

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA



FACOLTA' DI INGEGNERIA

**SCAFFOLD E BIOREATTORI PER LA
COSTRUZIONE DI VASI SANGUIGNI
INGEGNERIZZATI**

Relatore: Ch.mo Prof. ANDREA BAGNO

Laureando: Alessandro Zandonà

Corso di laurea triennale in Ingegneria Biomedica

Anno Accademico 2010/2011

Ad Anna e a tutte le persone a me care.

SOMMARIO

Abstract.....p. 9

Capitolo 1. Scaffold per vasi sanguigni ingegnerizzati

1.1. Introduzione.....	p. 10
1.2. Composizione dei vasi sanguigni.....	p. 12
1.3. Tipologie d'impianto.....	p. 15
1.3.1. Impianti di origine biologica.....	p. 15
1.3.2. Impianti di origine sintetica non degradabili.....	p. 16
1.3.3. Impianti di origine sintetica degradabili.....	p. 20
1.3.4. Impianti biosintetici.....	p. 20
1.3.5. TEBVs.....	p. 22
1.4. Applicazioni degli impianti.....	p. 25
1.5. Principio dell'ingegneria tissutale.....	p. 25
1.6. Cenni storici.....	p. 29

Capitolo 2. Tipologie di scaffold

2.1. Introduzione.....	p. 32
2.2 Scaffold biologici.....	p. 33
2.2.1 Scaffold biologici decellularizzati.....	p. 33
2.2.2 Studio sugli scaffold decellularizzati.....	p. 34
2.2.3 Gel naturali di collagene o fibrina (biopolimeri).....	p. 38
2.2.4 Studio sugli scaffold di gel di collagene.....	p. 42
2.2.5 Studio sugli scaffold di gel di fibrina.....	p. 44
2.2.6 Acido ialuronico.....	p. 46
2.2.7 Studio sugli scaffold di acido ialuronico.....	p. 46
2.3 Scaffold sintetici.....	p. 49
2.3.1 Dacron.....	p. 49
2.3.2 Studio sugli scaffold in Dacron.....	p. 53
2.3.3 Teflon ed ePTFE.....	p. 55
2.3.4. Studio sugli scaffold in ePTFE.....	p. 57

2.3.5 Poliuretani.....	p. 58
2.3.6 Studio sugli scaffold in poliuretano.....	p. 59
2.3.7 PGA, PLA e copolimeri.....	p. 61
2.3.8 Studio sugli scaffold in PGA.....	p. 63

Capitolo 3. Bioreattori per vasi sanguigni ingegnerizzati

3.1. Introduzione.....	p. 65
3.2. I bioreattori.....	p. 66
3.2.1. Crescita e sopravvivenza del tessuto nel bioreattore.....	p. 67
3.2.2. Stimoli meccanici nel bioreattore.....	p. 69
3.3. Tipologie di bioreattore.....	p. 70
3.3.1. Bioreattori statici.....	p. 72
3.3.2. Bioreattori dinamici.....	p. 73
3.3.3. Bioreattori biomimetici.....	p. 76
Conclusioni.....	p. 83
Bibliografia.....	p. 85

ABSTRACT

Nell'accezione più generale, l'oggetto di approfondimento di questa tesina è l'approccio dell'ingegneria tessutale allo sviluppo di impianti vascolari composti non più solo da materiali sintetici, ma anche da tessuto biologico. L'obiettivo è quello di riprodurre in vitro vasi sanguigni biocompatibili, che posseggano le caratteristiche ed il potenziale di crescita tipico dei condotti vascolari naturali.

Nello specifico, ci si sofferma su alcuni aspetti della realizzazione di suddetti impianti, che consta di differenti passaggi. In primis si assiste alla preparazione dello scaffold, successivamente avviene la coltura e la semina delle cellule sul supporto ed infine si procede all'impianto nel paziente. Analisi immunohistochimiche permettono poi di valutare il risultato ottenuto.

La tesina si aprirà con una rapida presentazione delle tipologie di impianti vascolari, dei richiami al sistema circolatorio e delle relative problematiche. Si tratterà poi dell'approccio dell'ingegneria tessutale ai vasi sanguigni (TEBVs: tissue-engineered blood vessels), passando per gli step citati in precedenza. In seguito si focalizzerà l'attenzione sui due argomenti cardine: i materiali con cui si realizza lo scaffold ed i bioreattori. Per quanto concerne il primo punto, si esamineranno le proprietà e le tecniche di lavorazione dei materiali, e per ciascuno si riporterà uno studio in cui esso è stato utilizzato come scaffold per un impianto vascolare. La discussione verterà poi sui bioreattori, dei quali si analizzeranno la struttura ed il funzionamento, ed anche in tal caso si propongono esempi delle differenti tipologie di bioreattore.

Nella vastità dell'argomento, che coinvolge molteplici discipline, si scelgono dunque due aspetti che maggiormente riguardano l'ambito dei biomateriali.

CAPITOLO 1

Scaffold per vasi sanguigni ingegnerizzati

1.1 Introduzione

Le protesi vascolari sono dispositivi medici che permettono il recupero della funzionalità di un tratto vascolare, consentendo allo stesso di mantenere un corretto trasporto di sangue. Si possono distinguere innesti con diametro interno superiore o inferiore ai 5 mm, a seconda delle esigenze. Le protesi più diffuse sono quelle a grosso calibro, destinate a sostituire l'aorta e le sue diramazioni: si parla dunque di impianti arteriosi. La maggior diffusione di questi è legata a motivi di carattere fisiologico. Nei graft di grosso calibro, infatti, la pressione e la velocità del flusso ematico sono elevate a tal punto che solo un'esigua quantità di sangue viene a contatto con le pareti del vaso e per un tempo molto breve. Diminuiscono notevolmente in tal caso i fenomeni trombotici, cioè eventi di coagulazione intravascolare che portano all'occlusione dell'orifizio. Questo rappresenta un vantaggio nella fase realizzativa del graft rispetto alle protesi di piccolo calibro, per le quali è necessario invece costruire una superficie interna non trombogena. Inoltre, la pressione presente all'interno delle vene è inferiore a quella delle arterie e questo limita l'insorgere di danni vascolari, determinando una minore frequenza e gravità delle patologie venose rispetto a quelle arteriose: per questo motivo gli impianti arteriosi sono più richiesti.

Le patologie arteriose che si presentano maggiormente sono la stenosi e l'aneurisma.

Un'arteria è stenotica (Figura 1.1) quando si ha un restringimento del lume causato da un coagulo o da una placca aterosclerotica, cioè un accumulo di lipidi, tessuto connettivo, cellule muscolari lisce e glicosamminoglicani.



Figura 1.1- Stenosi dell'arteria carotide interna.

Il condotto perde quindi elasticità, il diametro utile per il passaggio del sangue si riduce o addirittura si occlude e viene compromessa la normale attività del vaso. Il flusso ematico infatti non irrorerà più in maniera adeguata i tessuti a valle, i quali diventano ischemici; se tale situazione persiste si può incorrere nella necrosi dei tessuti stessi.

L'aneurisma (Figura 1.2) invece è un allargamento patologico dell'arteria causato dal cedimento della parete. Le possibili complicazioni sono la rottura del condotto, la compressione di strutture adiacenti e l'insorgenza di trombosi dovuta ad anomale condizioni fluidodinamiche locali.



Figura 1.2- Aneurisma cerebrale.

Per quanto concerne la realizzazione degli innesti a piccolo calibro si presentano problematiche maggiori. Più è stretto il condotto, maggiore è la resistenza esercitata dallo stesso sul flusso sanguigno; si instaurano così situazioni di turbolenza in prossimità delle pareti del vaso con la possibile conseguente aggregazione delle piastrine e trombosi. Si devono perciò adottare accortezze maggiori rispetto agli innesti con diametro superiore ai 5 mm, cioè: la scelta di una superficie interna liscia in modo da ridurre il coefficiente d'attrito ed il mantenimento delle dimensioni e delle proprietà elastico-meccaniche dei condotti originari.

In generale si associano ad un graft vascolare, così come a qualsiasi protesi, due requisiti ideali fondamentali:

- l'impianto deve mantenere la propria funzionalità ed integrità fisica per un tempo superiore all'aspettativa di vita del paziente;
- deve verificarsi una situazione di biocompatibilità, cioè l'impianto della protesi non deve provocare l'insorgenza di reazioni indesiderate.

Esiste una normativa europea specifica per le protesi vascolari e i condotti valvolati (protesi vascolare più valvola), la quale enuncia e definisce i parametri che caratterizzano le proprietà meccaniche e le prestazioni degli impianti. La norma sopra citata è la EN 12006-2 del febbraio 1998 e i parametri considerati sono:

- porosità;
- permeabilità all'acqua;
- resistenza meccanica longitudinale e circonferenziale;
- lunghezza utilizzabile;
- diametro interno a riposo;
- diametro interno in pressione;
- spessore;
- *compliance*.

Durante la progettazione di un TEBV si devono soddisfare tutti i suddetti requisiti, ma uno dei più importanti per la caratterizzazione meccanica della protesi è la *compliance*. Essa è la misura della distensibilità di un'arteria, o elasticità radiale, e si calcola mediante la formula $(\Delta D/DP) \times 100$, dove con D si indica il diametro e P la pressione ematica. Una protesi dunque dev'essere *compliant* e quindi deve cercare di imitare il comportamento meccanico dei vasi naturali. Un interessante approccio al problema è il ricorso agli impianti biorisorbibili, i quali sono solamente un supporto per la ricrescita di tessuto naturale dell'ospite. Si innestano protesi ottenute in laboratorio ma che via via si degradano e vengono sostituite da tessuto autologo, ottenendo così condotti del tutto uguali a quelli originari del paziente, evitando i problemi di compliance e rigetto.

1.2 Composizione dei vasi sanguigni

I vasi sanguigni sono un sistema chiuso di condotti che portano sangue dal cuore ai tessuti e da questi nuovamente al cuore. Il sangue scorre nei vasi principalmente per la spinta che riceve dall'azione di pompa del cuore, ma anche per effetto del rimbalzo elastico delle arterie durante la diastole, della compressione delle vene da parte dei muscoli scheletrici nel lavoro muscolare e della pressione intratoracica negativa nell'inspirazione.

Come noto, ci sono tre tipi di vasi sanguigni: arterie, capillari e vene. È da chiarire subito che tale distinzione è fatta in base alla direzione del flusso ematico rispetto al cuore e non a seconda che il sangue che vi scorre all'interno sia ossigenato o meno. In realtà nel sistema

circolatorio si trovano anche le arteriole e le venule ma si tratta sempre rispettivamente di arterie e vene, che hanno un diametro inferiore alla media.

Il sangue che viene pompato all'esterno del ventricolo cardiaco sinistro percorre dunque l'aorta, si dirama attraverso le varie arterie, raggiunge così le arteriole e da qui passa nei capillari. Una volta avvenuto lo scambio di sostanze in tal sede, il sangue deossigenato viene accolto dalle venule e successivamente percorre le vene per tornare all'atrio destro, al quale accede tramite la vena cava. Il flusso ematico passa così attraverso il ventricolo destro e da qui viene pompato nella vena polmonare, che lo trasporta fino ai polmoni. Indi il sangue ritorna all'atrio sinistro per ricominciare il percorso.

Il diametro medio di un'arteria è di 25-50 mm, quello di una vena di medio calibro va dai 2 ai 9 mm ma si arriva anche ai 25 mm delle vene di grosso calibro, mentre i capillari hanno un diametro che varia dai 5 ai 10 μm .

Sia le arterie che le vene presentano tre strati (Figura 1.3):

- tonaca avventizia, lo strato più esterno composto da tessuto connettivo e fibroblasti;
- tonaca media, lo strato intermedio formato da muscolatura liscia organizzata in fasci concentrici al lume del vaso e fibre elastiche;
- tonaca intima, lo strato interno costituito dall'endotelio e dal sottostante tessuto connettivo.

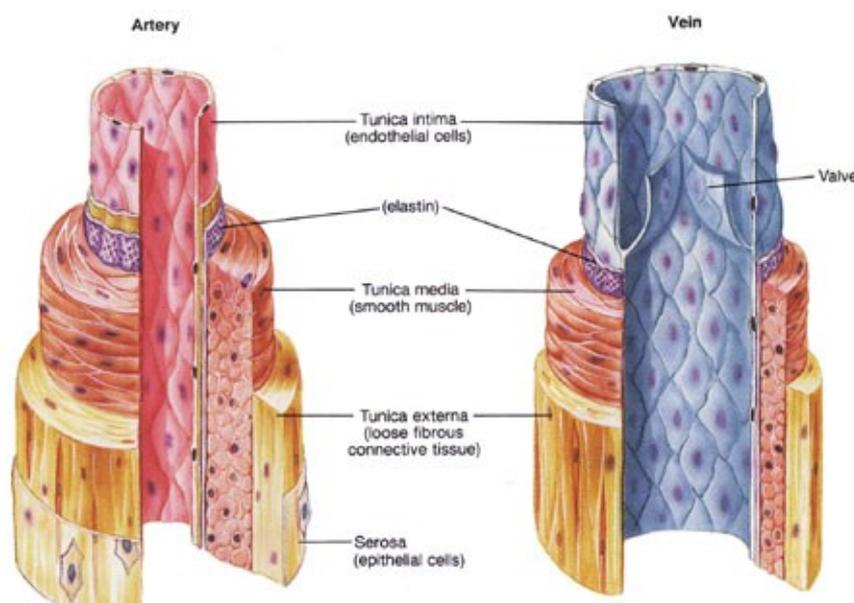


Figura 1.3 – Sezione di un'arteria e di una vena.

Le pareti dell'aorta e delle altre arterie di grande diametro contengono una quantità

relativamente grande di tessuto elastico, raccolto principalmente nelle lamine elastiche interna ed esterna. Esse vengono stirate durante la sistole (vasodilatazione) e si ritraggono durante la diastole (vasocostrizione), comprimendo il sangue. Le arterie sono ubicate principalmente in profondità, vicino alle ossa. Le diramazioni più sottili delle arterie, le arteriole, contengono meno tessuto elastico, ma sono molto più ricche in muscolatura liscia. Esse infatti permettono la regolazione del flusso sanguigno in un organo, irrorando maggiormente le zone che ne hanno più bisogno, ed espletano tale funzione variando il loro stato di contrazione. Per esempio, se un organo durante uno sforzo fisico necessita di più ossigeno, le cellule muscolari delle arteriole che interessano tale organo si rilassano fintanto che il diametro dei vasi aumenti.

Le vene sono meno elastiche delle arterie, contengono meno tessuto muscolare ed hanno i tre strati più sottili, vantando dunque un lume più grande, così che si rende minima la resistenza al flusso sanguigno; inoltre esso è più lento e la pressione esercitata è minore. Sono presenti poi nei condotti venosi delle valvole dette “a coda di rondine”, assenti nelle arterie, che impediscono che il sangue fluisca nella direzione errata.

Infine i capillari, che mettono in comunicazione arterie e vene, sono i condotti più sottili presenti nel sistema circolatorio e sono composti solamente da uno strato endoteliale; in questo modo rendono possibile lo scambio di sostanze nutritive, CO₂, ossigeno, ormoni e prodotti di rifiuto tra il sangue ed i tessuti adiacenti.

In tutte e tre le tipologie di vaso lo strato endoteliale riveste molteplici ruoli. Esso infatti è una barriera selettivamente permeabile e trombo-resistente e permette il controllo del tono vascolare, dell'attivazione, adesione ed aggregazione delle piastrine, dell'adesione dei leucociti e della migrazione e proliferazione delle cellule della muscolatura liscia.

Le cellule endoteliali sono sensibili ai cambiamenti nella pressione sanguigna, nella pressione parziale di ossigeno e nel flusso ematico in generale; tale abilità nel percepire e nell'adattarsi alle variazioni dell'ambiente circostante, consente allo strato endoteliale di cambiare le proprie funzioni in base alle diverse esigenze.

Si trovano poi nei condotti vascolari le cellule della muscolatura liscia, denominate anche SMCs (*smooth muscle cells*), le quali ricoprono un compito importante per l'omeostasi dei vasi sanguigni. Infatti nell'eventualità di un danno ad un'arteria, tali cellule guidano la formazione di neointima, cioè dello strato più interno del condotto grazie alla migrazione e proliferazione di cellule dallo strato intermedio. Oltre a tale capacità, il tessuto muscolare secerne fibre e lamelle elastiche, fibre di collagene e proteoglicani, permettendo al vaso di mantenere elasticità e compliance radiale.

1.3 Tipologie di impianto

Nel paragrafo precedente si sono classificati gli impianti in base al loro diametro interno, ma un'ulteriore distinzione può esser fatta considerando le proprietà chimico-fisiche. Qui di seguito è esposta una generica classificazione:

- impianti vascolari di origine biologica
 - trattati chimicamente
 - non trattati chimicamente
- impianti vascolari di origine sintetica
 - biorisorbibile
 - non biorisorbibile
- impianti biosintetici
- tissue-engineered blood vessels (TEBVs)

1.3.1 Impianti di origine biologica

La prima tipologia consiste in segmenti vascolari prelevati dal paziente stesso o da un altro soggetto umano e conservati a bassa temperatura, circa 4° C (non trattati chimicamente oppure trattati con la glutaraldeide, che fissa molto bene le strutture proteiche). Negli impianti biologici rientrano anche i vasi provenienti dal paziente senza il processo di devitalizzazione, ma in tal caso non ha senso parlare di protesi. Ricapitolando quindi si distinguono le protesi realizzate con tessuto umano dello stesso ricevente (autograft), di un altro soggetto umano (omograft) o di un organismo di un'altra specie (eterograft). Numerose sono le tipologie provate e tra di esse si ricordano:

- arterie crio-preserved di cadavere umano;
- carotidi bovine modificate chimicamente;
- vene ombelicali umane, fissate;
- vasi fibrosi fabbricati su di un mandrino rotante.

Come esempio di impianto autologo si prende la vena safena, che consiste in uno dei due più grossi condotti venosi degli arti inferiori assieme alla vena femorale ed ha un diametro in genere compreso tra i 4 ed i 6 mm. L'indubbio vantaggio dell'utilizzo di questo vaso è che non evoca alcuna reazione di rigetto e possiede caratteristiche meccaniche paragonabili alle arterie da sostituire. Si è però registrata una percentuale di fallimento del 25-40% e nel 20-30% dei pazienti la vena safena non risulta disponibile al prelievo.

Si sono sperimentati anche innesti di vena safena omologa (omograft), ma non si sono raccolti risultati incoraggianti in quanto si osserva una variabilità ed imprevedibilità nelle caratteristiche fisiche e meccaniche. Inoltre sono frequenti i fenomeni di rigetto e di deterioramento, e si suppone che la pervietà del condotto rimanga inalterata solo per vasi di diametro superiore ai 5 mm. Per queste ragioni, già nel 1960 gli omograft vengono abbandonati, anche se poi sono stati reintrodotti per gestire, ad esempio, l'infezione negli impianti protesici aortici (Kieffer *et al.* 2004). Analoghe considerazioni valgono per le arterie autologhe o omologhe.

Fino ad ora si è parlato di impianti biologici che come unico trattamento subiscono la crioconservazione, ma si utilizzano anche segmenti vascolari trattati chimicamente. Si prelevano dunque vasi sanguigni umani o animali (bovini), i quali subiscono la “fissazione” con glutaraldeide; essa comporta la reticolazione chimica del collagene, generando legami chimici (cross-links) tra le catene dello stesso, e ne consentono la stabilizzazione. La glutaraldeide elimina l'antigenicità dei tessuti naturali ed aumenta la resistenza a trazione, ma anche la fragilità, ed ha effetto citotossico. I vasi che sono maggiormente usati in per ottenere questa tipologia di impianti sono la vena ombelicale umana (HUV), le arterie carotidi di vitello e le arterie mammarie bovine interne.

In questi ultimi due casi, ma in generale nell'eventualità in cui non si utilizzino innesti autologhi, si possono riscontrare fenomeni di rigetto, rendendosi così necessario il ricorso a terapie immunosoppressive. Esse, oltre che costose, devono essere somministrate per periodi prolungati e sono causa di assuefazione, di intolleranza e anche di tumori. Si devono inoltre eseguire sempre controlli su tali protesi, poiché potrebbero esser portatrici di infezioni virali quali l'HIV, l'epatite ed altro. Si è dunque soliti utilizzare preferibilmente arterie e vene autologhe, provenienti cioè dal paziente medesimo. In più del 10% dei casi però queste non sono disponibili a causa di traumi, interventi chirurgici precedenti o problemi di varia natura; ecco un motivo per cui sono stati introdotti gli innesti di origine sintetica.

1.3.2 Impianti di origine sintetica non degradabili

La seconda delle tipologie comprende le protesi vascolari ottenute con materiali non biologici, tra i quali si possono annoverare Vinyon N, Nylon, Orlon, Dacron ed Teflon. Inizialmente si proposero degli impianti che rimanevano in sede fino a quando non venivano rimossi chirurgicamente per usura o complicazioni varie; più recenti sono invece le protesi biorassorbibili, le quali fungono da guida per la totale ricostituzione delle pareti vascolari

ed in seguito si riassorbono lasciando in situ un vaso uguale a quello originario dal punto di vista meccanico, morfologico e funzionale. Tale approccio presenta vantaggi sia rispetto a quello degli impianti biologici, sia rispetto a quello degli impianti sintetici non biorassorbibili. Non si rende infatti più necessario l'utilizzo di vasi autologhi, evitando quindi interventi chirurgici per l'asportazione, e si limita il contatto del paziente con materiali estranei, in quanto a lungo termine la protesi sarà riassorbita.

Circa i materiali sintetici, due sono i polimeri non degradabili che per oltre 50 anni sono stati utilizzati: il polietilene tereftalato (PET, Terylene o Dacron) ed il politetrafluoroetilene (PTFE, Teflon o Gore-Tex), del quale è utilizzata anche la forma espansa (ePTFE). Si ricorda anche il Vinyon-N, utilizzato da Blakemore e Voorhes nel 1954 per un innesto arterioso impiantato in 10 pazienti. Nonostante inizialmente sembrasse una soluzione promettente, si è poi notata la mancanza di biostabilità a lungo termine.

Un altro materiale è il Nylon, che presenta una grande facilità ad instaurare legami ad idrogeno intercatena; si ricorda che tale legame è un caso particolare di interazione dipolo-dipolo, che si instaura tra molecole contenenti idrogeno legato covalentemente ad atomi più elettronegativi, quali fluoro, ossigeno ed azoto. Il legame a ponte di idrogeno assume particolare importanza nel campo biologico ed in diversi processi biochimici. Infatti per esempio esso permette di determinare la struttura delle proteine, consente alle catene del DNA di rimanere unite grazie all'interazione che si crea tra le basi azotate, si forma tra le molecole d'acqua conferendo alla stessa proprietà peculiari quali la coesione, un'elevata tensione superficiale e limita la tendenza del fluido ad evaporare. Come detto, il Nylon forma facilmente legami a ponte di idrogeno: sussiste quindi un problema non di poco conto dal momento che il Nylon può assorbire notevoli quantità d'acqua e giungere perciò ad una idrolisi degradativa.

Infine si ricordano i poliuretani ed i siliconi.

PET e PTFE sono biomateriali polimerici deformabili, idrofobici e resistenti grazie all'alto grado di cristallinità. Il PET (Figura 1.4) è un poliestere a basso peso molecolare ottenuto per condensazione tra un acido bicarbossilico (acido tereftalico) e un alcol bifunzionale (glicole etilenico), che fu introdotto in Inghilterra nel 1939. Per la prima volta nel 1950 fu trasformato per filatura in fibre dalla DuPont, prendendo il nome commerciale di Dacron o Terylene. Si trova in commercio anche un film dello stesso polimero resistente alla lacerazione chiamato Mylar. Le protesi realizzate con questo poliestere sono usate prevalentemente per i condotti di medio o largo calibro (dagli 8 mm in su) e per il 90% degli impianti si registrano successi a lungo termine.

La tessitura delle fibre del polimero può essere di tipologie differenti: *woven* (tessuto intrecciato regolare) e *knitted* (tessuto lavorato a maglia), che a sua volta si divide in *weft* e *warp*. La tessitura *woven* implica che le fibre siano perpendicolari tra loro, mentre quella *knitted* prevede che le fibre non siano tese ma abbiano continue curvature.

Durante la produzione del Dacron, le fibre sono pure allungate in direzione longitudinale ed inoltre la protesi subisce diversi tipi di corrugamento, in modo tale da migliorarne flessibilità, elasticità e resistenza.

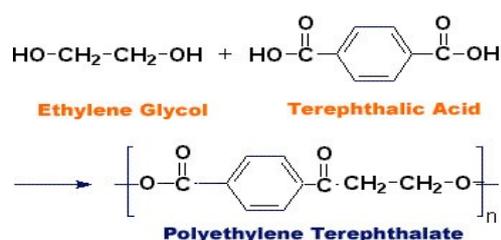


Figura 1.4 - Formula chimica del polietilene tereftalato (PET).

Il PTFE invece è un polimero fluorurato non degradabile, a base di carbonio e ovviamente di fluoro, brevettato nel 1937 dalla DuPont come Teflon, mentre il correlato ePTFE fu brevettato nel 1969 dalla Gore come Gore-Tex. Il suo monomero è composto da un'unità etilenica, in cui al posto dei quattro atomi di idrogeno si trovano atomi di fluoro (Figura 1.5). Una proprietà interessante di questo biomateriale è la capacità di divenire microporoso in seguito ad un'espansione su scala microscopica. Si ricorda che la porosità è uno dei requisiti principali di un graft, in quanto è fondamentale per un'adeguata integrazione tissutale. Inoltre le protesi fabbricate in PTFE possiedono una superficie luminale elettronegativa, che minimizza le interazioni con i componenti del flusso ematico. Di norma si usufruisce di tale polimero, ma più frequentemente della sua forma espansa, per sostituire vasi di medio calibro (fino a 6-7 mm). Anche per il PTFE ci sono le tipologie di tessitura viste per il Dacron.

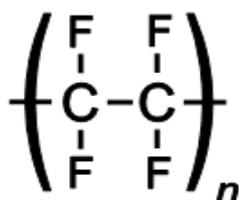


Figura 1.5 - Formula chimica del politetrafluoroetilene (PTFE).

Più recenti infine i poliuretani ed i siliconi. I primi sono copolimeri a blocchi, risultanti dalla reazione tra alcoli ed isocianati bifunzionali (Figura 1.6). Spesso in un poliuretano si distingue una fase morbida, detta *soft segment*, ed una più rigida, definita *hard segment*. A seconda dei reagenti selezionati per la loro sintesi, si ottengono materiali con differenti proprietà; si possono ottenere PU rigidi, flessibili, adesivi, schiumosi, etc. Essi sono molto versatili nella lavorazione e pure molto resistenti a flessione ed abrasione e sono perciò utilizzati anche per impianti di piccolo calibro. I riscontri negativi si ritrovano a lungo termine, quando si va incontro ad un fenomeno di degradazione biologica denominata ESC (*environmental stress cracking*), cioè la comparsa di microfratture superficiali. Si suppone oltretutto che in seguito alla degradazione il materiale rilasci ammine aromatiche potenzialmente cancerogene.

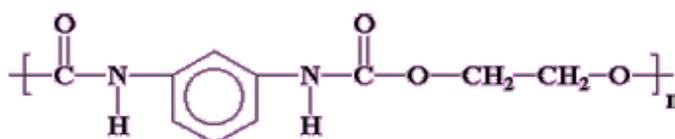


Figura 1.6 – Esempio di poliuretano (PU).

I secondi poi sono polimeri inorganici detti anche polisilossilani e sono composti da una catena silicio-ossigeno e gruppi funzionali organici legati agli atomi di silicio. Aggiungendo un particolare catalizzatore o agente di vulcanizzazione si possono ottenere gomme siliconiche a partire dal silicone; esse sono composte da catene lineari a basso peso molecolare di polidimetilsilossano (Figura 1.7).

In generale i siliconi sono biostabili, resistono cioè all'azione di modifica da parte dell'ambiente biologico, sono emocompatibili ma meccanicamente deboli. Le gomme inoltre risultano essere elastiche e resistenti alle alte temperature.

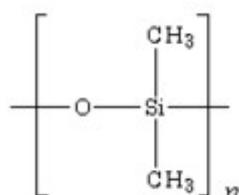


Figura 1.7 - Formula chimica del polidimetilsilossano (PDMS)

1.3.3 Impianti di origine sintetica degradabili

I polimeri biodegradabili maggiormente diffusi sono i derivati dell'acido poliglicolico (PGA) e dell'acido polilattico (PLA), risultati della polimerizzazione rispettivamente dell'acido glicolico e dell'acido lattico. Molto comuni sono anche i copolimeri del PGA (Figura 1.8) e del PLA (Figura 1.9) o i composti di essi con altri polimeri. Essi sono a loro volta utilizzati unitamente a strati di cellule, le quali secernono i componenti della matrice extra-cellulare e consentono dunque di ottenere un condotto vascolare funzionale e del tutto biologico una volta che il polimero è scomparso. La velocità di biodegradazione può essere controllato attraverso la tipologia di polimero che si associa al PGA, al PLA o ad un loro copolimero. Ne esistono molte varietà, ma si ricordano l'acido poli-L-lattico (PLLA), il poliidrossialcanoato (PHA), l'acido policaprolattone-copolilattico ed il glicole polietilenico.

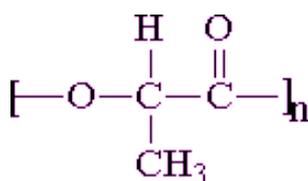


Figura 1.8 - Formula chimica dell'acido polilattico (PLA).

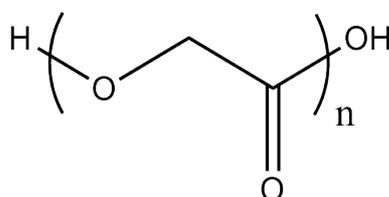


Figura 1.9 - Formula chimica dell'acido poliglicolico (PGA).

I polimeri biodegradabili possono anche essere usati per rilasciare nel tempo fattori di crescita atti a promuovere la rigenerazione e lo sviluppo della parete del condotto vascolare.

1.3.4 Impianti biosintetici

Vengono definiti impianti vascolari “biosintetici” o “bioibridi” invece quelli che sono formati a partire da componenti biologici impiantati su una struttura sintetica che però non si riassorbe. La tecnica più diffusa è quella che usufruisce di cellule endoteliali seminate sullo scaffold sintetico prima dell'impianto, in quanto l'endotelio risulta essere il miglior materiale antitrombogenico. Basti pensare che nei vasi naturali esso è infatti componente fondamentale dello strato più interno, la tonaca intima. Negli anni Ottanta si effettuarono i

primi trials clinici su questa tipologia di innesto: vennero prelevate cellule endoteliali autologhe provenienti da segmenti venosi sottocutanei (vena safena, cefalica o giugulare) e successivamente esse furono seminate all'interno del lume della protesi realizzata in Dacron, prima dell'impianto della stessa nel paziente (Herring *et al.* 1984). Tale operazione venne eseguita su una popolazione di non fumatori e si parla di metodo di semina cellulare single-stage, in quanto le ECs (*endothelial cells*) una volta raccolte sono poste direttamente sullo scaffold. I risultati ottenuti dal suddetto esperimento misero in evidenza la problematica relativa all'insufficiente densità di cellule che si formava sul supporto (Bordenave *et al.* 1999).

Un'alternativa fu dunque il metodo *double-stage*, secondo il quale le cellule raccolte dall'endotelio non sono direttamente seminate sullo scaffold, bensì rimangono per un certo periodo (2-4 settimane) in incubazione per permettere loro la moltiplicazione. Nonostante questa procedura necessiti di tempi superiori, ha però il vantaggio di consentire trattamenti in vitro prima dell'impianto; infatti lo strato endoteliale è sottoposto a sollecitazioni meccaniche quali la pressione idrostatica derivante da quella sanguigna, sollecitazioni tangenziali che in vivo saranno prodotte dalla frizione tangenziale del flusso ematico contro le pareti del vaso, lo stiramento ciclico longitudinale e circonferenziale dovuto alla distensione del condotto a causa del ciclo cardiaco.

Per migliorare la tecnica dell'endotelializzazione *double-stage* si stanno ricercando fonti cellulari alternative e metodologie per la ritenzione delle cellule stesse. In effetti le cellule dei vasi sanguigni sono ancoraggio dipendenti, necessitano perciò di essere adese ad un substrato per sopravvivere o mantenere le loro funzioni vitali. In tale adesione rivestono un ruolo fondamentale le CAM (*cellular adhesion molecules*), tra le quali si ricordano le integrine, le caderine e le selectine, e le proteine che ad esse si legano. Le cellule dunque sono connesse tra loro e alla lamina basale grazie ai legami che si instaurano tra CAM e certe proteine della membrana extracellulare, quali il collagene, la fibronectina, la vitronectina e la laminina. In questo modo sussiste un collegamento tra citoscheletro interno alla cellula ed ECM esterna ad essa. Si è pensato così di rivestire i biomateriali con le suddette proteine che si legano con le CAM, favorendo così l'adesione cellulare.

Un'ulteriore strategia indagata è quella che prevede l'uso di cellule progenitrici, le quali si possono differenziare in diversi tipi cellulari a seconda dell'ambiente in cui si trovano. Un esperimento venne condotto sui cani, nei quali si impiantarono in posizione aortica condotti di ePTFE contenenti cellule del midollo osseo. I risultati mostrarono un completo sviluppo dello strato endoteliale e mancanza di occlusione (*patency*) dopo sei mesi (Noishiki *et al.*

1996). Si provò poi ad agire in modo simile prelevando cellule progenitrici endoteliali (EPC) dal sangue periferico (Asahara *et al.* 1997); esse sono sempre cellule circolanti di derivazione dal midollo osseo dell'adulto, in grado di differenziarsi in cellule endoteliali mature e formare strutture vascolari tubulari. Tale approccio si rivela molto promettente in quanto si è osservata un'accelerazione dell'endotelializzazione sul supporto sintetico senza alcun fenomeno trombotico quando si utilizzano le cellule derivate dal midollo osseo.

1.3.5 TEBVs

I TEBVs sono il passo più innovativo nella ricerca di impianti che siano più simili possibile ai vasi sanguigni nativi. Nella loro progettazione, si ricorre principalmente a tre componenti: uno scaffold per costituire la struttura del condotto e conferire ad esso una certa consistenza, una matrice adesiva e cellule vascolari. In genere per la scelta degli scaffold ci sono quattro approcci: supporti sintetici permanenti, tessuti naturali decellularizzati, scaffold biodegradabili e la cosiddetta tecnologia “non-scaffold”.

Sui supporti si seminano uno strato endoteliale e cellule muscolari metabolicamente attive, coadiuvate da collagene ed elastina. Nel caso ideale lo scaffold dovrebbe essere biodegradabile in modo tale da lasciare sul posto un condotto simile, se non identico, a quello nativo che viene sostituito.

La prima tipologia di scaffold sopra citata, cioè quella dei supporti sintetici permanenti, fu sperimentata da Weinberg e Bell nel 1986. Si seminarono cellule del muscolo liscio, endoteliali e fibroblasti di bovino su delle strutture tubulari di gel di collagene. I fibroblasti infatti, interagendo con le fibrille di collagene, si contraggono e compattano la matrice di gel, aumentandone così la densità. Il tutto dovette però essere rinforzato da una maglia di Dacron posta all'esterno in modo da supplire alla altrimenti scarsa resistenza meccanica.

Il secondo approccio prevede invece l'utilizzo di scaffold costituiti da tessuti decellularizzati. Non si parla ovviamente di tessuti autologhi, bensì di omograft o di eterograft. In questi casi infatti l'idea principale è che, una volta privato il tessuto delle sue cellule, questo perda il proprio potere antigenico così da poter essere innestato nell'ospite senza scatenare reazioni immunitarie. Esempi di tali scaffold si ritrovano con Lantz nel 1993, che utilizzò la piccola submucosa intestinale come impianto vascolare, o con Bader nel 2000, il quale seminò cellule umane su un'aorta porcina decellularizzata.

Il terzo tipo di supporto, quello biodegradabile, può essere composto da acido poliglicolico, acido polilattico o loro copolimeri. Sotto determinate condizioni di stress furono seminate cellule muscolari seguite da cellule endoteliali ed il graft ottenuto fu impiantato in alcuni

maiali (Niklason et al. 1999). Si intraprese inoltre un simile approccio, in cui però si ricorse alle cellule del midollo osseo (*bone-marrow cells* o BMCs); la protesi così ottenuta fu innestata al posto della vena cava inferiore di un cane e le analisi successive mostrarono come tali cellule fossero state in grado di differenziarsi in cellule muscolari ed endoteliali (Matsumura et al. 2003).

Infine il primo esperimento che adottò la tecnologia “non scaffold” si propose di coltivare fibroblasti e strati di cellule della muscolatura liscia su di un mandrino di PTFE, in seguito rimosso, e di seminare successivamente all'interno del lume dell'innesto le cellule endoteliali. Un altro impianto realizzato con questa tecnologia utilizzò un tubo composto da silicone e plastica che venne inserito nella cavità peritoneale di topi e conigli. Si osservò che dopo 2 settimane l'innesto si era ricoperto in modo spontaneo di miofibroblasti, matrice di collagene ed uno strato di endotelio. La tecnica fin qui descritta prende infatti anche il nome di approccio “*self assembly*”.

Tabella 1.1 – Impianti biologici nell'uso clinico.

Impianti biologici				
	Autografts		Omografts	Eterografts
	Arteriosi	Venosi	Arteriosi	Venosi
<i>Vantaggi</i>	Funzione eccellente, più approssimazione, meno mismatch nel diametro	Duraturi e versatili, resistenza a infezione, relativa disponibilità	Grande disponibilità, più resistenza alle infezioni	
<i>Svantaggi</i>	Disponibilità, vasospasmo, morbilità sito donatore	Disponibilità, difficile prelievo, danno al graft venoso	Antigenicità, deterioramento graft, rigetto cronico, occlusione precoce, rischio di infezione	
<i>Evoluzion e</i>	Ispessimento intima, iperplasia miointimale	Sfaldamento endotelio, dilatazione venosa, ispessimento parete, arterializzazione	Perdita endotelio, risposta immunitaria fibrotizzazione	

Tabella 1.2 – Impianti sintetici nell'uso clinico.

1.3 Tipologie di impianto

Impianti sintetici					
	PET		ePTFE		Poliuretani
	Woven	Knitted	Bassa porosità	Alta porosità	
<i>Vantaggi</i>	Più stabilità, meno permeabilità, meno emorragia	Più porosità, crescita tessuto, distensibilità radiale	Biostabilità, no dilatazione eccessiva	Biostabilità, migliore crescita cellulare	Compliance, buona emo e biocompatibilità, meno trombogenicità
<i>Svantaggi</i>	Compliance ed integrazione del tessuto ridotta, bassa porosità, rischio infezioni	Dilatazione eccessiva, rischio di infezione	Integrazione limitata, rischio infezione, formazione di stroma	Tardo degrado neointima, rischio di infezione	Biodegradazione nella prima generazione, rischio infezione, carcinogenico?
<i>Evoluzione</i>	Capsula interna di fibrina, capsula esterna di collagene, scarso endotelio	Fibrina dentro il lume, scarso endotelio	Fibrina e strato piastrine dentro il lume, capsula di tessuto connettivo con macrofagi, no crescita endotelio intraparietale	Macrofagi e invasione polimorfonucleare, migrazione dei fibroblasti, sprouting capillare, angiogenesi e neointima più spessa	Sottile strato interno di fibrina, fuori macrofagi, crescita limitata (PU fibrillari), migliore crescita con pori più grandi (PU schiumosi)

Tabella 1.3 – Impianti biosintetici e TEBVs nell'uso clinico e sperimentale.

	Impianti biosintetici	TEBVs
<i>Vantaggi</i>	Antitrombogenici, miglior pervietà	Reattività, non trombogenicità. crescita, autoriparazione, metabolicamente attivi, potenzialmente convenienti economicamente
<i>Svantaggi</i>	Problema di ottenere molte cellule, rischio di contaminazione della coltura cellulare, non per usi di emergenza	Fabbricazione impegnativa, sconvenienti dal punto di vista del tempo e dei costi, laboratorio con bioreattori cellulari, solo centri specializzati
<i>Evoluzione</i>	Autorinnovamento di endotelio funzionale	Integrazione completa

1.4 Applicazione degli impianti

Un'applicazione molto frequente degli impianti biologici è il bypass aorto coronarico (Figura 1.10), intervento necessario nel caso di stenosi di una o più coronarie.

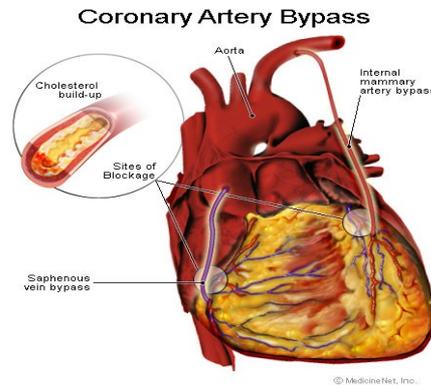


Figura 1.10- Bypass aortocoronarico.

Questo comporta il mancato afflusso di sangue ossigenato al cuore e dunque l'insorgenza di infarti. Si preleva la vena safena autologa, cioè la vena dalla gamba dello stesso ricevente, e la si utilizza collegando una sua estremità a monte dell'occlusione e l'altra a valle. In questo modo il sangue può eludere l'ostacolo e fluire normalmente. In certe situazioni sarebbero richieste anche arterie autologhe, ma non risultano prelevabili senza gravi conseguenze. Eccezioni sono rappresentate dalla mammaria interna, situata sul lato posteriore del torace e che decorre a margine dello sterno, dall'arteria gastrica destra, da quella intercostale e da quella radiale, che genera nell'avambraccio e segue il percorso del radio. Si presenta infine anche l'uso di segmenti arteriosi omologhi prelevati da cadaveri e crioconservati; si tratta della prima tecnica che venne utilizzata nella chirurgia vascolare. L'applicazione dei graft sintetici nacque invece per l'esigenza di contrastare la rottura degli aneurismi dell'aorta addominale e si diffuse anche come alternativa agli innesti biologici in quanto l'invecchiamento di questi ultimi è relativamente rapido.

1.5 Principio dell'ingegneria tessutale

L'ingegneria tessutale ("Tissue Engineering", termine coniato dalla fondazione Washington National Science nel meeting del 1987) è stata definita nel 1988 come "una tecnica interdisciplinare che applica i principi e i metodi dell'ingegneria e delle scienze biologiche con l'obiettivo di comprendere le relazioni fondamentali tra struttura e funzione nei tessuti sani e malati dei mammiferi e di sviluppare sostituti biologici in grado di ripristinare,

mantenere o migliorarne le funzioni ” (Fox e Skalak). Le differenti discipline che collaborano per tale fine spaziano dalla scienza dei materiali alla biologia cellulare, dalla bioingegneria alla chirurgia.

La biologia si occupa di selezionare le cellule da coltivare e segue l'evoluzione di quelle impiantate; la chirurgia definisce i parametri da rispettare per poter ottenere un prodotto che sia clinicamente utilizzabile, ossia finalizzato a determinate patologie e impiantabile. La scienza dei materiali si propone di realizzare i supporti, indaga le interazioni degli stessi con le cellule e studia l'evoluzione di questi nel tempo. La bioingegneria coordina le differenti discipline, ne valuta i risultati e nello specifico realizza lo scaffold per le cellule, implementa algoritmi per monitorare e giudicare la crescita di tessuto sul supporto.

Il connubio tra le varie discipline ha permesso di apportare una notevole innovazione nella consueta pratica medica; infatti, a differenza di ciò che accadeva in precedenza, l'ingegneria tessutale si pone l'obiettivo di progettare tessuti che possano integrarsi totalmente con quelli del paziente e che stimolino la rigenerazione naturale degli organi e/o dei tessuti stessi, senza il bisogno di ricorrere a trattamenti farmacologici. La strategia adottata dall'ingegneria tessutale per perseguire i propri obiettivi si basa su una procedura automatizzata e multi-fasica. Come già anticipato nell'introduzione, infatti, la costruzione di un impianto vascolare segue passi ben precisi ed eventuali variazioni nei singoli step permettono di giungere ad innesti di differente tipologia. Intuitivamente, per esempio, la realizzazione di una protesi sintetica biodegradabile e quella di una non biodegradabile prevede in entrambi i casi la preparazione di uno scaffold, ma si useranno due diversi materiali sottoposti a due diversi trattamenti.

L'idea di fondo però rimane sempre la medesima qualsiasi sia l'innesto che si voglia realizzare: si isolano da una sorgente le cellule (e/o i loro prodotti) e le si espandono in vitro, successivamente si seminano su un supporto 2D o 3D con determinate geometrie e composizioni chimiche, ed infine si pone quanto ottenuto in un bioreattore dove il futuro innesto viene trattato e sottoposto a stimoli fisici e condizioni sperimentali riproducibili e monitorabili.

Di seguito si illustra la metodologia assunta dall'ingegneria tessutale nell'approccio alla realizzazione di protesi vascolari (Figura 1.11). In linea di principio, si prepara un supporto con geometria e caratteristiche chimico-fisiche dipendenti dalla tipologia di innesto che si desidera ottenere. Particolare importanza dev'essere attribuita in questa fase all'analisi superficiale, cioè allo studio dei fenomeni di interazione che sussistono all'interfaccia tra materiale e sistema biologico. Le caratteristiche della superficie dell'impianto influiscono

fortemente sul processo di integrazione dello stesso con l'ospite. Quando il graft viene innestato, la disposizione degli atomi e delle molecole dello strato superficiale subisce delle variazioni in base agli stimoli ricevuti dal sistema esterno.

Si procede poi con la raccolta di cellule, le quali vengono coltivate in modo da farle proliferare ed ottenerne un numero sufficiente per la semina su supporto. Varia può essere la provenienza e la tipologia delle cellule usate, ma si è notato come l'utilizzo di cellule staminali dia la possibilità di ottenere ogni tipo di tessuto in vitro. Esse sono in grado di differenziarsi generando cellule specializzate, e sono le caratteristiche dello scaffold che ne influenzano il differenziamento e lo sviluppo. In questa fase ci sono molteplici studi correlati all'interazione cellula-materiale; un buono scaffold infatti deve essere riconosciuto dalle cellule e solo in seguito può esserci l'adesione tra esse ed il substrato.

Come già visto in precedenza, nel meccanismo di adesione cellulare le proteine di membrana dette integrine rivestono un ruolo fondamentale; nel momento in cui la cellula infatti entra in contatto con un substrato, avviene uno scambio di segnali chimici tra l'esterno ed il citoscheletro. Le integrine sono i mediatori tra l'ambiente extracellulare e quello interno e permettono il passaggio dei segnali: essi determinano una riorganizzazione dei filamenti proteici citoscheletrici e quindi un cambiamento morfologico della cellula per adattarsi al supporto. Per consentire la realizzazione di tale processo in vitro, si ricorre perciò a dei fattori di adesione, in modo che si possa ottenere appunto l'adesione cellula-materiale ma anche quella cellula-cellula (Figura 1.12).

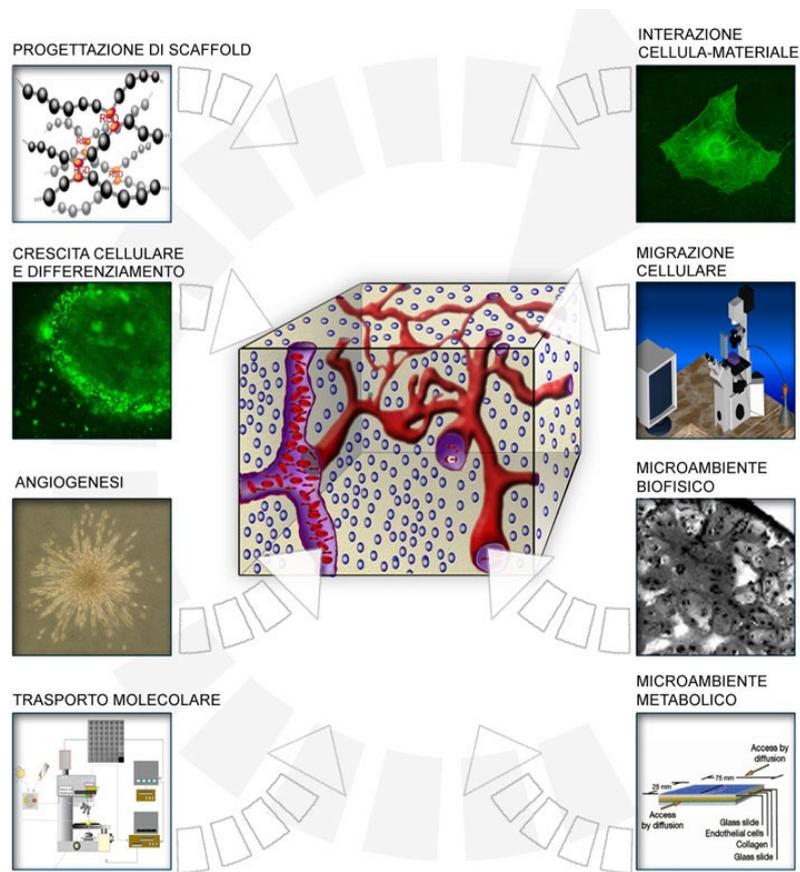


Figura 1.11 – Procedura ingegneria tissutale.

In seguito all'innesto, però, si vorrebbe assistere anche alla migrazione cellulare verso l'impianto, cioè alla completa integrazione dello stesso con i tessuti circostanti. Il graft deve quindi essere in grado di “guidare” le cellule verso uno specifico sito, in modo da regolare la rigenerazione tissutale. Per arrivare a questo punto si devono ricreare le condizioni microambientali che la protesi ritroverà in vivo e questo si raggiunge attraverso l'utilizzo di bioreattori. Si può così studiare come il tessuto evolva e quali siano le sue caratteristiche chimico-fisiche in tale ambiente.

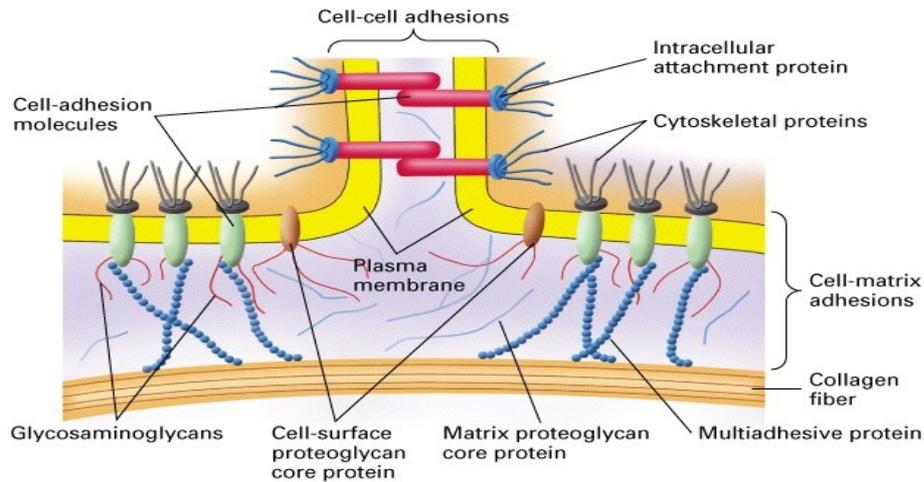


Figura 1.12 – Esempio di molecole coinvolte nella adesione cellula-cellula e cellula-substrato.

Dal momento che i tessuti ingegnerizzati devono emulare in tutto i tessuti naturali, anch'essi necessitano di un costante apporto di ossigeno e sostanze nutritive; in vivo è il sistema vascolare che provvede a ciò, ma in vitro è necessario elaborare degli espedienti alternativi. Due sono le tecniche per ovviare al problema: si riproduce l'angiogenesi (formazione di nuovi vasi sanguigni) in vitro così da ottenere un impianto già vascularizzato prima dell'innesto, oppure si realizza un graft bioattivato da opportuni mediatori angiogenici che permettono di indurre in situ una invasione della rete vascolare del paziente.

1.6 Cenni storici

Il primo approccio alla problematica di sostituire un tratto vascolare danneggiato risale 1906, quando per la prima volta si assistette all'utilizzo di un autograft venoso come sostituto di un tratto arterioso. Fu José Goyanes (1876-1964) che, in occasione di un aneurisma popliteale (parte posteriore del ginocchio), rimosse la parte danneggiata dell'arteria e collegò le estremità recise della stessa mediante un tratto di vena poplitea autologa. Il paziente in seguito all'operazione presentò un'infezione, ma ciò si deve probabilmente all'iniezione di gelatina nella cavità poplitea eseguita prima dell'operazione per eliminare l'aneurisma, piuttosto che all'impianto del graft. Il soggetto fu in ogni caso ricoverato e non si rilevarono problemi alla circolazione sanguigna.

Nel 1915 Bertram M. Bernheim (1880-1957) fornì un ulteriore approccio alla riparazione dell'aneurisma popliteo. Il paziente in questo caso dovette subire l'asportazione di circa 15 cm di arteria poplitea, sostituita da 12 cm di vena safena, a differenza di quanto realizzato invece da Goyanes. Altre casistiche si susseguirono, ma notevole importanza ebbero i due

precedenti casi, in quanto fu da qui che si fece strada l'idea di poter ricostruire un tessuto danneggiato; sarà questo il concetto basilare da qui partirà l'ingegneria tessutale. Tra gli studi che sono seguiti nel tempo si ricordi quello di Kunlin, il quale realizzò nel 1948 un bypass femoro-popliteo con un impianto costituito dalla vena safena invertita, gettando le basi per una pratica che risulta essere tutt'oggi affermata. Sempre in quell'anno iniziarono a diffondersi i primi impianti arteriosi costituiti da tessuto estraneo ma proveniente da soggetti della stessa specie (Gross et al. 1948).

Nel 1952 si assistette invece all'introduzione di un impianto vascolare artificiale, realizzato da Voorhees; la protesi era un tubo di Vinyon 'N', che trovò applicazione come sostituto aortico in un esperimento su cane. Due anni dopo Blakemore e lo stesso Voorhees impiantarono tale innesto su 10 pazienti umani per sostituire un tratto di aorta addominale colpita da aneurisma. Inizialmente si osservarono risultati promettenti, ma le analisi a lungo termine posero in evidenza problematiche legate alla biostabilità e alla crescita di tessuto sulla protesi stessa. Ciononostante il contributo di Blakemore e Voorhees costituì un passo importante per il rapido progresso della chirurgia vascolare e della ricerca e utilizzo delle protesi.

Nel 1986 Weinberg e Bell progettaronò il primo sostituto di vaso sanguigno ingegnerizzato, con una procedura che sarà d'esempio per l'ingegneria tessutale negli anni a venire; Weinberg e Bell possono essere considerati i padri fondatori di tale disciplina scientifica. Essi coltivarono cellule di muscolo liscio, endoteliali e fibroblasti di bovino e le seminarono su supporti tubulari di gel di collagene, rinforzati da una maglia di Dacron. Le analisi post-intervento rivelarono che l'impianto era in grado di sopportare la pressione fisiologica per un intervallo di tempo tra le 3 e le 6 settimane, ma il graft progettato da Weinberg e Bell dimostrò la possibilità di ottenere un innesto ingegnerizzato con cellule umane.

Giunse dunque il momento di raccogliere e coordinare tutti i progressi raggiunti durante quegli anni e meglio definire quindi la nuova tendenza della ricerca medica, per portarla nella pratica clinica. Fu così che nel 1987 a Washington, in occasione del meeting dell'US National Science Foundation (NSF), si usò per la prima volta il termine *tissue engineering*. Successivamente il NSF identificò l'ingegneria tessutale come una tecnologia emergente con una certa priorità di finanziamento. Nel 1988, in California, si organizzò il First Tissue Engineering (TE) Symposium, durante il quale si cercò di definire per la prima volta ufficialmente quella nuova area di ricerca scientifica che prenderà appunto il nome di "ingegneria tessutale". È in questa occasione che si assiste alla sua definizione da parte di Fox e Skalak.

In un primo momento si cercò di creare sistemi che riproducessero fedelmente i tessuti e gli organi naturali nella forma, nella proprietà e nella funzione. In poco tempo fu evidente che la complessità dei tessuti biologici in termini di composizione macromolecolare, organizzazione micro e macrostrutturale e di interazioni tra cellule e ambiente, rendevano difficile il passaggio dei costrutti ingegnerizzati dall'ambito sperimentale a quello clinico.

Ci si focalizzò dunque sullo studio delle cellule e delle loro potenzialità, fattori e scaffolds biocompatibili per la ricostruzione tessutale, ma non si diede importanza al fatto di emulare la “non omogeneità” dei tessuti nativi, cioè quella combinazione di elementi cellulari, molecole specifiche, micro- e macrostruttura che definiscono le peculiari caratteristiche chimiche, fisiche e meccaniche del tessuto, necessarie allo svolgimento della specifica funzione.

Dopo una decina d'anni di studio si notò dunque come l'ingegneria tessutale non avesse ancora risposto in maniera soddisfacente alle grandi aspettative di fornire nuove modalità terapeutiche per i trattamenti clinici con tessuti ingegnerizzati o sostituzioni d'organo con cellule viventi. Così nel 1998 la comunità scientifica promosse un'evoluzione della TE, focalizzando l'attenzione sull'importanza che la biomeccanica riveste nell'ambito della progettazione e dello sviluppo degli impianti per la riparazione dei tessuti molli e di quelli duri. Si passò dunque ad una ingegneria tissutale funzionale (FTE), in cui si ricercano le esigenze meccaniche e strutturali in situ del tessuto da ripristinare, in modo da poter ristabilire completamente la funzione dell'organo o del tessuto. Questo nuovo approccio ha avuto importanti ripercussioni soprattutto per quegli impianti che devono sostituire tessuti soggetti ad ingenti carichi o sollecitazioni cicliche, quali quello muscolo-scheletrico o cardiaco-vascolare.

Gli studi nell'ambito dell'ingegneria tessutale sono tuttora in grande espansione e oltre alla ricerca di una sempre maggiore varietà di costrutti ingegnerizzati, si concentrano sulla considerazione delle qualità funzionali e meccaniche che questi devono possedere per adempiere le funzioni e per il raggiungimento degli intenti prefissati: in primis superare i limiti dei trattamenti convenzionali di trapianto protesico e del trapianto d'organi. Questi tipi di intervento chirurgico infatti presentano difficoltà che risultano evidenti anche solo considerando l'ipotesi di partenza di queste tecniche: si vuole sostituire una parte di un sistema complesso come quello biologico con una protesi, cioè un sistema artificiale indubbiamente assai semplificato.

CAPITOLO 2

Tipologie di scaffold

2.1 Introduzione

Come in precedenza accennato, si possono distinguere due grandi tipologie di impianti in base alla natura degli scaffold utilizzati: essi possono essere di origine biologica o sintetica. Qui di seguito si riprendono in dettaglio i differenti tipi di graft e ci si sofferma sulla descrizione delle loro proprietà chimico fisiche e sulla loro preparazione.

In generale un supporto deve possedere le seguenti proprietà per poter essere utilizzabile in applicazioni di ingegneria tessutale:

- 1) biocompatibilità, cioè *la capacità di un materiale di non determinare, da parte di un sistema vivente, sfavorevoli reazioni alla sua presenza in una specifica applicazione*; è un requisito fondamentale citato anche dalle norme europee;
- 2) biodegradabilità, cioè il materiale deve venire demolito o trasformato in seguito all'azione dell'ambiente in cui è inserito;
- 3) opportuna macrostruttura: si ricorda infatti che lo scaffold dovrebbe promuovere l'adesione cellulare, la conseguente neomorfogenesi e permettere la completa integrazione con l'ambiente circostante. Questo è strettamente legato alla struttura del supporto;
- 4) opportuna porosità, per consentire la migrazione cellulare e l'invasione tessutale, così come la diffusione delle sostanze nutritive e quelle di scarto;
- 5) adeguata dimensione dei pori, che dipende dalla tipologia di tessuto da rigenerare; si parla di 20-125 μm per i tessuti molli, 150-400 μm per tessuti duri, di 45-150 μm per la rigenerazione del tessuto epatico;
- 6) opportuna area e composizione chimica di superficie, in quanto è qui che avvengono le interazioni cellula-matrice che portano all'adesione;
- 7) compatibilità meccanica: gli scaffold devono infatti poter sopportare le stimolazioni meccaniche tipiche del sito di innesto, in modo da adempiere alla loro funzione di 'guida' per la ricrescita di tessuto.

2.2 Scaffold biologici

2.2.1 Scaffold biologici decellularizzati

Si intendono scaffold biologici quei supporti in cui non compaiono materiali sintetici e possono subire o meno trattamenti chimici prima del loro utilizzo, a seconda della loro provenienza. Come già anticipato, c'è la possibilità di prelevare tratti vascolari dello stesso paziente che dovrà in seguito ricevere l'impianto (graft autologhi o autograft), oppure di usufruire di homograft o di eterograft: i primi sono vasi sanguigni di un soggetto diverso dall'ospite ma appartenente alla stessa specie, mentre i secondi sono provenienti da animali. Nel caso di innesti autologhi non si assiste a trattamenti chimici di alcun tipo ed al massimo essi vengono crioconservati. Trattamenti chimici vengono invece solitamente riservati agli homograft (di solito protesi bovine o porcine) e agli eterograft, anche se non si esclude l'eventualità di poter trattare pure qualche autograft.

Il trattamento più comune è la fissazione in glutaraldeide (Figura 2.1): è una dialdeide dell'acido glutarico ed il suo utilizzo nella fase di preparazione dello scaffold permette di aumentare la stabilità meccanica del materiale biologico e di conservarlo nel tempo grazie al suo effetto citotossico.

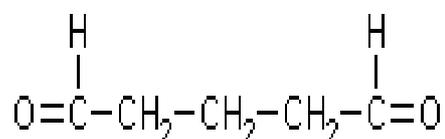


Figura 2.1- Formula chimica della glutaraldeide.

La fissazione è così definita in quanto serve appunto a 'bloccare' la struttura della materia vivente, ritardando i processi degradativi che si innescano quando, per esempio, si preleva tessuto togliendolo dalle condizioni fisiologiche naturali. La fissazione agisce in due modi sul materiale trattato; in primis essa inibisce le biomolecole (tipo gli enzimi) e termina tutte le reazioni biochimiche, evitando la digestione o comunque il danneggiamento del campione, preservandone lo stato chimico. Inoltre, il trattamento protegge lo scaffold da danni estrinseci. La glutaraldeide in effetti possiede un efficace effetto citotossico, risultando letale per la maggior parte dei microorganismi comuni che potrebbero altrimenti colonizzare e danneggiare il campione. In secondo luogo la fissazione spesso altera cellule o tessuti per aumentare la resistenza e la stabilità del materiale.

Il trattamento con glutaraldeide è particolarmente indicato per supporti ricchi di collagene, ma in generale è più frequente per gli eterograft rispetto agli homograft, visto che

l'immunoistocompatibilità tra uomo e animale è decisamente inferiore a quella interumana. Un ulteriore processamento riservato agli scaffold consiste nella decellularizzazione. Se si ricorre al trattamento precedente per conservare e rafforzare un tessuto privato del suo ambiente naturale, la decellularizzazione è invece legata all'esigenza di conferire biocompatibilità all'impianto e dunque evitare (o perlomeno ridurre) possibili reazioni immunitarie dell'ospite. L'idea di base è che il potere antigenico dei graft, cioè la loro tendenza a stimolare le difese immunitarie dell'ambiente in cui saranno innestati, sia correlato alla presenza di residui cellulari dell'organismo donatore sullo stesso impianto. I problemi maggiori si hanno ovviamente in occasione degli eterograft, poiché la loro tipologia di cellule è appartenente ad una specie differente da quella dell'ospite. Ciononostante il trattamento di decellularizzazione viene impartito anche agli omograft per maggiore sicurezza. Il suddetto trattamento consta essenzialmente di due passaggi. In primo luogo si pone il campione in un ambiente ipo- o ipertonico, al fine di causare la lisi delle membrane cellulari. Infatti, in un ambiente ipotonico, con concentrazione di soluto più bassa rispetto a quella delle cellule, queste ultime assorbono acqua, si gonfiano ed esplodono (lisi appunto). In secondo luogo si utilizzano detergenti che rimuovono i detriti cellulari, ma che possono rappresentare una minaccia per le proprietà meccaniche dello scaffold a causa dei residui tossici che possono rilasciare.

2.2.2 Studio sugli scaffold decellularizzati

Si riporta qui di seguito uno studio avente come fine la realizzazione di un impianto vascolare che come scaffold utilizzi una vena decellularizzata. Lo studio è stato condotto da Schaner et al. nel 2004. Nello specifico, il condotto vascolare d'interesse è la vena safena umana (autologa o omologa), trattata con un detergente di cui in letteratura non si era mai riportato l'uso: si tratta del dodecilsolfato di sodio (SDS) (Figura 2.2), che sembra evitare i problemi legati alla fissazione con glutaraldeide (scarsa compliance e degenerazione aneurismale) e che preserva la matrice extracellulare dal rischio dei residui tossici precedentemente citati. Inoltre l'impiego di una vena come fonte di tessuto per uno scaffold protesico presenta un indubbio vantaggio rispetto all'utilizzo di tessuto proveniente da altre specie animali, in quanto come detto si riducono notevolmente (se non del tutto) i rischi di una risposta immunitaria da parte dell'ospite. Oltretutto la disponibilità di questa tipologia di scaffold è immediata.

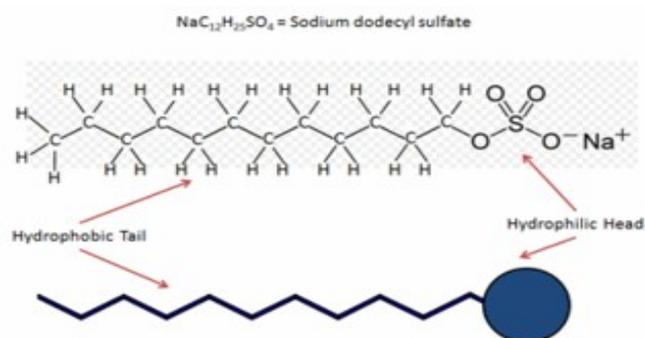


Figura 2.2- Dodecilsolfato di sodio.

Lo studio è stato condotto sotto i protocolli approvati dal Thomas Jefferson University's Institutional Review Board e dal Institutional Animal Care and Use Committee. L'aspetto trattato in questa sede sarà solamente la preparazione a cui viene sottoposta la vena per poter essere utilizzata come scaffold.

Il vaso d'interesse è la grande vena safena (GSV) che decorre lungo la coscia e la gamba, originando dalla vena dorsale dell'alluce e dall'arco venoso dorsale del piede e terminando nella giunzione safenofemorale, dove si unisce con la vena femorale. La GSV viene prelevata dal donatore resecandola a livello del suo sbocco nella femorale e distalmente a livello richiesto dal tratto vascolare da sostituire. Nel momento dell'estrazione si deve tener conto del calibro della vena; si è infatti notato che qualora esso scenda sotto i 3-4 mm le probabilità di successo dell'intervento diminuiscono notevolmente. I segmenti non dilatati a sufficienza sono stati trasportati in laboratorio in Medium 199 a 4° C. Esso fu sviluppato nel 1950 per degli studi nutrizionali sugli embrioni di pollo e tutt'oggi è utilizzato come mezzo nutriente per supportare la sopravvivenza funzionale delle cellule e dei tessuti. Tra i suoi componenti si ritrovano purine (adenina, guanina, xantina e ipoxantina), pirimidine (timina, uracile) e composti grassi solubili.

Una volta ottenuto il tratto vascolare di interesse, lo si è posto per 15 ore in un shaker termostato alla temperatura di 37° C insieme al detergente SDS. Successivamente il futuro scaffold è stato sciacquato ed agitato per 5 volte con un tampone fosfato salino (PBS, Phosphate Buffered Saline) per periodi di 10 minuti ciascuno. Il PBS è una soluzione tampone salina contenente cloruro di sodio, fosfato di sodio e fosfato di potassio, la cui concentrazione è pari a quella del corpo umano; essendo isotonico e non tossico, viene appunto utilizzato come soluzione per il lavaggio di tessuti.

Durante lo studio sono state sperimentate differenti concentrazioni di SDS (Tabella 2.1), in modo tale da poter determinare quella minima necessaria a ottenere una completa decellularizzazione. Sono dunque state testate le concentrazioni di 0.01, 0.025, 0.05, 0.075 e

0.1% di SDS in PBS e, per confrontare le conseguenze della decellularizzazione rispetto all'utilizzo di una vena non trattata, si sono fatte delle analisi anche su quest'ultima opzione (0.0% SDS).

Tabella 2.1- Decellularizzazione della grande vena safena umana dopo trattamento con SDS.

	Vena naturale	SDS usato (%)					
		0.00	0.01	0.025	0.05	0.075	0.1
# nuclei nel raggio di 0.025 mm	42±11	27±1	29±	20±8	15±1	3±4	2±
% decellularizzazione		35	32	52	64	94	96

La tabella mostra la percentuale di cellule che risultano rimosse dall'intera parete del vaso in seguito al trattamento. Le analisi istologiche e al SEM (Figure 2.3 e 2.4) hanno dimostrato come la superficie luminale della grande vena safena umana sia priva di cellule endoteliali dopo l'utilizzo di SDS. Si nota che la decellularizzazione pressoché completa si raggiunge con una concentrazione di SDS superiore allo 0.075% e quindi gli studi successivi si baseranno su campioni trattati con tale concentrazione.

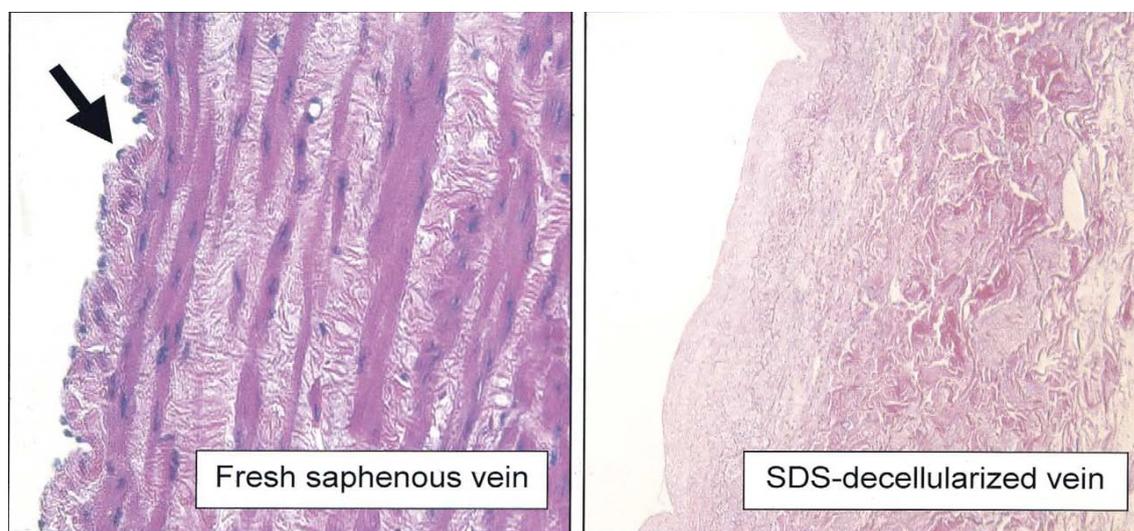


Figura 2.3- Immagine al microscopio ottico della grande vena safena umana prima (sinistra) e dopo (destra) trattamento con lo 0.075% di SDS. Il trattamento elimina completamente le cellule endoteliali presenti sulla superficie luminale (freccia) e il 94% delle cellule intraparietali.

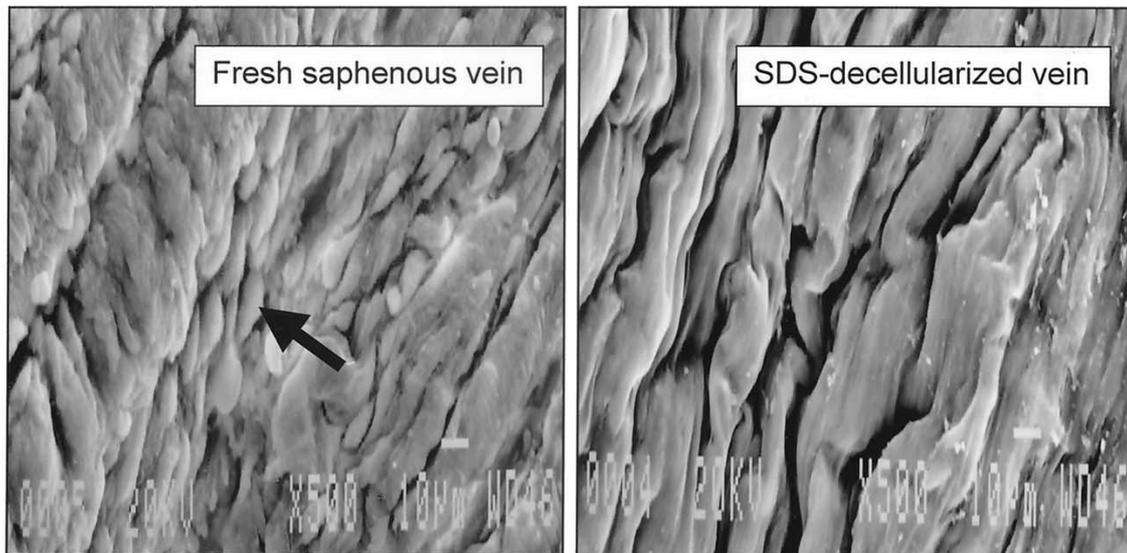


Figura 2.4- Immagine al microscopio elettronico a scansione della superficie luminale della grande vena safena umana prima (sinistra) e dopo (destra) trattamento con lo 0.075% di SDS (500 x). La freccia indica le cellule endoteliali che a destra sono assenti lasciando visibile la membrana basale.

Come anticipato, il trattamento con SDS non porta alla comune complicazione che consegue all'uso di detergenti per la decellularizzazione e cioè al danneggiamento della matrice extracellulare. Le analisi dimostrano infatti come le fibre di collagene ed elastina siano preservate e dunque la struttura della matrice rimanga pressoché invariata (Figura 2.5).

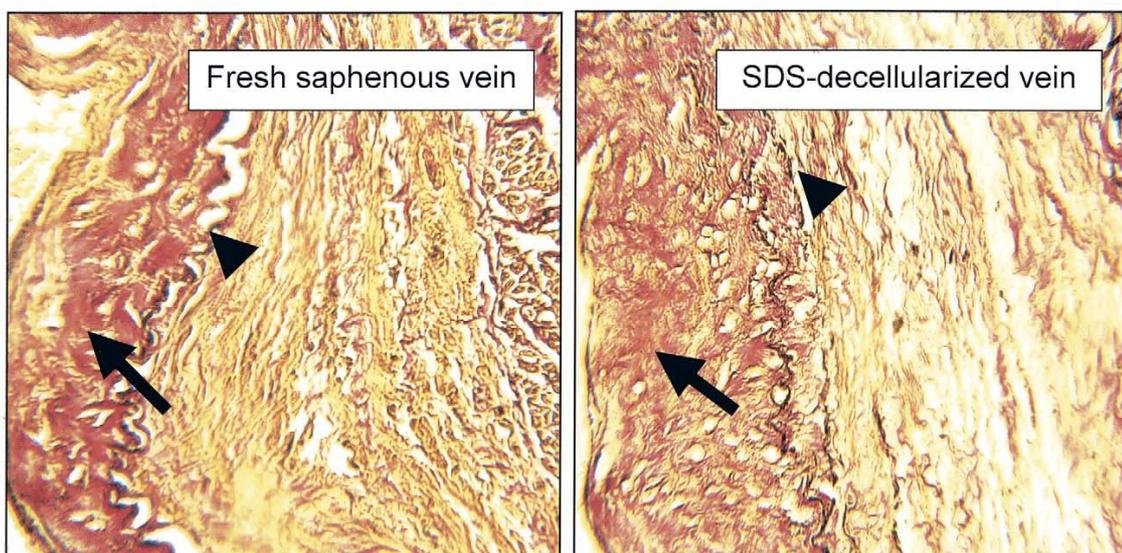


Figura 2.5- Immagine al microscopio ottico della grande vena safena umana prima (sinistra) e dopo (destra) trattamento con lo 0.075% di SDS (colorazione Verhoff-vonGieson). Si nota la conservazione della morfologia delle fibre di collagene (fibre rosse, freccia) e di elastina (fibre nere, punta delle frecce).

Si tratta di un notevole vantaggio in quanto il collagene conferisce resistenza al vaso e l'elastina influenza la sua distensibilità. Inoltre il collagene di tipo IV, uno dei componenti

principali della matrice extracellulare, contiene dei ligandi che promuovono l'adesione cellulare e quindi se si evita di danneggiarlo, si può favorire la futura ricrescita del tessuto in vivo. Preservando la matrice ed i suoi componenti oltretutto si ottiene un vaso meccanicamente stabile e resistente, peculiarità di assoluta importanza per uno scaffold poiché deve rimanere intatto almeno per un tempo sufficiente alla ricrescita tessutale in situ. Per poter valutare però il comportamento della vena decellularizzata in vivo si è ricorsi all'applicazione su modello canino. Si sono prelevate vene giugulari canine, è stato eseguito il trattamento con SDS e si sono poi impiantate come graft di interposizione carotidea su animali. Un limite derivante da questa scelta è che la vena safena umana è di certo differente dalla vena giugulare canina e quindi le conclusioni tratte in precedenza non risultano del tutto confermate. Inoltre non si può ancora accertare la durata ed il comportamento a lungo termine dello scaffold.

2.2.3 Gel naturali di collagene o fibrina (biopolimeri)

Un' alternativa al tipo di scaffold visto nel precedente paragrafo è costituita dai gel naturali di collagene o fibrina. L'idea è dunque sempre quella di utilizzare materiale biologico, ma in questo caso si opta per la manipolazione dei materiali proteici che compongono la matrice extracellulare. Uno dei componenti principali della ECM è infatti il collagene, proteina strutturale composta da catene polipeptidiche, chiamate catene α , intrecciate in modo tale da formare una struttura elicoidale compatta. Ogni singola catena possiede una struttura primaria costituita da oltre 1400 amminoacidi, tra i quali è peculiare la tripletta glicina, prolina, idrossiprolina (Gly-Pro-Hyp)_n (Figura 2.6).

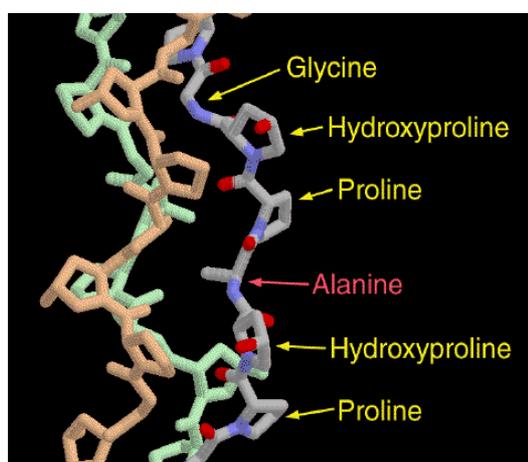


Figura 2.6- Struttura del tropocollagene.

Ogni filamento assume una struttura terziaria elicoidale sinistrorsa; tre filamenti si organizzano in una superelica destrorsa che costituisce la struttura quaternaria del tropocollagene. Questo è il precursore del collagene, il quale risulta infatti composto da fibrille, a loro volta costituite da molecole di tropocollagene associate tra loro a formare file parallele sfalsate (Figura 2.7). A seconda del modo in cui tali molecole sono collegate si ottengono oltre 25 tipi diversi di collagene. In generale comunque, questa organizzazione conferisce al collagene, e quindi ai tessuti che lo contengono, elevata resistenza a trazione. Questo aspetto risulta molto importante nell'ambito delle protesi vascolari poiché rende il graft capace di sopportare grandi deformazioni e si previene così la rottura della parete dell'impianto. Inoltre, sussistono ulteriori motivazioni per cui le fibre di collagene sono considerate buone componenti per i supporti degli impianti protesici vascolari. In effetti esse possiedono un basso potere antigenico e contengono sequenze leganti le integrine, rivestendo così un ruolo fondamentale nell'adesione cellulare.

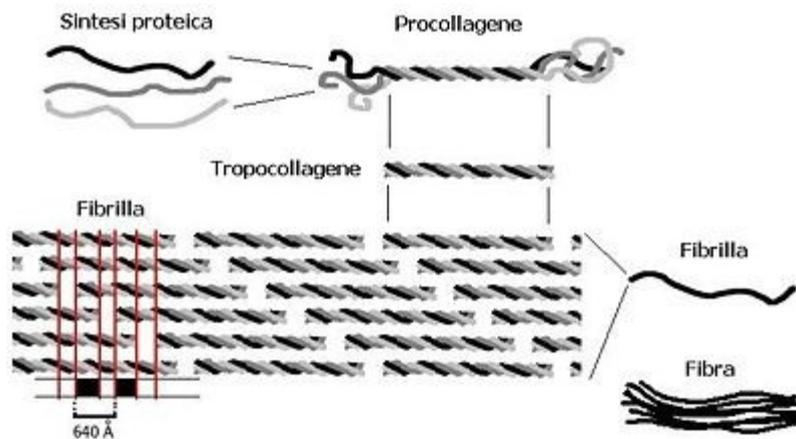


Figura 2.7- Schema riassuntivo della biosintesi del collagene.

Tali proprietà giustificano i numerosi studi effettuati sul collagene per poterlo utilizzare come componente dei scaffold protesici, quali quelli sull'orientamento delle sue fibre, delle condizioni di cross-linking (reticolazioni tra catene) e sulle tecniche di semina cellulare. Si sono indagati anche agenti chimici che possano aumentare la stabilità chimico-meccanica del collagene nel tempo, caratteristica dipendente dall'interazione tra le fibre dello stesso; tali agenti mirano dunque a rafforzare le reticolazioni intercatena. La sostanza più efficiente è la glutaraldeide, di cui discusso precedentemente.

La ricerca è però proseguita oltre allo scaffold basato solamente sulle fibre di collagene, per approdare a quello costituito da un gel di collagene. Questo approccio si basa sulla seguente osservazione : alcune cellule, come per esempio i fibroblasti, se intrappolate all'interno di

gel di collagene, sono in grado di contrarsi e di compattare il gel stesso, aumentandone considerevolmente la densità e la consistenza. Dopo aver neutralizzato il composto formato da collagene fibrillare solubile sospeso con tali cellule, si viene a creare un gel. Similmente a come avviene il processo di cicatrizzazione in vivo, le cellule interagiscono con le fibrille di collagene e compattano la matrice, escludendo l'acqua. Si sottopone successivamente il composto ad una pressione meccanica che orienta il collagene lungo la direzione della sollecitazione, ottenendo una struttura altamente compatta.

Il primo uso di gel di collagene come scaffold si è verificato per l'appunto nel campo dell'ingegneria tissutale dei condotti vascolari. Si inserisce un cilindro all'interno di una struttura tubulare cava creando un'intercapedine riempita dalla sospensione di cellule e collagene. Dopo che si è formato il gel, la struttura si compatta aderendo al cilindro interno che viene così rimosso. Non potendosi accorciare circonferenzialmente a causa della presenza del cilindro, il gel si compatta trasversalmente, lungo il suo spessore, e le fibre si dispongono in maniera circonferenziale come nell'avventizia dei vasi sanguigni.

Un altro tipo di scaffold biologico studiato è quello costituito dai più elastici gel di fibrina. Essa è una proteina fibrillare insolubile, che deriva dal fibrinogeno, una proteina plasmatica solubile prodotta a livello epatico. Il processo che dal fibrinogeno conduce alla fibrina è molto più complesso rispetto a quanto si accenni qui di seguito e può avvenire attraverso due percorsi: la via estrinseca e la via intrinseca (Figura 2.8). La fibrina si forma in seguito alla polimerizzazione del fibrinogeno, dovuta all'azione dell'enzima trombina, e che porta alla tessitura di una maglia fibrillare. Un grande vantaggio è che quest'ultima viene prodotta mediante il sangue del paziente che ospita lo scaffold, evitando quindi la risposta infiammatoria durante l'impianto.

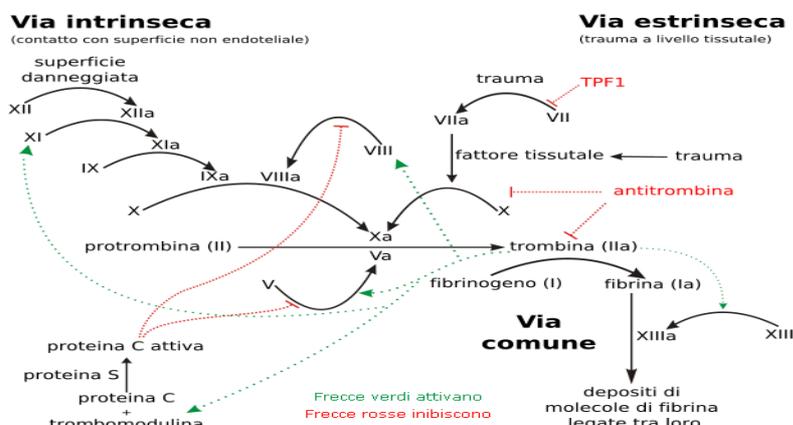


Figura 2.8- Le due vie per la trasformazione di fibrinogeno in fibrina.

La fibrina inoltre possiede la capacità di generare legami con proteine che controllano e coordinano la migrazione e l'adesione cellulare, quali il fattore di crescita dell'endotelio vascolare e la fibronectina. Quest'ultima è una glicoproteina adesiva dimerica, che consta di due catene polipeptidiche unite da ponti disolfuro in sede C-terminale. Tale proteina è presente nel tessuto connettivo lasso e denso e contiene lungo le due catene dei domini per il legame con altre proteine e macromolecole, quali per esempio il collagene, l'eparina, l'integrina e appunto la fibrina (Figura 2.9).

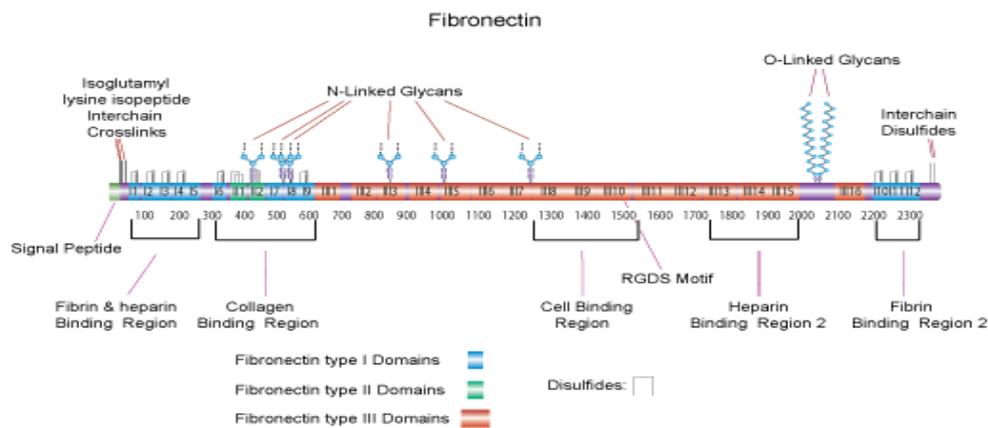


Figura 2.9- Una delle due catene della fibronectina, con i vari domini funzionali.

Si è poi anche notato che incorporando cellule del muscolo liscio in un gel di fibrina, esse producono molto più collagene e matrice extracellulare rispetto a quanto accade se sono inglobate in gel di collagene. È stato oltretutto dimostrato da Tranquillo e colleghi che le SMCs incorporate nel gel guidano il compattamento e l'allineamento delle fibre di fibrina e del collagene sintetizzato dalle cellule stesse, in modo che esse si distribuiscano in modo circolare attorno al mandrino non adesivo usato come supporto durante la costruzione dello scaffold. Swartz e colleghi hanno poi realizzato un impianto vascolare basato su un supporto in gel di fibrina, nel quale sono state inglobate cellule endoteliali e di muscolo liscio di origine ovina, e successivamente è stato innestato nella vena giugulare di agnelli. In seguito è stata osservata un'integrità meccanica del tutto simile al vaso nativo sostituito e si è notato come nel graft si sia sviluppato sia collagene che elastina, attestando quanto precedentemente detto riguardo alle proprietà secretorie delle cellule incorporate in gel di fibrina.

Così come è avvenuto per la trattazione degli scaffold biologici decellularizzati, in seguito alla descrizione dei materiali, si riportano qui due studi relativi rispettivamente ai gel di collagene ed a quelli di fibrina.

2.2.4 Studio sul gel di collagene

Il primo studio presentato è relativo ai gel di collagene ed è stato condotto da Toshiyuki Kanayama et al. nel 2007. L'oggetto della ricerca non è propriamente la realizzazione di uno scaffold per impianti vascolari composto da gel di collagene, bensì di un supporto per la coltura cellulare sul quale le cellule vengono sottoposte ad una tensione uniassiale ciclica (stretching culture). Se però si pensa che uno scaffold protesico deve poter consentire la sopravvivenza e la proliferazione cellulare e che, una volta impiantato, sarà sottoposto a sollecitazioni meccaniche continue, allora si può dedurre che le conclusioni tratte da tale studio potranno interpretarsi come verifiche dell'applicabilità o meno del gel di collagene come scaffold per graft.

Il gel testato in questa ricerca viene anche definito *e-gel* (elastic collagen gel) e venne sviluppato a partire da atelocollagene di salmone (SC). Due sono i passi della sua preparazione: il primo consiste nell'introdurre 1-etil-3-(dimetilaminopropil)-carbodiimide (EDC, C₈H₁₇N₃) durante la fibrillogenesi del collagene; il secondo prevede un trattamento ad alta temperatura. Nonostante i comuni materiali collagenosi si dissolvano in acqua ad una temperatura superiore a quella della loro denaturazione, il gel prodotto in questo modo si contrae notevolmente a tali temperature ma non incorre nella dissoluzione.

La *stretching culture* viene eseguita per indagare il comportamento delle cellule endoteliali (ECs) sottoposte alla tensione uniassiale ciclica che mira ad imitare le forze esercitate dal flusso sanguigno che è appunto pulsatile. Osservando le ECs in vivo si nota che esse, in risposta alle sollecitazioni meccaniche, secernono fattori endoteliali quali le citochine e si allineano lungo l'asse longitudinale del vaso. Nel presente studio si sono considerate le cellule endoteliali della vena ombelicale umana (HUVECs), che è stato dimostrato disporsi perpendicolarmente all'asse di tensione, e che in seguito a stress meccanici aumentano la produzione delle suddette citochine, tra le quali si ricordano l'interleuchina-6 (IL-6) e l'interleuchina-8 (IL-8). L'IL-6 accresce la permeabilità del vaso e stimola la proliferazione delle cellule di tessuto muscolare liscio, mentre l'IL-8 regola la proliferazione, la sopravvivenza e la migrazione delle cellule endoteliali.

Le HUVECs saranno coltivate sul supporto di *e-gel* e se ne studieranno i comportamenti. Se le cellule così coltivate risulteranno avere le stesse caratteristiche che possiedono in natura, allora si potrà concludere che la coltura in *e-gel* è soddisfacente ed un eventuale scaffold dello stesso materiale è da considerarsi adeguato per impianti vascolari.

La preparazione del gel è iniziata ponendo in soluzione (0.5% p/p) l'atelocollagene di salmone con HCl diluito (pH 3); successivamente, la soluzione è stata mescolata con 25 mM

di tampone fosfato di sodio (pH 6.8), contenente 58.3 mM di NaCl e 100 mM di EDC e mantenuta alla temperatura di 4°C. In seguito a diverse prove la concentrazione definitiva di SC, NaCl ed EDC sono state rispettivamente 0.2% (p/p), 35 mM e 60 mM. Il prodotto è stato poi tenuto per 24 ore in incubazione a 4° C, dopodiché il gel fibrillare di SC così ottenuto è stato incubato in un bagno termostato a 60° C per 5 minuti. Si forma in questo modo l'*e*-gel. Successivamente, il gel è stato posto su un piatto di coltura tessutale e, prima di ricevere le cellule a loro volta trattate, esso è stato incubato in un bioreattore per 1 ora a 37° C. Le HUVEC sono state in seguito seminate sul gel con una densità di 5×10^3 cellule/cm² e dunque coltivate in condizioni statiche; il mezzo di coltura è stato cambiato ogni 2 giorni. Periodicamente sono state svolte anche delle analisi per poter monitorare la crescita e la morfologia delle cellule. Dopo la coltura statica si è eseguita quella dinamica; l'*e*-gel quindi è stato modellato a forma rettangolare (10×20 mm) e fissato a strutture all'interno di una camera di silicone elastico. Quest'ultima è stata collegata ad un apparato di trazione, controllato al computer, in modo da poter allungare ed accorciare il foglio di gel e con esso le cellule che vi saranno seminate. La loro densità è di 5×10^4 cellule/cm² e per consentire la loro adesione al supporto e la loro proliferazione si è posta la camera di stretching in un incubatore (5% di CO₂ a 37° C). Dopo 2 giorni di coltura statica viene applicata al gel una trazione monoassiale allungandolo del 10% ad una frequenza di 1 Hz.

A questo punto si è controllato il tasso di crescita delle cellule coltivate staticamente sul gel, quantificandone il numero attraverso la misura della quantità di DNA in coltura. È risultato che con il passare del tempo si registra un aumento del numero di cellule e quindi si può affermare che l'*e*-gel permette la crescita cellulare, requisito importante per uno scaffold. Considerando poi la disposizione delle HUVEC in risposta al carico ciclico, si è notato che dopo 2 ore di sollecitazione la maggior parte di esse è orientata rispetto all'asse di trazione con un angolo di circa 90%. Se lo stimolo meccanico viene fornito per più di 120 minuti, si assiste ad un progressivo orientamento perpendicolare rispetto all'asse di sollecitazione di un numero sempre maggiore di cellule. Inoltre, si sono monitorate anche le proprietà secretorie delle HUVEC, controllando la quantità di IL-6 e IL-8 prodotta. È emerso che la loro produzione aumenta in funzione del tempo e della situazione di coltura. Infatti per entrambe le tipologie di interleuchine, una condizione di coltura statica conduce ad una minor produzione rispetto ad una condizione dinamica.

I risultati ottenuti mostrano perciò come il comportamento delle HUVEC in vivo e quello delle stesse su un supporto di *e*-gel siano praticamente molto simili se non identici. In conseguenza tale biopolimero può essere utilizzato dall'ingegneria tessutale come materiale

per la produzione di innesti vascolari secondo il processo di fabbricazione riportato.

2.2.5 Studio sul gel di fibrina

Questo studio punta direttamente allo sviluppo di scaffold in gel di fibrina per l'ingegneria tessutale applicata all'ambito cardiovascolare, che comprende sia vasi sanguigni sia valvole cardiache. La sperimentazione è stata condotta da Stefan Jockehoevel et al. nel 2000.

Il gel di fibrina, come già anticipato, può formarsi a partire dal contatto con il sangue del paziente, evitando eventuali reazioni di rigetto dell'organismo nei confronti di un corpo estraneo. In particolare, in questa ricerca si focalizza l'attenzione su una sospensione di miofibroblasti e di gel di fibrina ed ovviamente sulle cellule da seminare che sono ottenute dall'aorta ascendente (il primo tratto a partire dal ventricolo sinistro) di cuori espantati.

Per la produzione del gel di fibrina si è partiti dal fibrinogeno prelevato dal plasma sanguigno e lo si è disciolto in acqua. In seguito è stato dializzato con un'apposita membrana e unito al tampone salino di Tris (TBS); la soluzione è stata sterilizzata e filtrata ripetutamente. 50 mM di CaCl_2 , 20% di trombina (20 unità/ml) e 70% di cellule risospese nel tampone di Tris sono state mescolate delicatamente. Si è successivamente aggiunto il fibrinogeno in un rapporto 1:1. Il tessuto è stato indi coltivato in un *basic medium* supportato con 1 mM di acido L-ascorbico 2-fosfato per aumentare la produzione di collagene. Per lo strato di gel così ottenuto sono stati sperimentati spessori da 1 a 3 mm ed in tutti i casi si è effettuata una fissazione con una soluzione dello 0.01% di poli-L-lisina. Diversi metodi di fissazione sono poi stati indagati in modo da evitare lo *shrinking* tissutale, cioè la retrazione della protesi dovuta ad un eccessivo processo di fibrosi.

Per realizzare uno scaffold ideale, bisognerebbe fare in modo che la biodegradazione sia in accordo con la ricrescita del tessuto sullo stesso, perciò per controllare che il gel si dissolva in tempi prestabiliti si è aggiunta della aprotinina (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ di medium): è un enzima proteolitico inibitore, il quale rallenta la fibrinolisi agendo su diverse proteasi della serina, quali la tripsina, la chimotripsina e la plasmina.

In questo studio ci si è concentrati sulla realizzazione di un condotto valvolare più che di un normale vaso sanguigno, ma i risultati ottenuti sono applicabili ad un impianto vascolare in generale. Innanzitutto, si è osservato un eccellente sviluppo tessutale sullo scaffold di gel. In secondo luogo, come anticipato, la possibilità di controllare la degradazione del supporto mediante l'uso di aprotinina favorisce l'integrazione dell'impianto con l'ambiente fisiologico. Riguardo questo aspetto, è fondamentale una buona distribuzione delle cellule sullo scaffold per poter ottenere un conseguentemente forte sviluppo tessutale. Ad un'omogenea

distribuzione cellulare infatti è legata una grande produzione di matrice extracellulare (Figura 2.10).

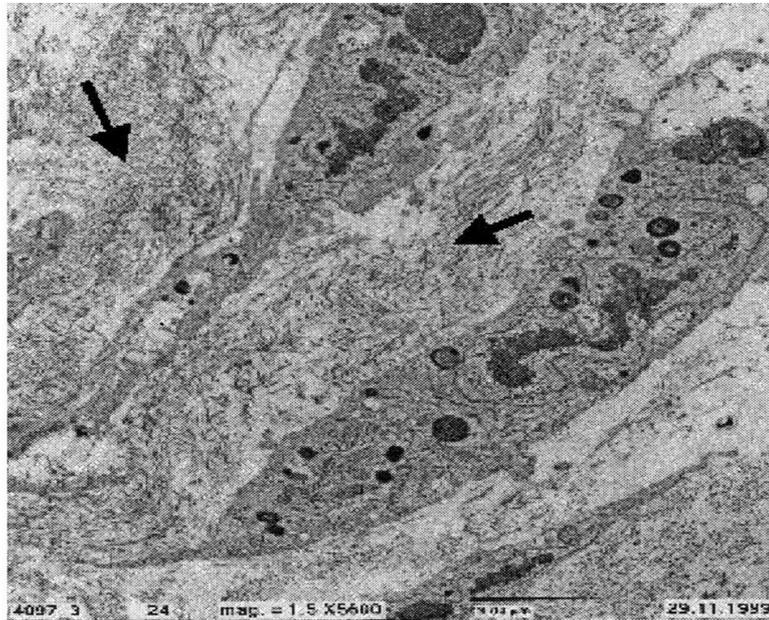


Figura 2.10- Gel di fibrina dopo un periodo di coltura di 4 settimane.

Solitamente nelle strutture spugnose e fibrose si assiste ad una colonizzazione da parte delle cellule che si concentra soprattutto sulla superficie del supporto e solo in seguito esse migrano anche all'interno. Lo sviluppo del tessuto è perciò ritardato. Invece nel gel di fibrina la distribuzione cellulare è omogenea fin dall'inizio, grazie alla tecnica con cui tale gel è prodotto. In effetti, durante la polimerizzazione della sospensione gel/cellule, queste subiscono una veloce immobilizzazione in quanto il processo avviene solo in pochi minuti.

Inoltre, poiché il gel si produce dal sangue del paziente è da escludere una reazione infiammatoria al graft innestato. Rispetto ai supporti porosi, il gel di fibrina è in grado di accumulare negli spazi intercellulari il collagene ed altri componenti della ECM che vengono sintetizzati dalle cellule seminate sullo scaffold. La produzione di tali sostanze è supportata dal gel, in quanto esso secreta fattori di crescita derivati dalle piastrine ed il fattore di crescita trasformante beta.

Due sono invece i problemi legati a questo tipo di supporto. In primis persiste il problema dello *shrinking*, che però viene superato ricorrendo alla fissazione in poli-L-lisina; nonostante esso sia un inconveniente si è in ogni caso notato che la tensione prodotta dallo *shrinking* all'interno dell'impianto, così come il trattamento fissativo, promuovono la produzione di collagene.

Il secondo svantaggio incontrato è stato la scarsa resistenza e rigidità meccanica, che

impediscono l'immediato impianto del graft al termine della preparazione. Una soluzione potrebbe essere una ottimizzazione nel rapporto di concentrazione di fibrinogeno e cellule, oppure il ricorso ad un supporto altamente poroso (dimensione dei pori > 1 mm) e biodegradabile combinato al gel di fibrina. In conclusione comunque il gel di fibrina possiede numerosi caratteristiche che lo rendono ideale come scaffold per protesi vascolari.

2.2.6 Scaffold di acido ialuronico

L'acido ialuronico è un glicosamminoglicano non solfatao ad alto peso molecolare (tra 10^4 e 10^5 Da), un polimero lineare dunque costituito da monomeri ripetuti composti di due unità di natura glucidica. Le unità disaccaridiche di cui è costituito sono l'N-acetil-glucosamina, un amminozucchero, e l'acido D-glucuronico (Figura 2.11).

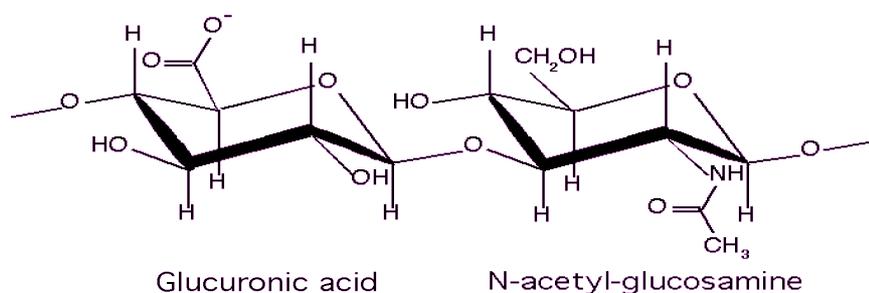


Figura 2.11- Disaccaride ripetuto che costituisce l'acido ialuronico.

Tale polimero è presente nella ECM di tutti i tessuti e in particolare si trova anche nelle pareti dell'aorta. A pH fisiologico l'acido ialuronico si presenta in forma di ialuronato.

L'utilità di questa molecola come biopolimero è dovuta alla semplicità delle sue unità ripetitive e le soluzioni da esso formate sono viscoelastiche e pseudoplastiche; le sue proprietà sono dipendenti dalla concentrazione e dal peso molecolare delle sue catene.

2.2.7 Studio sull'acido ialuronico

Lo studio di cui di seguito è stato condotto a Padova da Barbara Zavan, Vincenzo Vindigni, Sandro Lepidi, Ilaria Iacopetti, Giampiero Avruscio, Giovanni Abatangelo e Roberta Cortivo nel 2008. Lo scopo è stato quello di analizzare la capacità di un impianto biodegradabile basato su uno scaffold di acido ialuronico (HYAFF-11), di svilupparsi in un vaso sanguigno di diametro di 4 mm innestato in un modello porcino. In particolar modo ci si è concentrati sul rimodellamento della matrice extracellulare e sulla biosintesi dell'elastina. Questa infatti deve essere presente nell'impianto vascolare in quanto permette di evitare complicazioni ed

assicura allo stesso l'appropriata funzionalità meccanica che il vaso nativo possiede. L'elastina infatti conferisce elasticità alla struttura, consentendo al condotto di potersi deformare sotto sollecitazione meccanica per poi ritornare alla configurazione originaria, evitando dunque fenomeni di *creep*. Inoltre l'elastina regola l'attività delle cellule del tessuto muscolare liscio vascolare, così che vengono evitate patologie fibrocellulari. Infine essa regola l'attivazione del fattore della crescita β -1, influenzando dunque il comportamento delle cellule. Si è poi osservato che in caso l'elastina non sia presente nella matrice extracellulare, il vaso incorre in fenomeni di stenosi.

In questo studio si riprende ad osservare una protesi vascolare basata su acido ialuronico detta ABAT (*Artery Bioregeneration Assist Tube*), già analizzata in uno studio precedente. Da tale sperimentazione era emerso che l'impianto era capace di indurre la rigenerazione completa di un condotto arterioso, inclusa la naturale componente elastica. Si era però fatto ricorso al topo come modello animale ed il vaso realizzato era di piccolo calibro (2 mm di diametro). Si sono volute quindi testare nuovamente le potenzialità dell'ABAT, progettando un condotto dimensionalmente maggiore (4 mm di diametro e 5 cm di lunghezza) per applicarlo ad un modello più complesso: l'innesto infatti è stato effettuato al posto di un tratto di arteria carotidea di maiale.

Per ottenere il biomateriale si è partiti da 80-200 kDa di ialuronato di sodio, sintetizzando così l'acido ialuronico; questo è stato poi totalmente esterificato con alcool benzilico e dissolto in dimetilsolfossido (DMSO). Una sbarra cilindrica rotante con il nucleo d'acciaio di diametro di 4 mm è stata successivamente rivestita con 1.5 ml della soluzione ottenuta di HYAFF-11/DMSO e la sbarra così ricoperta è stata poi immersa in un bagno di etanolo. Rimuovendo lo strato formatosi sopra la sbarra cilindrica si sono ottenuti dei condotti tubulari, i quali sono stati tagliati in modo da ottenere tubuli di 5 cm di lunghezza, 4 mm di diametro e 50 μ m di spessore. Essi sono poi stati lavati in acqua, asciugati in aria e sterilizzati con radiazioni gamma.

Gli impianti alla fine ottenuti sono stati inseriti in 10 maiali e per le analisi si sono sacrificati coppie di animali dopo 1, 2, 3, 4 e 5 mesi dall'innesto.

Su 10 protesi, 3 hanno mostrato una parziale o totale occlusione, ma tutte le cavie erano sopravvissute e non presentavano alcuna insufficienza vascolare nemmeno nelle regioni periferiche. Le 3 occlusioni, dovute ad iperplasia intimale, non sono state causate da inefficienza dell'innesto ma da un problema nel sito anastomotico (cioè dove si è eseguita la sutura tra vaso naturale e graft); l'anastomosi appunto aveva in effetti creato un mismatch tra diametro della protesi e quello dell'arteria nativa, portando così ad una progressiva

occlusione del condotto. Il graft non risulta dunque soggetto ad alcuna dilatazione aneurismale o collasso. Inoltre dopo 4 mesi dall'impianto (Figura 2.12) si nota la rigenerazione del tessuto elastico e dopo 5 mesi si assiste al riassorbimento del biomateriale, soppiantato da nuovo tessuto. Questo attesta la biocompatibilità del supporto, il quale appare come un ambiente “biomimetico” durante la formazione del tessuto. Ulteriore conferma di tale proprietà deriva dall'assenza di infiltrazioni di neutrofili e linfociti.

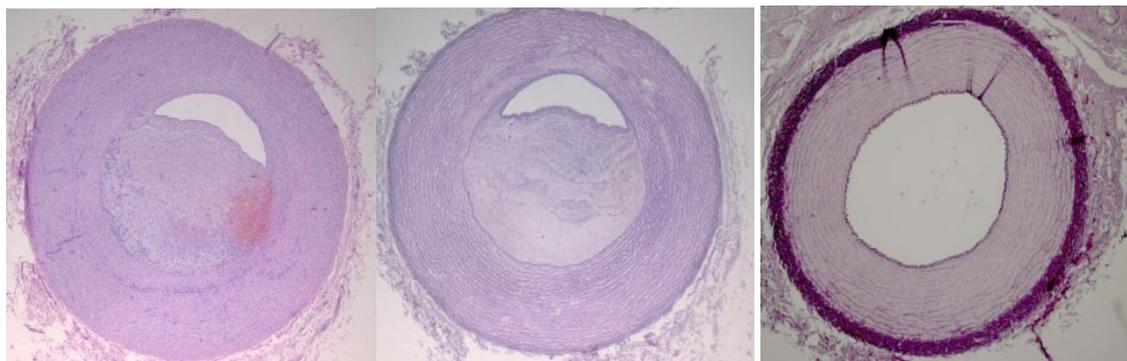


Figura 2.12- Sezioni trasversali delle protesi dopo 4 mesi (immagine a sinistra con colorante H&E, ed al centro con colorante Weigert's) e della arteria nativa (immagine a destra). Si nota l'occlusione suddetta, mentre non è evidente alcun biomateriale.

Nello specifico si è osservato che la sintesi del collagene di tipo 1 è raddoppiata dal primo al quinto mese e che un grande numero di cellule autologhe hanno colonizzato lo scaffold. In effetti, considerando 1 cm di scaffold, dopo il primo mese si contano circa 7×10^6 cellule, mentre dopo 4 mesi se ne contano circa 12×10^6 . Dopo il primo mese sono principalmente i fibroblasti a colonizzare lo scaffold, mentre le EC e le SMC pur essendo presenti in piccole quantità dopo il primo mese, aumentano progressivamente con il passare del tempo. Si suppone quindi che le fibre elastiche siano per la maggior parte sviluppate nel primo mese e successivamente si dispongono ad anelli attorno allo strato mediale delle arterie (Figure 2.13 e 2.14).

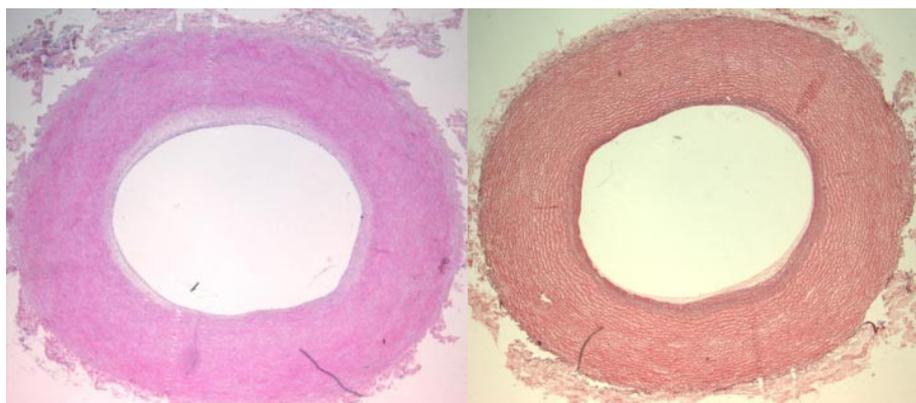


Figura 2.13- Sezione trasversale delle protesi 5 mesi dopo l'impianto.

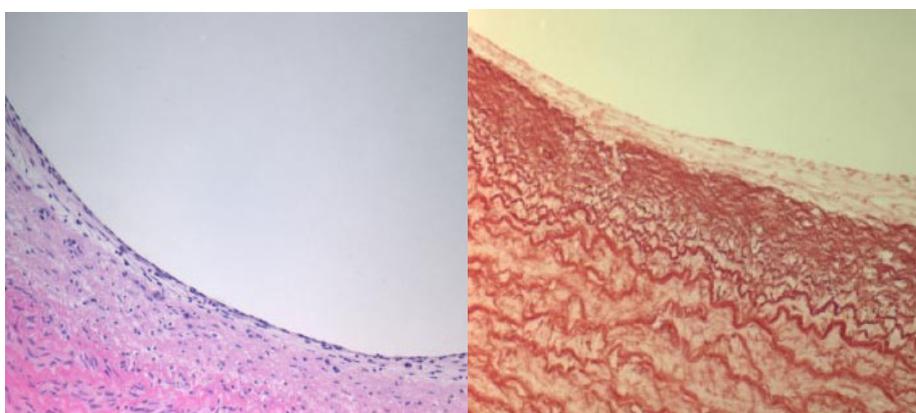


Figura 2.14- Organizzazione dell'intima. Si notino le cellule appiattite sulla superficie luminale. Nella immagine a destra sono ben evidenti i componenti elastici.

Infine l'ABAT ha presentato anche buone proprietà meccaniche: le analisi hanno dimostrato che il diametro rimane costante e dunque l'innesto resta stabile durante la fase di integrazione con l'ambiente fisiologico.

In conclusione questa protesi possiede numerosi vantaggi: promuove la produzione di elastina, permette l'endotelializzazione della superficie luminale e consente in generale la crescita di tessuto; è biodegradabile e biocompatibile e presenta buone proprietà meccaniche.

2.3 Scaffold sintetici

2.3.1 Dacron

Dacron è uno dei nomi commerciali del PET (polietilene tereftalato), polimero termoplastico appartenente alla famiglia dei poliesteri. Si ricordi che per polimero termoplastico si intende un polimero lineare composto da catene unite da legami deboli,

quali quelli ad idrogeno e forze di Van der Waals. Vista la natura dei legami che tengono assieme le catene, se si fornisce sufficiente energia termica al polimero, il materiale fonde a causa del distacco delle catene stesse. Nello specifico il PET fonde alla temperatura di 270 °C.

Il Dacron è dunque resistente, deformabile e biostabile ed è presente in diverse forme; trova utilizzo nella chirurgia cardiovascolare per realizzare protesi vascolari di largo diametro, per suture arteriali e per la costruzione di anelli valvolari. Il PET viene solitamente trasformato in fibre, a partire da sue macromolecole lineari con un peso medio di circa 20000 Da. Si parte dunque da grani di poliestere, che vengono tramutati in filamenti molto sottili tramite filatura e successivamente riuniti per formare una fibra multifilamento. Il trattamento a cui i filamenti sono sottoposti influisce direttamente sulle proprietà meccaniche finali della fibra e quindi del materiale. Se infatti il Dacron viene tirato ed allungato a lunghezze superiori di quella iniziale per più volte, le catene polimeriche si orientano in modo tale da conferire alla fibra una certa resistenza a rottura oltre che una certa rigidità ed conseguente stabilità dimensionale. Inoltre il PET possiede buona inerzia chimica, per cui non viene aggredito dalla maggior parte dei composti chimici, ed una buona idrofobicità, cosicché di solito si evitano fenomeni di degradazione per idrolisi delle fibre. Un ulteriore aspetto positivo di questo polimero è che, al contrario di altri, può essere sterilizzato sia in autoclave a vapore, sia con ossido di etilene o con raggi gamma ma in ogni caso non viene degradato da tali processi.

Come anticipato, il Dacron viene ottenuto per tessitura e le due principali tipologie fondamentali utilizzate sono quella *woven* (Figura 2.15) e quella *knitted*, quest'ultima distinta a sua volta in *weft* (Figura 2.16) e *warp knitted* (Figura 2.16).

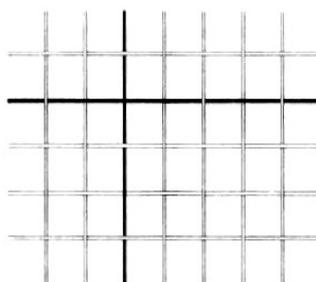


Figura 2.15- Tessitura woven. Le fibre si incrociano ad angolo retto.

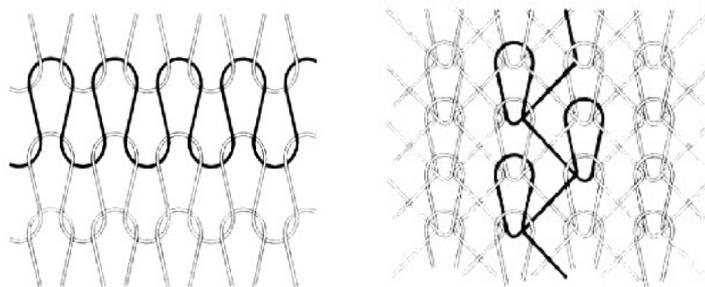


Figura 2.16- Tessitura *weft knitted* (sinistra) e *warp knitted* (destra).

Nella tessitura *woven* le fibre vengono intrecciate in modo tale da risultare perpendicolari tra loro. Questa disposizione permette di ottenere un materiale che presenta grande stabilità e resistenza nelle direzioni delle fibre. Nel momento dell'innesto della protesi in Dacron la si dispone dunque in modo da far coincidere una delle direzioni delle fibre con l'asse principale di carico della protesi; ciò significa che l'impianto risponderà in maniera adeguata alla maggior parte delle sollecitazioni che esso deve comunemente subire nel sito d'innesto. Il Dacron ottenuto con tessitura *woven* però ha una bassa porosità che, nonostante possa essere controllata con la tecnologia tessile, comporta elevata rigidità con conseguente facilità di calcificazione. Si instaura così un cattivo accoppiamento tra vaso naturale e sintetico, che può portare al fallimento dell'anastomosi (sutura chirurgica).

La tessitura *knitted* invece realizza una struttura in cui le fibre non sono tese come nel caso precedente, bensì risultano soggette a continue curvature. Come conseguenza la stabilità dimensionale diminuisce ma la porosità aumenta, ed è sia un vantaggio in quanto a tale caratteristica è legata la capacità di integrazione della protesi, sia un problema per le perdite ematiche. Si ricorda infatti che per porosità si intende la permeabilità della protesi vascolare al sangue e si misura con prove di permeabilità all'acqua. Da tali esperimenti si formula una classificazione in base alla quale poter definire il grado di porosità di un materiale. Si considera non poroso un tessuto che, sotto un flusso d'acqua con una pressione di 120 mmHg, lascia passare meno di 300 cm³ d'acqua in un minuto per centimetro quadrato di tessuto.

Nello specifico, il Dacron *weft knitted* e quello *warp knitted* si differenziano per il fatto che nel primo le fibre sono tessute in direzione circonferenziale nella protesi, mentre nella tessitura *warp* le fibre sono tessute secondo la direzione longitudinale. In quest'ultima tipologia inoltre le connessioni e le curvature delle fibre sono quantitativamente maggiori. Storicamente, le prime protesi vascolari in Dacron che vennero realizzate erano state ottenute mediante tessitura *weft* (Weinberg e Bell); già nel momento della preparazione

sorsero però delle complicazioni. Infatti, quando la protesi viene tagliata per adattarla al sito in cui dev'essere installata, essa può smagliarsi a seconda del tipo di taglio effettuato; questo fenomeno aumenta nel caso in cui la protesi venga tagliata non perpendicolarmente al suo asse. Un secondo problema consiste nella scarsa stabilità dimensionale.

Per quanto concerne invece le protesi in *warp knitted* Dacron, grazie al maggior numero di connessioni e curvature delle fibre, esse possiedono una notevole stabilità dimensionale ed una maggiore resistenza alla smagliatura.

In generale il *knitted* Dacron viene impregnato con albumina, collagene o gelatina per aumentarne la stabilità meccanica, modificarne la porosità/permeabilità e non rendere necessaria la precoagulazione del sangue prima dell'impianto. Infatti la porosità delle protesi di questo tipo può determinare una fuoriuscita del sangue. Per ovviare al problema, si bagnano gli impianti con il sangue dei pazienti che dovranno ospitarli. Questo conduce a due conseguenze: il sangue coagula all'interno delle porosità del tessuto rendendolo impermeabile, e si rende emocompatibile la superficie interna della protesi. Inoltre, recentemente si ingloba negli impianti *knitted* una rifinitura in velluto che induce le catene del materiale ad orientarsi perpendicolarmente alla superficie del tessuto; in questo modo si aumenta l'ancoraggio della fibrina e delle cellule e dunque si incoraggia la rigenerazione tessutale.

Un ulteriore trattamento al quale il Dacron è sottoposto è il corrugamento (Figura 2.17), che può essere circolare o a spirale; esso consente di aumentare l'elasticità e la flessibilità del graft. Senza tale trattamento la protesi, in seguito ad una flessione, tende ad occludersi. Inoltre attraverso il corrugamento si rende l'impianto più adatto alle variazioni di lunghezza: si riducono notevolmente le sollecitazioni delle suture con il condotto vascolare naturale.

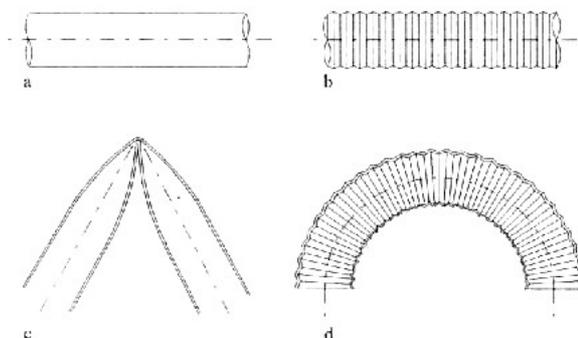


Figura 2.17- Effetto del corrugamento. Nella figura a è raffigurata la protesi non corrugata, che se curvata tende ad occludersi (c), mentre quella corrugata (b) consente di essere curvata senza alcuna occlusione (d).

Le analisi effettuate in seguito all'innesto della protesi in Dacron hanno mostrato che il

primo processo al quale si assiste è quello di adsorbimento/desorbimento delle proteine plasmatiche da parte della superficie dell'impianto. Successivamente eritrociti e globuli bianchi aderiscono al graft, le piastrine si depositano sulla sua superficie e, nel migliore dei casi, avviene la migrazione delle cellule dell'endotelio e del muscolo liscio. Non è infatti comune, se non in qualche studio animale, la ricrescita di un tessuto endoteliale e muscolare ben sviluppato. Il deposito di fibrina poi inizia poche ore dopo l'innesto e si stabilizza attorno ai 18 mesi, dopo i quali se ne può osservare un compatto strato che si è diffuso anche negli interstizi della protesi. Dopo 5 mesi compaiono anche capillari e fibroblasti, mentre nella matrice extracellulare che circonda il graft si nota la presenza dei macrofagi e di tessuto granulare. A causa però dello spesso strato di fibrina che è da considerarsi come una specie di barriera, i capillari rimangono disconnessi dalla superficie scarsamente endotelializzata.

2.3.2 Studio sul Dacron

Come già visto, uno dei principali svantaggi mostrati dal Dacron è la scarsa ricrescita di tessuto endoteliale sulla sua superficie. In questo studio si vuole proporre una soluzione al problema, cercando di accelerare l'endotelializzazione sul PET. La ricerca è stata condotta da Vishwanath Bhattacharya et al. nel 2000. Si persegue l'obiettivo suddetto utilizzando particolari cellule dalle quali derivano quelle del midollo osseo e che hanno sulla loro superficie l'antigene CD34 (cellule CD34+), ed uno scaffold composito. L'impianto è stato poi effettuato nell'aorta toracica discendente di cane (Figura 1.30 B). Lo studio è stato condotto da Vishwanath Bhattacharya, Peter A. McSweeney, Qun Shi, Benedetto Bruno, Atsushi Ishida, Richard Nash, Rainer F. Storb, Lester R. Sauvage, William P. Hammond, and Moses Hong-De Wu.

In questa sede si descrivono la preparazione dello scaffold ed i risultati ottenuti al termine della sperimentazione.

Come anticipato, il supporto per la semina delle cellule CD34+ non è composto esclusivamente da PET, ma è questo materiale che vi si trova in prevalenza. Si tratta infatti di un impianto in cui si è unito un condotto di 8 mm di diametro e 4 cm di lunghezza realizzato in PET *knitted* corrugato, con alle estremità due segmenti della stessa lunghezza e dello stesso diametro ma in ePTFE (politetrafluoroetilene espanso). Il tutto è stato rivestito con della gomma siliconica, lasciando uno spazio tra lo strato esterno e la parte interna in Dacron (Figura 2.18 A).

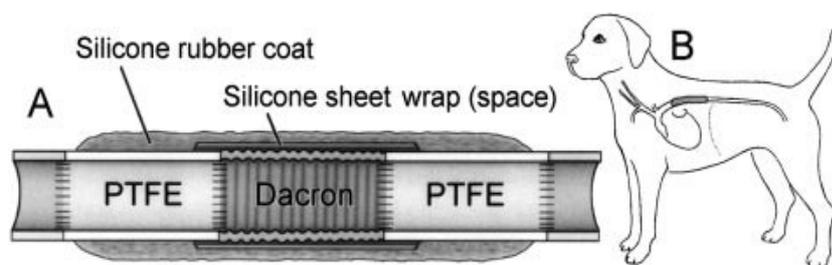


Figura 2.18- Struttura del graft composito (A). Impianto nel modello canino (B).

La parte centrale di Dacron è proprio quella che è stata interessata dalla semina delle cellule. Il metodo utilizzato per la preparazione dello scaffold consta di 4 passaggi e prevede la coagulazione preimpianto. In primo luogo è stata mescolata una sospensione di 1 mL di cellule CD34+ con sangue venoso periferico proveniente dalla cavia ed è poi stata iniettata all'interno del condotto protesico e nello spazio tra parte in Dacron e rivestimento di silicone. Per permettere che tutto il vaso fosse impregnato di tale composto, si è fatto ruotare il graft per circa 5 minuti. Nei due seguenti passaggi, dopo aver ripulito il condotto da eventuali residui in eccesso dallo step precedente, si sono inseriti dentro al lume 5 mL di sangue venoso periferico, cosicché si è formato un coagulo di fibrina sia sulle pareti che sulla superficie del vaso in Dacron. Nel quarto ed ultimo passaggio si è unita la sospensione di sangue e cellule CD34+ rimaste dal primo step con 5 mL di sangue contenente eparina (4 mL di sangue ed 1 mL di eparina). Iniettando il tutto all'interno della protesi si induce una diminuzione della trombogenicità, prevenendo fenomeni di rigetto quando, una volta innestato, il graft entrerà a contatto col sangue dell'ospite. Lo scaffold così preparato è stato successivamente conservato in una struttura spugnosa umida per circa 20 minuti a temperatura ambiente. Oltre agli innesti così preparati, si sono utilizzati anche graft di controllo, i quali sono invece stati trattati solamente con sangue venoso.

Gli impianti sono dunque stati inseriti all'interno di 10 cani e le analisi post-impianto sono state effettuate 4 settimane dopo l'intervento chirurgico. A tal punto non sono stati riscontrati fenomeni di degradazione o di infezione, il graft è ricoperto da tessuto pleurico e nello spazio tra la parete di PET ed il rivestimento di silicone è stato evidenziato un coagulo di sangue. Inoltre, sebbene ad occhio nudo i graft seminati con le CD34+ e quelli di controllo sembrassero uguali, si è visto che ci sono invece differenze relative al tessuto che vi si era formato sopra. In effetti, per quanto concerne gli impianti seminati, essi presentavano uno strato di neointima spessa $174 \pm 53 \mu\text{m}$ e costituita da cellule endoteliali ed infiammatorie. Al contrario, sulla maggior parte dei graft di controllo si è osservata una neointima spessa $124 \pm 94 \mu\text{m}$ composta da coagulo di fibrina, macrofagi, neutrofili, globuli rossi e cellule

giganti. Sia nel caso delle protesi seminate con le CD34+ che nelle altre si è poi osservato che nello spazio tra parete e silicone si formava uno strato di fibrina con all'interno globuli rossi e cellule infiammatorie.

Una grande differenza tra le due tipologie di graft invece si è riscontrata relativamente all'angiogenesi. In effetti, negli impianti seminati si è notata la formazione di microvasi sanguigni nella neointima, nelle pareti del condotto e nello spazio parete-gomma siliconica. In quest'ultimo punto i microvasi risultano più grandi, mentre più sottili quelli formati nella neointima e nello spazio intraparietale. Tali capillari di diverse forme e dimensioni hanno pure mostrato la tendenza a collegarsi tra di loro (Figura 2.19), superando il problema precedentemente esposto per cui a causa dello strato di fibrina che si crea nel condotto tali vasi rimangono sconnessi. Nelle protesi di controllo sono molto meno numerosi invece questi capillari. Infine in entrambi i casi non sono stati evidenziati osteociti, osteoblasti o in generale fenomeni di microcalcificazione 4 settimane dopo l'impianto.

Si può così concludere che, almeno in un modello canino, l'endotelializzazione e la formazione di microvasi sanguigni in una protesi vascolare può essere raggiunta seminando le cellule CD34+ su di un supporto composto in prevalenza di Dacron.

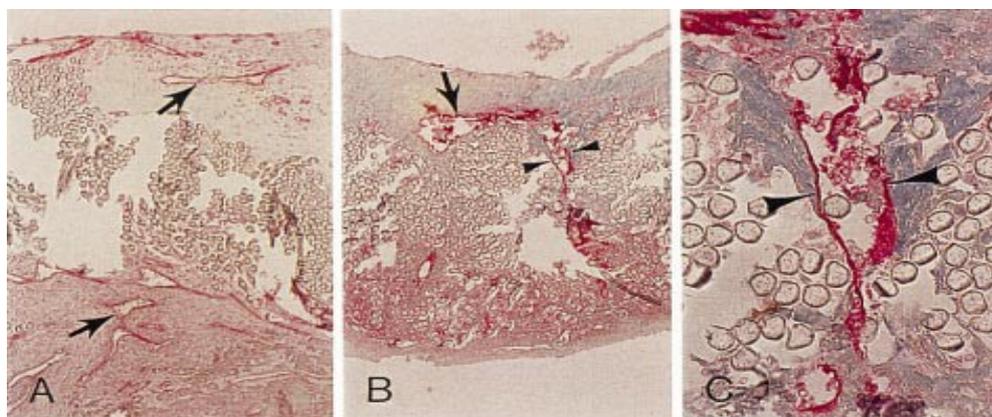


Figura 2.19- Formazione di microvasi nei graft seminati. (A) Nella neointima e nello spazio esterno del graft ($\times 75$). (B) Microvaso (freccia) e microvaso attraverso la parete del graft (punte delle frecce) ($\times 75$). (C) Zoom dell'area in B (punte delle frecce) ($\times 300$).

2.3.3 Teflon

Il Teflon è il polimero del tetrafluoroetilene e l'altro nome con il quale viene identificato è infatti politetrafluoroetilene (PTFE). Esso è il più importante ed utilizzato tra i polimeri a base di fluoro e carbonio, tra i quali si ricordano anche il politetrafluorocloroetilene (PTFCE), il polivinilfluoruro (PVF) ed il copolimero etilene-propilene perfluorato (FEP). Nessuno di questi però possiede le caratteristiche del PTFE: eccellente inerzia chimica,

insolubilità in acqua o altri solventi organici, eccellenti proprietà dielettriche, stabilità meccanica, elevata temperatura di rammollimento (342 °C), antiaderenza e proprietà autolubrificanti.

Il metodo utilizzato per produrre componenti in Teflon è molto simile a quello usato per la metallurgia delle polveri. Si parte da una miscela di polveri di Teflon mescolate con un lubrificante quale ad esempio la nafta; si modella poi la geometria voluta mediante uno stampo ed una volta ottenuta, si esegue un riscaldamento fino ad una temperatura superiore a quella di rammollimento, compattando dunque le polveri attraverso una specie di sinterizzazione. Infine, a seconda del grado di cristallinità desiderato, si esegue un raffreddamento a velocità controllata. Il grado di cristallinità dipende sia dalla struttura dei componenti del polimero, sia dalla “storia” meccanica e termica dello stesso. Il tipo di lavorazione e le temperature raggiunte influiscono dunque sulla struttura del Teflon, e di conseguenza sulle sue proprietà fisico-meccaniche.

In genere il PTFE viene utilizzato nella sua forma non porosa per applicazioni quali tenute, elementi antifrizione, rivestimenti antiaderenti; si può però anche ottenere Teflon poroso, attraverso tecniche con cui si formano fibre, che vengono in seguito lavorate analogamente a quanto mostrato per il Dacron.

A partire dal Teflon, verso la metà degli anni '60 si è sviluppato il politetrafluoroetilene espanso (ePTFE), denominato anche Gore-Tex. Esso ha trovato applicazione nell'ambito delle protesi vascolari nella seconda metà degli anni '70.

L' ePTFE si ottiene con uno speciale processo di stiramento ad alta temperatura che genera nodi di PTFE interconnessi da sottili fibrille altamente orientate (Figura 2.20).

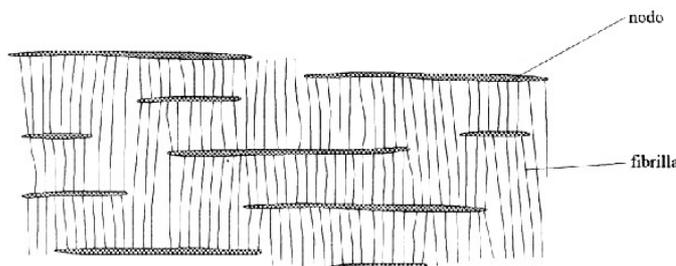


Figura 2.20- Struttura dell' ePTFE (Gore-Tex).

Il Gore-Tex dunque è un polimero poroso non degradabile con una superficie elettronegativa, la quale limita le reazioni con i componenti del sangue. Esso risulta essere biostabile, infatti ha una minor tendenza, ad esempio, a deteriorarsi in ambiente biologico rispetto al PTFE. In genere comunque il comportamento che esso ha in ambiente biologico è

influenzato dal tipo di lavorazione a cui è sottoposto.

Il grado di porosità viene misurato in base alla distanza tra i nodi di PTFE (IND = *internodal distance*), che può variare dai 30 ai 90 μm . Sono state prodotte varianti di graft in ePTFE di diversa porosità e tra queste in particolare se ne ricorda una innestata in alcuni babbuini (Golden *et al.* 1990). Si trattava di innesti di 4 mm ad alta porosità (IND di 60 μm) e su di essi si notò la ricrescita di endotelio sulla superficie luminale. Un esperimento compiuto poi sull'uomo, utilizzando sempre graft in ePTFE ad alta porosità, ha evidenziato come esso induca la formazione di capillari, sebbene questi non si siano espansi per tutto lo spessore della parete e non fosse presente uno strato interno di endotelio.

Considerando ora invece il ePTFE a bassa porosità (IND $\leq 30 \mu\text{m}$) non si sono riscontrate differenze rispetto agli impianti realizzati in Dacron. Anche le risposte dell'ambiente fisiologico umano infatti sono simili per entrambi i tipi di graft: dopo l'impianto si nota la mancanza di strato endoteliale sulla superficie interna del lume, si sviluppa un coagulo di fibrina o un materiale amorfo ricco di piastrine e tra 1 e 6 mesi una matrice esterna di collagene che si infiltra all'interno della protesi.

2.3.4 Studio sull'ePTFE

Qui di seguito si illustra uno studio condotto per valutare la biostabilità di un impianto in politetrafluoroetilene espanso altamente poroso. Lo studio qui esposto è stato condotto da Mitsuhiro Isaka *et al.* nel 2006. In esperimenti precedenti si è dimostrato che maggiore era la porosità del materiale, migliore era l'integrazione dello stesso con l'ambiente fisiologico. Lo svantaggio accertato però era che un impianto caratterizzato da alta porosità risultava anche fragile e quindi non utilizzabile clinicamente. Nel presente studio dunque si è realizzato un graft altamente poroso, ma biocompatibile e con la capacità di integrarsi nei tessuti dell'ospite. L'innesto è stato inserito nell'aorta addominale di undici cani di razza beagle di entrambi i sessi e con peso compreso tra i 10 ed i 12 kg.

Nel graft utilizzato la distanza internodale media era di 60 μm e la struttura dall'esterno all'interno comprendeva tortuosi canali formati da fibrille e nodi di PTFE. L'impianto era lungo 30-40 mm, il suo diametro interno misurava 6 mm ed è stato rinforzato da un filamento di fluoroetilenopropilene. Gli undici graft sono stati poi inseriti nelle cavie ed estratti ad intervalli di 2 settimane (4 graft), 4 settimane (altri 4 graft) ed 80 settimane (3 graft).

Sugli impianti asportati si sono valutate la resistenza alla tensione radiale, quella a trazione longitudinale, la forza di ritenzione della sutura ed il tasso di deformazione. Questo è stato

calcolato in percentuale, come rapporto tra il diametro massimo su quello minimo. Per quanto riguarda invece la resistenza alla trazione così come la forza della sutura, essa è stata definita come il valore massimo di forza per pervenire a rottura (MPa). I risultati hanno mostrato che negli innesti non c'era traccia di alcuna occlusione o problemi a livello di anastomosi. Il tasso di deformazione rilevato è stato di $100 \pm 0\%$ dopo due settimane, $106 \pm 7.3\%$ dopo 4 e $107 \pm 4.1\%$ dopo 80 settimane. Per quanto concerne le altre analisi, la resistenza a trazione radiale e longitudinale del graft prima dell'impianto erano 4.3 ± 0.4 Mpa e 17.2 ± 2.6 Mpa, dopo 2 settimane erano 4.4 ± 0.4 Mpa e 15.0 ± 1.5 Mpa, dopo 4 settimane erano 3.9 ± 0.3 Mpa e 12.2 ± 2.4 Mpa e dopo 80 settimane erano 4.1 ± 0.3 Mpa e 16.0 ± 0.4 Mpa rispettivamente. Alla fine dunque si può notare una certa stabilità delle due proprietà considerate. Per quanto riguarda inoltre la forza di ritenzione della sutura, prima dell'impianto era di 479.3 ± 51.0 g e dopo 80 settimane era di 550.7 ± 81.6 g; non c'è quindi una sostanziale differenza tra prima e dopo l'innesto.

Molti studi precedenti, come accennato, sono stati condotti per testare le proprietà dei graft in ePTFE ma non si era mai trovata l'applicabilità di impianti che avessero alta porosità. Nel 1975 infatti Campbell et al. in seguito ad uno studio conclusero che la distanza internodale ottimale era quella di $22 \mu\text{m}$, in quanto una maggiore porosità era associata ad una minore conservazione della protesi a lungo termine nei modelli canini, dovuto alla crescita nell'impianto di una pseudointima troppo spessa. Negli anni '80 e '90 però si sono condotti ulteriori esperimenti in cui si sono valutate le prestazioni di innesti con porosità via via maggiori; questo perché i pori di grandi dimensioni consentivano una veloce crescita di tessuto dall'esterno del graft fino all'interno dei suoi interstizi, consentendo una grande integrazione della protesi con l'ambiente biologico. Ma, come anticipato, tali innesti mancavano di resistenza meccanica. Questo studio però ha invece dimostrato che è possibile ottenere un graft in ePTFE che, oltre ad essere biocompatibile e favorire la crescita tessutale, risulta anche stabile in quanto non presenta fenomeni di deformazione o di cedimento se sottoposto a sollecitazioni radiali e longitudinali. Deve però ancora essere testato su modelli umani.

2.3.5 Poliuretani

I poliuretani sono una famiglia di polimeri elastici che si formano per reazione tra alcoli ed isocianati bifunzionali e che contengono un gruppo uretanico ($[-\text{NH}-(\text{CO})-\text{O}-]$). Questo implica la presenza contemporanea della funzione ammidica e di quella esterea. Se invece si fanno reagire isocianati bifunzionali e diammine si giunge alla formazione delle poliuree.

Generalmente i poliuretani sono dei copolimeri a segmenti o a blocchi, costituiti da 3 diversi monomeri: un segmento cristallino denominato *hard segment* per la sua rigidità, un monomero che serve come estensore della catena, ed un segmento amorfo definito *soft segment* più morbido. Alle temperature fisiologiche l'*hard segment* contribuisce a definire la resistenza meccanica e la rigidità del materiale, mentre il *soft segment* influisce sulla sua elasticità e flessibilità. Le proprietà meccaniche del polimero dunque dipendono dal rapporto tra le due fasi e dagli intermedi usati per la sintesi.

A seconda della loro microstruttura, i poliuretani possono distinguersi in fibrillari o schiumosi. Se infatti durante la reazione di polimerizzazione si aggiungono piccole quantità d'acqua, si ottengono le cosiddette schiume poliuretatiche.

In ambito biomedico i poliuretani utilizzati si basano su un *soft segment* formato da poliestere, polietere o policarbonato ed hanno trovato le loro prime applicazioni in contesto medico sin dagli anni '60 (Boretos e Pierce, 1967). L'approvazione di tale polimero in ambito clinico risale però solo al 2000, in quanto le prime tipologie di poliuretani sperimentate non misero in luce i risultati sperati. In effetti si riscontrò un notevole svantaggio: la biodegradazione idrolitica che rilascia nell'ambiente biologico ammine aromatiche potenzialmente cancerogene e porta al fallimento dell'impianto protesico. Studi successivi hanno comunque consentito di realizzare dei graft in poliuretano che sono risultati stabili nei confronti dell'idrolisi e dell'ossidazione e che favoriscono una veloce endotelializzazione. Sia i poliuretani fibrillari che quelli schiumosi però rendono difficile la crescita di capillari al loro interno; per quanto concerne i primi, essi mostrano una crescita di uno strato di fibrina sulla superficie luminale che è più spesso di quello osservato sui graft in *knitted* Dacron, e sulla superficie esterna si rileva la presenza di macrofagi. Nei poliuretani schiumosi, invece, i pori facilitano la crescita di capillari e più i pori sono grandi, più è garantita la vascolarizzazione dell'impianto e più ridotta è l'indesiderata azione infiammatoria dei macrofagi. In ogni caso però la crescita dei capillari è fermata quando essi raggiungono lo strato di fibrina interno alla protesi. Sono in ogni caso richieste ulteriori sperimentazioni in quanto i risultati sull'uomo non sono ancora ottimali.

2.3.6 Studio sui poliuretani

In questo studio si è indagato il comportamento di un innesto vascolare realizzato con uno scaffold in poli(carbonato-urea)uretano (CPU) e cellule umane provenienti dai vasi sanguigni del cordone ombelicale. Si tratta di cellule del tessuto muscolare liscio (SMCs), usate per rivestire il supporto, e di cellule endoteliali (ECs) su di esso seminate. Il graft così

ottenuto è stato impiantato in modelli canini per 36 mesi, dopo essere stato sottoposto a trattamenti specifici ed analizzato in vitro. Tale ricerca è stata condotta nel 2008 da S. T. Rashid et al.

Inizialmente del poliolo poliuretano secco è stato portato a 60 °C e poi mescolato con 9.1 g di 4,4'-metilene bisfenil isocianato (MDI), causando dunque la reazione tra i due, posti sotto azoto e formando così un prepolimero. A questo sono stati aggiunti 100 g di dimetilacetammide fino a formare una soluzione. In seguito, per ottenere l'estensione della catena, si è aggiunta una miscela di etilendiammina e dietilammina alla dimetilacetammide secca. Alla soluzione è stato infine aggiunto del butanolo in 2 g di dimetilacetammide ed i polimeri CPU sono poi stati estrusi a basse temperature.

Una volta preparato lo scaffold, esso subisce trattamenti per valutare la resistenza a sollecitazioni meccaniche. Per soppesare i risultati dati dal processo di preconditionamento, metà degli impianti sono stati coltivati in situazioni statiche, mentre l'altra metà è stata posta in un circuito in cui si sono esercitate sollecitazioni di taglio di bassa intensità. Dopo 2 ore tutti i graft sono stati inseriti nel circuito, in cui però si era aumentata l'intensità della sollecitazione, per emulare il flusso e la pressione arteriosa. Lo stesso esperimento è stato poi nuovamente effettuato, ma non più comparando una coltura statica con un preconditionamento costante a bassa intensità, bensì confrontando quest'ultimo con il cosiddetto *incremental preconditioning*; ogni 3 giorni si è infatti aumentata l'intensità delle sollecitazioni dentro al circuito, incrementando il flusso interno.

In generale si è comunque visto che il preconditionamento, sia costante che incrementale, ha portato ad una proliferazione e ad un attaccamento maggiore delle cellule sullo scaffold rispetto a quanto si osserva invece dopo una coltura statica (Figura 2.21).

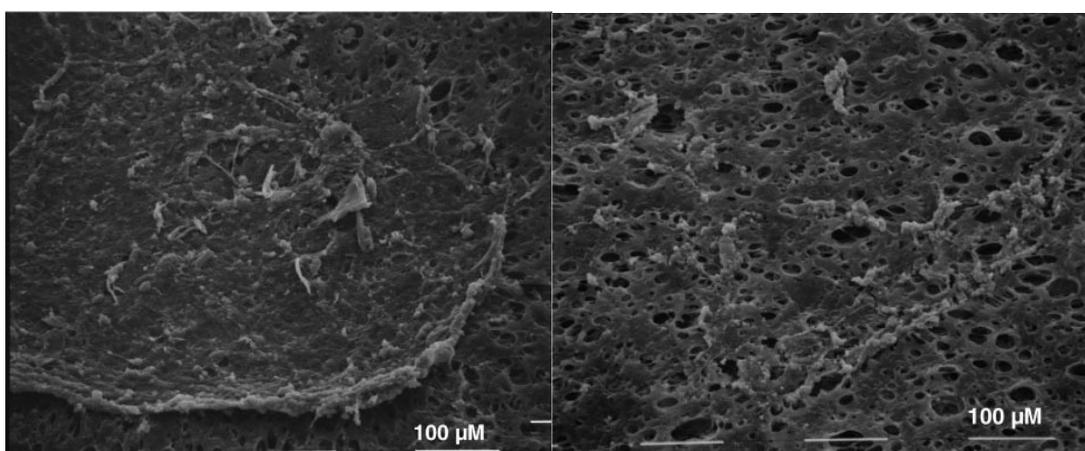


Figura 2.21- Immagini SEM di graft in CPU con cellule EC e SMC: dopo trattamento di preconditioning (sinistra) e dopo coltura statica (destra).

È noto poi che sia le cellule sia la matrice extracellulare, se sottoposte a sollecitazioni meccaniche, possono orientarsi sia in vivo che in vitro. Ecco perché in questo studio prima dell'impianto si è posto lo scaffold in CPU contenente le cellule all'interno di un apposito circuito, in cui si riproduce il flusso pulsatile del sangue. Si sono in questo modo ricreate tutte le sollecitazioni che il graft ritroverà in vivo: pressione idrostatica, forze tangenziali e circonferenziali. Come conseguenza si è notata la differenziazione, la proliferazione e l'attaccamento al supporto sia delle cellule endoteliali che di quelle muscolari; inoltre sono state prodotte molecole della ECM quali il collagene e la fibronectina. Il trattamento di preconditioning deve però essere protratto per una settimana prima che il tasso di ritenzione cellulare rimanga costante.

Una volta assodato che trattando lo scaffold si hanno migliori risultati piuttosto che lasciandolo in coltura statica, si è indagata l'eventuale differenza tra un trattamento con sollecitazioni ad intensità bassa e costante e uno in cui essa viene incrementata lentamente. È risultato che la ritenzione delle cellule sul supporto è maggiore se questo viene sottoposto all'*incremental preconditioning*.

Infine, si è osservato che i trattamenti proposti in questo studio, oltre che migliorare aspetti legati alle interazioni cellule-supporto, sono importanti anche per le caratteristiche meccaniche dello scaffold. In effetti la resistenza meccanica di quest'ultimo è incrementata in seguito ai trattamenti di preconditioning.

In conclusione sono molti gli aspetti positivi legati agli scaffold in poliuretano, anche se si stanno ancora indagando le condizioni ottimali per i trattamenti.

2.3.7 PGA e PLA e copolimeri

Il PGA, il PLA ed i loro copolimeri sono polimeri biodegradabili, che dunque rimangono intatti per il periodo di tempo necessario ad espletare la loro funzione e poi scompaiono dall'organismo.

Il PGA (acido poliglicolico) è un polimero cristallino derivante dall'acido glicolico, la cui cristallinità è compresa tra 35-75%, la temperatura di fusione è di 225-230 °C e quella di transizione vetrosa è tra i 35 ed i 40 °C (soglia al di sotto della quale il polimero è duro, rigido e trasparente, ed al di sopra della quale diventano invece possibili dei movimenti delle molecole della catena). Il PGA è stabile termicamente ed il tempo di degradazione è 6-12 mesi. La sua forma ad alto peso molecolare è insolubile in qualunque solvente organico, ma può essere disciolta da solventi contenenti molti atomi di fluoro, mentre quella a basso peso molecolare è lentamente idrolizzata in acqua; in ambiente fisiologico dunque, degrada

fino ad essere assorbito in circa 4 settimane dall'impianto ed escreto in 4-6 mesi. Il processo di degradazione in cui incorre il PGA consta di due passaggi: in primis l'acqua entra nelle zone amorfe del materiale rompendo i legami esterei; successivamente si assiste all'erosione della parte cristallina, giungendo così al prodotto della degradazione, l'acido glicolico. Uno degli aspetti fondamentali per cui il PGA è molto usato come componente degli scaffold biodegradabili è che, una volta degradato, non rilascia nell'ambiente fisiologico sostanze tossiche; anzi l'acido glicolico può entrare nel ciclo di Krebs e poi venire escreto in forma di acqua ed anidride carbonica, o anche di urea.

Il PLA (acido lattico) è un poliestere lineare biodegradabile prodotto a partire dall'acido lattico. Per la precisione, esso è convertito nel dimero (lattide), che è purificato e polimerizzato ad acido polilattico senza bisogno di solventi. L'acido lattico poi è una molecola chirale (non è dunque sovrapponibile alla sua immagine speculare) e quindi ne esistono due forme isomeriche: D- (presente allo 0.5%) e L- (presente al 99.5%). Poiché l'acido lattico è chirale e possiede due centri di asimmetria, esso esiste in quattro forme differenti e questo permette di produrre PLA con diverse proprietà. In generale, la polimerizzazione del lattide verso polimeri ricchi di L-isomero fornisce prodotti cristallini, mentre quelli che contengono più del 15 % di D-isomero sono più amorfi. Il PLA, per la presenza del gruppo metilico laterale ha proprietà chimiche, fisiche e meccaniche diverse rispetto al PGA; per esempio risulta essere più idrofobico ed infatti diviene biodegradabile in seguito ad idrolisi a temperatura maggiore di 60 °C ed umidità maggiore del 20%.

Come anticipato, si possono ottenere diverse forme di acido polilattico e tra queste si ricordano l'acido poli(L-lattico) (PLLA) e l'acido poli(D,L-lattico) (PDLLA). Il 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. E' meno cristallino del PGA, con grado di cristallinità intorno al 35%.

Il PDLLA ha una distribuzione casuale degli isomeri D- ed L- lungo la catena polimerica; è un materiale amorfo e trasparente ed il suo punto di transizione vetrosa varia con il peso molecolare, restando intorno ai 50-60 °C. Inoltre, la degradazione del PDLLA risulta più veloce di quella del PLLA; a seconda delle dimensioni e dello spessore del campione, l'idrolisi del PDLLA si completa in 2-12 mesi.

Largamente utilizzati sono anche i copolimeri di PGA e PLA, tra i quali si ricorda per esempio il PLGA. A seconda del rapporto tra acido lattico e acido glicolico si ottengono PLGA differenti, ma in generale essi sono tutti più amorfi anziché cristallini, presentano una temperatura di transizione vetrosa tra i 40 ed i 60 °C e possono essere degradati molto più

facilmente rispetto ai loro monomeri. Si è anche dimostrato che la forma equimolare (50% di acido lattico e 50% di acido glicolico) presenta la maggiore velocità di degradazione ed il suo tempo di emivita in vivo è di circa 15 giorni. Il PGLA, come il PGA ed il PLA, possiede il vantaggio di non produrre elementi tossici in seguito alla sua degradazione; può insorgere comunque qualche problema nelle persone intolleranti al lattosio.

2.3.8 Studio sul PGA

Questo studio prevede la costruzione di impianti vascolari di piccolo diametro, composti da uno scaffold costituito da polimeri biodegradabili, sul quale sono state seminate cellule endoteliali e miofibroblasti vascolari di ovino. La ricerca qui riportata è del 2001 ed è stata condotta da Simon P. Hoerstrup et al. Anche in questo studio, una volta preparato lo scaffold, lo si è posto in un sistema che emulasse le condizioni che il graft avrebbe trovato in vivo. Si è infatti ricreato un flusso pulsatile applicato all'interno del lume della protesi, generando dunque una sollecitazione tangenziale ed una periodica distensione radiale della parete del condotto, proprio come accade per un vaso naturale interessato dal flusso ematico.

Il supporto è stato realizzato a partire da una maglia di fibra di acido poliglicolico di 10 mm di spessore, rivestita da uno strato di poli-4-idrossibutirato (P4HB), immergendola in una soluzione di tetraidrofurano (1% peso/volume di P4HB). Il P4HB è un biopolimero assorbibile resistente, duttile e termoplastico; può dunque essere modellato in qualsiasi forma. Nel caso specifico si sono fabbricati scaffold tubulari con un diametro interno di 0.5 cm ed una lunghezza di 4 cm. Infine si è sterilizzato il supporto con ossido di etilene. Sullo scaffold così ottenuto si sono seminati i miofibroblasti ed il tutto è stato coltivato in un mezzo nutriente per 4 giorni in incubatore (37 °C, 5% di CO₂). In seguito si sono seminate anche le cellule endoteliali e la protesi è stata trasferita in un bioreattore, dove è stata sottoposta a sollecitazioni meccaniche via via crescenti. Il mezzo di coltura è stato cambiato ogni 7 giorni.

Le analisi effettuate dopo il periodo di trattamento hanno dimostrato che dopo 21 giorni compare un denso strato di tessuto sulla superficie luminale, mentre è meno sviluppato quello che compare sulla parte esterna. Questi risultati sono relativi alle protesi sottoposte alle sollecitazioni meccaniche, mentre per quanto concerne quelle coltivate staticamente la proliferazione e l'organizzazione tessutale è inferiore. Si è poi notato un continuo incremento di collagene e dunque una progressiva strutturazione della matrice extracellulare, fondamentale per la stabilità meccanica dell'impianto. Inoltre già dopo 14

giorni si assiste ad un orientamento delle cellule sul supporto nella direzione del flusso a cui sono sottoposte nel bioreattore (Figura 2.22).

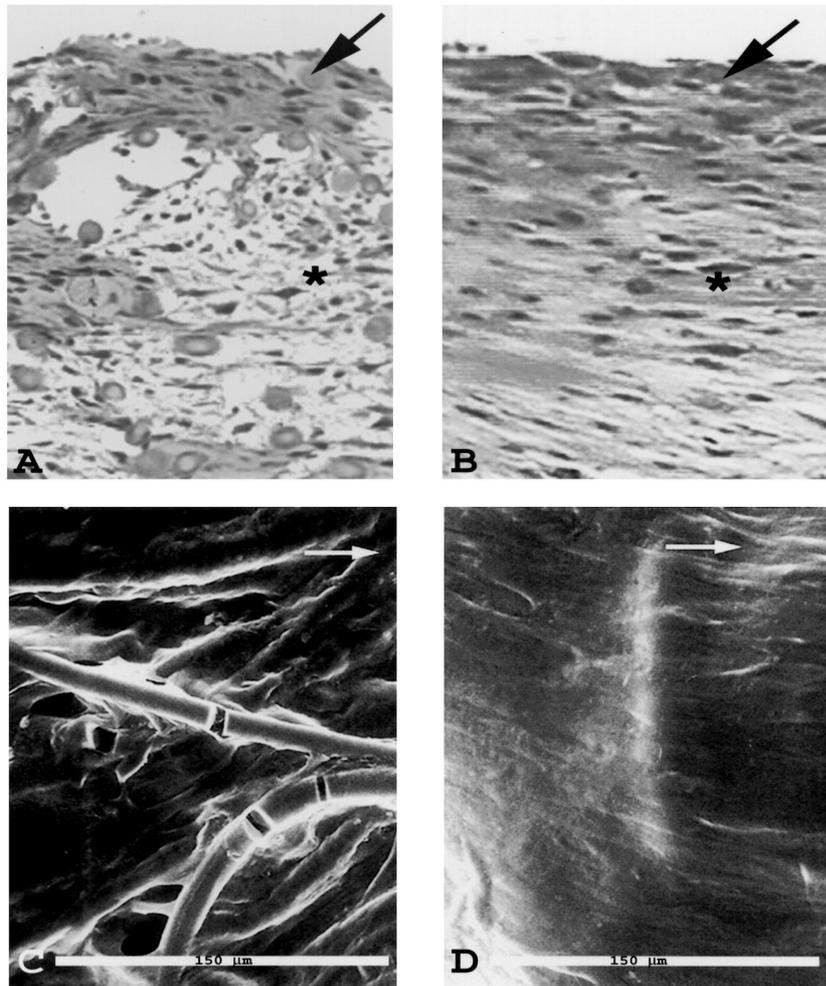


Figura 2.22- Parte superiore: istologia (H&E $\times 100$) del TEBV dopo 21 giorni di coltura in vitro. Si compara il graft coltivato staticamente (A) con quello sottoposto a flusso pulsatile (B), in cui si nota lo strato luminale sviluppato (freccia) e la spessa matrice extracellulare esterna (*). Parte inferiore: immagini SEM in cui si vede la differenza tra la liscia superficie luminale dei graft trattati (D) e quella meno omogenea dei graft coltivati staticamente (C). In D si nota anche l'orientamento delle cellule nella direzione del flusso (freccia bianca = direzione flusso in vitro).

Anche dal punto di vista delle proprietà meccaniche poi si è osservato un accrescimento della resistenza dell'impianto e una maggiore forza di ritenzione delle suture, ben 5 volte superiore a quella misurata negli innesti posti in coltura statica. Si è però notato un inconveniente: la diminuzione dello spessore del condotto protesico sia nei graft sollecitati meccanicamente, sia in quelli coltivati staticamente.

Si può comunque concludere che ponendo l'impianto in fase di crescita in un ambiente simile a quello incontrato in vivo si accelera la proliferazione del tessuto e la formazione di un innesto stabile.

CAPITOLO 3

Bioreattori per vasi sanguigni ingegnerizzati

3.1 Introduzione

Si è già visto più volte in precedenza come l'ingegneria tessutale rappresenti un'alternativa interessante al classico approccio allo sviluppo di impianti protesici. Essa infatti si pone l'obiettivo di sviluppare sostituti biologici o ibridi per i tessuti danneggiati, ma che a differenza degli innesti convenzionali possiedono la capacità di crescere, rimodellarsi, autoripararsi e dunque integrarsi completamente con i tessuti biologici. L'ingegneria tessutale e gli impianti da essa realizzati possono dunque essere definiti, come affermò Williams, come “la persuasione del corpo a curare se stesso, attraverso la distribuzione verso gli appropriati siti, di segnali molecolari, cellule e strutture di supporto”.

Nel perseguire il fine ultimo di un graft vascolare ingegnerizzato, si riscontrano però diverse problematiche. Innanzitutto gli innesti devono possedere le adeguate proprietà meccaniche, oltre che quelle funzionali, e si devono poi considerare le eventuali reazioni immunitarie da parte dell'ambiente ospite. Inoltre, in vivo, lo sviluppo ed il rimodellamento del tessuto sono controllati da un complesso insieme di fattori regolatori che interagiscono a vari livelli. Nella fase di preparazione del graft si è reso quindi necessario riprodurre un ambiente “biomimetico”, cioè un ambiente di coltura tridimensionale che simuli le condizioni in cui la protesi si troverà in vivo. In questo modo si può dirigere in vitro la differenziazione e la proliferazione cellulare sul graft, anticipando il processo che dovrebbe poi avvenire anche in vivo e che dovrebbe portare alla rigenerazione tessutale. Ecco dunque che si progettano i bioreattori, nei quali si provvede a fornire all'impianto quei fattori precedentemente citati che regolano i processi cellulari negli organismi viventi, così come gli specifici stimoli meccanici e biochimici ai quali sarà soggetto il graft una volta innestato.

Focalizzando ora gli aspetti che si vogliono controllare in una protesi posta in un bioreattore, si citano la proliferazione cellulare, l'orientamento e la distribuzione delle cellule ed in generale le proprietà meccaniche dell'innesto (cellule e scaffold). Innanzitutto, per quanto riguarda la crescita di tessuto (e dunque la migrazione, la proliferazione e la differenziazione cellulare), ma anche la sua organizzazione, si deve ricordare che si tratta di processi determinati dalla capacità delle singole cellule di interagire con l'ambiente esterno. Da qui giungono differenti segnali che, una volta captati, vengono indirizzati al nucleo in

cui si assiste all'espressione/repressioni di particolari geni.

Nei bioreattori si cerca quindi di controllare proprio tali segnali extracellulari in modo da determinare il destino delle cellule. Sono molteplici i segnali che esse interpretano e, sia presi singolarmente sia nelle loro combinazioni, possono essere determinanti per la crescita e l'organizzazione del tessuto. Tra i differenti segnali si ricordano i fattori di crescita e differenziazione, la natura e la disposizione dei componenti della matrice extracellulare, le interazioni intercellulari, le sollecitazioni meccaniche ed altri fattori quali la tensione dell'ossigeno o il pH.

Per quanto concerne invece il comportamento meccanico dell'impianto, un importante processo è quello della meccanotrasduzione. È un fenomeno per cui le cellule tramutano in segnali biochimici le sollecitazioni meccaniche subite, modificando dunque le loro funzioni ma anche la loro distribuzione in risposta alle forze esterne. Gli stimoli meccanici che vengono forniti alla protesi nel bioreattore risultano fondamentali almeno per due motivi: preparare l'innesto a sopportare i carichi presenti in vivo e stimolare le cellule ad assumere le funzionalità necessarie alla sopravvivenza ed allo sviluppo nell'ambiente fisiologico.

3.2 I bioreattori

Un bioreattore è un sistema che simula l'ambiente fisiologico e permette il controllo delle singole variabili in modo tale da poter creare, condizionare e testare cellule, tessuti, organi e supporti in vitro. Molteplici sono gli ambiti nei quali risulta utile ricorrere all'utilizzo di un bioreattore: nelle industrie farmaceutiche, in quelle alimentari ed in quelle biotecnologiche così come nella produzione della birra per esempio. In questa sede si trattano i bioreattori per l'ingegneria tessutale, dei quali esistono varie tipologie a seconda della dimensione, della complessità e dell'ambiente fisiologico del tessuto da ingegnerizzare. In ogni caso, nella loro varietà devono però adempiere ad almeno una delle seguenti funzioni fondamentali:

- la sopravvivenza dell'impianto attraverso l'apporto ed il mantenimento di specifiche concentrazioni di nutrienti e gas;
- la distribuzione uniforme delle cellule sullo scaffold tridimensionale;
- la somministrazione di adeguati stimoli per preparare il graft alle condizioni biologiche in vivo.

Come ovvio, un ulteriore importante requisito per un bioreattore è la capacità di mantenere le sue funzionalità per un periodo di tempo sufficiente allo sviluppo tessutale sullo scaffold; si può arrivare anche a 3-4 mesi.

3.2.1 Crescita e sopravvivenza del tessuto nel bioreattore

Il bioreattore deve garantire la sopravvivenza del graft in esso contenuto e dunque è necessario che provveda ad un continuo apporto di sostanze nutrienti ed ossigeno, oltre che consentirne la diffusione verso l'interno dell'impianto; il sistema deve poi permettere l'allontanamento dei prodotti del metabolismo.

Negli organismi viventi il trasporto di nutrienti ed ossigeno viene effettuato dalla rete vascolare e, prevalentemente attraverso diffusione; nell'impianto protesico ingegnerizzato però sono assenti, almeno inizialmente, i capillari ed il trasporto diffusionale in sé copre solo distanze ridotte. Perciò non si ha un adeguato passaggio di sostanze dal mezzo di coltura alla protesi. Per esempio si è notato che in un bioreattore l'ossigeno riesce a diffondere solamente a 100 μm di profondità nel graft, lasciando ipossico lo strato più interno (Figura 3.1).

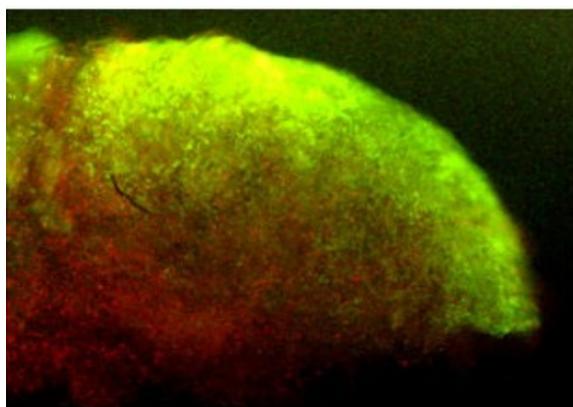


Figura 3.1- Tessuto cardiaco ingegnerizzato con colorante. Le cellule in verde sono quelle viventi, mentre quelle morte sono colorate in rosso.

Un metodo pensato per risolvere il problema è quello della perfusione diretta della protesi con il mezzo di coltura; si fa dunque fluire quest'ultimo sul graft, imitando l'azione svolta dal sangue nell'ambiente naturale. In alternativa si è realizzata una struttura di canali inserita in un polimero elastico altamente poroso, in modo da emulare la rete di capillari nativa. Per cercare di riprodurre il sangue all'interno di questi tubuli si fa scorrere il mezzo di coltura unito ad una emulsione di perfluorocarbonio (PFC).

Un ulteriore aspetto a cui dovrebbe provvedere un bioreattore è la crescita del tessuto e si è già accennato che per raggiungere questo scopo si devono manipolare diversi fattori e segnali di vari natura. Tra quelli solubili si ricordano per esempio le citochine, i fattori di crescita, le proteine morfogenetiche, gli ormoni steroidei e gli ioni. Si è osservato che l'influenza che essi esercitano sulle cellule è strettamente legata al loro dosaggio, tanto che

dosi eccessive possono condizionare negativamente le cellule stesse e le loro funzioni. Inoltre un ruolo importante nella crescita cellulare, così come nell'adesione e nella differenziazione, è rivestito dalla matrice extracellulare. Essa funge da intermediario tra i segnali biologici e le cellule, conferisce stabilità all'impianto, ne favorisce l'integrazione con l'ambiente circostante, consente l'organizzazione del tessuto e la comunicazione tra le cellule. Le sue funzioni sono dovute sia alla natura dei suoi singoli componenti sia alla sua struttura in generale. In un bioreattore si dovrebbero quindi immettere quelle sostanze che di norma compongono la ECM e ricrearne la sua struttura. Per quanto concerne il primo aspetto, si inseriscono nel bioreattore componenti della matrice solubili ed insolubili, quali ad esempio le proteine collagenose e non, proteoglicani e glicosaminoglicani (GAGs).

Come accennato sopra, la matrice permette alle cellule di comunicare tra loro e dunque consente loro di organizzarsi, in modo tale da ottenere un tessuto ben strutturato. Ecco quindi che un altro parametro che un bioreattore può controllare è proprio l'interazione cellule-cellula e ECM-cellula, a seconda del modo in cui si desidera organizzare il tessuto nello spazio. Le suddette interazioni sono poi influenzate dalle sollecitazioni meccaniche alle quali il tessuto viene sottoposto.

Si deve inoltre ricordare che il ciclo vitale delle cellule e la loro differenziazione sono dipendenti dalla morfologia delle stesse. In effetti la ECM può modulare i segnali biologici in modo tale da alterare l'attività di certi enzimi (chinasi), il che si ripercuote sulla progressione del ciclo cellulare. Oppure si è visto che se, durante la formazione del tessuto, si interviene a livello dei legami tra cellule e matrice e quelli tra cellule e cellule, si giunge ad un tessuto ed a risposte cellulari che invece sono assenti in caso di coltura statica.

Esistono poi cellule/tessuti che in natura generano autonomamente dei segnali elettrici oppure che necessitano degli stessi. Si è notato infatti che questi stimoli influenzano l'allineamento e l'accoppiamento delle cellule, favorendo l'organizzazione tessutale ma anche migliorando la funzionalità del tessuto. Questo fenomeno dimostra ancora una volta l'interdipendenza esistente tra struttura e funzione del tessuto ed inoltre evidenzia che le conseguenze indotte dalle sollecitazioni elettriche sono simili a quelle incontrate in seguito a sollecitazioni meccaniche.

Il bioreattore è anche da considerarsi come uno strumento di indagine e non solo come un passaggio nel processo di preparazione di un impianto ingegnerizzato. Esso deve dunque permettere il monitoraggio dello stato del graft durante il periodo di coltura e consentire così di valutare i pro e i contro dei trattamenti proposti, oltre che suggerire il momento ottimale per l'innesto della protesi. I metodi che si applicano per tale monitoraggio variano a seconda

del tessuto, anche se si è osservato che una tecnica efficace è il controllo del livello di glucosio. Questi metodi possono quindi essere analisi istochimiche ma anche monitoraggi delle proprietà meccaniche, se ad esempio la funzionalità principale del tessuto in vivo dovrà essere appunto quella meccanica. In generale comunque, tali tecniche dovrebbero assicurare l'integrità del tessuto monitorato ed essere dunque non invasive; su tale aspetto si sta tuttora indagando.

3.2.2 Stimoli meccanici nel bioreattore

All'interno dell'ambiente simulato dal bioreattore, così come in vivo, le sollecitazioni meccaniche applicate all'impianto sono importanti sia nell'ambito della crescita e della organizzazione del tessuto, sia per quanto riguarda le proprietà fisiche finali del graft. Gli stimoli fisici infatti modificano la morfologia cellulare, la disposizione degli organelli all'interno delle cellule, l'orientamento e la distribuzione delle stesse sullo scaffold, ma possono anche essere tradotti in segnali biochimici; questo conduce a modulazioni dei segnali che di norma si trasmettono tra le cellule, risultando anche in alterazioni della funzionalità cellulare. Ragion d'essere di questo ultimo aspetto è che lo stimolo meccanico porta ad un'alterazione dell'espressione dei geni e quindi in ultimo anche dell'attività della cellula. Un esempio è rappresentato da uno studio condotto da Zimmermann e Eschenhagen per ottenere tessuto cardiaco ingegnerizzato. Durante la coltura, sono stati applicati stimoli meccanici per 7 giorni e come risultato si è ottenuto un tessuto ben strutturato, cellule ben accoppiate ed anche buona capacità di contrazione. Oppure ancora, negli studi relativi agli scaffold riportati in precedenza si è più volte sottolineato come si ottengano migliori impianti protesici in seguito al trattamento in sistemi con flusso pulsatile, anziché in coltura statica.

Per riassumere, gli stimoli meccanici dei quali si parla sono la pressione idrostatica, esercitata dai fluidi interstiziali, il flusso idrodinamico, che interagendo con la matrice extracellulare provoca uno sforzo di taglio (*shear stress*), sforzi di trazione, compressione e taglio.

Per entrare un po' più nello specifico, si è dimostrato che il tessuto risponde alle sollecitazioni meccaniche attraverso una variazione di flusso del liquido interstiziale e che tali stimoli sono mediati dalle integrine, similmente a quello che, come già visto, accade per gli stimoli biochimici nella fase di adesione cellulare. Gli input meccanici passano tramite tali proteine di membrana e, una volta giunti al citoscheletro (in particolare ai filamenti di

actina), vengono trasdotti al nucleo, dove si innescano l'inibizione o l'espressione di particolari geni. Tale espressione può tradursi in un cambiamento del fenotipo cellulare e quindi stimolare la produzione di determinate proteine. Studi hanno dimostrato che non è solo l'innesto protesico in sé a beneficiare degli effetti delle sollecitazioni meccaniche, ma anche la ECM. Si è per esempio osservato che, se nel bioreattore si riproduce un carico ciclico che viene protratto a lungo, si giunge ad un aumento di organizzazione anche all'interno della matrice; inoltre si è visto che nella realizzazione di tessuto cartilagineo, per esempio, il tasso di sintesi di ECM aumenta se il tessuto viene sottoposto a compressioni a frequenze fisiologiche.

Per quanto concerne i bioreattori per gli impianti vascolari, fondamentale è stata la realizzazione di sistemi nei quali si può combinare la riproduzione della sollecitazione idrodinamica e di quella meccanica (Figura 3.2).



Figura 3.2- Il bioreattore Leeds per valvole cardiache.

3.3 Tipologie di bioreattore

Differenti sono le tipologie di bioreattore realizzate e ciò dipende dal fatto che devono essere progettati rispettando le specifiche ambientali (condizioni necessarie alla sopravvivenza delle cellule), le specifiche funzionali (stimoli meccanici specifici sul costruito) e le specifiche utente (per poter essere usati da personale non tecnico). Le variabili associate alle specifiche suddette sono molteplici e riassunte nello schema in Figura 3.3.

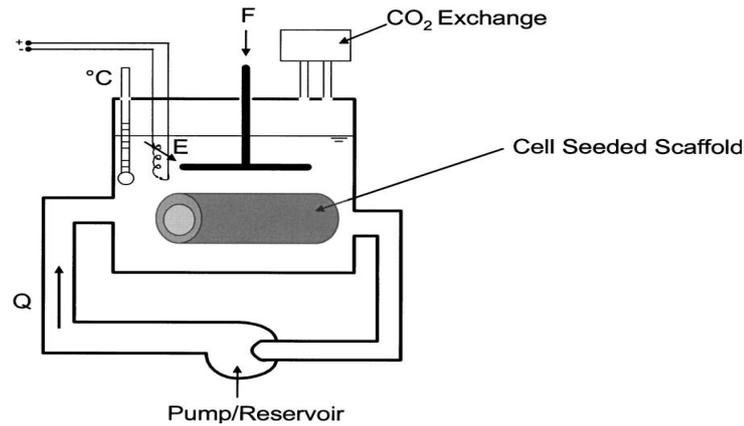


Figura 3.3- Schema delle principali variabili presenti in un bioreattore.

Per quanto riguarda le specifiche ambientali, l'impianto deve essere coltivato in condizioni di sterilità, il ricambio del medium dev'essere agevole e l'ambiente deve essere mantenuto a 37°C con atmosfera controllate (O₂ 20% e CO₂ 5%). Deve inoltre esserci un buon trasferimento di massa in fase liquida e fase gas. Le variabili legate a tali specifiche sono la pressione parziale dell'ossigeno e dell'anidride carbonica, il pH, l'umidità e la composizione del medium di coltura.

Per quanto concerne invece le specifiche funzionali, le variabili sono il flusso (Q), controllato in composizione, pressione e temperatura (eventuali fonti di calore, E), le forze (in generale F) pulsatili, quelle di taglio, le forze di pressione, la frequenza di sollecitazione, la portata.

Infine le specifiche utente definiscono che l'interfaccia di utilizzo sia semplice, intuitiva ed efficace per il controllo e la verifica dei parametri di coltura e che si possano prevedere le condizioni di rischio.

Così come si sono citate le variabili che possono trovarsi in qualsiasi tipo di bioreattore, si ricordano ora i componenti che risultano ricorrenti (Figura 3.4). Si specifica che il reservoir è la camera in cui è contenuto il medium di coltura, che viene diffuso attraverso la pompa; nella camera di processamento invece si posiziona il graft da trattare.

Visti i caratteri generali dei bioreattori, si procede con la caratterizzazione delle tre grandi tipologie nelle quali essi possono essere suddivisi: sistemi statici, sistemi dinamici e sistemi biomimetici.

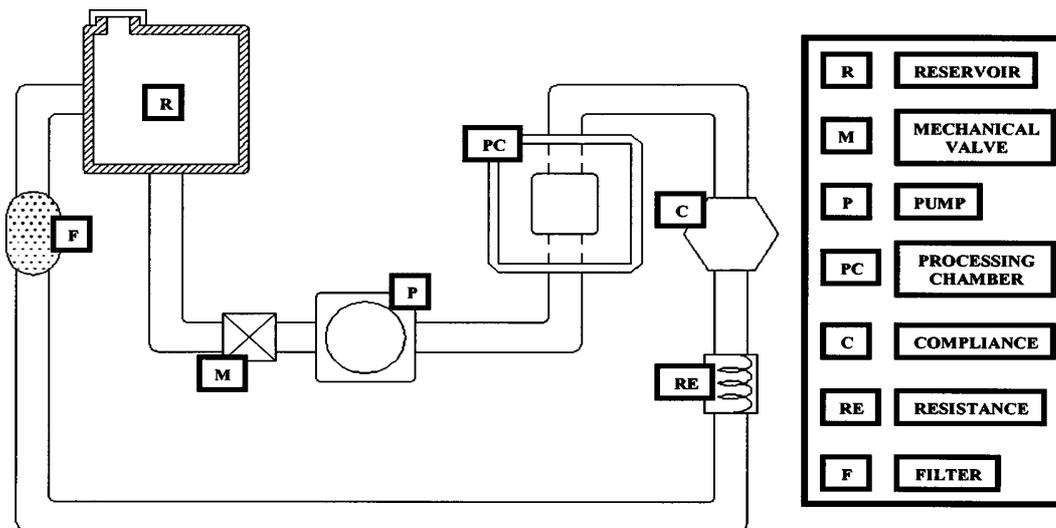


Figura 3.4- Schema di un sistema a flusso pulsatile.

3.3.1 Bioreattori statici

Questi bioreattori sono di certo i più semplici, ma anche i meno utilizzati visti i vantaggi apportati da sistemi dinamici. Essi non sono nient'altro che un contenitore all'interno del quale viene inserito il medium di coltura e l'impianto ingegnerizzato. All'interno si può ricreare sia un ambiente statico che uno parzialmente dinamico, grazie ad un agitatore meccanico. In un bioreattore statico le specifiche funzionali non sono soddisfatte in modo adeguato, mentre le specifiche ambientali di base possono essere soddisfatte senza problemi, nel senso che si garantisce la crescita e la sopravvivenza del tessuto. In effetti le due condizioni principali per cui questo accada sono raggiunte: si provvede ad un'aerazione superficiale di gas e ad un trasporto di sostanze attraverso diffusione. Nel caso invece del bioreattore statico con agitatore meccanico, il trasporto delle sostanze si ha per convezione turbolenta ed il tessuto che cresce sul costruito non risulta uniforme. In entrambi i tipi di bioreattore statico comunque non si riescono a riprodurre sollecitazioni meccaniche adeguate e questo comporta che il tessuto che si ottiene è di certo con un'organizzazione ed una stabilità minore rispetto a quello ottenuta da coltura dinamica. Valutati dunque i vantaggi apportati dagli stimoli fisici durante la fase di crescita tessutale, si sta abbandonando questo tipo di sistema di coltura.

3.3.2 Bioreattori dinamici

Questa tipologia permette di imporre una maggiore varietà di sollecitazioni meccaniche al

tessuto ingegnerizzato e tra i vari tipi di tale bioreattore si ricorda per esempio lo *spinner flask*. Si tratta di uno dei primi sistemi utilizzati per la coltura 3D in condizioni dinamiche di condrociti ed anche uno dei più semplici bioreattori. Il magnete all'interno della flask è libero di ruotare per effetto di un campo magnetico imposto dall'esterno. La rotazione del magnete sul fondo della camera tiene in movimento continuo il medium, mentre i supporti contenenti il costrutto sono fissati alla struttura della flask. Questo sistema risolve anche il problema della sterilità evitando l'utilizzo di giunture o organi meccanici interni azionati dall'esterno. I tappi laterali posti sulla flask consentono l'immissione di sostanze e il ricambio del medium (Figura 3.5). Il movimento del medium fornisce una sollecitazione meccanica sulle cellule, stimolandone l'attività e migliorando il trasporto di sostanze nutritive e di scarto. Nonostante ciò, lo *spinner flask* non sembra essere una soluzione ottimale perché elevati sforzi di taglio inducono la formazione di una capsula fibrosa esterna sul costrutto in crescita.

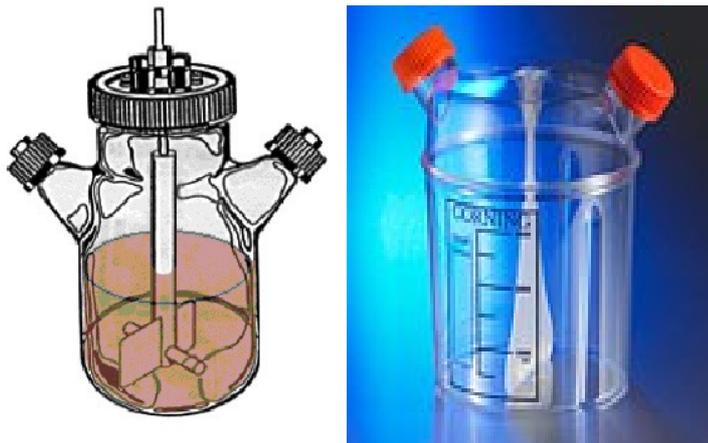


Figura 3.5- Schema (sinistra) e foto (destra) di uno *spinner flask*.

Un altro tipo di bioreattore dinamico è il bioreattore a parete rotante (Figura 3.6), realizzato per la prima volta dalla NASA. Si tratta di una camera cilindrica rotante rispetto ad un asse orizzontale in cui i costrutti sono liberi di muoversi all'interno del medium; per effetto del diverso bilancio tra forze centrifughe e forza di gravità esiste un movimento relativo tra costrutto e fluido. Poiché la camera di coltura è colma di fluido ed in rotazione, il sistema prevede un circuito di perfusione per permettere l'inserimento ed il ricambio del medium. In questo tipo di bioreattori i costrutti, in uno stato di caduta libera all'interno del medium, risultano sottoposti a bassi sforzi di taglio. Anche in questo caso il flusso di medium è solo superficiale e fatica a raggiungere il centro dei costrutti, creando un ostacolo all'omogeneità

degli stimoli chimici imposti.

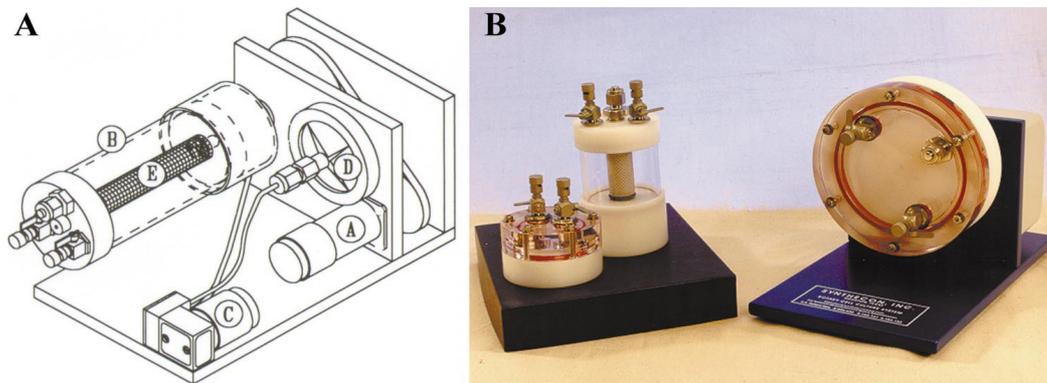


Figura 3.6- Sinistra: schema di un bioreattore a parete rotante. Si noti il motore elettrico (A), che fa ruotare il vaso cilindrico di coltura (B). C'è poi una pompa pneumatica (C) collegata ad un filtro (D) e, sull'asse centrale, si trova un ossigenatore (E). Destra: nella foto si mostrano anche alcuni cilindri di diverso volume.

Sempre nell'ambito degli studi della NASA relativi al bioreattore a parete rotante, si studiarono le camere di perfusione, per permettere la coltura cellulare nella microgravità dello spazio oppure per eseguire degli studi in particolari condizioni gravitazionali. In tali strutture i costrutti cellulari sono fissati alla camera di coltura e vengono stimolati idromeccanicamente attraverso il passaggio del medium all'interno della camera. Con un sistema a perfusione diretta gli effetti meccanici risultanti sono più uniformi. E' bene evitare l'unidirezionalità di movimento del fluido, che determinerebbe una non uniforme deposizione della matrice lungo lo spessore del costrutto. In particolare si otterrebbero sia diverse condizioni di trasferimento di massa che differenti stimolazioni meccaniche sui lati opposti del costrutto cellulare. Si è dimostrato che una perfusione interstiziale confinata, costringente il medium a passare per il centro del costrutto, consente di ottenere risultati migliori rispetto alla perfusione. La normale perfusione lascia al medium di coltura la possibilità di un percorso alternativo, solo superficiale e lungo i bordi, ritornando quindi a condizioni di coltura simili a quelle dei primi due sistemi considerati.

Si può dunque parlare ora dei bioreattori a perfusione e/o pressione idrostatica. Le stimolazioni riprodotte sono ottenute tramite un pistone capace di trasferire la forza di attuazione al medium di coltura che, essendo incompressibile e rinchiuso in una camera stagna e indeformabile, si pressurizza.

E' possibile applicare lo stimolo meccanico sul costrutto secondo due diversi metodi:

- 1) i costrutti rimangono in coltura statica e periodicamente vengono trasferiti nella

camera del bioreattore a pressione idrostatica dove rimangono solo per il tempo necessario all'applicazione dello stimolo pressorio;

- 2) i costrutti sono soggetti a coltura perfusa all'interno del bioreattore a cui si alterna la stimolazione meccanica (bioreattore a perfusione/pressione idrostatica).

Il bioreattore a perfusione e pressione idrostatica (Figura 3.7) è composto da:

- camera di coltura dove è alloggiato il porta campione;
- circuito idraulico per il ricircolo del medium, comprendente una pompa a due canali;
- circuito pneumatico per attivare il pistone che pressurizza la camera di coltura e per comandare speciali valvole in grado di isolarla durante i cicli di pressurizzazione;
- centralina elettronica per programmare il funzionamento dell'intero sistema di coltura.



Figura 3.7- Parte del bioreattore a perfusione per applicare cicli di pressione idrostatica (camera di coltura, attuatore pneumatico e valvole idrauliche).

La camera di coltura di tale bioreattore soddisfa i seguenti requisiti: un basso volume di riempimento (20 ml), condizioni di simmetria in entrambe le direzioni di movimento del fluido, equa distribuzione del medium all'interno della camera ed facile espulsione delle bolle d'aria eventualmente presenti. Il basso volume di riempimento consente di poter effettuare un ricircolo più rapido del medium durante la perfusione ed inoltre si limitano i costi del ricambio del medium.

Il circuito idraulico è composto da due tubi ossigenatori che sono connessi l'uno a monte e l'altro a valle della camera di coltura, in modo tale da poter migliorare l'ossigenazione del medium che entra nella camera di coltura quando la direzione del flusso viene invertita. Anche in questo bioreattore ovviamente si trova un reservoir, che costituisce la riserva di medium necessaria a mantenere costantemente riempito tutto il sistema e consente di eliminare eventuali bolle d'aria che vi giungono dalla camera di coltura.

Una pompa roller a due canali permette di movimentare il fluido all'interno del circuito, essa

è gestita da un controllore elettronico, che inverte la direzione di rotazione dei rulli e quindi anche quella di perfusione, ad intervalli prestabiliti.

Il circuito pneumatico infine è sostanzialmente diviso in due rami: uno comanda il pistone pneumatico deputato a pressurizzare il fluido presente all'interno della camera di coltura, il secondo attiva le valvole idrauliche posizionate rispettivamente all'ingresso e in uscita della camera di coltura. Un compressore, dotato di filtro per eliminare le impurità dell'aria, fornisce il mezzo per mettere in moto il pistone e per comandare le valvole idrauliche.

3.3.3 Bioreattori biomimetici

In questi sistemi si va oltre a quanto visto nei due tipi di bioreattori precedenti. Oltre a realizzare un ambiente in vitro che permetta la crescita e la sopravvivenza del tessuto ed in cui si riproducano certi stimoli meccanici, nei bioreattori biomimetici si imitano anche le condizioni fisiologiche. Molteplici sono stati gli studi che hanno interessato tali reattori nell'ambito delle protesi cardiovascolari. Si ricorda per esempio Wolfenbarger che ha realizzato un dispositivo per ottenere lo sviluppo di tessuto su un graft devitalizzato e decellularizzato proveniente da uomo o animale; Goldstein che durante la costruzione di valvole cardiache ingegnerizzate ha sviluppato un sistema per riprodurre il flusso presente nell'aorta; Hoerstrup si interessò sia che di bioreattori per valvole cardiache, che per i condotti vascolari di piccolo diametro. Il sistema realizzato per questi ultimi è mostrato in Figura 3.8, ed è molto simile comunque a quello progettato per le valvole cardiache. Tale sistema è stato utilizzato per lo sviluppo di 4 protesi vascolari basate su scaffold composti da due polimeri biorassorbibili (PGA/P4HB), sui quali si sono seminate cellule endoteliali e miofibroblasti vascolari. Inizialmente il graft è stato lasciato in coltura statica, dopodiché è stato sottoposto ad un flusso pulsatile di medium nutritivo che è stato incrementato gradualmente col passare dei giorni, da 125 ml/min a 750 ml/min. La pulsatilità del flusso è stata permessa da una pompa ad aria, la quale ha stimolato una membrana elastica.

Si presenta ora un bioreattore biomimetico per condotti arteriosi (Figura 3.9), che, nonostante riproduca anch'esso la situazione di pressione e di flusso presente in vivo come il precedente, risulta avere però una struttura diversa. La circolazione pulsatile riprodotta dal sistema è generata da un modello di ventricolo sinistro, guidato da pressioni positive e negative. Esso produce un flusso principale che passa all'interno del vaso ingegnerizzato, mentre una seconda pompa genera un flusso secondario che interessa la parte esterna dell'impianto. Regolando il flusso e la pressione, così come la frequenza di sollecitazione, si possono riprodurre differenti condizioni fisiologiche. Comunque, una volta fissati i

parametri desiderati, essi possono essere gradualmente modificati in modo tale da simulare il processo di crescita da feto ad adulto. Nel sistema è presente anche un'unità resistiva periferica, atta a simulare la resistenza che si ritrova all'interno del sistema vascolare in vivo; c'è poi un'unità di ricambio di gas, essenziale per il mantenimento di un'atmosfera controllata all'interno del sistema. Il monitoraggio dei parametri nel bioreattore è reso possibile da un trasduttore di pressione ed una sonda di flusso elettromagnetica.

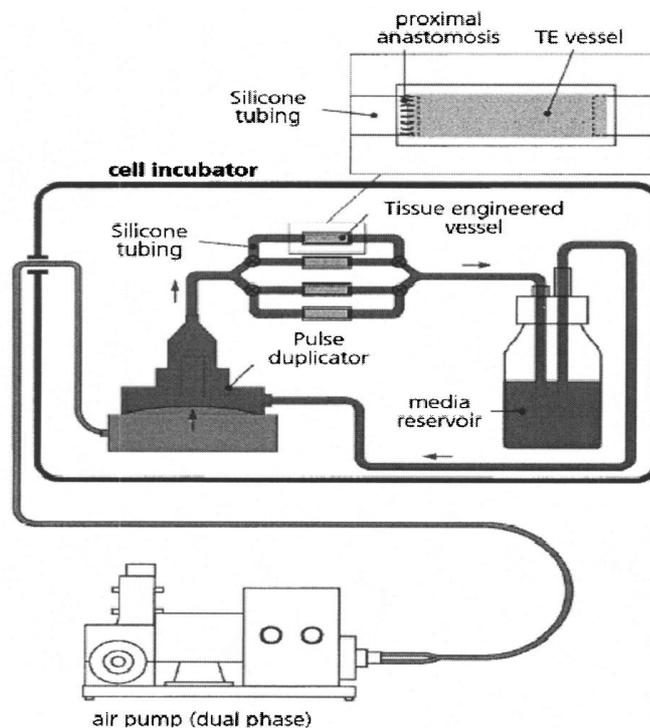


Figura 3.8- Schema del sistema usato da Hoerstrup per protesi vascolari di piccolo calibro.

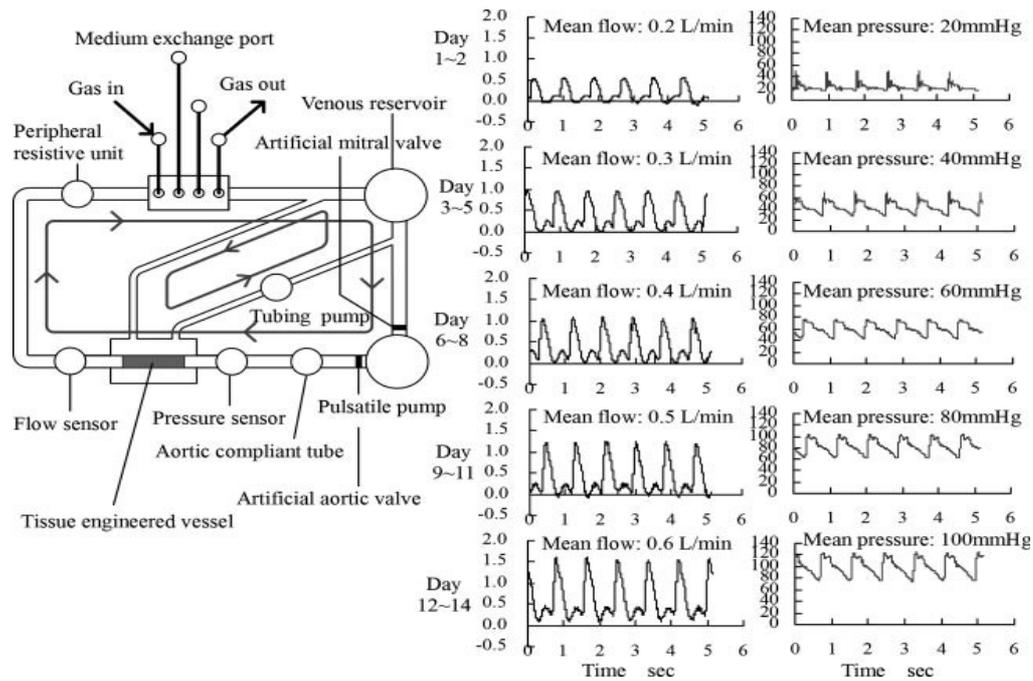


Figura 3.9- Schema del bioreattore pulsatile e monitoraggio del flusso e della pressione nei vari giorni di coltura.

Un ulteriore esempio di bioreattore è quello progettato da Seliktar (Figura 3.10), il quale ha ideato un sistema in cui sottoporre i costrutti tubulari ad una sollecitazione ciclica. Il terreno di coltura su cui porre lo scaffold seminato con le cellule è un tubo di silicone, messo a contatto con medium di coltura e controllato pneumaticamente. Un meccanismo ad aria compressa è collegato al tubo di silicone e le sollecitazioni meccaniche sono causate dal gonfiarsi e dallo sgonfiarsi del condotto. Il tutto è mantenuto in un incubatore con CO₂ a 37°C.

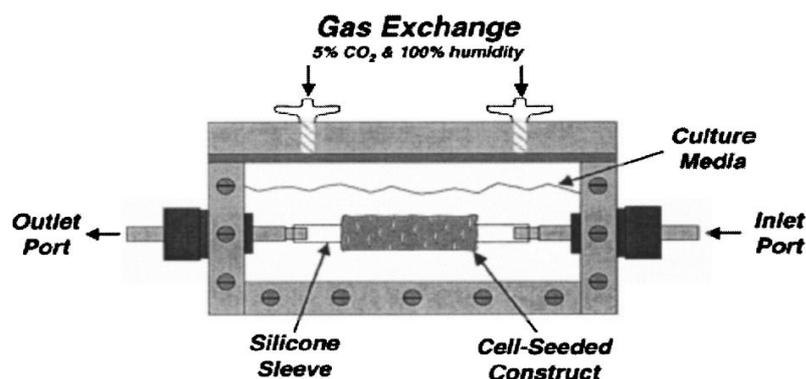


Figura 3.10- Bioreattore biomimetico di Seliktar.

Un altro studio in cui si è ricorsi all'utilizzo di un bioreattore biomimetico è stato quello condotto da L.E. Niklason et al. nel 1999; come obiettivo della ricerca si è posta la realizzazione di impianti vascolari arteriosi di piccolo calibro. Si è partiti da cellule

vascolari autologhe, seminate su uno scaffold polimerico biodegradabile e si è in seguito posizionato il graft in un bioreattore, il quale imitava le condizioni fisiologiche in cui l'innesto si è poi trovato in vivo. In realtà è più giusto parlare di sistema biomimetico, anziché di singolo bioreattore, in quanto il trattamento della protesi è avvenuto mediante un meccanismo costituito da più parti, tra le quali i bioreattori erano solo una componente. Come mostra la Figura 3.11 infatti, il sistema in questione presenta un serbatoio in cui è contenuto il medium di coltura, una pompa pulsatile, una camera di compliance, dei condotti e 4 bioreattori collegati in parallelo, simili a quello visto nello studio di Seliktar. In essi sono stati posizionati gli scaffold, una volta seminati con delle cellule muscolari aortiche e riempiti di medium di coltura ed altre sostanze, tra le quali acido ascorbico, prolina, alanina, glicina e 20% di siero fetale bovino. In ciascun bioreattore si è mantenuta una concentrazione di CO₂ del 10% e di umidità al 100% alla temperatura di 37°C. All'interno degli scaffold un tubo di silicone altamente elastico permette il passaggio del medium nel lume vascolare, evitando il rischio di sfaldamento a cui il graft sarebbe andato incontro nel caso in cui il flusso avesse interessato direttamente il lume.

La camera di compliance invece, posta tra la pompa ed i bioreattori, permette di evitare che le vibrazioni ad alta frequenza si trasmettano ai bioreattori. La pompa poi rende pulsatile il flusso proveniente dal serbatoio, in modo tale da emulare il flusso sanguigno, ed esercita una pressione di 270 ± 30 mmHg. Nello specifico si sono sollecitati gli impianti con una frequenza che varia dai 60 ai 165 battiti al minuto ed una distensione radiale del 5% ad ogni ciclo. Dopo 8 settimane è stato rimosso il tubo di silicone dall'interno degli scaffold, cosicché il flusso potesse entrare in contatto diretto con il lume dell'impianto. In tal modo il graft viene interessato anche da forze tangenziali, le quali sono state incrementate gradualmente in conseguenza all'aumento del flusso del medium, passando rispettivamente da 1×10^{-2} N/m² a 3×10^{-2} N/m² e da 0.033 a 0.1 ml/s.

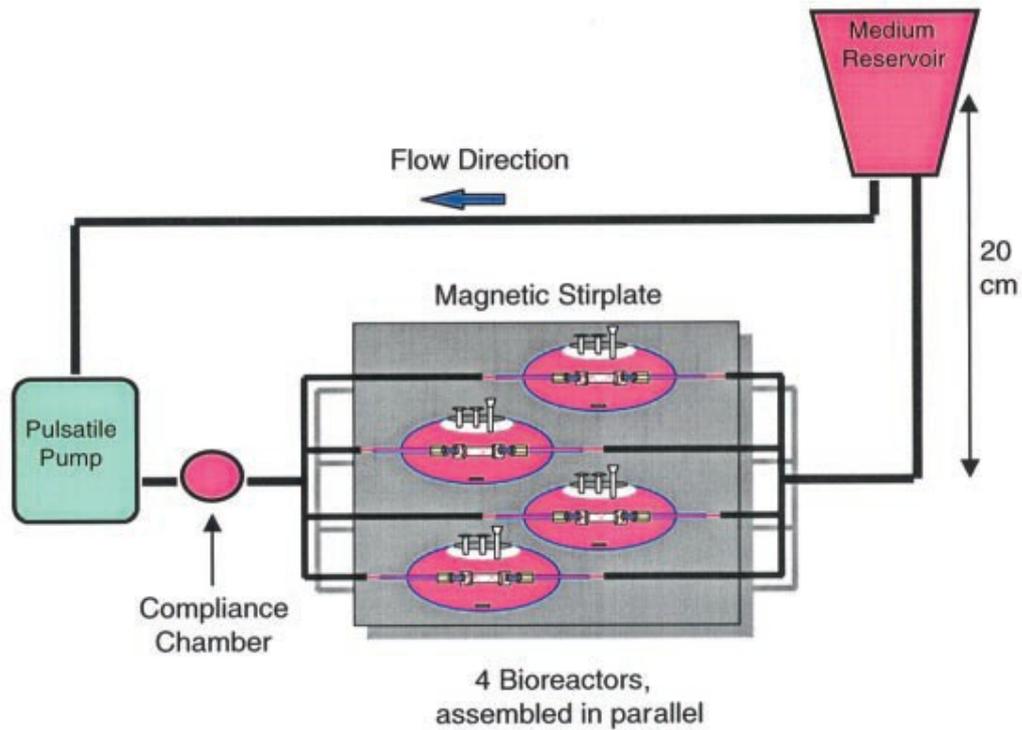


Figura 3.11- Sistema biomimetico di Niklason.

Si presenta un ulteriore studio, in cui si prende in considerazione un bioreattore ancora differente. Nel 2003, infatti, Theo Kofidis et al. hanno realizzato un reattore a camere multiple nelle quali si sono coltivati tratti di aorta di topo, avendo come fine ultimo quello di proporre un nuovo concetto di coltura di tessuto cardiovascolare. La ricerca nasce dal seguente problema: lo sviluppo del tessuto cardiaco, essendo ipermetabolico, richiede un notevole afflusso di nutrienti che non può essere supportato da semplici microcapillari. Ci si è posti dunque l'intento di generare un tessuto bioartificiale contenente un vaso di largo calibro, che poi si dirami a sua volta in vasi più piccoli.

Il bioreattore utilizzato per raggiungere l'obiettivo è quello mostrato in Figura 3.12. Esso è composto da diverse camere in parallelo senza collegamenti tra di loro; in ognuna delle camere sono sistemati i tratti aortici suddetti, con le estremità posizionate rispettivamente in una delle due aperture laterali, che permettono il passaggio del medium all'interno dei tratti vascolari. Una volta applicati i vasi, si inserisce in ogni camera un composto liquido di collagene e cardiomiociti di topo, lasciandolo consolidare per 30 minuti prima di iniziare la perfusione. Successivamente si collega un contenitore all'ingresso della camera, il quale funge da reservoir contenente il medium di coltura, e così anche all'uscita si è posto un contenitore per le sostanze di scarto. Il tutto è stato inserito in un incubatore a 37 °C e con il 5% di CO₂.

Una micropompa consente al perfusato di raggiungere il vaso in condizioni di flusso pulsatile.

Ciascuna camera possiede poi due coperture, definite rispettivamente ‘culture cover’ e ‘drug administration cover’. La prima è un vetro trasparente, utile all’osservazione dell’ambiente di coltura, mentre la seconda presenta dei diaframmi attraverso i quali è possibile iniettare o aspirare medium.



Figura 3.12- Bioreattore a camere parallele.

Infine si riporta qui uno studio condotto nel 2008 da Edward I. Chang et al., nel quale si sono considerati gli EMB come possibili bioscaffold. Gli EMB sono un insieme di vasi naturali espianati, nello specifico un’arteria afferente, dei letti capillari ed una vena efferente, e tessuto parenchimale. Un bioreattore consente il mantenimento delle loro funzioni e della loro struttura, permettendo ad essi di venire poi seminati con cellule staminali e reimpiantati nell’ospite.

Nello specifico il bioreattore (Figura 3.13) è essenzialmente un sistema a perfusione, composto da un ossigenatore, una pompa, una camera per il tessuto, un reservoir ed un sistema di acquisizione dati. Il perfusato scorre all’interno dei condotti del sistema in un’unica direzione: dal reservoir esso raggiunge l’ossigenatore, passa poi attraverso il tratto arterioso dell’EMB, i capillari ed infine esce dal tratto venoso ritornando al reservoir. Il medium utilizzato è stato supportato anche da altre sostanze quali siero di ratto (5%), penicillina/streptomina (20%) e 20 U/ml di eparina. Gli EMB poi sono stati fissati in una matrice di 1% di PBS-agarosio, in modo tale che mantenessero inalterata la struttura e la pressione idrostatica al loro interno.

È presente inoltre una valvola per evitare che la perfusione ad alta pressione danneggi il sistema. Essa consente anche di regolare il flusso di perfusato e dunque di sottoporre il tessuto a pressioni variabili, in un range di portate che va da 0.2 ml/min a 5 ml/min.

Come si può vedere, il bioreattore imita il principio di funzionamento dell'apparato cardiocircolatorio, ponendo dunque i vasi in una situazione del tutto simile a quella presente nell'organismo ospite. Attraverso il sistema di acquisizione dati inoltre si possono monitorare fino a 10 parametri simultaneamente.

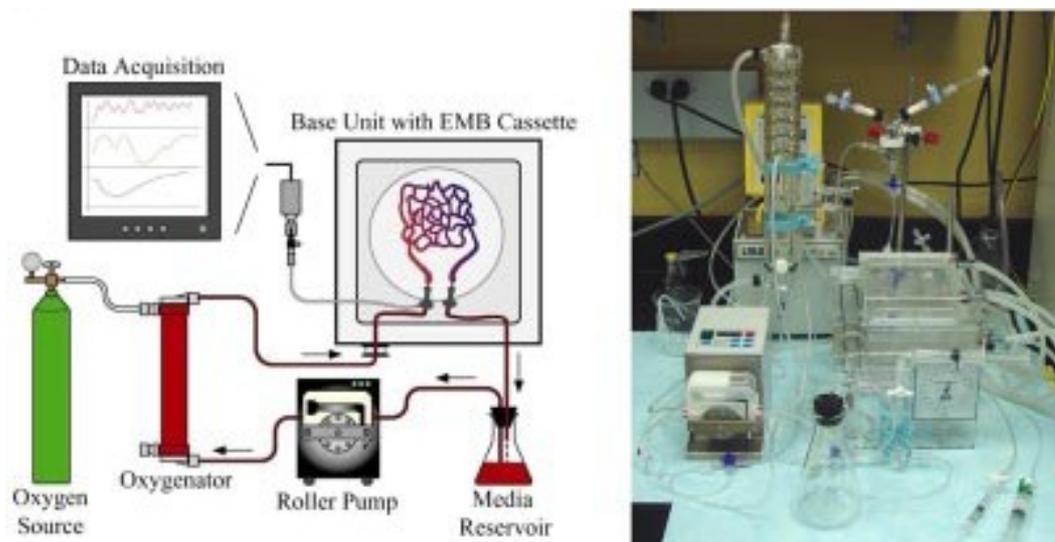


Figura 3.13- Bioreattore a perfusione (sinistra) e setup del laboratorio.

CONCLUSIONI

Nel primo capitolo si è parlato delle innovazioni che l'ingegneria tessutale ha apportato nell'ambito degli impianti protesici; i bioreattori sono strumenti essenziali per il perseguimento degli scopi di quella ricerca che è iniziata nel momento in cui Weinberg e Bell hanno realizzato il primo *tissue-engineered blood vessel* (TEBV).

Diversi studi hanno infatti dimostrato che i costrutti posti in un bioreattore (dinamico o biomimetico) migliorano molto le proprietà fisiche-meccaniche. Già negli studi preliminari di Hoerstrup si è osservato che usando un bioreattore biomimetico a flusso pulsatile si accelera la crescita cellulare, si incrementa l'organizzazione tessutale e si aumenta il deposito di matrice extracellulare attorno all'impianto. Inoltre, la superficie luminale dei graft risulta molto più omogenea rispetto a quella delle protesi coltivate staticamente. Dal punto di vista meccanico si nota un aumento della stabilità e della resistenza; per esempio un condotto realizzato sotto condizioni di flusso pulsatile ha mostrato una soglia di massima resistenza a 326.3 mmHg rispetto i 177.5 mmHg iniziali, dopo 21 giorni di coltura.

Anche Seliktar ha riportato un incremento delle proprietà meccaniche di un suo costrutto trattato dinamicamente rispetto ad un graft non trattato. Questo prima del trattamento presentava una tensione circonferenziale massima di 16 kPa e un modulo elastico di 68 kPa; dopo essere stato immesso in un bioreattore, il massimo stress sopportabile è cresciuto a 58 kPa ed il modulo elastico misurato è stato di 142 kPa. Seliktar ha anche mostrato come le cellule muscolari si orientino circonferenzialmente e si distribuiscono omogeneamente attraverso la parete del vaso, rispetto a quanto osservato per i graft non trattati dinamicamente (Figura 3.14).

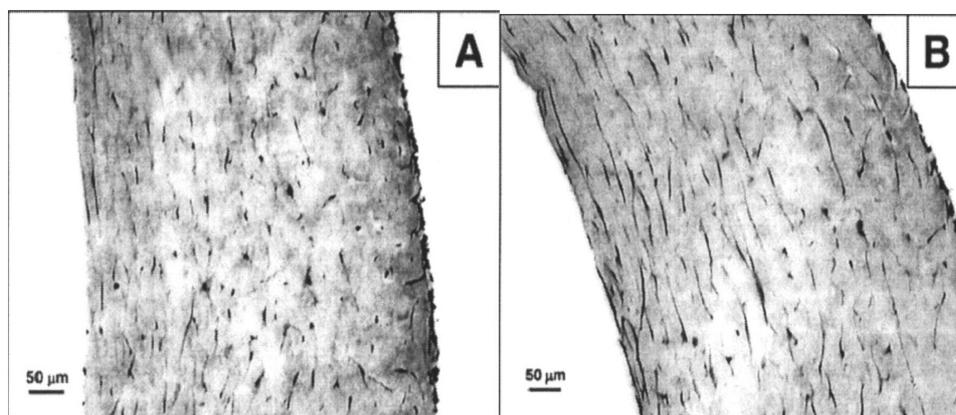


Figura 3.14- Graft cresciuto in coltura statica (A) e coltivato dinamicamente (B).

Tra i molti studi, Niklason ha ottenuto la miglior resistenza a rottura e la maggiore ritenzione delle suture per le arterie ingegnerizzate. I valori sono rispettivamente di 2150 mmHg e 91 g, anche se, mentre il primo risultato assomiglia molto al valore dei vasi naturali, il secondo risulta circa 3 volte più basso.

In conclusione, l'utilizzo di un bioreattore per la realizzazione di impianti cardiovascolari ingegnerizzati porta a graft con proprietà morfologiche e meccaniche migliori rispetto a quelli ottenuti per coltura statica. Non si ha ancora la certezza dell'affidabilità in ambito clinico di molti degli impianti realizzati, in quanto provati solamente su modello animale e comunque ancora in fase di studio su modello umano.

Si prospetta comunque un futuro in cui questo problema ed altri saranno affrontati con risorse sempre più numerose; si stanno diffondendo per esempio metodi matematici e modelli computazionali che aprono nuovi orizzonti per la ricerca. Le simulazioni numeriche infatti permettono di migliorare il design dei bioreattori e di valutare a priori l'evoluzione dell'impianto all'interno del bioreattore stesso.

BIBLIOGRAFIA

- Barron V., Lyons E., Stenson-Cox C, McHugh P. E., Pandit A.. *Bioreactors for Cardiovascular Cell and Tissue Growth: A Review*. Annals of Biomedical Engineering 2003, 31: 1017–1030.
- Bhattacharya V., McSweeney P. A., Shi Q., Bruno B., Ishida A., Nash R., Storb R. F., Sauvage L. R., Hammond W. P., Hong-De Wu M.. *Enhanced endothelialization and microvessel formation in polyester grafts seeded with CD341 bone marrow cells*. Blood 2000, 95(2): 581-585.
- Chang Edward I., Bonillas R. G., El-ftesi S., Chang Eric I., Ceradini D. J., Vial I. N., Chan D. A., Michaels V J., Gurtner G. C.. *Tissue engineering using autologous microcirculatory beds as vascularized bioscaffolds*. The FASEB Journal 2009, 23: 906-915.
- Chlupáč J., Filová E., Bakáčová L.. *Blood Vessel Replacement: 50 years of Development and Tissue Engineering Paradigms in Vascular Surgery*. Physiological Research 2009, 58.
- Di Bello Carlo (2004), *Biomateriali*, Bologna, Patron Editore (Collana di Ingegneria Biomedica).
- Ganong W. F. (2005), *Fisiologia Medica*. Trad. di Midrio M., De Lorenzo A., De Luca B., Ferraina S.. Padova, Piccin [tit. orig. Review of Medical Physiology].
- Grayson W. L., Martens T. P., Eng G. M., Radisic M., Vunjak-Novakovic G.. *Biomimetic Approach to Tissue Engineering*. Seminars in Cell and Developmental Biology 2009, 20(6): 665-673.
- Hammond T. G., Hammond J. M.. *Optimized suspension culture: the rotating-wall vessel*. American Journal of Physiology-Renal Physiology 2001, 281: 12-25.

- Hoenig Michel R., Campbell Gordon R., Rolfe Barbara E., Campbell Julie H. *Tissue-Engineered Blood Vessels: Alternative to Autologous Grafts?*. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 2005, 25: 1128-1134.
- Hoerstrup S. P., Zünd G., Sodian R., Schnell A. M., Grünenfelder J., Turina M. I. *Tissue engineering of small caliber vascular grafts*. European Journal of Cardio-thoracic Surgery 2001, 20: 164-169.
- Isaka M., Nishibe T., Okuda Y., Saito M., Seno T., Yamashita K., Izumisawa Y., Kotani T., Yasuda K.. *Experimental Study on Stability of High-porosity Expanded Polytetrafluoroethylene Graft in Dogs*. Annals of Thoracic and Cardiovascular Surgery 2006, 12(1): 37-41.
- Isenberg Brett C., Williams C., Tranquillo R. T.. *Small-Diameter Artificial Arteries Engineered In Vitro*. Circulation Research 2006, 98: 25-35.
- Iwasaki K., Kojima K., Kodama S., Paz A. C., Chambers M., Umezu M., Vacanti C. A.. *Bioengineered Three-Layered Robust and Elastic Artery Using Hemodynamically-Equivalent Pulsatile Bioreactor*. Circulation 2008, 118: S52-S57.
- Jockenhoevel S., Zund G., Hoerstrup S. P., Chalabi K., Sachweh J. S., Demircan L., Messmer B. J., Turina M.. *Fibrin gel - advantages of a new scaffold in cardiovascular tissue engineering*. European Journal of Cardio-thoracic Surgery 2001,19: 424-430.
- Kanayama T., Nagai N., Mori K., Munekata M.. *Application of Salmon Collagene Gel to Uniaxial Stretching Culture of Human Umbilical Vein Endothelial Cells*. Journal of Bioscience and Bioengineering 2008, 105(5): 554-557.
- Kofidis T., Lenz A., Boublik J., Akhyari P., Wachsmann B., Mueller Stahl K., Haverich A., Leyh R. G.. *Bioartificial grafts for transmural myocardial restoration: a new cardiovascular tissue culture concept*. European Journal of Cardio-thoracic Surgery 2003, 24: 906-911.

- Korossis S.A., Bolland F., Kearney J. N., Fisher J., Ingham E.. *Bioreactors in Tissue Engineering*. Tissue Engineering 2005, 2.
- L'Heureux N., Pâquet S., Labbé R., Germain L., Auger F. *A completely biological tissue-engineered human blood vessel*. The FASEB Journal 1998, 12: 47-56.
- Mirensky T. L., Nelson G. N., Brennan M. P., Roh J. D., Hibino N., Yi T., Shinoka T., Breuer C. K.. *Tissue-engineered arterial grafts: long-term results after implantation in a small animal model*. Journal of Pediatric Surgery 2009, 44: 1127–1133.
- Niklason L. E., Gao J., Abbott W. M., Hirschi K. K., Houser S., Marini R., Langer R.. *Functional Arteries Grown in Vitro*. Science 1994, 284.
- Novellino L. *Il trapianto con vena safena in situ secondo Rob nel trattamento delle arterioopatie obliteranti degli arti inferiori*. Acta Biomaterialia 1967, 13.
- Rashid S. T., Fuller B., Hamilton G., Seifalian A. M.. *Tissue engineering of a hybrid bypass graft for coronary and lower limb bypass surgery*. The FASEB Journal 2008, 22: 2084-2089.
- Ratcliffe A.. *Tissue engineering of vascular grafts*. Matrix Biology 2000, 19: 353-357.
- Ravi S., Qu Z., Chaikof E. L.. *Polymeric Materials for Tissue Engineering of Arterial Substitutes*. Vascular 2009, 17: 2-15.
- Schaner P. J., Martin N. D., Tulenko T. N., Shapiro I. N., Tarola N. A., Leichter R. F., Carabasi R. A., DiMuzio P. J.. *Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering*. Journal of Vascular Surgery 2004, 40(1): 146-153.

- Zavan B., Vindigni V., Lepidi S., Iacopetti I., Avruscio G., Abatangelo G., Cortivo R.. *Neoarteries grown in vivo using a tissue-engineered hyaluronan-based scaffold*. The FASEB Journal 2008, 22: 2853-2861.
- Zhang W. J., Liu W., Cui L., Cao Y.. *Tissue engineering of blood vessel*. Journal of Cellular and Molecular Medicine 2007, 11(5): 945- 957.