

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI**

**“FEDERICO II”**



**FACOLTÀ DI INGEGNERIA**

**DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DEI MATERIALI  
E DELLA PRODUZIONE**

**DOTTORATO DI RICERCA IN INGEGNERIA**

**DEI MATERIALI E DELLE STRUTTURE**

**XX° CICLO**

**INGEGNERIZZAZIONE DI STENT CORONARICI  
PER IL RILASCIO CONTROLLATO DI FARMACI**

*Tutor:*

**PROF. P.A. NETTI**

*Coordinatore:*

**PROF. D. ACIERNO**

*Candidato:*

**LAURA INDOLFI**

# Indice

<i>Introduzione</i> .....	1
 <i>Capitolo 1- Stato dell'arte - Stent</i>	
1.1 - <i>Malattie cardiovascolari – Stenosi</i> .....	6
1.2 - <i>Stent</i> .....	9
1.3 - <i>In-Stent Restenosi (ISR)</i> .....	16
1.4 - <i>Stent rivestiti</i> .....	19
1.5 - <i>Limiti degli stent rivestiti</i> .....	21
1.6 - <i>Drug-Eluting Stent (DES)</i> .....	23
1.7 - <i>Limiti dei DES</i> .....	26
1.8 - <i>Modellazione Matematica</i> .....	29
 <i>Capitolo 2- Stato dell'arte – Rilascio di Farmaci</i>	
2.1 - <i>Sistemi di rilascio controllato di farmaci</i> .....	34
2.2 - <i>Biomateriali per i sistemi di rilascio</i> .....	39
2.3 - <i>Meccanismi di rilascio</i> .....	41
2.4 - <i>Microsfere come sistemi di rilascio</i> .....	43
2.5 - <i>Sistemi di rilascio nei DES</i> .....	45
 <i>Capitolo 3- Rivestimento polimerico di stent coronarici</i>	
<i>Introduzione</i> .....	51
3.1 - <i>Materiali</i>	
3.1.1- <i>Stent e acciaio 316L</i> .....	52
3.1.2- <i>Poli(2-idrossietil-metacrilato) (pHEMA)</i> .....	55
3.2 - <i>Metodi</i>	
3.2.1 - <i>Caratterizzazione dei materiali</i> .....	56
3.2.2 - <i>Tecnica di rivestimento</i> .....	61
3.2.3 - <i>Caratterizzazione del dispositivo</i> .....	66

3.2.4 - Prove di adesione .....	72
3.3 - Risultati sperimentali e discussioni	
3.3.1 - Proprietà caratteristiche del pHEMA .....	76
3.3.2 - Realizzazione del coating .....	79
3.3.3 - Caratterizzazione del coating .....	84
3.3.4 - Adesione del pHEMA .....	89
Conclusioni .....	94

## Capitolo 4- Realizzazione di uno stent multicomponente

Introduzione.....	96
4.1 - Materiali	
4.1.1 - Acido Poli(lattico-co-glicolico) (PLGA).....	98
4.1.2 - Fludara®.....	100
4.1.3 - Rhodamina.....	102
4.2 - Metodi	
4.2.1 - Realizzazione microsfera.....	103
4.2.2 - Caratterizzazione microsfera.....	105
4.2.3 - Tecnica inclusione delle microsfera nel rivestimento..	107
4.3 - Risultati e discussioni	
4.3.1 - Caratterizzazione microsfera.....	112
4.3.2 - Realizzazione del rivestimento.....	117
Conclusioni .....	131

## Capitolo 5- Rilasci dal sistema multicomponente

Introduzione.....	132
5.1 - Materiali .....	133
5.2 - Metodi	
5.2.1 - Preparazione dei campioni.....	133
5.2.2 - High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	134
5.2.3 - Studi di rilascio in vitro dalle microsfera di PLGA.....	136
5.2.4 - Studi di rilascio in vitro da lastre rivestite pHEMA.....	136

5.3 - Risultati e discussioni	
5.3.1 - Studi di rilascio in vitro dalle microsfele di PLGA.....	137
5.3.2 - Studi rilascio in vitro da sistema multicomponente....	139
Conclusioni .....	143

## Capitolo 6- Modellazione agli Elementi Finiti (FEM)

Introduzione.....	145
6.1 - Materiali	
6.1.1 - Simulatore Femlab 3.2 di COMSOL.....	146
6.2 - Metodi	
6.2.1 - Risoluzione equazione di Navier – Stokes .....	153
6.2.2 - Risoluzione equazione di convezione-diffusione .....	155
6.2.2.1 Farmaco idrofobo .....	157
6.2.2.2 Farmaco idrofilo .....	159
6.3 - Risultati e discussioni	
6.3.1 - Navier – Stokes.....	162
6.3.2 - Diffusione – Convezione.....	163
6.3.2.1 Farmaco idrofobo .....	164
6.3.2.2 Farmaco idrofilo .....	166
Conclusioni.....	170
 Conclusioni .....	 172
 Bibliografia.....	 174

# **Introduzione**

La stenosi è una delle più frequenti condizioni patologiche a carico dell'apparato cardiocircolatorio: è un restringimento dei vasi sanguigni causato da una placca aterosclerotica che si deposita sulla parete arteriosa riducendo o arrestando il flusso sanguigno al cuore.

L'angioplastica coronarica transluminale percutanea (PTCA) è una strategia interventistica che consiste nello schiacciamento della placca stenotica sulle pareti dell'arteria tramite l'introduzione ed espansione, al sito dell'occlusione, di un catetere con palloncino. Fu introdotta nel 1979 e divenne rapidamente il principale metodo di rivascularizzazione coronarica nonché la più comune procedura terapeutica utilizzata in cardiologia. Ciò nonostante, nel lungo termine, la PTCA porta spesso alla riuclusione del vaso trattato, detta: "restenosi".

La restenosi è la risposta del vaso sanguigno al danno tessutale causato dall'angioplastica ed è legata principalmente ad una proliferazione esagerata della neointima e all'elastic recoil della parete vasale.

L'elastic recoil è il ricollasso nel lume sanguigno, a causa della perdita di elasticità, della porzione di placca schiacciata sulla parete del vaso [1].

Un notevole passo in avanti nel trattamento di tale patologia ischemica è stato effettuato negli anni Novanta con l'introduzione di scaffold metallici, gli stent, capaci di dare al vaso stenotico il sostegno meccanico necessario per evitare il ricollasso. La procedura di stenting è simultanea a quella di angioplastica; il catetere, posizionato nel tratto occluso, viene espanso portando con sé lo stent che entrerà a contatto con la parete vasale schiacciando la placca e bloccandola in posizione [2]. L'introduzione nella pratica clinica di tali dispositivi ha rivoluzionato il campo della cardiologia interventistica apportando notevoli miglioramenti nella prevenzione della restenosi. Nonostante gli stent siano capaci di eliminare l'elastic recoil del vaso stenotico, però, il loro posizionamento ed il trauma della parete vasale che ne consegue innescano una proliferazione eccessiva di neointima e quindi una *in-stent restenosi* (ISR) [3].

Tale riscontro ha sviluppato un'intensa attività di ricerca per trovare soluzioni alternative che potessero migliorare la risposta clinica a tali dispositivi sulla base di applicazioni di competenze ingegneristiche e di scienza dei materiali.

Una prima reazione negativa a seguito dell'impianto di stent è dovuta all'elevata trombogenicità della maglia metallica di cui è costituito. Quindi, un primo approccio intuitivo è mirato a migliorare la biocompatibilità dell'impianto attraverso il rivestimento dello stent con materiali polimerici [4]. Sebbene tale modifica apporti miglioramenti sostanziali nella clinica interventistica, attraverso l'utilizzo di dispositivi "ibridi" capaci di combinare le proprietà di sostegno del metallo alla biocompatibilità dei polimeri, una certa percentuale di in-stent restosi è ancora presente.

Ulteriori studi nell'ambito della biologia molecolare hanno permesso di individuare che i processi che portano alla restenosi *intra-stent* sono differenti da quelli indotti dall'angioplastica. La patofisiologia ed i meccanismi alla base della ISR sono caratterizzati principalmente dalla proliferazione della neointima, dalla deposizione della matrice extracellulare e dalla risposta infiammatoria al posizionamento del dispositivo [5].

Sulla base di tali nozioni, ingegneri, biologi, biomaterialisti e cardiologi, attraverso un approccio interdisciplinare, hanno sviluppato un nuovo dispositivo combinando le proprietà di sostegno meccanico e biocompatibilità precedentemente descritte con la terapia farmacologica. Nascono così gli stent a rilascio di farmaco, o Drug-Eluting Stent (DES), che utilizzano la struttura metallica dello stent come piattaforma per il rilascio locale di farmaci capaci di prevenire e contrastare la restenosi. La corretta progettazione di un siffatto dispositivo deve tener conto di una serie di problematiche e necessità quali la scelta di una geometria ottimale della maglia metallica, l'utilizzo di un farmaco con spiccate proprietà anti-restenosi e di un rivestimento polimerico idoneo capace di rilasciare farmaci idrofili in maniera controllata. La corretta riuscita clinica del DES è altamente dipendente da ogni singolo suo componente, così come dalla loro interazione [6].

L'utilizzando di stent come veicolo per il direccionamento locale di agenti attivi ha consentito di raggiungere livelli terapeutici nel tessuto, con basso rischio di tossicità sistemica, ottenendo così una notevole efficacia della terapia farmacologica.

Attualmente solo due DES sono in utilizzo nella pratica clinica, che hanno raggiunto prestazioni sempre più elevate e conseguono risultati clinici sempre più incoraggianti. Questi complessi dispositivi possono aprire la strada al superamento della restenosi, vero tallone d'Achille della cardiologia interventistica.

Ciò nonostante, alcuni aspetti di tali dispositivi sono ancora migliorabili per amplificare il loro benefico effetto clinico.

La principale limitazione è dovuta alle cinetiche di rilascio ottenibili; entrambi i DES in commercio, infatti, possono rilasciare **un solo agente** attivo e di natura **lipofila** attraverso un meccanismo dettato dalla diffusione delle molecole nel rivestimento polimerico. Ma, come detto in precedenza, la restenosi è un processo governato da una serie di eventi, così detti a cascata, per cui idealmente si avrebbe bisogno di un approccio combinato in grado di rilasciare più agenti attivi. Recenti studi clinici [7], inoltre, hanno dimostrato l'efficacia di farmaci antitumorali nell'inibizione della restenosi; purtroppo alcuni di essi sono altamente idrofili e non possono essere rilasciati con cinetiche modulabili nel tempo dai DES attualmente disponibili.

Non va tuttavia dimenticato che, dopo essere rilasciato dal rivestimento polimerico dello stent, il farmaco diffonde nella parete arteriosa per arrivare al sito d'interesse attraverso numerosi meccanismi che sono fortemente dipendenti dalle sue caratteristiche chimico-fisiche quali carica elettrica e dimensioni. Inoltre, anche altri fattori, quali flusso sanguigno, gradiente di concentrazione e flusso convettivo, nonché la struttura e l'omogeneità della parete arteriosa, possono influenzare la farmacocinetica del principio attivo. L'azione combinata di tutti questi parametri determinerà la distribuzione spaziale e temporale del farmaco nel tessuto vasale, condizione necessaria affinché possa esplicare la sua funzione terapeutica [8].

Risulta evidente, dunque, che per la progettazione di nuovi stent cardiovascolari è importante considerare anche come tali dispositivi si comporteranno una volta posizionati *in vivo*. A causa della complessità ed eterogeneità dell'ambiente fisiologico è, però, impossibile ricavare informazioni utili attraverso studi sperimentali *in vitro*. Pertanto, sono necessari strumenti che possano predire l'effettivo comportamento dello stent a seguito dell'impianto. Un sostanziale aiuto, in tale ambito della ricerca, è apportato dai metodi computazionali in grado di simulare fenomeni complessi come quello di interesse clinico.

In tale filone si colloca questo progetto di Dottorato di Ricerca finalizzato alla realizzazione di un nuovo dispositivo cardiovascolare in grado di superare i limiti intrinseci legati agli stent a rilascio di farmaci.

Obiettivo principale di questo lavoro è la messa a punto di un sistema che possa rilasciare, in maniera controllata e prolungata nel tempo, agenti attivi di natura idrofila. Per ottenere ciò si è ricorso a sistemi più complessi di rilascio di farmaco. I DES odierni possono, infatti, considerarsi dei sistemi omogenei in cui il farmaco è uniformemente disperso nel rivestimento polimerico.

L'idea innovativa portata avanti in tale lavoro è, invece, quella di realizzare un sistema multicomponente in cui il farmaco idrofilo venga inglobato in microsferiche polimeriche biodegradabili successivamente disperse nel rivestimento. In tal modo è possibile proteggere il farmaco da un rilascio rapido rendendolo disponibile alla diffusione, attraverso la matrice del rivestimento, solo a seguito del processo di degradazione delle microsferiche, che rappresenta il meccanismo controllante il rilascio. Scegliendo opportunamente i materiali per la realizzazione di tali carrier, in base al tempo di degradazione, è possibile modulare le cinetiche di rilascio ottenibili da tali sistemi in funzione dell'applicazione preposta.

Tale approccio permette anche di superare la seconda importante limitazione degli attuali DES e cioè la monoterapia. L'utilizzo di carrier microparticellati all'interno del rivestimento apre, infatti, la strada all'ottenimento di stent che possano contenere più di un farmaco, incapsulati in diverse formulazioni di microsferiche, che saranno rilasciati simultaneamente o in sequenza, a seconda delle cinetiche di degradazione dei polimeri utilizzati. Un siffatto dispositivo permetterebbe di contrastare, in maniera decisamente più efficace, uno o più meccanismi alla base della in-stent restenosi. In prospettiva, tale stent multicomponente potrebbe essere ingegnerizzato ulteriormente onde permettere un rilascio crono-spaziale di agenti attivi disponendo i carrier sulla superficie del rivestimento in maniera da ottenere, ad esempio, il rilascio di agenti antiproliferativi nella parete arteriosa e anticoagulanti nel lume ematico.

La prima fase di questo Dottorato di Ricerca è stata incentrata, dunque, sulla realizzazione di un rivestimento polimerico capace di limitare, durante il posizionamento dello stent, il danno alla parete arteriosa, principale causa della in-stent restenosi. A tale scopo è stata ottimizzata una tecnica spray modificata con la quale si

può ottenere un rivestimento omogeneo di una superficie complessa, quale lo stent. Il materiale scelto è un idrogelo polimerico, il poli(idrossi-etil-metacrilato) *pHEMA*. Questo, grazie alla sua proprietà di idratarsi a contatto con i fluidi biologici, crea un sottile strato *soffice* sulla superficie dello stent che può ridurre/annullare il trauma durante il posizionamento. Pertanto, il *pHEMA* è stato caratterizzato in termini di adesione alla superficie metallica e persistenza a contatto con fluidi biologici per verificare che fosse capace di resistere alla procedura d'impianto.

Successivamente, si è passati alla realizzazione del sistema multicomponente precedentemente descritto. Si è scelto di utilizzare, quale farmaco idrofilo, la Fludarabina, che è un potente agente antitumorale con proprietà antirestenosi. Le microsfere sono state realizzate in acido polilattico-co-glicolico (PLGA) per le sue ben note applicazioni nell'ambito dei sistemi di rilascio, oltre che per la possibilità di modulare ed ingegnerizzare il rilascio variando parametri formulativi. Due diverse formulazioni di microsfere di PLGA contenenti Fludarabina sono state realizzate ed integrate all'interno del rivestimento di *pHEMA* per realizzare uno stent multicomponente.

Le cinetiche di rilascio da tali dispositivi sono state caratterizzate per verificare l'ottenimento di un rilascio prolungato nel tempo dell'agente idrofilo, e per confermare l'influenza della variabile formulativa delle microsfere sulla modulazione del profilo di rilascio.

In un'ultima fase del presente progetto, si è verificata l'efficacia di tale sistema multicomponente *in vivo* attraverso l'utilizzo di sistemi computazionali che simulano il comportamento in ambienti altamente complessi quali il corpo umano.

# Capitolo 1

## Stato dell'arte - Stent

### 1.1 Malattie cardiovascolari - Stenosi

Le malattie dell'apparato cardiocircolatorio sono una delle maggiori cause di morte in Europa e vengono affrontate, secondo i casi, attraverso la prevenzione dei fattori di rischio, tramite la terapia farmacologica ed, infine, con l'intervento chirurgico.

La cardiopatia ischemica è tra le sindromi più frequenti di tale patologia nei Paesi occidentali, le cui manifestazioni sono l'angina pectoris e l'infarto miocardico. In tutte le manifestazioni cliniche di questa cardiopatia, la causa alla base dei sintomi è la riduzione del lume delle coronarie, le arterie che portano sangue e nutrimento al cuore. I vasi hanno l'importante funzione di fornire sangue, quindi ossigeno, al cuore ed un loro restringimento provoca dei danni al tessuto che, se non trattati dal punto di vista medico, portano il paziente verso una condizione di crisi, cioè all'*infarto miocardio* [9]

Le arterie si occludono o si restringono per la formazione di una placca aterosclerotica a seguito dell'accumulo di depositi (principalmente lipidici) sulle loro pareti interne o per la formazione di un coagulo.

L'aterosclerosi, quindi, rappresenta una delle principali cause di ischemia che, in relazione al sito della lesione vascolare, può interessare anche diversi distretti corporei.

Il restringimento o l'ostruzione dell'arteria viene definita **stenosi** (fig. 1) e quando avviene lentamente nel tempo, comporta una riduzione del flusso di sangue al muscolo cardiaco solo in alcune occasioni (in particolare durante attività fisica di una certa entità) e a manifestarsi sono i sintomi dell'**angina**.

Quando, invece, il restringimento è rapido e improvviso si ha l'interruzione del sangue al muscolo cardiaco che quindi va in necrosi, e si ha l'**infarto** [10].

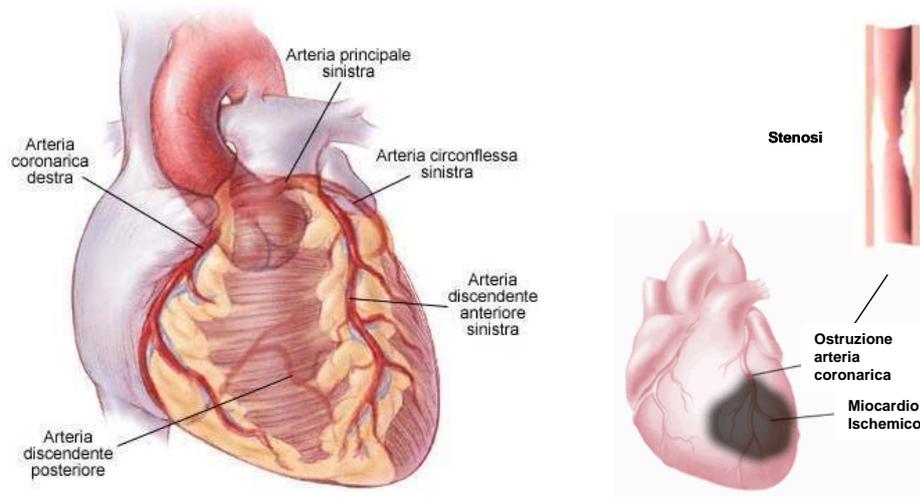


Figura 1: Anatomia del cuore con particolare di coronaria stenotica

Inizialmente l'unica possibile via d'intervento chirurgico era rappresentata dal **bypass** (fig. 2). La circolazione viene ripristinata attraverso l'uso di un ponte, una vena prelevata solitamente da una gamba (la vena safena), che bypassa il restringimento della coronaria malata.

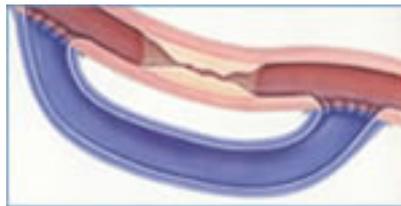


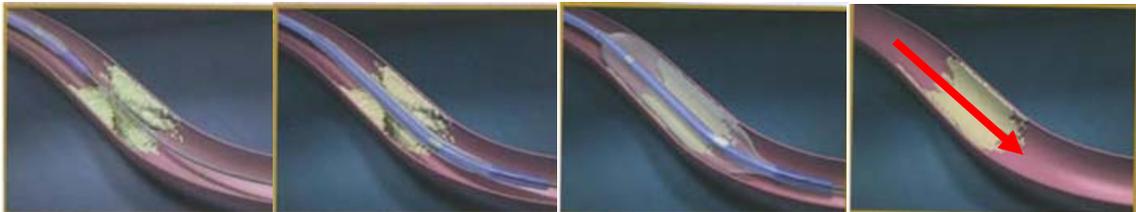
Figura 2: Bypass aortocoronarico

Successivamente si è pensato di sostituire l'intervento di innesto di bypass aortocoronarico con uno più efficace, l'angioplastica coronarica percutanea transluminare (PTCA), intervento meno invasivo e meno costoso del bypass, dando inizio all'era moderna della cardiologia interventistica. La PTCA consiste nell'inserimento all'interno dell'arteria di un catetere con un piccolo palloncino, il quale si espande nel punto della stenosi, schiacciando tutto il materiale contro la parete

dell'arteria eliminando così la placca e permettendo di ripristinare il corretto flusso di sangue (fig. 3) [11].

Successivamente all'espansione, il palloncino viene sgonfiato e rimosso dal vaso[12]. Il primo ad utilizzare tale tecnica fu il cardiologo svizzero *Andreas Gruentzig* che sviluppò un catetere a palloncino in grado di dilatare con sicurezza e con una elevata percentuale di successi le lesioni delle arterie iliache e femorali.

La successiva miniaturizzazione di questo sistema di cateteri a palloncino consentì l'esecuzione a Zurigo nel 1977, da parte dello stesso *Gruentzig*, della prima angioplastica coronarica trasluminare per via percutanea [13] .



*Figura 3: Procedura di angioplastica coronaria*

Col tempo, però, si è osservato che a causa del trauma meccanico determinato dal palloncino la coronaria poteva andare incontro, nell'arco dei quattro-sei mesi successivi, ad un nuovo restringimento (**restenosi**) (fig. 4) dovuto:

- all'elastic recoil: la parete arteriosa perde di elasticità e di flessibilità, collassando all'interno del lume arterioso e rendendo il tratto nuovamente occluso;
- ad una progressiva riduzione del diametro del vaso (rimodellamento negativo),
- alla migrazione e proliferazione delle fibrocellule muscolari lisce della parete vasale (proliferazione neointimale o iperplasia intimale)

Questo evento si verifica fino al 50% dei casi e tuttoggi risulta favorito da alcuni fattori clinici (diabete mellito, stato infiammatorio in atto), caratteristiche angiografiche (ramo discendente anteriore, vasi piccoli, lesioni lunghe, ostiali, biforcazioni e occlusioni croniche) e procedurali (stenosi, placca residua).

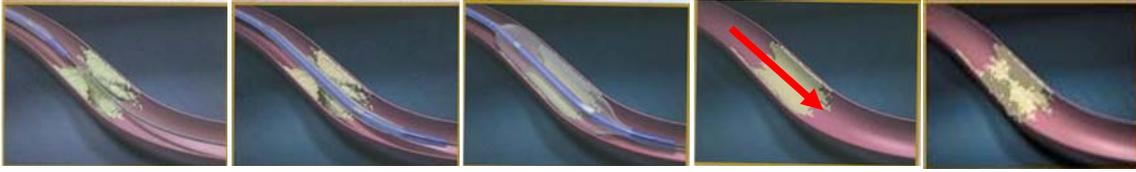


Figura 4: Restenosi dopo procedura di angioplastica coronaria

La risoluzione di questo problema è stato uno dei più importanti obiettivi della ricerca nella cardiologia interventistica degli ultimi dieci anni ed oggi la patologia aterosclerotica può essere trattata e risolta mediante tecniche endovascolari minimamente invasive che ripristinano il lume vasale attraverso lo schiacciamento della placca occlusiva e la dilatazione locale dell'arteria [14].

Negli anni Novanta, infatti, la tecnica dell'angioplastica è stata resa ancora più sicura ed efficace con l'impianto di dispositivi in grado di fungere da tutori di pareti stenotiche, gli *stent coronarici*, fino ad ora gli unici strumenti in grado di dimostrare una chiara efficacia antirestenosi. Si tratta di endoprotesi metalliche tubolari che vengono inserite in corrispondenza del tratto ristretto dell'arteria coronarica, mediante l'uso di cateteri, e fatti espandere all'interno del vaso con una procedura analoga e generalmente simultanea all'angioplastica con palloncino. Essi svolgono da un lato una funzione di sostegno meccanico, tesa a minimizzare il ritorno elastico dei tessuti nella fase seguente al trattamento angioplastico, e dall'altro favoriscono la cicatrizzazione dell'arteria trattata, sigillando dissezioni e trattenendo frammenti fibrosi della placca occlusiva, opponendosi quindi al rimodellamento negativo, uno dei meccanismi alla base della restenosi.

## 1.2 Stent

Il primo stent fu ideato da *Dotter* ed era costituito da una spirale di acciaio inossidabile a spire molto strette; 14 anni dopo lo stesso *Dotter*, introdusse il concetto di stent termoplastico in nitinolo [15]. Negli anni 80, poi, *Maas*, utilizzò come stent una spirale elastica autoespandibile costituita da due bande metalliche di acciaio inox, tale stent risultava completamente endotelializzato [16].

Lo stent, che si presenta come un piccolo tubicino espandibile a maglie intrecciate, costituisce una sorta di impalcatura in grado di dilatare l'arteria. Attualmente sono costituiti da spirali o maglie metalliche variamente configurate e sono inseriti per via percutanea utilizzando cateteri opportunamente sagomati; effettuato il corretto posizionamento, il tutore viene dilatato sino al diametro voluto. Successivamente il palloncino viene sgonfiato mentre lo stent espanso rimane a contatto con le pareti dell'arteria evitando il collasso della parete vasale e, quindi, l'elastic recoil. Con il passare del tempo, le cellule della parete arteriosa crescono attorno alle maglie del dispositivo fissandolo ulteriormente in posizione (fig. 5).

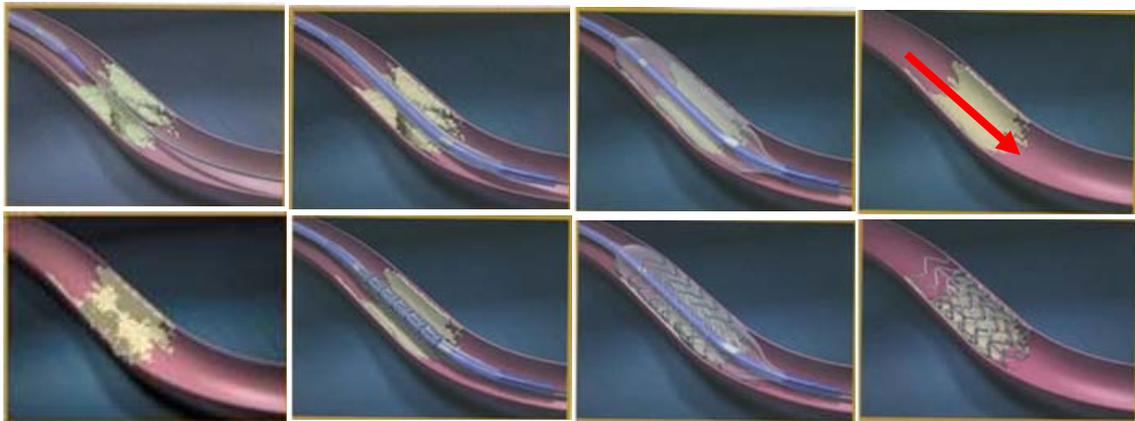


Figura 5: Impianto di stent tramite procedura di angioplastica coronaria

L'introduzione nella pratica clinica dei dispositivi in questione, ha quindi permesso la netta riduzione delle complicanze legate a questo tipo di intervento, soprattutto nei casi di occlusione acuta.

Dunque, il collocamento di uno stent nella sede di una lesione ostruttiva ha due finalità: una immediata e una a lungo termine.

- La prima ha lo scopo di correggere due eventi che possono causare insuccesso tecnico della PTA: la *dissezione* che consegue alla rottura degli strati medio ed intimale della parete del vaso e che può causare riduzione o arresto del flusso ematico; *l'elastic recoil* che vanifica l'intento dilatativo dell'angioplastica.
- La seconda ha lo scopo di realizzare una superficie endoluminale liscia che intende assolvere alla principale finalità dello stenting: limitare le recidive a distanza. E'

noto, infatti, come la riparazione parietale sia più esuberante dove la superficie endoluminale è più accidentata, in quanto la rugosità della parete favorendo una più consistente adesione piastrinica, stimola i processi di iperplasia fibrointimale [17].

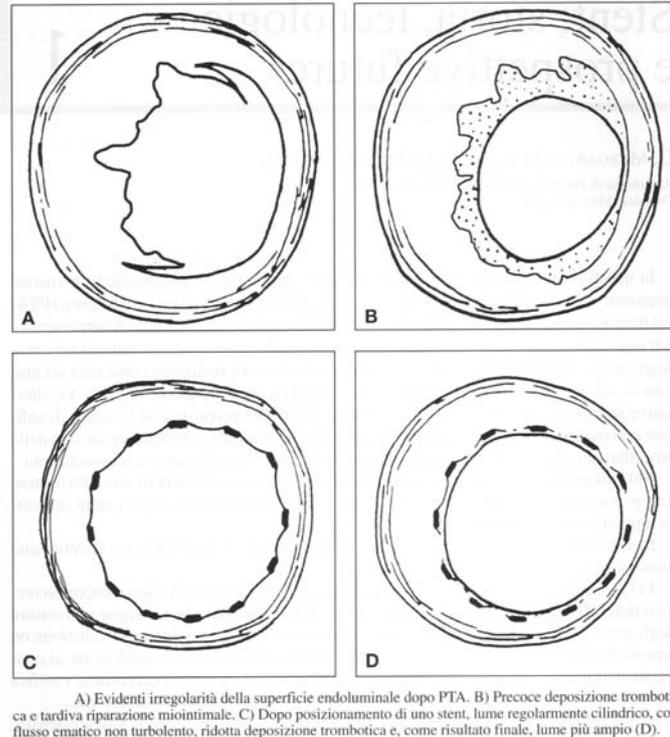


Figura 6: Schema della cicatrizzazione vasale a seguito di PTCA o stenting

Tale evenienza è rappresentata in fig. 6, dove si compara il rimodellamento della lesione dopo procedura di angioplastica e di stenting. Il palloncino espandendosi crea una lesione molto più frastagliata (A) di quella procurata dallo stent (C), che darà quindi luogo, per quanto detto in precedenza, ad una maggiore proliferazione della neointima comportando un lume vasale più ridotto (B).

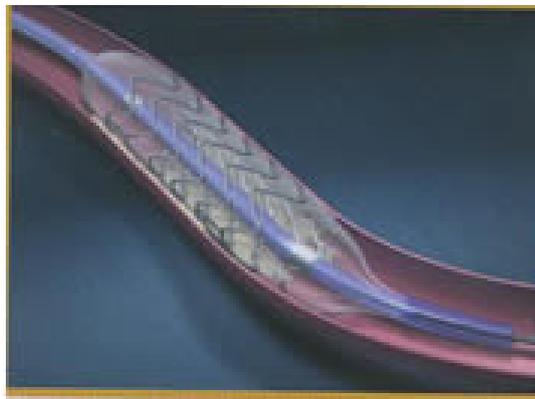
Gli stent possono essere classificati in relazione al distretto circolatorio di impiego, ma anche in base al meccanismo di apertura, al materiale, alle caratteristiche geometriche ed alla tecnica di produzione. In particolare, è possibile distinguere:

1. stent *shape memory alloy* (i.e. a memoria termica)
2. stent elasto-plastici *balloon-expandable* (i.e. espandibili con palloncino)
3. stent elastici *self-expandable* (i.e. autoespandibili).

Gli **stent a memoria termica**, utilizzati da Dotter e Cragg, furono realizzati in nitinolo, una lega di nichel-titanio dotata di particolari proprietà: un filo di tale materiale

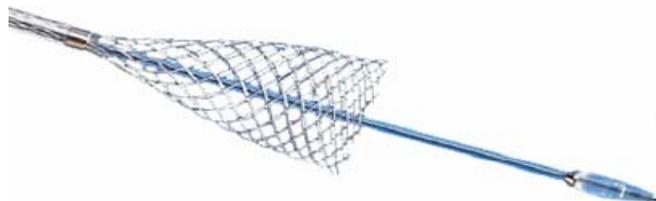
modellato ad una determinata forma alla temperatura di 500°C può essere riplasmato diversamente a 0°C, riassumendo tuttavia la forma primitiva se portato a una temperatura di 30-60°C [18].

Gli **stent espandibili con palloncino** (fig. 7), una volta inseriti nel lume vasale in configurazione indeformata mediante un catetere e posizionati sul sito della lesione, vengono aperti, subendo deformazione plastica, attraverso il gonfiaggio di un palloncino solidale al catetere ed interno allo stent. Posizionata la protesi, il catetere a palloncino viene rimosso.



*Figura 7: Stent espandibile con palloncino*

Infine, nel caso di **stent autoespandibili** (fig. 8), una guaina vincola il dispositivo nella sua configurazione deformata fino al posizionamento nel sito della lesione vasale. Qui la guaina viene retratta e lo stent si espande elasticamente entrando in contatto con i tessuti biologici che lo accolgono fino ad un predeterminato diametro, risultato dell'equilibrio raggiunto tra elastic recoil del vaso stenotico e forza espansiva dello stent.



*Figura 8: Stent autoespandibile*

Spesso, quando si utilizzano stent autoespandibili, è necessaria una procedura aggiuntiva di angioplastica (post-dilatazione) che, attraverso l'azione forzata di un palloncino, consente uno schiacciamento ottimale della placca lipidica ed una apertura completa del dispositivo.

L'evoluzione tecnologica in questo settore riguarda la ricerca e lo sviluppo di stent sempre più piccoli ed adattabili alle differenti necessità e situazioni [19].

Le caratteristiche del materiale costituente il dispositivo tra cui la biocompatibilità e la trombogenicità, i parametri di forma che ne caratterizzano la geometria, il comportamento meccanico e gli effetti di interazione biomeccanica vaso/stent rappresentano fattori che possono significativamente influenzare e catalizzare i processi di restenosi e che pertanto rivestono un ruolo determinante nelle scelte progettuali e cliniche degli stent [20].

#### ⌘ **Biomeccanica**

L'analisi comparativa di numerosi casi clinici e lo studio meccanico-biologico del sistema accoppiato stent/arteria dimostra la stretta dipendenza tra le modalità di impianto dello stent e la probabilità di restenosi del lume o di trombo-embolizzazione della placca [21,22].

Le caratteristiche costruttive di uno stent devono consentire al dispositivo un buon ancoraggio alle pareti vasali ed un'adeguata resistenza sia all'elastic recoil del vaso stenotico, sia all'affaticamento causato dallo stress delle pulsazioni arteriose [23]. Un elevato rapporto tra il diametro dello stent espanso nel lume vasale e il diametro serrato sul catetere introduttore è auspicabile ed è, inoltre, necessario che la parete dello stent abbia spessore ridotto per offrire la minima resistenza al flusso ematico. Parimenti ridotta deve essere la superficie della protesi lambita dal flusso ematico, per attenuare la trombogenicità intrinseca della struttura metallica del dispositivo [24].

Infine, anche la radiopacità risulta una caratteristica importante, in quanto consente la facile visualizzazione del dispositivo all'esame scopico e grafico.

Attualmente solo una struttura metallica può soddisfare tutti i requisiti richiesti, garantendo ingombro e massa sufficientemente ridotti [25].

Una problematica controversa dello stenting intravascolare è rappresentata dal ruolo svolto dalle caratteristiche di compliance radiale e di flessibilità longitudinale dei

diversi tipi di stent nel favorire la pervietà a lungo termine dei vasi trattati. [26]. Infatti, è necessario garantire, da un lato, una elevata flessibilità longitudinale [27] combinata ad un elevato rapporto tra i diametri post- e pre-apertura, così da rispettare l'anatomia vascolare nella fase di raggiungimento del sito di impianto anche nel caso di ramificazioni secondarie; dall'altro, la stessa flessibilità longitudinale, in configurazione aperta, deve essere associata ad una elevata rigidità radiale per minimizzare il ritorno elastico dell'arteria e consentire la mobilità del vaso [28].

#### ☞ *Biocompatibilità/Trombogenicità*

Gli stent oggi disponibili sono costruiti con metalli o leghe metalliche per conciliare le esigenze di solidità e radiopacità conservando massa e volume ridotti.

La struttura metallica è, tuttavia, intrinsecamente trombogena; nelle fasi iniziali che seguono il posizionamento dello stent questa può essere una caratteristica positiva, in quanto un trombo fibrinico, depositato in strato sottile sulla superficie metallica ne favorisce la rapida copertura endoteliale, bloccando l'ulteriore progressione del trombo ed eliminando il rischio di occlusione.

Quando un dispositivo metallico viene esposto al sangue circolante, in pochi secondi inizia una serie di eventi che ne modifica la superficie preparandola alla successiva copertura endoteliale; in seguito la progressione degli eventi rallenta raggiungendo la completa quiescenza dopo alcuni anni. All'esame con microscopio elettronico una superficie metallica esposta al flusso ematico risulta dopo pochi minuti coperta da un trombo amorfo; entro le prime 24 ore si forma uno strato ad elevato contenuto proteico con scarse cellule, prevalentemente orientate secondo la direzione del flusso ematico, che costituisce un substrato favorevole per la successiva crescita delle cellule endoteliali. In tempi variabili (da qualche giorno a qualche mese) lo strato trombotico viene sostituito da tessuto fibromuscolare (fig. 9) [29].

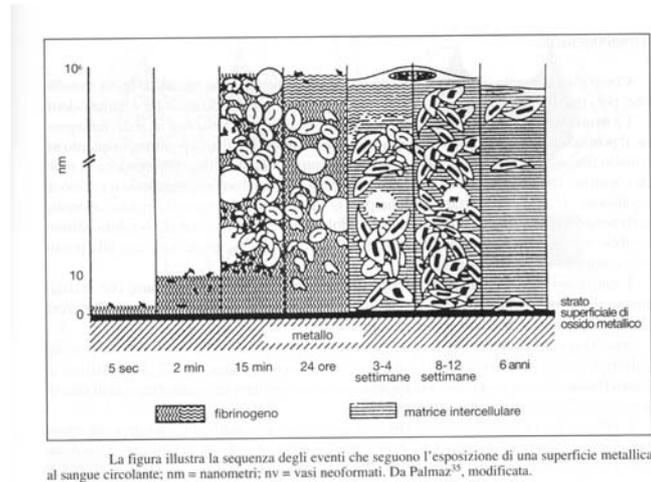


Figura 9: Sequenza temporale del processo a seguito del contatto stent-sangue

Le cellule fibromuscolari in diretto contatto con la superficie metallica paiono sviluppare un'adesione fisica, che si attua per il tramite di un sottile film proteico.

Poiché il più importante degli eventi precoci è costituito dal formarsi dello strato più o meno sottile di depositi trombotici, appare quindi essenziale la comprensione dei complessi meccanismi che regolano la maggior o minor trombogenicità delle superfici metalliche. In tal senso composizione chimica, caratteristiche di superficie e proprietà meccaniche del tutore metallico orientano la risposta biologica dell'ospite.

Dunque, la maggiore o minore tolleranza biologica dipende dai fenomeni che occorrono all'interfaccia tra il tessuto ospite e lo stent impiantato. L'interfaccia tra stent e sangue è rappresentata da uno strato sottilissimo di ossido metallico; il tipo di ossido dipende dalla composizione del materiale e dalla lavorazione utilizzata nella finitura di superficie: quest'ultima ne determina la composizione chimica caratterizzando così la maggiore o minore biocompatibilità del dispositivo. Anche le caratteristiche fisiche di superficie condizionano il grado di reattività della superficie metallica al flusso ematico; in particolare rugosità, carica elettrica ed energia libera di superficie influenzano la trombogenicità e l'incorporazione tessutale dello stent impiantato. Sicuramente una maggior rugosità della superficie aumenta la trombogenicità del tutore metallico [27].

Anche l'energia libera di superficie svolge un ruolo importante influenzando il comportamento dei liquidi che giungono a contatto con il metallo determinandone la maggior o minor aderenza. Materiali con elevata energia libera di superficie, e quindi a

maggior trombogenicità, dovrebbero di conseguenza essere preferibili nella costruzione degli stent intravascolari, essendo più facilmente incorporati nella parete vasale [30].

E' altresì importante evitare anomale turbolenze o riduzioni del flusso ematico endoluminale: un flusso ematico ridotto, infatti, stimolerebbe nuovamente la produzione trombotica sulla superficie protesica, sino alla possibile completa occlusione del vaso.

Risulta, quindi, evidente che quando uno stent viene posizionato in un vaso di piccolo calibro o sia comunque esposto a condizioni di basso flusso, è auspicabile la terapia con anticoagulanti ed antiaggreganti (eparina, aspirina e dipiridamolo) al fine di garantirne la pervietà a lungo termine. Le ricerche attuali sono mirate ad ottimizzare livello e durata della terapia anticoagulante, per ridurre al minimo l'entità dei depositi trombotici prima della completa riendotelizzazione della superficie interna dello stent; a tal fine si stanno sperimentando anche particolari stent che rilasciano eparina [31].

### **1.3 In-stent restenosi (ISR)**

I miglioramenti nella cura della stenosi tramite la procedura di stenting rispetto alla semplice angioplastica, sono dovuti principalmente alle proprietà di sostegno di queste protesi metalliche, che prevengono il restringimento del vaso dovuto ad elastic recoil e rimodellamento negativo.

Restano comunque irrisolte alcune complicazioni associate principalmente all'utilizzo di stent coronarici quali la trombosi e la restenosi intrastent. La trombosi intrastent è una condizione molto pericolosa in quanto comporta l'occlusione dello stent a causa di un trombo. Ciò accade raramente al momento dell'impianto e si verifica spesso entro i successivi 30 giorni, rendendo l'evenienza ancora più pericolosa. Questa condizione è spesso associata con l'infarto miocardico e, solitamente, viene trattata con angioplastica d'urgenza o con l'intervento di bypass. Il miglioramento nelle tecniche necessarie alla procedura di stenting, tra cui l'utilizzo di pressioni di espansione più elevate per permettere allo stent di posizionarsi perfettamente nella parete vasale, insieme all'utilizzo combinato di agenti antiaggreganti ha diminuito notevolmente la probabilità di tale inconveniente a meno dell'1% [32, 33]

La restenosi intrastent, invece, è la più comune complicanza associata con il posizionamento di uno stent coronarico. La frequenza con la quale può presentarsi è

influenzata da diversi fattori tra cui caratteristiche legate al paziente stesso, caratteristiche morfologiche della lesione e design dello stent.

La restenosi è la risposta di cicatrizzazione della parete arteriosa a seguito del trauma subito durante il posizionamento di uno stent e consta di due principali processi: la iperplasia neointima (proliferazione e migrazione delle cellule muscolari lisce SMC e deposizione della matrice extracellulare) e il rimodellamento vasale.

Una visione generale degli eventi molecolari e cellulari della in-stent restenosi è stata proposta da *Welt e Rogers* [34] (fig. 10).

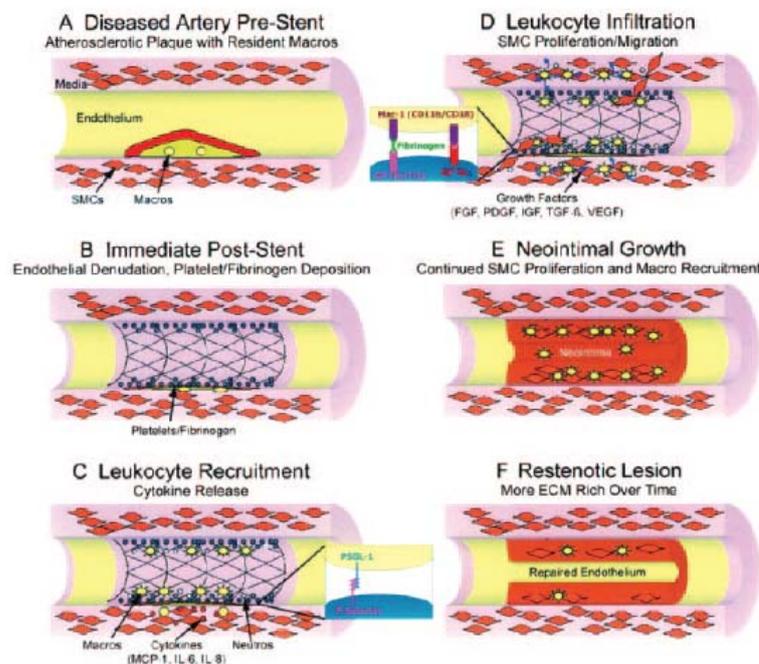


Figura 10: Successione degli eventi molecolari a seguito di procedura di stenting

Una serie di eventi iniziano immediatamente dopo il posizionamento dello stent, tra cui la de-endotelializzazione, lo schiacciamento della placca (spesso con dissezione della tunica media e a volte dell'avventizia) e la tensione dell'intera arteria. Un layer di piastrine e fibrina viene, infine, depositato al sito danneggiato. Le piastrine attivate sulla superficie cominciano ad esprimere molecole di adesione capaci di richiamare dal flusso sanguigno i leucociti per cominciare il processo di riparo sulla superficie danneggiata. [35]. La migrazione nel tessuto dei leucociti attraverso il layer di piastrine e fibrina è guidato dai gradienti chimici di chemochine rilasciate dalle SMC presenti in situ. Lo step successivo è la fase di proliferazione cellulare. Le piastrine, i leucociti e le SMC

presenti in superficie rilasciano fattori di crescita che stimolano altre SMC a migrare dalla tunica media alla neointima la quale, dopo alcune settimane, sarà costituita principalmente di SMC, macrofagi e matrice extracellulare. Successivamente comincerà la fase di divisione cellulare, che gioca un ruolo essenziale nell'ulteriore sviluppo della restenosi [36].

La ricerca scientifica negli ultimi anni ha promosso notevoli sviluppi in tale ambito, tuttavia i meccanismi molecolari del rimodellamento dell'arteria non sono ancora ben identificati, ed inoltre, il termine *rimodellamento* è stato ampiamente ed indiscriminatamente utilizzato per descrivere sia il restringimento che il dilatamento vascolare. [37, 38].

Nonostante i vantaggi apportati dall'utilizzo di stent, la probabilità di restenosi dopo l'impianto di stent metallici è ancora superiore al 20%, e la necessità di reintervenire sulla lesione trattata si assesta al 10% [39]. Ciò a causa della iperplasia della neointima, che nel caso di stent metallici risulta essere più elevata se paragonata alla PTCA [40]. Inoltre, anche altri fattori non vanno sottovalutati, quali non corretto posizionamento o espansione dello stent, scelta di un diametro non adeguato o caratteristiche non ottimali della lesione [41].

Il concetto che uno stent potesse fornire il necessario supporto strutturale ad un vaso danneggiato è stato inizialmente dimostrato da *Dotter* nel 1969. Ciò nonostante, le attuali applicazioni cliniche di questi nuovi dispositivi terapeutici sono state ostacolate dalla iniziale occlusione dovuta alla trombogenicità del metallo [42, 43] e alla successiva restenosi indotta dall'iperplasia intimale [44].

Da quanto su esposto si deduce come, salvaguardando le indispensabili caratteristiche di solidità e resistenza, lo stent debba avere un disegno a maglie molto ampie, sia per ridurre al minimo la trombogenicità intrinseca alla struttura metallica, sia per coprire in minima quantità l'endotelio sano: maglie fitte e con superficie endoluminale non liscia determinano, come facilmente intuibile, una reattività intimale maggiore.

## **1.4 Stent rivestiti**

Poiché i meccanismi alla base dell'interazione tra metallo, tessuto e sangue non sono ancora completamente noti, la biocompatibilità ed emocompatibilità di stent metallici rimane ancora una problematica non risolta. Ulteriori studi sono dunque necessari allo scopo di ridurre l'intrinseca trombogenicità degli stent e di annullare, o quanto meno diminuire, la reazione intimale costantemente apprezzabile dopo il posizionamento. Uno dei più concreti approcci per risolvere tale problematica è quello di rivestire la superficie endoluminale delle protesi metalliche con materiali che ne riducano l'intrinseca trombogenicità per alterarne le caratteristiche superficiali senza interferire con le proprietà bulk del metallo [45].

Oltre alle usuali problematiche di biocompatibilità con il tessuto, l'esposizione dello stent al flusso sanguigno, con la possibilità di richiamare le piastrine ed attivare così il processo di coagulo, offre un'ulteriore difficoltà nell'identificazione del componente ideale per uno stent ibrido (base metallica più rivestimento) senza aumentarne il rischio trombotico [46].

Al fine di offrire una barriera biologicamente inerte tra la superficie dello stent, il sangue e la parete endoteliale, molti differenti rivestimenti sono stati analizzati in vari studi clinici, randomizzati e non [47] con lo scopo di migliorare le performance dello stent, e tra essi i polimerici giocano un ruolo fondamentale grazie alle loro ben note proprietà biocompatibili [48].

A seguito del massiccio studio scientifico in tale filone, attualmente il portafoglio di materiali per il rivestimento è ampio [47,49] e di seguito sono riportati solo alcuni dei materiali utilizzati in tale ambito scientifico.

### **§ Oro**

L'oro è un materiale relativamente inerte ed è anche radiopaco, caratteristica di notevole importanza per la visualizzazione radiografica [50], e studi pre-clinici hanno evidenziato che riduce la trombogenicità dello stent, diminuisce la formazione di neointima e mostra anche proprietà antibatteriche. Tuttavia, dati sperimentali in trials umani utilizzando stent rivestiti d'oro sono deludenti nonostante gli incoraggianti studi preliminari [51]. In tale contesto, *Edelman et al.* [52] hanno studiato la risposta vascolare

in arterie coronariche porcine comparando stent rivestiti con oro standard o termoprocessato. I risultati hanno mostrato una riduzione di iperplasia neointima e una minor risposta infiammatoria per gli stent termoprocessati rispetto a quelli semplicemente rivestiti. Ciò può essere principalmente attribuito alla superficie maggiormente liscia, conseguenza della rimozione delle impurità a seguito del processo termico. Questo studio conferma ulteriormente che le proprietà superficiali e la purezza del materiale possono giocare un ruolo fondamentale nelle interazioni tessuto/materiale [53].

#### ⌘ *Carburo di Silice (SiC)*

Il carburo di silice amorfo (SiC), un semiconduttore, è un altro possibile componente utilizzato come rivestimento di stent che si è mostrato promettente in termini di riduzione della ISR [54], migliorandone la tromboresistenza [47] grazie alle sue proprietà antitrombogeniche [55]. La diminuzione nella deposizione delle piastrine sulla superficie di uno stent rivestito di SiC rispetto a stent metallici conferma la promettente scelta di rivestimenti di SiC come materiale per ridurre la restenosi [56].

#### ⌘ *Phosphorylcoline*

Il polimero fosfolipidico phosphorylcoline (PC) è una porzione neutralmente carica della membrana dei globuli rossi ed è strutturalmente composta da componenti sia idrofili che idrofobi [57] la cui emocompatibilità è ampiamente documentata in letteratura [58]. Per tali motivi, è stata utilizzata come rivestimento di stent metallici con lo scopo principale di prevenire l'adesione di cellule che attivino il processo di coagulazione [57]. Inoltre, la sua peculiare caratteristica di mimare l'ambiente biologico può potenzialmente conferire allo stent proprietà tromboresistenti [58]. Vari trials umani confermano le proprietà antitrombogeniche e la diminuzione di incidenza di restenosi quando si utilizzano stent rivestiti con PC [59] che risultano essere quindi ben tollerati anche in pazienti con patologie acute [47].

#### ⌘ *Eparina*

L'Eparina, un gruppo eterogeneo di glicosamminoglicani, è stata ampiamente utilizzata per modificare la superficie di impianti vascolari per le sue proprietà

anticoagulanti [60]. L'eparina è stata impiegata prevalentemente come rivestimento passivo di stent poiché è ben tollerata dal corpo e può ridurre le complicazioni dovute a reazioni trombogeniche [61]. Quando paragonati in trials umani a stent metallici di controllo [62], o a stent rivestiti d'oro [63] o SiC [64] gli stent rivestiti di eparina sono stati associati a una riduzione dell'attivazione di cellule endoteliali e piastrine. L'incidenza di in-stent trombosi quando vengono utilizzati gli Hepacoat™ stent (Cordis Corporation, Florida) in trials clinici risulta essere dello 0.7% in infarti acuti del miocardio [65].

## **1.5 Limiti degli stent rivestiti**

Nonostante gli sviluppi scientifici, tra i quali lo stenting coronario è stato il più significativo, la restenosi rimane il problema che maggiormente limita l'efficacia della procedura.

Il principale limite degli stent rivestiti è rappresentato dal fatto che essi sono in grado di eliminare soltanto due delle componenti meccaniche del processo di restenosi, il recoil e il rimodellamento, ma non la proliferazione intimale che, al contrario, appare particolarmente accentuata rispetto ad altre tecniche di trattamento percutaneo. In circa il 50-60% dei casi la comparsa di restenosi all'interno dello stent si accompagna a recidiva di ischemia la quale potrà richiedere un nuovo intervento di rivascularizzazione .

Sebbene l'utilizzo di rivestimenti polimerici migliori la biocompatibilità delle superfici metalliche, un'ulteriore problematica si è proposta dovuta proprio alla presenza del layer polimerico. Numerosi studi clinici hanno, infatti, evidenziato una notevole risposta infiammatoria non riscontrata nell'utilizzo di stent metallici causata dalla presenza di linfociti infiltrati, macrofagi e cellule giganti tipiche di reazioni di rigetto a corpi estranei [48,66]. Tale accumulo di cellule infiammatorie sulla superficie dell'interfaccia stent/arteria può stimolare il rilascio di fattori di crescita e citochine il che può di conseguenza indurre la formazione di neointima.

Una recente classificazione distingue quattro tipi di restenosi angiografica (tab. 1) con un rischio di recidiva nel primo anno che va dal 19% nel tipo focale al 50-83% nei tipi proliferativi o con occlusione totale [67].

Tabella I. Classificazione e prognosi della restenosi intrastent.

Tipo restenosi (grado)	Proliferazione neointimale (angiografia)	Incidenza (%)	TVR (% 1 anno)
Focale (I)	≤ 10 mm all'interno dello stent	42	19
Diffusa (II)	> 10 mm all'interno dello stent	21	35
Proliferativa (III)	Sorpassa i bordi dello stent	30	50
Occlusione totale (IV)	Occlude completamente il vaso	7	83

TVR = rivascularizzazione del vaso trattato. Da Mehran et al.<sup>189</sup>, modificata.

Tabella 1: Classificazione e prognosi della restenosi intrastent

I meccanismi infiammatori e di proliferazione su cui si basa la risposta di cicatrizzazione del tessuto arterioso, insieme allo specifico ruolo dei componenti presenti nel sangue e nell'interfaccia arteria-stent sono i potenziali bersagli per un efficace approccio terapeutico. Comparato col solo catetere da angioplastica, lo stenting coronario accoppiato con una drastica terapia antitrombotica e anticoagulante migliora la risposta negativa a lungo termine sul tratto arterioso trattato [68].

Poiché la restenosi intrastent è un processo quasi esclusivamente riconducibile a iperplasia neointimale, è ipotizzabile che trattamenti antiproliferativi possano risultare di particolare beneficio in questo contesto.[69]. Alcuni immunosoppressivi sono stati testati per il loro potenziale di inibire la restenosi con risultati clinici ottimali; purtroppo, una forte limitazione di tale tipologia di farmaci è l'elevata tossicità sistemica che li caratterizza. Attraverso i notevoli affinamenti della tecnologia bioingegneristica conseguiti negli ultimi anni è stato possibile ovviare a tale inconveniente combinando la procedura di stenting con il rilascio controllato locale. L'idea innovativa è stata quella di rivestire la superficie dello stent con sostanze attive realizzando in tal modo la condizione in cui la stessa endoprotesi serve come veicolo per il rilascio locale, per un tempo prestabilito e a determinate concentrazioni, di un selezionato farmaco con un'azione mirata contro la risposta iperplastica cellulare.

Si tratta di stent a rilascio di farmaci, rivestiti di materiali generalmente polimerici contenenti un farmaco antiproliferativo/antinfiammatorio. Tali materiali, inoltre, possono essere potenzialmente utilizzati per rilasciare sia potenti anticoagulanti, usati per diminuire la percentuale delle complicazioni trombotiche acute associate allo stent metallico, sia farmaci antiproliferativi intesi a modificare i processi curativi del tratto di vaso danneggiato [70].

Questi stent sono capaci di rendere disponibili direttamente nel sito della lesione in maniera controllata e prevedibile microdosi del farmaco per tempi prolungati,

contrastando così i meccanismi infiammatori ed i conseguenti fenomeni di proliferazione intimale [71].

La sicurezza e l'efficacia di tale approccio dipendono in maniera critica dalla delicata combinazione di farmaco, polimero e cinetiche di rilascio [72].

## **1.6 Drug Eluting Stent (DES)**

Lo scopo della ricerca, inizialmente, era mirato alla riduzione della trombogenicità migliorando la biocompatibilità della superficie metallica dello stent [73], ma negli ultimi anni l'interesse della ricerca scientifica si è spostato sulla produzione di uno stent che possa essere utilizzato come piattaforma inerte per il rilascio di agenti attivi [74]. Un siffatto dispositivo è capace di fornire i vantaggi meccanici dello stenting e, allo stesso tempo, fornire una piattaforma per il rilascio locale di farmaci capaci di ridurre la trombogenicità dello stent e ostacolare l'iperplasia neointima [75]

Nonostante l'ottimizzazione dell'architettura e delle caratteristiche meccaniche degli stent rivestiti diminuiscano notevolmente la probabilità di restenosi, l'utilizzo di piattaforme per il rilascio di farmaci attraverso un ideale profilo di rilascio sembra essere l'unico approccio valido per migliorare la riuscita a lungo termine di tale procedura clinica [53]. In pratica tali stent a rilascio di farmaco, comunemente detti DES (Drug-Eluting Stent) constano di tre elementi: la piattaforma (cioè lo stent stesso), il carrier (solitamente un polimero) e l'agente attivo (un farmaco che possa prevenire la restenosi) che devono soddisfare una serie di requisiti importanti. Il rilascio di farmaco deve essere controllato e programmato [76], in maniera da rilasciare un'adeguata dose al sito d'azione, in più il carrier polimerico deve essere compatibile con il farmaco [77], resistere al processo di realizzazione, sterilizzazione e stoccaggio ed esibire proprietà di rilascio di farmaci [78]. E ultimo, ma non meno importante, deve essere compatibile con la parete vasale. La riuscita clinica del DES è altamente dipendente da ogni singolo suo componente, così come dalla loro interazione.

Oltretutto, il farmaco una volta rilasciato dal DES, viene trasportato attraverso la parete dell'arteria con un meccanismo fortemente dipendente dalle sue caratteristiche chimiche, quali dimensioni e carica [79]. Un ampio range di agenti antitrombogenici

rilasciati da una vasta gamma di combinazioni di farmaci/sistemi di rilascio sono attualmente al vaglio clinico per stabilirne l'efficacia nella riduzione della restenosi, inducendo a pensare, con ottimismo, che tale rivestimento attivo di stent possa rappresentare una efficace cura per il tallone di achille della PCI [80].

Un drug-eluting stent è, dunque, un dispositivo capace di rilasciare nel flusso ematico uno o più agenti bioattivi che possono depositarsi nel sito del tessuto danneggiato adiacente allo stent. Il farmaco può essere semplicemente legato alla superficie dello stent, immerso e rilasciato attraverso un materiale polimerico o, ancora, intrappolato in un carrier e rilasciato attraverso questo [81, 82]. Poichè, da quanto precedentemente esposto sulla restenosi, la proliferazione delle SMC ha inizio a seguito della procedura di stenting e si protrae per almeno 2 settimane [83] è necessario che l'agente attivo sia reso disponibile nel sito d'azione per una finestra temporale di almeno 3 settimane, affinché sia efficace nella prevenzione della restenosi [84, 85].

E' di fondamentale importanza poter finemente controllare la cinetica di rilascio dei farmaci in maniera da modularla in base alla fase patofisiologica della restenosi su cui si vuole intervenire in funzione del farmaco da rilasciare [86,87].

Non vanno sottovalutati i potenziali effetti tossici, sia locali che sistemici, del farmaco specialmente nel caso di due stent posizionati insieme, o la possibilità di una tardiva risposta infiammatoria innescata dal polimero stesso che può far slittare la restenosi a tempi più lunghi [88].

Sono di seguito riportati gli unici DES che finora sono stati approvati dalla Food and Drug Administration (FDA) e, quindi, attualmente disponibili sul mercato, i cui meccanismi di rilascio verranno approfonditi nel capitolo successivo.

#### ⌘ ***BiodivYsio (Biocompatible)***

Il rivestimento di phosphorylcholine è ottimale, anche, per l'applicazione in stent a rilascio di farmaci poichè ha la capacità di assorbire e rilasciare un ampio range di agenti attivi. Attualmente esistono due stent per rilascio di farmaci a basi di PC disponibili in commercio, il BiodivYsio Matrix LO stents progettato specialmente per farmaci idrosolubili con basso peso molecolare e BiodivYsio Matrix HI stents per l'interazione di componenti carichi negativamente (eg, DNA, heparin, and oligonucleotides) che saranno facilmente assorbiti e rilasciati *in vivo* [89]. Studi pre-

clinici non randomizzati con dexamethasone,55 tra cui lo STRIDE (Study of Anti-Restenosis with BiodivYsio Matrix LO Dexamethasone-Eluting Stent), effettuato con lo scopo di valutare la sicurezza ed efficacia del BiodivYsio Matrix LO stent (Dexamet stent) [90] non hanno evidenziato problemi cardiaci e mostrano una percentuale della restenosi binaria a 6 mesi del 13.3%.

§ *Cypher (Cordis )*

La diffusione è il meccanismo principale che regola il rilascio di farmaci da stent, e in particolare dal *Cypher* stent (Cordis J&J), uno degli unici stent a rilascio di farmaci attualmente in commercio, nel quale l'agente attivo è il Sirolimus [91]. Il Sirolimus è un potente agente immunosoppressivo e antiproliferativo con altre note attività biologiche [92]. Il suo effetto sulla proliferazione delle cellule muscolari lisce, che sono alla base della restenosi, è reversibile poiché le cellule riassumono la proprietà proliferativa pochi giorni dopo la rimozione dell'agente terapeutico [93]. I più importanti successi clinici ottenuti mediante l'utilizzo di stent a rilascio di Sirolimus sono un'incidenza dello 0% della restenosi a 6 mesi ed un'efficacia clinica al *follow-up* di 1 anno, evidenziata dal trials clinico RAVEL [94], nonché una pervietà persistente al *follow-up* di 2 anni evidenziata dallo studio First-In-Man [95], e la possibilità di utilizzo in piccoli vasi e lunghe lesioni come dimostrato nel progetto European SIRIUS [96].

§ *Taxus (Boston Scientific)*

L'utilizzo del Paclitaxel nello stent *Taxus* ha portato ad una percentuale di restenosi dello 0% nel trial pilota Taxus I [97], un'incidenza accettabile dei maggiori eventi cardiaci avversi (MACE) a 6 mesi [98].

Nel contesto della restenosi, studi portati avanti da vari gruppi di ricerca hanno evidenziato che l'utilizzo del paclitaxel interferisce con la formazione di iperplasia neointima in diversi modelli animali [99]. Dal punto di vista del rilascio controllato da stent mirato alla lesione vascolare, il paclitaxel offre un portfolio di proprietà fisicochimiche che lo rendono forse uno dei più idonei agenti attivi per tale applicazione [100]. E' inoltre ben noto che il paclitaxel inibisce la migrazione e proliferazione delle cellule muscolari lisce in maniera dose-dipendente e, tra le sue proprietà, si annoverano

la capacità di promuovere l'apoptosi, inibire l'angiogenesi e ridurre l'aggregazione delle piastrine [101].

## **1.7 Limiti dei DES**

Dalla prima introduzione dei DES nella pratica clinica nel 2001, i trials relativi agli stent capaci di rilasciare sirolimus o paclitaxel hanno evidenziato la loro efficacia nell'inibire la restenosi intra stent [102]. Ciò nonostante i risultati a seguito del trattamento con DES non sono ancora del tutto soddisfacenti a causa di alcuni problemi intrinseci, quali ad esempio la persistenza del rivestimento polimerico anche dopo il completamento del rilascio del farmaco. E', dunque, evidente la necessità di continuare ad ottimizzare tali dispositivi in termini di cinetiche di rilascio e di presenza e tipologia del rivestimento polimerico [103].

Va sottolineato, inoltre, che non tutti i dispositivi progettati hanno portato dei risultati efficienti, ad esempio la Boston Scientific nel 2004 ha ritirato dal commercio il suo Taxus Express stent a causa di problematiche incorse durante il posizionamento e legate alla frattura di parti del dispositivo [104].

Tecnologie innovative di rivestimento sono state implementate nella realizzazione dei nuovi stent, in maniera da ottenere rivestimenti persistenti capaci di contenere farmaci e caratterizzati da stabilità meccanica e ottima compatibilità con le procedure cliniche d'impianto per evitare delaminazioni o fratture durante l'espansione. Notevoli miglioramenti sono stati, inoltre, effettuati nel perfezionamento di caratteristiche superficiali quali rugosità e bagnabilità del rivestimento per migliorare ulteriormente la biocompatibilità del dispositivo.

Dunque, la maggiore sfida con la quale la ricerca sta attualmente combattendo è la riduzione della restenosi senza troppo danneggiare l'integrità della parete vasale, in maniera da evitare complicazioni trombotiche e riuscire, inoltre, a migliorare i sistemi di inserimento per poter raggiungere anche anatomie complesse e tortuose [105].

Un possibile futuro scenario è quello in cui sia possibile, individuata la dose di agente attivo necessaria per la specifica patologia, realizzare stent capaci di rilasciare tale quantità con un idoneo profilo cinetico [106].

Inoltre, grazie ai recenti passi in avanti nella comprensione dei meccanismi biologici alla base della restenosi [107], la risposta del tessuto arterioso a seguito dell'impianto di stent risulta essere estremamente complessa e caratterizzata da multipli percorsi biochimici. Uno degli attuali limiti dei DES è quello di poter rilasciare un solo farmaco, mentre una corretta prevenzione della restenosi implicherebbe l'utilizzo combinato di più agenti attivi per poter inibire tutti gli specifici percorsi biologici.

In questi contesti, stent rivestiti con differenti agenti attivi, capaci per esempio di inibire la proliferazione delle SMC e di promuovere il processo di ri-endotelializzazione, sono attualmente al vaglio della ricerca scientifica. Si potrebbe addirittura pensare ad un rilascio non solo temporale ma anche spaziale di diversi agenti attivi, attraverso un dispositivo capace di rilasciare un farmaco antiproliferativo nella direzione della parete arteriosa, mentre un farmaco anticoagulante viene rilasciato nel flusso ematico [108]. In tale contesto, un rilascio multiplo cronospaziale di agenti attivi costituisce dunque la pionieristica frontiera, non solo da un punto di vista medico ma anche bioingegneristico, nella cura della in-stent restenosi.

Anche le cinetiche di rilascio attualmente disponibili non sono completamente soddisfacenti. E' stato, infatti, dimostrato che il processo di in-stent restenosi segue percorsi differenti se innescato da stent metallici o da DES. Gli eventi a cascata che portano alla riparazione del tessuto danneggiato a seguito di impianti di stent metallici possono essere schematizzati come segue: 1) una fase trombotica di deposizione di piastrine e fibrina nei primi 14 giorni, 2) una fase di infiammazione acuta che dura per circa 3 mesi; 3) una fase di formazione di tessuto in cui le SMC proliferano; 4) e la fase di produzione della matrice extracellulare che si estende per più di un anno; ed infine 5) la fase di rimodellamento per oltre 18 mesi. (fig. 11A)

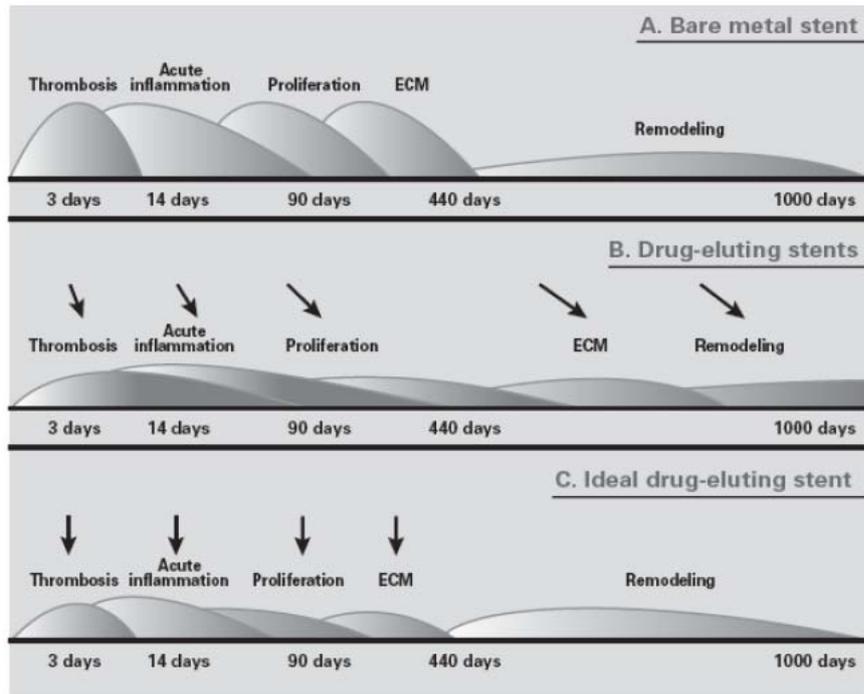


Figura 11: Evoluzione temporale del processo di endotelizzazione dopo procedura di stenting

Al contrario l'introduzione dei DES altera il processo di guarigione ed in alcuni casi genera ipersensibilità. Come evidenziato nella fig. 11B tale tipologia di stent efficacemente riduce la proliferazione di SMC e la produzione di matrice extracellulare. Tuttavia trials clinici attribuiscono ai DES un ritardo del processo di endotelializzazione ed una persistenza della fase infiammatoria oltre i 90 giorni. L'ipersensibilità riscontrata con l'utilizzo del Cypher stent può essere attribuita alla presenza del polimero sintetico presente in tale dispositivo [109,110], mentre nel caso del Taxus oltre alla presenza del polimero giocano un ruolo importante anche le cinetiche lente.

Un "ideale" DES dovrebbe essere caratterizzato da un processo di riparo a seguito dell'impianto capace di sopprimere l'eccesso di proliferazione della neointima, consentendola solo nella fase iniziale necessaria per proteggere lo stent dal flusso ematico, ed incoraggiare una omogenea e funzionale endotelializzazione. In tale processo "ideale" il DES dovrebbe essere biocompatibile senza essere infiammatorio, così da non ritardare il processo di cicatrizzazione (fig 11 C)

## **1.8 Modellazione Matematica**

Da quanto precedentemente esposto, un DES è caratterizzato da un rivestimento micrometrico di materiale capace di immagazzinare e rilasciare lentamente un farmaco, scelto in base alla sua capacità di ridurre la probabilità di formazione di nuove restrizioni dell'arteria nel sito d'azione.

Il trasporto di farmaci attraverso tessuti viventi, in particolare attraverso la parete dei vasi sanguigni, è un problema che coinvolge numerosi fenomeni fisici complessi ed eterogenei. Da un lato esso è influenzato dalla fluidodinamica del sangue nelle arterie e dall'altro, dalla lenta filtrazione del plasma attraverso la parete di queste, fenomeno con il quale numerose specie chimiche vengono trasferite dal sangue all'interno della parete dei grandi vasi sanguigni [111].

Purtroppo però, l'intricato design dello stent, il tessuto biologico con cui si trova ad interagire e le cinetiche locali con le quali il farmaco viene rilasciato non ci consentono di conoscere in maniera intuitiva la distribuzione e la deposizione del farmaco all'interno della parete arteriosa.

Pertanto per studiare gli effetti del sangue sul rilascio del farmaco nell'arteria, sotto rigorose condizioni, che non possono essere controllate in vivo a causa della variazione della posizione, forma e rivestimento dello stent, occorre sviluppare appropriati modelli matematici e metodi computazionali in grado di simulare il fenomeno.

Intuitivamente si è sempre pensato che il farmaco non venisse efficacemente rilasciato all'interno della parete, a causa del fatto che una sua buona parte venisse trascinata via dal flusso sanguigno.

Un importante studio, basato sulla simulazione numerica, condotto da *Edelman et al.* [112], ha dimostrato che ciò non è vero e che la cinetica del farmaco è influenzata positivamente dalla fluidodinamica del sangue [113].

Infatti, attraverso un software computazionale a volumi finiti per lo studio delle fluidodinamiche (CFDRC), le simulazioni mostrano due zone di ricircolo del sangue, una in zona prossimale e l'altra in zona distale rispetto allo stent che danno origine a due corrispondenti zone di ristagno del farmaco. Grazie a tale accumulo nel tempo

nell'interfaccia lume-arteria, il farmaco riesce facilmente a penetrare all'interno della parete arteriosa risultando disponibile al sito d'azione in dose maggiore rispetto a quella inizialmente ipotizzata (fig. 12)

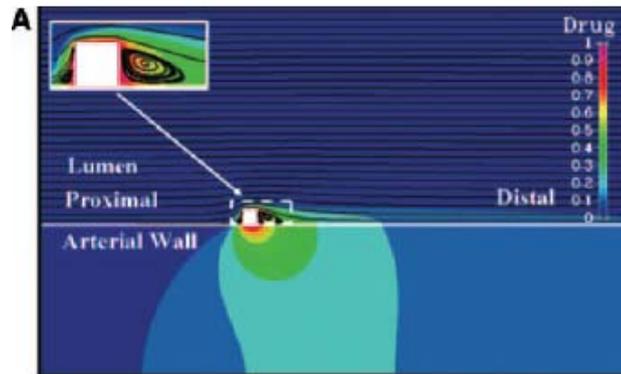


Figura 12: Simulazione della distribuzione del farmaco e relativi profili di concentrazione nella parete

Nonostante ciò, prima di arrivare a facili conclusioni, bisogna tenere in considerazione le diverse variabili che entrano in gioco in questo intricato processo.

Per esempio, la deposizione del farmaco risulta elevata quando tutta la superficie della maglia dello stent rilascia; viceversa risulta sorprendentemente molto ridotta quando a rilasciare è soltanto la porzione di rivestimento a contatto con la parete; a conferma del fatto che la maggior parte del farmaco reso disponibile deriva da quelle porzioni dello stent che inizialmente si pensavano inattive. (fig. 13)

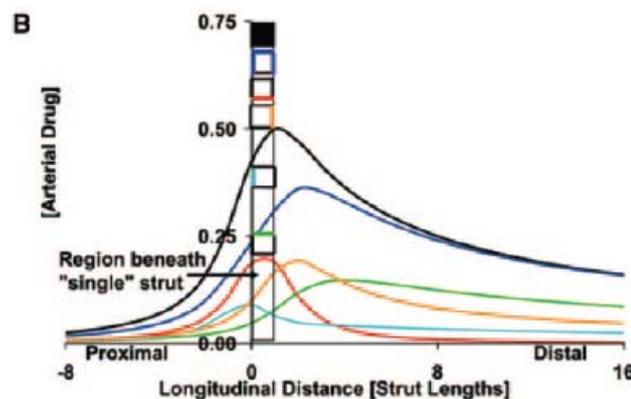


Figura 13: Concentrazione di farmaco nell'arteria al variare della sorgente di farmaco

Anche la geometria dello stent può generare variazione nella distribuzione del farmaco come è possibile notare dalle stesse simulazioni: i profili di concentrazione

all'interno della parete arteriosa, dipendono, infatti, dalla distanza tra i fili costituenti la maglia. Dalla figura 14 si può osservare che i profili di rilascio di farmaco, all'interno del tessuto arterioso, al variare della geometria risultano completamente differenti.

Per uno stent a maglia stretta, infatti, la cinetica di rilascio del farmaco appare piuttosto omogenea; la funzione che descrive il profilo di concentrazione mostra un solo picco ad una concentrazione elevata, come se a rilasciare fosse un unico filo e non una struttura complessa.

Viceversa, per uno stent con geometria a maglia larga, il rilascio è meno omogeneo ed uniforme; il profilo di concentrazione risulta essere contraddistinto da una serie di picchi equispaziati di modulo inferiore al precedente, posti ad una distanza l'uno dall'altro, determinata dalla distanza osservabile tra i fili costituenti la maglia dello stent [114].

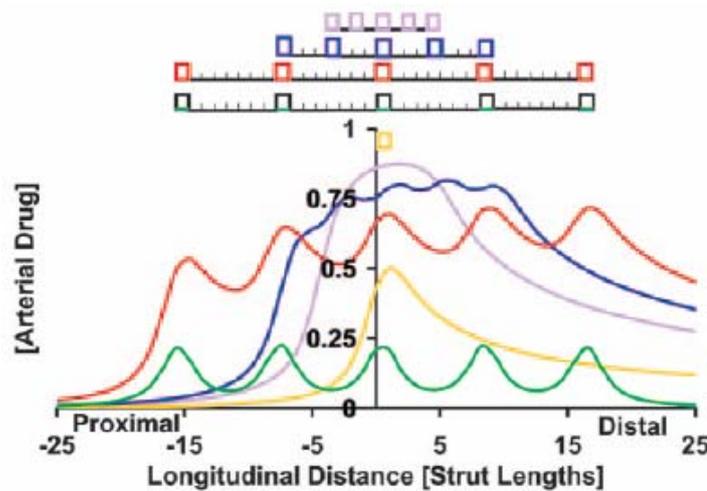


Figura 14: Profili di concentrazione lungo la parete dell'arteria al variare della geometria dello stent

E', inoltre, da non sottovalutare la presenza o meno nell'arteria della placca trombotica, la cui posizione e dimensioni influenzano, in maniera diretta, le cinetiche relative alla distribuzione del farmaco all'interno delle pareti arteriose (fig. 15) [115].

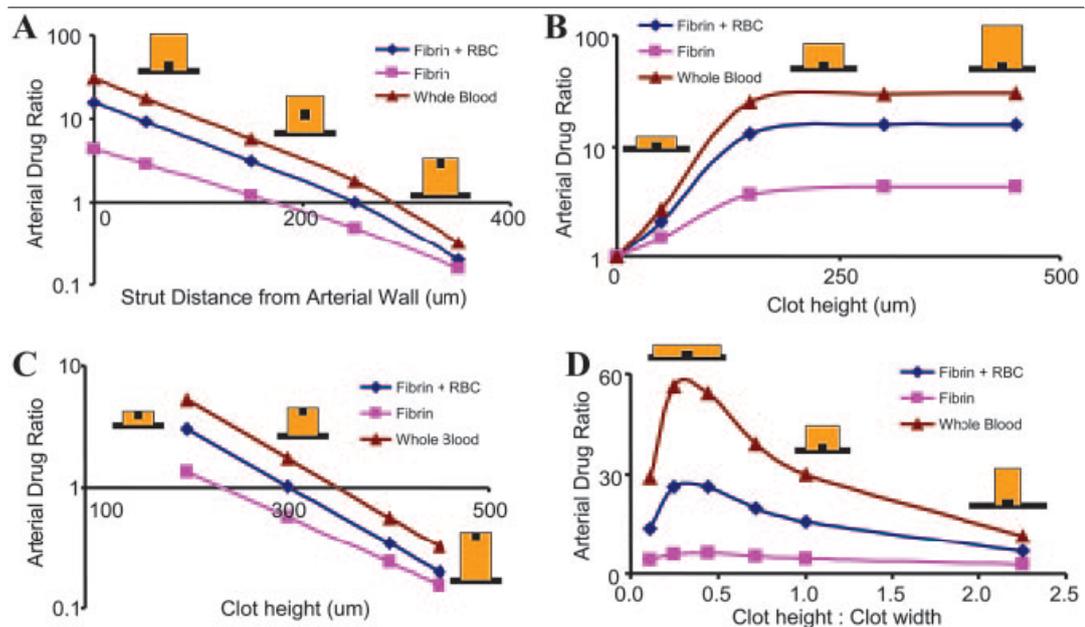


Figura 15: Quantità di farmaco presente nell'arteria in funzione di posizione e dimensione della placca

Negli ultimi anni è stata attribuita alle simulazioni numeriche un'importanza sempre più crescente per il loro contributo innovativo e concreto, rivolto soprattutto alle attività sperimentali. Nella maggior parte dei casi l'interesse è mirato alla realizzazione di modelli matematici in grado di simulare sia la deformazione dello stent durante l'inserimento all'interno dell'arteria che il rilascio e l'assorbimento da parte del tessuto arterioso del farmaco.

Migliavacca *et al.* [116], per esempio, hanno studiato gli effetti del trauma meccanico conseguente all'espansione dello stent all'interno di un'arteria stenotica e il successivo rilascio di farmaco all'interno delle pareti ponendosi l'obiettivo di creare modelli matematici efficaci per consentire lo sviluppo di un ambiente software validato a supporto della realizzazione di uno stent a rilascio di farmaco. A tale scopo, la deformazione meccanica dello stent a seguito della sua espansione all'interno dell'arteria aterosclerotica, è stata simulata attraverso una modellazione matematica basata sul codice commerciale ad elementi finiti ABAQUS (fig. 16).

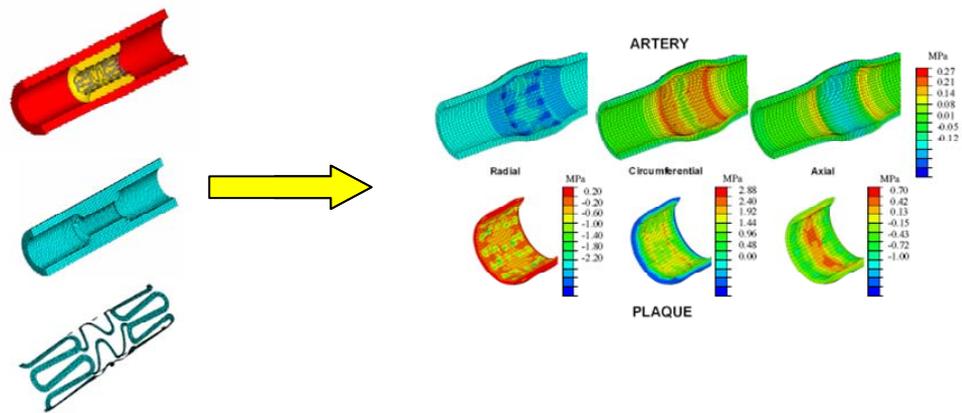


Figura 16: Deformazione meccanica dello stent durante l'espansione all'interno dell'arteria

La deformazione dell'arteria coronaria e dello stent, sono utilizzati come input geometrici per simulare e modellare il rilascio del farmaco. In questo caso, la soluzione numerica dell'equazione parziale differenziale, che descrive la filtrazione del plasma e il trasporto di massa attraverso la parete arteriosa è stata ottenuta dal codice LifeV (fig.17).

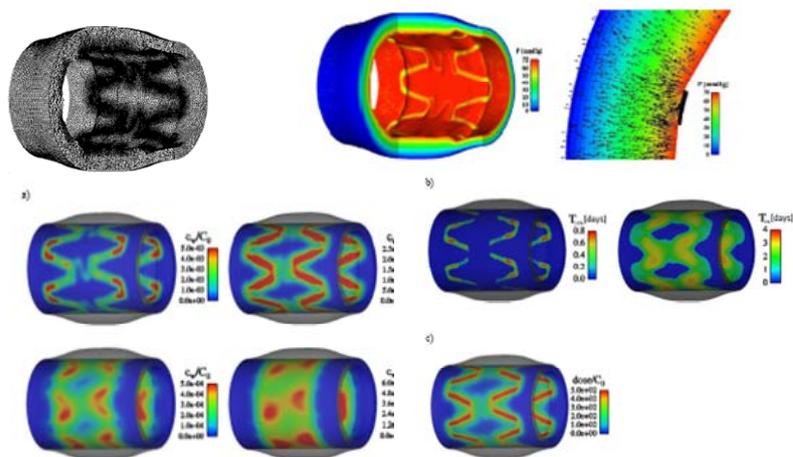


Figura 17: Filtrazione del plasma e trasporto di massa attraverso la parete arteriosa

Da tali simulazioni è possibile trarre importanti informazioni sul destino del farmaco dopo il rilascio dal rivestimento e ricavare una “mappa” spazio-temporale del suo percorso nell'arteria.

## **Capitolo 2**

### **Stato dell'arte: Rilascio di farmaci**

#### **2.1 Sistemi di rilascio controllato di farmaci**

La tecnologia del rilascio controllato di farmaci è un' area scientifica di frontiera che coinvolge approcci multidisciplinari. Il rilascio controllato di farmaci si ha combinando un polimero, naturale o sintetico, con uno o più farmaci, per far sì che il rilascio del principio attivo abbia luogo secondo un disegno prestabilito. E' opportuno distinguere tra rilascio prolungato e controllato.

Il rilascio prolungato ha luogo quando si utilizzano forme di dosaggio che somministrano un farmaco per un periodo lungo. Il rilascio, sempre più lento rispetto a quello ottenibile con forme di dosaggio tradizionale, è fortemente influenzato dall'ambiente esterno nel quale si trova.

Un sistema di rilascio controllato, invece, si realizza quando attraverso questo è possibile controllare la concentrazione di farmaco nel tessuto bersaglio, realizzando profili predeterminati; il profilo di rilascio dipende dalla forma del sistema stesso e dall'ambiente esterno. Non è detto che un sistema di rilascio controllato realizzi un rilascio prolungato, perché l'attenzione è mirata alla localizzazione del farmaco [117].

In figura 1 è rappresentato l'andamento della concentrazione di farmaco nel sangue nel tempo al variare del sistema di rilascio; vengono comparate le formulazioni di somministrazione tradizionale di rilascio immediato, con un rilascio prolungato e con un rilascio controllato.

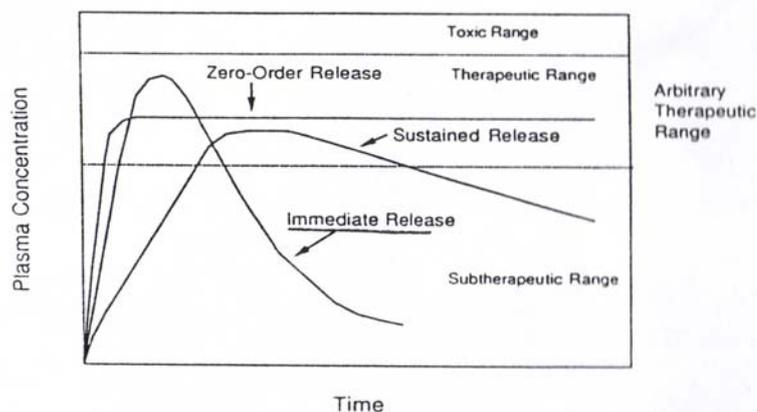


Figura : Andamento della concentrazione di farmaco nel tempo in diverse tipologie di rilascio

Un sistema ideale deve avere la capacità di fornire un rilascio con andamento prevedibile sia nello spazio che nel tempo, ma con le tecnologie attualmente disponibili è possibile solo un raggiungimento parziale di tale obiettivo. Nelle applicazioni mediche, inoltre, è auspicabile che il dispositivo sia inerte, biocompatibile, semplice da impiantare, somministrare e rimuovere, capace di contenere alte quantità di farmaco e facilmente fabbricabile e sterilizzabile [118].

I sistemi per il rilascio controllato sono, dunque, un utile strumento per superare le difficoltà legate alla somministrazione di farmaci proteici poiché offrono numerosi vantaggi rispetto alle forme convenzionali di dosaggio. L'utilizzo di sistemi di rilascio controllato è sempre più promettente nella cura di varie patologie da quando gli sviluppi nella conoscenza del genoma umano e le moderne tecnologie hanno permesso la produzione di una ampia gamma di proteine per uso terapeutico [119]. I farmaci proteici hanno un'emivita piuttosto bassa, variabile da pochi minuti a qualche ora, come evidenziato in tabella 1, e questo ne limita le possibilità di rilascio diretto in ambiente fisiologico. Ciò dipende da caratteristiche fisico-chimiche sfavorevoli, quali l'elevato peso molecolare, la carica, l'idrofilicità e le varie forme di instabilità che possono presentare, nonché da alcune caratteristiche biologiche quali la scarsa permeabilità delle membrane biologiche e il metabolismo presistemico dovuto agli effetti di primo passaggio.

Per superare tali inconvenienti è opportuno ricorrere a sistemi di rilascio capaci di proteggere la molecola proteica dagli attacchi biologici sino al raggiungimento del sito d'azione e ad inibitori proteolitici per aumentare l'emivita [120].

Gli obiettivi principali della tecnologia del rilascio controllato sono la riduzione della frequenza di somministrazione e della dose del farmaco, l'incremento dell'efficienza dello stesso tramite il rilascio in una limitata zona del corpo e il raggiungimento di un rilascio uniforme [121].

Action	Protein agent	Plasma half-life (min)	Potential use in tissue engineering
Cell proliferation	EGF [94]	2.32	Wound healing (stimulation of cell growth)
	bFGF [39]	1.5	
	TGF- $\beta$	11–160	
Cell differentiation	NGF [1]	2.4	Maintenance of cell function
	bFGF [95]	1.5	
Cell migration	Formyl peptides	Varying	Inflammatory response Nerve regeneration
	NGF [96]	2.4	
Cell aggregation	Antibodies [97]	Varying	Tissue formation
	HIV-1 Tat [98,99]		
	PEG-peptide conjugates		

Tabella . : Tempi di emivita di vari agenti proteici in ambiente fisiologico.

I dispositivi per il rilascio controllato di farmaci possono essere distinti secondo la cinetica di rilascio che realizzano (fig.2).

- ∞ Se la velocità di rilascio è costante fino all'esaurimento della carica di farmaco all'interno del dispositivo il rilascio è di ordine zero perché non dipende dalla carica residua
- ∞ Se la velocità di rilascio è proporzionale alla massa di agente contenuto nel device il rilascio è di primo ordine
- ∞ Se il profilo di rilascio è proporzionale al reciproco della radice quadrata del tempo il rilascio è quadratico.

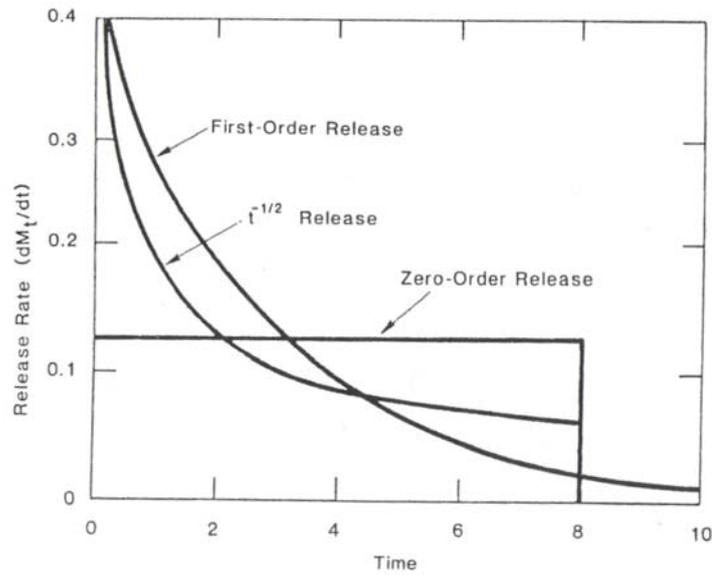


Figura 2: Cinetiche di rilascio di ordine zero, uno e  $t^{-1/2}$

La tecnologia del rilascio controllato presenta molti vantaggi, rispetto alla somministrazione sistemica tradizionale, che possono essere schematizzati come segue:

- ∞ I sistemi di rilascio controllato possono ottenere un profilo di rilascio che sia per un periodo quanto più lungo possibile compreso nella finestra terapeutica, cioè la sua concentrazione sanguigna deve essere superiore alla minima concentrazione efficace e inferiore alla minima concentrazione tossica. In figura 3 è mostrato il confronto tra le concentrazioni nel sangue di un farmaco somministrato per via convenzionale e lo stesso farmaco somministrato con un sistema a rilascio controllato.

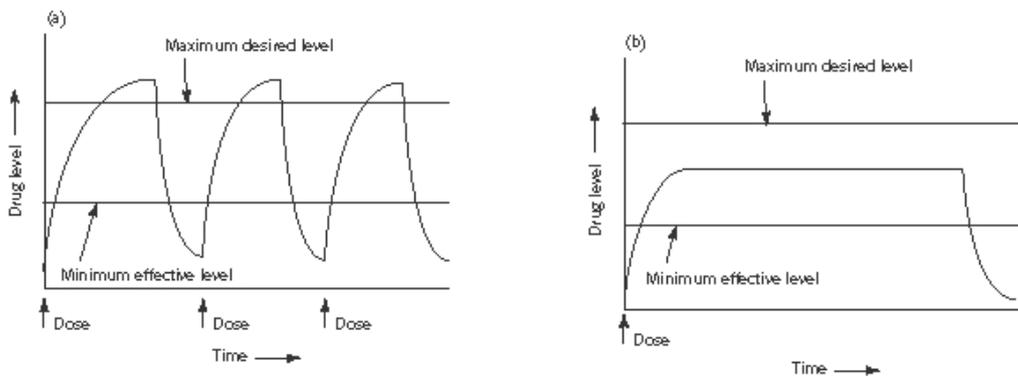


Figura 3: Confronto tra un sistema di rilascio convenzionale (a) e un sistema di rilascio controllato (b)

- ∞ Con le metodologie di somministrazione tradizionale, inoltre, si pone il problema della durata dell'attività biologica del farmaco all'interno del corpo umano. I principi attivi macromolecolari, infatti, hanno un'emivita in vivo molto bassa e quindi risultano spesso inefficaci poiché possono subire deattivazione o denaturazione. Con l'utilizzo di carriers polimerici è possibile proteggere l'agente incapsulato dall'ambiente biologico fino al momento del rilascio, migliorando così l'efficacia del trattamento farmacologico.
  
- ∞ Attraverso la tecnologia del rilascio controllato, inoltre, è possibile realizzare un rilascio localizzato al sito bersaglio. Un ulteriore miglioramento apportato da tale tecnologia alla medicina è la possibilità di avere una maggiore efficacia del farmaco con minori somministrazioni. Spesso, infatti, un regime terapeutico può protrarsi per periodi lunghi, talvolta anche anni. Strategie tradizionali comportano il ricorso a dosi elevate, che possono indurre una risposta tossica dovuta a sovradosaggio, o la reiterazione del trattamento che può mantenere la concentrazione di farmaco nel torrente ematico al di sotto della concentrazione minima efficace. Un rilascio controllato o prolungato di farmaco consente di rilasciare il farmaco localmente e in modo tale che la sua concentrazione sanguigna resti a lungo all'interno dell'intervallo terapeutico. In questo modo, dunque, la somministrazione può essere meno frequente e la risposta terapeutica migliorata [122].

Le formulazioni di rilascio controllato e la natura dei polimeri utilizzati evolvono continuamente e sono allo studio formulazioni che possano rispondere a variazioni ambientali o a stimoli esterni; possono essere citati a titolo di esempio i dispositivi sensibili al pH. Poiché molti dei polimeri sensibili al pH si rigonfiano in corrispondenza di alti valori e collassano a bassi valori di pH, l'evento di trigger del rilascio è determinato proprio dall'aumento del pH dell'ambiente esterno. [123]

## **2.2 Biomateriali per i sistemi di rilascio**

Un sistema di rilascio controllato può essere realizzato a partire da numerosi materiali e la scelta del materiale va effettuata accuratamente. Un materiale ideale deve essere chimicamente inerte e privo di impurezze, oltre ad avere anche una struttura fisica adatta, con invecchiamento minimo e una facile processabilità. [124]

Il meccanismo di degradazione e rilascio di un agente attivo può essere descritto in termini dei seguenti parametri:

- ∞ *La chimica del polimero biodegradabile*: la degradazione idrolitica dipende dalla natura e dalla posizione dei legami insaturi e dei gruppi reattivi presenti nella catena polimerica.
- ∞ *Velocità della reazione d'idrolisi*: il modo in cui il polimero degrada determina sostanzialmente il rendimento del dispositivo. La degradazione può progredire dalla superficie (degradazione eterogenea), uniformemente in tutta la matrice di polimero (degradazione omogenea), o dalla combinazione di questi meccanismi.
- ∞ *Progettazione del dispositivo*: l'agente attivo può essere disciolto o disperso nella matrice polimerica come parte di un sistema monolitico in cui la diffusione dell'agente attivo è controllata dalla degradazione o dalla diffusione, oppure in un serbatoio (reservoir) rivestito dal polimero, che controlla la diffusione del farmaco. [125]

La scelta del polimero è condizionata, inoltre, dalle interazioni tra polimero e farmaco, in particolare nei farmaci proteici. La penetrazione di acqua nel vettore in seguito all'impianto idrata il farmaco contenuto nella matrice, inducendo potenziali reazioni chimiche indesiderate tra le molecole della proteina o tra proteina e polimero, portando alla perdita di attività del farmaco. Infatti, le proteine possono subire varie forme di destabilizzazione legate essenzialmente a reazioni di idrolisi, racemizzazione, aggregazione o denaturazione [126].

Tra i materiali utilizzati o studiati per lo sviluppo di vettori per il rilascio controllato di farmaci vanno ricordati il poli-metilmetacrilato (PMMA), l'alcool polivinilico (PVA), l'acido poliacrilico (PAA). Tra i materiali di sviluppo più recente, possono essere citati i polilattidi (acido polilattico, PLA) e i poliglicolidi (acido poliglicolico, PGA), oltre ai loro copolimeri (tipicamente, l'acido polilattico-co-glicolico, PLGA) le cui formule di struttura sono indicate in figura 4.

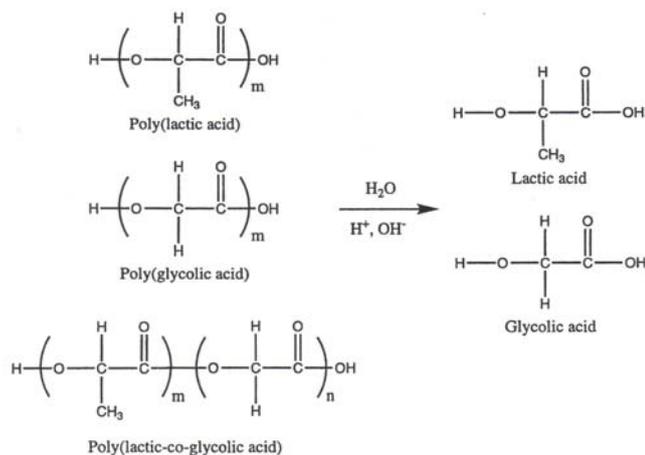


Figura 4: Formule di struttura del PLA, PLGA e dei loro copolimeri PLGA

Polimeri appartenenti a questo gruppo erano in origine adoperati come materiale di sutura assorbibile e, in seguito, sono stati impiegati per la fabbricazione di sistemi di rilascio biodegradabili. I polilattidi sono dei poliesteri che presentano il vantaggio di decomporsi in frammenti, biologicamente accettabili dall'organismo ospite, che sono poi metabolizzati e rimossi attraverso i normali processi metabolici. Inoltre tali polimeri sono sostanzialmente atossici e sono dei riconosciuti materiali biodegradabili. [127]

L'acido lattico è otticamente attivo e può essere prodotto in varie forme, acido poli(L-lattico), poli(D-lattico), e poli(D,L-lattico) che viene di solito utilizzato per la sua capacità di formare film; tutte le forme di PLA sono solubili nei comuni solventi e sono facilmente processabili.

L'acido poliglicolico è un solido cristallino con un elevato punto di fusione, circa 230°C, ed è pressoché insolubile nei comuni solventi organici. Quando è copolimerizzato con il PLA, con percentuali variabili tra il 30 e il 50%, il copolimero risultante è più facilmente manipolabile e solubile. Quindi, composizioni usualmente

adoperate variano dal PLA puro, che degrada in circa 12 mesi, al 50% di PGA, che degrada approssimativamente in 1 mese.[128]

Il meccanismo di degradazione per tutti i poliesteri sembra essere una semplice reazione omogenea autocatalitica la cui velocità è proporzionale alla concentrazione di acido carbossilico libero nel polimero. La velocità di erosione dipende dalla chimica dell'estere, dalla morfologia della matrice polimerica, dalla cristallinità e dalla morfologia. [129]

## **2.3 Meccanismi di rilascio**

Il rilascio dei farmaci dalle matrici polimeriche avviene attraverso meccanismi puramente diffusivi, degradativi e diffusivi in seguito a swelling. [130]

Quando il meccanismo è una pura diffusione le macromolecole sono rilasciate dal dispositivo per permeazione dal suo interno verso l'ambiente esterno; si può distinguere tra la diffusione macroscopica, attraverso i pori della matrice polimerica, o microscopica, attraverso le catene del polimero.

Un dispositivo *reservoir* è costituito da una membrana contenente il farmaco da rilasciare e l'agente attivo diffonde attraverso essa con una velocità controllata dalla natura e dallo spessore della membrana (fig. 5). La velocità di rilascio è costante per un lungo intervallo di tempo, e possono ottenersi cariche di materiale attivo più elevate rispetto ad altri sistemi. D'altra parte, le tecnologie di incapsulazione sono di solito piuttosto costose poiché è richiesto il controllo molto accurato di parametri di progetto quali lo spessore della membrana e l'area superficiale. [131]

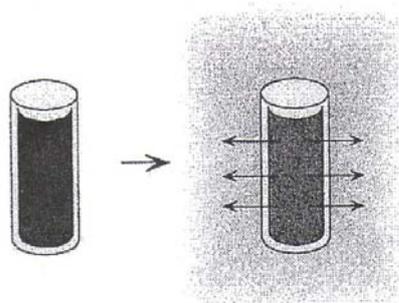


Figura 5 : Tipologia di un dispositivo reservoir controllato da meccanismo diffusivo

Il profilo di rilascio fornito da tali dispositivi dipende dalla concentrazione del materiale in equilibrio con la superficie interna della membrana. Se il serbatoio contiene una soluzione satura di farmaco, la velocità di rilascio è costante finché il principio attivo in eccesso resta nella soluzione. Se, invece, la soluzione contenuta nel dispositivo è insatura, la sua concentrazione decresce in funzione dell'agente rilasciato e, corrispondentemente, la velocità di rilascio decresce esponenzialmente nel tempo mostrando una cinetica di primo ordine.

Nei sistemi controllati dalla diffusione il dispositivo è stabile nell'ambiente biologico e non varia le sue dimensioni né per swelling né per degradazione. La diffusione del farmaco avviene attraverso i pori o la struttura macromolecolare del polimero dopo l'inserimento in vivo senza indurre cambiamenti nel polimero stesso.[132]

Esistono, poi, dispositivi *monolitici* in cui il materiale che deve essere rilasciato è disperso uniformemente nella matrice polimerica (fig. 6). Il profilo di rilascio è determinato dalla quantità di agente disperso, dalla natura dei componenti e dalla geometria del dispositivo. Tali dispositivi si definiscono soluzioni monolitiche quando il farmaco è liquido ed è dissolto nel mezzo polimerico, e dispersioni monolitiche quando il farmaco è poco solubile nel polimero e la sua frazione solida è dispersa in piccole particelle nel dispositivo. [133]

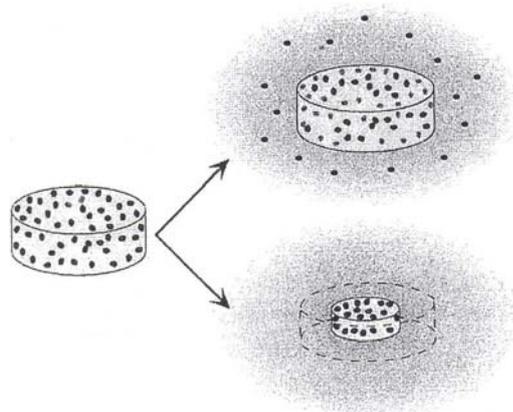


Figura 6: Dispositivi monolitici controllati da diffusione o da degradazione

Un vantaggio proprio dei dispositivi monolitici è legato al fatto che difetti quali micropori, che influenzano fortemente la cinetica di rilascio per sistemi reservoir, non la alterano sostanzialmente nei dispositivi monolitici. Questo permette di ottenere costi di

produzione inferiori. Questi vantaggi compensano lo svantaggio della velocità di rilascio decrescente nel tempo tipica di questi sistemi.

Vanno inoltre citati altri sistemi di rilascio tra cui gli osmotici, nei quali la pressione sviluppata dalla diffusione di acqua attraverso una membrana semipermeabile spinge una soluzione del principio attivo all'esterno del device, oltre ai sistemi controllati dallo swelling che sono inizialmente asciutti e, una volta introdotti nel corpo, assorbono acqua o fluidi biologici rigonfiandosi. Con lo swelling aumentano le dimensioni delle maglie del network polimerico costituente il dispositivo permettendo all'agente incapsulato di diffondere nell'ambiente esterno.[134]

## **2.4 Microsfere come sistemi di rilascio**

La ricerca tecnologica ha permesso la realizzazione di sistemi di rilascio in svariate forme e dimensioni. Una delle formulazioni più comuni, soprattutto per l'utilizzo di materiali biodegradabili, è quella delle microparticelle. Queste sono state utilizzate in sistemi di rilascio orali e iniettabili sottocutaneamente. [135] Grazie alla loro peculiarità di essere facilmente iniettabili, perciò, trovano ampio utilizzo in campo medico poiché per il loro impianto non è necessario ricorrere a un intervento chirurgico.

Attraverso svariate tecnologie, quali la doppia emulsione, lo spray-drying ed il freeze-drying, si possono fabbricare particelle di polimero con un ampio range di dimensioni, 1-100 nm per le nanoparticelle e 1-100  $\mu\text{m}$  per le microparticelle, in cui il principio attivo desiderato può essere collocato spazialmente in maniera differente [136].

Le *microcapsule* sono costituite da un cuore contenente l'agente terapeutico e da una membrana polimerica ben definita che funge da parete capace di trattenere la soluzione (fig. 7). Nelle applicazioni di rilascio controllato di farmaci, tali sistemi sono attualmente all'apice dell'interesse poiché il farmaco viene rilasciato attraverso un meccanismo governato dalla diffusione attraverso la membrana polimerica. Tali sistemi appartengono quindi alla categoria, già descritta in precedenza, dei sistemi *reservoir*, di conseguenza le microcapsule sono capaci di prolungare le cinetiche di ordine zero. Tali sistemi possono essere realizzati attraverso un complesso metodo di dispersione colloidale a tre fasi. L'attrattiva di ottenere un rilascio prolungato di ordine zero da microcapsule, può essere però inficiata da vari motivi tra cui gli elevati costi di

produzione, che limitano l'uso delle microcapsule a specifiche terapie, e la possibilità di rottura della membrana esterna, comportando così un rilascio improvviso di tutto il farmaco incapsulato con la conseguente problematica di sovradosaggio .

Una tecnica alternativa per la produzione di sistemi particellati per il rilascio di farmaci è quella della microemulsione, che porta alla formazione di *microsfere* che non sono caratterizzate dalla presenza del guscio esterno. Tali sistemi, infatti, sono *monolitici* in cui il farmaco è omogeneamente disperso nella matrice polimerica (fig. 7). Le cinetiche ottenibili sono quelle tipiche di rilascio da matrici, precedentemente descritte. [137]

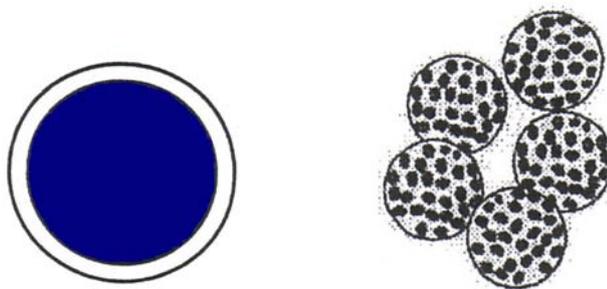


Figura 7 : Microparticelle in formulazioni di microcapsule e microsfere

Le caratteristiche fisiche, chimiche e il rilascio del farmaco dalle microsfere dipendono dall'azione terapeutica richiesta e sono determinate dai materiali e dalle tecnologie usate per la loro sintesi. Quindi, manipolando i parametri di progetto e di fabbricazione del vettore è possibile determinare il suo comportamento in vivo, ovvero la cinetica di rilascio. [138]

I solventi usati per sciogliere i materiali polimerici sono scelti secondo la stabilità e la solubilità sia del farmaco che del vettore polimerico in mezzo idrofilo e idrofobo rispettivamente, nonché secondo i costi di produzione. Inoltre i principi attivi possono essere o incorporati nelle microsfere durante il processo di fabbricazione oppure aggiunti successivamente tramite assorbimento superficiale. [139]

Il controllo delle dimensioni è un ulteriore parametro fondamentale nella realizzazioni di sistemi particolati e la distribuzione dei diametri è una variabile altresì importante. Sistemi particolati “grossolani” possono, infatti, essere preparati attraverso separazione di fase e liofilizzazione usando soluzioni farmaco/polimero o sospensioni. In questi casi però le particelle spesso non sono sferiche e caratterizzate da un'ampia

distribuzione delle dimensioni che ne alterano le cinetiche di rilascio ottenibili rendendole a volte non riproducibili all'interno dello stesso lotto di produzione.

Le microsfele, grazie alle dimensioni ridotte, presentano il vantaggio di un elevato rapporto superficie/volume. Anche le proprietà interfacciali sono estremamente importanti e spesso determinano il comportamento delle microsfele; infatti la tecnologia di fabbricazione dipende dalla creazione di un'ampia area interfacciale contenente il polimero che creerà dei legami interfacciali con la molecola di farmaco e dai metodi di cross-linking necessari per conferirne la stabilità nel tempo [140].

## **2.5 Sistemi di rilascio nei DES**

L'impianto di stent, come precedentemente descritto nel Capitolo 2, tende a danneggiare il vaso sanguigno comportando la proliferazione neointima, conosciuta come in-stent restenosi, la quale ostacola l'iniziale successo a seguito dell'intervento [141,142]. Recentemente, è emerso il concetto di usare gli stent coronarici per il rilascio locale di agenti antiproliferativi con farmacocinetiche programmate come soluzione ottimale per superare il problema della restenosi [143,72,144]. Lo scopo del rilascio localizzato di farmaco è quello di controllare, o ridurre, la crescita e migrazione delle cellule muscolari lisce così come quello di prevenire la risposta infiammatoria, principali cause della proliferazione neointima e della in-stent restenosi [145].

Numerosi trials clinici hanno dimostrato l'efficienza del rilascio locale di farmaci dai Drug-Eluting Stent ed attualmente sono una delle più promettenti strategie di trattamento per prevenire la restenosi dopo stenting. I DES assicurano il massimo rilascio dell'agente farmacologicamente attivo nel sito d'azione, poiché essi si trovano a diretto contatto la parete dell'arteria coronarica [146].

La scelta dell'ottimale tecnologia per il rilascio controllato di diversi farmaci dipende da molti fattori, tra cui le proprietà fisico-chimiche del farmaco, la durata del rilascio e il profilo che si desidera ottenere. E', quindi, molto importante conoscere gli svariati sistemi di rilascio attualmente disponibili per poter essere in grado di applicarli agli attuali DES per ottimizzarli o svilupparne dei nuovi.

☞ *Rilascio controllato dalla Diffusione*

Sistemi di rilascio controllati dalla diffusione utilizzano polimeri non solubili in acqua. Il **Cypher** stent della Cordis Corp. utilizza una miscela di poli(n-butil-metacrilato) (PBMA) e poli(etilene-co-vinil acetato) (PEVA) in cui è disperso l'agente attivo, il Sirolimus. La presenza di un topcoat rende tale stent un dispositivo *reservoir*. La figura 8 A mostra la struttura base di tale stent, evidenziando la maglia metallica rivestita con la matrice polimerica e il topcoat, mentre la figura 8 B mostra il profilo di rilascio *in vitro* del sirolimus per i primi 30 giorni.

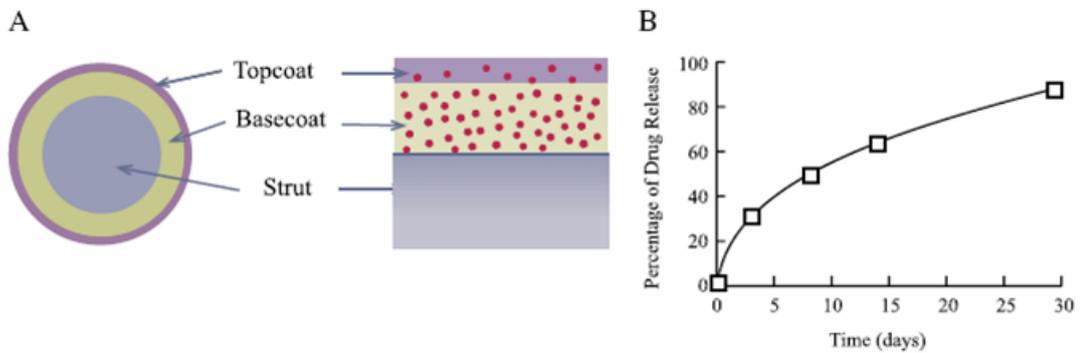


Figura 8: Schema strutturale dello stent Cypher (A), profili di rilascio di Sirolimus da Cypher (B)

Il rilascio di farmaci da sistemi controllati da pura diffusione può essere descritto dalla seguente equazione:

$$M = SDK \frac{\Delta C}{h} \left( t + \frac{h^2}{3D} \right)$$

dove M è l'ammontare totale di farmaco rilasciato, S è l'area superficiale disponibile per il rilascio, D e K sono rispettivamente il coefficiente di diffusione e il coefficiente di partizione del farmaco nella membrana che controlla il rilascio,  $\Delta C$  è il gradiente di concentrazione, h è lo spessore della membrana e t è il tempo di rilascio. Il termine  $h^2/3D$  tiene conto dell'iniziale burst prima di raggiungere lo stato stazionario.

Il topcoat nel Cypher stent è la membrana che controlla la cinetica di rilascio e nonostante sia inizialmente scarica, il farmaco migra in essa dopo la fase di preparazione determinando il burst iniziale nei primi giorni che rilascia una quantità

sufficiente di farmaco tale da prevenire la neointima iperplasia subito dopo l'impianto dello stent.

Il **TAXUS** stent della Boston Scientific utilizza, invece, un copolimero triblocco, il Translute™, a base di poli(stirene-b-isobutilene-b-stirene) per il rilascio sostenuto di Paclitaxel. Il farmaco è rilasciato direttamente dalla matrice polimerica di Translute nell'ambiente circostante senza l'utilizzo di una barriera di controllo, rendendo così il Taxus un sistema *monolitico* il cui rilascio è controllato dalla diffusione. La figura 9A mostra la struttura di tale stent dalla quale si evince l'assenza della barriera polimerica di controllo, mentre la figura 9B mostra i profili di rilascio dagli stent.

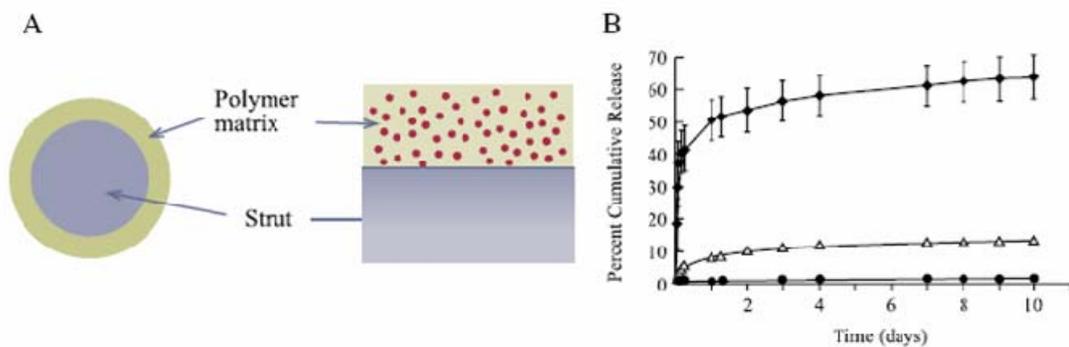


Figura 9: Schema strutturale dello stent Taxus (A), profili di rilascio di Paclitaxel da Taxus (B)

Tali profili di rilascio ottenuti a partire da matrici contenenti eccesso di farmaco, sono descritti dalla seguente equazione:

$$M = S[DC_s(2A - C_s)t]^{1/2}$$

dove M, S, D e t hanno lo stesso significato precedentemente descritto, mentre  $C_s$  e A sono la solubilità del farmaco nella matrice polimerica e la concentrazione totale di farmaco, rispettivamente.

Tre diverse formulazioni, contenenti la stessa dose di farmaco di  $1 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ , sono disponibili in commercio e ognuna di essa determina una cinetica di rilascio differente. L'area superficiale rimane la stessa per tutte le formulazioni e i differenti profili sono dovuti a differenti valori di D, che possono essere variati semplicemente cambiando la concentrazione di polimero nella matrice. Poiché il rapporto farmaco-polimero decresce, la massa di polimero, e quindi lo spessore del rivestimento, aumenta.

Questo è un semplice approccio per poter controllare la cinetica di rilascio utilizzando lo stesso sistema farmaco-polimero.

☞ *Rilascio controllato da Scambio Ionico*

Poiché sono presenti una moltitudine di ioni nel nostro corpo, lo scambio ionico è un valido approccio nel rilascio controllato di farmaci elettricamente carichi.

Lo stent **BiodivYsio**, della Biocompatible, è rivestito con un polimero sintetico contenente parti della phosphorylcoline che rende la superficie più biocompatibile [150].

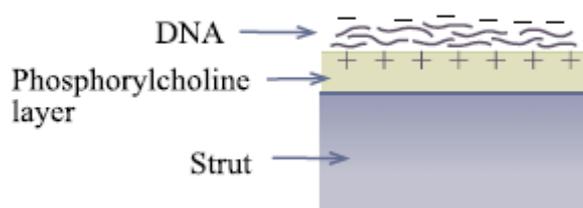


Figura 9: Schematizzazione della struttura del BiodivYsio stent

Il layer di phosphorylcholine carico positivamente, interagisce con molecole cariche negativamente, come il DNA per esempio, attraverso interazioni elettrostatiche. Il DNA legato può essere lentamente rimpiazzato da ioni carichi negativamente presenti nel corpo e più affini al layer polimerico (fig. 9).

Oltre i DES già utilizzati nella pratica clinica, altri nuovi dispositivi sono al vaglio sperimentale per migliorare la riuscita terapeutica della procedura di stenting. La direzione in cui la ricerca si sta muovendo è l'utilizzo di ulteriori meccanismi di rilascio che meglio possano esplicare la funzione terapeutica richiesta.

☞ *Rilascio controllato dalla Dissoluzione/Degradazione*

Lo stent **Achieve**, della Cook Inc., può essere direttamente impregnato con un farmaco senza l'utilizzo di un layer polimerico; lo stent viene semplicemente immerso in una soluzione di Paclitaxel ed etanolo, e a seguito dell'evaporazione del solvente si forma un fine residuo di farmaco sulla superficie metallica (fig. 10) [147].

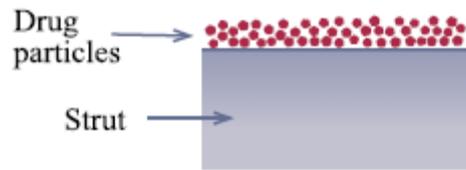


Figura 10: Schematizzazione della struttura del Achive stent

Poiché non è presente un layer polimerico la maggior parte del farmaco viene rilasciato istantaneamente.

Un'ulteriore applicazione di tale tipologia di sistemi per il rilascio di farmaco a base di Dissoluzione/Degradazione è riscontrabile nel **Conor** stent, della Conor Medsystems, il quale è caratterizzato da numerose cavità sulla sua superficie, ognuna delle quali viene riempita con una soluzione di farmaco e polimero biodegradabile (generalmente PLGA) (fig. 11) [148].

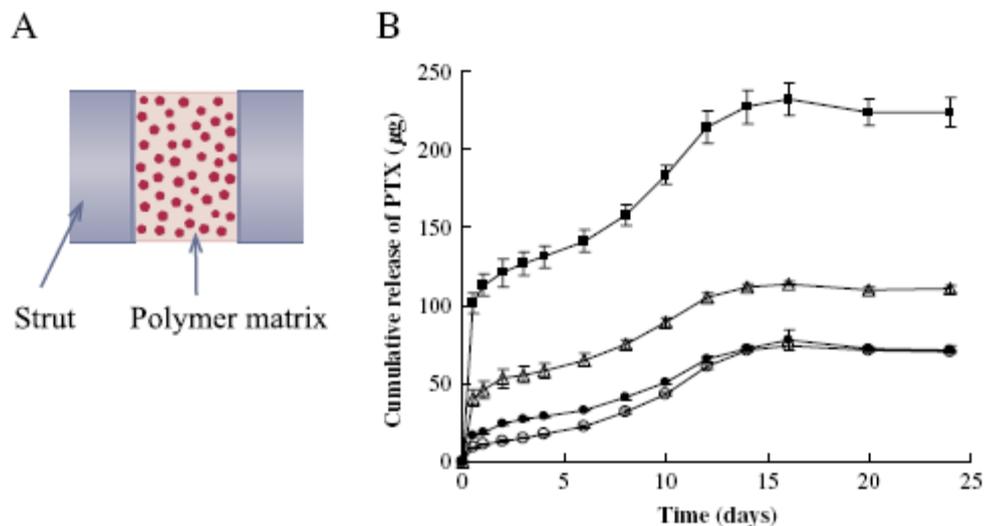


Figura 11: Schema strutturale dello stent Conor (A), profili di rilascio di Paclitaxel da Conor (B)

Il Paclitaxel caricato viene lentamente rilasciato a seguito della degradazione del PLGA all'interno delle cavità ed il profilo di rilascio può essere facilmente modulato controllando la cinetica di degradazione del PLGA variando il rapporto di acido lattico/glicolico.

Un sistema analogo è il **Janus CarboStent™** caratterizzato da profonde scanalature sulla superficie esterna dello stent che possono essere utilizzate come

contenitori di farmaco, il tacrolimus [149] La superficie dello stent viene prima trattata con un rivestimento integrale di carbofilm, noto per rendere la superficie meno trombogena a contatto con il sangue. Le scanalature aumentano la capacità di carica di farmaco fino a cinque volte rispetto ai tradizionali DES disponibili delle stesse dimensioni. Le scanalature possono essere, inoltre, riempite di solo farmaco o di una soluzione polimerica che lo contenga (fig. 12).

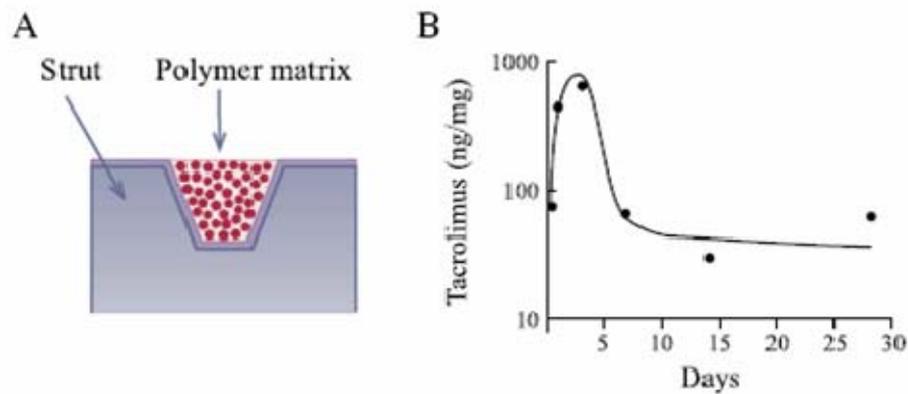


Figura 12: Schema strutturale dello stent Janus (A), profili di rilascio in vivo di Paclitaxel da Janus(B)

La principale limitazione di tali innovativi sistemi consta nell'essere comunque dei sistemi omogenei, in cui cioè il farmaco è uniformemente disperso nella matrice polimerica.

Un'idea innovativa, su cui si basa tale progetto di Dottorato, potrebbe essere l'utilizzo combinato di più sistemi di rilascio quali matrice polimerica di rivestimento e microsferi biodegradabili.

## **Capitolo 3**

# **Rivestimento polimerico di stent coronarici**

## **Introduzione**

Il più importante progresso nell'intervento percutaneo coronarico (PCI) dall'introduzione dell'angioplastica è stato l'utilizzo clinico degli stent nelle arterie coronariche [151]. Nonostante la procedura di stenting, oggi di routine nella pratica clinica, si sia rivelata efficace, numerosi trials riportano un'elevata incidenza di in-stent restenosi (ISR) [152]. Tale evenienza può essere attribuita ad un'eccessiva risposta tessutale al trauma subito dal vaso durante il posizionamento dello stent oltre alla risposta infiammatoria, caratteristica della reazione tessutale all'introduzione di corpi estranei. Oltretutto, la superficie metallica dello stent è intrinsecamente trombogena e recenti studi hanno dimostrato che la composizione dello stent, così come la geometria e le caratteristiche della superficie, possono influenzarne la biocompatibilità [153].

Attualmente, la ricerca ha focalizzato la sua attenzione sulla struttura e composizione dello stent, con particolare attenzione a come il vaso risponde all'introduzione del dispositivo e ai metodi utilizzabili per aumentarne la biocompatibilità [47].

Il concetto di un rivestimento protettivo tra la superficie dello stent ed il tessuto vascolare è attraente e si è rivelato essere una valida soluzione per aumentare la biocompatibilità del dispositivo limitando così l'eccessiva reazione infiammatoria.

Molti materiali sono comunemente utilizzati come rivestimento con lo scopo di migliorare le performances degli stent, e tra questi i polimeri giocano un ruolo importante per la loro documentata biocompatibilità [48].

Appare evidente, da quanto precedentemente esposto, che l'utilizzo di materiali non solo biocompatibili, ma anche capaci di ridurre al tempo stesso il danno tessutale durante l'impianto di stent sia altamente auspicabile. In tale ambito di ricerca si sviluppa la parte iniziale di questo progetto mirata alla realizzazione di stent rivestiti di un idrogel polimerico, il quale a contatto con il flusso ematico si idrata rendendo la superficie più soffice e, quindi, l'impianto meno traumatico. La scelta del polimero ideale a tale applicazione è caduta sul poli(idrossi-etil-metacrilato) pHEMA per le sue ben note proprietà di biocompatibilità ed interazione con i fluidi biologici.

Scelto il materiale si è passati all'ottimizzazione di una tecnica spray innovativa capace di rivestire stent coronarici con un sottile strato di idrogel, saldamente adeso alla superficie metallica. Tale tecnica è stata sviluppata ponendo particolare attenzione all'adesione dell'idrogel alla maglia metallica e alla sua stabilità chimica nel tempo, per realizzare uno stent capace di resistere alla procedura chirurgica e all'esposizione in ambiente biologico.

## **3.1 Materiali**

### **3.1.1 Stent e Acciaio 316L**

Lo stent coronarico su cui è incentrato il lavoro di tesi è lo stent Tsunami Gold (*Fig. 1*), realizzato dalla Terumo Corporation (Ashitaka, Japan).

Lo stent, di tipo balloon expandable, è realizzato in acciaio 316 L, un particolare acciaio inossidabile a basso contenuto di carbonio, appartenente alla categoria degli austenitici, tagliato al laser per realizzare la sottile geometria della maglia. Questo presenta alle sue estremità due markers radiopachi in oro, che posti sulla parte distale e prossimale dello stent ne garantiscono la massima visibilità e facilitano il suo perfetto posizionamento sulla lesione.

Lo stent viene fornito premontato su un catetere a palloncino semicompiante, ipotubo "Arashi", rapid exchange, dopo essere stato sterilizzato con ossido di etilene.

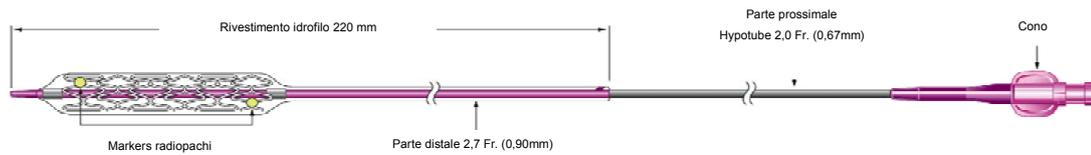
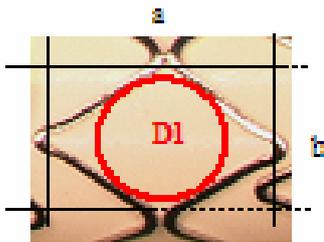


Figura 1: Stent Tsunami Gold

I modelli disponibili, utilizzati per le procedure di stenting delle patologie vascolari coronariche, quali ad esempio la stenosi, hanno diametri che variano da 2,0 a 4,0 mm e lunghezze da 8 a 30 mm.

Le celle hanno un disegno a diamante e sono collegate da una doppia connessione (Duo-Link); sono inoltre alternate e di numero variabile in base al diametro (5 celle x i diametri 2.0-2.25 mm, 6 x 2.5-3.0 mm, 7 x 3.5-4.0 mm) per garantire una copertura vasale costante, che è circa del 16,3% (tab 1).



	2.5mm	3.0mm	3.5mm	4.0mm
Pre-dilatation (a x b)	2.08 x 0.49	2.08 x 0.49	2.42 x 0.49	2.86 x 0.49
Post-dilatation (a x b)	1.71 x 1.28	1.48 x 1.54	1.69 x 1.80	2.04 x 2.06
DI (diameter)	0.9	0.9	1.2	1.4

Tabella 1: Dimensioni celle dello stent Tsunami

Lo stent Tsunami è caratterizzato da un'elevata flessibilità e facilità di posizionamento grazie all'unicità del suo rivestimento polimerico idrofilico di M Coat sulla punta e sullo shaft, al basso profilo di ingresso (0.017 mm).

Inoltre risulta essere uno degli stent in acciaio con il più basso spessore di maglia (0,08 mm) attualmente sul mercato (fig.2).

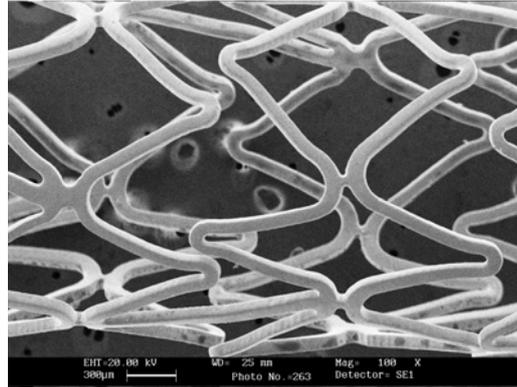


Figura 2. Micrografia SEM dello stent Tsunami gold

Le sue peculiari caratteristiche lo rendono indicato anche per il trattamento dei piccoli vasi [154].

Nella prima fase della ricerca, sono stati inoltre utilizzati differenti tipologie di stent per valutare l'influenza della geometria sulla tecnica di rivestimento. Sono stati, dunque, analizzati stent prodotti dalla Guidant, nelle versioni Pixel e Zeta, che differiscono tra loro per la geometria della maglia e per le dimensioni, tutti realizzati in acciaio AISI 316L (fig. 3).

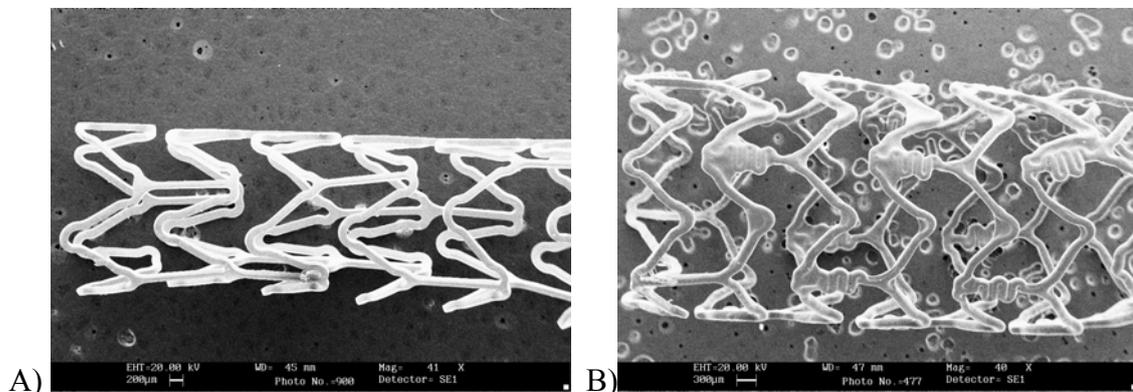


Figura 3: Micrografie SEM dello stent Pixel (A) e Zeta (B) della Guidant

Prove preliminari tese alla scelta del materiale da utilizzare e test di caratterizzazione ed adesione sono stati effettuati su lastre di acciaio 316L, caratterizzate preventivamente da un'analisi all'EDS necessaria per assicurare la medesima composizione dell'acciaio.

### **3.1.2 Poli(2-idrossietil-metacrilato) (pHEMA)**

A partire dal pionieristico lavoro di *Wichterle e Lim* del 1960 sugli idrogeli crosslinkati di pHEMA [155], e grazie al loro carattere idrofillico e alla potenziale biocompatibilità, gli idrogeli sono stati all'apice dell'interesse per gli scienziati biomaterialisti per molto anni [156]. Gli idrogeli a base sia di polimeri naturali che sintetici hanno continuato ad essere d'interesse per l'incapsulazione di cellule [157] e più recentemente alcuni idrogeli sono diventati particolarmente indicati nel nuovo filone della *tissue engineering* come matrice per il riparo e la rigenerazione di un'ampia varietà di tessuti ed organi [158].

Gli idrogeli sono network di polimeri idrofillici capaci di assorbire acqua dal 10-20% fino a cento volte il loro peso a secco; possono essere chimicamente stabili o possono degradare ed eventualmente disintegrarsi e dissolversi. Vengono chiamati gel "reversibili", o "fisici", quando il network è tenuto insieme da un reticolo molecolare e/o forze secondarie quali forze ioniche, idrofobiche e ponti idrogeno [159]. Vengono, invece, chiamati "permanenti", o "chimici", quando covalentemente crosslinkati. Essi possono essere inoltre realizzati attraverso il crosslinking di polimeri solubili in acqua, o per conversione di polimeri idrofobici ad idrofillici in aggiunta ad un crosslinking per generare il network.

A questa famiglia di materiali appartiene il poli(2-idrossietil-metacrilato), pHEMA, che ci è stato fornito dalla Sigma-Aldrich sotto forma di cristalli già polimerizzati e dal peso molecolare di 20,000 Da, disciolto successivamente in etanolo per ottenere una soluzione liquida del polimero. Più nel dettaglio, una soluzione di pHEMA/etanolo al 10% w/v è stata ottenuta mettendo i cristalli in etanolo in agitazione magnetica fino alla completa realizzazione di una soluzione omogenea e fluida.

Grazie alla sua elevata biocompatibilità il pHEMA ha trovato ampio utilizzo in campo biomedico, soprattutto in quei settori in cui è necessaria una buona interazione con fluidi biologici, quale ad esempio l'utilizzo come lentine a contatto. Il pHEMA è un tipo di idrogelo che comunemente possiede un network tridimensionale ed è capace di ritenere un'elevata quantità d'acqua senza dissolversi. Tali idrogeli hanno guadagnato un ampio riconoscimento per la loro idoneità nei tessuti soffici e per applicazioni

sottocutanee oltre che per la loro buona energia meccanica, resistenza chimica e il loro relativamente elevato contenuto d'acqua [160,161].

Essi sono stati considerati anche per applicazioni impiantabili includendo organi artificiali bioibridi [162], dispositivi per il rilascio controllato [163], e sistemi di rilascio di insulina [164].

Membrane non porose di pHEMA sono state ampiamente studiate come sistemi modello per la diffusione di soluti a basso peso molecolare in idrogeli densi [165]. In tali sistemi, la diffusione è determinata principalmente da due fattori: la densità di crosslinking del network o dalla dimensione della maglia e il grado di swelling.

Se un farmaco proteico con carica netta opposta a quella dell'idrogelo viene caricato nella matrice polimerica, è possibile che i pori in superficie vengano otturati durante la carica del gel. Di conseguenza quando una proteina viene caricata in un tale network, la forza ionica, il pH e la soluzione tampone usata nella preparazione del gel possono, da soli o insieme, controllare l'ammontare e la distribuzione della proteina caricata. Il rilascio di un farmaco macromolecolare da un idrogelo sarà controllato dalla frazione di volume poroso, dalla dimensione dei pori e dalla loro interconnessione, dalla dimensione della molecola del farmaco e dal tipo e dalla forza di interazione che esiste tra il farmaco e la catena polimerica che crea il network dell'idrogelo.

## **3.2 Metodi**

Nella prima fase del progetto si è effettuata una caratterizzazione generale dei materiali utilizzati per la realizzazione del layer polimerico sulla superficie metallica dello stent di cui di seguito si riportano le specifiche e i principi di funzionamento degli strumenti utilizzati.

### **3.2.1 Caratterizzazione dei materiali**

#### ***Calorimetria Differenziale a Scansione (DSC) del pHEMA***

Al fine di ottenere una caratterizzazione termica dei materiali utilizzati, sono state effettuate campagne di analisi al DSC e alla TGA.

Per determinare la temperatura di transizione vetrosa del pHEMA è stato utilizzato un TA Instrument DSC 2910. Il polimero è stato testato nella sua forma bulk, come fornito dalla Sigma, in capsule non ermetiche di alluminio impostando un range da temperatura ambiente a 200°C con velocità di riscaldamento di 10°C/min in atmosfera controllata, utilizzando gas di azoto.

La calorimetria differenziale (DSC) è una tecnica usata per studiare cosa succede al materiale quando viene riscaldato, quindi per studiare le transizioni termiche.

Nella DSC le temperature del campione e di un riferimento inerte, cioè che non subisce alcuna variazione durante il processo, sono misurate e controllate rispetto a un programma di variazione delle temperature in funzione del tempo. Le curve DSC riflettono le variazioni energetiche del materiale esaminato e le variazioni strutturali subite sono accompagnate da effetti energetici in modo da avere grafici caratteristici per transizioni vetrose, fusioni e cristallizzazioni.

Con questo metodo possono essere studiati:

- $T_g$ , (temperatura di transizione vetrosa) di materiali amorfi e semicristallini
- La cristallizzazione di polimeri semicristallini
- Stabilità ossidativi
- Purezza del materiale e identificazione di materiali incogniti
- Capacità termica  $C_p$

Per quanto riguarda l'analisi al DSC di polimeri, i grafici risultanti differiscono a seconda della tipologia di polimero e variano per polimeri cristallini ed amorfi.

*Polimeri semicristallini:*

La transizione avviene a  $T$  costante ed è evidenziata da un picco endotermo (la convenzione endo e eso è arbitraria, quindi il picco può essere rivolto verso il basso o verso l'alto) posizionato a cavallo della temperatura di fusione,  $T_m$ . L'area del picco è proporzionale alla massa, all'entalpia di fusione e alla percentuale di cristallinità del campione (fig.4).

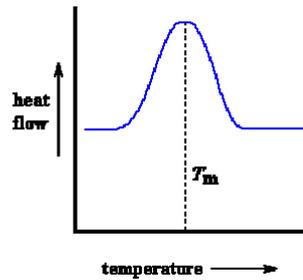


Figura 4: Picco di fusione in un'analisi DSC

I picchi di fusione dei polimeri saranno più ampi rispetto a quelli di sostanze a basso peso molecolare perché nei polimeri si ha distribuzione ampia di dimensioni e di imperfezioni dei cristalli infatti la temperatura di fusione è inversamente proporzionale a dimensioni e perfezione dei cristalli.

La forma e la posizione dei picchi dipende inoltre dalla velocità di riscaldamento (il surriscaldamento sposta i picchi verso temperature più elevate al contrario velocità basse si possono avere fenomeni di ricristallizzazione che spostano i picchi a temperature di fusione più basse), dalla quantità e dalla forma del campione così da avere picchi di fusione multipli.

*Polimeri amorfi:*

Questi polimeri si possono trovare in tre stati fisici diversi: vetroso, gommoso, viscofluido.

Nello stato *vetroso* si hanno movimenti vibrazionali degli atomi attorno alle posizioni di equilibrio. Nello stato *gommoso* si possono avere vibrazioni di torsione delle unità macromolecolari e le catene sono rese relativamente flessibili. Nello stato *viscofluido* si ha elevata mobilità delle catene che assumono conformazioni disordinate.

Il passaggio tra stato vetroso e gommoso è chiamata transizione vetrosa ed è caratterizzata da un flesso nel tracciato DSC in corrispondenza della  $T_g$ , dovuto a una modesta variazione nella capacità termica in funzione di T (fig.5).

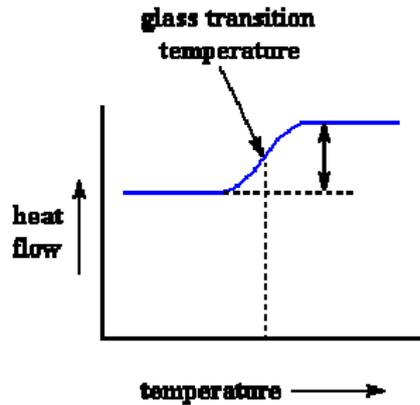


Figura 5: Passaggio di stato da vetroso a gommoso

Il valore della  $T_g$  dipende fortemente dalle modifiche termiche subite dal polimero, è possibile che uno stesso polimero abbia diversi stati vetrosi corrispondenti a loro volta a diverse quantità di “volume libero”, non occupato da segmenti macromolecolari, immagazzinato durante la fase di raffreddamento.

La  $T_g$  misurata durante il ciclo di riscaldamento è di solito diversa da quella misurata durante il raffreddamento. La DSC è infatti una tecnica relativa e la differenza di temperatura con l’ambiente esterno è importante.

Inoltre il tracciato DSC risulta influenzato da velocità di raffreddamento/riscaldamento, il flesso si trasforma in un picco se la velocità di raffreddamento è stata più bassa della velocità di riscaldamento durante la misura, il picco corrisponde all’entalpia immagazzinata nella fase di raffreddamento.

### ***Analisi Termo-Gravimetrica (TGA) del pHEMA***

L’analisi di perdita in peso dinamica, per esaminare l’effetto della composizione sulla degradazione termica del pHEMA, è stata effettuata con uno strumento termogravimetrico DuPon TGA 951. Ancora una volta i campioni sono stati testati in atmosfera controllata, azoto, con una velocità di scansione di  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ , in questa analisi però il polimero è stato portato da temperatura ambiente a  $600^\circ\text{C}$ .

L’analisi termogravimetrica, TGA, è la seconda tecnica più conosciuta per l’analisi termica. Tramite quest’ultima, infatti, è possibile determinare le variazioni di peso in un materiale in funzione della temperatura sotto determinate condizioni di

atmosfera controllata. La sua applicazione principale include la determinazione della stabilità termica e composizione dei materiali.

La bilancia costituisce il cuore dello strumento termoanalitico e permette la continua misura della massa del campione mentre temperatura e/o tempo variano. Il campione può essere raffreddato o riscaldato a velocità selezionata o può essere mantenuto a temperatura fissa, isoterma (convenzionali scansioni termiche sono comprese tra 5 e 20 °C/min). Quindi, la bilancia, inserita in un analizzatore termico viene chiamata “termobilancia” per indicare che il sistema deve essere in grado di seguire la massa del campione in un certo definito intervallo di temperatura, senza che la “testa di misura” della bilancia subisca una variazione termica.

Sottoposto a tali variazioni di temperatura, il campione può evolvere gas corrosivi o reattivi con il materiale di cui è costituita la bilancia stessa; in questo caso bisogna operare con un sistema di gas di protezione. Si usa un gas inerte (comunemente N<sub>2</sub>) che riempie con una leggera sovrappressione la parte dove è alloggiata la “testa di misura” della bilancia. In tal modo, i gas che evolvono dal campione alloggiato nel fornello salendo non possono entrare nella bilancia, poiché trovano una pressione superiore.

La curva TGA in funzione della temperatura del campione viene ottenuta riportando in ordinata la massa percentuale piuttosto che la massa assoluta, per permettere una più facile comparazione tra diverse curve

### ***Reologia***

Per la caratterizzazione reologica è stato utilizzato il reometro rotazionale GEMINI della Bohlin Instruments. Il GEMINI può lavorare sia a controllo di sforzo che di deformazione (stress & strain controlled) e permette di effettuare sia prove stazionarie e in transitorio (stress relaxation, creep) che dinamiche (fig. 6).

Avendo scelto come metodologia di rivestimento quella dello spraying la soluzione polimerica verrà sottoposta a shear stress ed è importante, per noi, sapere come reagirà a tale sollecitazione. Di conseguenza è opportuno effettuare un'analisi reologica al fine di verificare se il comportamento sia o meno quello di un fluido newtoniano.



Figura 6: Immagine del reometro GEMINI

Non avendo una stima dell'effettivo shear imposto, anche a causa della possibilità di cambiare la potenza, le analisi effettuate al reometro sono state effettuate impostando un ampio range di shear stress nel quale studiare il comportamento del materiale polimerico. La soluzione al 10% w/v pHEMA/etanolo è stata posta nel reometro e testata fino a un valore di shear rate pari a  $1500 \text{ s}^{-1}$ .

### **3.2.2 Tecnica di rivestimento**

#### ***Aerografo***

L'aerografo è un strumento simile ad una piccola pistola a spruzzo che, tramite l'aria compressa generata da un compressore esterno o alimentata da un serbatoio, nebulizza un fluido creando campiture omogenee caratteristiche di questa tecnica.

Per illustrare con semplicità le modalità di funzionamento dell'aerografo basta avere presente un comunissimo nebulizzatore. Lo spruzzatore rappresenta lo strumento più elementare che utilizzi l'effetto aspirante di un flusso d'aria, figura 7. L'aria soffiata dentro la cannucchia (a) e direzionata in corrispondenza dell'estremità superiore del tubicino (b), risucchia il fluido contenuto nel serbatoio (c), che risale lungo il tubicino (b) per poi essere nebulizzato all'estremità del tubo stesso. Queste azioni di aspirazione e nebulizzazione sono le stesse che si verificano nel funzionamento dell'aerografo.

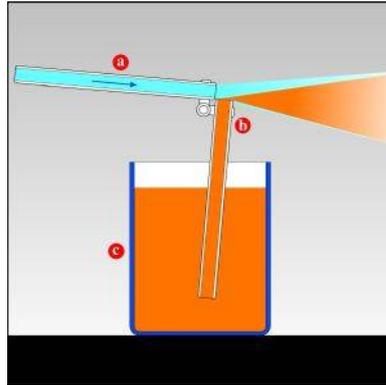


Figura 7 : Principio di funzionamento del nebulizzatore

La spiegazione fisica di questi effetti viene data dal principio di Venturi e dall'equazione di Bernoulli. Il principio di Venturi dice che un gas, costretto a passare attraverso un condotto la cui sezione ad un certo punto diventa inferiore, acquista velocità. A questo principio si collega Bernoulli, la cui equazione dice che quando il suddetto gas, costretto ad attraversare un condotto di diverse sezioni, acquista velocità per il principio di Venturi, si verifica anche una diminuzione di pressione in corrispondenza della strozzatura del tubo. Osservando la figura 8, si nota come il gas che passa dalla sezione (a) del tubo, acquisti velocità quando entra nella sezione (b). La pressione, in corrispondenza del tubo nella zona (a) ha un certo valore  $P$  che diminuisce al valore  $P_1$  in corrispondenza della strozzatura (b), dove il gas aumenta di velocità. Questa diminuzione di pressione determina la risalita del fluido (c) lungo il tubo e questa risalita (h) è tanto maggiore e rapida quanto è maggiore la velocità del gas nella strozzatura (b) del tubo e quanto è maggiore la differenza tra i due valori di pressione  $P$  e  $P_1$ .

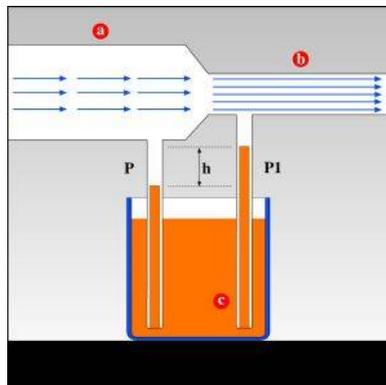


Figura 8: schematizzazione dell' aerografo

A seconda degli usi e delle esigenze si distinguono due tipi di aerografi: **a doppia** e **a singola azione**.

Con il nome di aerografi a **singola azione** si distinguono quegli apparecchi in cui è possibile solo regolare l'ingresso dell'aria premendo il pulsante A in figura 9. Il fluido viene aspirato dal serbatoio e nebulizzato sulla estremità del puntale quando incontra il getto di aria compressa. La portata del fluido può essere regolata solo prima di azionare l'aria, e non durante la sessione di lavoro, e il conseguente getto resta comunque uniforme fino al momento in cui ci si fermerà e se ne modificherà la quantità.

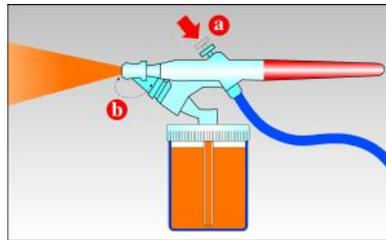


Figura 9: aerografo a singola azione

In quelli a **doppia azione** si può regolare sia l'ingresso dell'aria che quello del fluido (fig. 10). Nel caso degli aerografi a **doppia azione indipendente** il tasto va premuto verso il basso per aprire la valvola dell'aria, e va trascinato verso la parte posteriore dell'aerografo per aprire il fluido. Questo trascinamento lungo l'asse dell'aerografo fa indietreggiare l'ago, liberando l'ugello (o duse) e permettendo alla soluzione di essere aspirata e di fuoriuscire per poi essere nebulizzata. Tanto più si fa indietreggiare l'ago attraverso il movimento del pulsante all'indietro, tanto più si libera l'ugello, tanto più fluido fuoriesce [166].

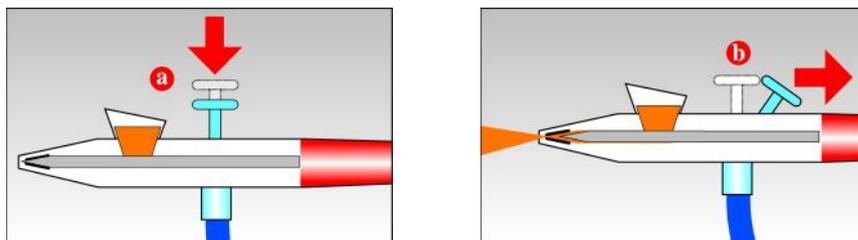


Figura 10: Funzionamento dell'aerografo a doppia azione indipendente

Per la nostra applicazione abbiamo scelto la tipologia dell'aerografo a doppia azione controllata così da poter avere un parametro in più da poter modificare per ottimizzare il rivestimento.

### ***Spray-coating***

Per le prove di rivestimento degli stent è stato necessario mettere a punto un sistema che ci permettesse di rivestire il campione in tutte le sue parti in maniera omogenea.

Un sottile layer di pHEMA è stato realizzato mettendo a punto una tecnica spray modificata basata sul movimento rotatorio dello stent durante il rivestimento con l'aerografo. Lo stent è stato messo in rotazione da uno stage motore (ProScan, Prior) con controllo remoto da PC (Microspft© HyperTerminal) mantenendo una velocità costante. Il principio alla base della tecnica spray di rivestimento è la collisione di aria e liquido per realizzare una nebulizzazione. Il flusso d'aria viene "sparato" da un compressore nell'ugello dell'aerografo a doppia azione trascinando la soluzione polimerica di pHEMA e etanolo (10%w/v) contenuta nel recipiente. Il sistema in questione è schematizzato nella figura seguente. Una volta posizionato lo stent viene spruzzato con la soluzione polimerica di pHEMA e lasciato in ambiente controllato per favorire l'evaporazione del solvente ed il deposito del film polimerico.

Purtroppo a causa dell'elevata flessibilità del device, caratteristica necessaria per la applicazione a cui è preposto, durante il rivestimento lo stent si piegava sotto il flusso di soluzione polimerica proveniente dall'aerografo. Ciò si rifletteva in un rivestimento non perfetto, il quale risultava disomogeneo all'aumentare della distanza dalla estremità agganciata all'albero motore.

A causa di tali vibrazioni, inoltre, venivano rivestite anche le cavità interne alla maglia metallica, situazione altamente sconsigliabile in quanto non permette la successiva ricompressione del dispositivo per l'impianto.

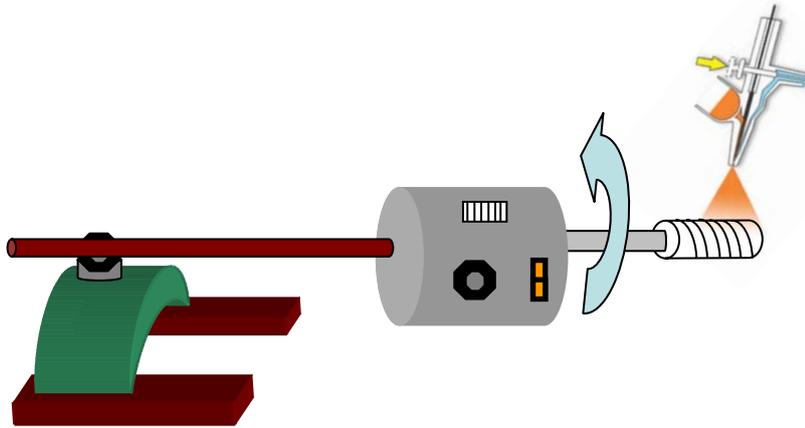


Figura 11 : Schematizzazione del prototipo del sistema rotante

E' stato dunque necessario modificare leggermente il sistema rotante con l'aggiunta di un ulteriore aggancio all'altra estremità del dispositivo in maniera da rendere il sistema più rigido.

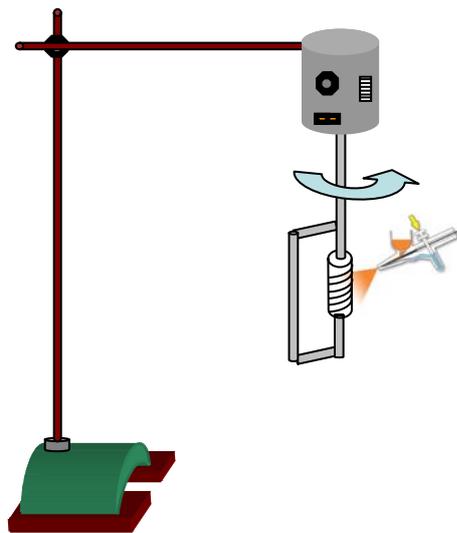


Figura 12: Schematizzazione del sistema rotante modificato

Una velocità di flusso ottimale della soluzione polimerica in uscita dell'aerografo (6 ml/min) e una distanza tra stent e ugello (~ 60 cm) sono state mantenute costanti. Per ottimizzare l'uniformità dello spessore del rivestimento, sono stati esaminati diversi parametri di processo quali velocità di rotazione, tempo di nebulizzazione della soluzione polimerica e condizioni di evaporazione. (tab. 2)

Velocità di flusso	6 ml/min
Distanza dallo stent	60 cm
Velocità di rotazione	3, 6, 12 rpm
Tempo di nebulizzazione a v: 6rpm	10, 20, 30, 40 s
Condizioni di evaporazione del solvente	Cleaned room or laminar flow hood

Tabella 2: Parametri di processo

Va sottolineato che non tutta la soluzione nebulizzata raggiunge la superficie dello stent, poiché l'angolo spazzato dall'aerografo è maggiore dell'angolo  $\theta$ , angolo ottenuto attraverso considerazioni trigonometriche usando la lunghezza dello stent e la distanza dall'aerografo.

### ***Cast-coating***

Per poter meglio studiare le interazioni tra il pHEMA e il substrato metallico, lastre di acciaio sono state utilizzate come modello dello stent per effettuare le prove di adesione. Tali lastre sono state pulite agli ultrasuoni effettuando delle immersioni di 15 minuti in etanolo e acetone in successione per tre volte. La soluzione di pHEMA ed etanolo è stata quindi colata sulle lastre utilizzando sagome di gomma siliconica al fine di realizzare uno stampo capace di mantenere la forma. I campioni sono stati posti ad evaporare, ottenendo così un film liscio e non poroso, il cui spessore è stato misurato con un microtomo Mitutoyo Digimatic ( Serie 293, Japan).

### **3.2.3 Caratterizzazione del dispositivo**

#### ***Microscopia elettronica a scansione (SEM)***

Il microscopio a scansione elettronica, sfruttando l'interazione degli elettroni con la materia è in grado di acquisire l'immagine della superficie di un campione ingrandendola fino a milioni di volte. L'immagine viene formata in un tubo a raggi catodici sincronizzato con un fascio di elettroni che operano una scansione sulla superficie dell'oggetto. Gli elettroni passano nel sistema di scansione dove sono deflessi da campi magnetici che permettono una scansione della superficie del campione.

Il fascio di elettroni incidente sul campione ha un movimento sincronizzato con il fascio di elettroni che eccita gli elementi fluorescenti dello schermo permettendo così di visualizzare l'immagine; in particolare la presenza di zone più chiare è dovuta alle emissioni relative ad elementi di numero atomico più elevato e quindi in grado di emettere più elettroni, mentre le zone più scure sono riferite ad emissioni relative ad elementi con numero atomico più basso. Per osservare un campione è necessario creare il vuoto all'interno del microscopio, con una pressione  $P = 10^{-4}$ - $10^{-5}$  mbar, in modo da ridurre l'interazione tra elettroni e molecole di gas.

Nel SEM una fonte di notevoli informazioni è rappresentata dai raggi X, fotoni di radiazione elettromagnetica ad alta energia e bassa lunghezza d'onda. Quando un fascio di elettroni con energia sufficiente incide su un solido, gli elettroni interagiscono con gli elettroni degli atomi eccitandoli a livelli con energie più alte. La diseccitazione degli elettroni causa l'emissione dei raggi X.

Per l'analisi dei campioni il rivelatore è costituito da un monocristallo di Si drogato con Litio al quale viene trasferita l'energia dei fotoni X. Uno dei principali vantaggi dell'utilizzo della microscopia a scansione è il non essere distruttiva: il campione, infatti, non viene modificato nel corso dell'analisi, ma viene in parte alterato solo durante la preparazione che richiede alcuni accorgimenti.

L'analisi chimica nel microscopio elettronico a scansione (SEM) viene realizzata misurando l'energia e la distribuzione delle intensità dei raggi X generati dal fascio elettronico sul campione utilizzando un rivelatore a dispersione di energia EDS (spettrometria per dispersione di energia). L'analisi che viene prodotta può essere sia dell'area che in quel momento viene ingrandita, oppure, fermando la scansione del fascio elettronico, di un punto di interesse sulla superficie del campione. Dato che la porzione di spazio eccitata dal fascio elettronico, che produce lo spettro X, è un intorno del punto di pochi micron, il SEM+EDS è un potente mezzo di indagine su solidi chimicamente disomogenei a scala microscopica.

### ***Spettroscopia FTIR-ATR del pHEMA***

La spettroscopia IR costituisce un potente mezzo di indagine nello studio dei materiali in quanto consente di determinarne le sostanze presenti. L'assorbimento della

radiazione infrarossa da parte di una sostanza comporta una variazione degli stati vibrazionali molecolari.

La teoria delle vibrazioni molecolari ammette che un legame chimico fra due atomi possa essere descritto come un oscillatore armonico, tale che la forza di richiamo tra due atomi sia di natura elastica e descritta dalla legge di Hooke,  $F=-kx$ , dove  $k$  è la costante di forza e in questo caso è un indice della forza di legame.

Si dimostra che il numero d'onda  $n$  dell'oscillatore è correlato alla costante di forza  $k$  e alla massa ridotta  $\mu$  secondo la relazione:

$$n = \lambda - 1 = (2\pi c) - 1 \left( \frac{k}{\mu} \right)^{-1/2} \quad \text{con} \quad \mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} - 1$$

Esiste un buon accordo tra le frequenze calcolate con il modello dell'oscillatore armonico e quelle trovate sperimentalmente.

La legge che regola l'assorbimento della radiazione da parte di un solido è quella di Lambert-Beer secondo la quale :

$$\frac{I}{I^o} = e^{-k_\lambda l}$$

dove  $I$  è l'intensità della radiazione trasmessa,  $I^o$  quella della luce incidente,  $l$  è lo spessore del mezzo dielettrico,  $k_\lambda$  il coefficiente di estinzione che misura la tendenza della sostanza ad assorbire la radiazione di lunghezza d'onda  $\lambda$ .

Considerando la trattazione quantomeccanica dell'oscillatore armonico e tenendo conto del fatto che a temperatura ambiente l'unico livello vibrazionale sufficientemente popolato è quello per cui  $v=0$  ( $v$  è il numero quantico vibrazionale), l'unica transizione sufficientemente intensa per una vibrazione lungo una stessa direzione, è quella relativa alla transizione  $v_{0 \rightarrow 1}$ . Ciò è espresso dalla *regola di selezione* che indica come attive solo le transizioni tra livelli vibrazionali adiacenti. La regola di selezione determina l'assorbimento, la cui intensità dipende dal numero relativo di molecole che si trovano nello stato da cui ha origine la transizione rispetto a quello dello stato di arrivo (cioè la popolazione dei livelli), dalla concentrazione effettiva delle molecole che assorbono (cioè la legge di Lambert-Beer) e dalla variazione del momento

elettrico che si verifica durante la vibrazione. Dunque l'intensità dell'assorbimento è un indice della mobilità degli elettroni di legame sotto l'effetto della vibrazione e quindi un indice indiretto della densità elettronica di legame.

Gli assorbimenti di molecole poliatomiche che appaiono in uno spettro infrarosso possono avere origine principalmente da vibrazioni lungo un ben definito legame oppure dalla combinazione fra di loro di vibrazioni di legami adiacenti, generando il fenomeno dell'*accoppiamento vibrazionale*. L'accoppiamento vibrazionale avviene soltanto fra due o più legami che siano fra loro sufficientemente vicini nella struttura molecolare e che siano di energia vibrazionale paragonabile.

Detto ciò, si deduce che al crescere del numero di atomi di una molecola aumenta il numero delle vibrazioni normali, ma composti diversi che hanno un particolare gruppo o un legame in comune mostrano sempre bande di assorbimento, attribuibili a quel gruppo, simili sia in intensità sia in frequenza. Si conclude che un gruppo funzionale corrispondente ad un certo legame chimico assorbe sempre in una regione ben definita dello spettro infrarosso indipendentemente dalla natura del resto della molecola.

Ogni volta che c'è un assorbimento di raggi infrarossi da parte di un gruppo o di un legame si ha una corrispondente diminuzione della trasmittanza. I picchi di trasmittanza sono più marcati per le bande di stretching (lungo le direzioni dei legami) che per quelle di bending (con deformazione degli angoli di legame) a causa dei valori diversi di energia richiesti dal tipo di vibrazione.

Si sottolinea che lo spettro infrarosso di un materiale amorfo è caratterizzato dalla distribuzione di valori, relativi agli angoli di legame, che sono molto vicini tra loro; non si osservano più bande strette e ben definite relative ad uno specifico assorbimento, ma bande allargate dovute alla fusione di bande adiacenti.

La composizione strutturale e molecolare del sottile film di idrogel su lastre metalliche è stata quindi studiata attraverso tale tecnica. Lo spettro FTIR è stato analizzato nel range di 500-4000  $\text{cm}^{-1}$  usando uno spettrometro Nexus FT-IR dotato di single reflection attenuated total reflectance (ATR) con una risoluzione di 4  $\text{cm}^{-1}$  e 20 scans.

### ***Angolo di contatto***

La misura dell'angolo di contatto è un'importante strumento per caratterizzare la bagnabilità di un solido. Liquidi e solidi devono essere caratterizzati in maniera da ottimizzare la loro interazione ed i metodi attualmente disponibili in commercio per misurare l'angolo di contatto sono i seguenti: Sessile Drop, Wilhelmy Plate e Washburn Adsorption.

L'angolo di contatto è un importante parametro che permette di determinare anche l'idrofobicità o idrofilicità di una superficie solida ed è ampiamente riportato in letteratura [W.A. Zisman, Contact angle, wettability and adhesion, in: Advances in Chemistry Series, vol. 43, American Chemical Society, Washington, DC, 1964] che può essere utilizzato per calcolare la tensione superficiale del solido. Numerose tecniche sono state utilizzate per misurare l'angolo di contatto che sono state ispirate dell'idea di usare la seguente equazione, ottenuta da *Thomas Young* nel 1805.

L'equazione di Young regola l'equilibrio di tre tensioni interfacciali e dell'angolo di contatto  $\Theta_Y$  di una goccia di liquido su un solido.

$$\gamma_{lv} \cos \Theta_Y = \gamma_{sv} - \gamma_{sl}$$

dove  $\gamma_{lv}$  è la tensione superficiale liquido vapour,  $\gamma_{sv}$  quella solido vapore e  $\gamma_{sl}$  quella solido liquido.

Nel nostro studio gli esperimenti sono stati effettuati attraverso il metodo sessile con un dispositivo OCA per la misurazione dell'angolo di contatto al fine di valutare l'idrofilicità della superficie metallica rivestita di pHEMA. La misura è stata effettuata con un Data Physics (modello OCA 20) equipaggiato con una video camera CCD e un software SCA 20. Gli angoli di contatto statici sono stati misurati collocando una goccia di acqua (3  $\mu\text{L}$ ) con velocità di 1  $\mu\text{L}/\text{min}$  sulla superficie rivestita e non delle lastre di acciaio. L'angolo è stato misurato nei 4 secondi successivi al contatto della goccia con i campioni.

### ***Microscopia a forza atomica (AFM)***

Uno degli aspetti più importanti durante il posizionamento di uno stent è legato all'effetto di impatto dello stesso, a seguito dell'espansione meccanica, con la parete

vasale. E' necessario che la superficie di contatto sia estremamente liscia per evitare lesioni e rotture nel vaso che potrebbero attivare meccanismi di riparo capaci di indurre una successiva occlusione.

E', dunque, opportuno che, modificando stent già in commercio attraverso il coating polimerico, non vengano alterate caratteristiche biomeccaniche quali la limitata rugosità.

Per valutare come la superficie del dispositivo cardiovascolare venga ad essere modificata a seguito del rivestimento che effettuiamo, la superficie dello stent "tal quale" e del corrispettivo con idrogel sono state sottoposte ad una scansione al microscopio a forza atomica, consentendo così la valutazione della superficie e la determinazione dei parametri di rugosità ad essa associati.

Il principio di funzionamento di un microscopio a forza atomica è il seguente: una punta molto acuminata (dell'ordine dei micron) viene fatta "scorrere" sulla superficie del campione da analizzare. Le forze di interazione tra la punta e gli atomi della superficie in esame, dell'ordine dei nanonewton, provocano una deflessione della leva sulla quale la punta è montata. Ad un cambiamento di topografia della superficie in esame corrisponde un cambiamento nella deflessione della leva, che viene rivelato dalla posizione di un fascio laser (fig. 13).

Da una scansione sulla superficie del campione, si può ottenere un' immagine tridimensionale con un'accuratezza nella misura dell'altezza dell'ordine di 0.1 nm. Questa tecnica di microscopia permette di osservare campioni su scala nanometrica, si effettua in aria, è non distruttiva e non richiede preparazioni particolari.

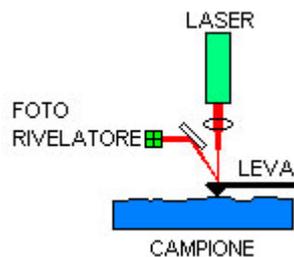


Figura 13: Principio di funzionamento dell' AFM

L'immagine AFM di un campione può essere ottenuta partendo da tre classi principali di interazione:

*-contact mode.* La punta ed il campione rimangono in contatto, nel regime di repulsione inter-molecolare, mentre lo scanning della superficie procede.

*-tapping mode.* Il cantilever viene posto in oscillazione alla sua frequenza di risonanza e posizionato sulla superficie in modo che la punta la tocchi solo per una piccola frazione della sua oscillazione.

*-non-contact mode.* Il cantilever viene posto in oscillazione ad una distanza dal campione tale per cui non si è più nel regime repulsivo inter-molecolare.

Stent rivestiti con il sottile strato di pHEMA e stent di controllo sono stati analizzati usando un Digital Instrument Nanoscope 3A a temperatura ambiente e al 40% di umidità secondo la modalità tapping mode. Con tale tecnica è stato possibile ottenere immagini a risoluzione migliore senza danneggiare la superficie del polimero, esaminando un'area di  $4 \times 4 \mu\text{m}^2$  su ogni campione.

### ***Stabilità in ambiente fisiologico***

La persistenza del sottile strato di pHEMA sulla superficie metallica, quando si trova a contatto con un fluido, è una caratteristica peculiare per le protesi cardiovascolari. Poiché il pHEMA da noi utilizzato è un polimero lineare non crosslinkato, è di cruciale importanza verificarne la stabilità in ambiente fisiologico per tempi lunghi.

Stent rivestiti di pHEMA sono stati immersi in vials contenente PBS per 6 mesi e successivamente analizzati al microscopio elettronico in dispersione di energia (EDS) per risalire agli elementi chimici presenti sulla superficie e ricavarne così la conferma della persistenza del rivestimento.

### **3.2.4 Prove di adesione**

L'adesione tra la struttura metallica e il rivestimento polimerico è una caratteristica peculiare per le protesi, la cui mancanza può determinare problemi enormi. Questi problemi sono peggiori per i dispositivi cardiovascolari che sono in stretto contatto con i fluidi biologici e il sangue. Se l'adesione non è sufficientemente forte, lo strato polimerico può non resistere alla procedura clinica creando crepe nel coating o, peggio, pezzi del rivestimento potrebbero staccarsi e finire nel circolo ematico. Per tale

ragione abbiamo accuratamente testato l'adesione tra pHEMA e acciaio, nel nuovo dispositivo clinico. Per eludere le difficoltà legate alle esigue dimensioni della superficie metallica dello stent siamo ricorsi a diverse strategie quali variazioni della  $T_g$  del pHEMA e prove di adesione secondo Norme Standard su lastre metalliche.

### ***Instrom 4204 per prove meccaniche***

Il sistema da testare è però abbastanza complesso in quanto la geometria dello stent e lo strato di film polimerico sono estremamente piccoli. Di conseguenza le prove sono state effettuate adattando al nostro sistema una norma ASTM D1002-05 per la valutazione dell'adesione a taglio (Single-Lap-Joint) e trazione (Pull-Off) tra lastre metalliche. Per le prove è stata utilizzata una macchina dinamometrica Instrom 4204, di cui si riporta di seguito il principio di funzionamento.

#### *Principio di funzionamento della macchina dinamometrica Instron 4204:*

Una macchina dinamometrica è costituita da quattro parti essenziali:

- ✓ Un attrezzatura di applicazione del carico;
- ✓ Un sistema di controllo e di visualizzazione dei parametri meccanici visualizzabili durante la prova;
- ✓ Una consolle per l'acquisizione dei dati;
- ✓ Un computer per l'elaborazione dei dati ricevuti durante la prova.

La prima parte è costituita principalmente da un montante su cui viene collocata la traversa mobile in grado di scorrere con moto verticale ascendente e discendente. Su di essa viene montata la cella di carico il cui peso varia a seconda della prova che deve essere compiuta (assegnata dalle norme ASTM D1002-05 così come la velocità della traversa mobile).

La seconda parte della macchina è il sistema di controllo che provvede al monitoraggio dei valori di sforzo e di deformazione che subisce il campione durante la prova. Per il suo corretto funzionamento è necessario compiere, prima della singola prova, delle operazioni che permettono la lettura della cella di carico, l'azzeramento del carico e della deformazione nonché l'assegnamento di un piccolo precarico indispensabile per il corretto avvio della prova. Infine, la

macchina è corredata di sistema automatico costituito da un computer, dotato di software idoneo alla codifica dei dati trasmessi dalla macchina. In particolare l'elaboratore registra in ingresso i parametri della prova da compiere: caratteristiche geometriche del campione, cella di carico, velocità della traversa. Al termine della prova esso fornirà in uscita i parametri richiesti, opportunamente codificati, in modo da poter essere successivamente elaborati mediante software.

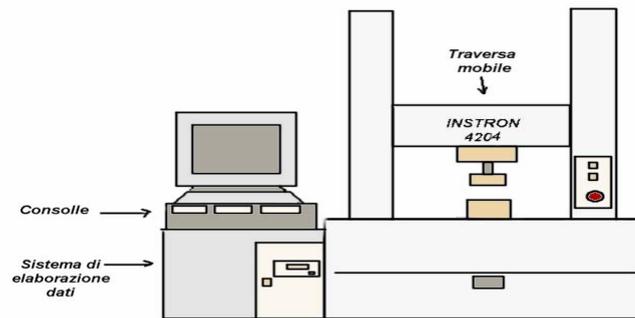


Figura 14: Schema dell'architettura della macchina dinamometrica Instron 4204

### Single-Lap-Joint test

Per la preparazione dei campioni Single-Lap-Joint, la soluzione di pHEMA è stata colata sulla parte terminale di una lastra metallica e lasciata evaporare per formare lo strato di rivestimento di 50  $\mu\text{m}$ . Successivamente è stato aggiunto uno strato di cianoacrilato per permettere l'adesione alla lastra libera (fig. 15). Dato lo spessore limitato del film si potrebbe pensare di aver così ottenuto un semi-interpenetrating network, ma prove preliminari di adesione del solo cianoacrilato sull'acciaio hanno avvalorato l'ipotesi di trascurabilità di tale evento.

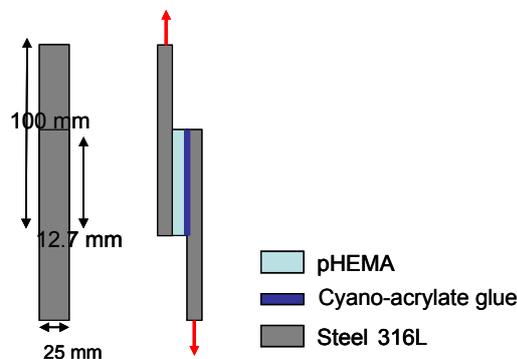
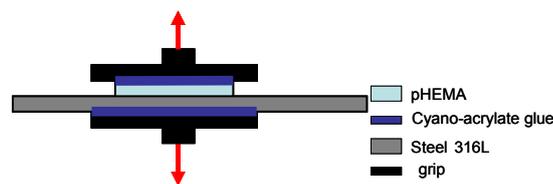


Figura 15: Geometria dei provini utilizzati per il test di trazione meccanica

### ***Pull-Off test***

La preparazione dei campioni per le prove di pull-off prevede l'uso di una sola lastra di metallo. La procedura è simile a quella del single-lap-joint: la soluzione polimerica di pHEMA viene colata nell'area di overlap, che per le prove a trazione, è posta al centro. Dopo la formazione del sottile strato di pHEMA, adeso all'acciaio, si aggancia alla lastra un apposito morsetto di metallo mediante cianoacrilato (fig. 16)

Successivamente sullo strato di PHEMA si posiziona un altro morsetto di metallo, identico al primo e con superficie ruvida, mediante cianoacrilato.



*Figura 16: Geometria dei provini utilizzati per il test di trazione meccanica*

Entrambe le prove di Single-Lap-Joint e Pull-Off sono state effettuate impostando una velocità di trazione di 1.3 mm/min, e usando una cella di carico di 1kN. L'adesione dell'idrogel alla superficie metallica è stata testata sia nel suo stato secco che swellato per meglio mimare le effettive condizioni di impianto. Per la prova con idrogel idratato i campioni sono stati immersi in PBS per permetterne la completa idratazione.

Il carico misurato al momento del distacco è stato diviso per l'area di overlap, relativa ai campioni di Single-Lap-Joint e Pull-Off, in maniera da ottenere il corrispettivo valore dello stress di shear e di trazione. Inoltre, per poter identificare il meccanismo e l'interfaccia di rottura, le superfici sono state esaminate dopo il cedimento in dispersione di energia (EDS) durante le analisi al microscopio elettronico (SEM).

### ***DSC – variazioni di $T_g$***

E' ben noto che molte proprietà dei materiali, quale ad esempio la temperatura di transizione vetrosa, possono essere influenzati dalla presenza di stress residui [167] dettati dalla forza di adesione tra due substrati.

L'effetto di stress residui d'interfaccia sulla temperatura di transizione vetrosa dei film di pHEMA è stata valutata utilizzando il DSC precedentemente descritto. Due differenti tipologie di campioni sono state dunque realizzate. La soluzione di pHEMA ed etanolo è stata colata sulle lastre di acciaio (A) o in uno stampo di Teflon (B) in maniera da ottenere, a seguito dell'evaporazione del solvente, un film polimerico contenente sia stress interfacciali che di matrice nel caso (A) e un film con soli stress di matrice nel caso (B). Entrambi i film polimerici sono stati testati in capsule non ermetiche di alluminio ad una velocità di riscaldamento di 10°C/min in flusso controllato di azoto e in un range di temperatura, da ambiente a 140°C. La temperatura di transizione vetrosa è stata determinata come la media di almeno tre separate misure del punto di flesso del termogramma.

### **3.3 Risultati sperimentali e discussione**

#### **3.3.1 Proprietà caratteristiche del pHEMA**

##### ***DSC***

Per determinare la temperatura di transizione vetrosa del pHEMA è stato utilizzato un TA Instrument DSC 2910. Il polimero è stato testato in capsule non ermetiche di alluminio impostando un range da temperatura ambiente a 200°C con velocità di riscaldamento di 10°C/min in atmosfera controllata, utilizzando gas di azoto. La temperatura di transizione vetrosa è stata determinata come punto medio del flesso a "S" del termogramma. (fig.17) attraverso la media di almeno tre misure indipendenti.

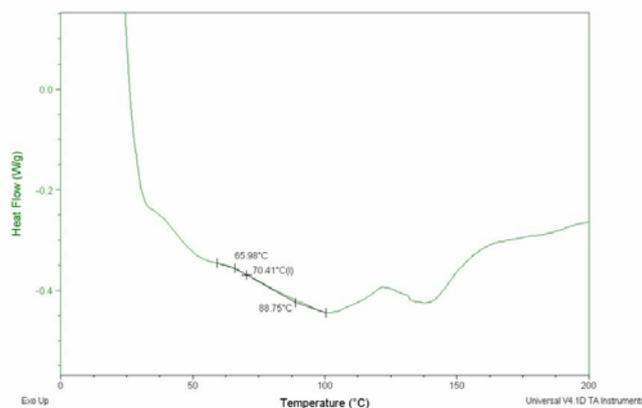


Figura 17: Termogramma DSC del PHEMA

I dati così ottenuti sono stati paragonati a dati noti in letteratura [168] assicurandoci così della veridicità e della riproducibilità dell'analisi (fig18).

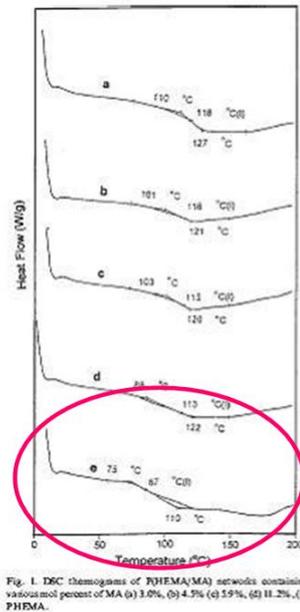


Figura 18: Termogramma DSC del PHEMA di letteratura

L'analisi al DSC evidenzia il cambiamento, seppur minimo, della capacità termica dovuta alla transizione vetrosa del pHEMA e la corrispondente temperatura di transizione vetrosa  $T_g$  ( $\sim 89^\circ\text{C}$ ) è mostrata in figura 17, congruente con la  $T_g$  fornita dal datasheet della Sigma.

### TGA

L'analisi di perdita in peso dinamica, per esaminare l'effetto della composizione sulla degradazione termica del pHEMA, è stata effettuata con uno strumento termogravimetrico DuPont TGA 951, ancora una volta i campioni sono stati testati in atmosfera controllata, azoto, con una velocità di scansione di  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ , in questa analisi però il polimero è stato portato da temperatura ambiente a  $600^\circ\text{C}$ .

Dai termogrammi sono state ricavate le temperature di inizio e fine degradazione, la perdita in peso del pHEMA comincia intorno ai  $300^\circ\text{C}$ , indicando che la degradazione è dovuta alla scissione random delle catene, e raggiunge il massimo a circa  $380^\circ\text{C}$  (fig. 19).

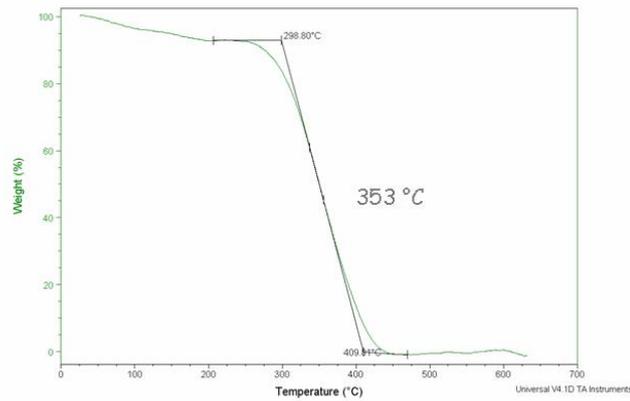


Figura 19: Termogramma TGA del PHEMA

Ancora una volta i termogrammi ottenuti sono stati comparati con quelli noti in letteratura, confermando ulteriormente la veridicità del dato (fig. 20). [168]

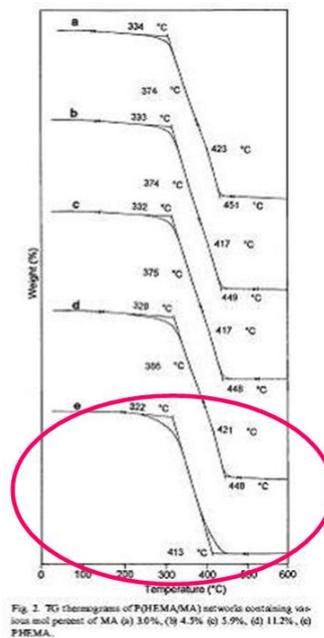


Figura 20: Termogramma TGA in letteratura del PHEMA

### ***Prove reologiche***

Come si evince chiaramente dai risultati di seguito riportati, il pHEMA si comporta come un fluido newtoniano; all'interno dell'ampio range di shear rate analizzato, infatti, la viscosità non si discosta molto dal valore di  $\eta$ : 0.02 Pa·s

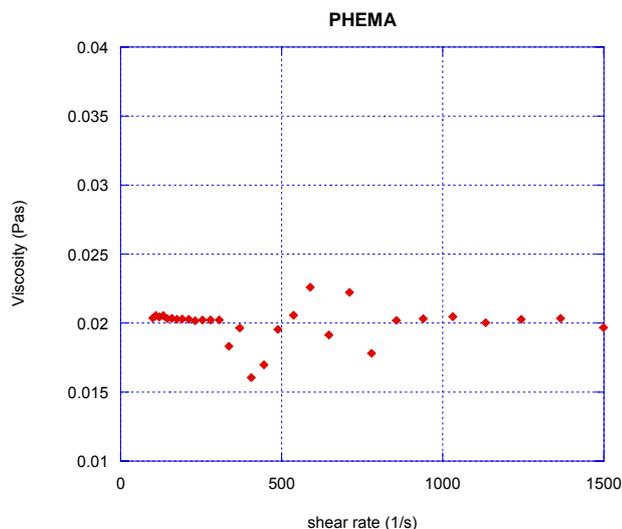


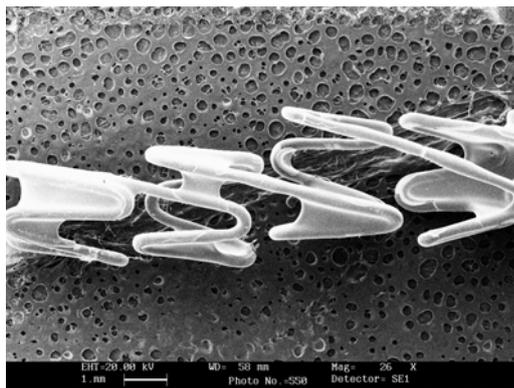
Figura 21: Grafico dello shear rate vs viscosità per la soluzione di PHEMA

### **3.3.2 Realizzazione del coating**

#### ***Analisi morfologica SEM***

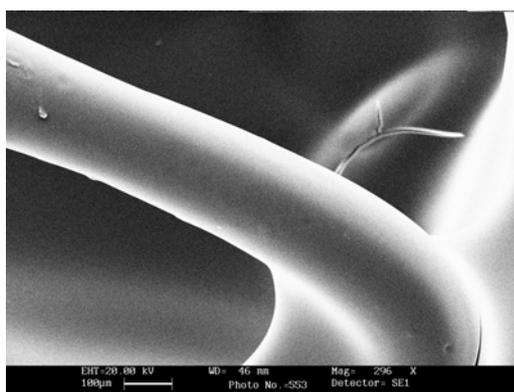
La soluzione di pHEMA è stata nebulizzata sullo stent in rotazione grazie al sistema precedentemente descritto.

I rivestimenti realizzati usando il prototipo del sistema rotante non hanno dato ottimi risultati. A causa dell'elevata flessibilità del device, caratteristica necessaria per la applicazione a cui è preposto, durante il rivestimento lo stent si piegava sotto il flusso di soluzione polimerica proveniente dall'aerografo determinando un coating non omogeneo in cui le cavità all'interno della maglia sono state parzialmente otturate del film polimerico, figura 22.



*Figura 22: Stent rivestito disomogeneamente*

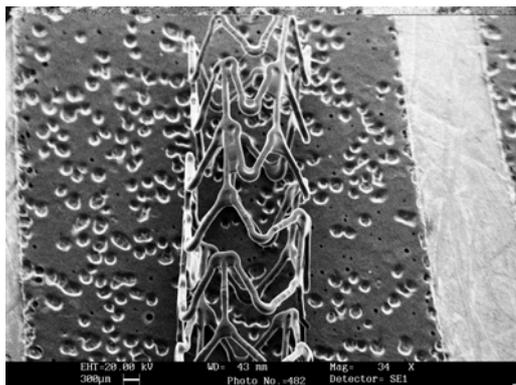
Nonostante i risultati poco brillanti è possibile notare che la maggior parte dello stent è comunque rivestito in maniera omogenea e che il coating risulta essere liscio, figura 23, il che è confortante per la scelta della tecnologia e del materiale.



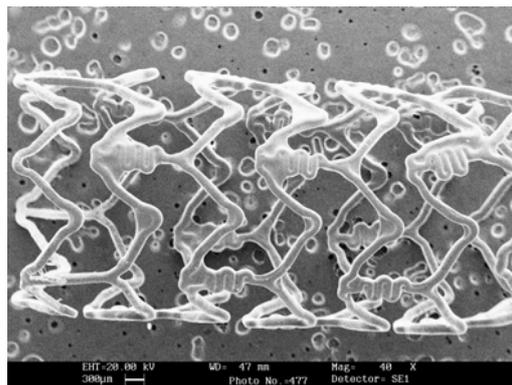
*Figura 23: Particolare dello stent HORUS rivestito*

Di seguito vengono riportati i rivestimenti ottenuti con il sistema rotante modificato, mantenendo cioè lo stent agganciato all'albero motore da entrambe le estremità. Come auspicato, i risultati sono decisamente migliori, lo stent è rimasto nella stessa posizione per tutta la durata del rivestimento e ciò si riflette in un coating più omogeneo e senza occlusione delle maglie metalliche.

Questa volta i rivestimenti sono stati effettuati su due diverse tipologie di stent, un Guidant Pixel e un Guidant Zeta, che differiscono tra loro per geometria della maglia e dimensione. I risultati sono comunque comparabili, entrambi gli stent sono rivestiti omogeneamente, il coating risulta ovunque compatto e i “gomiti” di curvatura non appaiono riempiti dal film polimerico.

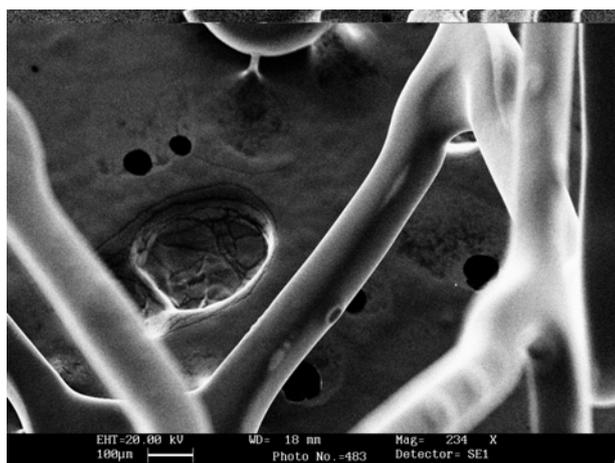


*Figura 24: Stent Pixel rivestito*



*Figura 25: Stent Zeta rivestito*

E' stata effettuata anche un'immagine della parte interna dello stent per verificare che la soluzione penetri attraverso le maglie ricoprendo anche la superficie interna non esposta direttamente al flusso dell'aerografo (fig. 26).



*Figura 26: Rivestimento interno dello stent*

Spingendosi a ingrandimenti maggiori (fig 27) per studiare a fondo la struttura morfologica dello stent rivestito di pHEMA è possibile vedere che è caratterizzato da una superficie estremamente liscia ed uniforme, senza crepe o ostruzioni e con una superficie interna ed esterna omogenea.

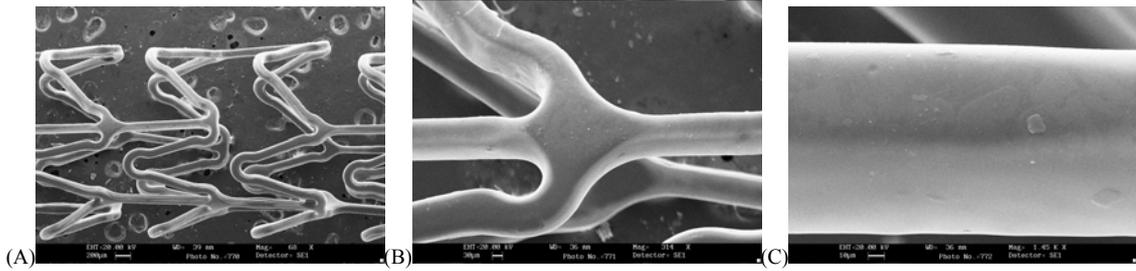


Figura 27: Micrografie a diversi ingrandimenti di uno stent Pixel rivestito

La misura dello spessore del rivestimento è stata effettuata, tramite il SEM, dopo aver indotto delle crepe, e l'analisi è stata effettuata per la tutta la lunghezza dello stent restituendo valori simili e, quindi, spessori uniformi.

### ***Parametri di processo***

Il rivestimento degli stent è stato ottenuto attraverso differenti velocità di rotazione (3-12 rpm) e tempi di nebulizzazione (fino a 40 sec, alla velocità di 6 rpm) per studiare, così, l'influenza delle condizioni di processo sullo spessore del rivestimento. Dopo la nebulizzazione della soluzione, i campioni, ancora ancorati al sistema motore, sono stati conservati in camera bianca o sotto cappa a flusso laminare per consentire un uniforme allontanamento del solvente.

Da tali prove è risultato che, variando la velocità di rotazione dello stent da 3 rpm a 12 rpm e nebulizzando la soluzione polimerica per un solo giro, lo spessore decresce da 18 a 5  $\mu\text{m}$ , come mostrato in figura 28.

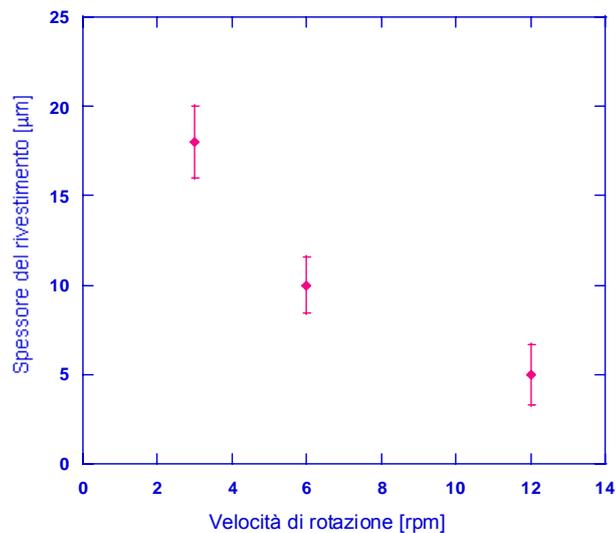


Figura 28. Spessori del rivestimento vs velocità di rotazione dello stent

D'altronde, si è osservato un trend opposto in funzione del tempo di nebulizzazione. Si è scelta una velocità di rotazione di 6 rpm ed è stato variato il tempo di nebulizzazione, da 10 a 40 sec e, conseguentemente, lo spessore del rivestimento è aumentato da 10 a 23  $\mu\text{m}$  (fig 29). Si precisa che un tempo di nebulizzazione di 10 sec a una velocità di 6rpm corrisponde a una completa rotazione dello stent sul suo asse.

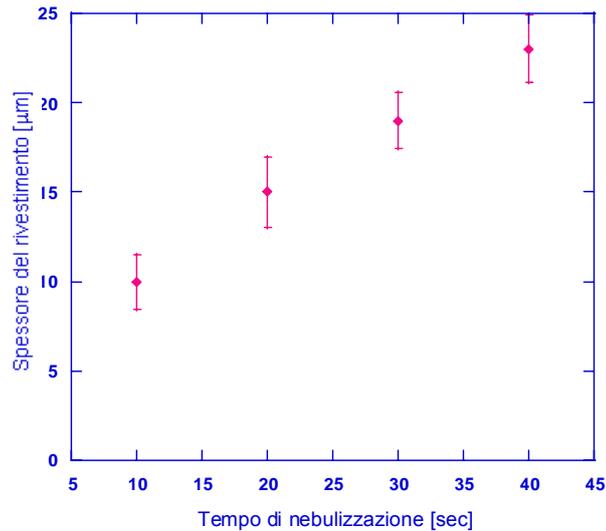


Figura 29. Spessore del rivestimento vs tempo di nebulizzazione

Anche le condizioni di evaporazione del solvente, etanolo, sono state modificate. Questa volta però, si è notato che esse influenzano notevolmente la riuscita del rivestimento, purtroppo, in termini negativi. Infatti, mentre al variare della velocità di rotazione e del tempo di nebulizzazione solo lo spessore del rivestimento varia, restando comunque invariate le caratteristiche di uniformità ed omogeneità, al variare delle condizioni di evaporazione si sono verificati rivestimenti non omogenei e con crepe sparse sulla superficie.

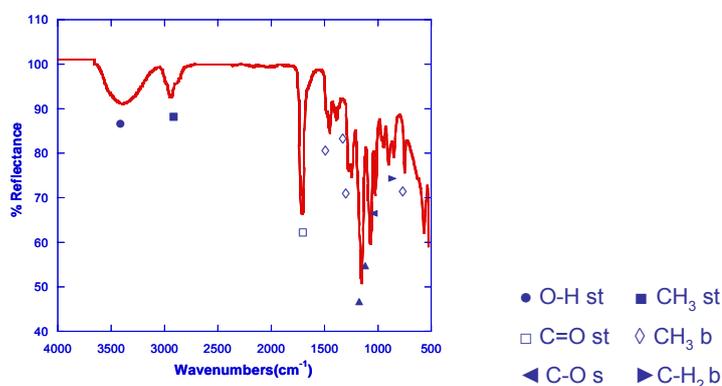
In particolare, i campioni lasciati ad evaporare sotto le cappe chimiche con flusso laminare hanno prodotto rivestimenti di spessore non omogeneo nella lunghezza dello stent, e caratterizzati da crepe. Al contrario, i campioni realizzati in ambiente controllato (camera bianca) ma senza flusso laminare, hanno prodotto rivestimenti omogenei, lisci ed uniformi.

### **3.3.3 Caratterizzazione del coating**

#### ***ATR-FTIR***

L'analisi di spettroscopia IR effettuata tramite NEXUS Thermo spectrometer Reflection element Diamond su campioni rivestiti riporta i picchi caratteristici del pHEMA, quali O-H, C=O, C-H<sub>2</sub> come riportato in fig. 30.

Sono evidenti i picchi caratteristici del gruppo alcolico a 3445 cm<sup>-1</sup> per lo stretching del gruppo O-H e a 1022 cm<sup>-1</sup> per il bending O-H. Inoltre, i gruppi esteri sono stati identificati dai picchi a 1728 cm<sup>-1</sup> per lo stretching del doppio legame carbonio-ossigeno C=O e a 1275 cm<sup>-1</sup> per quello di C-O.



*Figura 30: Analisi ATR-FTIR del PHEMA*

Tutto ciò a conferma che i film di pHEMA da noi ottenuti partendo da cristalli già polimerizzati e per evaporazione del solvente, rispecchiano e mantengono tutte le peculiari caratteristiche dell'idrogel ben note in letteratura.

#### ***Angolo di contatto***

Per verificare la maggiore idrofilicità del pHEMA rispetto al materiale dello stent, AISI 316L, sono state effettuate delle prove di bagnabilità delle lastre metalliche rivestite con la soluzione polimerica. La prova consta nel misurare l'angolo formato da una goccia di liquido che si posa sulla lastra metallica una volta fuoriuscita dalla siringa. L'immagine della singola goccia viene acquisita tramite una telecamera posta a una

delle estremità dello strumento e grazie all' analisi softwar si determina l'effettivo angolo di contatto della soluzione con la piastra.

L'angolo di contatto ottenuto per i campioni non trattati di acciaio 316L, risulta essere di 73°, mentre per i campioni rivestiti con il sottile strato di pHEMA è notevolmente ridotto a 32°, come si può chiaramente evincere dalle immagini riportate di seguito (fig. 31).

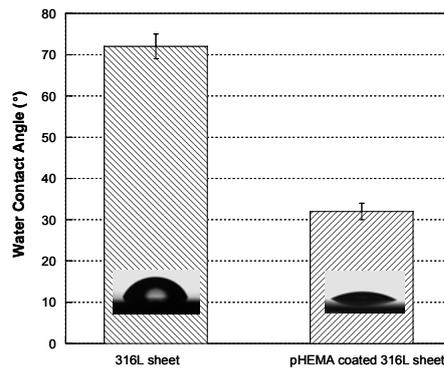


Figura 31: Angolo di contatto per stent controllo o rivestiti con pHEMA

La riduzione nell'angolo di contatto per le lastre rivestite di pHEMA, rispetto a lastre in 316L, è rappresentativo di un aumento di bagnabilità del dispositivo, evidenziando l'elevata natura idrofila dell'idrogel di pHEMA.

### Rugosità tramite AFM

Di seguito sono riportate le immagini relative alle scansioni piane e alle ricostruzioni 3-D su stent in acciaio 316L uncoat (fig 32 a e b) e coat (fig 33 a e b) con pHEMA, rispettivamente.

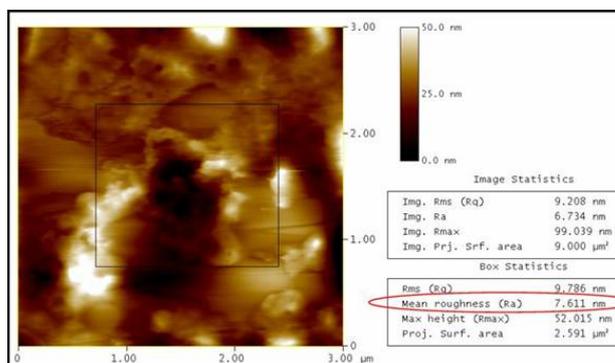


Figura 32 a: Analisi della superficie dello stent

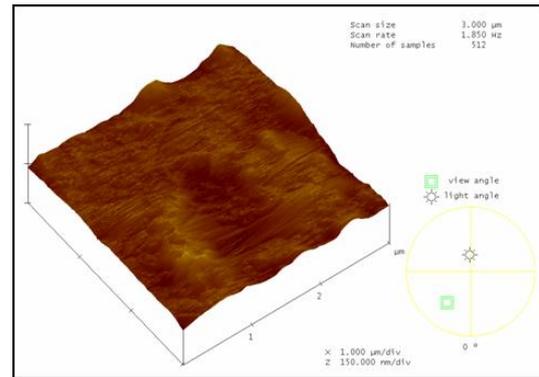


Figura 32 b: Analisi 3-D della superficie dello stent

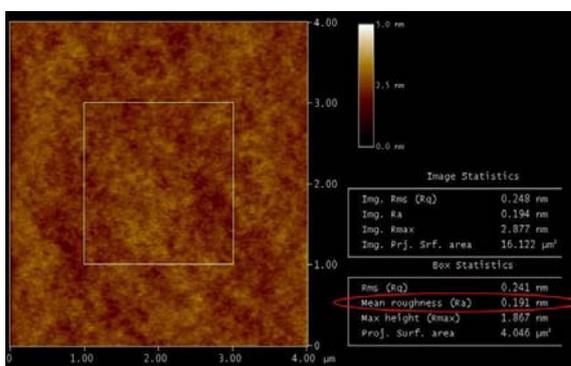


Figura 33 a: Analisi dello stent rivestito

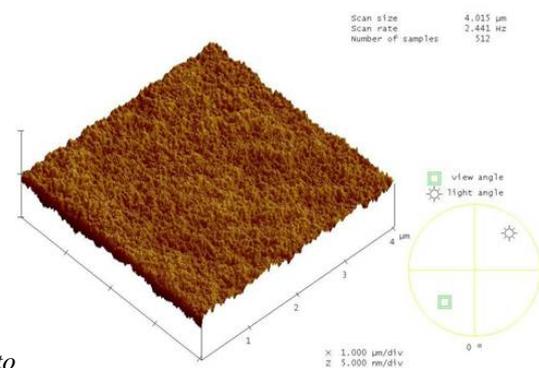


Figura 33 b: Analisi 3-D dello stent rivestito

Due sono i parametri fondamentali nella valutazione della rugosità:

$R_a$ , che caratterizza la rugosità della superficie, ed è definito come segue:

$$R_a = \frac{\int_0^{x_0} |z(x)| dx}{x_0}$$

dove  $z(x)$  è l'altezza della rugosità della superficie.  $R_a$  è perciò la lunghezza totale dei picchi e delle valli divisa per la lunghezza considerata ( $x_0$ ).

$R_q$ , comunemente usata ed è definita come la radice quadrata della media quadratica di  $z(x)$

$$R_q = \sqrt{\frac{\int_0^{x_0} z^2(x) dx}{x_0}}$$

Per i nostri campioni i valori di  $R_a$  ed  $R_q$  sono riportati nel grafico:

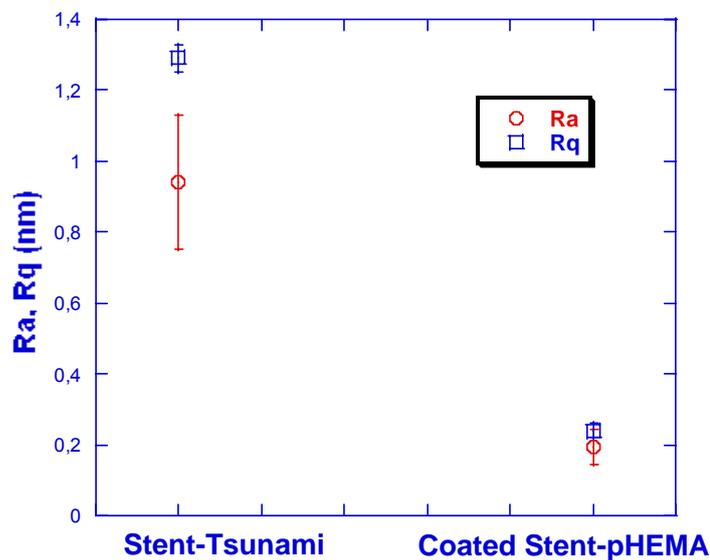


Figura 34: Valori di rugosità  $R_a$  e  $R_q$  per stent rivestiti o controllo

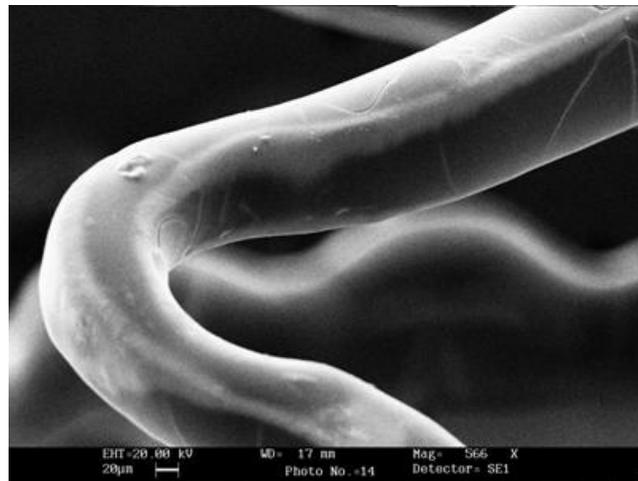
Da tali analisi risulta evidente che la superficie dei campioni rivestiti è estremamente liscia, con una rugosità media di 0.2 nm, notevolmente inferiore a quella degli stent non trattati, pari a circa 0.9 nm. E' importante sottolineare, che gli stent controllo da noi utilizzati, sono stent attualmente in uso nella pratica clinica, quindi con una rugosità già soddisfacente. Il miglioramento in termini di rugosità apportato dal sottile strato di pHEMA può auspicabilmente determinare un minor trauma del vaso nel momento di espansione dello stent, inducendo così una minor risposta infiammatoria.

### ***Stabilità in ambiente fisiologico***

Il sistema è stato caratterizzato fino a questo momento con il coating polimerico nel suo stato secco. Ma il dispositivo cardiovascolare, una volta inserito all'interno del vaso, esplicherà la sua funzione in soluzione fisiologica; ed è necessario, dunque, accertarsi che l'idrogelo rimanga adeso alla superficie dello stent a seguito del processo di swelling.

Poichè il pHEMA è un idrogelo lineare è di cruciale importanza capire il suo comportamento a contatto con un fluido, poichè parte di esso potrebbe staccarsi nel tempo dalla superficie dello stent e promuovere, così, una reazione negativa o peggio un trombo. Lo stent rivestito è stato immerso in soluzione fisiologica e successivamente analizzato tramite il microscopio a scansione elettronica (SEM) per effettuare un'analisi EDS così da verificare l'effettiva presenza del coating.

Come evidenziato dall'analisi EDS, Ossigeno e Carbonio sono presenti nel rapporto stechiometrico caratteristico del pHEMA sulla superficie dello stent anche dopo 6 mesi di immersione in PBS.



*Figura 35: SEM di uno stent rivestito immerso 6mesi in acqua*

Questi dati, insieme alle micrografie SEM confermano che lo strato di idrogelo è ancora adeso alla maglia dello stent.

Element	Atomic %
Cr K	2.63
Fe K	8.82
Ni K	1.14
C K	68.91
O K	18.51

Tabella 3: EDS sulla superficie dello stent rivestito ed immerso in acqua

### 3.3.4 Adesione del pHEMA

I campioni di acciaio 316L e pHEMA sono stati preparati seguendo la norma ASTM D1002-05 e testati con una velocità di trazione di 1.3mm/min. Le prove sono state effettuate sia in condizioni di coating asciutto che bagnato, a seguito di swelling in soluzione fisiologica.

#### *Single-Lap-Joint test*

I provini wet hanno dimostrato un andamento più morbido della curva carico-spostamento, riportata in fig. 36, confermando il comportamento più plastico, e quindi meno vetroso, dell'idrogel in condizioni simili a quelle di utilizzo in ambiente fisiologico.

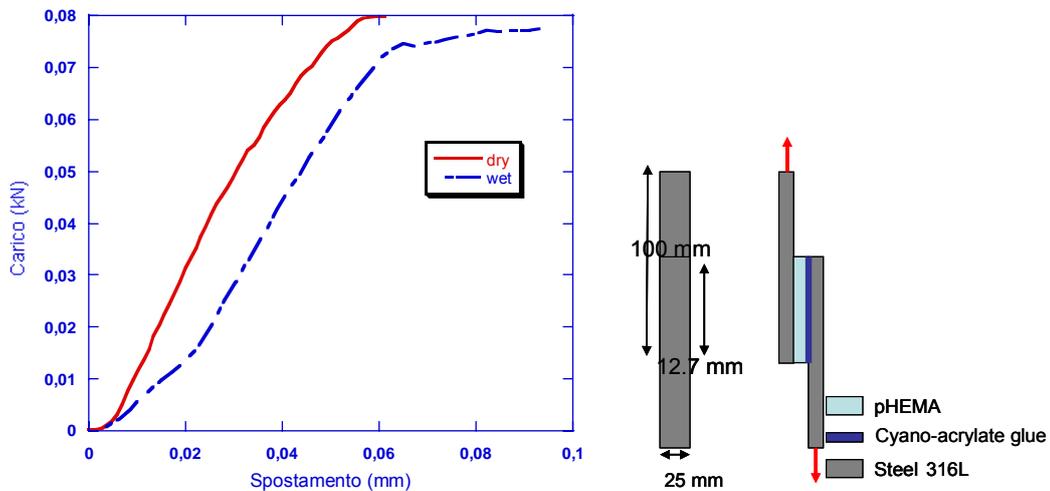


Figura 36: Andamento del grafico carico-spostamento e geometria dei provini

Il valore del carico massimo di rottura è stato successivamente diviso per l'area di contatto  $12.7 \times 25 \text{ mm}^2$  (di overlap) al fine di ottenere il valore dello sforzo a rottura che viene di seguito riportato sia per i campioni asciutti che wet (fig. 37).

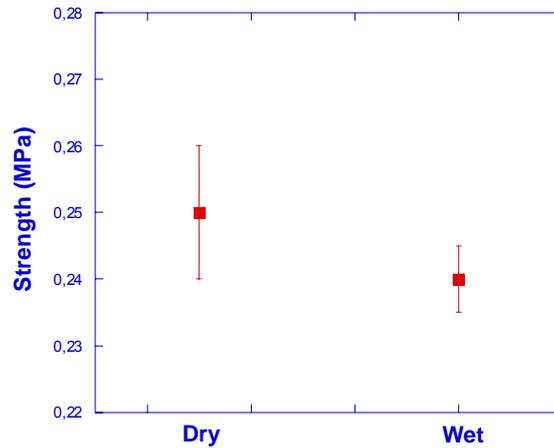


Figura 37: Sforzo massimo di rottura per i campioni dry e wet.

I campioni mostrano una differenza, seppur minima, del valore dello sforzo nello stato dry and wet ma entrambi i valori sono compatibili con quelli esplicitati durante la manovra di posizionamento del dispositivo cardiovascolare nel tratto d'interesse.

### ***Pull-Off test***

Per l'analisi dei campioni testati in Pull-Off lo spostamento massimo a rottura è risultato lo stesso sia per i campioni in stato secco che idratato. Tuttavia, è stato riscontrata un'enorme differenza nel carico massimo di rottura, risultando di 0.4kN e 0.1kN rispettivamente, per i campioni secchi e idratati (fig. 38).

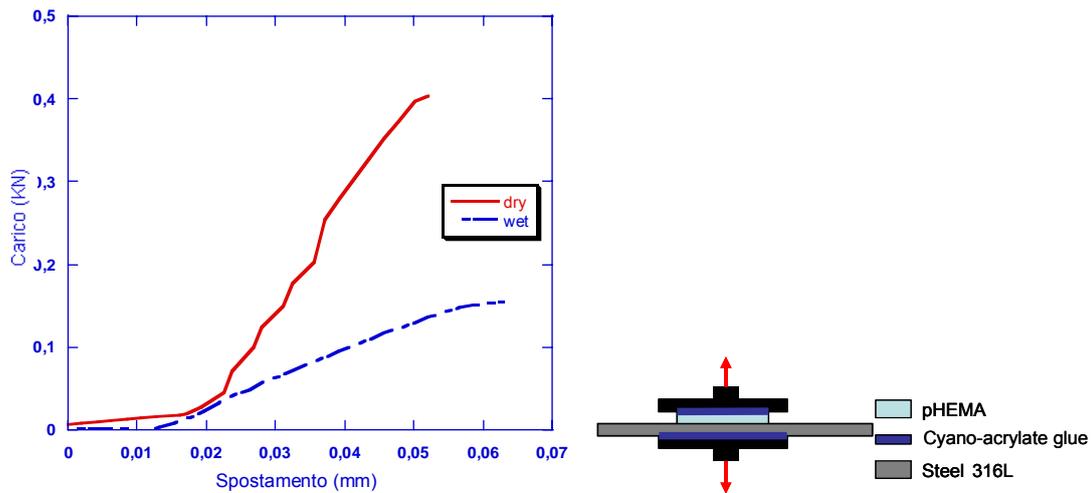


Figura 38: Andamento del grafico carico-spostamento e geometria dei provini

Conseguentemente, anche il relativo sforzo varia in un range ampio, 0.9 MPa e 0.4 MPa, come riportato in figura 39.

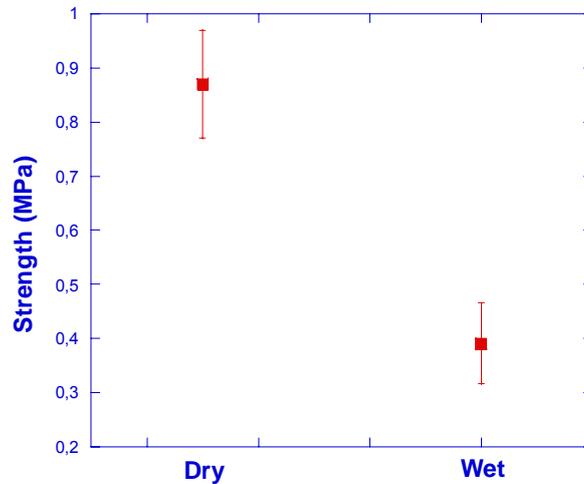


Figura 39: Sforzo massimo di rottura per i campioni dry e wet.

I campioni, dopo essere stati testati, sono stati analizzati al microscopio a scansione elettronica per valutare l'effettiva zona di cedimento e per verificare il meccanismo di frattura. Ciò è stato suggerito anche dalla necessità di verificare che il sottile strato di cianoacrilato non infici i risultati ottenuti determinando, con la sua adesione all'acciaio, risultati falsati.

Le micrografie SEM sia sulle superfici su cui era inizialmente adeso il pHEMA (A), che su quelle incollate al pHEMA attraverso il cianoacrilato (B) hanno mostrato un frattura estesa ed omogenea su tutta la superficie, dimostrando che il meccanismo di frattura è principalmente interfacciale, avvenendo soprattutto all'interfaccia stent-pHEMA, anche se sono presenti alcune zone di frattura coesiva nel rivestimento polimerico (fig. 40). Ciò ad evidenza del fatto che tutto il pHEMA inizialmente adeso sull'acciaio si è staccato a causa degli sforzi impartiti durante la prova.

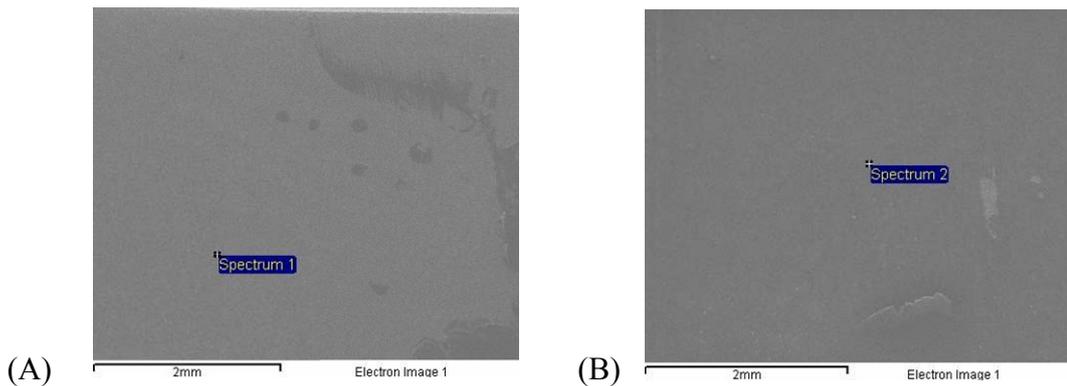


Figura 40: Micrografie SEM delle superfici a seguito di frattura meccanica

L'analisi EDS su tali superfici, ha ulteriormente confermato tali dati, restituendo sulla superficie inizialmente occupata dall'idrogelato i componenti dell'acciaio, e sulla lastre speculare C e O nelle percentuali caratteristiche del pHEMA (tab4).

Element Atomic %	Spectrum 1	Spectrum 2
C K	-	82.33
O K	-	17.67
Cr K	18.98	-
Fe K	81.02	-

Tabella 4: Analisi EDS delle zone di cedimento meccanico

### ***Analisi della $T_g$ al DSC***

Stress residui includono quelli interfacciali e quelli caratteristici della matrice. Per il materiale da noi utilizzato, quindi il pHEMA, gli stress residui di matrice sono

dovuti all'evaporazione del solvente durante la preparazione del layer di pHEMA. Mentre stress residui d'interfaccia sono presenti quando lo strato di pHEMA è realizzato su un substrato metallico a causa dell'adesione tra le due superfici. Quindi una stima dell'adesione tra la superficie dello stent e il rivestimento di pHEMA può essere dedotta da variazioni nella temperatura di transizione vetrosa.

Il DSC registra con precisione il seppur minimo cambiamento nella capacità di calore relativo alla temperatura di transizione vetrosa dei film di pHEMA (tab. 5), per tutti i campioni è stato evidenziato un solo valore della  $T_g$  dipendente dalle condizioni di preparazione dei campioni.

E' noto, da valori di datasheet, che la temperatura di transizione vetrosa  $T_g$  dei cristalli bulk di pHEMA da noi utilizzato è di 89°C. I valori restituiti dalle analisi al DSC mostrano una  $T_g$  di 79°C nel caso di strati di pHEMA ottenuti su substrati di Teflon, e tale valore decresce ulteriormente a 64°C per campioni di pHEMA adesi su substrato metallico.

Campioni pHEMA	Film su 316L	Film su Teflon	Cristalli bulk
$T_g$ (°C)	64	79	89

Tabella 5: Temperatura di transizione vetrosa dei film di pHEMA

La diminuzione di  $T_g$  nel caso dei campioni su Teflon è ragionevolmente dovuta agli stress residui che si formano durante l'evaporazione del solvente. E' altresì evidente, che l'ulteriore effetto degli stress d'interfaccia, presenti su substrato metallico ma assenti su Teflon, sono responsabili dell'ulteriore diminuzione della  $T_g$ . Ciò conferma che l'evaporazione del solvente influenza le proprietà intrinseche di un materiale ma, l'aspetto più interessante per questo lavoro, è che l'ampia riduzione di  $T_g$  per strati adesi su acciaio è evidenza di una forte adesione tra pHEMA e acciaio, come già dimostrato dai test meccanici.

## **Conclusioni**

Obiettivo principale di questa prima fase della tesi di Dottorato è stato quello di progettare un nuovo stent capace di ridurre il danno tessutale durante l'impianto.

La superficie metallica è stata ricoperta con uno strato di idrogel che diventa più soffice a seguito del contatto con fluidi biologici. Il nostro approccio consiste nel realizzare una tecnica spray capace di realizzare uno strato omogeneo ed uniforme di polimero sulla superficie complessa dello stent. In particolare, la tecnica consiste nel nebulizzare la soluzione di idrogel sullo stent messo in rotazione sul proprio asse da un sistema motore collegato al PC. Questa peculiarità, insieme al semplice principio di funzionamento ed agli economici materiali utilizzati, rende questa tecnica versatile, economica e semplice.

Lo strato idrofilico di pHEMA è stato visualizzato sulla superficie metallica dello stent dalle micrografie SEM evidenziando una superficie estremamente uniforme e liscia, senza crepe o oclusioni tra le maglie. Inoltre, ottimizzando i parametri di processo, quali velocità di rotazione e tempo di nebulizzazione della soluzione, è stato possibile ottenere spessori modulabili del rivestimento, variabili da 5 a 20  $\mu\text{m}$ .

L'adesione tra la struttura metallica e il rivestimento polimerico è una caratteristica cruciale per le protesi cardiovascolari, la cui assenza o insufficienza può provocare complicazioni. Per tale motivo l'adesione tra pHEMA e acciaio è stata analizzata nel dettaglio sfruttando strumenti alternativi per superare le limitazioni dovute alle dimensioni ridotte del dispositivo.

Le prove di adesione attraverso la Norma Standard hanno restituito valori dello sforzo massimo a rottura in trazione e taglio compatibili con l'applicazione clinica, sia in campioni con idrogel secco che idratato. Quest'ultimo risultato è di notevole importanza poiché meglio mima la condizione del pHEMA durante la procedura d'impianto.

L'analisi EDS delle superfici a seguito della frattura ha evidenziato che i valori ottenuti tramite le prove meccaniche si riferiscono all'effettivo cedimento dell'interfaccia acciaio/pHEMA e non a possibili rotture all'interno della matrice polimerica. Tali risultati, insieme con la diminuzione di  $T_g$  ottenuta tramite analisi al

DSC, confermano la forte interazione chimica presente tra l'idrogel di interesse e la maglia metallica dello stent.

In conclusione, il nostro dispositivo, caratterizzato da un rivestimento stabile e altamente idrofilo, può essere progettato in termini di spessore, a seconda dell'applicazione desiderata, permettendo il corretto posizionamento del tutore senza incorrere in problematiche di scarsa adesione del polimero o di elevato danno vascolare.

## **Capitolo 4**

### **Realizzazione di uno stent multicomponente**

#### **Introduzione**

Nonostante gli stent rivestiti abbiano apportato notevoli miglioramenti rispetto ai normali dispositivi metallici, ultimamente l'interesse scientifico si è spostato sulla produzione di stent da usare come piattaforma inerte per il rilascio locale di farmaci o geni [74]. Un siffatto dispositivo è capace di assicurare i vantaggi meccanici dello stent e, allo stesso tempo, di fornire una piattaforma per il rilascio locale di farmaci con il fine di ridurre la trombogenicità dello stent e la neointima iperplasia [75].

Gli stent a rilascio di farmaci, o Drug Eluting Stent (DES), offrono la possibilità di rilasciare localmente livelli terapeutici locali di metaboliti attivi garantendo livelli sistemici trascurabili [53]. Nonostante l'ampia scelta di potenziali farmaci che possono essere incorporati nei rivestimenti degli stent, non è ancora chiaro quale agente possa essere localmente rilasciato in un'opportuna concentrazione e per un periodo di tempo prolungato per ottenere un efficace risultato antiproliferativo [46].

Tuttavia, i DES attualmente presenti sul mercato constano di alcune limitazioni che ne inficiano la perfetta riuscita clinica, tra cui la difficoltà, attraverso i meccanismi di rilascio utilizzati, di rilasciare agenti attivi di natura idrofila. Infatti entrambi i DES attualmente sul commercio, il Cypher e il Taxus, sono caratterizzati da un rilascio dettato dalla semplice dispersione del farmaco nel rivestimento polimerico e la natura idrofoba è necessaria per evitare che l'agente attivo venga rilasciato istantaneamente nel flusso ematico durante la procedura di posizionamento.

Appare, quindi, evidente, che l'architettura del dispositivo, le interazioni tra farmaco e polimero e la sua distribuzione in esso, così come le strategie di rilascio (reservoir, matrix o microcarrier) insieme con i meccanismi di rilascio che le governano (diffusione, erosione/degradazione, swelling) rappresentano i punti chiave su cui la ricerca sta lavorando per migliorare la performance dei DES.

Inoltre, grazie alle recenti scoperte nella biologia della restenosi [102] si evince che la risposta a seguito dell'impianto di uno stent è estremamente complessa e caratterizzata da vari percorsi biochimici; e quindi un approccio logico nella lotta alla restenosi implica l'utilizzo di diversi farmaci per inibire uno o più dei suddetti eventi [107].

In questo contesto si sviluppa la seconda parte del presente lavoro di Dottorato mirata alla progettazione di un rivestimento multicomponente di stent, capace di realizzare un rilascio programmato e multifattoriale di farmaci. L'idea innovativa consta nell'introduzione, all'interno della matrice polimerica del rivestimento, di carrier per il rilascio di farmaci capaci di modulare le cinetiche anche di agenti idrofili. Incapsulando agenti idrofili in microsfele successivamente disperse nel rivestimento polimerico, è possibile, quindi, manipolare le cinetiche di tali agenti controllando il meccanismo di degradazione delle microsfele sul quale si base il rilascio.

Questa fase è stata focalizzata alla realizzazione di due diverse formulazioni di microsfele di PLGA per il rilascio di un agente idrofilo, la Fludarabina, e alla successiva messa a punto della tecnica di rivestimento multicomponente, capace di inglobare tali microsfele nel rivestimento polimerico di pHEMA senza alterarne le proprietà precedentemente valutate.

## **4.1 Materiali**

Dopo aver realizzato, ottimizzato e caratterizzato il rivestimento con pHEMA dello stent coronarico, si è passati ad inglobare in esso le microparticelle per il rilascio controllato di agenti attivi. Di seguito, quindi, sono riportati i materiali utilizzati oltre a quelli precedentemente descritti. Va sottolineato che la parte di realizzazione e caratterizzazione delle microsfele è stata realizzata dal Dipartimento di Chimica

Farmaceutica e Tossicologica della Facoltà di Farmacia, in collaborazione con la quale si svolge questo progetto di dottorato.

### **4.1.1 Acido Poli(lattico-co-glicolico) (PLGA)**

L'acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA) è un polimero amorfo ottenuto per copolimerizzazione degli acidi lattico e glicolico.

➤ *Acido polilattico (PLA)*: L'acido polilattico è un poliesteri lineare biodegradabile prodotto a partire dall'acido lattico. Per la presenza del centro chirale al carbonio  $\alpha$  esistono le due forme isomeriche D- ed L-, riportate in figura 1:

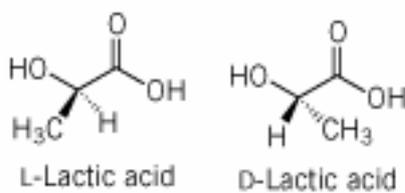


Figura 1: forme isomeriche D- e L- del PLA

Il PLA, per la presenza del gruppo metilico laterale ha proprietà chimiche, fisiche e meccaniche diverse rispetto al PGA. L'acido poli(L-lattico) (PLLA) è un polimero biocompatibile e biodegradabile. È un materiale semicristallino estremamente idrofobico con temperatura di transizione vetrosa intorno ai 65°C e temperatura di fusione di circa 170°C; è meno cristallino del PGA, con grado di cristallinità intorno al 35%. L'acido poli(D,L-lattico) (PDLLA) ha una distribuzione casuale degli isomeri D- ed L- lungo la catena; è un materiale amorfo e trasparente e il suo punto di transizione vetrosa varia con il peso molecolare restando comunque intorno ai 50-60°C, (tabella 1). La cinetica di degradazione del PDLLA è perciò più veloce di quella del PLLA. Secondo le dimensioni e lo spessore del campione, l'idrolisi del PDLLA si completa in 2-12 mesi. Indipendentemente dal peso molecolare, la cristallinità e la composizione del copolimero influenzano la velocità di degradazione. [170]

➤ *Acido poliglicolico (PGA)*: è un polimero solido cristallino: la sua cristallinità è compresa tra 35-75%, la transizione vetrosa avviene tra 35 e 40°C e la temperatura di fusione è di 225-230°C; è inoltre stabile termicamente e il tempo di degradazione è 6-12 mesi (tab. 1). Il PGA è lentamente idrolizzato dall'acqua e degrada, conseguentemente, in ambiente fisiologico fino ad essere assorbito in circa 4 settimane dall'impianto ed escreto in 4-6 mesi. [171]

Polymer	Glass Transition Temperature (°C)	Melting Point (°C)	Crystallinity
Poly(glycolic acid) $\text{-(O-CH}_2\text{-CO)-}_n$	36	230	Highly crystalline
Poly(D-lactic acid) $\left( \begin{array}{c} \text{Me} \\   \\ \text{-(O-CH-CO)-} \end{array} \right)_n$	67	180	Highly crystalline
Poly(D, L-lactic acid) $\left( \begin{array}{c} \text{Me} \\   \\ \text{-(O-CH-CO)-} \end{array} \right)_n$	57		Amorphous glass

Tabella 1: Caratteristiche e formule di struttura del PGA, PDLA e PDLA

➤ *Acido polilattico-co-glicolico (PLGA)*: è il copolimero degli acidi lattico e glicolico. Il copolimero formato da PLA tra il 30 e il 50% è più facilmente processabile e solubile. Quindi nella pratica si usano composizioni che vanno dallo 0 al 50% di PLA (tabella 2).

Polymer type	Melting point (°C)	Glass trans. temp. (°C)	Degradation time (months) <sup>a</sup>	Density (g/cm <sup>3</sup> )	Tensile strength (MPa)	Elongation, %	Modulus (GPa)
PLGA	Amorphous	45-55	Adjustable	1.27-1.34	41.4-55.2	3-10	1.4-2.8
DL-PLA	Amorphous	55-60	12-16	1.25	27.6-41.4	3-10	1.4-2.8
L-PLA	173-178	60-65	>24	1.24	55.2-82.7	5-10	2.8-4.2
PGA	225-230	35-40	6-12	1.53	>68.9	15-20	>6.9
PCL	58-63	-65	>24	1.11	20.7-34.5	300-500	0.21-0.34

Tabella 2: Confronto tra varie caratteristiche del PLA, PGA e PLGA

Il PLGA è un polimero amorfo che degrada lentamente. La forma equimolare presenta la maggiore velocità di degradazione e il suo tempo di emivita in vivo è di circa 15 giorni, mentre la completa degradazione si ha in 63 giorni (fig. 2) [140].

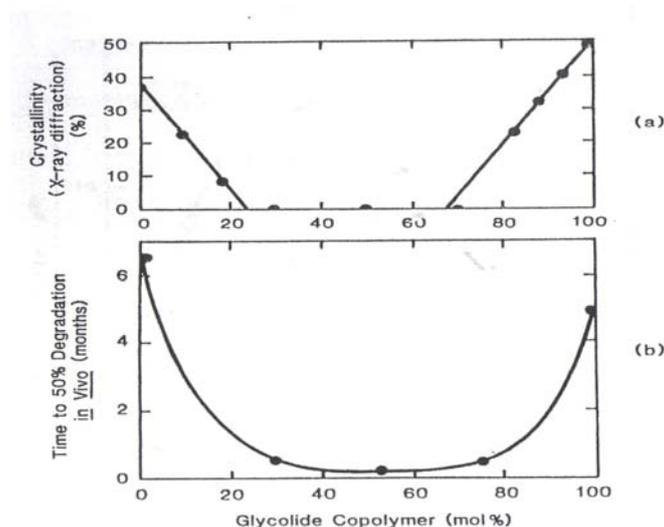


Figura 2: Proprietà del PLGA in funzione della composizione.

Per la realizzazione di vettori microparticellati è stato usato il PLGA 50-50 (lattico/glicolico %) prodotto dalla Boehringer Ingelheim, (Ingelheim, Germany), con due diversi Resomer il RG506 e RG502H, che differiscono tra loro per la viscosità intrinseca, maggiore per il resomer RG506 e minore per il RG502H.

#### **4.1.2 Fludara®**

La Fludarabine phosphate il cui nome frequente è Fludara®, è un agente chemioterapico usato per il trattamento di alcune forme tumorali, essa interferisce con le cellule tumorali e ne inibisce la crescita e la proliferazione nel corpo. Il tumore si forma quando le cellule all'interno del corpo si moltiplicano anormalmente ed incontrollabilmente e spargendosi nei tessuti vicini li distruggono. La Fludarabina evita alle cellule tumorali di moltiplicarsi provocando una deficienza di DNA e RNA nelle cellule portandole alla morte.

Clinicamente la restenosi viene trattata con farmaci antitumorali per inibire la crescita e la proliferazione delle cellule muscolari lisce che possono provocare trombi ed in-stent restenosi, dunque tale farmaco risulta essere idoneo all'applicazione

preposta. Inoltre, essendo idrofilo, è l'agente ideale per verificare il superamento dei limiti tecnologici attualmente alla base della realizzazione di stent capaci di rilasciare farmaci non idrofobi.

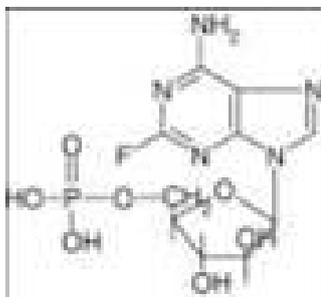


Figura 3: Formula chimica della fludarabina

La Fludara®, prodotto commerciale per iniezione, la cui formula strutturale è riportata in fig 3, si presenta in flacone monodose contenente 2-F-Ara-AMP (50 mg), mannitolo (50 mg) e idrossido di sodio (pH 7,7). Per isolare la 2-F-Ara-AMP dal mannitolo si procede con un processo di cristallizzazione così come schematizzato in figura 4.

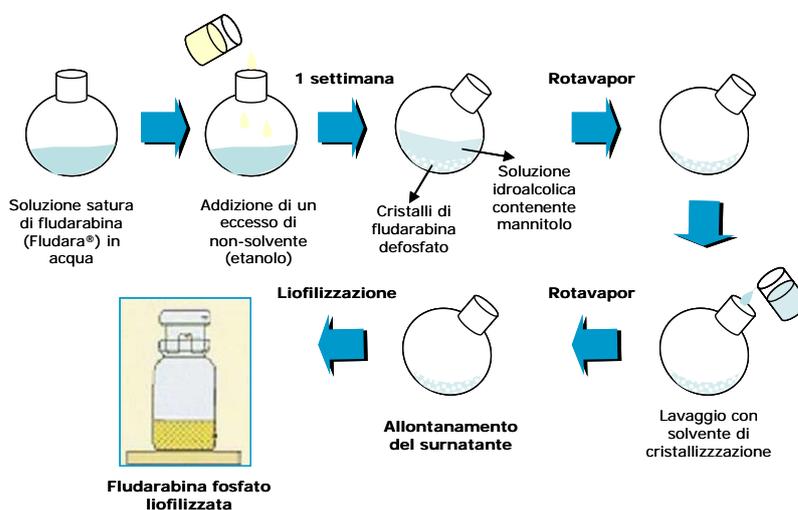


Figura 4: Cristallizzazione della 2-F-Ara-AMP.

Si prepara una soluzione satura di 2-F-Ara-AMP (Fludara®) in acqua, si aggiunge un eccesso di non solvente (etanolo) fino ad intorbidimento. La soluzione così ottenuta viene lasciata per una settimana a temperatura ambiente per favorire la separazione dei cristalli di 2-F-Ara-AMP dalla soluzione idroalcolica contenente

mannitolo. All'avvenuta formazione dei cristalli, si procede ad allontanare il surnatante meccanicamente e le tracce di solvente mediante rotavapor alla temperatura di 38°C. Il residuo solido così ottenuto è lavato con il solvente di cristallizzazione e sottoposto ad un ulteriore ciclo di allontanamento del solvente. Dopo il lavaggio, si procede a liofilizzare i cristalli di 2-F-Ara-AMP ottenuti, successivamente denominati semplicemente Fludarabina.

### 4.1.3 Rhodamina

Per visualizzare le microsfele all'interno del rivestimento polimerico di pHEMA al posto della Fludarabina è stata incapsulato un dye fluorescente (fluorocromo).

I fluorocromi (o anche probes) sono molecole che si legano in maniera altamente specifica a molecole bersaglio biologiche. Hanno curve di eccitazione ed emissione note (figura 5) e per questo trovano molte applicazioni biologiche. La scelta del fluorocromo va effettuata tenendo presente che questo deve assorbire la luce eccitante, mantenendo integro il legame con le molecole bersaglio. [172]

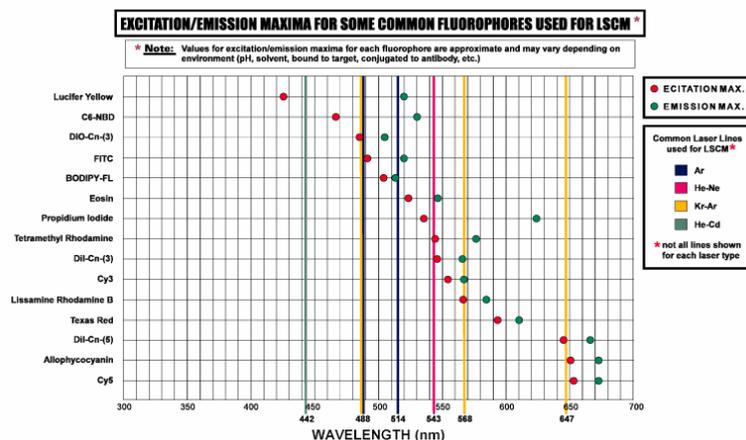


Figura 5: Picchi di eccitazione e lunghezze d'onda di emissione per vari fluorocromi

La rhodamine B base la cui formula di struttura è riportata in figura 6

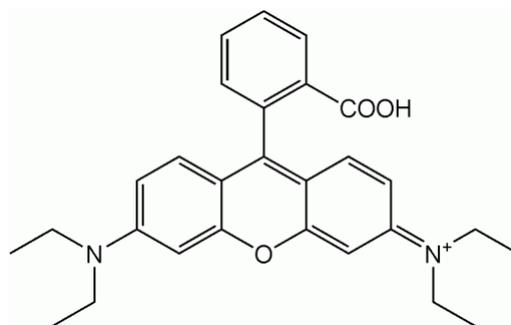


Figura 6: Formula di struttura della TRITC

presenta il picco di eccitazione ad una lunghezza di 540 nm e il picco d'emissione a 570 nm, in figura 7 è rappresentato il grafico dei relativi spettri.

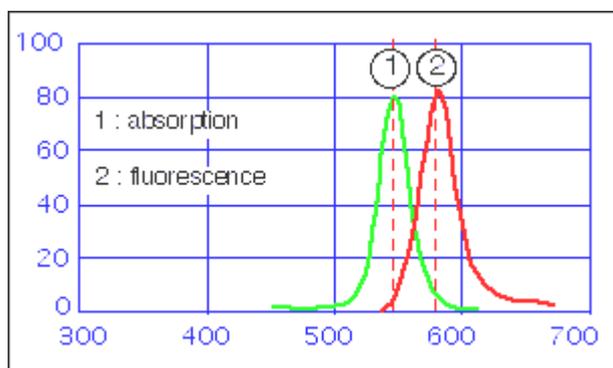


Figura 7: Spettri di eccitazione e di emissione della Rodamina

## 4.2. Metodi

### 4.2.1 Realizzazione microsferi

Microsferi a base di PLGA al 15% di Fludarabina (15 mg di Fludarabina per 100 mg di microsferi) sono state prodotte mediante la tecnica dell'emulsione multipla-evaporazione del solvente utilizzando due differenti tipi di polimero, entrambi al 10% p/v, il Resomer 50:50 RG506 (lotto **FLUDA506**) e il Resomer 50:50 RG502H (lotto **FLUDA502H**) (fig. 8). Per gli studi di microscopia confocale, la Fludarabina è stata sostituita con un'eguale quantità di Rhodamina B base, quale sonda fluorescente.

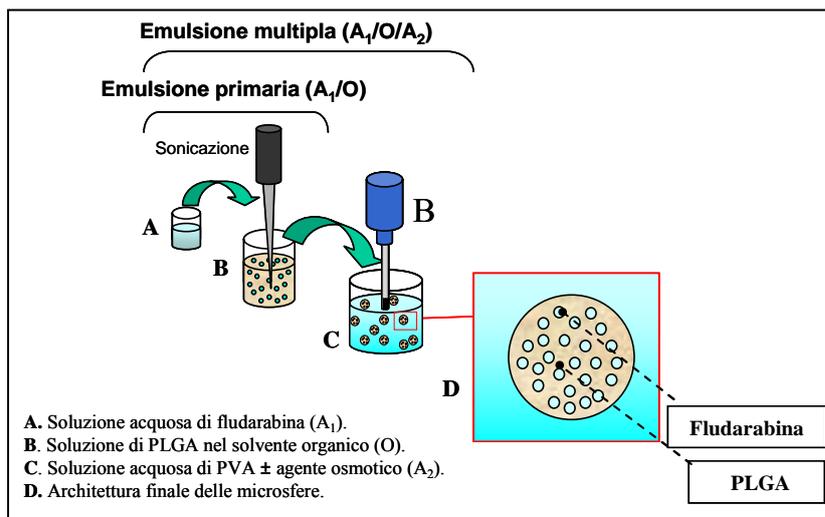


Figura 8. Preparazione delle  $\mu$ sfe mediante emulsione multipla- evaporazione solvente.

### **Fluda506**

Per la preparazione dell'emulsione primaria acqua in olio ( $A_1/O$ ), nel caso delle microsfe al 10% di PLGA Resomer 506, 17,5 mg di Fludarabina cristallizzata sono stati solubilizzati in 50  $\mu$ l di acqua filtrata (formulazione  $A_1/A_2$  v/v 1:200) ed emulsionati in 1 ml di una soluzione polimerica al 10% (p/v) in diclorometano mediante sonicazione per 2 minuti (Sonicator 3000 Misonix, USA). L'emulsione primaria ( $A_1/O$ ) è stata poi aggiunta alla fase acquosa esterna ( $A_2$ ) costituita da 10 ml di PVA 40-88 allo 0,5% (p/v), contenente NaCl al 3% (agente osmoticamente attivo). La dispersione, così ottenuta, è stata sottoposta ad omogeneizzazione a 11600 rpm (vel. 3) per 1 minuto (sonda 10F), con formazione di un'emulsione multipla ( $A_1/O/A_2$ ). Il solvente organico è stato allontanato per evaporazione sotto agitazione elettromagnetica (MR 3001K, Heidolph, Germania) per circa tre ore.

Le microsfe ottenute sono state lavate con acqua distillata, congelate e sottoposte ad un ciclo di liofilizzazione della durata di 24 ore (0,001 atm,  $-60^\circ\text{C}$ ) (Modulo Edwards, Gran Bretagna).

### **Fluda502H**

Le microsfe al 10% di PLGA Resomer 502H sono state preparate seguendo la stessa procedura descritta per il lotto FLUDA506. In questo caso, tuttavia, il PVA 40-88 è stato sostituito dal PVA 13-23 all'1%.

Microsfere bianche, a base del solo polimero, sono state preparate in entrambe le formulazioni per confronto, nelle stesse condizioni sperimentali.

	Encapsulation technique	PLGA type
FLU506	Multiple emulsion-solvent evaporation	Resomer RG506
FLU502H	Multiple emulsion-solvent evaporation	Resomer RG502H

Tabella 3. Schema ricapitolativi delle microsfere

## **4.2.2 Caratterizzazione microsfere**

### ***Osservazione al microscopio elettronico.***

Le microsfere sono state analizzate dopo liofilizzazione mediante Microscopia Elettronica a Scansione (SEM) (Leica S440, Germania).

### ***Analisi granulometrica.***

Il diametro medio e la distribuzione dimensionale delle particelle è stata determinata utilizzando un granulometro laser (Coulter LS 100Q, USA) a partire da microsfere liofilizzate previamente sospese in una soluzione acquosa di PVA allo 0,5% (p/v).

Il Coulter Counter permette di misurare le dimensioni di particelle per diffrazione di un raggio laser incidente. Il metodo di misura delle dimensioni della diffrazione di un raggio luminoso sfrutta il principio dell'ottica per cui piccole particelle investite da un fascio di luce disperdono la luce in caratteristici e simmetrici pattern che possono essere raccolti su uno schermo. La distribuzione delle dimensioni delle particelle può essere ricavata dal pattern dell'intensità della luce dispersa espresso come funzione dell'angolo formato rispetto alla direzione del raggio incidente (flux pattern) (fig. 9).

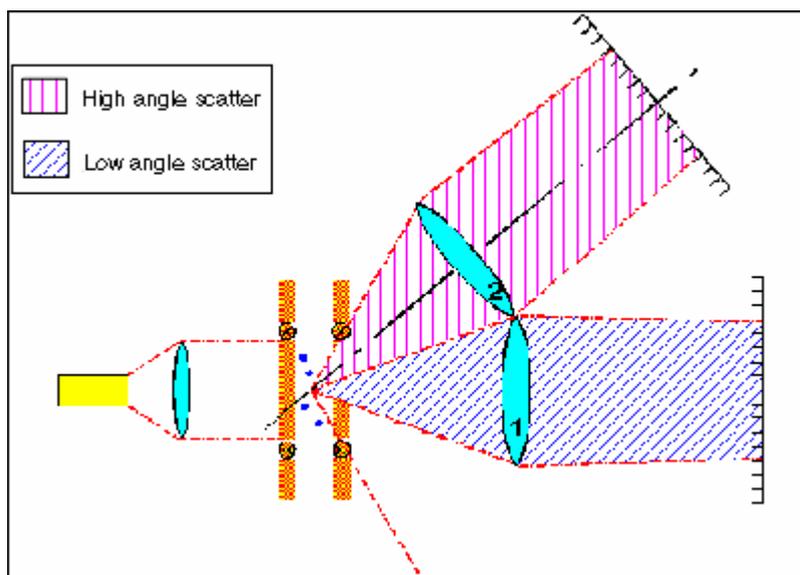


Figura 9: Schema della luce dispersa per interazione con particelle

Per ciascuna formulazione il diametro medio delle particelle è stato espresso in  $\mu\text{m} \pm$  la deviazione standard (SD) della misura effettuata in triplicato su tre differenti lotti di microsferi.

### ***Tassi d'incapsulazione.***

La quantità di Fludarabina incapsulata nelle microsferi è stata valutata mediante solubilizzazione del polimero in diclorometano e successiva estrazione della Fludarabina in fase acquosa. Un mg di microsferi è stato sospeso in 1 ml di diclorometano e sottoposto ad agitazione fino a completa solubilizzazione del PLGA. Alla sospensione ottenuta è stato aggiunto 1 ml di tampone fosfato 10 mM a pH 7,4. Le due fasi sono state miscelate su vortex per 1 minuto. Dopo centrifugazione dell'emulsione (15 minuti, 4°C, 5000 rpm), la fase acquosa è stata prelevata ed analizzata mediante HPLC per il contenuto e la qualità della Fludarabina incapsulata. I risultati sono espressi in termini d'incapsulazione reale percentuale (mg di Fludarabina incapsulata in 100 mg di microsferi)  $\pm$  la deviazione standard (SD) della misura effettuata su tre differenti lotti.

### ***Attività Fludarabina incapsulata***

Per verificare che la Fludarabina mantenesse la sua forma attiva durante il processo di realizzazione delle microsfeere e venisse rilasciata con il suo intatto potenziale bioattivo è stato effettuato un saggio di proliferazione cellulare.

Abbiamo utilizzato come coltura le A-10 Vascular Smooth Muscle Cells linea cellulare di ratto (VSMC) tra il 5 ed il 6 passaggio, cresciute in piastre petri per colture cellulari in adesione. Come mezzo di coltura abbiamo usato il Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) al 10% di Fetal Bovine Serum (Fbs), addizionato del 1% di penicillin /streptomycin ( P/S ) a 37°C con il 5% di CO<sub>2</sub>. Le cellule sono state starvation ad una confluenza dell' 80% con DMEM base per sincronizzare il ciclo cellulare e successivamente è stato effettuato il trattamento.

Quattro tipologie di campioni sono state utilizzate. Cellule incubate con mezzo di coltura contenente Fludarabina libera (50µM), cellule incubate con mezzo di coltura contenente microsfeere capaci di rilasciare la stessa quantità di Fludarabina (50µM) e i relativi due controlli negativi, cioè cellule incubate in presenza di mezzo di coltura puro o contenente microsfeere bianche (non caricate con farmaco). Su questi campioni è stato effettuato un saggio di proliferazione cellulare, attraverso l'analisi dell'assorbimento di bromodeossiuridina BrdU per determinare la sintesi di DNA dopo 24 e 48 ore di incubazione.

### **4.2.3 Tecnica di inclusione delle microsfeere nel rivestimento**

#### ***Singolo layer***

La tecnica di rivestimento dello stent coronarico ottimizzata nel capitolo precedente è stata utilizzata anche per la realizzazione del coating contenente le microsfeere per il rilascio di Fludarabina. Questa volta alla soluzione di pHEMA/etanolo (10%w/v) sono state aggiunte anche le microsfeere, sia Fluda506 che Fluda502H, e sullo stent in rotazione è stata spruzzata una sospensione pHEMA/etanolo/microsfeere a concentrazione 1mg/ml.

A partire dai risultati ottenuti nella fase di ottimizzazione del coating di solo pHEMA, sono stati scelti come parametri di processo una velocità di 6 rpm, tempo di

nebulizzazione della soluzione di un giro (pari a 10sec) e una modalità di evaporazione in camera bianca.

### ***Multiplo layer***

Una tecnica modificata, variando le condizioni di evaporazione, è stata in seguito ottimizzata ed utilizzata per un omogeneo ed uniforme rivestimento degli stent con microsfele.

Dopo aver nebulizzato la sospensione di pHEMA/etanolo/microsfere, lo stent, ancora agganciato per un'estremità al sistema rotore, viene chiuso in una eppendorf per realizzare delle condizioni di evaporazione del solvente estremamente lente. Il campione viene tenuto così sigillato overnight e, successivamente, si procede a un rivestimento di copertura di solo pHEMA o ad una reiterazione della tecnica modificata.

I campioni ottenuti sono stati successivamente sottoposti ad analisi gravimetrica per ottenere una stima della quantità di microsfele, e quindi di farmaco, effettivamente caricate sulla superficie dello stent coronarico.

Tali campioni, inoltre, sono stati anche realizzati utilizzando le microsfele contenenti Rhodamina, in maniera da essere facilmente visualizzabili attraverso analisi al microscopio confocale, per caratterizzarne la disposizione spaziale.

### ***Microscopia stereoscopica***

Per ottenere immagini in grado di evidenziare la presenza delle microsfele all'interno del rivestimento di pHEMA sullo stent, si è reso necessario l'utilizzo di una fotocamera digitale collegata al microscopio stereoscopico. I raccordi non contengono parti ottiche, pertanto la visualizzazione dell'immagine e la sua messa a fuoco, si devono unicamente alle funzioni di questo tipo di microscopio.

Un normale microscopio è fornito di un solo obiettivo, in cui le eventuali due immagini inviate agli oculari sono geometricamente identiche perché ottenute tramite una superficie piana semiriflettente per sdoppiamento di un unico fascio. Nei microscopi stereoscopici, invece, vi sono due microscopi composti indipendenti, con due obiettivi. I due microscopi, quindi, osservano l'oggetto da diversa angolatura e le due immagini non sono identiche. Da ciò nasce la sensazione di rilievo, cioè la visione stereoscopica (a tre dimensioni). Consideriamo uno dei due schemi di base dei

microscopi stereoscopici, quello chiamato “ad obiettivo principale comune” (CMO) (fig. 10).

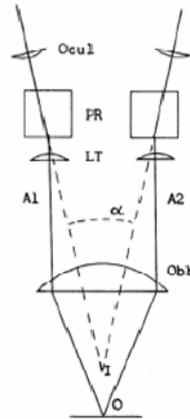


Figura 10: Principio di funzionamento dello stereomicroscopio

In esso, l'oggetto O sta nel primo fuoco di un obiettivo di grandi dimensioni il quale ne dà un'immagine all'infinito. Un diaframma ricava da questo obiettivo due fasci parziali con gli assi paralleli fra loro (A1 ed A2). In questo tratto sono situati in genere i sistemi per il cambiamento dell'ingrandimento. Sopra, si trovano in genere le lenti di tubo (LT), il sistema dei prismi raddrizzanti (PR) e gli oculari. Per variare la distanza interpupillare si fanno spesso ruotare i tubi porta-oculari, solidariamente coi prismi, attorno agli assi ottici A1 ed A2, che sono paralleli fra loro. Poiché in molti modelli i tubi porta-oculari sono inclinati rispetto agli assi A1 - A2, si ha con questa rotazione una variazione della distanza fra gli oculari, cioè la regolazione della distanza interpupillare. Il punto di miglior fuoco O non si sposta, ma il punto di incontro degli assi degli oculari (I) si sposta, e di parecchio. In casi limite (distanza pupillare al valor minimo) gli assi dei due oculari possono divenire paralleli ed anche divergenti, ed in questo caso si ostacola la fusione psicologica delle due immagini. Non si ha spostamento di nessuna delle due immagini rispetto al campo visivo, ma cambia l'angolo di convergenza degli oculari e degli occhi. Questo non è fisiologico, anche se viene in genere tollerato. Viene tollerata anche la lieve rotazione in senso opposto delle due immagini attorno al loro centro, rotazione che si verifica variando la distanza pupillare.

### ***Microscopia confocale a scansione laser (CLSM)***

In un microscopio confocale la luce di un laser viene fatta convergere dalle lenti dell'obiettivo in un punto estremamente piccolo del campione osservato. Il punto stesso, attraverso un sistema di specchi oscillanti, viene spostato attraverso tutto il campo visivo dell'obiettivo così da effettuare una scansione completa di tutto il piano focale.

Diversamente da quanto avviene in un microscopio tradizionale, in un microscopio a fluorescenza la sorgente luminosa è laser. Grazie alla piccolissima area di campione analizzata, la risoluzione è molto alta e le caratteristiche della luce risultante (estrema coerenza, alta intensità e lunghezza d'onda unica) consentono di evitare i fenomeni di aberrazione e diffrazione tipiche della luce prodotta dalle lampade a incandescenza.

Il laser eccita i soli fluorocromi appartenenti al piano focale, corrispondenti al punto di massima concentrazione del raggio; in questo modo le sezioni non appartenenti al tale piano non vengono eccitate e il risultato complessivo è una riduzione degli aloni e del rumore di fondo [173].

Il principio di funzionamento di un microscopio confocale può essere schematizzato come segue (fig. 11):

- La luce, emessa dal laser, è deviata dallo specchio dicroico
- Dopo, la luce investe il campione, eccitandolo. I suoi fluorocromi emettono una radiazione luminosa la quale, catturata dalle lenti dell'obiettivo, colpisce lo specchio dicroico. Attraverso questo la luce riflessa è deviata mentre la luce fluorescente passa attraverso il pinhole e un filtro, giungendo al fotomoltiplicatore.
- Il pinhole funge da diaframma e impedisce che la luce proveniente dalle zone fuori fuoco raggiunga il fotomoltiplicatore. In questo modo solo il segnale luminoso relativo al piano focale contribuisce alla formazione dell'immagine finale. E' comunque presente un minimo contributo delle zone fuori fuoco dovuto a fenomeni di rifrazione all'interno del campione.
- Il fotomoltiplicatore trasforma l'intensità luminosa rilevata in un segnale elettrico proporzionale all'intensità stessa.

- Il segnale elettrico uscente dal fotomoltiplicatore è poi digitalizzato e inviato ad un computer che registra l'intensità luminosa in ogni punto. Questi valori di intensità sono utilizzati per ricostruire l'immagine video: ogni punto del campione corrisponde ad un pixel, e l'intensità luminosa di ogni punto è rappresentata da un certo tono di grigio. L'accostamento di tutti i singoli pixel analizzati fornisce l'immagine finale.

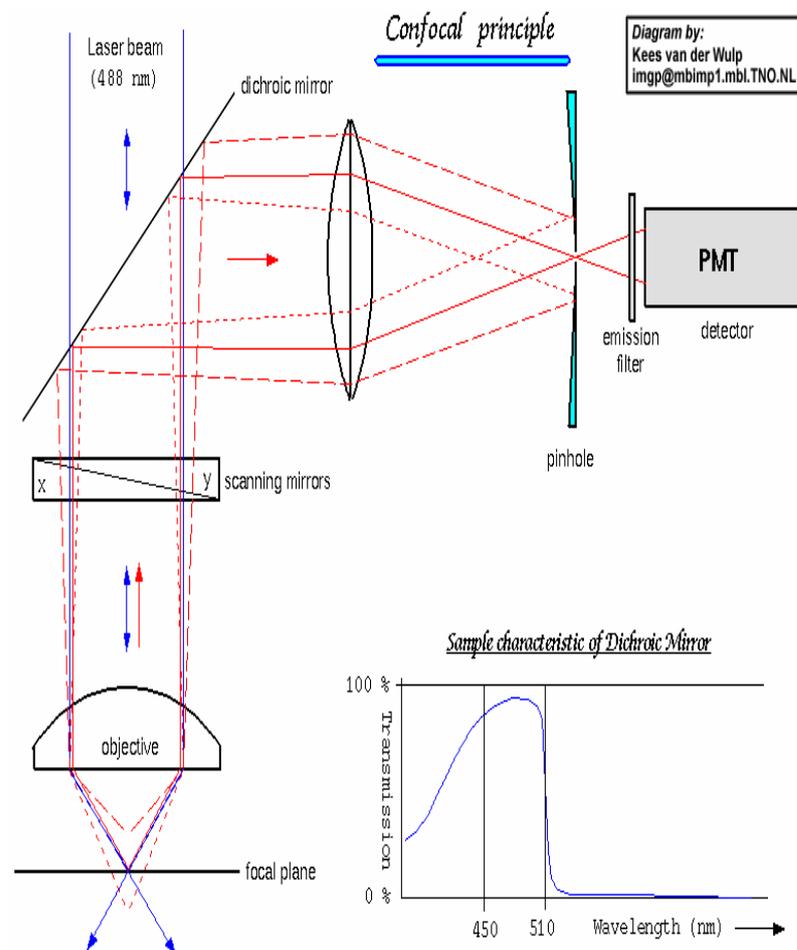


Figura 11: Principio di funzionamento di un microscopio confocale

- Spostando il campione lungo l'asse verticale dopo ogni scansione è possibile effettuare scansioni di differenti piani focali. Queste scansioni sono dette sezioni ottiche e la loro unione, eseguita via software, consente di ricostruire un'immagine complessiva dell'intero volume, in cui tutti i piani sono contemporaneamente a fuoco. Questa è l'acquisizione del volume. (figura 12) [174]

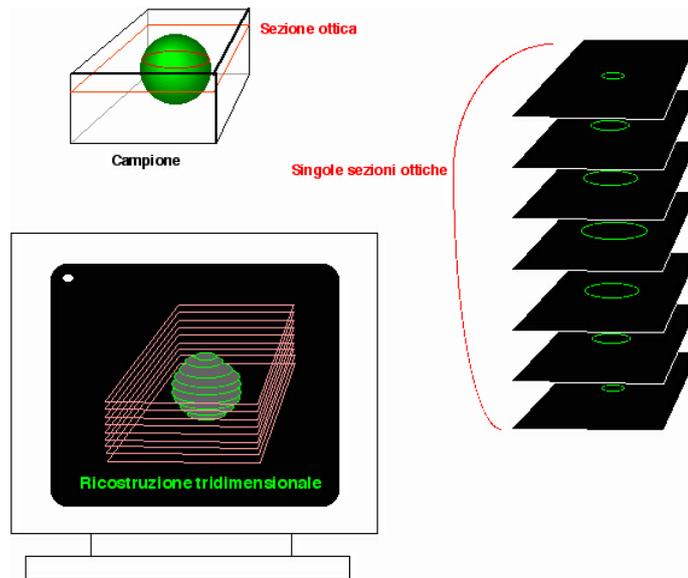


Figura 12: Sezioni ottiche e ricostruzione 3D di un'immagine al confocale

L'immagine acquisita può essere successivamente elaborata per quanto riguarda la regolazione del contrasto, cromia, e rotazione virtuale del volume acquisito attraverso la scansione. È inoltre possibile effettuare un controllo delle dimensioni dei campioni.

I campioni utilizzati per l'analisi con la LSCM devono essere marcati con un *probe* (o dye) fluorescente. Nella scelta del probe da utilizzare è necessario considerare la lunghezza d'onda di eccitazione ed emissione, le linee di laser disponibili, i filtri da utilizzare e la possibilità che, una volta legata al probe, la molecola possa presentare caratteristiche differenti.

Un problema a cui può andare incontro un campione da analizzare al microscopio confocale è il bleaching del marcatore fluorescente. Per bleaching si intende lo spegnimento irreversibile della fluorescenza, legato all'elevata potenza del laser che investe il campione. [175]

## **4.3 Risultati e discussioni**

### **4.3.1 Caratterizzazione microsfere**

Si riportano di seguito le micrografie SEM delle microsfere di PLGA contenenti Fludarabina.

### ***Fluda506***

Inizialmente si sono riscontrati alcuni problemi di ottimizzazione del processo di realizzazione. A causa dell'elevata affinità con l'acqua, essendo la Fludarabina una molecola idrofila, durante la preparazione e il risciacquo il farmaco fuoriusciva dalle microsfere lasciandole porose e vuote all'interno. Dall'analisi SEM appariva evidente che la morfologia non fosse del tutto sferica e con notevoli differenze nelle dimensioni, figura 13; inoltre, utilizzando un ingrandimento maggiore vengono messi in evidenza i pori venutisi a creare al momento della fuoriuscita del farmaco durante la preparazione, figura 14.

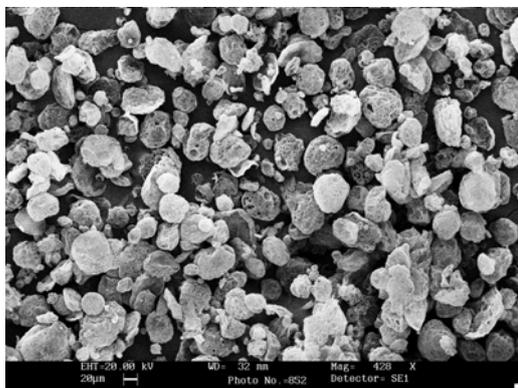


Figura 13: Micrografia SEM delle Fludara 10

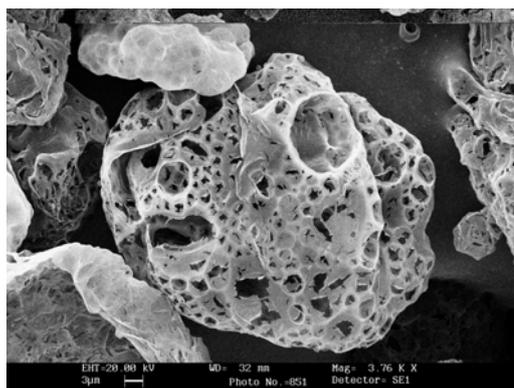


Figura 14: Singola microsfera di Fludara 10

Si è pensato allora di aggiungere un sale nella fase water esterna per creare una pressione osmotica capace di bilanciare la fuoriuscita di Fludarabina. Dopo vari tentativi, caratterizzati dalla variazione della quantità di magnitolo presente nella fase esterna, è stata ottenuta una formulazione di microsfere sferiche e perfettamente lisce,

come evidenziato dalle immagini SEM riportate per due diversi ingrandimenti, figure 15 e 16.

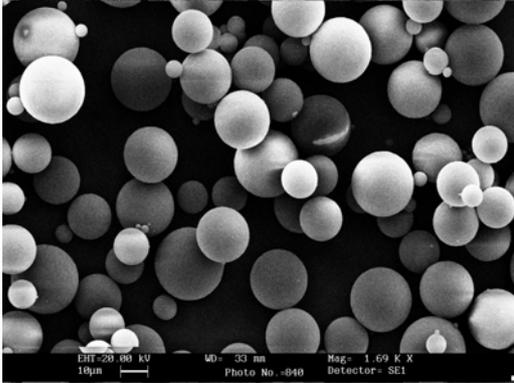


Figura 15: Micrografia delle Fluda506

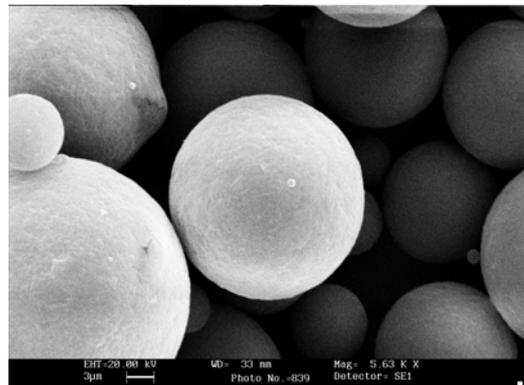


Figura 16: Singola microsfera di Fluda506

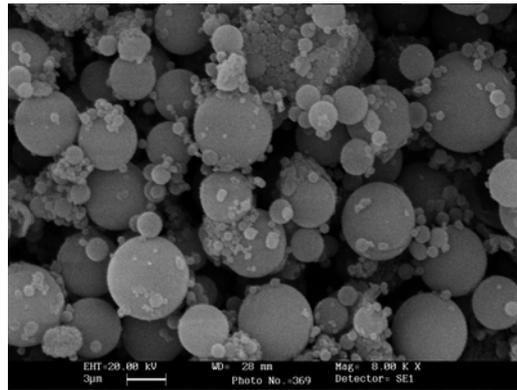
Dall'analisi granulometrica al Coulter, si evince una monodispersione dei diametri, come già intuibile dalle osservazioni SEM, centrata intorno a un valore del diametro medio di 14.4  $\mu\text{m}$  (Tabella 4). L'efficienza di incapsulazione si è rivelata ottima, e pari a un valore molto prossimo al 100%.

### ***Fluda502H***

La formulazione Fluda502H differisce dalla Fluda506 per la tipologia del Resomer. Le microsfele sono state realizzate sulla falsariga della metodologia modificata precedentemente descritta; quindi le microsfele sono state subito ottenute con una morfologia sferica e non porosa. L'unica differenza è la dimensione delle stesse, che risulta nettamente inferiore; ciò è attribuibile alla diversità del polimero che, essendo caratterizzato da una viscosità intrinseca inferiore, durante la fase

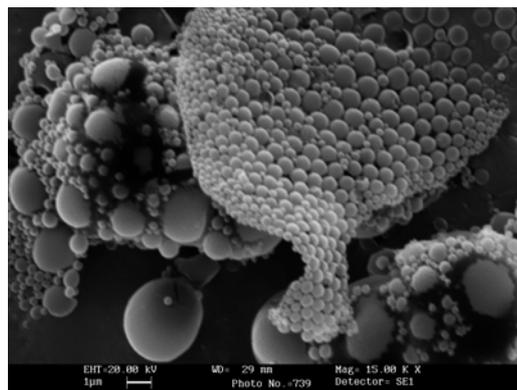
dell'emulsione offre minore resistenza determinando dimensioni più piccole delle fase disperdente.

Di seguito sono riportate le analisi al microscopio elettronico, dalle quali si evince una distribuzione meno omogenea dei diametri (fig. 17). Sono ben distinguibili due popolazioni di microsfele, una più grande con diametro intorno ai  $4\mu\text{m}$  e una seconda di molto inferiore, con dimensioni dell'ordine delle centinaia di nanometri.



*Fig. 17. Micrografia delle microsfele Fluda502H*

Ad un'analisi ad ingrandimenti più spinti, è possibile osservare che la popolazione nanometrica di microsfele, a causa del vuoto spinto necessario alla preparazione dei campioni, tende a sinterizzare creando un layer omogeneo di microsfele, come evidenziato dall'immagine 18.



*Figura 18: Singola microsfera di Fluda502H*

Tale distribuzione è stata ulteriormente confermata dall'analisi granulometrica al Coulter, con un diametro medio di  $6.9\mu\text{m}$  (tab. 4). Per questa formulazione l'efficienza

di incapsulazione risulta essere molto inferiore, ma ciò era prevedibile a causa delle ridotte dimensioni delle particelle, risultando dell'ordine del 36%.

Le proprietà morfologiche e di incapsulazione delle due diverse tipologie di microsfele sono riassunte nella tabella 4.

	Encapsulation technique	Mean diameter (mg ± SD)	FLU actual loading (%)	Encapsulation efficiency (%)
<b>FLU506</b>	Multiple emulsion - solvent evaporation	14.4 ± 2.0	20	99 ± 5.0
<b>FLU502H</b>	Multiple emulsion - solvent evaporation	6.9 ± 1.0	6.9	36.7 ± 3.0

Tabella 4 Caratteristiche delle due formulazioni di microsfele

### ***Attività della Fludarabina incapsulata***

Per verificare che durante il processo di incapsulamento della Fludarabina nelle microsfele il farmaco non si denaturi e perda la sua attività, è stato effettuato un saggio di proliferazione cellulare su VSMs. Dopo 12h di incubazione con Bromodeossiuridina i campioni controllo, cioè cellule piastrate in presenza di mezzo semplice o contenente microsfele bianche, presentano un assorbimento di BrdU pari al 40 %, come mostrato in fig. 19.

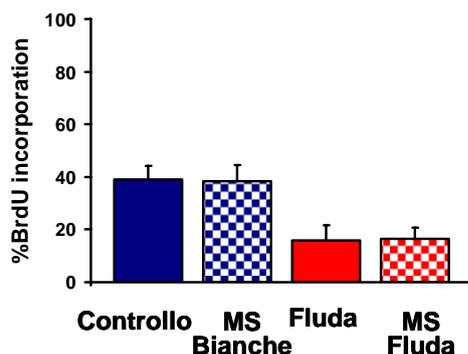


Figura 19: Risultati del BrdU test per proliferazione cellulare a 12h

Mentre i campioni contenenti cellule piastrate in presenza di Fludarabina libera (50µmol) mostrano una riduzione del valore al 20%, indice dell'attività antiproliferativa dell'agente tumorale. I campioni di cellule nel cui mezzo di coltura sono state introdotte

microsfere che a 12 ore hanno rilasciato la stessa quantità di farmaco, mostrano un comportamento del tutto analogo, assorbendo circa il 20% di BrdU (fig. 19).

Questa diminuzione è indice di una ridotta proliferazione cellulare, dovuta proprio alla presenza della Fludarabina nel mezzo di coltura. L'analogo comportamento restituito dai due diversi campioni è indice dell'intatta attività della Fludarabina rilasciata dalle microsfere.

Tale esperimento è stato portato avanti nel tempo. Dopo 48 ore, i campioni contenenti la Fludarabina libera hanno raggiunto il controllo, assorbendo circa il 100% di BrdU, mentre sui campioni incubati in presenza di microsfere capaci di rilasciare il farmaco si ha un valore seppur minimamente inferiore, di circa l'80% (fig. 20). Questo fenomeno può essere giustificato prendendo in considerazione l'emivita della fludarabina. Dopo 48h in mezzo di coltura, la fludarabina libera ha perso la sua attività, diventando inefficace, al contrario le microsfere generano un apporto di fludarabina modulato nel tempo, rendendola disponibile nella sua forma attiva per un periodo prolungato. L'evidenza che a 48h, però, il valore del test sia già dell'80% è dovuto al rilascio non ancora ottimizzato dalle microsfere.

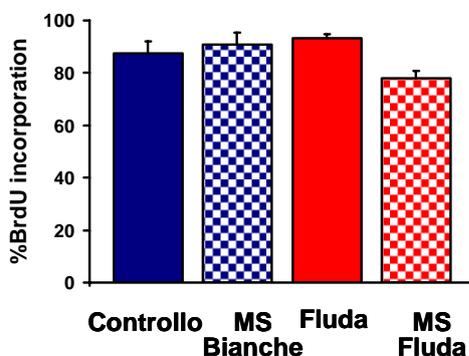


Figura 20: Risultati del BrdU test per proliferazione cellulare a 48h

### **4.3.2 Realizzazione del rivestimento**

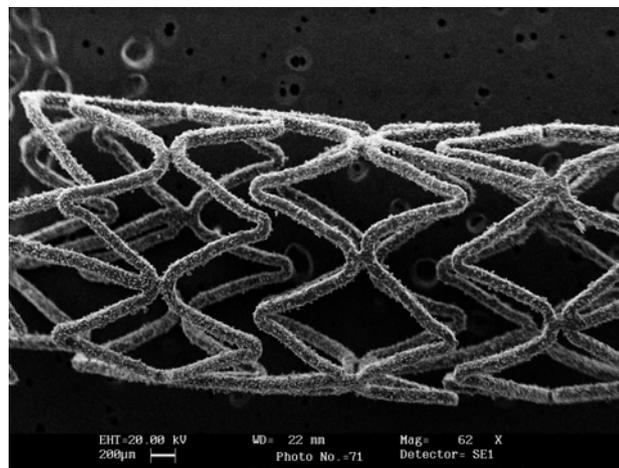
#### ***Singolo layer***

Successivamente alla caratterizzazione delle microsfere sono state effettuate prove di rivestimento multicomponente, cioè utilizzando una sospensione di pHEMA e microsfere per esaminare l'efficacia del sistema. La sospensione 1mg/ml di

pHEMA/etanolo/microsfere è stata nebulizzata sugli stent in rotazione e lasciata evaporare in ambiente controllato. I campioni così ottenuti sono stati successivamente analizzati al microscopio a scansione elettronica.

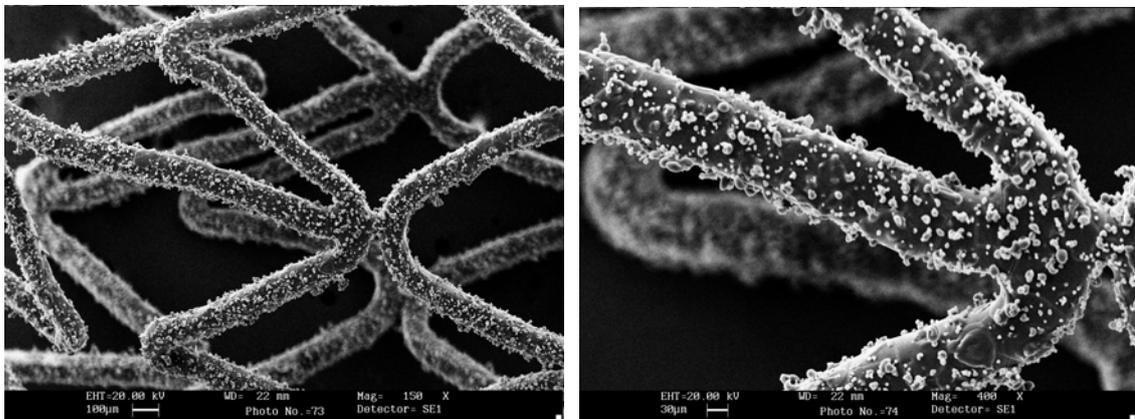
### **Fluda506.**

Come si può evincere dalle seguenti micrografie SEM, le maglie dello stent non vengono occluse dalla soluzione polimerica, risultando in un layer omogeneo come nel caso di solo pHEMA (fig. 21)



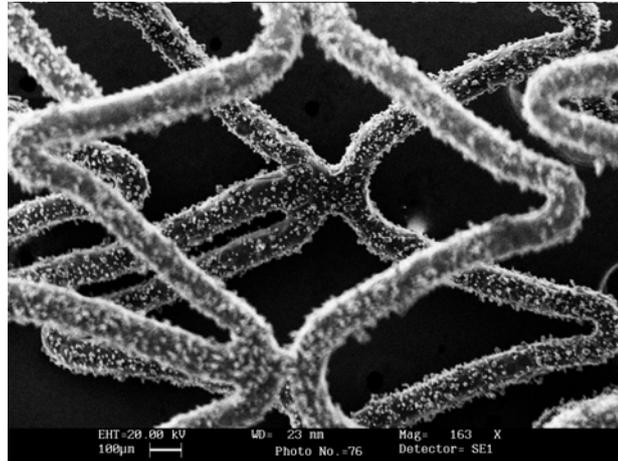
*Figura 21: Micrografia SEM dello stent Tsunami rivestito con  $\mu$ -sfere*

Andando ad analizzare i campioni più in profondità, quindi con ingrandimenti maggiori, è possibile però constatare la presenza delle microsfere non completamente inglobate nel rivestimento (fig. 22)



*Figura. 22 Micrografie dello stent ricoperto con Fluda506 a diversi ingrandimenti*

Bisogna comunque sottolineare, che il rivestimento risulta omogeneo su tutta la lunghezza dello stent, compatto e senza crepe, e la superficie è omogeneamente rivestita anche nella parte interna dello stent come evidenziato dalla seguente micrografia (fig. 23)

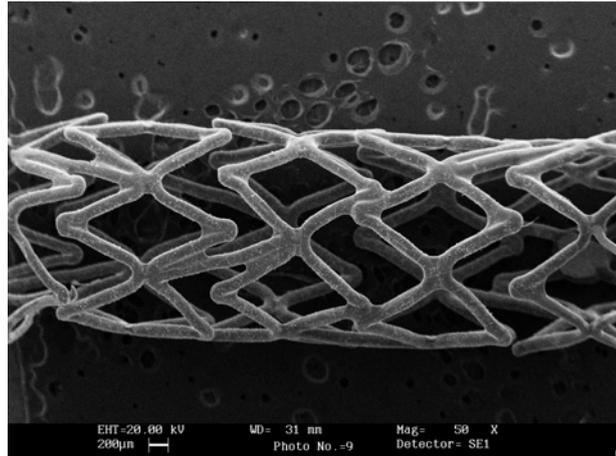


*Figura 23: Evidenza della superficie interna dello stent rivestito con FLuda506*

Tale rivestimento non risulta però ottimale per l'applicazione preposta, infatti la presenza di microsfele non completamente inglobate nel rivestimento potrebbe provocare il distacco di alcune di esse durante la procedura d'impianto e creare un trombo.

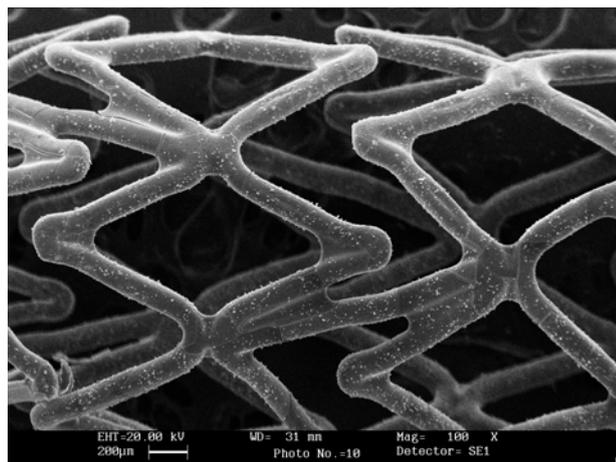
Tenendo presente i risultati di ottimizzazione del layer di solo pHEMA, da cui si evince che alla velocità di 6rpm (quella correntemente usata) il rivestimento per più giri determina uno spessore maggiore, si è pensato che tale incremento riuscisse a ricoprire perfettamente le microsfele. Di seguito si riportano i risultati ottenuti nebulizzando la sospensione precedentemente descritta per 4 giri.

Come evidenziato dalla micrografia, le maglie risultano comunque non occluse dal rivestimento (fig. 24) e la situazione è notevolmente migliorata.



*Figura 24: Rivestimento dello stent con microsfero dopo 4 giri*

Ciò nonostante il risultato non è comunque idoneo dato che sono ancora presenti microsfero esterne al rivestimento (fig 25).



*Figura 25: Rivestimento dello stent zoom con microsfero*

Tuttavia, è ulteriormente verificato che l'introduzione delle microsfero non altera i risultati di rivestimento ottimizzati per il solo pHEMA. Infatti, gli stent così rivestiti sono caratterizzati da uno spessore omogeneo che risulta dell'ordine dei 20µm come quelli ottenuti per il solo pHEMA dopo una nebulizzazione per 4 giri (fig. 26).

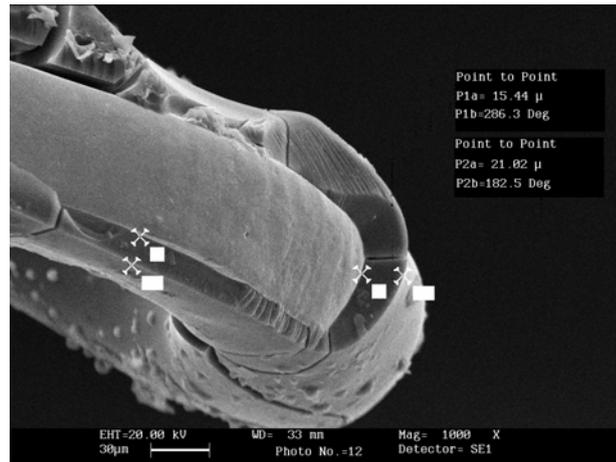


Figura 26: Spessore del rivestimento contenente le microsferi FLuda506

E' però evidente che il rivestimento così ottenuto va ulteriormente migliorato.

### Fluda502H

Analisi del tutto analoghe sono state effettuate utilizzando le microsferi Fluda502H.

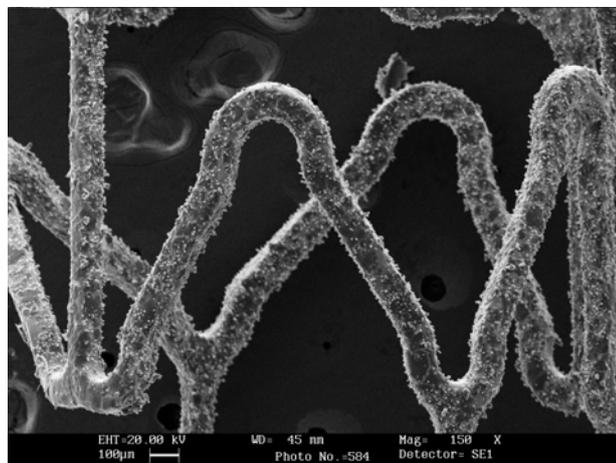


Figura 27: Stent rivestito con Fluda502H

Nonostante le dimensioni ridotte i risultati ottenuti non sono comunque soddisfacenti. Infatti, le microsferi risultano essere ancora non del tutto inglobate nel rivestimento, anche se per questa tipologia la maggior parte delle microsferi è visibile al di sotto del sottile layer di pHEMA (fig. 28).

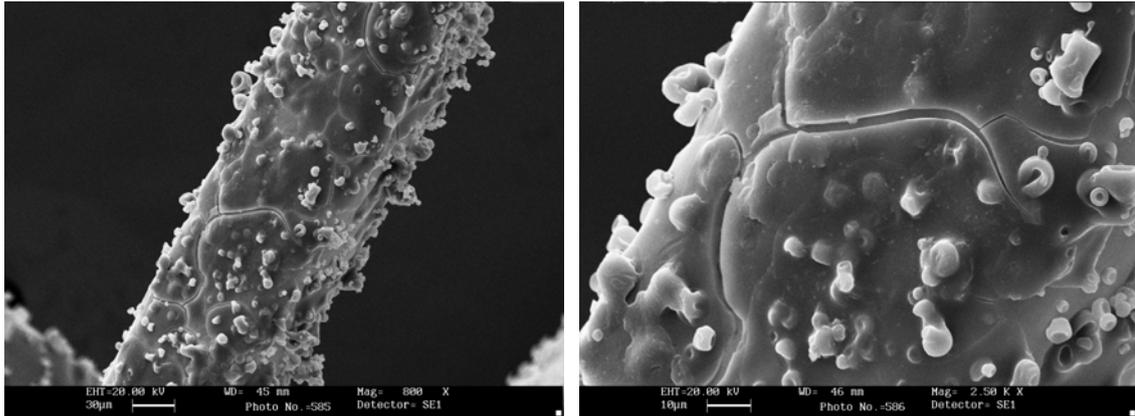


Figura 28: Micrografie a differenti zoom del rivestimento con Fluda502H

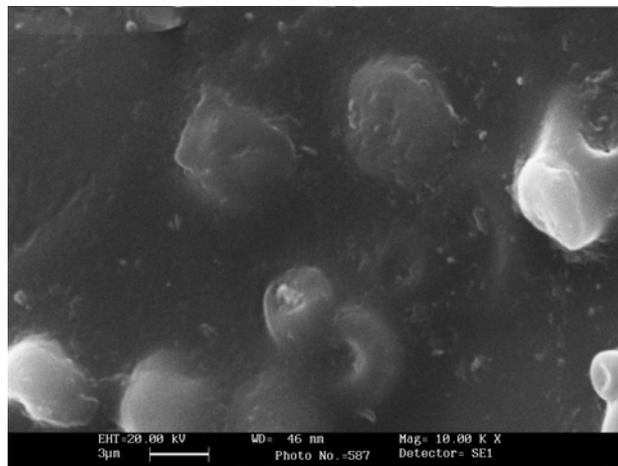


Figura 29. Particolare dello stent rivestito ad un ingrandimento spinto

Infatti dalle micrografie SEM (fig. 29) si evince che la maggior parte delle microsfele, seppur inglobate nel polimero, non sono completamente incluse in esso ma fuoriescono. Questa situazione non è per nulla auspicabile, in quanto un eventuale distacco dei microcarrier potrebbe dar luogo a trombi od emboli ed inficiare l'efficacia del rilascio.

### ***Multiplo layer***

La tecnica di rivestimento è stata quindi modificata, dato che la diminuzione delle dimensioni delle microsfele non ha migliorato l'outcome del dispositivo rivestito.

I campioni, dopo nebulizzazione, sono stati posti in un ambiente chiuso per consentire un'evaporazione lenta del solvente. Questa modifica ha consentito di ottenere

un layer di sole microsfere adese alla superficie dell'acciaio, al quale poi è stato sovrapposto un layer di pHEMA come precedentemente descritto.

La spiegazione di tale fenomeno è la seguente, una volta messe in sospensione le microsfere si imbibiscono di pHEMA ed etanolo, e a contatto con l'acciaio aderiscono istantaneamente. Al contrario, a causa dell'evaporazione lenta, il pHEMA non riesce a creare lo strato omogeneo dovuto al rapido allontanamento del solvente e quindi cola per gravità lasciando solo un monolayer di microsfere (fig.30).

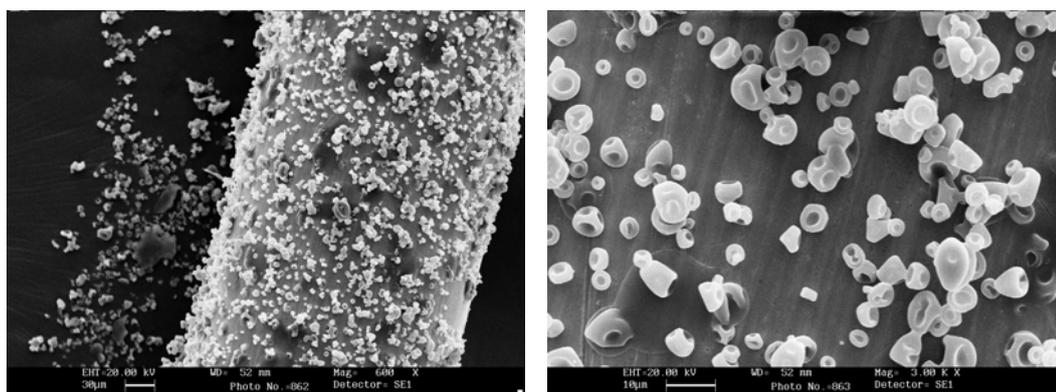


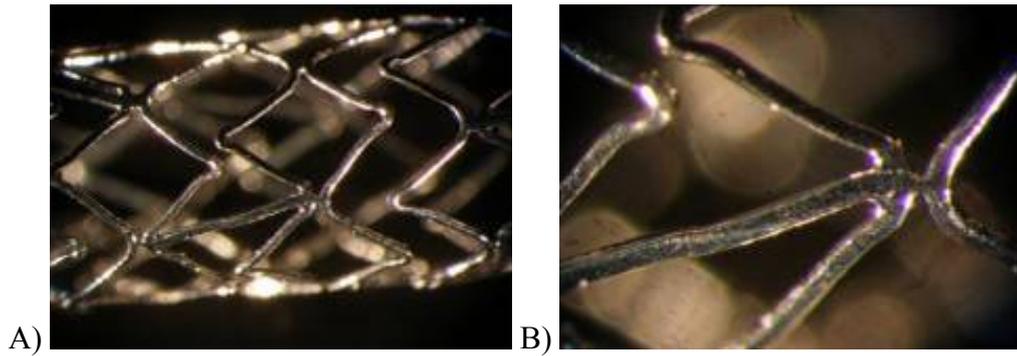
Figura 30: Immagine della rivestimento dopo evaporazione lenta.

Tale modifica ci ha inoltre permesso di valutare la quantità di microsfere effettivamente caricata sullo stent pesando i campioni a seguito di ogni step di rivestimento.

### ***Fluda506***

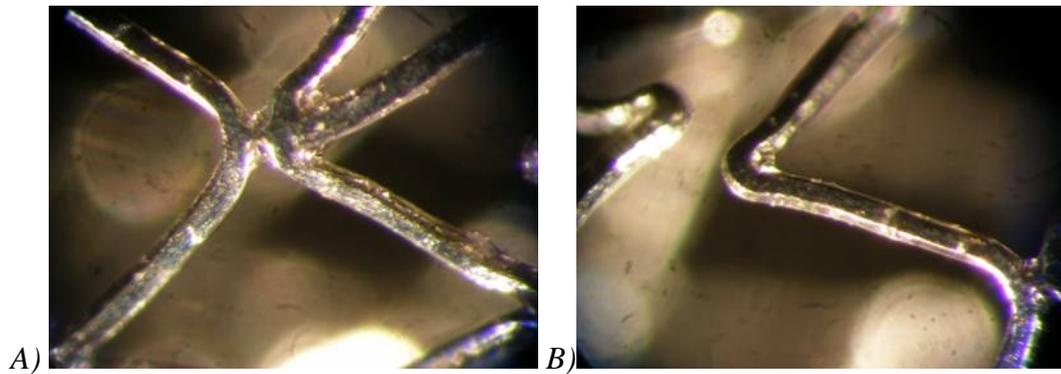
Per ogni step, i campioni sono stati analizzati al microscopio stereoscopico per valutare visivamente la quantità di microsfere effettivamente caricate sullo stent e prendere in considerazione l'eventuale possibilità di effettuare un ulteriore rivestimento, nel caso in cui si presentino porzioni prive di microsfere sulla superficie interna o esterna dello stent.

Sono state effettuate anche immagini di controllo dello stent tal quale, senza alcun rivestimento (fig. 31) come controllo negativo.



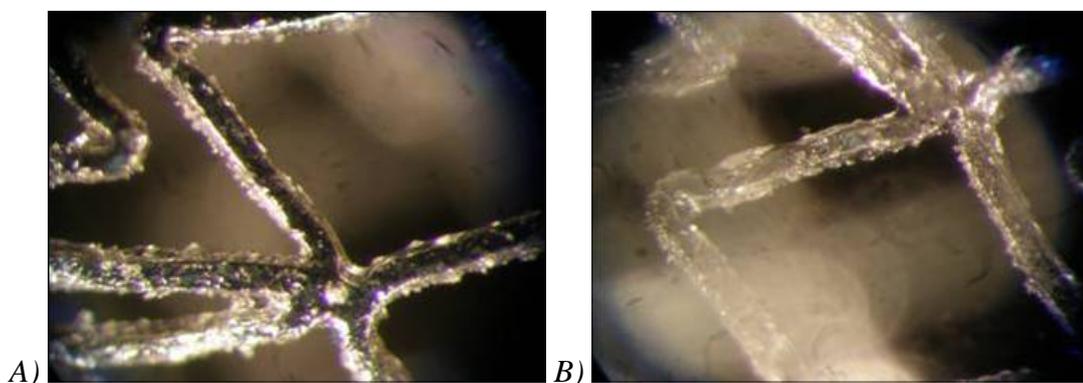
*Figura 31: Stent senza rivestimento*

Il primo layer di microsferi (fig. 32) risulta poco uniforme su tutta la superficie dello stent. Ciò a ragione del fatto che le microsferi Fluda506 sono piuttosto grandi, con diametro circa  $14\mu\text{m}$ , e questo causa un numero maggiore di zone di vuoto.



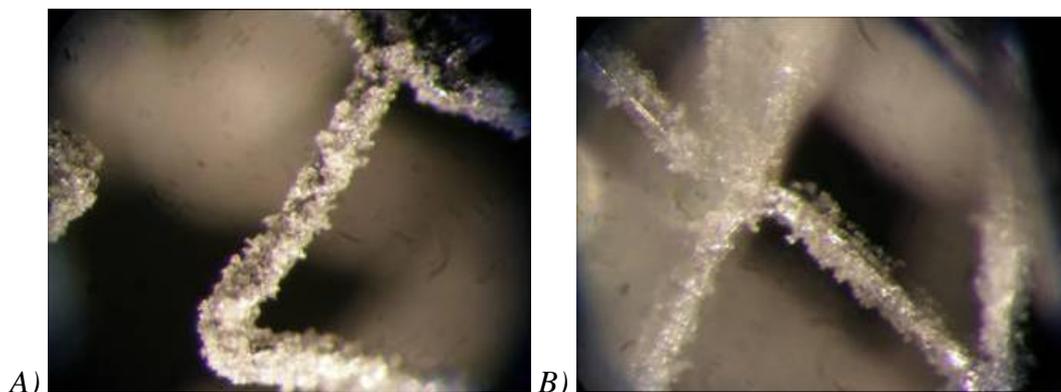
*Figura 32: Stent con un rivestimento di microsferi Fluda506. A: lato esterno; B: lato interno*

Effettuando il secondo rivestimento si vede un layer di microsferi sicuramente più omogeneo del precedente, ma non ancora sufficientemente compatto da poter eludere la creazione di un terzo rivestimento (fig. 33).



*Figura 33: Stent con due rivestimenti di microsferi Fluda506. A: lato esterno; B: lato interno*

E', quindi, stato possibile realizzare con tale tipologia di microsfele, un terzo layer (fig. 34). Tutte le analisi ai veri step di rivestimento sono state effettuate prendendo in considerazione anche la parte interna dello stent, quella non a diretto contatto con il flusso nebulizzato, per verificare la presenza di microsfele.



*Figura.34: Stent con un rivestimento di microsfele Fluda506. A: lato esterno; B: lato interno*

Come riscontrabile dalla stessa figura le maglie dello stent non risultano essere occluse dalla soluzione polimerica.

Dall'analisi gravimetrica, si è dedotto che con ogni rivestimento è possibile rivestire lo stent con circa 0.24 mg di microsfele Fluda506. Conoscendo la dose di Fludarabina contenuta in un mg di microsfele è possibile risalire alla quantità di farmaco effettivamente carica sullo stent (Tabella 5)

Poiché tali microsfele contengono una elevata quantità di farmaco, 1 mg di microsfele contengono circa 200 µg di fludarabina, la massima dose realizzabile è di 128 µg.

E' quindi possibile ottenere stent capaci di rilasciare lo stesso farmaco in quantità diverse variando solo la reiterazione del processo di rivestimento.

FLU506	Aumento in peso (mg ± SD)	dose Fludarabina (µg)
1 coating	0.24 ± 0.095	48
2coating	0.49 ± 0.205	98
3 coating	0.64 ± 0.206	128

Tabella 5: Aumento medio in peso relativo alla realizzazione di diversi layer di microsfere Fluda506

### **Fluda502H**

Anche in questo caso, procedendo alla stessa maniera, per ogni step i campioni sono stati analizzati visivamente al microscopio stereoscopico, per valutare la quantità di microsfere effettivamente caricate sullo stent e procedere all'eventuale possibilità di effettuare un ulteriore rivestimento.

La figura 35 mostra la presenza delle Fluda502H caricate sullo stent dopo la realizzazione del primo layer per nebulizzazione, la cui massa di circa 0,08 mg corrisponde ad un quantitativo di fludarabina di 5,4 µg. Questo primo layer di microsfere si presenta omogeneo ed uniforme sia all'interno (fig. 35-A) che all'esterno (fig.35-B) della maglia, nonostante l'esistenza di porzioni di superficie dello stent non completamente ricoperte dalle microsfere.

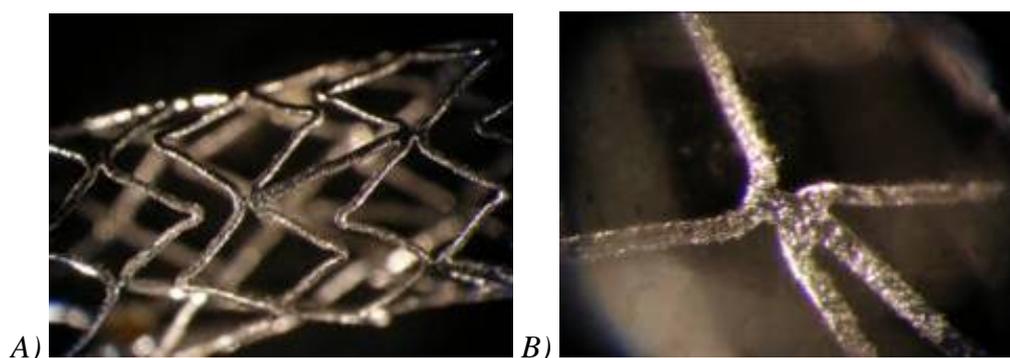


Figura 35: Stent con un rivestimento di microsfere Fluda502H. A: lato esterno; B: lato interno

Ciò induce alla creazione di un secondo layer di rivestimento. Dalla figura 36 è possibile vedere che sia all'interno (fig. 36-A) che all'esterno (fig.36-B) questo secondo rivestimento risulta ancora più uniforme del precedente.

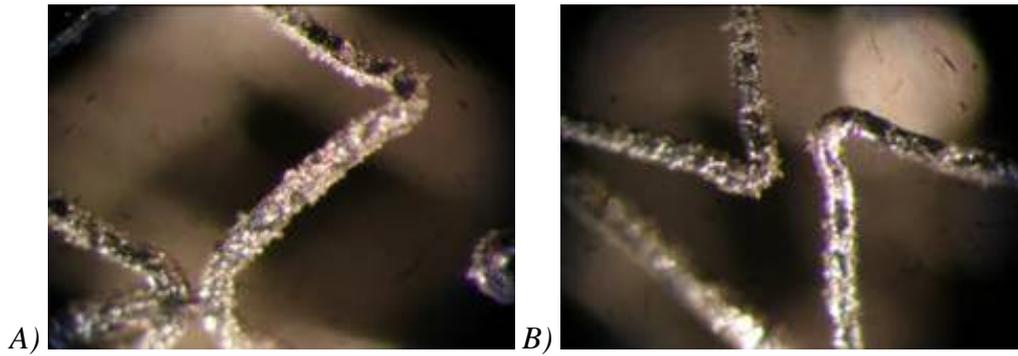


Figura 36: Stent con due rivestimenti di microsferes Fluda502H. A: lato esterno; B: lato interno

Tuttavia, incoraggiati dalla presenza di porzioni della superficie ancora vuote si procede alla creazione di un terzo layer di microsferes.

Dalla figura 37 si può osservare quest' ultimo rivestimento di microsferes che si presenta compatto ed uniforme, senza zone di vuoto e senza occludere le maglie dello stent.

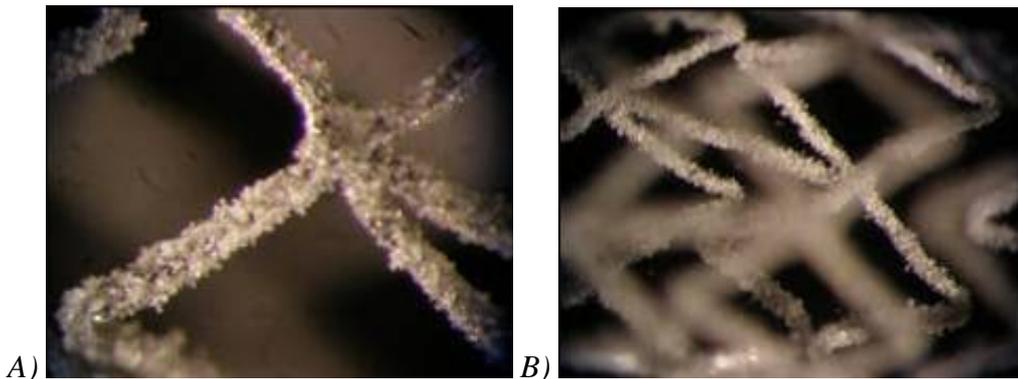


Figura 37: Stent con tre rivestimenti di microsferes Fluda502H. A: lato esterno; B: lato interno

In tabella 6 è rappresentato l'aumento in peso dei campioni in seguito ai tre diversi rivestimenti. In media, con ogni rivestimento è possibile caricare circa 0,08 mg di microsferes. Sapendo che 1 mg di microsferes contengono circa 69  $\mu\text{g}$  di Fludarabina, si ricava che con tale tecnica è possibile realizzare stent capaci di rilasciare una quantità massima di 24,15  $\mu\text{g}$  di farmaco.

Ciò è da tenere in conto per ben orientare l'utilizzo di tale dispositivo al variare della patologia e della specifica terapia farmacologia.

FLU502H	Aumento in peso (mg $\pm$ SD)	dose Fludarabina ( $\mu$ g)
1 coating	0.085 $\pm$ 0.0071	5.8
2coating	0.185 $\pm$ 0.0212	12.7
3 coating	0.351 $\pm$ 0.0102	24.2

Tabella 6: Aumento medio in peso relativo alla realizzazione di diversi layer di microsferi Fluda502H

Entrambi i campioni ottenuti con il multiplo rivestimento, sono stati poi rivestiti con un ulteriore strato di pHEMA ed analizzati al microscopio elettronico. Le micrografie SEM restituiscono una superficie liscia del dispositivo in cui la presenza delle microsferi non si evince se non nelle crepe indotte e nei punti volutamente non rivestiti per evidenziarne la presenza.

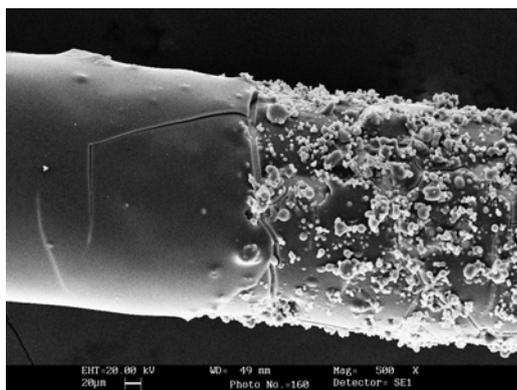


Figura 38. Zona di transizione tra il layer di  $\mu$ -sfere e il pHEMA

In queste immagini, si evince la completa riuscita dell'ottimizzazione del nostro dispositivo. Infatti, la superficie appare decisamente liscia ed omogenea (fig. 39) e ad un ingrandimento maggiore è possibile verificare la presenza delle microsferi nella parte interna del rivestimento. Inoltre l'analisi del rivestimento restituisce un valore dello spessore decisamente compatibile con la completa ricopertura delle microsferi, soprattutto nel caso della formulazione Fluda502H, caratterizzata da un diametro inferiore.

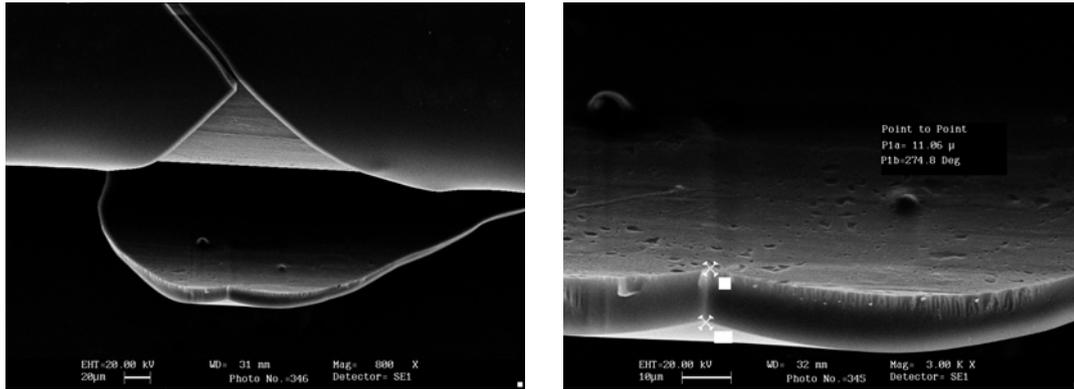


Figura 39. Analisi SEM di un crepa al cui interno si evince la presenza delle microsferi

### ***Microscopia confocale CLSM.***

I campioni così ottenuti sono stati analizzati anche al microscopio confocale a scansione laser. Per tali analisi sono state utilizzate microsferi contenenti la Rhodamina capace di essere facilmente visualizzata al confocale.

Sono stati effettuati anche campioni di controllo rivestiti di solo pHEMA per settare i parametri del confocale in maniera da non restituire rumore di fondo dovuto alla presenza dell'idrogel. Nella fig 40 è riportata un'immagine di una maglia metallica di controllo rivestita di solo pHEMA; come chiaramente osservabile il segnale rosso è decisamente trascurabile.

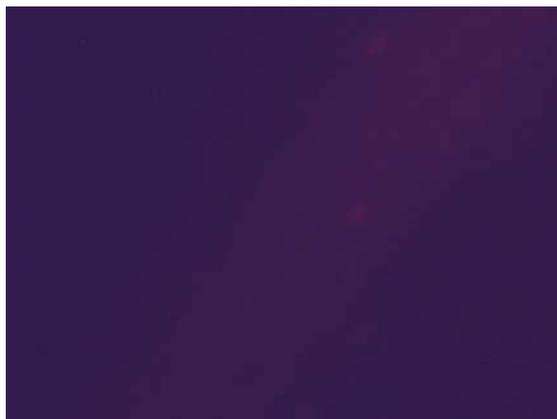


Fig. 40 Immagine al confocale di uno stent rivestito di pHEMA

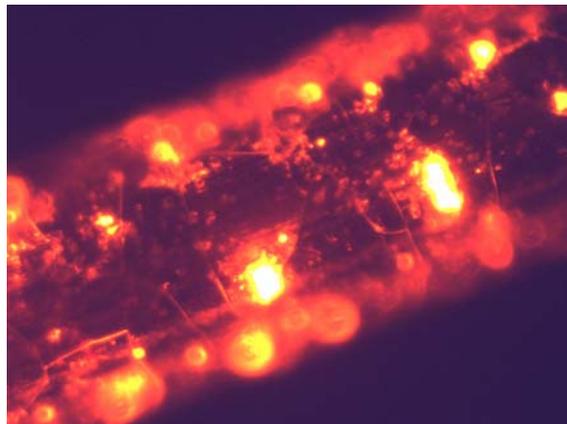
Analogamente sono stati analizzati campioni rivestiti da sole microsferi, come descritto dalla metodologia multilayer. La fig. 41 riporta il risultato di tale analisi al

confocale, dalla quale appare evidente la presenza di microsfele sulla superficie della maglia metallica.



*Figura 41 Immagine al confocale di uno stent rivestito con microsfele*

Tali analisi sono state ripetute anche su campioni rivestiti del top layer di pHEMA quale copertura delle microsfele. Come è evidenziato dalla figura 42, la maglia metallica appare ancora fluorescente nel rosso, a conferma delle microsfele inglobate nell'interno dello strato di pHEMA, la cui presenza è la causa della visione più omogenea del segnale fluorescente.



*Figura 42 Immagine al confocale di uno stent rivestito con microsfele e pHEMA*

## **Conclusioni**

In questa seconda fase del progetto, è stata messa a punto una tecnica spray modificata per ottenere il rivestimento multicomponente di stent. Tale rivestimento consta di una matrice polimerica, capace di aderire in maniera ottimale alla maglia metallica, nella quale vengono inglobati microcarrier polimerici per il rilascio di farmaci, indipendentemente dalla loro natura idrofila o idrofoba.

Risultati sperimentali, hanno dimostrato che con tale tecnica modificata è possibile effettuare più layer di microsfele adese alla superficie metallica, senza occludere la complessa geometria dello stent, risultando così in un dispositivo in cui la carica bioattiva è modulabile a seconda della applicazione richiesta. Tali stent sono stati caratterizzati in termini di uniformità, omogeneità e rugosità della superficie, evidenziando che la presenza delle microsfele non altera le ottime caratteristiche ottenute rivestendo con solo pHEMA.

La validità di tale tecnica è stata, inoltre, testata anche al variare della formulazione di microsfele; nessuna differenza a livello di caratteristiche superficiali del dispositivo è stata riscontrata utilizzando microsfele di diametro piccolo ( $\sim 4\mu\text{m}$ ) o grande ( $\sim 14\mu\text{m}$ ).

Tuttavia, è facilmente ipotizzabile che stent contenenti diverse formulazioni di microsfele possono consentire il rilascio di più farmaci con cinetiche modulabili nel tempo. Ancora una volta, tenendo presente che uno dei limiti degli attuali DES è la possibilità di rilasciare un solo farmaco di natura idrofoba, mentre la restenosi ha bisogno di più agenti idro e/o lipo-fili per essere contrastata, è intuibile l'elevato impatto che un siffatto dispositivo multi componente possa avere sulla pratica clinica.

Inoltre, la capacità di progettare stent attraverso la realizzazione di diversi layer di microsfele consente l'ottenimento di un dispositivo in cui la carica bioattiva può essere modulata a seconda della dose clinica richiesta.

In prospettiva, è altresì pensabile la realizzazione di un dispositivo in cui microsfele contenenti farmaci differenti siano posizionate all'interno del rivestimento per garantire un direccionamento mirato dei diversi farmaci.

## **Capitolo 5**

### **Rilasci dal sistema multicomponente**

#### **Introduzione**

La terza fase di tale progetto è mirata alla valutazione delle cinetiche di rilascio di agenti idrofili dal dispositivo cardiovascolare ottimizzato. Dopo aver realizzato il sistema multicomponente, in cui lo stent è rivestito da un sottile strato di pHEMA al cui interno sono inglobate microsfere di PLGA per il rilascio controllato di Fludarabina, è importante verificare la concretezza del rilascio ipotizzato. In collaborazione con il Dipartimento di Chimica Farmaceutica e Tossicologica della facoltà di Farmacia si è quindi passati alla fase di caratterizzazione dei rilasci di Fludarabina dal sistema multicomponente. Partendo dall'assunto che la dose di farmaco capace di esplicare una funzione antiproliferativa è pari a 150µg le cinetiche di rilascio sono state effettuate su una quantità di microsfere, calcolata a partire dal tasso di incapsulazione che le caratterizza, capace di rilasciare la dose desiderata.

Poiché tale fase sperimentale si è svolta in parallelo alla realizzazione ed ottimizzazione dello stent multicomponente, le cinetiche di rilascio sono state effettuate su campioni assimilabili al nuovo dispositivo. Sono state, dunque, utilizzate lastre di acciaio 316L, lo stesso costituente il nostro stent, sulle quali si è realizzato un sottile strato di pHEMA contenente le microsfere Fluda506 o Fluda502H, dalle quali si è studiato il rilascio.

Sono state, inoltre, utilizzate lastre rivestite di pHEMA al cui interno la Fludarabina è stata omogeneamente dispersa, per mimare le condizioni di rilascio dagli stent attualmente disponibili sul mercato.

## **5.1 Materiali**

Poichè la fase relativa ai rilasci *in vitro* della Fludarabina dalle microsfere è stata sviluppata in parallelo all'ottimizzazione del sistema multicomponente, le prove sono state effettuate utilizzando dei sistemi assimilabili allo stent. Si è ricorso all'utilizzo di lastre in acciaio 316L ricoperte di un sottile strato di pHEMA contenente le microsfere, in maniera tale da avere dei campioni con una esatta e nota quantità di farmaco. Tale sistema modificato, inoltre, ci consente di ottenere microsfere perfettamente inglobate nel rivestimento polimerico.

Le cinetiche di rilascio sono state ottenute a partire da entrambe le formulazioni di microsfere precedentemente ottimizzate (Fluda506 e Fluda502H) al fine di valutare l'influenza della formulazione sulle proprietà di rilascio.

E' da precisare che, ancora una volta, la parte relativa alla caratterizzazione dei rilasci da microsfere è stata realizzata dal gruppo del Dipartimento di Chimica Farmaceutica e Tossicologica della Facoltà di Farmacia, in collaborazione con la quale si svolge questo progetto di dottorato, che ha messo a punto la tecnica all'HPLC per la valutazione della quantità di Fludarabina rilasciata dai campioni multicomponente da noi preparati.

## **5.2 Metodi**

### **5.2.1 Preparazione dei campioni**

Le prove di rilascio dal sistema multicomponente sono state, dunque, effettuate attraverso l'utilizzo di campioni assimilabili allo stent. Sulle lastre in acciaio 316L preventivamente pulite con lavaggi in etanolo e acetone sotto ultrasuoni, come descritto nel capitolo 4, è stata colata una sospensione di pHEMA/etanolo contenente Fludarabina libera o incapsulata in microsfere a seconda dei campioni da realizzare.

### ***Controllo***

Per la preparazione dei campioni controllo 150µg di Fludarabina sono stati dispersi nella soluzione di pHEMA/etanolo e successivamente la sospensione è stata colata sulle lastre, ottenendo così dei campioni con Fludarabina libera all'interno della matrice di pHEMA. Tali campioni sono assimilabili agli stent attualmente presenti in commercio, in cui il farmaco è omogeneamente disperso nella matrice polimerica del rivestimento.

### ***Fluda506***

Partendo dall'assunto che si vuole rilasciare una quantità di Fludarabina pari a 150 microgrammi e conoscendo il tasso di incapsulazione delle microsfere Fluda506 sono stati preparati dei campioni a concentrazione 1mg/ml di microsfere, in maniera da rilasciare la dose prestabilita.

Quindi, 1 ml della sospensione di pHEMA/etanolo/Fluda506 a concentrazione 1mg/ml di microsfere è stata colata sulle lastre e fatta evaporare. Sono stati preparati anche campioni a concentrazione di 2 mg/ml per studiare l'effetto della concentrazione di microsfere sui rilasci.

### ***Fluda502H***

Prove del tutto analoghe sono state condotte utilizzando una sospensione di pHEMA/etanolo/Fluda502H. Per avere dei risultati confrontabili con quelli relativi ai campioni contenenti Fluda506, anche questa tipologia di campioni è stata realizzata colando 1 ml di sospensione a concentrazione di 1mg/ml o 2mg/ml; consci del fatto che 1 mg di microsfere Fluda502H contiene una dose minima di Fludarabina pari a 69µg.

## **5.2.2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)**

L'analisi quali-quantitativa della Fludarabina rilasciata è stata effettuata mediante cromatografia liquida ad alta prestazione a fase inversa (RP-HPLC).

La cromatografia liquida ad alta prestazione, più semplicemente nota come HPLC è una tecnica cromatografica che permette di separare due o più composti

presenti in un solvente sfruttando l'equilibrio di affinità tra una "fase stazionaria" posta all'interno della colonna cromatografica e una "fase mobile" che fluisce attraverso essa.

Una sostanza più affine alla fase stazionaria rispetto alla fase mobile impiega un tempo maggiore a percorrere la colonna cromatografica (tempo di ritenzione), rispetto ad una sostanza con bassa affinità per la fase stazionaria ed alta per la fase mobile.

Il campione da analizzare è iniettato all'inizio della colonna cromatografica dove è "spinto" attraverso la fase stazionaria dalla fase mobile applicando pressioni dell'ordine delle centinaia di atmosfere. Per ottenere un'elevata efficienza nella separazione è necessario che le dimensioni delle particelle del riempimento siano molto ridotte (di solito hanno diametri compresi da 3 a 10  $\mu\text{m}$ ), per questo motivo è indispensabile applicare un'elevata pressione se si vuole mantenere una ragionevole velocità di flusso dell'eluente e quindi un tempo di analisi adeguato.

Alla fine della colonna è applicato un rivelatore e un calcolatore che permettono una analisi in continuo dell'uscita della colonna e quindi di poter quantificare e/o identificare le sostanze iniettate.

I vantaggi principali di questa tecnica sono: la dimensione ridotta della colonna che evita problemi di deviazioni longitudinali (movimenti della fase mobile longitudinali) e di percorsi alternativi; velocità di eluizione (passaggio della fase mobile attraverso la colonna) costante e regolabile; velocità di esecuzione ridotta; piccole quantità di composto necessaria all'analisi (nell'ordine dei 5-10 microgrammi di campione solubilizzato in apposito solvente) tutto a favore di una maggiore accuratezza e precisione.

E' stato impiegato un sistema HPLC Shimadzu (Kyoto, Giappone) costituito da una pompa LC-10AD operante ad un flusso di 1 ml/min, una valvola d'iniezione Rheodyne, 7725i, un rivelatore UV-VIS SPV-10A ed un integratore C-R6 A. Per l'analisi è stata utilizzata una colonna Sinergy-Hydro-RP C18 (Phenomenex, USA) di dimensioni 250 x 4,6 mm e un rivelatore UV alla lunghezza d'onda di 262 nm. La fase eluente era una miscela di tampone fosfato (10 mM fosfato monobasico) a pH 4,5 e metanolo in rapporto 80:20 (v/v).

Al fine di costruire una retta di taratura, sono state preparate soluzioni standard di Fludarabina in tampone fosfato a pH 7,4 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10mM, NaCl 120mM, KCl 2.7mM modificato con 0,05%  $\text{NaN}_3$ ) in un range di concentrazione di 0,4-40  $\mu\text{g/ml}$  ed i

valori di area del picco cromatografico ottenuti sono stati riportati in grafico in funzione della concentrazione.

La stabilità della Fludarabina è stata valutata in soluzione a pH 7,4 ed alla temperatura di 37°C. Una soluzione di Fludarabina cristallizzata in tampone fosfato (1 mg/ml), è stata lasciata in bagnetto termostato a 37°C e ad intervalli di tempo regolari sono stati effettuati i prelievi successivamente analizzati all'HPLC. Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato.

In ogni caso, soluzioni standard di fludarabina defosfato, principale metabolita in soluzione della Fludarabina, sono state iniettate per confronto.

### **5.2.3 Studi di rilascio *in vitro* dalle microsfere di PLGA**

Inizialmente sono state caratterizzate le cinetiche di rilascio da microsfere poste in soluzione. Gli studi di rilascio *in vitro* della Fludarabina sono stati realizzati sospendendo 5 mg di microsfere (Fluda506 o Fluda502H) liofilizzate in 1 ml di PBS a pH 7,4 modificato con lo 0,05% di sodio azide in bagno termostato a 37°C.

Ad intervalli di tempo regolari è stato prelevato tutto il mezzo di rilascio che è stato sostituito con lo stesso volume di PBS fresco. I campioni sono stati centrifugati (15 minuti, 20°C, 5000 rpm) per allontanare ogni residuo di microsfere ed il supernatante analizzato per il contenuto e la qualità di Fludarabina, secondo la metodica cromatografica descritta.

Le cinetiche sono state condotte in condizioni dinamiche sotto agitazione in bagnetto termostato oscillante, per mimare le condizioni fisiologiche ed i risultati sono riportati come % di Fludarabina rilasciata  $\pm$  la deviazione standard (SD) calcolata su tre differenti lotti di microsfere.

### **5.2.4 Studi di rilascio *in vitro* da lastre rivestite di pHEMA**

Successivamente si è passati a caratterizzare il rilascio *in vitro* della Fludarabina dai campioni multicomponente. Le lastre metalliche rivestite sono state immerse in 2 ml di PBS a pH 7,4 modificato contenente lo 0,05% di sodio azide, in modo da ottenerne una completa ricopertura ed incubate a 37°C in bagno termostato.

Ad intervalli di tempo regolare è stato prelevato 1 ml di PBS sostituito con lo stesso volume di mezzo fresco, filtrato (filtri in cellulosa rigenerata da 0,45  $\mu\text{m}$ ) e analizzato secondo la metodica cromatografia precedentemente descritta. Le cinetiche, anche in questo caso, sono state condotte in condizioni dinamiche sotto agitazione continua, per mimare le condizioni fisiologiche.

## **5.3 Risultati e Discussioni**

### **5.3.1 Studi di rilascio *in vitro* dalle microsfere di PLGA**

#### ***Fluda506***

Le cinetiche di rilascio di Fludarabina dalle microsfere di PLGA del lotto Fluda506, hanno restituito un andamento caratterizzato un burst consistente, circa del 40%, e un rilascio sostenuto nei due giorni successivi, fino ad arrivare però ad un rilascio massimo incompleto, solo del 60%, come evidenziato in fig. 1.

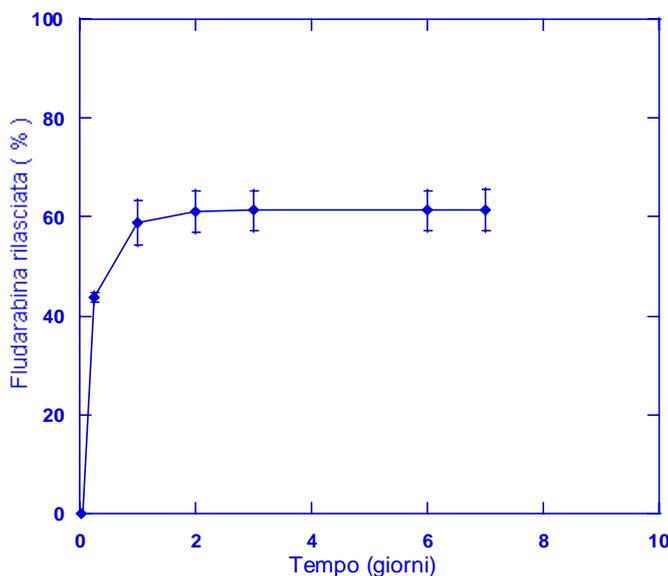


Figura 1: Cinetiche di rilascio di Fludarabina da microsfere Fluda506 in PBS

Non tutta la Fludarabina incapsulata, dunque, è stata rilasciata indice che oltre il 40% del farmaco è rimasto all'interno della formulazione e verrà reso disponibile a seguito del fenomeno degradativo del polimero.

### ***Fluda502H***

Prove di rilascio analoghe sono state condotte per la formulazione Fluda502H, restituendo una cinetica decisamente differente, dovuta essenzialmente alla variazione del polimero utilizzato. Questa volta il burst risulta essere marcatamente più elevato, circa del 60%, ma il rilascio è continuo e sostenuto completandosi in 20 giorni (fig. 2)

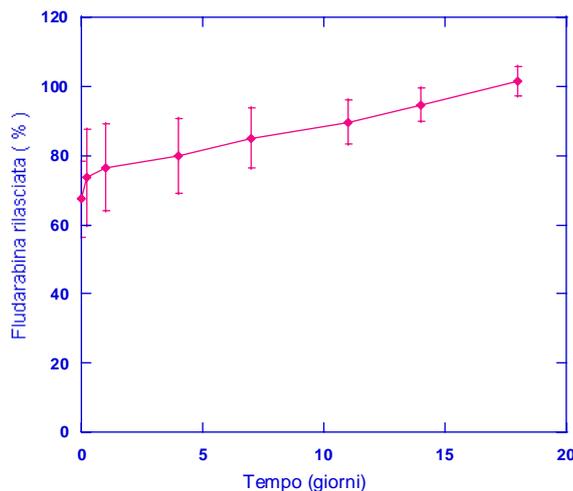


Figura 2: Cinetiche di rilascio di Fludarabina da microsfele Fluda502H in PBS

Sovrapponendo le due cinetiche sullo stesso grafico è notevole l'evidente differenza tra i due rilasci determinati dalla diversa formulazione di microsfele (fig.3).

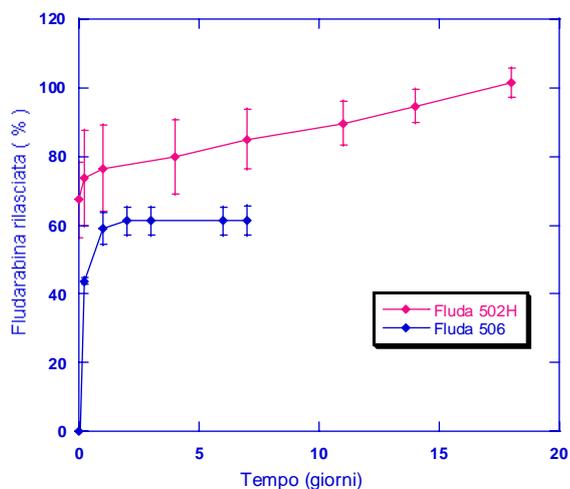


Figura 3: Confronto tra le cinetiche di rilascio di Fludarabina in PBS

Tali risultati sono l'evidenza sperimentale della possibilità di modulare il rilascio di uno stesso agente attivo semplicemente incapsulandolo in vettori differenti. Nel caso specifico i due carrier sono costituiti addirittura dallo stesso polimero (PLGA) differendo solo per la viscosità intrinseca. Dunque, variando tale parametro, è stato possibile ottenere cinetiche differenti dello stesso farmaco in termini sia temporali che di quantità di farmaco rilasciata.

### **5.3.2 Studi di rilascio *in vitro* dal sistema multicomponente**

Obiettivo principale di tale fase del progetto è quello di verificare se esiste una differenza sostanziale tra il rilascio di Fludarabina omogeneamente dispersa nel layer polimerico di pHEMA o incapsulata in microsfele di PLGA in esso contenute. Particolare attenzione è stata posta nello studiare l'influenza che hanno sul rilascio parametri di progetto quali formulazione delle microsfele e loro concentrazione all'interno del rivestimento.

#### ***Controllo***

Per quanto riguarda le cinetiche di rilascio dai campioni multicomponente di controllo, in cui la Fludarabina è omogeneamente dispersa nel sottile strato polimerico di pHEMA, i risultati sono altamente non riproducibili come si può osservare dalla fig. 4.

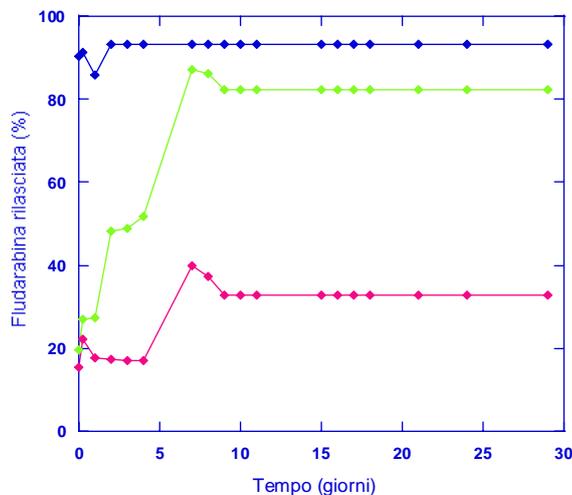
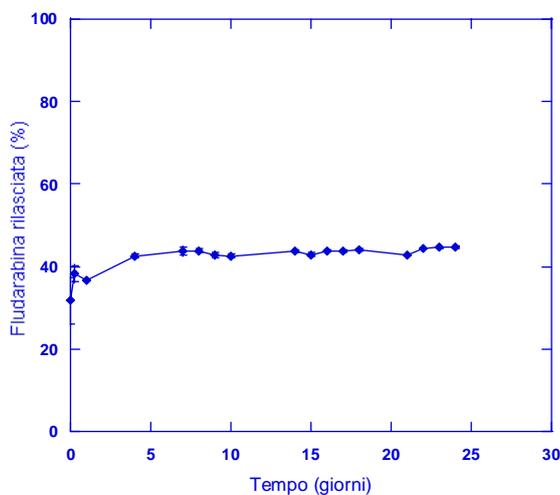


Figura 4: Cinetiche di rilascio di Fludarabina da matrice di pHEMA

I rilasci da tre differenti batch hanno restituito risultati non paragonabili, ad evidenza che l'omogenea distribuzione di Fludarabina in una matrice polimerica non è auspicabile per ottenere un rilascio controllato del farmaco.

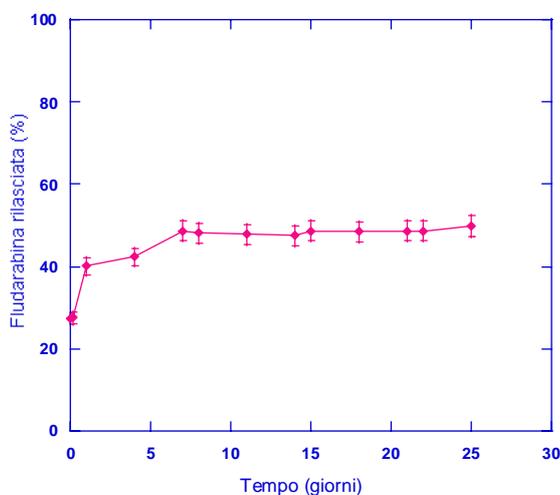
### ***Fluda506***

Le cinetiche di rilascio dal sistema multicomponente contenente le microsfere Fluda506 a concentrazione 1mg/ml sono riportate in fig. 5.



*Figura 5: Cinetiche di rilascio dal sistema multicomponente con Fluda506 1mg/ml*

Il profilo di rilascio è caratterizzato da un burst iniziale marcato ed un rilascio sostenuto nei primi giorni successivi.



*Figura 6: Cinetiche di rilascio dal sistema multicomponente con Fluda506 2mg/ml*

Nessuna differenza, in termini di % di Fludarabina rilasciata è osservabile per le cinetiche restituite dalle lastre a maggiore concentrazione di microsfere (fig.6). Per entrambi i campioni il profilo è caratterizzato da un burst di circa il 20% e il rilascio si arresta al 50% nei 10 giorni successivi.

Se paragonati ai rilasci da microsfere poste in PBS (fig. 7), tali rilasci risultano essere differenti; il burst iniziale, infatti, è ridotto dal 40% al 20% e la quantità di Fludarabina rilasciata non eguaglia quella ottenuta in PBS.

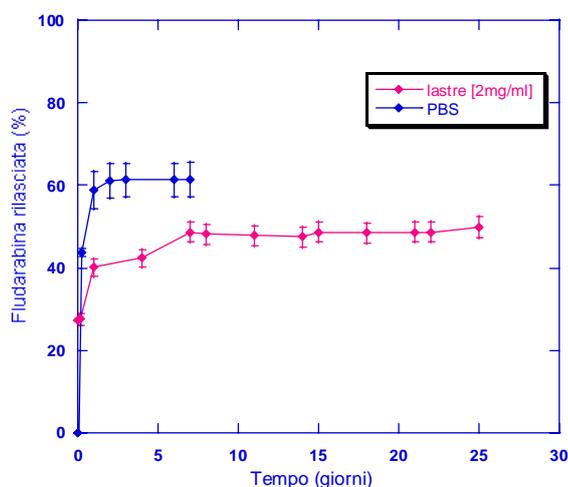


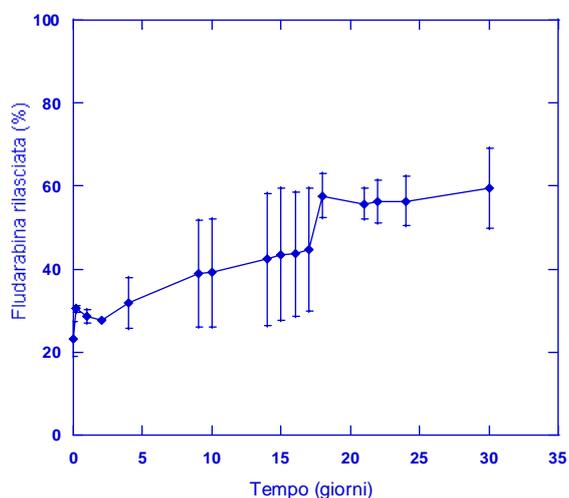
Figura 7: Cinetiche di rilascio microsfere e sistema multicomponente

Il rallentamento nella cinetica è attribuibile alla presenza del pHEMA che, essendo un idrogel polimerico, ritiene l'acqua libera presente nel sistema ritardando l'uptake di acqua da parte delle microsfere. L'idratazione delle microsfere è una condizione necessaria per far avvenire il rilascio in quanto esso è basato sulla degradazione idrolitica del PLGA.

Va, inoltre, sottolineato che la presenza delle microsfere consente di superare il limite di non riproducibilità delle cinetiche osservato nel caso di Fludarabina omogeneamente dispersa nella matrice polimerica. I rilasci ottenuti risultano altamente controllati e riproducibili, anche al variare della quantità di microsfere presenti nel dispositivo.

### ***Fluda502H***

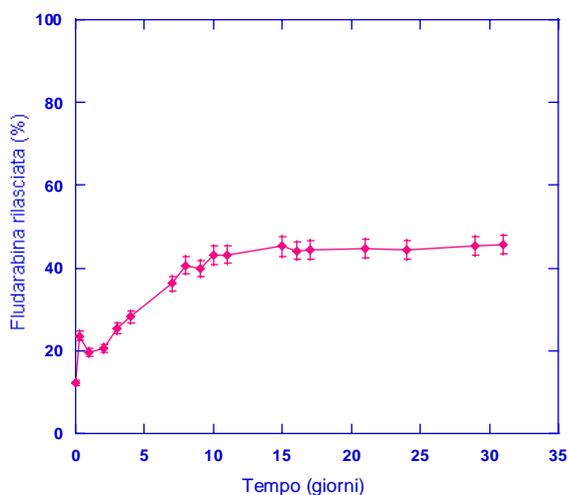
Risultati del tutto analoghi sono stati ottenuti dai campioni multicomponente contenenti microsferi Fluda502H a concentrazione 1ng/ml, come mostrato in fig. 8.



*Figura 8: Cinetiche di rilascio dal sistema multicomponente con Fluda502H 1mg/ml*

Anche in questo caso, le cinetiche si sono rivelate riproducibili, con un burst non eccessivamente marcato e un rilascio controllato fino a 30 giorni raggiungendo il 60%.

Andamento del tutto analogo anche per i rilasci ottenuti da campioni contenenti maggiore quantità di microsferi. Le cinetiche sono caratterizzate da un burst iniziale di circa il 20%, ed un rilascio prolungato fino a 30 giorni con un valore del 40 % (fig. 9)



*Figura 9: Cinetiche di rilascio dal sistema multicomponente con Fluda506 2mg/ml*

Confrontando tali risultati con le cinetiche in PBS, si riscontra nuovamente un rallentamento nella cinetica, dovuto sempre alla presenza della matrice idrofila di pHEMA (fig. 10).

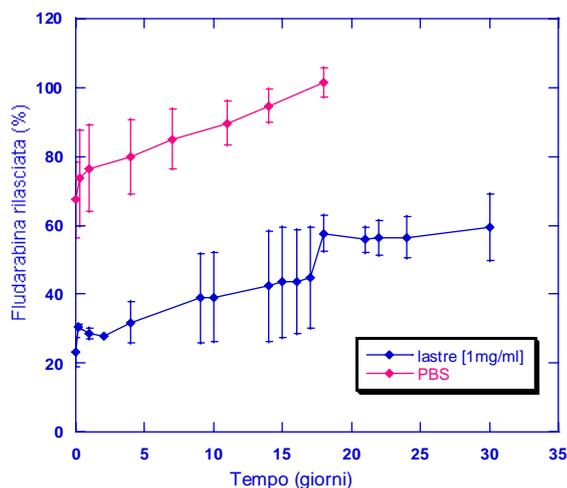


Figura 10: Cinetiche di rilascio microsfera e sistema multicomponente

Poiché in soluzione acquosa le microsfele riescono a rilasciare il 100% del farmaco incapsulato è ipotizzabile che il restante 60% di Fludarabina ancora presente nel sistema multicomponente verrà rilasciato in maniera controllata per un periodo più lungo.

## Conclusioni

I risultati dell'analisi HPLC su tali campioni ci hanno fornito informazioni importanti sul nostro sistema.

La Fludarabina omogeneamente dispersa nel coating di pHEMA viene completamente rilasciata nelle prime 24 ore e la cinetica non è riproducibile risultando in rilasci estremamente differenti al variare del batch analizzato. Al contrario il sistema multicomponente, in cui la Fludarabina viene rilasciata dalle microsfele inglobate nel pHEMA, consente un rilascio decisamente più modulato e controllato.

Le cinetiche ottenute possono essere modulate al variare della formulazione di microsfele utilizzate, infatti, il rilascio da Fluda506 è molto rapido ed incompleto, mentre le Fluda502H restituiscono un rilascio del 100% in 20 giorni anche se

caratterizzato da un burst elevato. Poichè, la concentrazione di microsfele presenti nel dispositivo non influenza le cinetiche risultando solo in una maggiore dose di farmaco rilasciata, è possibile modulare la carica bioattiva sullo stent in funzione della necessità clinica, senza alterare il profilo di rilascio.

Nonostante le cinetiche non siano del tutto ottimizzate per la richiesta clinica l'informazione importante che abbiamo ricavato da queste analisi è legata all'influenza, determinante, che hanno i microcarrier sul rilascio. Questa è un'informazione decisamente di rilievo, in quanto ci permette di progettare uno stent multifattoriale. E', infatti, ipotizzabile la realizzazione di uno stent contenente entrambe le formulazioni di microsfele in grado così di rilasciare due diversi farmaci incapsulati nelle Fluda506 e Fluda502H. Un siffatto dispositivo consentirebbe il rilascio nei primi giorni del farmaco contenuto nelle Fluda506, e poi un rilascio a 20 giorni dell'agente incapsulato nelle Fluda502H contrastando in maniera più efficace il processo di restenosi.

I DES presenti in commercio, al contrario, sono caratterizzati esclusivamente dalla presenza di un solo farmaco omogeneamente disperso nel coating, con notevoli limitazioni sulla modulazione del rilascio.

La nostra idea, di inglobare il principio attivo in microcarrier presenti nel rivestimento ci permette di superare i limiti attuali di monoterapia da DES ottenendo, attraverso la manipolazione delle cinetiche, un rilascio cronotemporale in situ di più agenti attivi.

## **Capitolo 6**

### **Modellazione agli Elementi Finiti (FEM)**

#### **Introduzione**

A seguito della procedura d'impianto lo stent si viene a trovare a contatto con la parete arteriosa nella quale svolgerà il suo compito, cioè il rilascio di farmaci attivi nella prevenzione della restenosi. E' di fondamentale importanza nella progettazione di nuovi dispositivi cardiovascolari capire, e soprattutto prevedere, il comportamento che essi avranno *in vivo* in termini di cinetiche ed efficienza di rilascio al sito d'azione. Purtroppo però, l'intricato design dello stent, il tessuto biologico con cui si trova ad interagire e le cinetiche locali con le quali il farmaco viene rilasciato non ci consentono di conoscere in maniera intuitiva la distribuzione e la deposizione del farmaco all'interno della parete arteriosa.

Il trasporto di molecole bioattive attraverso tessuti biologici, in particolare attraverso la parete dei vasi sanguigni, è un problema che coinvolge numerosi fenomeni fisici complessi ed eterogenei. Da un lato esso è influenzato dalla fluidodinamica del sangue nelle arterie, e dall'altro dalla lenta filtrazione del plasma attraverso la parete di queste ultime, fenomeno con il quale numerose specie chimiche vengono trasferite dal sangue all'interno della parete dei grandi vasi sanguigni [111]. Nella prima fase di progettazione di nuovi stent generalmente ci si affida a studi *in vitro* di tali caratteristiche, i quali forniscono informazioni utili ma non lontanamente assimilabili a ciò che realmente avviene all'interno del corpo umano.

Pertanto per studiare gli effetti del sangue sul rilascio del farmaco nell'arteria, sotto rigorose condizioni che non possono essere controllate *in vitro* a causa della

variazione della posizione, forma e rivestimento dello stent, occorre sviluppare appropriati modelli matematici e metodi computazionali in grado di simulare tale fenomeno.

Intuitivamente si è sempre pensato che il farmaco non venisse efficacemente rilasciato all'interno della parete, a causa del fatto che una sua buona parte venisse trascinata via dal flusso sanguigno. Grazie alla simulazione numerica, invece, si è dimostrato che ciò non corrisponde a realtà e che la cinetica del farmaco è influenzata in maniera positiva dalla fluidodinamica del sangue [ 112].

Consci della potenzialità di tale strumento, ed in attesa di avviare le prove *in vivo* sui nostri stent multicomponente, l'ultima parte di tale progetto è incentrata sulla validazione, attraverso metodi computazionali, dell'efficacia del nuovo sistema nel rilasciare agenti attivi idrofili in maniera controllata e prolungata. Nello specifico, non tutta la geometria dello stent è stata considerata, ma si è preso in esame una sola sezione di una maglia metallica, ipotizzando che durante il posizionamento venga inglobata per metà nella parete arteriosa. Il flusso ematico è stato simulato attraverso lo stazionario dell'equazione di Navier-Stokes e la soluzione è stata utilizzata come input nella risoluzione dell'equazione di Diffusione/Convezione.

Infine, per paragonare il nuovo dispositivo multicomponente con quanto attualmente disponibile in commercio, sono state effettuate anche simulazioni in cui l'agente attivo, sia esso lipofilo o idrofilo, è omogeneamente disperso nel rivestimento dello stent.

## **6.1 Materiali**

### **6.1.1 Simulatore Femlab 3.2 di COMSOL**

Il simulatore utilizzato è il Femlab di COMSOL che fornisce un ambiente per lo studio e la risoluzione di equazioni differenziali a derivate parziali, discretizzate mediante il metodo degli elementi finiti (FEM).

Il processo che caratterizza il trasporto di farmaco all'interno della parete arteriosa è governato dal transitorio di un'equazione di convezione-diffusione:

$$\delta_{ts} \frac{\partial c}{\partial t} + \nabla \cdot (-D \nabla c) = R - u \cdot \nabla c \quad (1)$$

dove la convezione è generata dal flusso sanguigno e regolata dall'equazione di Navier-Stokes, allo stato stazionario:

$$\rho(u \cdot \nabla)u = \nabla \cdot \left[ -pI + \eta(\nabla u + (\nabla u)^T) \right] + F \quad (2)$$

Alcune semplificazioni geometriche sono state effettuate per simulare il comportamento *in vivo* di uno stent a rilascio di farmaci.

Si è scelto di descrivere il dominio considerando una sola sezione dello stent e non tutta la maglia metallica. Si è considerato che lo stent sia per metà inglobato nella parete vasale e per metà esposto al torrente ematico. Inoltre le dimensioni geometriche reali sono state utilizzate per la realizzazione dell'intero dominio.

La geometria del sistema, rappresentante il complesso arteria-stent-lume, in due dimensioni, x e y, è visibile dalla figura 1.

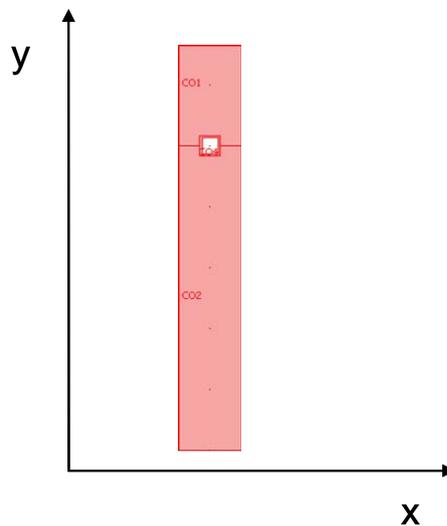


Figura 1: Geometria del sistema arteria-stent-lume

Dove:

- CO1 rappresenta la parete arteriosa, considerata omogenea (fig. 2), con un coefficiente di diffusione del farmaco,  $D_T$ , costante;

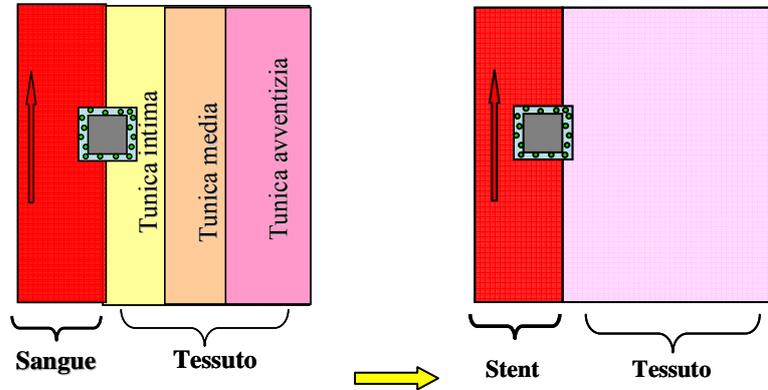


Figura 2: Rappresentazione della parete arteriosa omogenea

- CO2 rappresenta il lume arterioso;
- CO4 rappresenta il rivestimento polimerico dello stent, contenente il carrier necessario per il rilascio modulabile del farmaco.

In questo lavoro, sono state portate a termine due simulazioni: la prima, regolata dall'equazione di Navier-Stokes, allo stato stazionario, in cui viene generata la convezione dovuta al flusso sanguigno; la seconda è la valutazione del transitorio di un'equazione di convezione-diffusione di un farmaco in tale complesso dominio, e che tiene conto del flusso convettivo sanguigno. Questa seconda simulazione è stata sviluppata per due differenti farmaci, lipofili o idrofili, in cui la diffusione viene originata a partire da una concentrazione costante di farmaco dispersa all'interno del rivestimento. Tale situazione simula il comportamento *in vivo* degli stent attualmente presenti in commercio, in cui il rilascio del farmaco è dettato dalla pura diffusione delle molecole dell'agente attivo attraverso la matrice polimerica del rivestimento.

Tale simulazione è stata poi implementata anche nel caso del nostro sistema multicomponente, introducendo, quindi, nell'equazione di diffusione/convezione per farmaci idrofili un termine di generazione dovuto al rilascio a seguito della degradazione delle microsfe.

In tutti i casi, per fornire maggiore stabilità al programma, la geometria caratteristica del sistema e oggetto delle simulazioni è stata normalizzata; la normalizzazione è stata effettuata rispetto alla profondità  $L$ , lungo l'asse  $y$ , del lume

sanguigno. Dalla figura 3 è possibile osservare la geometria de sistema arteria-stent-lume. Le dimensioni caratteristiche di questa geometria sono state scelte a partire dai valori reali e nella tabella 1 sono riportate le dimensioni adimensionalizzate e non.

	Dimensioni reali	Dimensioni adimensionalizzate
A	80 $\mu\text{m}$	0,053
B	100 $\mu\text{m}$	0,067
C	100 $\mu\text{m}$	0,067
D	300 $\mu\text{m}$	0,2
E	450 $\mu\text{m}$	0,2968
F	500 $\mu\text{m}$	0,33
L	1500 $\mu\text{m}$	1

Tabella 1: Dimensioni caratteristiche della geometria del sistema arteria-stent-lume

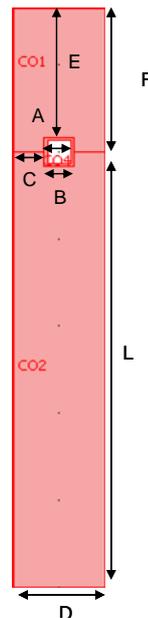


Figura 3: Rappresentazione geometrica del sistema arteria-stent-lume

Per coerenza, anche le equazioni che regolano la distribuzione di farmaco, sia quella di Navier-Stokes che quella di convezione-diffusione, sono state normalizzate.

### ⊗ *Navier-Stokes*

Inizialmente, è stata adimensionalizzata l'equazione di Navier-Stokes. Indicando con  $\rho$  la densità in  $[\text{Kg}/\text{m}^3]$ , con  $v_x$ , e  $v_y$  la velocità nelle direzioni, rispettivamente,  $x$  e  $y$

in [m/s], con  $p$  la pressione in [Pa] e con  $\eta$  la viscosità dinamica in [Pa\*s], parametri specifici del sangue, l'equazione di Navier-Stokes, viene adimensionalizzata come segue.

Si parte dall'equazione generale in due dimensioni e in assenza di forze volumetriche:

$$\rho \left( \frac{\partial v_x}{\partial t} + v_x \frac{\partial v_x}{\partial x} + v_y \frac{\partial v_x}{\partial y} \right) = -\frac{\partial p}{\partial x} + \eta \left( \frac{\partial^2 v_x}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 v_x}{\partial y^2} \right) \quad (3)$$

Nel nostro caso, poiché ci troviamo nello stato stazionario  $\frac{\partial v_x}{\partial t} = 0$ , quindi:

$$\rho \left( v_x \frac{\partial v_x}{\partial x} + v_y \frac{\partial v_x}{\partial y} \right) = -\frac{\partial p}{\partial x} + \eta \left( \frac{\partial^2 v_x}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 v_x}{\partial y^2} \right) \quad (4)$$

Per definizione  $v_x = v_b \cdot V$  e  $P = \frac{p \cdot L}{v_b \eta}$ , pertanto, sviluppando le derivate ed effettuando le opportune semplificazioni:

$$\rho \left( \frac{v_b^2 V}{L} \frac{\partial V}{\partial x} + \frac{v_b^2 V}{L} \frac{\partial V}{\partial y} \right) = -\frac{v_b \eta}{L^2} \frac{\partial P}{\partial x} + \eta \left( \frac{v_b}{L^2} \frac{\partial^2 V}{\partial x^2} + \frac{v_b}{L^2} \frac{\partial^2 V}{\partial y^2} \right) \quad (5)$$

$$\frac{\rho v_b^2}{L} \left( V \frac{\partial V}{\partial x} + V \frac{\partial V}{\partial y} \right) = -\frac{v_b \eta}{L} \frac{\partial P}{\partial x} + \frac{v_b \eta}{L^2} \left( \frac{\partial^2 V}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 V}{\partial y^2} \right) \quad (6)$$

$$\frac{\rho v_b^2}{L} \frac{L^2}{v_b \eta} \left( V \frac{\partial V}{\partial x} + V \frac{\partial V}{\partial y} \right) = -\frac{\partial P}{\partial x} + \left( \frac{\partial^2 V}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 V}{\partial y^2} \right) \quad (7)$$

$$\frac{\rho v_b L}{\eta} \left( V \frac{\partial V}{\partial x} + V \frac{\partial V}{\partial y} \right) = -\frac{\partial P}{\partial x} + \left( \frac{\partial^2 V}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 V}{\partial y^2} \right) \quad (8)$$

Infine imponendo  $\underline{\rho} = \frac{\rho v_b L}{\eta}$  e  $\underline{\eta} = 1$ , si ottiene l'equazione di Navier-Stokes adimensionalizzata:

$$\underline{\rho} \left( V \frac{\partial V}{\partial x} + V \frac{\partial V}{\partial y} \right) = - \frac{\partial P}{\partial x} + \underline{\eta} \left( \frac{\partial^2 V}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 V}{\partial y^2} \right) \quad (9)$$

### ∅ *Diffusione-Convezione*

Successivamente, è stata adimensionalizzata l'equazione di convezione-diffusione. Dunque, indicando con  $v_b$  la velocità del sangue in [m/s]; con  $D_b$ ,  $D_T$  e  $D_S$  i coefficienti di diffusione del farmaco, rispettivamente, nel sangue, nel tessuto arterioso e nel rivestimento dello stent in [m<sup>2</sup>/s]; con  $L$  la dimensione lungo l'asse  $y$  del lume sanguigno in [m], si sono ottenute le seguenti equazioni di convezione-diffusione normalizzate nei tre sottodomini di applicazione:

### ∅ *Nel tessuto*

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D_T \left( \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial y^2} \right) - v_x \left( \frac{\partial c}{\partial x} + \frac{\partial c}{\partial y} \right) \quad (10)$$

Per definizione  $v_x = v_b V$ ,  $c = c_0 C$  e  $T = \frac{t}{L^2} D_b$ , pertanto derivando:

$$D_b \frac{c_0}{L^2} \frac{\partial C}{\partial T} = D_T \frac{c_0}{L^2} \left( \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} \right) - \frac{v_b V}{L} c_0 \left( \frac{\partial C}{\partial x} + \frac{\partial C}{\partial y} \right) \quad (11)$$

e facendo le opportune semplificazioni:

$$D_b \frac{\partial C}{\partial T} = D_T \left( \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} \right) - v_b V L \left( \frac{\partial C}{\partial x} + \frac{\partial C}{\partial y} \right) \quad (12)$$

In conclusione, siccome nel tessuto non è presente il termine legato alla velocità del sangue  $v_b = 0$ , si ottiene:

$$\frac{\partial C}{\partial T} = \frac{D_T}{D_b} \left( \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} \right) \implies \frac{\partial C}{\partial T} = D_1 \left( \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} \right) \quad (13)$$

dove  $D_1 = \frac{D_T}{D_b}$  è noto dai dati di letteratura.

### ☉ Nel rivestimento polimerico di pHEMA dello stent

Tale adimensionalizzazione è stata effettuata in assenza del termine di generazione, che verrà discusso separatamente nel paragrafo dedicato al sistema multicomponente. Operando in maniera del tutto analoga al caso precedente, si ottiene:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D_S \left( \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial y^2} \right) - v_x \left( \frac{\partial c}{\partial x} + \frac{\partial c}{\partial y} \right) \quad (14)$$

$$D_b \frac{\partial C}{\partial T} = D_S \left( \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} \right) - v_b V L \left( \frac{\partial C}{\partial x} + \frac{\partial C}{\partial y} \right) \quad (15)$$

$$D_b \frac{c_o}{L^2} \frac{\partial C}{\partial T} = D_S \frac{c_o}{L^2} \left( \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} \right) - \frac{v_b V}{L} c_o \left( \frac{\partial C}{\partial x} + \frac{\partial C}{\partial y} \right) \quad (16)$$

$$\frac{\partial C}{\partial T} = \frac{D_S}{D_b} \left( \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} \right) \implies \frac{\partial C}{\partial T} = D_2 \left( \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} \right) \quad (17)$$

dove  $D_2 = \frac{D_S}{D_b}$

∅ **Nel lumen sanguigno**

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D_b \left( \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial y^2} \right) - v_x \left( \frac{\partial c}{\partial x} + \frac{\partial c}{\partial y} \right) \quad (18)$$

$$D_b \frac{c_0}{L^2} \frac{\partial C}{\partial T} = D_b \frac{c_0}{L^2} \left( \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} \right) - \frac{v_b V}{L} c_0 \left( \frac{\partial C}{\partial x} + \frac{\partial C}{\partial y} \right) \quad (19)$$

$$D_b \frac{\partial C}{\partial T} = D_b \left( \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} \right) - v_b VL \left( \frac{\partial C}{\partial x} + \frac{\partial C}{\partial y} \right) \quad (20)$$

Questa volta il termine legato alla velocità del sangue è  $v_b \neq 0$  ed è regolato dalla risoluzione della Navier-Stokes; in questo modo si ottiene:

$$\Rightarrow \frac{\partial C}{\partial T} = \left( \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} \right) - \frac{v_b VL}{D_b} \left( \frac{\partial C}{\partial x} + \frac{\partial C}{\partial y} \right) \quad (21)$$

## 6.2 Metodi

### 6.2.1 Risoluzione dell'equazione di Navier – Stokes

Per risolvere la Navier-Stokes in forma adimensionalizzata, è stato necessario normalizzare anche i parametri utili a definire i domini e le condizioni al contorno del sistema arteria-lume-stent. Dalla tabella 2, infatti è possibile vedere come i parametri scelti dai dati della letteratura, sono stati resi adimensionali.

Parametri caratteristici del sangue	Reali	Adimensionali
Densità	$\rho = 1060 \text{ kg/m}^3$	$\underline{\rho} = 1,6$
Viscosità dinamica	$\eta = 1 \cdot 10^{-3} \text{ Pa/s}$	$\underline{\eta} = 1$
Velocità	$v_b = 1 \cdot 10^{-3} \text{ m/s}$	$\underline{V} = 1$
Pressione	$p = 1,5 \cdot 10^4 \text{ Pa}$	$\underline{P} = 2,25 \cdot 10^7$

Tabella 2: Parametri caratteristici del sangue normalizzati

Per impostare la simulazione del flusso convettivo dato dal sangue, bisogna innanzitutto, disattivare i sottodomini rappresentanti il tessuto arterioso e il rivestimento polimerico. Solo in questo modo, sarà possibile specificare i dati fisici, i valori iniziali e l'elemento di calcolo necessari a definire l'unico sottodominio rimasto, il sangue (fig. 4 in rosa), e a fissare le relative condizioni al contorno.

Per la definizione del sottodominio si è fatto riferimento ai dati riportati in tabella 3.

Dati fisici	$\rho = 1,6 ; \eta = 1$
Valori iniziali	$V_x(t_0) = 1 ; V_y(t_0) = 0 ; P(t_0) = 2,25 \cdot 10^7$
Elemento di calcolo	Lagrange $L_2 - L_1$

Tabella 3: Dati fisici, valori iniziali, elemento di calcolo del sottodominio del sangue

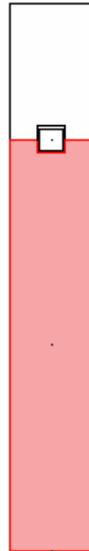


Figura 4: Rappresentazione della disattivazione dei sottodomini tessuto e rivestimento

Per quanto riguarda le condizioni al contorno imposte per questo sottodominio, basta osservare la figura successiva:

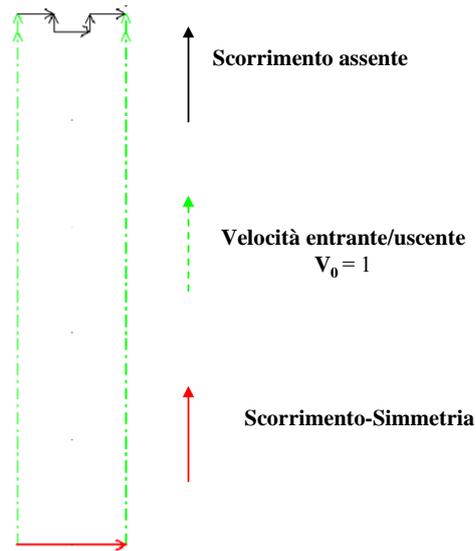


Figura 5: Condizioni al contorno per il sottodominio del sangue

All'interfaccia sangue/arteria e sangue/stent è stato ipotizzato uno scorrimento assente, nella parte di mezzeria del lume sanguigno si è imposto uno scorrimento-simmetria, mentre nelle sezioni di ingresso ed uscita la  $V_0$  è stata imposta unitaria.

### **6.2.2 Risoluzione dell'equazione di convezione-diffusione**

Una volta salvato il risultato ottenuto dalla simulazione del flusso convettivo del lume sanguigno, dall'equazione di Navier-Stokes, si è proceduto alla determinazione della soluzione dell'equazione di convezione-diffusione ed alla simulazione del processo diffusivo del farmaco sia all'interno del tessuto, che all'interno del sangue.

Per impostare il problema sono stati necessari vari parametri, come ad esempio: i coefficienti di diffusione del farmaco nei tre sottodomini; i valori iniziali del fenomeno e la formulazione dell'elemento necessario al calcolo; un termine di generazione, dato dal rilascio del farmaco a seguito della degradazione delle microsferi all'interno del rivestimento polimerico.

Tale equazione è stata risolta, come precedentemente anticipato, per due tipi di farmaci, idrofobi e idrofili, e simulata in due modalità diverse; la prima che prende inizio da una concentrazione iniziale di farmaco all'interno del rivestimento polimerico implementata per entrambi i farmaci, e la seconda da un termine di generazione  $R$ ,

conseguente alla degradazione delle microsferi, ed implementata solo nel caso di farmaci idrofili per validare l'efficacia del nuovo sistema di rilascio da stent.

Per quanto riguarda, l'impostazione delle condizioni a contorno dei tre domini, si può dire che esse restano inalterate sia nel caso della simulazione di un farmaco idrofilo che di un farmaco idrofobo.

Per maggiore chiarezza, si rimanda alla figura 6, dalla quale si evince una continuità di flusso all'interfaccia stent/arteria/sangue; un isolamento nelle pareti laterali dell'arteria; la concentrazione del farmaco è imposta nulla nella zona di ingresso del flusso e dettata dal flusso convettivo nella zona di uscita; ed in flusso è stato imposto nullo nella zona di mezzeria del lume sanguigno e della parete arteriosa.

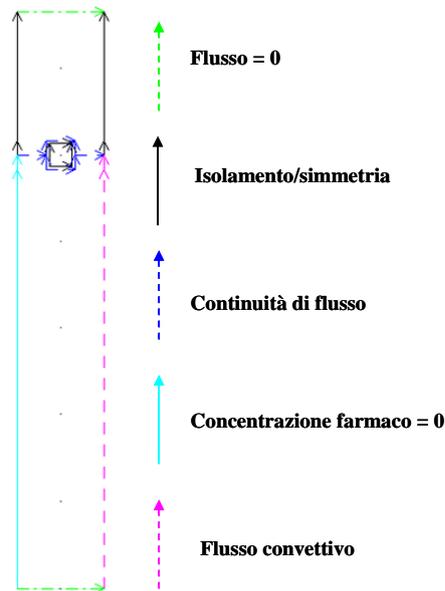


Figura. 6: Condizioni al contorno per i tre sottodomini

Gli unici cambiamenti, che si possono riscontrare dalle due simulazioni, si possono osservare solamente in quelle impostazioni che sono necessarie per definire i vari sottodomini.

### **6.2.2.1 Farmaco idrofobo**

Per impostare in modo corretto la simulazione della diffusione del farmaco all'interno dell'arteria e del sangue, bisogna specificare i dati fisici, i valori iniziali e l'elemento di calcolo necessari a caratterizzare i tre sottodomini.

I parametri caratteristici utilizzati per la simulazione di un farmaco idrofobo sono quelli mostrati nella Tabella 4 e ricavati da dati noti in letteratura per la velocità del sangue e per i coefficienti di diffusione di Paclitaxel nei tre domini, cioè nella parete arteriosa, nell'idrogel di pHEMA e nel sangue [111]

Coefficiente di diffusione dei farmaci idrofobi nel tessuto	$D_T$	$1 \cdot 10^{-16} \text{ m}^2/\text{s}$
Coefficiente di diffusione dei farmaci idrofobi nel phema	$D_S$	$15,4 \cdot 10^{-15} \text{ m}^2/\text{s}$
Coefficiente di diffusione dei farmaci idrofobi nel sangue	$D_b$	$1 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$
Velocità del sangue	$v_b$	$1 \cdot 10^{-3} \text{ m/s}$

*Tabella 4: Parametri caratteristici dei farmaci idrofobi*

Ovviamente, questi parametri sono stati normalizzati, sempre coerentemente all'equazione di convezione-diffusione (tab. 5), come precedentemente descritto.

Coefficiente di diffusione dei farmaci idrofobi nel tessuto	$D_1 = D_T/D_b$	$1 \cdot 10^{-5}$
Coefficiente di diffusione dei farmaci idrofobi nel phema	$D_2 = D_S/D_b$	$15,4 \cdot 10^{-4}$
Coefficiente di diffusione dei farmaci idrofobi nel sangue	$D_3 = D_b/D_b$	1
Velocità del sangue	$V = V v_b L/D_b$	$V = V \cdot 1,5 \cdot 10^5$

*Tabella 5: Parametri caratteristici dei farmaci idrofobi normalizzati*

Per la definizione dei tre sottodomini, nel caso in cui a dare inizio alla simulazione è sempre una concentrazione di farmaco costante all'interno del rivestimento polimerico dello stent, si è fatto riferimento ai dati riportati nelle tabelle successive.

#### **∅ Nel tessuto**

Per quanto riguarda il tessuto arterioso, non è presente la velocità del sangue, né il termine di generazione, il coefficiente di diffusione è quello precedentemente

calcolato e l'elemento di calcolo scelto per tutti i domini è il Lagrange-Quadratico. Ovviamente nel tessuto la concentrazione di farmaco iniziale è nulla.

Dati fisici	$D_1 = 1 \cdot 10^{-5}$ $R = 0$ $V_x = 0$ $V_y = 0$
Valori iniziali	$c(t_0) = 0$
Elemento di calcolo	Lagrange-Quadratico

☉ **Nel rivestimento polimerico di pHEMA dello stent**

Anche per il dominio inerente al rivestimento di pHEMA, risultano essere nulli i valori di velocità del sangue e del termine di generazione, il coefficiente di diffusione è quello calcolato in base alle regole di adimensionalizzazione e l'elemento di calcolo resta invariato. In tale dominio, però, la concentrazione del farmaco non è nulla ma pari al valore adimensionale unitario.

Dati fisici	$D_2 = 1 \cdot 10^{-4}$ $R = 0$ $V_x = 0$ $V_y = 0$
Valori iniziali	$c(t_0) = 1$
Elemento di calcolo	Lagrange-Quadratico

☉ **Nel sangue**

Per quanto riguarda il dominio del sangue, il termine di generazione e l'elemento di calcolo restano invariati, la concentrazione iniziale di farmaco è nulla, ed il coefficiente di diffusione è unitario, per definizione. I termini che subiscono variazioni, in questo caso sono quello relativi alla velocità del sangue, i quali vengono richiamati dalla soluzione dell'equazione di Navier-Stokes.

Dati fisici	$D_3 = 1$ $R = 0$ $V_x = V_x \cdot 1,5 \cdot 10^5$ $V_y = V_y \cdot 1,5 \cdot 10^5$
Valori iniziali	$c(t_0) = 0$
Elemento di calcolo	Lagrange-Quadratico

### **6.2.2.2 Farmaco idrofilo**

I parametri caratteristici utilizzati per la simulazione del farmaco idrofilo, ricavati sempre da dati di letteratura nei tre sottodomini [176], sono quelli dei destrani (tab. 6), caratterizzati da un peso molecolare paragonabile a quello della fludarabina.

Coefficiente di diffusione dei destrani nel tessuto	$D_T$	$1 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$
Coefficiente di diffusione dei destrani nel phema	$D_S$	$15,4 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$
Coefficiente di diffusione dei destrani nel sangue	$D_b$	$1 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$
Velocità del sangue	$v_b$	$1 \cdot 10^{-3} \text{ m/s}$

*Tabella 6: Parametri caratteristici dei destrani*

Naturalmente, tali parametri sono stati normalizzati, coerentemente all'equazione di convezione-diffusione (tab. 7).

Coefficiente di diffusione dei destrani nel tessuto	$D_1 = D_T/D_b$	$1 \cdot 10^{-2}$
Coefficiente di diffusione dei destrani nel phema	$D_2 = D_S/D_b$	$15,4 \cdot 10^{-1}$
Coefficiente di diffusione dei destrani nel sangue	$D_3 = D_b/D_b$	1
Velocità del sangue	$V = v_b L/D_b$	$V = 1,5 \cdot 10^4$

*Tabella 7: Parametri caratteristici dei destrani normalizzati*

Per impostare correttamente la simulazione della diffusione del farmaco, bisogna specificare i dati fisici, i valori iniziali e l'elemento di calcolo necessari a caratterizzare i tre sottodomini.

Per la definizione dei tre sottodomini, bisogna distinguere il caso in cui a dare inizio alla simulazione è una concentrazione di farmaco costante all'interno del rivestimento polimerico dello stent, da quella in cui è presente il termine di generazione. Dunque, si è fatto riferimento ai dati riportati nelle tabelle successive.

### ∞ *Concentrazione iniziale unitaria*

#### ∞ **Nel tessuto**

Per quanto riguarda il tessuto arterioso, il ragionamento è del tutto analogo a quello fatto in precedenza, infatti, non è presente le velocità del sangue, né il termine di generazione, il coefficiente di diffusione è quello precedentemente calcolato per farmaci idrofili e l'elemento di calcolo scelto per tutti i domini è il Lagrange-Quadratico. Ovviamente nel tessuto la concentrazione di farmaco iniziale è nulla.

Dati fisici	$D_1 = 1 \cdot 10^{-2}$ $R = 0$ $V_x = 0$ $V_y = 0$
Valori iniziali	$c(t_0) = 0$
Elemento di calcolo	Lagrange-Quadratico

#### ∞ **Nel rivestimento polimerico di pHEMA dello stent**

Anche per il dominio inerente al rivestimento di pHEMA, risultano essere nulli i valori di velocità del sangue e del termine di generazione, il coefficiente di diffusione è quello calcolato in base alle regole di adimensionalizzazione e l'elemento di calcolo resta invariato. In tale dominio, però, la concentrazione del farmaco non è nulla ma pari al valore adimensionale unitario.

Dati fisici	$D_2 = 15,4 \cdot 10^{-1}$ $R = 0$ $V_x = 0$ $V_y = 0$
Valori iniziali	$c(t_0) = 1$
Elemento di calcolo	Lagrange-Quadratico

#### ∞ **Nel sangue**

Per quanto riguarda il dominio del sangue, il termine di generazione e l'elemento di calcolo restano invariati, la concentrazione iniziale di farmaco è nulla, ed il coefficiente di diffusione è unitario, per definizione. I termini che subiscono variazioni, in questo caso sono quello relativi alla velocità del sangue, i quali vengono richiamati dalla soluzione dell'equazione di Navier-Stokes.

Dati fisici	$D_3 = 1$ $R = 0$ $V_x = V_x \cdot 1,5 \cdot 10^4$ $V_y = V_y \cdot 1,5 \cdot 10^4$
Valori iniziali	$c(t_0) = 0$
Elemento di calcolo	Lagrange-Quadratico

### ∞ Termine di generazione

Il termine di generazione, utilizzato nella simulazione, come parametro per la definizione del dominio del rivestimento polimerico, è stato ricavato dalla funzione, rappresentata nella figura 7, che descrive il rilascio nel tempo di Fludarabina a partire dalla degradazione delle microsfele FLUDA502H.

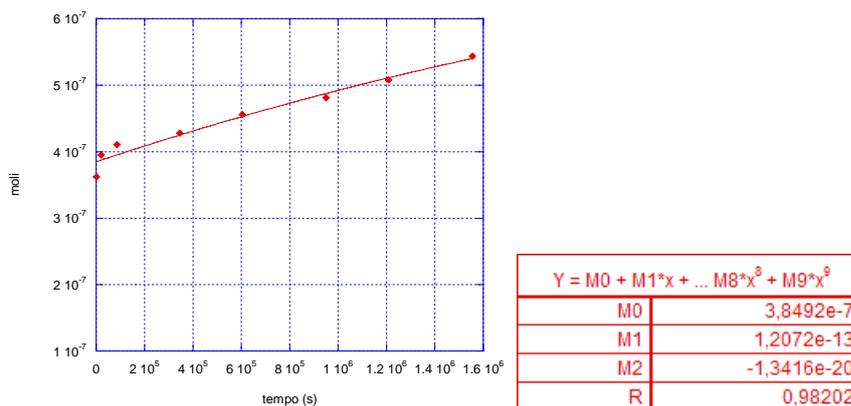


Figura 7: Funzione del rilascio di farmaco in moli in funzione del tempo

Per inserire tale valore all'interno del nostro sistema, bisogna eseguire ancora una volta un'adimensionalizzazione.

La funzione rappresentata in figura 7 è normalizzata a partire dagli assi x e y. I tempi sono adimensionalizzati, come solito, moltiplicandoli per il fattore  $D_b/L^2$  [sec]. Le moli di farmaco, invece, sono rese adimensionali, dividendole per il valore massimo rilasciato. La funzione che si ottiene in questo modo è quella mostrata in figura 8.

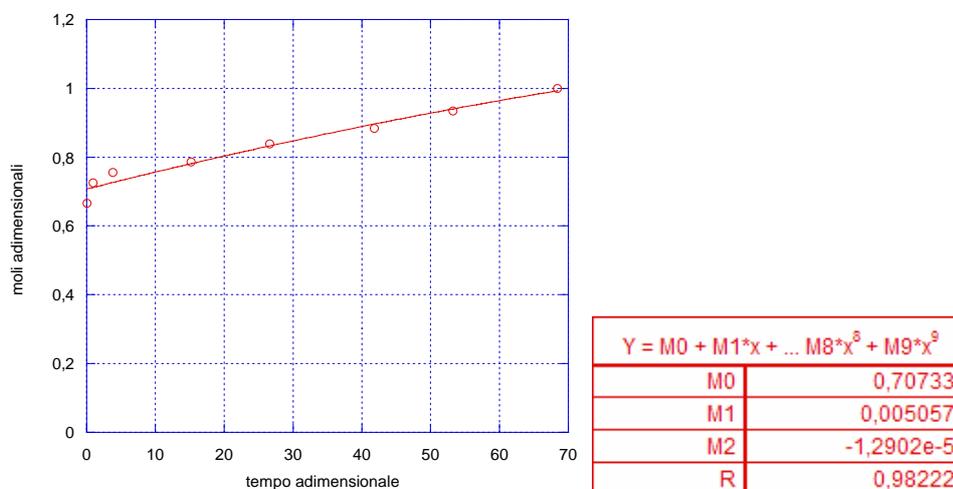


Figura. 8: Funzione di rilascio di farmaco adimensionalizzata

Arrivando dunque a

$$R'' = 0.707 + 0.00506 \cdot t - 1.2902 \cdot 10^{-5} \cdot t^2 \quad (22)$$

## **6.3 Risultati e Discussioni**

Le simulazioni ottenute si riferiscono a due situazioni diverse: una in cui il processo diffusivo del farmaco prende origine da una fissata concentrazione iniziale di farmaco (*stent attualmente in commercio*), e l'altra in cui l'inizio della diffusione si ha a partire da un termine di generazione che dipende dalla degradazione delle microsferi all'interno del rivestimento polimerico dello stent (*stent multicomponente*).

Nel primo caso sono state condotte simulazioni sia nel caso di un farmaco idrofilo che di un farmaco idrofobo.

Il flusso convettivo del sangue viene simulato a partire dall'equazione di Navier-Stokes allo stato stazionario.

### **6.3.1 Navier - Stokes**

La soluzione di tale equazione ha restituito un profilo parabolico delle velocità nel dominio del sangue, caratterizzato dalla simmetria del lumen sanguigno, considerandone solo una metà. La generazione del profilo di flussi convettivi risulta quindi estremamente reale, con una velocità massima, in modulo, nel centro del lumen sanguigno corrispondente ad un valore massimo adimensionale di 1,416, indice di una velocità  $1,416 \cdot 10^{-3}$  in m/s, ed una velocità pressoché nulla in prossimità della parete arteriosa, caratterizzata da un valore minimo adimensionale di  $3,458 \cdot 10^{-7}$  corrispondente ad una velocità  $3,458 \cdot 10^{-10} \sim 0$  in m/s (fig. 9).

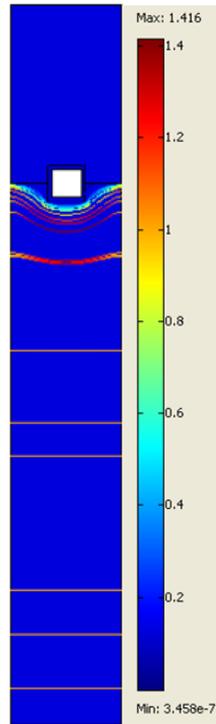


Figura 9: Risultato della Navier-Stokes e profili di flusso

E', inoltre, evidente che la presenza della maglia metallica dello stent altera sostanzialmente il flusso sanguigno, creando delle turbolenze nel profilo e delle zone di ricircolo nella parte distale dello stent, cioè quella a valle del dispositivo.

Questo risultato, oltre ad essere realistico in termini di velocità restituite, conferma ulteriormente l'ipotesi che la presenza dello stent alteri il flusso sanguigno, risultando non necessariamente in un aspetto negativo dell'impianto nella parete arteriosa.

### **6.3.2 Diffusione convezione**

A partire dalla soluzione della Navier-Stokes, cioè dal flusso convettivo originato, viene simulata la diffusione e la distribuzione del farmaco attraverso la parete arteriosa, mediante un'equazione di convezione-diffusione. I risultati di tale equazione mostrano dei profili di concentrazione variabile nel tempo e nello spazio.

### **6.3.2.1 Farmaco idrofobo**

La simulazione è stata condotta utilizzando parametri caratteristici di farmaci idrofobi per valutare le diversità di comportamento *in vivo* di agenti attivi di natura differente a partire dallo stesso sistema di rilascio.

Durante la diffusione nel tessuto arterioso e nel sangue questo tipo di farmaco, a concentrazione iniziale adimensionale unitaria ed uniformemente distribuita nel rivestimento dello stent, segue delle cinetiche lente consentendo il raggiungimento di tempi molto lunghi, circa 3 mesi, paragonabili, in maniera verosimile a quelli che si ottengono utilizzando i DES attualmente disponibili sul mercato, ai quali questa tipologia di simulazione può essere paragonata.

La simulazione è stata eseguita adimensionalizzando i tempi caratteristici del fenomeno diffusivo di un farmaco idrofobo in una geometria normale. Nella tabella 8 sono riportati i tempi corrispondenti ai fotogrammi della simulazione di figura 10, per meglio comprenderne l'andamento temporale.

<b>Tempi in secondi</b>	<b>Tempi adimensionalizzati</b>
0	0
1 giorno	$3,7 \cdot 10^{-1}$
1 settimana	2,6
1 mese	11,14
3 mesi	33,42

*Tabella 8: Tempi caratteristici della simulazione del processo diffusivo per un farmaco idrofobo*

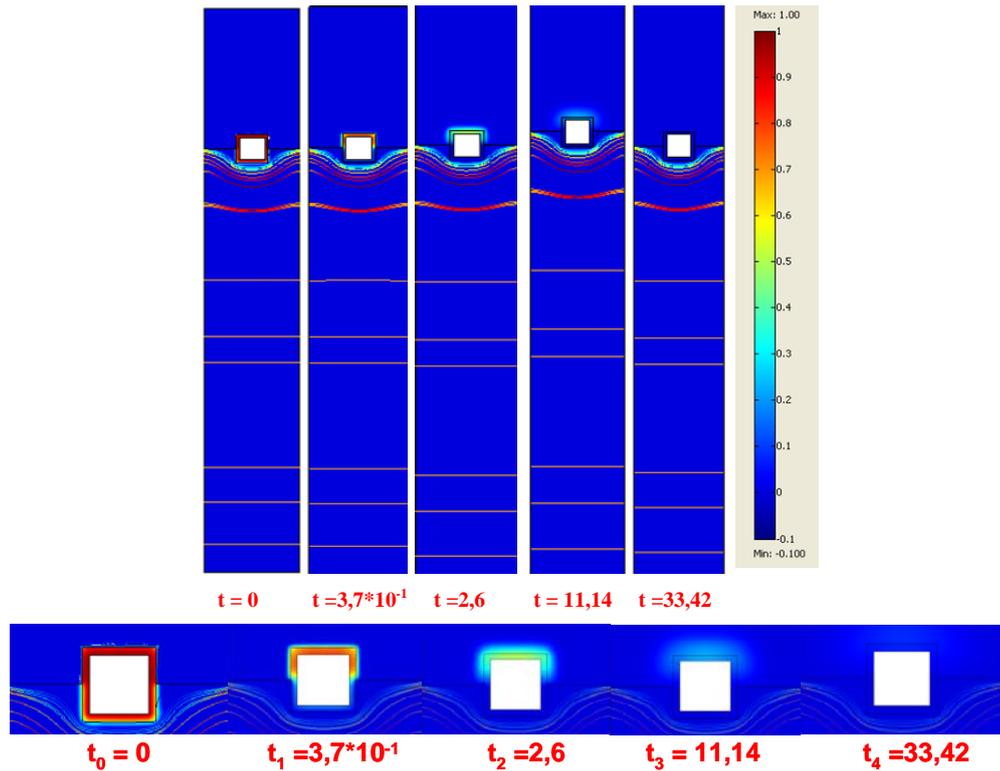


Figura. 11: Risultato della convezione-diffusione e profili di concentrazione per un farmaco idrofobo

Come si può dedurre dalle immagini della simulazione il farmaco idrofobo diffonde molto lentamente fuori dal rivestimento.

Nel sangue, per questo motivo, non si evince alcuna zona di ristagno. Infatti il farmaco, essendo idrofobo, ha poca affinità col sangue, e viene rilasciato nella direzione del lume sanguigno in piccole dosi, preferendo la direzione opposta, cioè verso il tessuto arterioso. Nonostante ciò, anche nella parete arteriosa il rilascio è caratterizzato da cinetiche non rapidissime.

In termini di concentrazione, infatti, 24 ore dopo l'impianto la concentrazione all'interno del rivestimento è pari ad un valore adimensionale di 0,8, indice che il 20 % della carica bioattiva in esso presente è stata già rilasciata. Tuttavia, dopo 1 mese la penetrazione del farmaco all'interno della parete risulta molto efficace risultando in un valore adimensionale della concentrazione di 0,18, ed infine, dopo tre mesi il farmaco risulta penetrato quasi totalmente nella parete, ma una minima parte della sua concentrazione iniziale è ancora presente all'interno del rivestimento, come evidenziato dalla presenza di un valore adimensionale di 0,062.

### **6.3.2.2 Farmaco idrofilo**

Per tale tipologia di agente attivo, si è simulato il rilascio sia da un dispositivo omogeneo, come quelli attualmente presenti sul mercato, sia dal nuovo sistema multicomponente, per verificare l'effettivo miglioramento apportato da tale dispositivo.

#### *∞ Concentrazione iniziale unitaria*

Durante la diffusione nel tessuto arterioso e nel sangue questo tipo di farmaco, a parità di concentrazione iniziale, segue delle cinetiche molto più rapide di quello idrofobo e ciò consente dei tempi di rilascio molto più brevi del caso precedente, a volte inferiori alle 24 ore.

La simulazione è stata eseguita adimensionalizzando i tempi caratteristici del fenomeno diffusivo di un agente idrofilo in condizioni normali (tab. 9).

Si riportano di seguito fotogrammi della simulazione a tempi tali da restituire informazioni significative sulla distribuzione del farmaco.

<b>Tempi in secondi</b>	<b>Tempi adimensionalizzati</b>
0	0
10 sec	$0,4 \cdot 10^{-3}$
30 sec	$1,3 \cdot 10^{-3}$
1 min	$2,6 \cdot 10^{-3}$
1 h	$1,6 \cdot 10^{-1}$
1 giorno	3,84

*Tabella 9: Tempi caratteristici della simulazione del processo diffusivo per un farmaco idrofilo*

Come è possibile vedere dalla figura 11, un farmaco idrofilo diffonde nella parete arteriosa con una cinetica molto rapida, terminando il suo transitorio dopo un solo giorno dal posizionamento del dispositivo. Ciò a conferma, che farmaci idrofili, seppur estremamente utili nella prevenzione della restenosi intra stent, non sono utilizzabili per il rilascio da piattaforme quali gli attuali DES

Nel sangue la diffusione è estremamente rapida, proprio a causa dell'elevata affinità con il flusso ematico. Il farmaco, infatti, viene rapidamente trascinato via,

tuttavia la breve durata del rilascio ci permette di esplorare la cinetica a tempi brevissimi evidenziando la presenza di un ristagno nella parte distale dello stent.

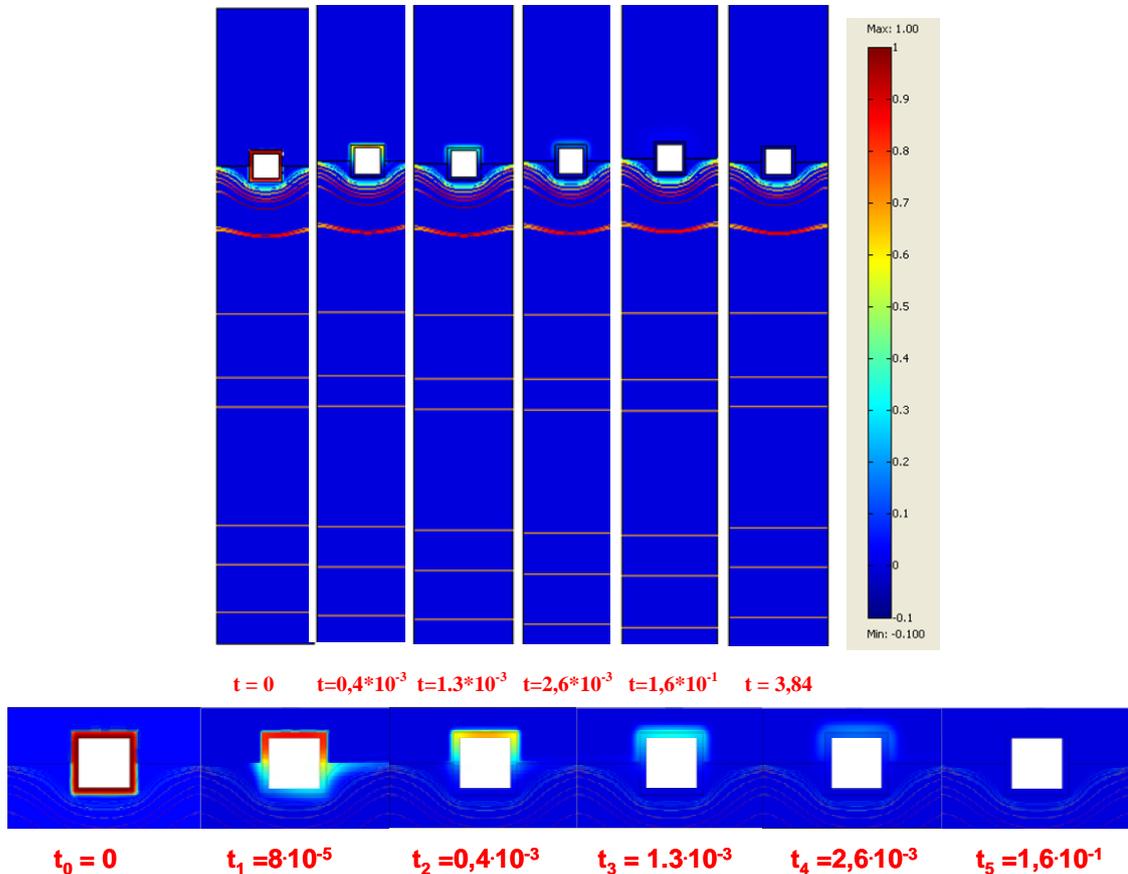


Figura 11: Risultato della convezione-diffusione e profili di concentrazione per un farmaco idrofilo

Il farmaco rilasciato nel lume sanguigno, viene trascinato dal flusso ematico, stazionando per brevi periodi nella zone distale dello stent. Tale ristagno potrebbe aumentare il potere diffusivo dell'agente attivo all'interfaccia sangue/arteria, ma la rapida cinetica con cui avviene ne inficia il risultato.

In termini di concentrazione, infatti, mentre la parete arteriosa è contraddistinta dal lento processo diffusivo di farmaco paragonabile a quello di un agente idrofobo il rivestimento è caratterizzato da un rapido svuotamento che inficia l'azione locale del rilascio.

Nel rivestimento da una concentrazione iniziale unitaria si passa ad un valore adimensionale di 0,67 nei 10 secondi successivi all'impianto, risultando in una perdita istantanea di più del 30% della carica bioattiva. Dopo circa un minuto è possibile

valutare una piccola penetrazione di farmaco nel tessuto arterioso, relativa ad una concentrazione adimensionale di circa 0,13, cioè del 10% di quella caricata, e, infine, dopo un giorno, seppur il farmaco risulta essere penetrato maggiormente nella parete in maniera uniforme, la sua concentrazione si è notevolmente abbassata fino ad un valore adimensionale di 0,0015.

E', quindi, confermata l'incapacità di utilizzare i sistemi di rilascio attualmente utilizzati per la realizzazione di stent per il rilascio di agenti idrofili. Infatti, la semplice dispersione del farmaco in maniera omogenea nel rivestimento fa sì che la cinetica sia dettata dalla sola diffusione delle molecole attraverso la maglia polimerica del rivestimento, e poiché i farmaci idrofili sono affini al flusso sanguigno si crea una forza spingente nella direzione del lume ematico elevata, che tende a svuotare il rivestimento in tempi brevi. Ciò inficia il potenziale terapeutico che tali farmaci idrofili hanno nei confronti della prevenzione della restenosi intra stent.

### ∞ *Termine di generazione*

Per i farmaci idrofili è stata condotta, dunque, anche un simulazione stabilita sempre da un'equazione di convezione-diffusione tenente conto, però, che l'inizio della diffusione non si ha a partire da una concentrazione iniziale di farmaco, ma dal termine di generazione R che discende dal rilascio delle microsfele all'interno del rivestimento polimerico dello stent.

La simulazione è stata eseguita sempre adimensionalizzando i tempi caratteristici del fenomeno diffusivo dell' agente idrofilo in condizioni normali (tab. 10), questa volta più lunghi rispetto al caso precedente.

<b>Tempi in secondi</b>	<b>Tempi adimensionalizzati</b>
0	0
1 sec	$4 \cdot 10^{-6}$
1 h	0,16
18 giorni	69
19 giorni	72,96
20 giorni	76,8

*Tabella 10: Tempi caratteristici della simulazione del processo diffusivo con termine di generazione*

Infatti, dalle cinetiche di rilascio *in vitro* si evince che il termine di generazione perdura per 18 giorni, quindi si è simulato il comportamento *in vivo* per 20 giorni.

Si riportano di seguito fotogrammi della simulazione a tempi tali da restituire informazioni indicative sulla distribuzione del farmaco (fig. 13).

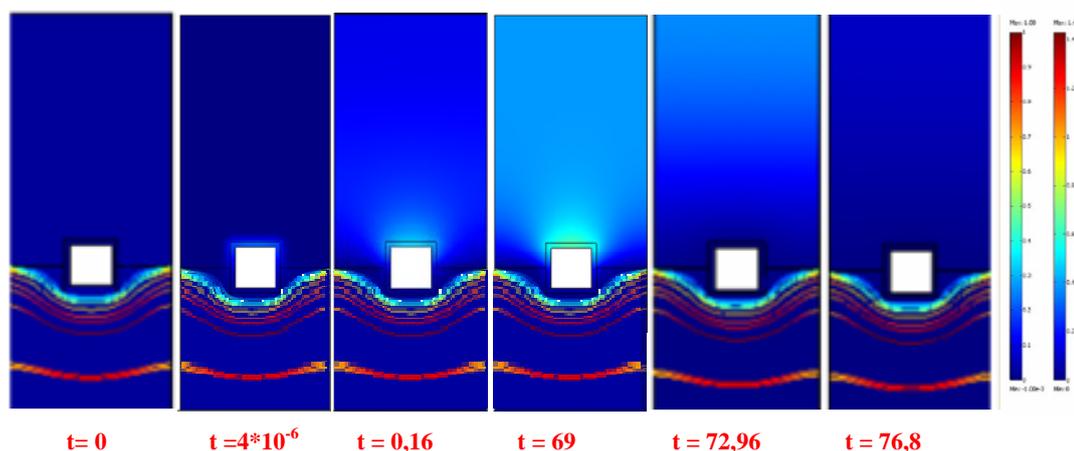


Figura 13: Risultato della convezione-diffusione e profili di concentrazione per sistema multicomponente

Come è possibile evidenziare dai frames relativi alla simulazione in oggetto, la generazione ha inizio immediatamente seppur a concentrazione basse; ciò fa sì che il farmaco che viene ad essere rilasciato nel flusso ematico non è rilevato mentre viene trascinato via. Come si vede nelle immagini della simulazione, la concentrazione del farmaco nel rivestimento parte da un valore pari a zero e cresce gradualmente nel tempo, fino ad arrivare ad un valore di concentrazione pari a 0,453 dopo 18 giorni. Man mano che il rilascio da microsfere procede, aumenta anche la concentrazione di farmaco nel tessuto, e quando, dopo 18 giorni, la generazione all'interno del rivestimento si esaurisce il farmaco presente si distribuisce omogeneamente nella parete vasale.

Utilizzando tale tecnologia, in cui l'agente idrofilo è rilasciato dalle microsfere contenute all'interno del rivestimento polimerico a seguito della loro degradazione, è possibile osservare un rilascio, nella parete arteriosa, più significativo rispetto al caso del farmaco idrofilo disciolto direttamente nel polimero.

Da tale simulazione è possibile verificare il superamento dei limiti tecnologici che impedivano un rilascio prolungato nel tempo anche per un farmaco idrofilo. Ciò grazie all'introduzione delle microsfere nel rivestimento. Infatti, a seguito della loro degradazione, le microsfere all'interno del rivestimento polimerico rilasciano l'agente

idrofilo in esse contenuto permettendo un rilascio, nella parete arteriosa, per tempi lunghi rispetto al caso del farmaco idrofilo omogeneamente disperso nel rivestimento.

. In questo modo il farmaco si rende disponibile al tessuto, seppur in minima concentrazione, per tempi lunghi, oltre i 20 giorni.

## **Conclusioni**

Il comportamento *in vivo* dello stent multicomponente precedentemente realizzato ed ottimizzato è stato simulato utilizzando il Femlab di COMSOL che fornisce un ambiente per lo studio e risoluzione di equazioni differenziali a derivate parziali, discretizzate mediante il metodo degli elementi finiti (FEM).

Le simulazioni sono state effettuate a partire da due condizioni iniziali diverse.

La prima in cui il processo diffusivo del farmaco ha avuto origine da una concentrazione iniziale costante di farmaco, assimilabile agli stent attualmente disponibili, e la seconda in cui l'inizio della diffusione si è avuta a partire da un termine di generazione  $R$  derivante dal rilascio del farmaco dalle microsfere all'interno del rivestimento polimerico dello stent, caratterizzante il sistema multicomponente da noi progettato.

Nel primo caso sono state condotte simulazioni sia per un farmaco idrofilo che per uno idrofobo per verificare l'impossibilità di utilizzare le piattaforme attualmente disponibili in clinica per il rilascio prolungato di agenti attivi idrofili.

A partire dal flusso convettivo originato dall'equazione di Navier-Stokes allo stato stazionario, è stata simulata la diffusione e la distribuzione del farmaco attraverso la parete arteriosa mediante un'equazione di convezione-diffusione.

Il farmaco idrofilo è stato rapidamente trascinato via nel sangue non permettendo una diffusione ottimale nella parete arteriosa. Il farmaco, infatti, risulta completamente rilasciato dopo un solo giorno.

Il farmaco idrofobo, diversamente, a parità di concentrazione iniziale all'interno del rivestimento polimerico ha seguito delle cinetiche diffusive molto più lente consentendo il rilascio per tempi molto più lunghi, circa 3 mesi.

Infine, per i farmaci idrofili, è stata condotta una seconda simulazione stabilita sempre da un'equazione di convezione-diffusione, in cui il flusso sanguigno è stato generato dall'equazione di Navier-Stokes.

In questo caso, però, l'inizio della diffusione è stata ottenuta a partire dal termine di generazione  $R$ . Da tale simulazione è stato possibile verificare il superamento dei limiti tecnologici che impedivano il rilascio prolungato nel tempo per un farmaco idrofilo.

Infatti, a seguito della loro degradazione, le microsfele inglobate all'interno del rivestimento polimerico hanno rilasciato l'agente idrofilo in esse contenuto, permettendo una diffusione nella parete arteriosa con cinetiche molto più lente rispetto al caso dello stesso farmaco idrofilo uniformemente disperso nel rivestimento polimerico.

---

## **Conclusioni**

Obiettivo di questo Dottorato di Ricerca è stato la realizzazione ed ottimizzazione di un innovativo stent coronarico per il rilascio di farmaci.

Sulla base delle necessità cliniche richieste dai cardiologi e a seguito dello studio delle analisi delle limitazioni che affliggono gli attuali stent, il presente lavoro è stato mirato alla progettazione di uno stent cardiovascolare capace di :

***Limitare il danno tessutale*** durante l'espansione ed il posizionamento dello stent; lo scopo è stato raggiunto rivestendo il dispositivo di un idrogel polimerico, il pHEMA. Il sottile strato di rivestimento, idratandosi a contatto con il sangue durante la procedura di impianto, crea una superficie *soffice* in grado di rendere il contatto con la parete vasale, durante l'espansione, meno traumatico. Una tecnica spray modificata è stata ottimizzata per ottenere un rivestimento omogeneo sulla complessa superficie dello stent. In particolare tale tecnologia consta nella nebulizzazione della soluzione polimerica di pHEMA sulla superficie dello stent posto in rotazione sul proprio asse. Variando opportunamente alcuni parametri di progetto, quali velocità di rotazione o tempo di nebulizzazione, è possibile ottenere spessori modulabili del rivestimento che rendono tale dispositivo di versatile applicazione. Lo stent così ottenuto è stato caratterizzato in termini di spessore, uniformità, adesione e persistenza del rivestimento. La morfologia della superficie del rivestimento di pHEMA appare liscia, omogenea ed uniforme, e senza nessuna evidenza di crepe o occlusioni tra le maglie. I risultati sperimentali mostrano che il nostro stent rivestito è capace di resistere agli sforzi impartiti durante la procedura di posizionamento senza produrre crepe o delaminazioni sulla superficie. Inoltre, la stabilità e persistenza del rivestimento polimerico è stata testata in ambiente fisiologico per 6 mesi senza mostrare cedimenti.

***Consentire il rilascio di agenti idrofili*** con cinetiche modulabili e prolungate rispetto a quelle generate dagli attuali DES; il risultato è stato raggiunto con la realizzazione di un sistema multicomponente. Al fine di ingegnerizzare le cinetiche di rilascio di farmaci idrofili, come la Fludarabina utilizzata in tale lavoro di Dottorato, l'idea che si è perseguita è stata l'utilizzo combinato di più sistemi di rilascio. La

---

Fludarabina è stata incapsulata in microsfere biodegradabili di PLGA le quali, attraverso la tecnica spray precedentemente ottimizzata, vengono inglobate nel rivestimento polimerico di pHEMA. Due formulazioni di microsfere sono state realizzate, tramite la tecnologia della doppia emulsione, per consentire la modulazione delle cinetiche di rilascio. Le microsfere così ottenute differiscono per le dimensioni (4 o 14  $\mu\text{m}$ ), ma entrambe vengono perfettamente inglobate nel rivestimento, consentendo così la realizzazione del sistema multicomponente caratterizzato da superficie omogenea e liscia come nel caso di solo idrogelo. Una volta ottimizzato tale sistema complesso, sono stati effettuati studi *in vitro* per determinare l'effettiva cinetica di rilascio comparandola con quella ottenuta in assenza di microcarrier (i.e. con il farmaco omogeneamente disperso nel rivestimento). Tali prove sperimentali hanno verificato che la realizzazione di un tradizionale DES contenente Fludarabina non è in grado di produrre cinetiche soddisfacenti, in quanto il rilascio risulta non riproducibile ed estremamente rapido. Al contrario, la realizzazione del sistema multicomponente ci consente di superare brillantemente tale limitazione, permettendoci di ottenere cinetiche prolungate dell'agente idrofilo nonché modulabili al variare della formulazione di microsfere utilizzata.

In parallelo, simulazioni matematiche agli elementi finiti (FEM) per la predizione delle cinetiche di rilascio del farmaco dallo stent *in vivo* hanno restituito delle informazioni importanti ed estremamente confortanti. Le cinetiche di rilascio *in vivo* di Fludarabina da DES hanno evidenziato un rilascio estremamente rapido che si completa nelle 24 ore successive all'impianto, come riscontrato dai rilasci *in vitro*. Mentre le simulazioni di rilascio dal sistema multicomponente proposto hanno mostrato un rilascio controllato e prolungato per oltre 20 giorni.

Ciò a conferma che, con l'utilizzo dell'innovativo stent da noi sviluppato, molti dei limiti che attualmente affliggono la cardiopatia ischemica, e che costituiscono il tallone d'Achille per la procedura di stenting coronarico, potrebbero essere brillantemente superati.

## **Bibliografia**

- [1] Geary R.L. et al., Time course of cellular proliferation, intimal hyperplasia and remodeling following angioplasty in monkeys with established atherosclerosis. A nonhuman primate model of restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16 (1): 33-43
- [2] Sigwart U. et al, Intravascular stents to prevent occlusion and restenosis after transluminal angioplasty, *N Engl J Med* 1987; 316: 701-706
- [3] Garasic JM. et al., Stent and artery geometry determine intimal thickening independent of arterial injury, *Circulation* 2000; 101 (7): 812-818
- [4] Bertrand O.F. et al., Biocompatibility aspects of new stent technology, *J Am Coll Cardiol*, 1998; 32: 562-571
- [5] Farb A. et al., Morphological predictors of restenosis after coronary stenting in humans, *Circulation* 1999; 99:44-52
- [6] Van der Hoeven B.L. et al., Drug Eluting stents: results, promises and problems, *Int J Cardiol* 2005; 99:9-17
- [7] Torella D. et al., Fludarabine prevents smooth muscle proliferation in vitro and neointimal hyperplasia in vivo through specific inhibition of STAT-1 activation *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292: H2935–H2943
- [8] Hwang C-H. et al., Physiological transport forces govern drug distribution for stent-based delivery, *Circulation* 2001 ; 104 :600-605
- [9] Indolfi C. et al., *Le sindromi coronariche acute*, EDIMES editore
- [10] Maiello L.. *Angioplastica coronarica e stent se le arterie si restringono. Sanità al Futuro*. 2005; 3: 3.2
- [11] Essed C.E. et al., Transluminal coronary angioplasty and early restenosis. Fibrocellular occlusion after wall laceration, *Br Heart J* 1983; 49: 393-396
- [12] [www.medtronic.com/italy/patients/CAD/angioplasty.html](http://www.medtronic.com/italy/patients/CAD/angioplasty.html)
- [13] Danesi A.. *Lo stent, alternativa al by-pass. Che cos'è, come si applica, e con quali innovazioni*. Internet.
- [14] Gruntzing A.R. et al., Nonoperative dilatation of coronary-artery stenosis: percutaneous transluminal coronary angioplasty, *N Engl J Med* 1979 ; 310 :61-68

- [15] Dotter CT, Judkins MP. Transluminal treatment of arteriosclerotic obstruction, *Circulation*. 1969; 30: 654-663
- [16] Nurdin N. et al., Haemocompatibility evaluation of DLC- and SiC-coated surfaces. *Eur Cell Mater* 2003; 5: 17-28
- [17] Palmaz JC, et al, Atherosclerotic rabbit aortas: Expandable intraluminal grafting. *Radiology* 160: 723-726, 1986
- [18] Bhatt DL, Topol EJ. Periprocedural myocardial infarction and emboli protection. In: “Textbook of Interventional Cardiology, 4 Edition”, Topol EJ (ed.), Elsevier Science, USA, 2003, pp.251-266
- [19] Maass D. et al, Transluminal implantation of intravascular “double elix” spiral prostheses: technical and biological consideration, *ESAO* 9: 252-256,1982
- [20] Dyet, J.F. et al., Mechanical properties of metallic stent: how do these properties influence the choice of stent for specific lesion?, *Cardiovasc. Intervent. Radiol.*, , 2000; 23; 47-54.
- [21] Huang. H et al., The impact of calcification on the biomechanical stability of atherosclerotic plaques, *Circulation*, 2001, pp. 1051-1056
- [22] Thierry, B. et al., Nitinol versus stainless steel stents: acute thrombogenicity study in an ex vivo porcine model, *Biomaterials*, Vol. 23, 2002, pp. 2997-3005
- [23] Wright WC, et al, Percutaneous endovascular stents: an experimental evaluation, *Radiology* 156:69-72,1985
- [24] Zollikofer CHL et al, Percutaneous endovascular stenting: pathophysiologic correlates, in: Maynar-Moliner M, Castaneda-Zuniga WR, Joffre F, Zollikofer CL (eds): “Percutaneous revascularization techniques”, Thieme, New York 296-300,1993
- [25] Palmaz JC, Intravascular stenting: from basic research to clinical application, *CVIR* 15:279-284,1992
- [26] Abbott WM et al, Effect of compliance mismatch on vascular graft patency, *J Vasc Surg* 5:376, 1987
- [27] Palmaz JC, Intravascular stenting: tissue-stent interactions and design consideration, *AJR* 160:613-618, 1993
- [28] Barra JA, Volant A, Leroy JP et al, Constrictive perivenous mesh prosthesis for preservation of vein integrity, *J Thorac Cardiovasc Surg* 92: 330-336,1986

- [29] Palmaz JC et al, Early endothelization of balloon expandable stents: experimental observations, *Radiology* 3: 119-124, 1988
- [30] Palmaz JC, Balloon-expandable intravascular stent, *AJR* 150:1263-1269, 1988
- [31] Palmaz JC et al, Balloon-expandable intraarterial stents: effect of anticoagulation on thrombus formation (abst) *Circulation* 76:45,1987
- [32] Hall P., et al., A randomized comparison of combined ticlopidine and aspirin therapy versus aspirin therapy alone after successful intravascular ultrasound-guided stent implantation, *Circulation* 93 (1996) 215–222
- [33] Leon M.B. et al., A clinical trial comparing three antithrombotic-drug regimens after coronary- artery stenting. Stent Anticoagulation Restenosis Study Investigators, *N. Engl. J. Med.* 339 (1998) 1665– 1671
- [34] Welt FG, Rogers C. Inflammation and restenosis in the stent era. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22: 1769–1776
- [35] Forrester JS, Fishbein M, Helfant R, Fagin J. A paradigm for restenosis based on cell biology: clues for the development of new preventive therapies. *J Am Coll Cardiol.* 1991;17:758 –769
- [36] Riessen R et al., Regional differences in the distribution of the proteoglycans biglycan and decorin in the extracellular matrix of atherosclerotic and restenotic human coronary arteries. *Am J Pathol.* 1994;144:962–974
- [37] Staab ME et al., Arterial remodeling after experimental percutaneous injury is highly dependent on adventitial injury and histopathology. *Int J Cardiol.* 1997;58:31–40
- [38] Labinaz M et al., Time course and importance of neoadventitial formation in arterial remodeling following balloon angioplasty of porcine coronary arteries. *Cardiovasc Res.* 1999;41:255–266
- [39] Bauters C, et al., Predictor of restenosis after coronary stent implantation. *J. Am Coll Cardiol* 1998; 31: 1291-8
- [40] Dussailant GR, et al., Small stent size and intimal hyperplasia contribute to restenosis: a volumetric intravascular ultrasound analysis. *J Am Coll Cardiol.* 1995; 26; 720-4

- [41] Castagna MT, et al., The contribution of “mechanical” problems to in-stent restenosis: An intravascular ultrasonographic analysis of 1090 consecutive in-stent restenosis lesion. *Am Heart J* 2001; 142: 970-4
- [42] Bucx JJ et al., The importance of adequate anticoagulation to prevent early thrombosis after stenting of stenosed venous bypass graft, *Am Heart J*, 1991;121:1389
- [43] De Scheerder I et al., Stenting in venous bypass grafts: a new treatment modality for a patients who are poor candidates for reintervention. *Am Heart J*, 1992;123:1046
- [44] Strauss BH et al., Relative risk analysis of angiographic predictors of restenosis within the coronary wall stent. *Circulation* 1991;84:1636
- [45] Gunn J, et al. Stent coatings and local drug delivery. *Eur Heart J* 1999; 20: 1693-700
- [46] EPIC Investigators. Use of a monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in high-risk coronary angioplasty, *N. Engl. J. Med.* 1994;330:956-961
- [47] Menown I. et al, Passive stent coatings in the Drug-Eluting era, *J. of Inv. Card.* 2005 Vol 17, Is4: 222-228
- [48] van der Giessen W.J., et al. Marker inflammatory sequelae to implantation of biodegradable and non biodegradable polymers in porcine coronary arteries, *Circulation*, 1994;94:1690-97
- [49] Hardhammar P.A., et al. Reduction in thrombotic events with heparin-coated Palmaz-Schatz stent in normal porcine coronary arteries. *Circulation* 1996;93: 423-30
- [50] Alt E, et al. The inflow coronary stent. In: Serruys P.W., Kutryk M.J.B. editors. *Handbook of coronary stents*, 1998, London, 265-273
- [51] Harding S.A., et al. Long-term clinical safety and efficacy of NIROYAL vs NIR intracoronary stent. *Cathet Cardiovasc Intervent* 2001;54: 141-145
- [52] Edelman E. et al. Gold-coated NIR stents in porcine coronary arteries. *Circulation* 2001;103(3): 429-34
- [53] Mani G. et al. Coronary stents: a materials perspective, *Biomaterials* 2007;28: 1689-1710

- [54] Heublein B, et al, Silicon carbide coating N A semiconducting hybrid design of coronary stents N A feasibility study. *J Invas. Cardiol* 1998;10: 255-62
- [55] Bolz A, Schaldach M, Artificial heart valves: improved blood compatibility by PECVD a-SiC:H coating. *Artif. Organs* 1990;14(4): 260-9
- [56] Unverborden M, et al. Comparison of a silicon carbide-coated stent versus a noncoated stent in human beings: the TENAX versus Nir stent study's long-term outcome. *Am. Heart J* 2003;145(4): E17
- [57] Cumberland D.C., et al. Biomimicry 1 : PC. *Semin Interv Cardiol.*, 1998;3:149-50
- [58] Whelan D, et al. Biocompatibility of Phosphorylcholine coated stents in normal porcine coronary arteries, *Heart* 2000;83 (3): 338-43
- [59] Zheng H, et al. Clinical experience with a new biocompatible phosphorylcholine-coated coronary stent. *J Invas Cardiology* 1999;11(10):608-14
- [60] Day J, et al. Heparin is much more than just an anticoagulant. *J Cardiothor Vascul Anesth* 2004;18(1):93-100.
- [61] De Scheerder I, et al. Experimental study of thrombogenicity and foreign body reaction induced by heparin-coated coronary stents. *Circulation* 1997;95:1549-1553
- [62] Beaudry Y, et al. Six-month results of small vessel stenting (2.0-2.8 mm) with the BiodivYsio SV stent. *J invasive Cardiol* 2001;13:628-31
- [63] Christensen K, et al. Heparin coating of the stent graft — effects on platelets, coagulation and complement activation. *Biomaterials* 2001;4:349-55
- [64] Tarnok A, et al. Rapid in vitro biocompatibility assay of endovascular stents by flow cytometry using platelet activation and platelet-leukocyte aggregation. *Cytometry* 1999;38:30-9
- [65] Keraiakes D.J., et al. Thrombosis and Drug-Eluting Stent: A critical appraisal. *Rev. Cardiovasc. Med.* 2004;5: 9-15
- [66] De Scheerder I. et al., Biocompatibility of polymer-coated oversized metallic stents implanted in normal porcine coronary arteries. *Atherosclerosis* 1995;114:105-14
- [67] Orrego P.S. et al., Limiti e utilità degli stent coronarici nelle varie condizioni cliniche. *Decorso a lungo termine. Ital Heart J Suppl* 2001; 2 (7): 701-718

- [68] Bennett MR, O'Sullivan M, Mechanism of angioplasty and stent restenosis: implications for design of rational therapy, *Pharmacol ther* 2001;91:149-66
- [69] Fattori R, Piva T, Drug-eluting stents in vascular intervention, rapid review, *The lancet*, vol 361, 2003
- [70] Schwartz RS. et al., Bioabsorbable, drug eluting, intracoronary stents: design and future applications, in Sigwart U and Frank GI, (eds), *Coronary Stent*, Heidelberg: sprinter-Verlag, 1992;135-154
- [71] C. Cavallini. Fattori clinici, angiografici e procedurali predittivi di restenosi coronaria dopo impianto di stent: sintesi delle evidenze. *Ital Heart J Suppl* 2001; 2 (7): 719-732
- [72] Schwartz RS, Edelman E, for the Consensus Committee. Drug-eluting stents in preclinical studies: recommendend evaluation from a consensus group. *Circulation* 2002;106:1867-73
- [73] Schwartz R.S., Animal models of human coronary restenosis. In: Topol EJ, ed. *Text book of interventional cardiology*, 1994 365-81
- [74] Nakayama et al, Development of high-performance stent: gelatinous photogel-coated stent that permits drug delivery and gene transfer. *J. Biomed. Mater. Res.* 2001;57: 559-66
- [75] Fischell T., Polymer coatings for stent, Can we judge a stent by its cover?, *Circulation* 1996;94: 1494-1495
- [76] Wilensky R, et al. Methods and devices for local drug delivery in coronary and peripheral arteries. *Trends Cardiovasc Med* 1993;3(5):163-70
- [77] Virmani R, et al. Mechanism of late in-stent restenosis after implantation of a paclitaxel derivate-eluting polymer stent system in humans. *Circulation* 2002;106:2649-51
- [78] Liistro F, Colombo A. Late acute thrombosis after paclitaxel eluting stent implantation. *Heart* 2001;86:262-64
- [79] Edelman E et al., Arterial Paclitaxel distribution and deposition, *Circulation Research* 2000;86:879-884
- [80] Sousa J, et al. Lack of neointimal proliferation after implantation of sirolimus-coated stents in human coronary arteries: a quantitative coronary angiography and three-dimensional intravascular ultrasound study. *Circulation* 2001;103:192-195

- [81] Landau C. et al., Biodegradable stents functions as vehicles for vascular delivery or recombinant adenovirus vectors (astr) *Circulation* 1995, 92(suppl I)670
- [82] Klugherz BD. et al., twenty-eight-day efficacy and pharmacokinetics of the sirolimus eluting stent. *Coron Artery Dis* 2002; 13:183-88
- [83] Tanner FC, et al., Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors in vascular disease, *Circ Res* 82 !998: 396-403
- [84] Babapulle MN, Einsenberg MJ, Coated stent for the prevention of restenosis: Part II, *Circulation* 106;2002:1859-66
- [85] Topol EJ, Serruys PW, *Frontiers in interventional cardiology*, *Circulation* 98; 1998:1802-20
- [86] Hiatt BL, et al., Drug-eluting stents for the prevention of restenosis: in quest for the Holy Grail, *Catheter Cardiovasc Interv* 55; 2002; 409-17
- [87] Jenkins NP, et al., Drug-eluting coronary stents, *Br Med J* 2325; 2002; 1315-16
- [88] Birmani R. et al., Mechanism of late in stent restenosis after implantation of a paclitaxel derivate eluting-stent system in humans. *Circulation* 2002,106:2649-51
- [89] Kutryk M.J, Drug eluting stents for the treatment of coronary artery disease, *Cardiol. Round* 2003, 10(vol VIII)
- [90] de Scheerder I. Study of anti-restenosis with the BiodivYsio Dexamethasone-eluting stent (STRIDE) trial: 6-month MACE and angiographic results. Presented at the American College of Cardiology 2002
- [91] Lemos PA, et al. Early outcome after sirolimus-eluting stent implantation in patients with acute coronary syndromes. Insights from the Rapamycin-Eluting Stent Evaluated At Rotterdam Cardiology Hospital (RESEARCH) registry. *J Am Coll Cardiol* 2003;41(11):2093-9
- [92] Parry T.J., et al. Drug-eluting stents: sirolimus and paclitaxel differentially affect cultured cells and injured arteries, *Eur. J. Pharmacol.* 2005;524:19– 29
- [93] Costa M.A., Simon D.I., Molecular basis of restenosis and drug eluting stents, *Circulation* 2005;111: 2257– 2273
- [94] Morice MC. et al., A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N. Engl. J Med* 2002;346:1773-80

- [95] Sousa JE, et al., Late (two-year) follow-up from the FIRST-In-Man (FIM) experience after implantation of sirolimus-eluting stents. *J Am Coll Cardiol* 2002;39 Suppl A:21A
- [96] Serruys PW et al., Sirolimus-eluting stents abolish neointimal hyperplasia in patients with in-stent restenosis: late angiographic and intravascular ultrasound results. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39 Suppl A:37°
- [97] Grube E et al., TAXUS 1 prospective, randomized, double blind comparison of NIRX™ stents coated with paclitaxel in a polymer carrier in de novo coronary lesions compared with uncoated controls. *Circulation* 2001;104 Suppl II:II463
- [98] Grube E, Serruys PW. Safety and performance of a paclitaxel-eluting stent for the treatment of in-stent restenosis: preliminary results of the TAXUS III trial. *J. Am Coll Cardiol* 2002; 39 Suppl A:58°
- [99] Heldman A, et al. Paclitaxel stent coating inhibits neointimal hyperplasia at 4 weeks in a porcine model of coronary restenosis. *Circulation* 2001;103(18):2289-95
- [100] Axel D.I., et al. Paclitaxel inhibits arterial smooth muscle cell proliferation and migration in vitro and in vivo using local drug delivery, *Circulation* 1997;96:636–645
- [101] Signore P.E., et al. Complete inhibition of intimal hyperplasia by perivascular delivery of paclitaxel in balloon-injured rat carotid arteries, *J. Vasc. Interv. Radiol* 2001;12:79– 88
- [102] Honda Y, et al. Novel drug delivery stent: intravascular ultrasound observation from the first human experience with the QP2-eluting polymer stent system. *Circulation* 2001;104:380-83
- [103] Commandeur S, et al. Polymers, drug release, and drug eluting stents, *J Interv Cardiol*, 2006;19 (6):500-506
- [104] <http://www.fda.gov/cdrh/recalls/recall-070104.html>
- [105] Smith E, et al. New developments in coronary stent technology, *J Interv Cardiol*, 2006 19 (6): 493-499
- [106] Wessely R, et al. Inhibition of neointima formation by a novel drug-eluting stent system that allows for dose-adjustable, multiple, and on-site stent coating. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:748-753

- [107] Scott Neal, Restenosis following implantation of bare metal coronary stents: Pathophysiology and pathways involved in the vascular response to injury, *Advanced Drug Deliv Rev* 2006;58:358-376
- [108] Tanguay J-F, Drug eluting stents and anti-platelet therapy – Current clinical implications, , In: Chakfè N, Durand B, Kretz J-G Eds, *New technologies in vascular biomaterials, Fundamentals about stent II*, Strasbourg 2007, 247-60
- [109] Nebecker JR. et al. Hypersensitivity cases associated with drug-eluting coronary stents: A review of the available cases from the Research on Adverse Drug Events and Reports (RADAR) project. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47:175-181
- [110] Virmani R. et al., Localized hypersensitivity and late coronary thrombosis secondary to a sirolimus-eluting stent: should we be cautious? *Circulation.* 2004;109:701-5
- [111] Yang C, Burt H., Drug-eluting stent: Factors governing local pharmacokinetics, *Adv Drug Deliv Rev*, 2006; 58:402-411
- [112] Lovich MA. et al., Carrier proteins determine local pharmacokinetics and arterial distribution of paclitaxel, *J Pharm Science*, 2001; 90(9): 1324-1335
- [113] Creel CJ. Et al., Arterial paclitaxel distribution and deposition, *Circ Res* 2000;86:879-884
- [114] Balakrishnan B. et al., Strut Position, Blood Flow, and Drug Deposition: Implications for Single and Overlapping Drug-Eluting Stents. *Circulation* 2005;111;2958-2965.
- [115] Hwang Chao-Wei, et al., Thrombosis Modulates Arterial Drug Distribution for Drug-Eluting Stents. *Circulation* 2005;111;1619-1626
- [116] Migliavacca F. et al., A predictive study of the mechanical behaviour of coronary stents by computer modelling. *Medical Engineering & Physics*, 2005; 27: 13-18.
- [117] Jantzen G.M. and Robinson J.R., Sustained- and Controlled-Release Drug Delivereliver, 575-604
- [118] Langer R.S., Wise D.L., *Medical applications of controlled release*, Vol I&II, Classes of systems, CRC Press, Boca Raton, FL 1984, 261PP
- [119] Amidon, Lee, Absorption of peptide and peptidomimetic drugs, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1994, 34, 321-341

- [120]Wearley, Recent progress in protein and Peptide delivery by noninvasive routes, Crit. Rev. Ther. Carrier Syst.,1991, 8, 331-394
- [121]Majeti N.V., Kumar Ravi, Nano and Microparticles as controlled drug delivery device, J. Pharm Pharmaceut Sci 2000
- [122]Bruck S. D., Controlled Drug Delivery, Vol I, Basic Concepts, CRC Press, Boca Raton, FL, 1983, 187PP
- [123]Kim SW, Temperature Sensitive Polymers for Delivery of Macromolecular Drugs, in Advanced Biomaterials in Biomedical Engineering and Drug Delivery Systems, Ogata N, Kim SW, Feijen J, et al. (eds), Tokyo, Springer, pp 126–133, 1996
- [124]Mikos AG, et al. (eds), Biomaterials for Drug and Cell Delivery, Pittsburgh, Materials Research Society, 1994
- [125]Pitt C.G., Schindler A., The design of controlled drug delivery systems based on biodegradable polymers, in biodegradables and delivery systems for contraception, E.S.I. Hafez, W.A.A.Van, OS, EDS, MTP Press, Lancaster, England, 1980, P17
- [126]Bunker G. S., Rhodes C. T., Modern Pharmaceutics, 3rd Edition, pp 845-850, 1996
- [127]Gilding D.K., Reed A.M., Biodegradable Polymers for use in surgery Poly(glicolic)/Poly(lactic) homo and copolymers: 1. Polymer 20 1459 (1979)
- [128]Miller R.A.et al., Degradation rates of oral resorbable implants (Poly lactates and Poly glycolates) : rate modification with changes in PLA/PGA copolymer ratio, J. Biomed. Mater. Res.11, 711 (1977)
- [129]Pitt C.G. et al., Aliphatic Polyester, II, The degradation of Poly(DL-Lactide), Poly(€Caprolactone) and their copolymers in vivo, Biomaterials 2, 215 (1981)
- [130]Baker, Lonsdale, Controlled release: mechanisms and rate in controlled release of biologically active agents, eds., plenum, new york, 1974,15-22
- [131]Robinson JR, and Lee VHL (eds), Controlled Drug Delivery: Fundamentals and Applications (2nd ed), New York, Marcel Dekker, 1987
- [132]Sinha VR, Khosla L., Bioabsorbable polymers for implantable therapeutic systems, Drug Dev Ind Pharm. 1998 Dec; 24(12):1129-38
- [133]Moore, Connectivity of dispersed particles: a probabilistic computation, NBS special publication, n°431, Gaithersburg, MD, 1976, p41

- [134] Baker, Controlled release of bioactive materials, Academic, New York, 1980, 473p
- [135] Cleland J.L., Solvent evaporation processes for the production of controlled release biodegradable microsphere formulations for therapeutics and vaccines, *Biotechnol Prog.* 1998 Jan-Feb;14(1):102-7
- [136] Benita S (ed), *Microencapsulation: Methods and Industrial Applications*, New York, Marcel Dekker, 1996
- [137] Heller J., Hoffman A., Drug delivery systems, in *Application of materials in medicine, biology, and artificial organs.*
- [138] Burgess, Colloids and colloid drug delivery systems, *Encyclopedia of pharmaceutical technology* 1990, 3, 31-63
- [139] Redmon, Hockey, De Luca, J. *Contr. Rel.*, 1991, 9, 99-109
- [140] Okada H., Toguchi H., Biodegradable microspheres in drug delivery, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 1995;12(1):1-99
- [141] Janicki C., Hwang C.-W., Edelman E.R., Dose model for stent-based delivery of a radioactive compound for the treatment of restenosis in coronary arteries, *Med. Phys.* 30 (2003) 2622– 2628
- [142] Drachman D.E., Clinical experience with drug-eluting stents, *Rev. Cardiovasc. Med.* 3 (2002) S31– S37; D.G. Rizik, T-stenting with drug-eluting stents for the treatment of bifurcation in-stent restenosis, *J. Interv. Cardiol.* 15 (2002) 519– 520
- [143] Hofma S.H. et al., Recent developments in coated stents, *Curr. Interv. Cardiol. Rep.* 3 (2001) 28– 36
- [144] Liistro F., First clinical experience with a paclitaxel derivat eluting polymer stent system implantation for in-stent restenosis: immediate and long-term clinical and angiographic outcome, *Circulation* 105 (2002) 1883–1886
- [145] Smith E.J., Rothman M.T., Antiproliferative coatings for the treatment of coronary heart disease: what are the targets and which are the tools?, *J. Interv. Cardiol.* 16 (2003) 475– 483.
- [146] Serruys P., Gershlick A., *Handbook of Drug-Eluting Stents*, Martin Dunitz pages, 2005.

- [147]Kunert W. Kuttner A., Taxol inhibits development of restenosis following experimental balloon angioplasty in the rabbit carotid artery. *Eur Heart J* 1996;17:368
- [148]Finkelstein A. et al., Local drug delivery via a coronary stent with programmable release pharmacokinetics, *Circulation* 107 (2003) 777–784
- [149]Bartorelli A.L. et al., Synergy of passive coating and targeted drug delivery: the tacrolimus-eluting Janus CarboStent, *J. Interv. Cardiol.* 16 (2003) 499–505
- [150]J.W. Moses, C.E.H. Buller, E.D. Nukta, et al., The first clinical trial comparing a coated versus a noncoated coronary stent: the Biocompatibles BiodivYsio stent in randomized control trial (DISTINCT), *Circulation* 101 (2000) II-664.
- [151]Fischmann DL., et al. A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease, *N.Engl.J.Med* 1994; 331: 496-501
- [152]Holmes J., State of art in coronary intervantion. *Am. J. Cardiol.* 2003; 91 (3A): 50A-3A
- [153]Boekstegers P., The AMG arthos and arthos-inert coronary stent implantation systems. In: Serruys PW, Resing BJ eds, *Handbook of coronary stents*, 2002; London 1-8
- [154]Sheda tecnica stent Tsunami Gold; Terumo Corporation
- [155]Wichterle O., Lim D, Hydrophilic gels in biologic use, *Nature* 185,1980,117
- [156]Hoffman AS, et al., Covalent binding of biomolcules to radiation-graften hydrogels on inert polymer surfaces, *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 18;1972,10-18
- [157]Sefton MV, et al., Making microencapsulation work: conformal coating immobilization gels and in vivo performance. *J Control Release* 65;200,173-186
- [158]Hoffman AS, Hydrogels for biomedical applications, *Adv Drug Delivery Rev* 43;2002,3-12
- [159]Campoccia D. et al., Semisynthetic resorbable materials from hyaluronan esterification, *Biomaterilas* 19;1998, 2101-27
- [160]Ratner B.D., Hoffman A.S., Synthetic hydrogels for biomedical applications, in: J.D. Andrade (Ed.), *Hydrogels for Medical and Related Applications*, American Chemical Society, Washington, DC, 1976; 74.

- [161] Montheard JP. et al., 2-Hydroxyethylmethacrylate (HEMA): chemical properties and applications in biomedical fields, *Rev. Macromol. Chem. Phys.* C32 (1992) 1
- [162] Klomp G.F. et al., Macroporous hydrogel membranes for a hybrid artificial pancreas. II. Biocompatibility, *J. Biomed. Mater. Res.* 17 (1983) 865
- [163] Anderson J.M. et al., The slow release of hydrocortisone sodium succinate from poly(2-hydroxyethyl methacrylate) membranes, in: J.D. Andrade (Ed.), *Hydrogels for Medical and Related Applications*, American Chemical Society, Washington, DC, 1976
- [164] Sato S. et al., Self-regulating insulin delivery systems. II. In vitro studies, *J. Contr. Rel.* 1(1984) 67
- [165] Ratner B.D., Miller I.F., Transport through crosslinked poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogel membranes, *J. Biomed. Mater. Res.* 7 (1973) 353
- [166] <http://www.aerografo.com/>
- [167] Wang H. and Siong Siow K., Measurement of  $\gamma'$  in Epoxy Resins by DSC-Effects of Residual Stress, *Polymer Engineering and Science*, march 1999, vol. 39, n. 3
- [168] Caykara T. et al., Thermal behavior of poly(2-hydroxyethyl methacrylate-maleic acid) networks, *Polym. Degrad. And stab.*, 80, 2003, pp.339-343
- [169] Klugherz BD. et al., Gene delivery from a DNA controlled release stent in porcine coronary arteries, *Nature Biotechnology* 2000; 18: 1181-1184
- [170] Schrier J., DeLuca P.P., Porous bone morphogenetic protein-2 microspheres: polymer binding and in vitro release, *AAPS PharmSciTech* 2001; 2(3) article 17
- [171] Yang S., et al., The design of scaffolds for use in tissue engineering, *Tissue engineering*, volume 7, number 6, 2001, Mary Ann Liebert, Inc
- [172] Haughland R. P., *Molecular Probes: Handbook of Fluorescent Probes and Research Biochemicals*, (1992)
- [173] Bacallo R. et al. (1990). Guiding principles of specimen preservation for confocal fluorescence microscopy. In "Handbook of Biological Confocal Microscopy" (J. Pawley, ed.), pp. 197-205. Plenum, New York
- [174] Bacallo, R., and Garfinkel, A. *Three- Dimensional Confocal Microscopy: Volume Investigation of Biological Systems.* (Stevens, J. K. et al., eds.), pp. 172-4. Academic Press, London. (1994)

- [175] Tsien R.Y., and Waggoner, A. Fluorophores for confocal microscopy: photophysics and photochemistry. In "Handbook of Biological Confocal Microscopy" (J. B. Pawley, ed.) pp. 153-161. Plenum, New York (1990).
- [176] Brazel SC, Peppas NA. Mechanism of solute and drug transport in relaxing, swellable, hydrophilic glassy polymers Polymer 40 (1999) 3383-3398