di Ross: fasi principali dell'intervento.

Questa tecnica in vigore da circa quarant'anni è utilizzata in individui selezionati e di giovane età.

In bambini e neonati si sono ottenuti risultati migliori rispetto all'impiego di altre protesi aortiche, facendo emergere una eccellente prestazione emodinamica.

Aspetto non secondario è che l'autograft è in grado di crescere insieme al paziente ed evita una terapia anticoagulante. Nel 93% dei casi a distanza di 10 anni dall'operazione non si ha avuto il bisogno di reintervento, mentre si verifica un'alta incidenza di stenosi dell'homograft in posizione polmonare dovuta probabilmente a una possibile infiammazione post-operatoria. Il reintervento sull'*homograft* polmonare può essere necessario nel 20% dei pazienti, a 20 anni dal primo intervento [6].

Un homograft (o allograft) è una valvola cardiaca umana prelevata da cadavere o da donatore vivente (deceduto di morte cerebrale o che ha subito un trapianto cardiaco).

Nel caso di espianto da donatore vivente, la conservazione avviene a 4°C in un ambiente di cultura con penicillina e poi impiantato in un intervallo di tempo non superiore alle 48 ore.

In caso di prelievo da cadavere, l'homograft viene sterilizzato con antibiotici e sottoposto a crio-preservazione in azoto liquido e conservato a -196°C fino all'intervento [7] (figura 1.7).



Figura 1.7 Homograft aortico prelevato da cadavere

Questo tipo di soluzione assicura delle caratteristiche emodinamiche eccellenti e un basso rischio di complicazioni post operatorie.

Nel 95% dei casi dopo 10 anni, l'homograft non presenta sintomi degenerativi, scendendo all'80% dopo 15 anni, per poi accelerare drasticamente una volta superati i 15 anni. Non si conoscono ancora le cause di tale accelerazione degenerativa e sono attualmente oggetto di studio [8].

Purtroppo pur presentando elevati benefici questo tipo di soluzione è sottoposta a limitata disponibilità e con un alto costo di trattamento e approvvigionamento. Inoltre le tecniche d'inserimento richieste risultano più complesse rispetto a quelle di altri dispositivi protesici.

Le valvole biologiche più comunemente impiantate sono rappresentate dagli heterografts di origine bovina o porcina fissati con glutaraldeide.

Queste bioprotesi sono tenute in sede e fissate al tessuto biologico tramite un supporto (*stent*, nel caso di pericardio bovino e valvole transcateretere) che mantiene la struttura tridimensionale e consente un'applicazione più semplice nel sito chirurgico.

Sono caratterizzate da buona emodinamicità e dall'assenza del fastidioso rumore che caratterizza le valvole meccaniche. Inoltre esse presentano un basso rischio di complicazioni tromboemboliche. Tuttavia, con il passare degli anni si riscontra un cedimento tissutale notevole e la presenza dello *stent* può essere causa di maggiore turbolenza e frizione portando a calcificazione e stenosi.

Per ovviare a queste complicazioni, negli ultimi anni, sono state progettate valvole porcine *stent-less* rimuovendo sia il *sewing-ring* sia lo *stent*.

Questi accorgimenti hanno portato un miglioramento delle caratteristiche emodinamiche grazie ad un migliore e più fluido scorrimento del sangue. L'impianto di queste valvole, d'altra parte, richiede una tecnica chirurgica più complessa rispetto alle valvole dotate di *stent* con anello di sutura [9].

Mettendo a confronto le due strategie si è riscontrato che la percentuale di reinterventi ed eventi tromboembolici ed endocarditi è inferiore nelle valvole *stent-less*. Sono maggiori anche statistiche di sopravvivenza negli anni immediatamente successivi l'intervento [10].

Per produrre bioprotesi valvolari xenografts si utilizzano tessuti porcini o bovini[11]; questi ultimi risultano particolarmente adatti per la produzione di *leaflet valves*. In tale applicazione, i lembi di pericardio sono suturati esternamente a un supporto valvolare, determinando un lume più ampio di quello delle protesi porcine. Il tessuto è sottoposto a un processo di sterilizzazione per rimuovere i *marker* biologici ed eliminare la risposta immunitaria da parte dell'organismo ricevente. Durante il fissaggio con glutaraldeide il pericardio è deformato in modo da ottenere la geometria finale.

1.3.3 Protesi valvolari percutanee

Nell'ambito della cardiocirurgia e nel trattamento delle patologie valvolari si sta aprendo un nuovo panorama dettato dalla sempre più elevata richiesta d'interventi chirurgici valvolari da parte di persone anziane, con un rischio operatorio troppo elevato.

Il numero di pazienti anziani, sta aumentando proporzionalmente all'innalzamento dell'aspettativa di vita dovuta a una migliore qualità di vita.

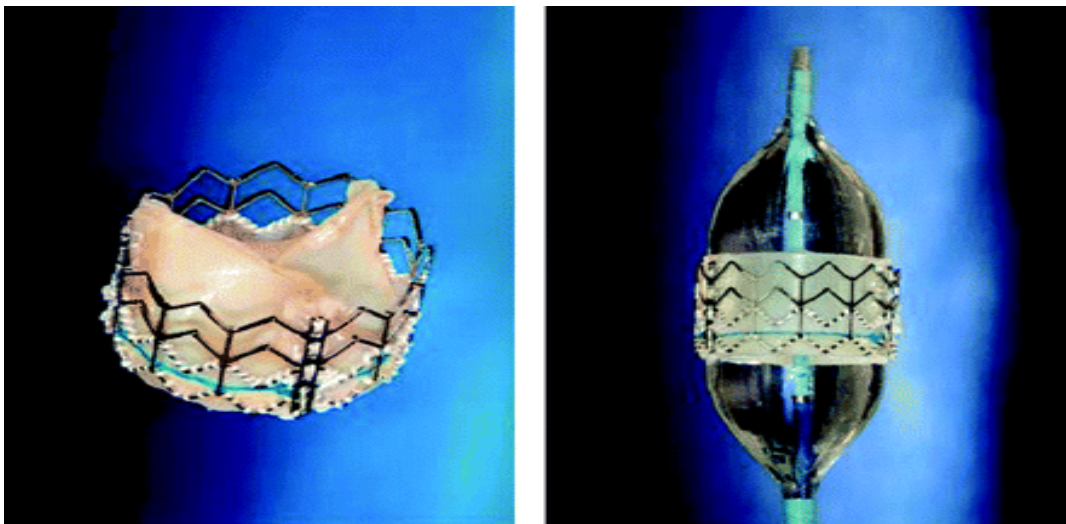
L'aspettativa di vita, nei paesi industrializzati, ha ormai superato gli 80 anni.

Attualmente l'offerta di nuove tecniche mini-invasive e percutanee di riparazione valvolare è cresciuta esponenzialmente determinando così l'inizio di una nuova era nel trattamento delle patologie valvolari.

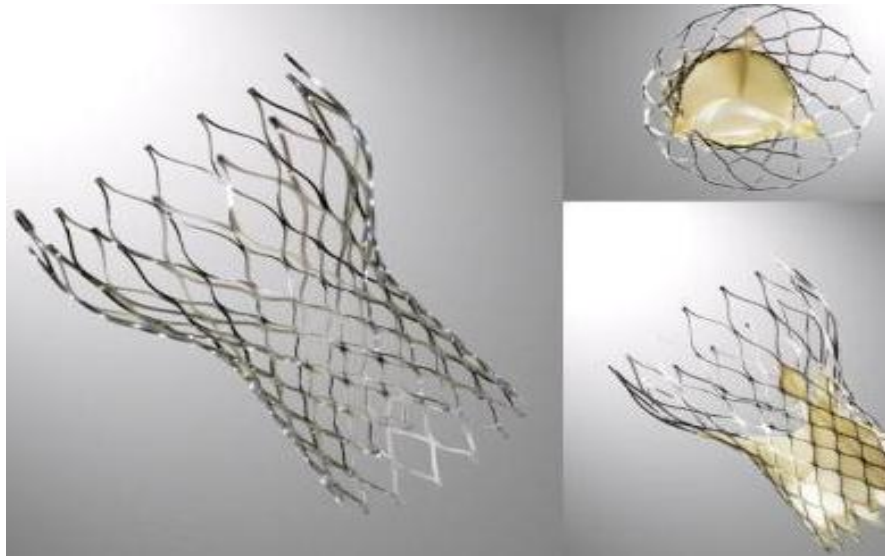
In particolare si è sviluppato l'impianto valvolare trans-catetere specificamente per la valvola aortica, pur essendo potenzialmente valido per tutte e quattro le valvole cardiache.

Le valvole aortiche per impianto percutaneo al momento disponibili utilizzano materiali biologici di origine animale e sono di tipo *trileaflet*.

I tre lembi valvolari sono cuciti o fissati a uno *stent* circolare, montato su di un catetere per il rilascio che può essere generalmente di due tipi: *balloon-expanding* o *self-expanding* (Figura 1.8).



a)



b)

Figura 1.8 a) Cribier-Edwards valve, impiantata tramite meccanismo balloon-expanding.
b) Medtronic CoreValve, impiantata secondo il meccanismo di rilascio self-expanding.

Nella prima tipologia, il dispositivo viene collocato in sede tramite espansione di un palloncino fissato sul catetere che rilascia la valvola, mentre nella seconda la collocazione è determinata dall'auto-espansione e dal ritiro dell'introduttore che guida il dispositivo.

In entrambi i casi non si procede alla rimozione della valvola aortica nativa, che viene utilizzata come base sulla quale inserire la protesi biologica [12].

In fase operatoria, prima di introdurre il catetere con la valvola da impiantare viene seguita una procedura valvuloplastica aortica con pallone, atta a fornire un passaggio di diametro maggiore necessario per l'inserimento dell'intero dispositivo [13].

Esistono tre modalità di approccio percutaneo alla valvola aortica: l'approccio anterogrado trans-settale, l'approccio retrogrado e l'approccio trans-apicale.

L'approccio anterogrado è così denominato perché il catetere su cui è montata la valvola è diretto al cuore attraverso il sistema venoso, quindi segue il verso del flusso sanguigno. Questo approccio prevede l'inserimento della valvola attraverso la vena femorale mediante un introduttore e, successivamente, l'esecuzione di una puntura trans-settale, il passaggio della protesi mediante l'utilizzo di una guida di supporto rigida, nell'atrio di sinistra, attraverso la valvola mitralica, e infine attraverso quella stenotica nativa, con l'esternalizzazione finale della guida dall'arteria femorale controlaterale. La puntura trans-settale costituisce uno svantaggio, con possibili danni permanenti o temporanei della valvola mitrale che deve essere attraversata dal catetere, inoltre la metodologia è piuttosto complessa, ed è stata quasi del tutto abbandonata.

L'approccio considerato attualmente di prima scelta per la maggior parte dei pazienti è l'approccio retrogrado, così denominato poiché il catetere viene spinto fino al cuore attraverso il sistema arterioso, in verso opposto a quello del flusso sanguigno. Questa tecnica prevede l'inserimento di introduttori di calibro crescente nell'arteria femorale, o, in alternativa, nell'arteria succlavia o ascellare previo isolamento chirurgico delle stesse [14]. Quest'approccio permette di evitare le complicanze funzionali o meccaniche sul lembo anteriore della valvola mitrale, inoltre non è necessaria una puntura trans-settale ed è tecnicamente più semplice. Lo svantaggio principale consiste nella possibilità di lesioni dei vasi aorto-femorali, e a potenziali danni della protesi nell'attraversamento dell'arco aortico e/o della valvola stenotica stessa [15].

L'approccio trans-apicale è riservato ai pazienti per i quali l'intervento retrogrado è controindicato; in questo caso si procede all'esposizione dell'apice cardiaco mediante minitoracotomia antero-laterale e si esegue un'incisione a livello dell'apice cardiaco; viene poi inserito un introduttore emostatico e successivamente introduttori di calibro crescente. La valvola è posizionata secondo l'approccio anterogrado, all'interno della valvola stenotica e, al termine della procedura, il ventricolo sinistro viene suturato chirurgicamente [14]. Il vantaggio principale è quello di garantire un accesso più diretto alla valvola aortica ed elimina il bisogno di accessi periferici di grandi dimensioni; lo svantaggio è collegato, invece, alla puntura apicale del ventricolo sinistro ed alla necessità di anestesia generale [15].

Ponendo a confronto le performance emodinamiche di valvole percutanee con quelle delle valvole tradizionali, esse risultano maggiori nelle valvole percutanee. Sia dopo l'intervento che con il passare degli anni.

Sempre maggiore, risulta l'indesiderato effetto del rigurgito subito dopo l'intervento.

Tutt'ora non è possibile considerare accettabile il trattamento percutaneo come sostituto a quello chirurgico.

I limiti principali allo stato attuale, risiedono nella scarsa accessibilità periferica, scarsa durata temporale, difficoltà di posizionamento e elevato rischio di migrazione della valvola che a differenza delle altre tecniche non viene suturata al tessuto naturale.

I metodi d'impianto percutanei disponibili dovranno quindi essere valutati nell'arco dei prossimi anni, per valutarne la sicurezza, la fattibilità ed efficacia a distanza. Attualmente il campo di applicazione di questi dispositivi è limitato ai soggetti con rischio chirurgico molto elevato, e quindi etichettati come "inoperabili".

E' da sottolineare il fatto che una procedura chirurgica molto meno invasiva come quella offerta da questi sistemi, potrebbe determinare un cambiamento sostanziale nelle indicazioni al trattamento di alcune malattie valvolari.

1.4 Valvole cardiache ingegnerizzate

Nella pratica clinica, ad oggi non si utilizzano tessuti viventi nell'ambito della cura delle valvulopatie e la terapia chirurgica, nella maggior parte dei casi, comporta la sostituzione valvolare con protesi meccaniche o biologiche non vitali.

Questi impianti non sono in grado di crescere, riparare e rimodellarsi secondo le condizioni fisiologiche del paziente.

La mancanza di vitalità, soprattutto in ambito pediatrico, porta il paziente a frequenti interventi chirurgici a cuore aperto aumentando drasticamente il tasso di mortalità.

L'1% dei neonati presenta un difetto congenito che colpisce la valvola aortica e che richiede la sostituzione.

L'ingegneria tessutale cerca di raggiungere l'obiettivo di creare un sostituto valvolare innovativo, privo dei limiti delle precedenti protesi, in modo da poter rendere la sostituzione valvolare una procedura risolutiva, che non necessita di successivi interventi.

Le tecniche dell'ingegneria tessutale *in vitro* prevedono i seguenti fondamentali passaggi [3]:

1. la creazione del supporto o *scaffold* su cui far crescere le cellule;
2. il prelievo delle cellule dal paziente e la preparazione della coltura cellulare per la semina su supporto;
3. la semina delle cellule sullo *scaffold* e la loro incubazione in bioreattore;
4. l'intervento chirurgico di sostituzione valvolare con la valvola ingegnerizzata.

Il successo delle protesi valvolari ingegnerizzate dipende, quindi, fundamentalmente da 3 fattori [16]:

1. dallo *scaffold*: matrice extracellulare che determina la forma tridimensionale della protesi. Lo *scaffold* serve come iniziale struttura guida per l'adesione cellulare e lo sviluppo tissutale e, dopo l'impianto, dovrebbe essere riassorbito e/o rimodellato;
2. dal tipo di cellule che vanno a ripopolare lo *scaffold* e che generano un tessuto vitale;
3. dalle condizioni della *coltura in vitro* del costrutto vitale, prima dell'impianto nel ricevente.

Nel 1962 furono formulate da un pioniere della cardiocirurgia, il Dr Dwight Harken [17] le caratteristiche essenziali di una protesi ideale, che furono poi estese alle valvole ingegnerizzate:

1. la valvola ingegnerizzata deve avere proprietà meccaniche e *performance* emodinamica comparabili a quelle della valvola nativa;
2. deve essere costituita di un tessuto vitale: capace di sostenere l'adesione, la proliferazione e la differenziazione delle cellule del ricevente;

3. deve essere capace di rimodellamento, per consentire la riparazione dei danni strutturali;
4. deve adattarsi alla crescita somatica del paziente ricevente;
5. deve poter resistere alle infezioni;
6. non deve andare incontro a calcificazione e degenerazione, in modo da durare per tutta la vita del paziente;
7. non deve scatenare reazioni infiammatorie o immunologiche;
8. non deve essere trombogena;
9. deve essere disponibile commercialmente.

La ricerca si sta muovendo proprio per trovare delle tecniche innovative in grado di dar vita ad un costrutto con le caratteristiche sopra riportate.

1.4.1 Tipologie di matrici per valvole cardiache ingegnerizzate

Gli *scaffold* utilizzati dall'ingegneria tessutale sono di tre tipi:

- sintetici;
- biologici;
- ibridi;

Gli *scaffold* di tipo sintetico sono costituiti di polimeri biodegradabili e biorisorbibili che, terminata la fase di crescita tessutale *in vitro* e/o *in vivo*, continuano il loro processo di degradazione, permettendo la crescita di una matrice extracellulare indistinguibile da quella nativa.

Partendo da una matrice completamente sintetica, a fine degradazione, avremo un organo o tessuto completamente biologico.

I primi materiali utilizzati per la costruzione di supporti sintetici sono stati l'acido poliglicolico (PGA), l'acido polilattico (PLA) e i loro copolimeri, ma vi è una continua ricerca di nuovi materiali e combinazioni di materiali per migliorare le caratteristiche biologiche e di *processing*. Infatti, oggi il PGA e il PLA sono stati abbandonati perché troppo rigidi e non adatti alla crescita cellulare *in vitro* [18], e sono stati sostituiti con materiali come il poliidrossialcanoato (PHA) e il poli-4-idrossibutirrato (P4HB). La combinazione di PGA, non intrecciato, e di P4HB, di rivestimento, conferisce allo *scaffold* termo-plasticità e consente di modellarlo in complesse forme tridimensionali, come una valvola cardiaca a tre lembi. Il PHA, infine, è un polimero termoplastico che deriva da un batterio. È un materiale flessibile ma richiede uno speciale processo di lisciviazione salina per ottenere una porosità accettabile per la semina cellulare [19]. Il vantaggio dei supporti sintetici è rappresentato dalla possibilità di variare non solo le loro caratteristiche di biodegradabilità, biorisorbibilità ma anche le caratteristiche biomeccaniche, agendo sulla composizione chimica e sulla lavorazione. Inoltre possono essere funzionalizzati con

specifici segnali molecolari in grado di migliorare e incrementare adesione e proliferazione cellulare [3], e presentano minore tendenza a evocare risposte immunogene. Gli svantaggi principali consistono nella difficoltà della costruzione del supporto nella forma tridimensionale corretta che sia stabile, resistente e flessibile; inoltre i polimeri presentano spesso un'elevata trombogenicità e una scarsa adesione e proliferazione cellulare, e nella loro degradazione possono generare sostanze tossiche per l'organismo.

Gli *scaffold* di tipo biologico possono essere di origine umana (allogenica) o animale (eterogenica).

Questa matrice tridimensionale può essere utilizzata direttamente come *patch* chirurgico o per la costruzione di valvole ingegnerizzate o per la semina *in vitro* con cellule autologhe per produrre un costrutto tessutale vitale. Tra le matrici più promettenti c'è il pericardio: ideale è quello di origine umana, poiché l'organismo ricevente lo riconosce come “*self*” e non attiva la risposta immunitaria, ma la disponibilità di pericardio umano è molto limitata, per cui attualmente, il pericardio maggiormente utilizzato per la costruzione di valvole ingegnerizzate biologiche è il pericardio bovino.

La matrice extracellulare che li compone presenta naturali siti di adesione cellulare, e contiene fattori per la crescita e le informazioni ottimali per lo sviluppo cellulare.

Anche se decellularizzati, gli *scaffold* biologici, presentano un certo rischio di scatenare una risposta immunogenica da parte del paziente.

Le loro proprietà meccaniche non sono eccellenti data la decellularizzazione e studi recenti hanno messo in luce una certa difficoltà alla penetrazione cellulare della matrice, con conseguente crescita tessutale incompleta [20].

L'approccio all'utilizzo di *scaffold* decellularizzati è da preferirsi a quello di *scaffold* artificiali, viste le migliori prestazioni dei primi rispetto ai secondi. La strada più promettente, attualmente, risulta essere quella dell'impianto di matrici seminate e precondizionate *in vitro*, in quanto è stata constatata una forte risposta immunogenica dopo l'impianto di valvole decellularizzate e non ripopolate che ha portato alla completa degenerazione dei tessuti con conseguente morte dei pazienti [21].

Gli *scaffold* ibridi si basano sull'idea di rivestire con un sottile strato di polimero biodegradabile una valvola porcina decellularizzata [22] per migliorarne le caratteristiche meccaniche e biologiche. E' stato dimostrato che il tessuto ibrido è rapidamente assimilato dall'organismo una volta impiantato. Inoltre, il rivestimento polimerico attenua l'attività pro-coagulativa delle componenti della matrice extracellulare. E' ancora materia di dibattito se queste protesi debbano, o meno essere seminate *in vitro* prima dell'impianto. Per passare all'applicazione clinica sull'uomo, sono necessari studi più approfonditi a lungo termine [3].

1.4.2 Biomolecole per valvole cardiache ingegnerizzate

Una nuova frontiera dell'ingegneria tessutale propone l'utilizzo di peptidi auto-assemblanti come *scaffold* per la crescita cellulare.

In diversi campi si sta sfruttando la loro capacità di organizzarsi in strutture ordinate mediante la creazione di legami idrogeno, ionici, interazioni idrofobiche e forze di Van der Waals. I peptidi sono infatti in grado di assemblarsi in strutture bi- o tri- dimensionali promuovendo le interazioni cellula-*scaffold* e cellula-cellula.

La classe dei peptidi auto-assemblanti è stata suddivisa negli anni '90 da Zhang [23] in cinque tipologie principali:

- Tipo I, o “Lego molecolari”: formano degli idrogel che possono essere utilizzati nella creazione di *scaffold*;
- Tipo II, o “interruttori molecolari”;
- Tipo III: “uncini molecolari” e “velcro molecolari”, sono peptidi utilizzati nei trattamenti superficiali;
- Tipo IV: gruppo a cui appartengono i nano tubi peptidici e le “capsule molecolari” per il trasporto di geni e proteine;
- Tipo V: “cavità molecolari” per la biomineralizzazione [24].

I peptidi auto-assemblanti sintetici possono essere ottenuti per frammentazione di proteine naturali oppure per sintesi chimica. In ogni caso queste molecole possono aggregare spontaneamente in soluzione fisiologica in fogli di β -sheet caratterizzati da un lato idrofilico e da un lato idrofobico.

L'auto-assemblamento è legato sia alla natura intrinseca dei singoli amminoacidi, sia alla loro posizione nella sequenza (*pattern*). È, quindi, possibile ottenere una determinata struttura secondaria scegliendo e predisponendo opportunamente gli amminoacidi in sequenza.

I peptidi per auto-aggregare devono possedere due caratteristiche: la complementarietà (ossia la ripetizione di una particolare distribuzione di carica all'interno della sequenza) e la compatibilità strutturale.

1.4.2.1 I peptidi auto-assemblanti ionico complementari di Tipo I

I peptidi ionico-complementari di Tipo I, utilizzati in questa tesi, rispondono sia all'esigenza di complementarietà, sia alla compatibilità; essendo caratterizzati dall'alternanza di residui positivi e negativi.

I peptidi appartenenti a questa classe assumono generalmente, in differenti solventi, una struttura secondaria di tipo β -sheet, dove ciascun piano di β -sheet ha una faccia a carattere

ionico con catene laterali cariche positivamente e negativamente e una faccia idrofobica. Grazie ad interazioni sia di carattere ionico sia idrofobico, i numerosi piani di β -sheet possono assemblare in strutture tridimensionali (Figura 1.9).

Il processo di auto-assemblaggio dipende da diversi fattori: la sequenza peptidica, la concentrazione, il pH, la presenza di sali e il tempo.

Anche il tipo di sale utilizzato sembra avere un ruolo importante nel processo di auto-assemblaggio. L'ordine di efficacia nell'induzione della formazione di membrane è: $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+$.

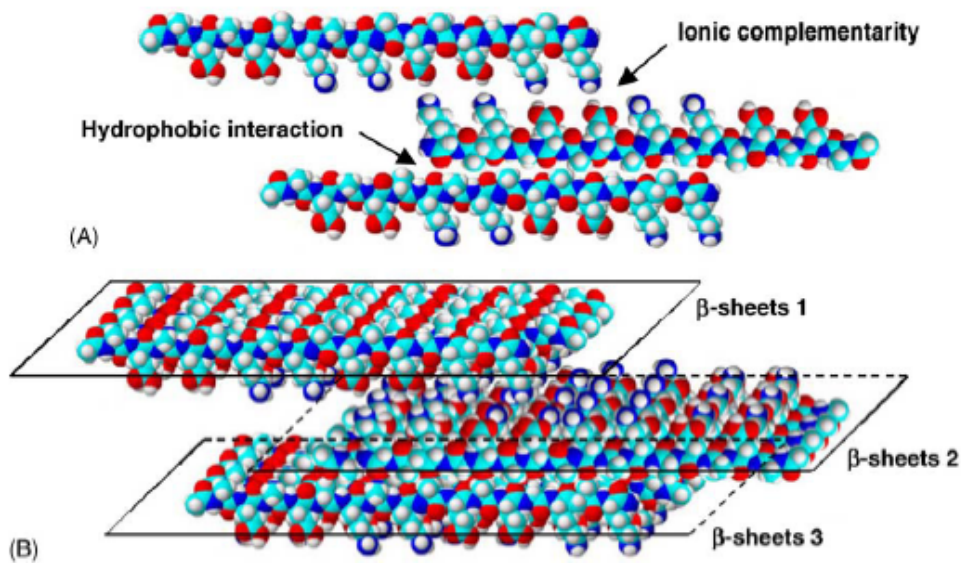


Figura 1.9 (A) Schema di auto-assemblaggio del peptide autoassemblante EAK 16-II attraverso interazioni idrofobiche e ionico-complementari. (B) Modello proposto per l'auto-assemblaggio del peptide EAK 16-II tramite aggregati basati sui β -sheet. In aggiunta ai legami idrogeno, le interazioni idrofobiche ed elettrostatiche aiutano a stabilizzare i β -sheet.

1.4.2.2 Il peptide EAK

Il peptide EAK (AEAEAKAKAEAEAKAK), composto da foglietti β che auto-assemblano in membrane, completamente atossiche, a seguito dell'aggiunta di sali in soluzione (più precisamente ioni monovalenti positivi), rappresenta il primo membro della classe di peptidi di Tipo I.

Recentemente, sono stati progettati una serie di peptidi auto-assemblanti ionico complementari "modificati", con lo scopo di studiare l'abilità dei differenti residui amminoacidici di indurre le strutture β -sheet e conseguentemente di formare matrici tridimensionali in presenza di sali [25].

Le modifiche proposte non hanno intaccato il *pattern* tipico dei peptidi auto-assemblanti, mantenendo inalterata l'alternanza di residui polari e apolari e la periodicità dei residui carichi.

Peptidi auto-assemblanti hanno trovato applicazione in diversi campi clinici: come substrati per la crescita dei neuriti e la formazione di sinapsi [26, 27]; quali promotori di nanofibre iniettabili per microambienti intramiocardici per cellule endoteliali [28]; come *scaffold* per lo sviluppo e la riparazione di cartilagine [29]; come riempitivi del tessuto osseo.

1.4.3 Utilizzo del pericardio come biomateriale

Il pericardio è una membrana sierosa (tonaca) dalla forma complessa che avvolge il cuore e la parte più prossimale della maggior parte dei grandi vasi a lui adiacenti.

Il tessuto pericardico è utilizzato ampiamente sia in ambiente chirurgico sia in ambiente sperimentale; può essere di origine umana (scarsa disponibilità) o animale (bovino, porcino, ovino, equino).

Gli ambiti dove è maggiormente richiesto sono: la neurochirurgia, la tracheoplastica, la chirurgia maxillo-facciale, la chirurgia oftalmica, ecc. anche se il campo dove è massimo il suo impiego è quello cardiocirurgico.

Il pericardio bovino è il materiale di eccellenza per la costruzione dei lembi di bioprotesi valvolari cardiache (tradizionali e percutanee). Tali valvole biologiche sono costruite *ex-novo* utilizzando alcune porzioni di pericardio scelte e selezionate da zone specifiche del tessuto intero. Queste zone devono presentare un alto grado di uniformità di orientamento e distribuzione delle fibre di collagene e uno spessore tissutale costante [30].

Il pericardio è stato considerato a lungo un materiale di qualità inferiore rispetto ai lembi valvolari porcini per la costruzione delle bioprotesi, tuttavia, le protesi in pericardio bovino hanno dimostrato una maggiore apertura dei lembi, più completa e simmetrica, con conseguenti vantaggi emodinamici. Inoltre, la maggiore percentuale di collagene presente nel tessuto pericardico, favorirebbe una maggiore durata della valvola stessa [31].

Nella parte sperimentale di questa tesi è stato oggetto di studio il tessuto pericardico bovino.

Dall'animale sono stati prelevati, a scopo di studio, alcuni campioni da zone differenti del pericardio decellularizzato: in base alla zona di appartenenza variano, infatti le caratteristiche fisiche del tessuto.

Dopo decellularizzazione, infatti, la zona del pericardio bovino del ventricolo anteriore sinistro (VAS) presenta un orientamento più definito delle fibre collagene, mentre il ventricolo posteriore destro (VPD) quella con andamento più eterogeneo delle fibre collagene. Infine, il ventricolo anteriore destro e il ventricolo posteriore sinistro

conservano, dopo la decellularizzazione, un andamento delle fibre di collagene intermedio a quello delle due aree precedenti [32].

1.5 Adesione e proliferazione cellulare

Passo fondamentale per la realizzazione di tessuti ingegnerizzati è l'attivazione di tutti i processi di adesione e proliferazione cellulare sullo *scaffold*.

Quest'aspetto cruciale permette la piena realizzazione della struttura e del suo mantenimento allo scopo di ottenere il corretto funzionamento del tessuto che andrà a svilupparsi sull'impianto.

Di rilevante importanza è l'adesione cellulare poiché essa è strettamente legata alla crescita, alla migrazione e alla differenziazione delle cellule. Molte di queste sono ancoraggio-dipendenti, cioè non interagiscono e non esprimono le loro funzioni fino a quando non abbiano aderito al supporto.

Diverse sono le proteine che favoriscono l'adesione svolgendo la funzione di mediatori, ognuna specifica della zona in cui agisce.

Per la matrice extracellulare abbiamo fibronectina, collagene, laminina, vitronectina.

Queste proteine sono in grado di legarsi e quindi comunicare solo con specifici ricettori, in grado di generare i segnali caratteristici per l'adesione e la proliferazione cellulare. Entrambi i processi sono fondamentali per la genesi di tessuto sano [3] e per l'attivazione dei meccanismi d'interazione e riconoscimento cellula-cellula e cellula-matrice.

La proliferazione cellulare è strettamente dipendente dal processo di adesione, ed è altrettanto fondamentale alla fine della crescita di nuovi tessuti.

1.5.1 Le sequenze adesive

Alcune integrine di membrana hanno la capacità di riconoscere solo brevi sequenze peptidiche, come la sequenza Arg-Gly-Asp (RGD), presente anche nella struttura primaria delle fibronectine della matrice extracellulare.

In Figura 1.10 viene riportato schematicamente il legame integrina-fibronectina attraverso il riconoscimento della sequenza adesiva RGD.

L'utilizzo clinico di proteine native biologicamente attive è ostacolato dal fatto che generalmente sono instabili, insolubili e costose. Per ovviare questi problemi attualmente è possibile utilizzare la tecnica denominata *peptide mimicry*, nella quale si utilizzano peptidi biomimetici contenenti le sequenze segnale della proteina nativa.

Diversi studi hanno provato che l'adesione cellulare su *scaffold* (sintetici e biologici) viene incrementata grazie alla presenza di peptidi RGD: catene di amminoacidi di lunghezza differente, a partire da semplici tripeptidi, caratterizzate dalla presenza nella loro struttura

della sequenza Arginina-Glicina-Acido Aspartico. Questa sequenza è molto utilizzata per promuovere l'adesione di cellule ancoraggio-dipendenti influenzandone sia il comportamento, sia la sopravvivenza.

L'attività del tripeptide è legata inoltre al blocco del terminale carbossilico o alla presenza di amminoacidi che fiancheggiano la sequenza.

L'attività varia come segue: GRGDSP > RGDS > RGD amide-terminale > RGD carbossi-terminale (inattivo).

1.5.2 I fattori di crescita

I fattori di crescita sono proteine che si legano a specifici recettori della membrana cellulare allo scopo di attivare ben determinate funzioni cellulari tra le quali: differenziazione, proliferazione e crescita [3]. Esistono differenti tipologie di fattori di crescita ed hanno funzioni differenti, che possono coinvolgere più tipi cellulari, oppure essere specifiche.

Nel panorama attuale della ricerca nell'ambito dell'ingegneria tissutale applicata alle valvole cardiache, occupa un ruolo di rilievo lo studio dell'attività che i fattori di crescita svolgono, sia *in vitro* che *in vivo*, una volta applicati direttamente sul tessuto oppure sullo *scaffold*.

Si utilizzano principalmente due fattori di crescita, l'IGF-1 e l'IGF-2, proteine che stimolano le attività cellulari di crescita e proliferazione.

1.5.3 La decellularizzazione

La decellularizzazione è una tecnica mediante la quale tutti i fattori immunogenici, proteine, carboidrati e acidi nucleici delle cellule vengono eliminati senza causare alterazioni rilevanti alle proprietà strutturali ed emodinamiche del tessuto. Dopo la decellularizzazione, la valvola si riduce a matrice extracellulare. Nell'ambito della *Tissue Engineering*, il tessuto acellulare ottenuto viene ripopolato dalle cellule dell'organismo ricevente, con una maturazione direttamente *in vivo* mediante le cellule autologhe circolanti e residenti, oppure con la semina di cellule accresciute *in vitro*, l'incubazione in un bioreattore e la successiva maturazione definitiva *in vivo*; la matrice totalmente ripopolata risulterebbe così "invisibile" al sistema immunitario dell'ospite, poiché sarebbe circondata da cellule endoteliali riconosciute come *self* ed, eventualmente, rimodellata.

Le gravi problematiche intrinseche al trapianto dall'animale all'uomo, quali il rigetto iperacuto dello *xenografts* e la possibile trasmissione di agenti patogeni, verrebbero in questo modo evitate.[36]

1.5.4 Calcificazione e fissazione

La durata limitata delle bioprotesi valvolari è il principale fattore che influenza negativamente la scelta di questi innesti negli interventi di sostituzione. Come già accennato in precedenza, al fine di ridurre i rischi di rigetto e degenerazione in vivo, le strutture vengono fissate con una particolare sostanza chimica: la glutaraldeide.

Il fissaggio della valvola in glutaraldeide è anche una delle prime cause di calcificazione del tessuto biologico; ma al momento non esistono altri metodi di fissaggio efficaci. Quindi dopo il fissaggio, per prevenire conseguenti calcificazioni, viene effettuata l'estrazione della glutaraldeide residua, seguita poi da un processo di detossicazione. In seguito, per una migliore protezione del materiale biologico, vengono applicati diversi trattamenti anticalcificanti. Diversi sono i requisiti affinché un trattamento anticalcificante risulti efficace, tra questi: una inibizione effettiva e prolungata della calcificazione, una adeguata performance della valvola in termini di emodinamica e di curabilità, l'assenza di infiammazione a livello locale e sistemico, l'assenza di interazioni sangue-superficie (emolisi, adesione delle piastrine), l'assenza di tossicità e di potenziale infezione. [39]

1.6 Scopo della tesi

Lo studio effettuato in questo lavoro di tesi s'inserisce all'interno della ricerca di sostituti innovativi di valvole cardiache. Le valvole biologiche *xenograft* attualmente impiegate, decellularizzate e fissate con glutaraldeide, hanno una durata media di dieci anni dovuta alla loro calcificazione provocata dal trattamento chimico e probabilmente anche da una detersione non accurata. Né questi sostituti né le valvole *homograft* criopreservate sono in grado di promuovere la ricolonizzazione delle matrici, evento che permetterebbe una durata maggiore dell'impianto e la capacità della valvola di modificarsi durante la crescita nel paziente pediatrico.

Per promuovere la capacità *self-seeding*, i sostituti valvolari di prossima generazione dovranno probabilmente evitare il fissaggio con glutaraldeide, operare una decellularizzazione migliore e promuovere la ricolonizzazione da parte delle cellule del ricevente. In questo lavoro sperimentale è stata valutata la possibilità di trattare il tessuto pericardico bovino, non fissato con glutaraldeide, con i peptidi auto-assemblanti allo scopo di incrementare l'adesione e la proliferazione cellulari non solo superficiali ma anche all'interno dello *scaffold* tridimensionale costituito dalla matrice decellularizzata. Infatti, è stato ampiamente dimostrato che questi peptidi formano idrogeli molto graditi alle cellule di tipi differenti e sono inoltre molto utili come *carrier* per il rilascio di biomolecole attive.

In questo lavoro specifico ci siamo occupati di determinare la quantità di peptide auto-assemblante e del peptide scelto come controllo che rimane all'interno del pericardio decellularizzato.

Capitolo 2

Materiali e metodi

Lo svolgimento della parte sperimentale in questo progetto di tesi ha comportato l'utilizzo di reagenti chimici e strumentazione di laboratorio. Nel seguente capitolo, in primo luogo verranno elencati i principali reagenti e gli strumenti utilizzati; poi, verranno brevemente descritte le diverse metodologie adoperate.

2.1 Materiali

2.1.1 Reagenti

Reagenti forniti da Sigma-Aldrich (Steinheim-Germania):

- Acetone;
- Acetonitrile;
- Acido acetico;
- N,N-dimetilformammide (DMF);
- Metanolo;
- Pirossidal-5-fosfato (PLP);
- Acido cloridrico (HCl);
- Trietilsilano (TES);
- Idrossido di Sodio;
- Soluzione tampone fosfato (PBS);
- Benzamidina;
- Iodoacetamide;
- Phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF);
- N-ethylmaleimide (NEM);
- Colato;
- Sodio azide;
- Anidride fosforica;
- Benzonasi;
- Percoll;
- Fenilisotiocianato;

Reagenti forniti da Carlo Erba (Milano, Italia):

- Metanolo;
- Sodio fosfato monobasico.

2.1.2 Peptidi per il trattamento del pericardio bovino

I tessuti biologici sono stati trattati con due differenti peptidi denominati: EAbuK e SDF, dei quali viene riportata la sequenza ed il peso molecolare. I seguenti peptidi erano già stati sintetizzati e purificati in laboratorio e risultavano quindi disponibili.

2.1.2.1 EAbuK (carbossi terminale)

Questo peptide appartiene alla classe dei peptidi auto-assemblanti di Tipo 1, ha un peso molecolare pari a 1728,33 Da, e presenta la sequenza amminoacidica di seguito riportata:

H-Abu-Glu-Abu-Glu-Abu-Lys-Abu-Lys-Abu-Glu-Abu-Glu-Abu-Lys-Abu-Lys-OH

Questo peptide è stato utilizzato per la condensazione con 5(6)-carbossitetrametilrodamina al terminale amminico.

2.1.2.2 EAbuK (ammide terminale)

Il peptide, la cui sequenza viene sotto riportata, appartiene sempre alla classe dei peptidi auto-assemblanti di Tipo 1, ed ha un peso molecolare di 1728,01 Da e la seguente sequenza:

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

2.1.2.3 Δ 5SDF1 β T

Il seguente peptide non appartiene alla classe dei peptidi auto-assemblanti, ha un peso molecolare pari a 2225,70 Da, e ha sequenza:

H-Lys-Trp-Ile-Gln-Glu-Tyr-Leu-Glu-Lys-Ala-Leu-Asn-Lys-Arg-Phe-Lys-Met-OH

Il peptide riproduce il frammento (56-72) della chemochina SDF-1 β umana (3-72). Per motivi di chiarezza verrà in seguito denominato SDF.

2.1.3 Strumentazione di laboratorio

Per lo sviluppo della parte sperimentale di questo lavoro di tesi si sono utilizzate diverse apparecchiature di laboratorio chimico.

2.1.3.1 Spettrometro di massa

Per la caratterizzazione ed identificazione dei peptidi utilizzati nella tesi, si sono effettuate diverse analisi di massa.

Le analisi di massa sono state eseguite presso il Dipartimento di Scienze del Farmaco dell'Università di Padova dal Prof. D. Dalzoppo. Lo strumento utilizzato è un ESI-TOF, modello Mariner System 5220 fornito dalla ditta Applied Biosystem (Perkin-Elmer).

Per le analisi di massa effettuate dal Dott. G. Picariello all'Istituto delle Scienze dell'Alimentazione del CNR ad Avellino, è stato utilizzato lo strumento MALDI-TOF, modello Voyager DE-Pro (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA).

2.1.3.2 Cromatografia

Per la separazione, purificazione ed analisi di peptidi si sono utilizzati due sistemi cromatografici:

- HPLC Waters 600E System Controller, munito di autocampionatore modello 717 e di rivelatore UV/Vis multicanale a lunghezza d'onda programmabile modello 2487. L'acquisizione e l'integrazione dei dati sono state eseguite dal programma Empower (Waters, Milford, MA, U.S.A.);
- HPLC Waters 600E Controller, munito di rivelatore UV/Vis multicanale a lunghezza d'onda programmabile modello 2487. L'acquisizione dei dati è stata eseguita tramite un registratore distribuito dalla Carlo Erba Strumentazione e prodotto dalla Kipp & Zonen (Delft, Olanda) modello BD40/BD41 Recorder.

Nell'analisi cromatografica si sono utilizzate colonne costituite da gel di silice funzionalizzata con catene idrocarburiche lineari di atomi di carbonio (fase stazionaria apolare), con differenti caratteristiche:

- Delta-Pak C₁₈ semipreparativa (15 µm, 100 Å, 7,8 × 300 mm) fornita da Waters;
- Colonna Zorbax C₁₈ semipreparativa (5 µm, 100 Å, 9,4 × 250 mm) fornita da Agilent (Santa Clara, California);
- Colonna Symmetry Shield C₈ analitica (5 µm, 60 Å, 4,6 × 250 mm) fornita da Waters;

- Colonna Vydac C₁₈ 218TP54 Protein&Peptide analitica (5 μm, 300 Å, 4,6 × 250 mm) fornita da Grace (Columbia, MD, U.S.A.).

Nelle analisi cromatografiche si sono utilizzati due eluenti:

- Eluente A: 0,05% di TFA in acqua MilliQ;
- Eluente B: 0,05% di TFA in acetonitrile.

L'acqua MilliQ utilizzata per le analisi è stata bi-distillata con il distillatore della ditta Cecchinato (Mestre, Italia), de-salificata, e privata dei componenti organici grazie al sistema MilliQ della ditta Waters.

2.1.3.3 Strumentazione per analisi biologiche

Per analizzare le matrici di pericardio mediante epifluorescenza è stato utilizzato il Microscopio ad Fluorescenza “Leica DC 300F” (Leica microsystem, Milano, Italia).

Per le misurazioni di massa è stata utilizzata una bilancia analitica (Sartorius mechatronics, Goettingen, Germania).

2.2 Metodi

2.2.1 Purificazione e caratterizzazione cromatografica

La purificazione mediante separazione dei peptidi desiderati dai prodotti secondari di reazione si è ottenuta attraverso la tecnica cromatografica *Reverse Phase – High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC). Questa tecnica è nata come tecnica preparativa ma si è affermata poi anche come tecnica analitica, ed è adatta alla separazione di specie non volatili termicamente labili come i peptidi [33].

La cromatografia su fase inversa è una cromatografia di ripartizione in cui la fase stazionaria ha caratteristiche apolari, mentre come fase mobile si possono utilizzare miscele, composte da soluzioni acquose e solventi organici.

L'interazione che permette la ritenzione dei peptidi nella fase stazionaria è di tipo idrofobico. La cromatografia può essere eseguita in modalità isocratica o in gradiente. In quest'ultimo caso, un aumento graduale della concentrazione di solvente organico rispetto all'acqua incrementa l'idrofobicità della fase mobile e determina la competizione tra questa e la fase stazionaria, con conseguente deassorbimento dell'analita a una data percentuale di solvente organico e successiva eluizione.

Generalmente, i peptidi si separano meglio in ambiente acido, conseguentemente la maggior parte delle fasi mobili contiene basse concentrazioni di acido TFA (0,05% nel caso degli eluenti usati durante il lavoro di tesi) il quale agisce come coppia ionica,

aumentando la ritenzione, favorendo la solubilità dei peptidi e riducendo le interazioni elettrostatiche di questi con gli eventuali residui silanolici presenti sulla fase stazionaria. In questo lavoro di tesi le analisi si sono effettuate utilizzando come eluenti 0,05% di TFA in H₂O MilliQ (Eluente A) e 0,05% di TFA in acetonitrile (Eluente B) opportunamente degasati con elio. La soluzione contenente il campione viene introdotta in testa alla colonna cromatografica tramite aspirazione nel caso di purificazione cromatografica, o per iniezione di piccolissime quantità di analita per scopi analitici. Viene riportato lo schema di funzionamento dell'analisi cromatografica (figura 2.1).

La cromatografia preparativa si riferisce al processo di isolamento di un composto presente in una miscela.

L'obiettivo della cromatografia analitica, è invece caratterizzare il campione in esame, cioè giungere alla sua identificazione, e alla quantificazione del suo grado di purezza.

Note le condizioni cromatografiche (colonna, fase mobile e gradiente), il tempo di ritenzione in colonna costituisce un dato strettamente correlabile all'identità della sostanza. Inoltre, poiché l'area sottesa dal picco della sostanza è direttamente proporzionale alla quantità di campione contenuto nella miscela totale, tramite l'integrazione del tracciato cromatografico è possibile quantificare il grado di omogeneità del prodotto raggiunto dopo purificazione.

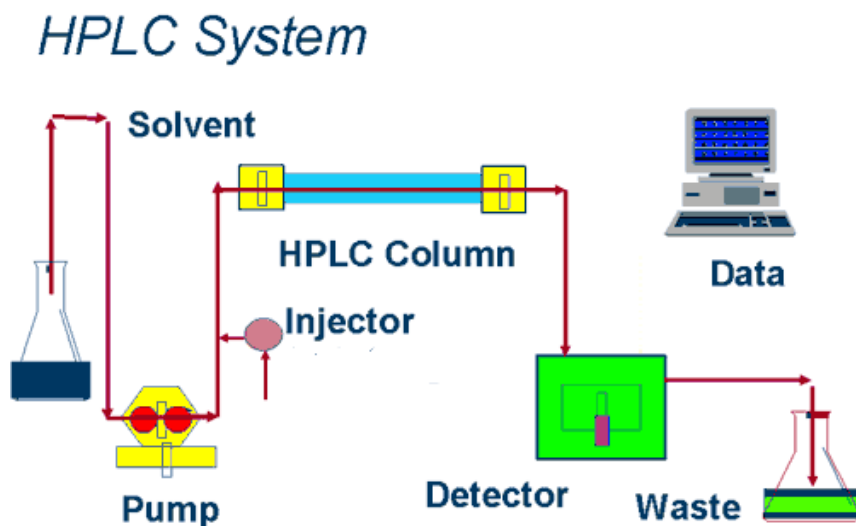


Figura 2.1 Schema di funzionamento di un cromatografo liquido.

2.2.2 Analisi amminoacidica

Per identificare gli amminoacidi presenti in una proteina o in un peptide è necessario per prima cosa idrolizzare tutti i legami peptidici, in modo da ottenere gli amminoacidi liberi; poi si procede con la loro separazione, identificazione e quantificazione.

Il metodo più utilizzato per idrolizzare completamente un peptide è l'idrolisi condotta in ambiente acido per HCl 6 N, a 110°C, per 24 ore; tali condizioni estreme di reazione, causano però la distruzione parziale (Ser e Thr), o totale (Trp) di alcuni amminoacidi, e la deaminazione di Asn e Gln che vengono dosate insieme ai corrispondenti acidi Asp e Glu. In alternativa è possibile anche condurre un'idrolisi basica per NaOH 2 M, a 100°C, tecnica che permette di preservare il Trp, ma che porta alla distruzione di Arg, Cys, Ser e Thr. In generale, la tecnica più utilizzata è l'idrolisi acida, in quanto distrugge meno amminoacidi e permette di ottenere risultati più affidabili.

Gli amminoacidi liberi presenti nell'idrolizzato devono essere derivatizzati con reagenti che ne permettano il riconoscimento; a tale scopo è possibile scegliere tra due diverse metodologie:

- La derivatizzazione post-colonna. Gli amminoacidi presenti nell'idrolizzato vengono separati tramite cromatografia a scambio ionico. L'interno delle colonne è in genere costituito da polistireni solfonati (S03), cioè scambiatori cationici forti. Tutti gli amminoacidi presentano una certa affinità per la resina anionica, grazie al gruppo amminico e/o ai gruppi ionizzabili presenti in catena laterale; il tempo di ritenzione, infatti, viene maggiormente determinato dalla loro carica netta. In genere viene fissato come condizione iniziale un pH acido (es: pH 2), sia per la solubilizzazione degli amminoacidi, sia per il condizionamento della colonna. L'eluizione viene, infatti, condotta in gradiente aumentando la forza ionica e il pH attraverso l'uso di soluzioni tampone. Gli amminoacidi, per primi quelli acidi, poi i neutri e infine i basici, vengono rilasciati dalla resina in scambio con i cationi inorganici del tampone (Na⁺) ed eluiti separatamente. Le frazioni raccolte vengono analizzate dopo reazione a 100°C con ninidrina, che porta alla formazione di specie rilevabili spettrofotometricamente. L'assorbanza di ciascun picco registrato è proporzionale alla concentrazione dell'amminoacido;
- La derivatizzazione pre-colonna. Una volta ottenuti gli amminoacidi liberi per idrolisi del peptide, si effettua la loro derivatizzazione; i reagenti più comuni sono il fluorenilmetilossicarbonil-cloruro (FMOC-Cl) e il fenilisotiocianato (PITC) (Figura 2.2).

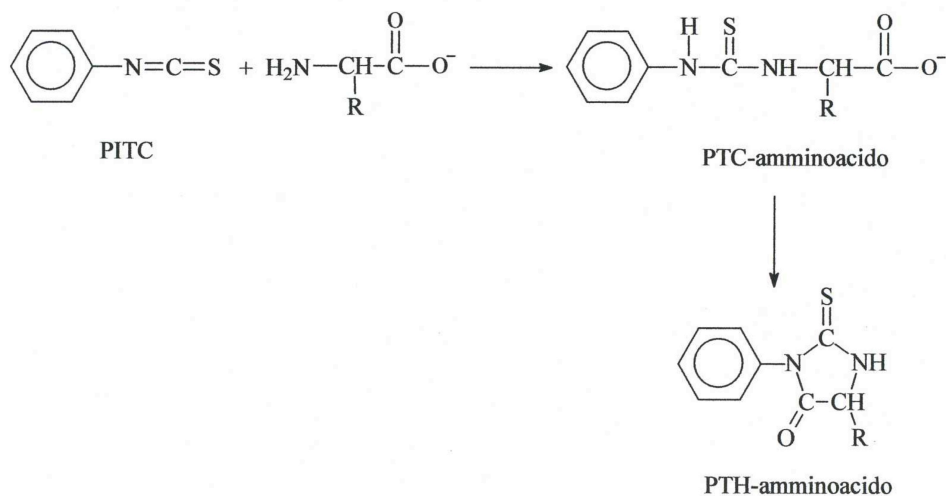


Figura 2.2 Reazione tra PITC ed un amminoacido generico.

Gli amminoacidi derivatizzati sono rilevabili per via spettrofotometrica e possono essere facilmente separati tramite HPLC in fase inversa. Rispetto alla derivatizzazione post-colonna, questa tecnica risulta più veloce, e permette la determinazione di tutti gli amminoacidi inclusa la prolina.

2.2.3 Spettrometria di massa

Le analisi di massa di peptidi/proteine utilizzati in questo lavoro di tesi, sono state eseguite con uno strumento ESI-TOF ed uno strumento MALDI-TOF. La spettrometria di massa (MS) è un metodo di analisi distruttivo, che consente di misurare le masse molecolari e di determinare la formula di struttura di composti incogniti, anche avendo quantità estremamente esigue.

Lo spettrometro è formato essenzialmente da tre parti:

1. camera di ionizzazione o sorgente;
2. analizzatore;
3. rivelatore;

Il campione viene ionizzato in un'apposita camera di ionizzazione per impatto con un fascio di elettroni, atomi, ioni o fotoni, secondo la tecnica di ionizzazione utilizzata. Alcune tecniche di ionizzazione sono molto potenti, operano ad alta energia e portano ad una frammentazione spinta (tecniche *hard*), altre invece operano a bassa energia producendo un numero inferiore di ioni (tecniche *soft*).

Le tecniche di ionizzazione si dividono in base al tipo di sorgente utilizzata.

- Lo strumento ESI-TOF utilizza una tecnica di ionizzazione nota come *ElectroSpray Ionization* (ESI) [34] che permette una ionizzazione del campione a temperatura ambiente e la formazione di specie multicarica, e con un analizzatore di tipo TOF (*time of flight* = a tempo di volo) che seleziona gli ioni in base al loro rapporto m/z (massa/carica) e al tempo che essi impiegano per percorrere l'analizzatore. L'analizzatore TOF può misurare valori di massa anche estremamente elevati con un'alta sensibilità. Un rivelatore infine, acquisisce il flusso di ioni e trasforma la corrente in un segnale che può essere amplificato, inviato a un computer e poi processato dal software "Data Explorer TM". La tecnica di ionizzazione ESI (*ElectroSpray Ionization*) [34] utilizza un gas inerte (es. azoto) per favorire il processo di nebulizzazione che viene provocato da una forte differenza di potenziale applicata all'ago metallico dell'iniettore il quale rilascia le goccioline cariche di soluzione (analita e solvente). L'ESI ha due caratteristiche essenziali: che la ionizzazione avviene a pressione atmosferica e che sulla specie molecolare si può depositare una carica multipla. Questo processo avviene in soluzione (acquosa e organica) che viene poi nebulizzata in una camera termostata, ad 80°C in genere, in cui è applicato un campo elettrico.
- Nella tecnica di ionizzazione MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) [35] il campione è immerso in un largo eccesso di matrice e bombardato da un fascio laser invece che da un fascio di atomi accelerati. L'energia del laser è sufficiente per formare ioni quasimolecolari MH^+ ma si possono anche formare cluster analita-matrice protonati o addotti con eventuali cationi presenti nella matrice. Il laser colpisce le molecole di matrice che, assorbendo la luce ultravioletta, passano a uno stato eccitato e provocano un veloce riscaldamento della regione interessata; si ottiene così l'espulsione di aggregati di analita solvatato dalle molecole di matrice e una desolvatazione con conseguente trasferimento di un protone (reazione acido-base tra le molecole di analita e della matrice).

La rielaborazione dei segnali in uscita dal rivelatore fornisce uno spettro di massa: cioè una serie di picchi d'intensità variabile la cui posizione corrisponde ad un determinato valore di m/z mentre sull'asse delle ordinate sono riportati i valori di abbondanza relativa degli ioni analizzati. Le intensità dei picchi sono espresse in percentuali del picco più intenso, il cosiddetto "picco base", cui si assegna arbitrariamente il valore di 100. Il potere risolutivo ($PR = m/\Delta m$), o risoluzione, dà una misura di quanto sensibile a differenze di massa è lo strumento utilizzato e dipende direttamente dalla massa del campione analizzato.

2.2.4 Spettroscopia di assorbimento UV/Vis

La radiazione UV/Vis copre un'ampia parte dello spettro elettromagnetico tra i 700 e i 10 nm; ma, generalmente le parti più utilizzate a scopi analitici sono il visibile (700-400 nm) e l'UV vicino (400-200 nm) [36].

Il principio su cui si basa la spettroscopia UV/Vis è quello di eccitare attraverso una radiazione gli elettroni che si trovano nei livelli energetici di una certa molecola, promuovendoli in orbitali ad energia maggiore. Affinché tale transizione abbia luogo, l'energia assorbita deve corrispondere esattamente alla differenza di energia tra i due orbitali. In un classico spettrofotometro doppio raggio UV/Vis, la radiazione policromatica generata da una sorgente (lampada a idrogeno o a deuterio per l'ultravioletto, lampada a tungsteno per il visibile) viene inviata ad un monocromatore; questo dispositivo seleziona la lunghezza d'onda d'interesse e la invia contemporaneamente ad una cella (con pareti in quarzo, trasparenti alla radiazione) contenente la soluzione con il campione e ad un'altra cella contenente il solvente. In questo modo, con l'acquisizione dei dati tramite un rivelatore ed un registratore computerizzato, si possono facilmente eliminare le bande di assorbimento del solvente, e registrare lo spettro della sostanza in esame. La legge di Lambert-Beer descrive i rapporti tra assorbanza misurata, concentrazione del campione e lunghezza del cammino ottico:

$$A = \epsilon_{\lambda} \times b \times c \quad [1]$$

dove A è la differenza tra il valore di assorbanza del campione e il valore di assorbanza della soluzione di riferimento, c è la concentrazione molare, b è il cammino ottico espresso in cm ed ϵ_{λ} [$M^{-1}cm^{-1}$] è il coefficiente di estinzione molare della sostanza a quella particolare lunghezza d'onda.

A basse concentrazioni e per valori di assorbanza comprese tra 0,1-0,8, esiste una correlazione lineare tra A e c , e l'equazione [1] può quindi essere descritta da una retta passante per l'origine in cui, per un percorso ottico di 1 cm, il coefficiente angolare corrisponde ad ϵ .

La scelta della lunghezza d'onda appropriata, viene effettuata osservando lo spettro di assorbimento della sostanza in esame. Per avere il massimo di sensibilità ci si deve collocare a λ_{max} di assorbimento; tuttavia spesso si deve tener conto anche di altri aspetti:

- ✓ la lunghezza d'onda scelta deve essere in un intervallo in cui l'assorbanza non vari eccessivamente in funzione di λ ;
- ✓ se sono presenti altre sostanze o altri gruppi in grado di assorbire a λ_{max} è preferibile scegliere una banda di assorbimento che sia riconducibile al solo composto in esame.

2.3 Matrici biologiche

In questo lavoro di tesi si sono svolti differenti esperimenti su matrici biologiche costituite da pericardi bovini decellularizzati tramite metodologia TRI-COL.

Sia la decellularizzazione dei pericardi che le misurazioni delle proprietà fisiche (massa, area, ecc.) eseguite sui dischetti di matrice dopo gli esperimenti sono stati effettuati dalla Dott.ssa Sabrina Facciolo presso il Dipartimento di Biologia “A.Vallisneri” dell’Università di Padova.

2.3.1 Decellularizzazione mediante protocollo TRI-COL

In questi esperimenti è stato applicato un metodo innovativo di decellularizzazione, denominato TRI-COL, perché prevede l’uso di due detergenti: Triton X-100 (TRI-) e colato (COL-).

In particolare, questo protocollo prevede un primo trattamento in cui il tessuto viene posto in una soluzione con inibitori di proteasi (benzamidina, iodoacetamide, PMSF, NEM); successivamente il tessuto viene lavato con soluzione ipotonica, seguito da un altro trattamento con inibitori di proteasi in presenza di Triton X-100. In seguito il tessuto viene lavato (con soluzione di Triton X-100 e NaN_3 in tampone), e poi immerso in soluzione ipertonica contenente sempre Triton X-100.

Dopo altri due lavaggi (con soluzione di Triton X-100 e NaN_3 in tampone), il pericardio viene trattato con una soluzione contenente colato di sodio. Poi, dopo due lavaggi in PBS isotonic a pH fisiologico, il pericardio viene posto in soluzione fisiologica, e successivamente in soluzione fisiologica addizionata con isopropanolo, con lo scopo di togliere i residui di colato di sodio e Triton X-100.

Per digerire gli acidi nucleici presenti, il tessuto viene poi trattato con benzonasi, ed infine conservato in PBS o soluzione fisiologica a +4°C.

2.3.2 Misurazione delle proprietà fisiche delle matrici biologiche

Al fine di valutare l’effetto della presenza dei peptidi sia auto-assemblanti che non auto-assemblanti nelle matrici di pericardio decellularizzato, dopo ogni esperimento si sono misurate le seguenti proprietà fisiche: massa, area, densità, volume, spessore e contenuto d’acqua di ciascun dischetto. Quest’ultime sono state messe a confronto con le medesime proprietà fisiche misurate da dischetti di pericardio decellularizzato non trattati con i peptidi ed utilizzati come riferimento.

Di seguito vengono riportate le procedure seguite per la misurazione delle proprietà fisiche.

Massa [g]:

I dischetti di pericardio decellularizzato, dopo il trattamento con i peptidi e i successivi lavaggi si trovano sospesi in H₂O milliQ oppure in PBS (in base al trattamento previsto dall'esperimento effettuato).

Ciascun dischetto viene asciugato su carta da filtro/assorbente, posizionato in una piastra Petri, usata come tara, e pesato con una bilancia analitica. La misura della massa è stata registrata dopo 2 minuti dal posizionamento del campione, quando il valore diveniva stabile.

Area [cm²]:

Dopo essere stati pesati, i dischetti di pericardio sono posti in una piastra Petri e coperti con un vetrino porta-oggetto per istologia, in modo da stenderli. Si è posizionato a lato dei campioni un righello professionale, in modo da avere un'unità di misura di riferimento. I campioni sono stati fotografati con macchina fotografica digitale Canon EOS50D con macro-obiettivo Canon EF 100 mm, mantenuta a distanza fissa (20 cm) dal piano fotografato. Il programma MacBiophotonics ImageJ 1.42I è stato utilizzato per tracciare il contorno di ogni dischetto di pericardio e misurarne l'area, prendendo il righello come riferimento.

Densità [g/mL]:

La densità dei dischetti è stata determinata preparando una scala di soluzioni di Percoll disciolto in PBS 10x, di diversa densità. La preparazione ha richiesto la misura della densità di un volume noto (100 mL) di PBS con concentrazione 10x:

1. si è posto un matraccio da 100 mL, chiuso con tappo, sulla bilancia analitica per effettuare la misura della tara;
2. Il matraccio è stato rimosso dalla bilancia e riempito con 100 mL PBS 10x;
3. la massa è stata registrata dopo 2 minuti;
4. la densità è stata calcolata con la seguente formula:

$$\rho = m / V \quad [2]$$

dove ρ [g/mL] è la densità della soluzione, m [g] è la massa misurata e V [mL] è il volume della soluzione, che in questo caso è di 100 mL.

Quindi, è stato calcolato il volume di Percoll da aggiungere al PBS 10x, per preparare la soluzione con densità prescelta, usando la seguente formula (come indicato dal produttore):

$$V_p = V_f(\rho_f - 0,1 \rho_{10x} - 0,9) / (\rho_p - 1) \quad [3]$$

dove: V_p [mL] è il volume di Percoll; V_f [mL] è il volume finale della soluzione; ρ_f [g/mL] è la densità finale della soluzione; ρ_{10x} [g/mL] è la densità del PBS concentrato 10 volte (10x) e ρ_p [g/mL] è la densità del Percoll pari a 1,130.

Si sono posizionati dei becker contenenti le soluzioni di Percoll di densità compresa tra 1,039 g/mL e 1,075 g/mL in ordine di densità crescente, con una differenza di 0,003 g/mL tra una soluzione e la successiva. Per ottenere una misura precisa della densità, l'esperimento è stato condotto a temperatura costante ($24^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$) mantenendo le soluzioni ben miscelate, in modo che le micro particelle di Percoll si distribuissero uniformemente. Iniziando dalla soluzione a densità minore, i dischetti sono stati immersi in successione in ciascun becker e si è osservata la fluttuazione del campione all'interno della soluzione. Si è assunto che la densità di ciascun dischetto fosse pari alla densità della soluzione nella quale il dischetto rimaneva galleggiante circa a metà del volume, senza risalire verso la superficie o depositarsi sul fondo del bicchiere.

Volume [cm³]:

Il volume di ciascun dischetto di pericardio è stato calcolato usando la seguente formula:

$$V = m / \rho \quad [4]$$

dove: V è il volume del dischetto di pericardio espresso in [cm³]; m è la massa del dischetto in [g] e ρ è la densità in [g/mL].

Spessore [cm]:

Lo spessore medio di ogni dischetto di pericardio è stato calcolato con la seguente formula:

$$s = m / (\rho \times A) \quad [5]$$

dove: s rappresenta lo spessore medio in [cm]; m è la massa del dischetto in [g]; ρ è la densità in [g/mL] e A è l'area del dischetto in [cm²].

Contenuto d'acqua [%w/w]:

I dischetti di pericardio sono stati congelati a -20°C overnight e poi a -80°C per 8 ore.

Quindi i campioni sono stati essiccati in campana da vuoto a 37°C in 2 cicli da 24 ore ciascuno in presenza di P_2O_5 .

I campioni così seccati, sono stati pesati secondo il metodo descritto in precedenza per la determinazione della massa.

Infine, il contenuto d'acqua è stato valutato attraverso la formula seguente:

$$\text{contenuto d'acqua} = 100\% - (\text{peso secco} / \text{peso idratato}) 100\% \quad [6]$$

Dove per *peso idratato* s'intende la massa del dischetto prima dell'essiccazione.

2.4 Analisi statistica

Per eseguire l'analisi statistica dei risultati ottenuti in questo lavoro di tesi, è stato utilizzato il programma di calcolo Excel, sia per collezionare i dati raccolti sia per estrapolare da essi tabelle e rette di taratura.

Per il confronto, sono state messe in relazione le medie delle rispettive classi di campioni.

In statistica se i parametri considerati sono le medie di variabili aleatorie, per avere un riscontro significativo delle eventuali differenze viene usato il test di *Student*.

In teoria delle probabilità la distribuzione di *Student*, o *t di Student*, è una distribuzione di probabilità continua che governa il rapporto tra due variabili aleatorie, la prima con distribuzione normale e la seconda il cui quadrato ha distribuzione χ^2 .

Questa distribuzione interviene nella stima della media di una popolazione che segue la distribuzione normale, e viene utilizzata negli omonimi test *t di Student* per la significatività e per ogni intervallo di confidenza della differenza tra due medie.

Tutti i test statistici di significatività assumono inizialmente la cosiddetta ipotesi zero, anche chiamata ipotesi nulla. Quando si esegue il confronto fra due o più gruppi di dati (campioni), l'ipotesi zero prevede sempre che non esista alcuna differenza tra i gruppi riguardo al parametro considerato. Se l'ipotesi nulla è valida, i campioni vengono dalla stessa popolazione.

Una decisione può quindi portare al respingimento o meno di tale l'ipotesi. La probabilità di commettere questo errore si chiama livello di significatività del test.

Questa probabilità, è chiamata *P-value* e indica il minimo livello di significatività per il quale l'ipotesi nulla è rifiutata. Ovvero l'ipotesi nulla viene rifiutata se il test fornisce un *P-value* inferiore al livello di significatività del test e viene accettata altrimenti.

Il livello di soglia generalmente viene fissato ai valori di 0.05 (5%) o di 0.01 (1%).

Per questo lavoro di tesi è stato scelto il primo valore.

Capitolo 3

Parte sperimentale

Scopo di questa tesi è l'analisi di matrici biologiche decellularizzate trattate con peptidi auto-assemblanti e non auto-assemblanti. Per quanto riguarda la quantificazione di peptide auto-assemblante e del peptide di controllo trattenuti all'interno delle matrici biologiche.

3.1 Trattamento di matrici biologiche decellularizzate

Precedenti studi hanno verificato la capacità di penetrazione del peptide auto-assemblante all'interno della matrice biologica pericardica, attraverso le fibre di collagene.

Per l'analisi e la quantificazione di peptide trattenuto, si sono utilizzati i pericardi decellularizzati tramite metodologia TRI-COL di tre bovini che si sono denominati "bovino P1", "bovino P2" e "bovino P3". Sia la decellularizzazione che la preparazione dei dischetti di pericardio sono stati effettuati dalla Dott.ssa S. Facciolo presso il laboratorio del Prof. M. Spina nel "Dipartimento di Biologia, A. Vallisneri" dell'Università di Padova. Dal pericardio di ciascun animale sono stati prelevati campioni sia dalla zona del ventricolo anteriore sinistro (VAS), dove le fibre di collagene sono ben orientate, sia dalla zona del ventricolo posteriore destro (VPD), dove le fibre di collagene sono disposte in maniera casuale e il tessuto risulta dunque anisotropo.

La scelta di utilizzare due zone differenti del pericardio bovino si è basata sulla volontà di indagare in quale modo la disposizione delle fibre di collagene della matrice extracellulare influisca sulla variazione delle sue proprietà fisiche dopo il trattamento con i peptidi.

Per l'esperimento è stato utilizzato il peptide auto-assemblante EAbuK amide-terminale (Capitolo 2, paragrafo 2.1.2.2) e, come riferimento, la sequenza peptidica SDF (Capitolo 2, paragrafo 2.1.2.3) che non appartiene alla classe dei peptidi auto-assemblanti ma è di lunghezza e peso confrontabili rispetto a EAbuK. Entrambi i peptidi erano già disponibili in laboratorio.

Sono stati trattati con il peptide auto-assemblante un totale di 12 dischetti (4 dischetti dal bovino P1, 4 dischetti dal bovino P2 e 4 dischetti dal bovino P3). Per ogni gruppo di 4 dischetti, 2 provengono dalla zona VAS e 2 dalla zona VPD dello stesso bovino.

Stessa suddivisione è stata fatta per i dischetti trattati con il peptide SDF non auto-assemblante (chiamato peptide di controllo). Avremo così altri 12 dischetti (4 dischetti dal bovino P1, 4 dischetti dal bovino P2 e 4 dischetti dal bovino P3) dove ogni gruppo di 4,

appartenente allo stesso bovino, conterrà 2 campioni prelevati dalla zona VAS e 2 dalla zona VPD.

Per un totale di 24 campioni trattati con le due sequenze peptidiche, più 12 dischetti (6 per la zona VAS e 6 per la VPD) trattati con sola H₂O MilliQ e, per 6, poi con tampone tenuti come riferimento di controllo.

Procedura sperimentale:

Si sono preparate le due soluzioni madre dei peptidi:

- Soluzione di EAbuK: è stata preparata una soluzione a concentrazione $C_{EAbuK} = 1$ mM, sciogliendo 6,57 mg (3,8 μ mol) di peptide in 3800 μ L di H₂O MilliQ;
- Soluzione di SDF: è stata preparata una soluzione a concentrazione $C_{SDF} = 1$ mM, sciogliendo 8,57 mg (3,85 μ mol) di peptide in 3850 μ L di H₂O MilliQ.

Ogni dischetto di pericardio bovino decellularizzato è stato posto in un pozzetto di una piastra da 48 pt.

Sono stati aggiunti 300 μ L di soluzione 1mM di EAbuK preparata in precedenza su 12 campioni e 300 μ L di soluzione madre 1mM di SDF sugli altri 12 campioni.

I 12 dischetti di controllo sono rimasti in H₂O MilliQ.

I campioni sono stati tenuti per 24h in soluzione peptidica a temperatura costante pari a 37°C sotto blanda agitazione. Al termine dell'incubazione, le soluzioni peptidiche residue sono state prelevate separatamente e inserite in provette numerate per le successive analisi.

Una volta tolte tutte le soluzioni contenenti i peptidi, per ogni coppia di campioni proveniente dallo stesso bovino e dalla stessa zona ventricolare, a un dischetto è stata aggiunta acqua MilliQ mentre all'altro PBS (soluzione salina tampone).

I campioni così ottenuti sono nominati come:

- P1-VAS-AUTOASSEMBLANTE-PBS
- P1-VPD-AUTOASSEMBLANTE-PBS
- P2-VAS-AUTOASSEMBLANTE-PBS
- P2-VPD-AUTOASSEMBLANTE-PBS
- P3-VAS-AUTOASSEMBLANTE-PBS
- P3-VPD-AUTOASSEMBLANTE-PBS
- P1-VAS-AUTOASSEMBLANTE-H₂O
- P1-VPD-AUTOASSEMBLANTE-H₂O
- P2-VAS-AUTOASSEMBLANTE-H₂O
- P2-VPD-AUTOASSEMBLANTE-H₂O
- P3-VAS-AUTOASSEMBLANTE-H₂O
- P3-VPD-AUTOASSEMBLANTE-H₂O

- P1-VAS-SDF-PBS
- P1-VPD-SDF-PBS
- P2-VAS-SDF-PBS
- P2-VPD-SDF-PBS
- P3-VAS-SDF-PBS
- P3-VPD-SDF-PBS
- P1-VAS-SDF-H₂O
- P1-VPD-SDF-H₂O
- P2-VAS-SDF-H₂O
- P2-VPD-SDF-H₂O
- P3-VAS-SDF-H₂O
- P3-VPD-SDF-H₂O

I campioni sono stati lasciati per 30 minuti alla temperatura di 37°C sotto blanda agitazione (lavaggio statico).

Al termine dell'incubazione sono state prelevate nuovamente le soluzioni, collezionate le successive e poste in provette numerate per analisi.

E' stato eseguito poi un secondo lavaggio, inserendo le soluzioni di acqua MilliQ e PBS nei rispettivi campioni.

Questo secondo lavaggio è stato eseguito in maniera dinamica, i campioni sono stati inseriti in centrifuga per 5 minuti, e come da procedura, si sono prelevate le soluzioni peptidiche residue in provette numerate.

Al termine, per ogni singolo campione, risultavano disponibili: la soluzione madre, la soluzione post-incubazione, la soluzione prelevata dopo il primo lavaggio (statico) e la soluzione prelevata dopo il secondo lavaggio (dinamico).

Per un totale di 72 campioni.

Per la quantificazione di peptide residuo all'interno della matrice biologica, è stata calcolata una retta di taratura per entrambi i peptidi.

Questo è stato possibile per SDF, in maniera diretta iniettando concentrazioni crescenti di peptide e quantificando le aree sottese ai picchi.

Discorso non valido per EAbuK data la sua tendenza all'auto-aggregazione. In questo caso è necessaria l'idrolisi acida dei campioni per la quantificazione degli amminoacidi componenti e risalire così alla quantificazione effettiva di peptide presente in soluzione.

3.1.1 Analisi chimico-fisiche della matrice

Al termine dell'esperimento sono state misurate le proprietà fisiche dei dischetti di pericardio trattati o con il peptide EAbuK, o con il peptide SDF o non trattati. Le proprietà

fisiche di ciascun dischetto sono state misurate dalla Dott.ssa Sabrina Facciolo presso il laboratorio del Prof. M. Spina nel “Dipartimento di Biologia, A. Vallisneri” dell’Università di Padova.

Risultati interessanti sono stati ottenuti dalla misurazione del contenuto medio percentuale di acqua trattenuta all’interno della matrice come riportato in Tabella 3.1.

Contenuto medio % (w/w) di H₂O di VAS e VPD (media±SD)		
	in H₂O	in PBS
EAbuK	93,24±1,05	84,49±1,00
SDF	91,44±1,53	82,77±1,66
CONTROLLO	75,71±2,89	79,45±1,76

Tabella 3.1 *Contenuto medio percentuale (w/w) di acqua in matrice di pericardio decellularizzata, post trattamento.*

Per una migliore e più immediata comprensione i valori ottenuti sono stati rappresentati graficamente nell’istogramma di Figura 3.1.

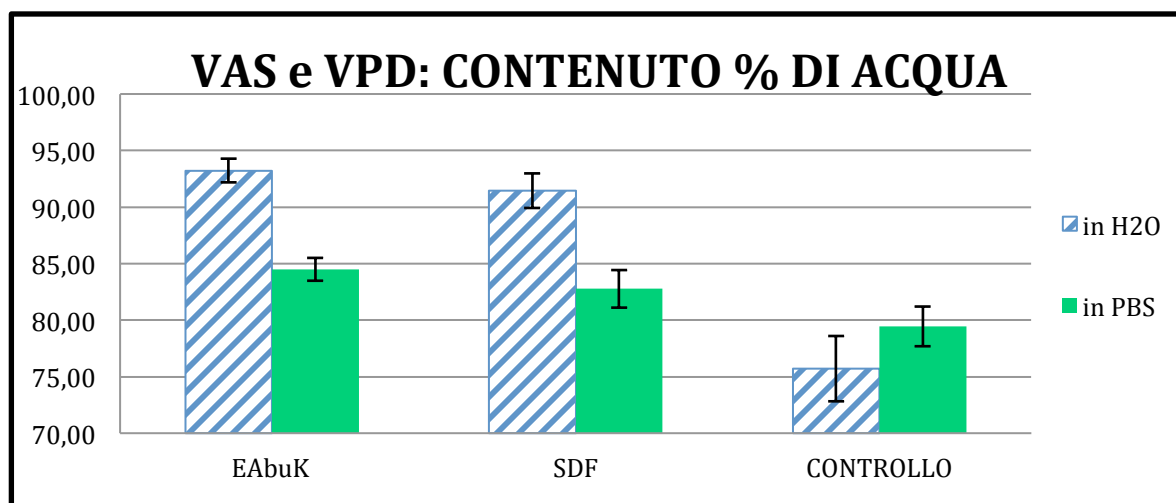


Figura 3.1 *Istogramma del contenuto medio percentuale (w/w) di acqua in matrice di pericardio decellularizzata, post trattamento.*

Dal grafico di Figura 3.1 è evidente come il trattamento della matrice con i peptidi induca un maggior contenuto d’acqua. Questo incremento è più pronunciato nel caso in cui la matrice sia stata trattata con il peptide auto-assemblante rispetto al non auto-assemblante. Per valutare la significatività dei dati ottenuti si è effettuato il test statistico *T-Student* a due code che ha restituito i valori di *P-value* riportati in Tabella 3.2.

Test T sul contenuto medio di H₂O di VAS e VPD		
	P-Value	
	in H₂O	in PBS
EAbuK vs CONTROLLO	0,000	0,001
SDF vs CONTROLLO	0,000	0,015

Tabella 3.2 Test T-Student per la significatività dei dati del contenuto medio percentuale di acqua trattenuta in matrice.

Ciascun test *T-Student* ha dato come risultato un valore di *P-Value* inferiore a 0,05, quindi si può confermare che i dati ottenuti sono significativi.

Risultati interessanti sono stati ottenuti anche dalla misurazione dello spessore medio della matrice, i dati sono riportati in Tabella 3.3.

Spessore medio di VAS e VPD (media±SD)		
	in H₂O	in PBS
EAbuK	0,17±0,01	0,08±0,01
SDF	0,14±0,01	0,08±0,00
CONTROLLO	0,06±0,00	0,06±0,01

Tabella 3.3 Spessore medio (mm) della matrice di pericardio decellularizzata, post trattamento.

Per una migliore comprensione i valori ottenuti sono stati rappresentati graficamente nell'istogramma di Figura 3.2.

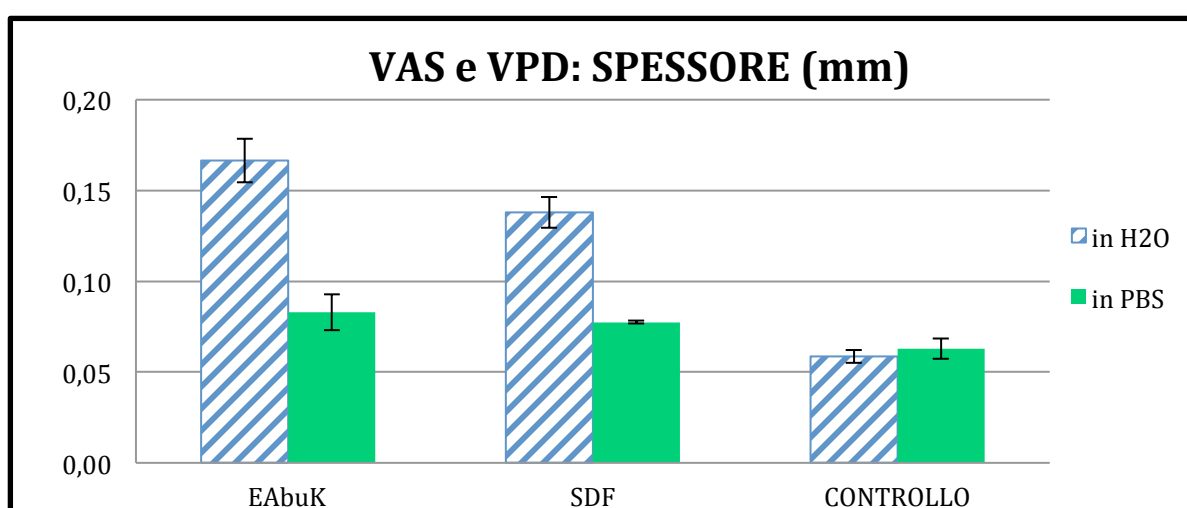


Figura 3.2 Iistogramma dello spessore medio (mm) della matrice di pericardio decellularizzata, post trattamento.

Dal grafico di Figura 3.2 è evidente come il trattamento della matrice con i peptidi comporti un incremento dello spessore. Anche in questo caso l'incremento è maggiore quando la matrice viene trattata con il peptide auto-assemblante rispetto al non auto-assemblante.

Per valutare la significatività dei dati ottenuti si è effettuato il test statistico *T-Student* a due code che ha restituito i valori di *P-value* riportati in Tabella 3.4.

Test T sullo spessore medio di VAS e VPD		
	P-Value	
	in H₂O	in PBS
EAbuK vs CONTROLLO	0,000	0,005
SDF vs CONTROLLO	0,000	0,002

Tabella 3.4 Test *T-Student* per la significatività dei dati di spessore medio della matrice.

Il test *T-Student* ha restituito valori di *P-Value* inferiori a 0,05, quindi si può confermare che i dati ottenuti sono significativi.

3.2 Quantificazione dei peptidi in matrice

3.2.1 Idrolisi peptidica

Un campione di peptide da analizzare viene innanzitutto idrolizzato come segue: 3 nmoli di peptide vengono trasferite in una provetta e vengono fatte reagire in un reattore di reazione contenente 250 μ L di HCl 6N alla temperatura di 110 °C per 24 ore. Le provette utilizzate per i campioni e il reattore di reazione vanno preventivamente lavati con una miscela di HNO₃ e H₂SO₄, sciacquati abbondantemente con acqua MilliQ.

3.2.2 Analisi amminoacidica

Nel presente lavoro di tesi è stata adottata la procedura Pico Tag, messa a punto per la Pico Tag Work Station della Waters; che prevede l'idrolisi acida del peptide, la derivatizzazione degli amminoacidi e infine, la loro separazione e quantificazione tramite RP-HPLC. Prima di procedere con l'analisi è fondamentale lavare accuratamente le provette, per i campioni e lo *standard*, e il reattore di reazione con una miscela 1:1 di HNO₃ e H₂SO₄, sciacquarle poi abbondantemente con H₂O MilliQ ed EtOH ed infine asciugarle con azoto.

Si trasferiscono quindi, ~3 nmoli di peptide da analizzare in una provetta e si sottopone tale campione ad idrolisi, a temperatura di 110°C per 24 ore, in un reattore.

Successivamente sul campione idrolizzato e, parallelamente, su 5 μ L di soluzione *standard* di aminoacidi (*ierce* 2500 mmoli/mL) si svolgono le seguenti operazioni:

1. Si portano a secco le soluzioni;
2. Si aggiungono 20 μ L, di soluzione *redry* (metanolo, H₂O MilliQ, TEA, in rapporto (v:v:v) 2:2:1);
3. Si portano a secco le soluzioni;
4. Si derivatizzano gli aminoacidi con 20 μ L, di una soluzione contenente metanolo, H₂O MilliQ, TEA, PITC in rapporto (v:v:v:v) 7:1:1:1 per 10 min. esatti;
5. Si portano a secco le soluzioni;
6. Si aggiungono 30 μ L, di metanolo e si portano nuovamente a secco i campioni;
7. Si aggiungono 400 μ L, di diluente PicoTag allo *standard* mentre per i campioni se ne impiegano 250 μ L;
8. Si sonicano i campioni per 2 min;
9. Si filtrano le soluzioni.

La metodica descritta permette di funzionalizzare ciascun residuo con il PITC ottenendo così un derivato, un PTH-amminoacido (feniltioindantoin amminoacido) (Fig. 2.2), facilmente rilevabile a 254 nm e adatto ad essere separato per via cromatografica su colonna a fase inversa.

L'integrazione dei picchi cromatografici degli standard ha permesso la formulazione di rette di taratura per ciascun feniltiocarbamilamminoacido e quindi la quantificazione del contenuto amminoacidico del campione. Questa analisi permette di quantificare la concentrazione esatta di un peptide in soluzione in quanto il valore di concentrazione calcolato a partire dalla quantità pesata di peptide non tiene conto della percentuale di acqua che rimane nel prodotto liofilizzato.

Gradiente:

L'analisi amminoacidica è stata condotta utilizzando una colonna pico Tag (3,9 x 300 mm) mantenuta a temperatura costante di 46 °C, eluenti A e B precedentemente descritti, flusso 1 mL/min e il seguente gradiente binario: 100% di A per 1 min, dallo 0% di B su A al 46% di B in 20 min, dal 46% al 100% di B in 1 min, 100% di B per 10 min; lettura dell'assorbanza a 254 nm.

3.2.3 Determinazione della retta di taratura di Abu

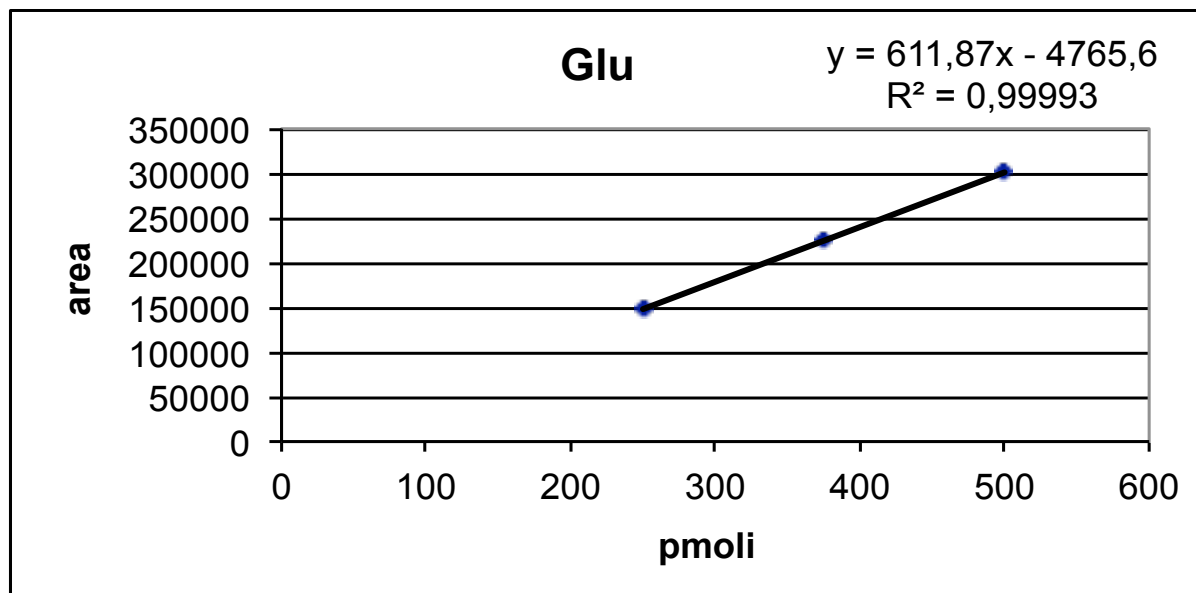
Per la determinazione della retta di taratura del peptide EAbuK non si può procedere in maniera diretta, tramite analisi RP-HPLC, proprio a causa della sua capacità di auto-aggregare che non consente la sua quantificazione diretta nelle soluzioni entrate in contatto con il pericardio.

L'idrolisi acida del peptide è stata eseguita proprio per ovviare a questo problema: una volta scisso negli amminoacidi che lo costituiscono, si può risalire alla quantità effettiva di EAbuK grazie alla quantificazione dell'acido aminobutirrico (Abu).

Si è scelto di effettuare la quantificazione del peptide rimasto nelle soluzioni post-incubazione con pericardio bovino e nelle soluzioni di lavaggio, attraverso la quantificazione dell'Abu perché, essendo questo un amminoacido non naturale, esso è presente nelle soluzioni solo come componente del peptide auto-aggregante, e non come residuo contaminante.

L'Abu non è un amminoacido naturale quindi non è stato possibile formulare la retta di taratura in maniera diretta, poiché esso non è contenuto nello *standard* fornito da *Pierce*.

L'analisi dello *standard Pierce* ha permesso il calcolo delle rette di taratura per acido glutammico (Glu) e lisina (Lys) (Figura 3.3).



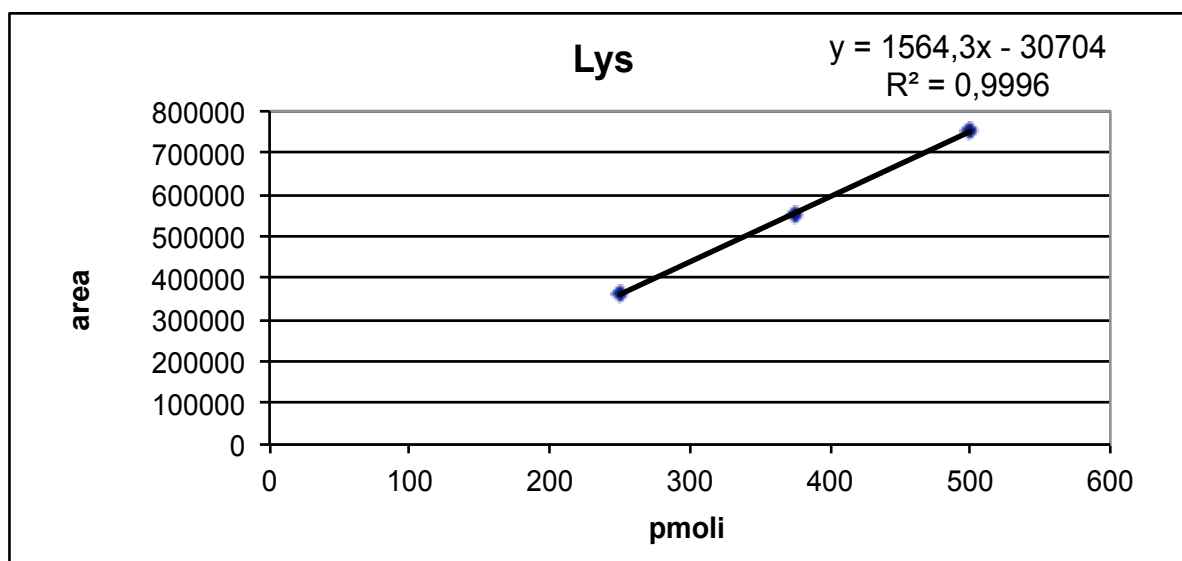


Figura 3.3 Rette di taratura ottenute per acido glutammico (Glu) e lisina (Lys).

Una soluzione di EAbuK è stata idrolizzata e derivatizzata. La concentrazione effettiva di tale soluzione è stata determinata sulla base del contenuto in Glu e Lys.

La retta di taratura per Abu è stata quindi ottenuta graficando i valori dell'area sottesa al picco di Abu contro le pmoli iniettate in HPLC-RP (Figura 3.4).

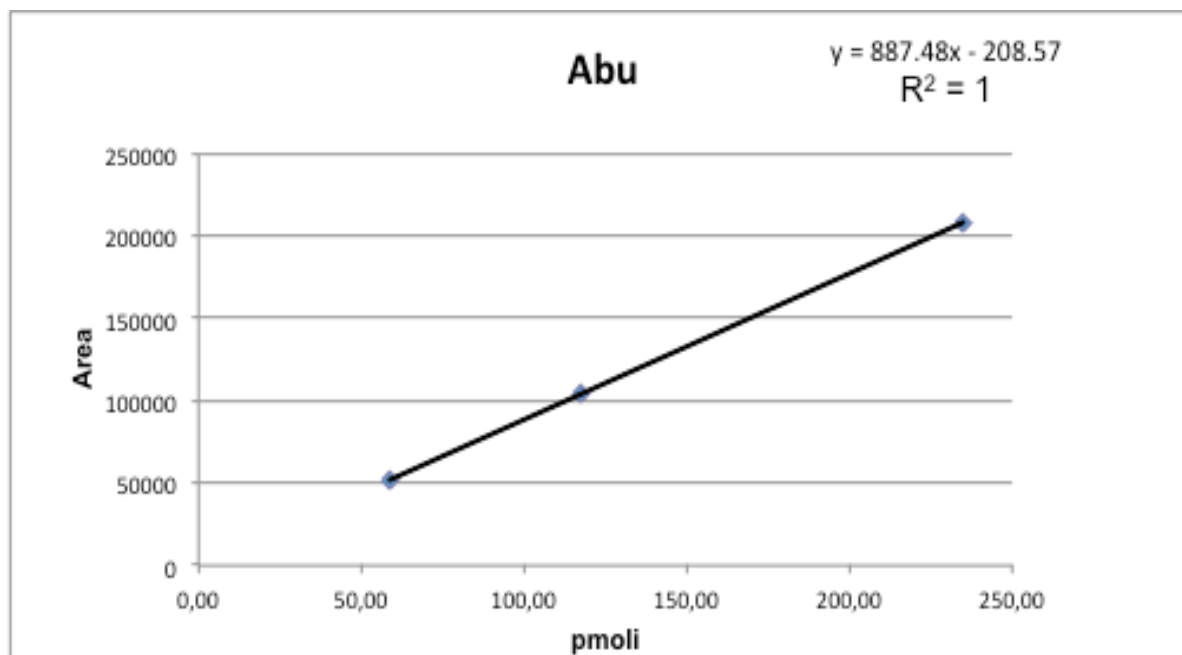


Figura 3.4 Retta di taratura per l'acido amminobutirrico (Abu).

3.2.4 Determinazione della retta di taratura di SDF

Per la determinazione della retta di taratura di SDF (Figura 3.5) si può procedere in maniera diretta inserendo in RP-HPLC volumi crescenti.

Parte sperimentale:

Si pesano 0,69 mg di peptide SDF in modo da ottenere una soluzione con concentrazione 1 mMolare.

Vengono inseriti in RP-HPLC 8 campioni con le seguenti concentrazioni crescenti:

1. Bianco con acqua MilliQ
2. 10 μL (1 nMoli)
3. 20 μL (2 nMoli)
4. 30 μL (3 nMoli)
5. 40 μL (4 nMoli)
6. 50 μL (5 nMoli)
7. 75 μL (7,5 nMoli)
8. 100 μL (10 nMoli)

- Cromatografia eseguita con le seguenti condizioni: colonna: Symmetry Shield; flusso: 1 mL/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente dal 20% al 34% di eluente B in 28 min; lettura dell'assorbanza a 214 nm.

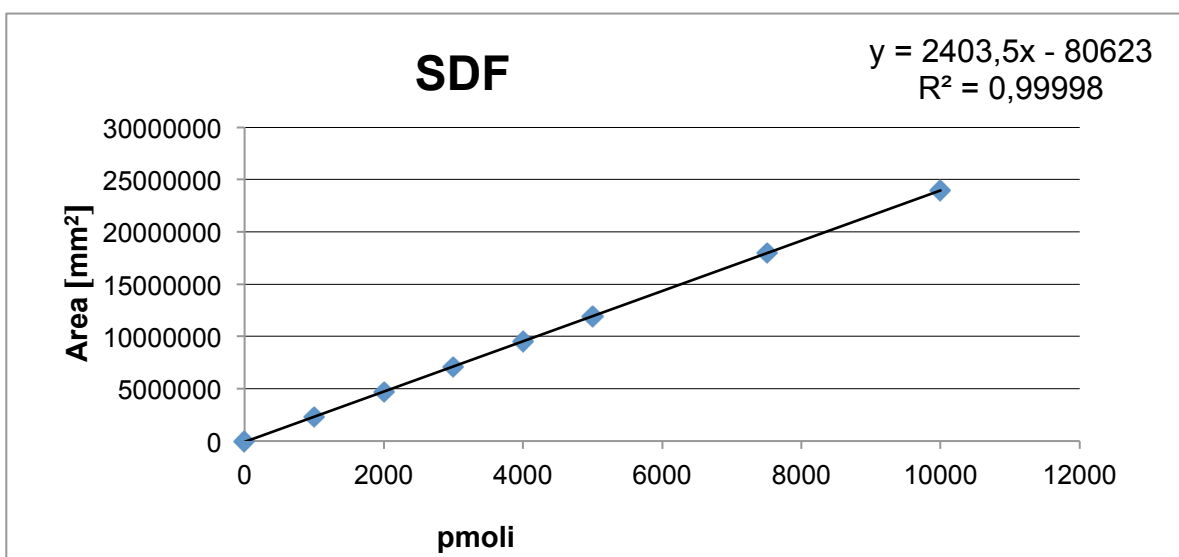


Figura 3.5 Retta di taratura per il peptide non auto-assemblante SDF.

3.3 Analisi RP-HPLC delle soluzioni residue e lavaggi

La quantità di ciascun peptide trattenuta all'interno del pericardio è stata calcolata secondo la metodologia basata sull'analisi cromatografica delle soluzioni recuperate separatamente da ciascun pozzetto post-esperimento.

3.3.1 Analisi RP-HPLC degli amminoacidi ottenuti dall'idrolisi delle soluzioni di EAbuk dopo il trattamento del pericardio bovino

Le soluzioni residue contenenti il peptide EAbuK recuperate separatamente dopo l'incubazione, sono state idrolizzate, derivatizzate e analizzate mediante cromatografia RP-HPLC. Di ciascun campione sono state eseguite 2 analisi a volume crescente, una a 10 μ L (figura 3.6) e una a 20 μ L.

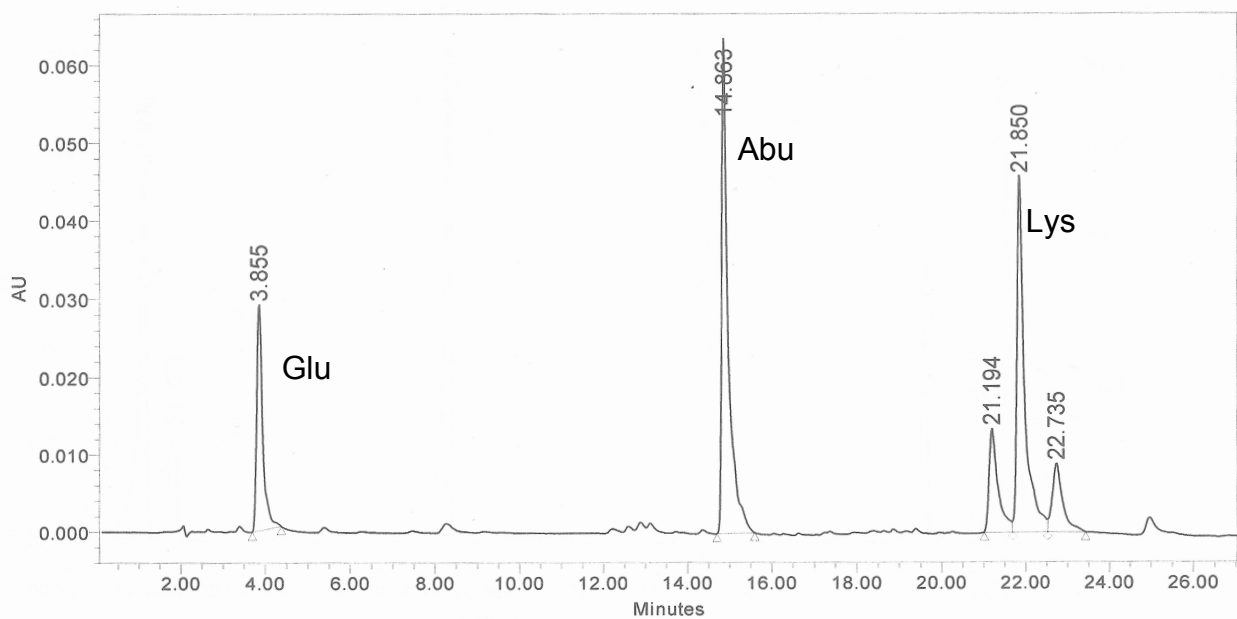


Figura 3.6 Analisi HPLC dell'idrolizzato del peptide EAbuK funzionalizzato con PTC. I tempi di ritenzione di Glu, Abu e Lys risultano rispettivamente 4, 15 e 22 minuti (soluzione post-incubazione).

Per i campioni delle soluzioni prelevate dopo il primo e il secondo lavaggio, sono state effettuate sempre 2 analisi a volumi crescenti, una a 40 μ L (figura 3.7-3.8) e una a 80 μ L.

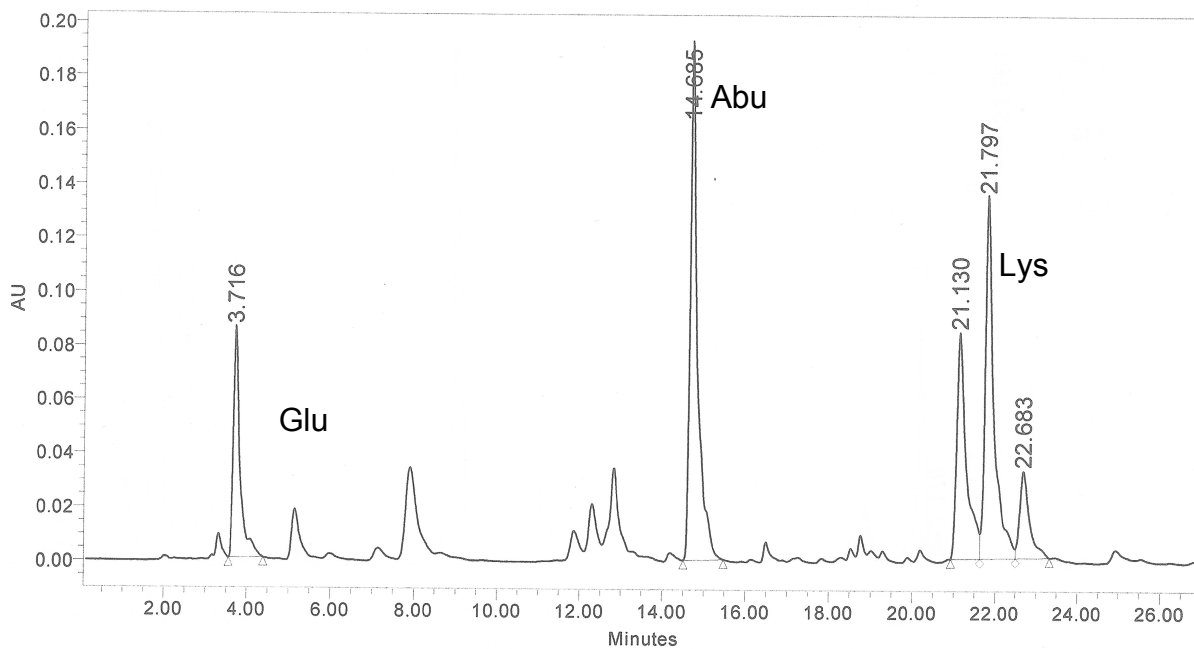


Figura 3.7 Analisi HPLC dell'idrolizzato del peptide EAbuK funzionalizzato con PTC. I tempi di ritenzione di Glu, Abu e Lys risultano rispettivamente 4, 15 e 22 minuti (soluzione primo lavaggio)

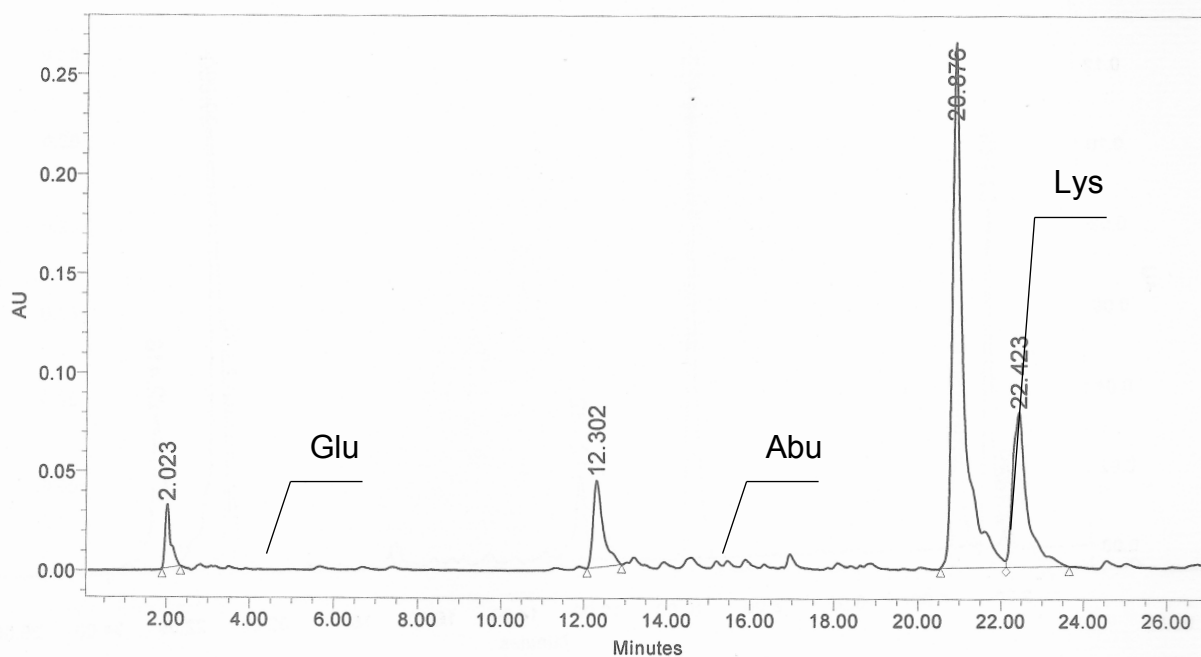


Figura 3.8 Analisi HPLC dell'idrolizzato del peptide EAbuK funzionalizzato con PTC. I tempi di ritenzione di Glu, Abu e Lys risultano rispettivamente 4, 15 e 22 minuti (soluzione secondo lavaggio)

Si possono riscontrare i picchi relativi alle aree di concentrazione di Glu, Abu e Lys per le soluzioni post esperimento e nei lavaggi successivi.

Per i secondi lavaggi effettuati in centrifuga, essendo le aree di picco nulle o non significative, possiamo concludere che non fuoriesce peptide dalla matrice.

3.3.2 Analisi RP-HPLC della soluzione di SDF dopo il trattamento del pericardio bovino

Con le soluzioni contenenti il peptide SDF recuperate post-esperimento si è proceduto in maniera differente. Sono state eseguite 5 analisi per campione a parità di volume, 10 μ L (Figura 3.9).

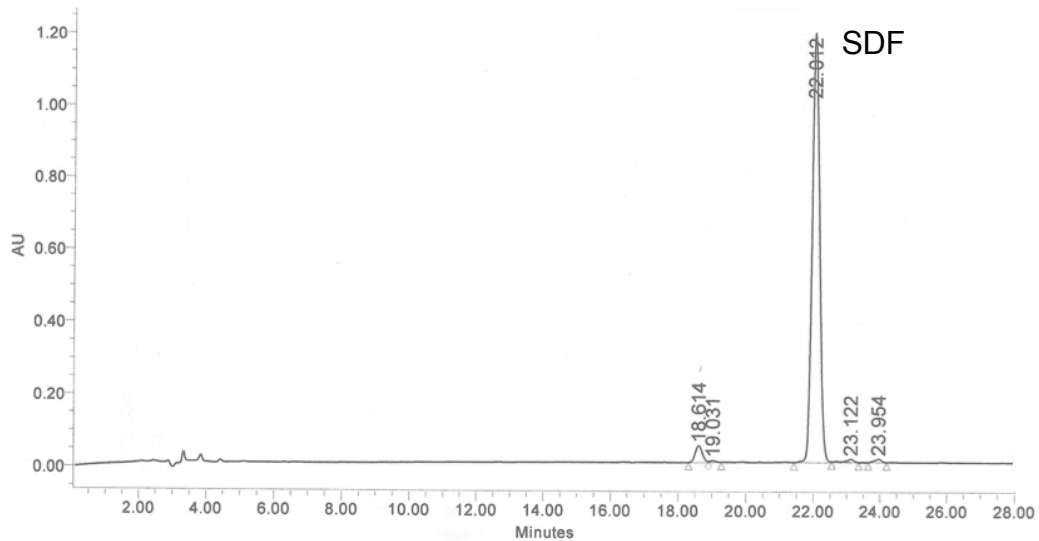


Figura 3.9 Analisi HPLC dell'idrolizzato del peptide SDF funzionalizzato con PTC. Il tempo di ritenzione di SDF risulta di 22 minuti (soluzione post-incubazione).

Per le soluzioni recuperate dal primo e secondo lavaggio, sono state effettuate 2 analisi sempre a parità di volume, 60 μ L (Figure 3.10-3.11).

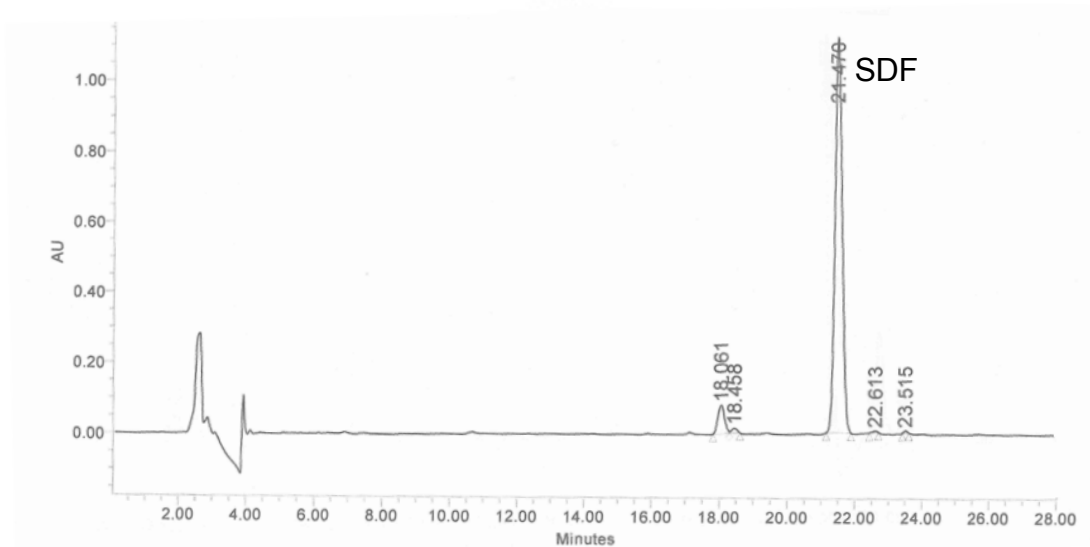


Figura 3.10 Analisi HPLC dell'idrolizzato del peptide SDF funzionalizzato con PTC. Il tempo di ritenzione di SDF risulta di 22 minuti (soluzione primo lavaggio).

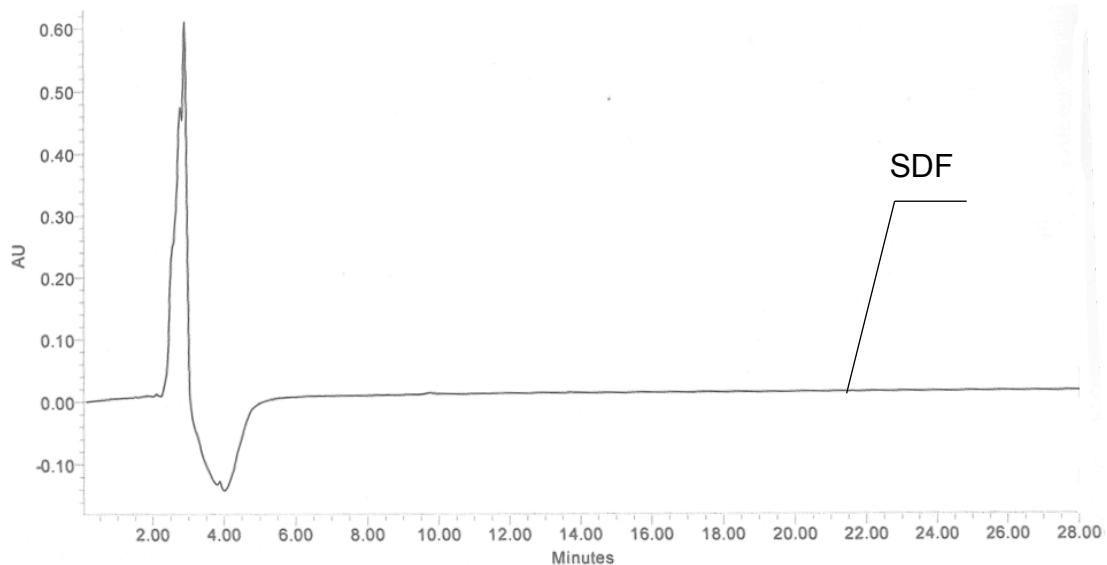


Figura 3.11 *Analisi HPLC dell'idrolizzato del peptide SDF funzionalizzato con PTC (soluzione secondo lavaggio)*

Si possono riscontrare i picchi relativi alle aree di concentrazione di SDF per le soluzioni post-esperimento e nei lavaggi successivi.

Per i secondi lavaggi effettuati in centrifuga, essendo le aree di picco nulle, possiamo concludere che non fuoriesce peptide dalla matrice.

3.3.3 Quantificazione del peptide EAbuK trattenuto dal pericardio bovino

Attraverso la misura delle aree dei picchi relativi ai residui Glu e Lys, a seconda della soluzione recuperata, si è calcolata la massa di peptide auto-assemblante rimasta nelle soluzioni post-esperimento e nei successivi lavaggi, e quindi, per differenza con la massa presente nel volume delle soluzioni madre per ciascun dischetto, si è potuto risalire alla quantità di EAbuK rimasta all'interno di ogni matrice di pericardio.

Nella soluzione madre di ogni singolo campione sono stati inseriti 0,64 mg di peptide EAbuK.

Dai grafici dei cromatogrammi delle soluzioni recuperate, attraverso il valore di picco dell'area, è stato calcolato il numero di picomoli di peptide presenti nelle rispettive soluzioni.

In tabella (Tabella 3.5) sono riportati i valori in milligrammi di peptide recuperato dalla soluzione iniziale e dai successivi lavaggi di ogni campione trattato con EAbuK.

mg EAbuK
0,640

	mg di peptide recuperato - EAbuK		
	Dalla soluzione post-incubazione	Dal primo lavaggio	Dal secondo lavaggio
N1 - VAS	0,272	0,02	0
N2 - VPD	0,275	0,04	0
N3 - VAS	0,272	0,03	0
N4 - VPD	0,243	0,06	0
N5 - VAS	0,228	0,02	0
N6 - VPD	0,302	0,07	0
N7 - VAS	0,282	0,09	0
N8 - VPD	0,213	0,18	0
N9 - VAS	0,243	0,09	0
N10 - VPD	0,350	0,13	0
N11 - VAS	0,249	0,06	0
N12 - VPD	0,282	0,03	0

Tabella 3.5 In giallo i campioni in PBS, in celeste i campioni in acqua MilliQ

E' stata poi effettuata un'analisi di differenziazione dei dati provenienti dalla regione di VAS e dalla regione VPD e una differenziazione dei dati in base al tipo di soluzione usata per l'incubazione.

I dati in tabella (Tabella 3.6) evidenziano che non ci sono significative differenze riguardanti le soluzioni utilizzate, mentre sembra influire leggermente la zona di pericardio trattata.

La parte VAS in minima percentuale riesce a trattenere con più efficacia il peptide.

	mg soluzione post-incubazione	mg primo lavaggio
Media VAS	0,258	0,03
Media VPD	0,273	0,06
Media VAS	0,258	0,08
Media VPD	0,282	0,11

Tabella 3.6 In giallo i campioni in PBS, in celeste i campioni in acqua MilliQ

I dati ottenuti risultano in accordo con la quantificazione riportata in “*Progettazione di valvole cardiache “self-seeding”: peptidi auto-aggreganti come “filler” per pericardio decellularizzato*” (A. Zamuner: Tesi di Laurea Magistrale in Ingegneria Chimica e dei Processi Industriali. Università di Padova, 2012). Tale analisi comportava l'idrolisi delle soluzioni, recuperate post-incubazione di ECM da VAS, del peptide EAbuK coniugato covalentemente con il cromoforo 5(6)-carbositetrametilrodamina (TAMRA), e la successiva quantificazione tramite lettura spettrofotometrica. Da questo lavoro si era ottenuto che la quantità di peptide auto-assemblante che rimane in matrice VAS è di 0,31 mg, molto simile ai 0,30 mg calcolati dai dati sopra riportati.

3.3.4 Quantificazione del peptide SDF trattenuto dal pericardio bovino

Attraverso la misura delle aree dei picco relativo a SDF, a seconda della soluzione recuperata, si è calcolata la massa di peptide non auto-assemblante rimasta nelle soluzioni post-esperimento e nei successivi lavaggi, e quindi, per differenza con la massa presente nel volume delle soluzioni madre per ciascun dischetto, si è potuto risalire alla quantità di SDF rimasta all'interno di ogni matrice di pericardio.

Nella soluzione madre di ogni singolo campione sono stati inseriti 0,69 mg di peptide SDF. Dai grafici dei cromatogrammi delle soluzioni recuperate, attraverso il valore di picco dell'area di concentrazione, è stato calcolato il numero di picomoli di peptide presenti nelle rispettive soluzioni. In tabella (tabella 3.7) sono riportati i valori in milligrammi di peptide recuperato dalla soluzione iniziale post-incubazione e nei successivi lavaggi di ogni campione trattato con SDF.

mg SDF
0,690

	mg di peptide recuperato - SDF		
	Dalla soluzione post-incubazione	Dal primo lavaggio	Dal secondo lavaggio
N1 - VAS	0,527	0,127	0
N2 - VPD	0,495	0,208	0
N3 - VAS	0,506	0,123	0
N4 - VPD	0,562	0,093	0
N5 - VAS	0,598	0,092	0
N6 - VPD	0,589	0,102	0
N7 - VAS	0,421	0,165	0
N8 - VPD	0,516	0,158	0
N9 - VAS	0,503	0,092	0
N10 - VPD	0,619	0,134	0
N11 - VAS	0,611	0,169	0
N12 - VPD	0,518	0,196	0

Tabella 3.7 *In giallo i campioni in PBS, in celeste i campioni in acqua MilliQ*

E' stata poi effettuata un'analisi di differenziazione dei dati provenienti dalla regione di VAS e dalla regione VPD e una differenziazione dei dati in base al tipo di soluzione usata per l'incubazione.

I dati in tabella (tabella 3.8) evidenziano che non ci sono significative differenze riguardanti le soluzioni utilizzate, e le diverse zone trattate.

	mg soluzione post-incubazione	mg primo lavaggio
Media VAS	0,544	0,11
Media VPD	0,549	0,13
Media VAS	0,512	0,14
Media VPD	0,551	0,16

Tabella 3.8 In giallo i campioni in PBS, in celeste i campioni in acqua MilliQ

I precedenti calcoli riassunti in forma percentuale sono mostrati dalle tabelle seguenti (tabella 3.9-3.10-3.11):

EAbuK	media mg di peptide recuperato dai campioni			mg di peptide iniziale	mg di peptide residuo in matrice
	sol. residua	primo lavaggio	secondo lavaggio		
PBS	0,265	0,041	0	0,640	0,333
H ₂ O	0,270	0,096	0	0,640	0,274

SDF	media mg di peptide recuperato dai campioni			mg di peptide iniziale	mg di peptide residuo in matrice
	sol. residua	primo lavaggio	secondo lavaggio		
PBS	0,546	0,135	0	0,690	0,009
H ₂ O	0,531	0,152	0	0,690	0,006

Tabella 3.9

Peptide Autoassemblante EAbuK				
% in soluzione post-esperimento		% in soluzione post 1°Lavaggio	% in soluzione post 2°Lavaggio	% in matrice
H ₂ O	42,2	15,0	0	42,9
PBS	41,5	6,4	0	52,1

Tabella 3.10

Peptide NON Autoassemblante SDF				
% in soluzione post-esperimento		% in soluzione post 1°Lavaggio	% in soluzione post 2°Lavaggio	% in matrice
H ₂ O	77,0	22,1	0	0,9
PBS	79,1	19,6	0	1,3

Tabella 3.11

Conclusioni

Questo lavoro di tesi fa parte di un progetto più ampio volto alla messa a punto di valvole cardiache “*self-seeding*” di lunga durata ed in grado di modellarsi e crescere con il paziente.

Le conclusioni di questo lavoro di tesi possono essere brevemente riassunte come segue:

- La presenza del peptide auto-assemblante all'interno della matrice (ECM) di pericardio incrementa il contenuto d'acqua della stessa;
- L'idrogel di peptide auto-assemblante determina un incremento nello spessore del pericardio.
- La disposizione delle fibre di collagene della matrice pericardica non influisce sulla permeazione del peptide al suo interno.
- Il peptide auto-assemblante viene trattenuto dalla matrice molto più del peptide di controllo non auto-assemblante.
- Il lavaggio in H₂O rimuove molto più peptide auto-assemblante rispetto al lavaggio con tampone salino.
- L'idrogel auto-assemblato sottoposto a centrifuga non viene rilasciato dalla matrice. Questo dato risulta molto importante per l'applicazione clinica investigata.

Bibliografia

1. Di Bello C.: *Biomateriali. Introduzione allo studio dei materiali per uso biomedico*. Pàtron Editore. 2004.
2. De Zanet D.: *Bioreattori per l'ingegneria tissutale della cartilagine*. Università degli studi di Padova 2009-2010.
3. Di Bello C., Bagno A.: *Interazioni tra biomateriali e tessuti*. Collana d'Ingegneria Biomedica. Pàtron editore. 2009.
4. Nanci, Wuest J.D., Peru L., Brunet P., Sharma V., Zalzal S., McKee M.D.: *Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules*. J Biomed Mater Res. 1998; 40(2): 324-335.
5. Butany J., Ahluwalia M.S., Munroe C., Fayet C., Ahn C., Blit P., Kepron C., Cusimano R.J., Leask R.L.: *Mechanical heart valve prostheses: identification and evaluation*. Cardiovascular Pathology. 2002; 12: 1-22.
6. Kouchoukos N.T.: *Aortic allografts and pulmonary autografts for replacement of the aortic valve and aortic root*. Ann Thorac Surg. 1999; 67: 1846-8.
7. Dossche K.M., de la Rivie A.B., Morshuis w.j., Schepens M.A., Defauw J.J., Ernst S.M.: *Cryopreserved Aortic Allografts for Aortic Root Reconstruction: A Single Institution's Experience*. Ann Thorac Surg. 1999; 67: 1617-22.
8. Palka P., Harrocks S., Lange A., Burstow D.J., O'Brien M.F.: *Primary aortic valve replacement with cryopreserved aortic allograft. An echocardiographic follow-up study of 570 patients*. Circulation. 2002 Jan 1; 105(1): 61-6.
9. Kerchove L., Glineur D., El Khoury G., Noirhomme P.: *Stentless valves for aortic valve replacement: where do we stand?*. Current Opinion in Cardiology. 2007; 22: 96-103.
10. Hoffmann G., Lutter G., Crème J.: *Durability of Bioprothetic Cardiac Valves*. Dtsch Arztebl int. 2008 Feb; 105(8): 143-148.
11. Thamilarasan M., Griffin B.: *Choosing the most appropriate valve operation and prothesis*. Cleve. clin. med. 2002 sep; 69(9): 688-90, 693-4, 696-8.
12. Clavel M.A., Webb J.G., Pibarot P., Altwegg L., Dumont E., Thompson C., et al: *Comparison of the hemodynamic performance of percutaneous and surgical bioprotheses for the treatment of severe aortic stenosis*. J. Am. Coll. Cardiol. 2009; 53: 1883-91.
13. Macchiarini, Jungebluth, Go, Asnaghi, Rees, Cogan, Dodson, Martorell, Bellini, Parnigotto, Dickinson, Hollander, Mantero, Conconi, Birchall: *Clinical transplantation of tissue-engineered airway*. The Lancet. 2008; 372: 2023-2030.

14. Godino C., Colombo A.: *Il trattamento percutaneo della stenosi aortica. Indicazione e limiti*. Unità di emodinamica – Ospedale San Raffaele di Milano.
15. Singh I.M., Shishehbor M.H., Christofferson R.D., Tzucu E.M., Kapadia S.R.: *Percutaneous treatment of aortic valve stenosis*. Cleve. Clin. Med. 2008 Nov; 75(11): 805-12.
16. Neuenschwander S., Hoerstrup S.P.: *Heart valve tissue engineering*. Transpl. Immunol. 2004; 12: 359-65.
17. Hacken D.F., Taylor W.J., Lefemine A.A., Lunzer S., Low H.B., Cohen M.L., Jacobeny J.A.: *Aortic valve replacement with a caged ball valve*. Am. J. Cadiol. 1962; 9: 292-299.
18. Vasely I. et al.: *Heart valve tissue engineering*. Cir. Res. 2005; 97: 743-755.
19. Flameng W. Et al.: *A new approach to heart valve tissue engineering*. International Journal of Cardiology. 2004; 95: 55-56.
20. Knight R.L., Wilcox H.E., Korossis S.A., Fischer J., Ingham E.: *The use of acellular matrices for the tissue engineering of cardiac valves*. J. Engineering on medicine. 2008; 222: 129-143.
21. Simon, Kasimir, Seebacher, Weigel, Ullrich, Salzer-Muhar, Rieder, Wolner: *Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients*. Eur. J. Cardiothorac. Surg. 2003; 23: 1002-6.
22. Nanci, Wuest J.D., Peru L., Brunet P., Sharma V., Zalzal S., McKee M.D.: *Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules*, J.Biomed.Mater.Res. 1998; 40(2): 324-335.
23. Zhang S. et al.: *Emerging biological materials through molecular self-assembly*. Biotech. Adv. 2002; 20: 321-339.
24. Turella F.: *Nano-Scaffold di polimeri naturali e sintetici per l'ingegneria tessutale: preparazione e caratterizzazione*. Laurea Specialistica in Scienza ed Ingegneria dei Materiali. Dipartimento di Ingegneria Meccanica, settore Materiali, Padova. 2008.
25. Gambaretto R., Tonin L., Di Bello C., Dettin M.: *Self-Assembling Peptides: Sequence, Secondary Structure in solution and Film Formation*. Biopolymers. 2008; 89: 906-915.
26. *User Manual*, Model 431A Peptide Synthesizer (1990) Applied Biosystem (ed.), versione 1.12.
27. Todd C. Holmes, Sonsoles de Lacalle, Xing Su, Guosong Liu, Alexander Rich, Shuguang Zhang: *Extensive neurite outgrowth and active synapse formation on self-assembling peptide scaffolds*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2000; 97: 6728-6733.
28. Schachner M.: *Neurobiology: Nervous engineering*, Nature. 2000; 405: 747-748.

29. Davis M.E., Motion M.J.P., Narmoneva D.A., Takahashi T., Hakuno D., Kamm R.D., Zhang S., Lee R.T.: *Injectable Self-Assembling Peptide Nanofibers Create Intramyocardial Microenvironments for Endothelial Cells*. *Circulation*. 2005; 111: 442-450.
30. Hiester E.D., Sacks M.S.: *Optimal bovine pericardial tissue selection sites. II. Cartographic analysis*. *J. Biomed. Mater. Res.* 1998; 39: 215-221.
31. Hiester E.D., Sacks M.S.: *Optimal bovine pericardial tissue selection sites. I. Fiber architecture and tissue thickness measurement*. *J. Biomed. Mater. Res.* 1998; 39: 207-214.
32. Manzan E.: *Valutazione di biomateriali per la creazione di scaffolds da utilizzare nell'Ingegneria Tissutale: caratterizzazione delle proprietà fisiche e degli aspetti morfo-strutturali del pericardio bovino e porcino, prima e dopo decellularizzazione*. Tesi di laurea specialistica in medicina e chirurgia. Università di Padova. 2011.
33. Stulik K., Pacakova V., Suchankova J., Claessens H.A.: *Stationary phase for peptide analysis by high performance liquid chromatography: a review*. *Analytica Chimica Acta*. 1997; 352: 1-19.
34. Siuzdak G.: *The Emergence of Mass Spectrometry in Biochemical Research*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994; 91: 11290-11297.
35. Beavis R.C., Chait B.T.: *High-Accuracy Molecular Mass Determination of Proteins Using Matrix-Assisted Laser Desorption Mass Spectrometry*. *Analytical Chemistry*,. 1990; 62: 1836-1840.
36. Cavinato C. *Metodi alternativi al trattamento con glutaraldeide nei sostituti valvolari biologici*. Unipd, 2013; 4 : 40-41.

Ringraziamenti

Ringrazio di cuore tutti quelli che hanno partecipato attivamente e passivamente alla buona realizzazione di questa tesi e tutti quelli che mi hanno accompagnato in questo percorso universitario.

Un grazie particolare va alla professoressa Monica Dettin, per la professionalità e la disponibilità con cui ha guidato questo lavoro di tesi.

Ringrazio Roberta Annj e Sabrina per avermi insegnato a muovermi in un laboratorio e per aver allietato le lunghe giornate di provette, analisi e numeri.

Grazie a Emi e Grigo, due fratelli acquisiti, quelle persone che passano con te 5 minuti e sembrano essere amici di una vita. Pronti a bastonarti nelle questioni serie e nelle risse di gruppo da divano con i cuscini che volano. Sempre pronti a una buona parola quando ce n'è stato bisogno. Sempre presenti, sempre disinteressati e pronti a dare...con un unico fine, il mio bene. Il vero 110 con la lode che porto a casa.

Grazie Chiaretta, amica e compagna di Brixen in versione studio/estiva.

Grazie alla “Compagnia del Carda”, suona un po’ come la Frodo Band ma direi che il paragone rende. Pippo, Enne, Covi, e le rispettive dolci metà (Enne? Non pervenuta!) che hanno riempito di risate e di partite a calcetto e basket le tristi giornate di studio.

Grande Carda, compagno di banco, di lezioni soporifere, di studiate matte e disperate negli orari più improponibili, di copiate strategiche, di voti di esami contestati. Quante risate che ci siamo fatti in questo grande circo che è l’UniPd. Grazie UniPd!

Grazie Julienne per le tue lezioni di moda e telefilm e per aver donato una visione femminile alla realtà delle cose.

Grazie a Babi, Cice e al gruppo tito per aver condiviso con me la puzza dell’aula studio tito livio. Grazie Capo e ai suoi scarsi Lakers per aver reso Boston una squadra migliore.

Grazie a tutti i miei nemici che hanno fatto di me una persona più forte.

Grazie ad Antonio, sempre vigile dall’alto di quella casa magnifica che si ritrova.

Grazie ai ladri di biciclette che hanno fatto in modo che viaggiassi in grande stile per le vie di Padova.

Grazie Fra...stella cometa che con la dolcezza e la pazienza hai accompagnato tutte le mie giornate! Nelle debolezze e nelle sorprese, nei miei momenti di rabbia e di ansia pre-esame. Coraggiosa nel portare avanti una storia a distanza senza garanzie ma che ha creduto in me, sempre. Grazie amore mio!

Un grazie particolare a te zio Pino, che nel mio periodo buio, fatto di ospedali e università bloccata a Roma hai saputo essere di stimolo con i tuoi interessi e con il tuo esempio. Ero piccolo ma mai ho scordato quello che hai saputo fare tra turni di lavoro e figlio piccolo

che non ti faceva dormire la notte. Tutto questo ha dato a me la forza di ricominciare in una città diversa, una realtà nuova. Quindi se in questa tesi leggo Padova e leggo laureato lo stimolo e la voglia di rimettermi in gioco sono frutto tuo...grazie!

Grazie ai miei due angeli, pilastri della mia esistenza. Le due colonne che oltre a supportarmi economicamente con grandi sacrifici hanno disteso sotto ogni mio passo un tappeto di affetto e sostegno affinché avessi sempre le migliori condizioni intorno a me. Grazie papà! Grazie mamma!

Manca solo una persona, non a caso l'ultima, l'unico affetto che è venuto a mancare da quando sono nato. Grazie nonno, quante notti ho concluso pensando a te, quanto affetto ho percepito solo sapendoti lassù. Questa tesi è per te, qualche mese e l'avremo festeggiata insieme. Non importa, ci sei ora tanto quanto prima...grazie nonno!

Perdonatemi se ho dimenticato qualcuno e la sdolcinatezza di qualche frase. Ma questo traguardo è stato frutto di un complesso percorso ed era giusto nominare tutti i partecipanti che hanno contribuito a rendere in discesa il mio futuro.

