

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA
SCUOLA POLITECNICA

Dipartimento di ingegneria civile, chimica e ambientale



CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN INGEGNERIA CHIMICA E DI PROCESSO

**Validazione di protesi vascolari biodegradabili e
bioriassorbibili in un bioreattore ad alte
prestazioni**

Relatori:

Prof. Pier Francesco Ferrari,
Prof. Jan Oscar Pralits

Co-relatori:

Dott.ssa Fatemeh Ahmadpoor

Candidata:

Beatrice Maragliano

Anno accademico 2022-2023

Sommario

Abstract	2
1. Introduzione	4
1.1 Apparato cardiocircolatorio	4
1.2 Tipi di vasi sanguigni.....	5
1.3 Patologie vascolari	8
1.4 Tissue Engineering.....	12
1.5 Risorse cellulari	15
1.6 Scaffold	16
1.6.1 Requisiti scaffold.....	17
1.6.2 Materiali impiegati	18
1.6.3 Tecniche di fabbricazione	27
1.7 Bioreattore	31
1.7.1 Tipi di bioreattore	32
2. Materiali e metodi	35
2.1 Preparazione delle soluzioni polimeriche.....	35
2.2 Processo di elettrofilatura.....	35
2.3 Coating con gelatina	37
2.4 Bioreattore	38
2.5 Quantificazione gelatina e quercetina.....	40
2.6 Analisi in microscopia a scansione elettronica (SEM)	42
2.7 Degradazione e swelling degli scaffold.....	43
2.8 Modello matematico per calcolo forze fluidodinamiche.....	43
2.9 Caratterizzazione meccanica	44
3. Risultati e discussione	46
3.1 Degradazione degli scaffold	46
3.2 Influenza delle forze fluidodinamiche	47
3.3 Rilascio gelatina	47
3.4 Rilascio quercetina	51
3.5 Caratterizzazione meccanica	54
4. Conclusioni	56
REFERENZE	57

Abstract

L'ingegneria dei tessuti vascolari mira alla fabbricazione e alla validazione di innesti vascolari di piccolo diametro, biodegradabili e biorisorbibili, risolvendo le problematiche legate alla vascolarizzazione e alla formazione di trombi causati dagli scaffold vascolari sintetici attualmente usati dopo l'impianto in vivo. Lo studio approfondito del comportamento in condizioni dinamiche degli scaffold ingegnerizzati è un passo importantissimo prima della sperimentazione *in vivo*, infatti, permette di valutare il comportamento del materiale costituente gli innesti vascolari e delle molecole bioattive usate per la sua funzionalizzazione in presenza delle condizioni fisiologiche rappresentative dell'attività biologica umana. In questo lavoro sono stati studiati innesti vascolari di 5 mm di diametro, ottenuti tramite processo di elettrofilatura di una miscela costituita da due soluzioni polimeriche: poli (ϵ -caprolattone) e poli(glicerol sebacato), entrambe al 20% m/v, in rapporto 1:1 v/v. Le protesi sono state ingegnerizzate con quercetina, molecola bioattiva in grado di modulare il processo infiammatorio successivo all'impianto *in vivo* e funzionalizzate con gelatina, proteina usata per l'impermeabilizzazione dei costrutti. Gli innesti vascolari così prodotti sono poi stati testati in bioreattore ad alte prestazioni per diversi regimi di flusso, utilizzando una soluzione di tampone fosfato salino (PBS). Per la realizzazione di questo studio sono state analizzate e validate le migliori modalità di utilizzo del bioreattore e dei suoi componenti. Il sistema è costituito da una pompa peristaltica, che ha permesso la simulazione del flusso e un insieme di tubi, serbatoi e valvole, in modo da mimare al meglio il sistema cardiocircolatorio umano. Un software dedicato, connesso ai vari sistemi di controllo presenti nel bioreattore, ci ha permesso di controllare le condizioni operative (flusso volumetrico e pressione) a cui gli scaffold venivano sottoposti. Sono stati svolti tre test, ognuno di durata pari a cinque giorni, prelevando quotidianamente campioni di soluzione per poterli analizzare in termini di contenuti di gelatina e quercetina rilasciati dagli scaffold durante il trattamento. In questo modo abbiamo studiato come la variazione di flusso nel tempo e la deposizione di una massa di gelatina variabile sulle protesi influenza il rilascio di molecole bioattive. Dopo i test le protesi trattate in bioreattore sono state inoltre caratterizzate dal punto di vista meccanico attraverso prova di trazione uniassiale. Questo studio ha permesso la formulazione di importanti ipotesi riguardanti il legame tra le molecole bioattive utilizzate per la funzionalizzazione del costrutto ed il costrutto stesso.

Vascular tissue engineering aims at the fabrication and validation of small diameter, biodegradable and bioresorbable vascular grafts, solving the problems related to vascularization and thrombus formation caused by synthetic vascular scaffolds currently used after *in vivo* implantation. The in-depth study of the behavior of engineered scaffolds in dynamic conditions is a very important step before *in vivo* testing. It allows to evaluate the behavior of the material constituting the vascular grafts and of the bioactive molecules used for its functionalization in the presence of physiological conditions representative of human biological activity. In this work, vascular grafts of 5 mm in diameter were studied, obtained through the electrospinning process of a mixture consisting of two polymeric solutions: poly(ϵ -caprolactone) and poly(glycerol sebacate), both at 20% m/v, in 1:1 v/v ratio. The prostheses were engineered with quercetin, a bioactive molecule capable of modulating the inflammatory process following implantation *in vivo* and functionalized with gelatin, a protein used to waterproof the constructs. The vascular grafts thus produced were then tested in a high-performance bioreactor for different flow regimes, using a phosphate buffer saline solution (PBS). To do this, the bioreactor and its components were studied and validated to precisely determine the best set up. The system consisted of a peristaltic pump, which allowed the simulation of the flow and a set of tubes, tanks and valves, in order to best mimic the human cardiovascular system. Dedicated software, connected to the various control systems present in the bioreactor, allowed us to control the operating conditions (volumetric flow and pressure) to which the scaffolds were subjected. Three tests were carried out, each lasting five days, and samples were taken daily to be able to analyze them in terms of gelatin and quercetin contents released from the scaffolds during treatment. In this way we determined the influence of both the flow variation over time and the deposition of a variable gelatin mass on the prostheses studied on the releases of bioactive molecules. After the tests, the prostheses treated in the bioreactor were also characterized from a mechanical point of view through a uniaxial tensile test. This study allowed the formulation of important hypotheses regarding the link between the bioactive molecules used for the functionalization of the construct and the construct itself.

1. Introduzione

1.1 Apparato cardiocircolatorio

L'apparato circolatorio è un sistema chiuso di vasi (i vasi sanguigni) in cui il sangue circola sotto la spinta di una pompa muscolare (il cuore) (Witzleb, 1989). Ha il compito principale di trasportare alle cellule di tessuti e organi ossigeno, sostanze nutritive e più in generale, tutti gli elementi necessari al loro sostentamento, eliminando i rifiuti metabolici come l'anidride carbonica. Inoltre, stabilizza il pH, regola la temperatura corporea e protegge il corpo dalle malattie.

Il sangue è un particolare tipo di tessuto connettivo caratterizzato dalla presenza di sostanza intercellulare allo stato fluido. Tale particolarità gli consente di scorrere all'interno i vasi che costituiscono il sistema vascolare. Nel sangue si riconoscono due componenti:

- Cellule, rappresentanti il 45% del volume sanguigno, le quali possono essere distinte in tre tipologie: globuli rossi, globuli bianchi e piastrine. I globuli rossi o eritrociti contengono l'emoglobina, particolare proteina capace di legare l'ossigeno e di trasportarlo dai capillari polmonari ai tessuti, ove viene ceduto in cambio dell'anidride carbonica; i globuli bianchi o leucociti contengono enzimi in grado di inglobare e digerire particelle estranee (germi patogeni, cellule senescenti o morte, materiali estranei all'organismo), svolgono quindi un ruolo di difesa contro agenti patogeni; le piastrine sono importanti per i processi di coagulazione del sangue.
- Plasma, ovvero il fluido intercellulare, rappresentante il 55% del volume sanguigno. Si tratta di una soluzione acquosa in cui si trovano disciolte numerosissime sostanze: proteine (tra cui albumina e immunoglobuline o anticorpi), glucidi, lipidi (come trigliceridi e colesterolo), ormoni, enzimi, ioni minerali e alcune vitamine.

Gli scambi tra sangue e cellule e viceversa avvengono per mezzo di un fluido, chiamato liquido interstiziale, contenuto in tutti i tessuti connettivi. Il liquido interstiziale, che si arricchisce in continuazione di materiale proveniente dai capillari sanguigni, viene in parte drenato dai capillari linfatici sotto forma di linfa. Contiene in sospensione una parte corpuscolata, costituita quasi esclusivamente da linfociti. I linfociti circolanti passano dalla linfa al sangue, andando così a rimpiazzare quelli che dal sangue erano passati nei tessuti per svolgervi il compito di difesa e di risposta immunitaria. La parte fluida è povera di proteine e di sali e contiene prodotti di rifiuto.

Il cuore è un organo contrattile cavo, diviso in due metà indipendenti (parte destra e parte sinistra), ciascuna delle quali è composta da una porzione superiore, l'atrio, e una inferiore, il ventricolo (Constantine and Dimopoulos, 2022). Ogni atrio comunica con il sottostante ventricolo per mezzo di

un apparato valvolare atrioventricolare. Alle cavità atriali giungono le vene, mentre dai ventricoli si originano le arterie. La parte destra riceve il sangue proveniente da tutti i tessuti e lo invia ai polmoni, mentre la parte sinistra, dopo averlo ricevuto dai polmoni lo spinge in tutto il corpo. Il sangue scorre infatti all'interno dell'organismo attraverso due circuiti, chiamati rispettivamente grande circolazione e piccola circolazione. La grande circolazione, o circolazione sistemica, origina dal ventricolo sinistro, comprende l'arteria aorta, i suoi rami, le vene cave superiore ed inferiori con le proprie radici e termina nell'atrio destro del cuore. Il sangue della grande circolazione, raggiungendo il territorio capillare, fornisce a cellule e tessuti ossigeno e principi nutritivi (metaboliti) e ne riceve anidride carbonica e i prodotti di degradazione del metabolismo (cataboliti). Queste sostanze vengono quindi portati verso apparati e organi deputati alla loro espulsione: il sangue si è così trasformato da arterioso in venoso. La piccola circolazione, o circolazione polmonare, origina dal ventricolo destro e comprende l'arteria polmonare e le vene polmonari, le quali sfociano nell'atrio sinistro del cuore. Il sangue della piccola circolazione, passando attraverso i polmoni, cede l'anidride carbonica e assume l'ossigeno che porterà ai tessuti per i relativi processi ossidativi.

Il flusso è assicurato da due fasi cardiache spontanee di contrazione e distensione del muscolo, sistole e diastole:

- Durante la fase di contrazione, o sistole, il muscolo cardiaco si contrae e attraverso i ventricoli destro e sinistro pompa il sangue rispettivamente verso i polmoni e verso tutto il resto dell'organismo;
- Durante la fase di distensione, o diastole, il muscolo si distende e i ventricoli si riempiono nuovamente di sangue proveniente dagli atri.

L'alternarsi di questi movimenti è chiamato ciclo cardiaco e determina una variazione della pressione aortica, massima durante la fase di sistole e minima durante la diastole. La frequenza cardiaca indica il numero di volte in cui il ciclo si compie in un minuto.

1.2 Tipi di vasi sanguigni

In base alla direzione del flusso ematico rispetto al cuore si possono classificare tre tipi di vasi sanguigni: arterie, vene e capillari (Labrosse, 2018). I vasi che trasportano il sangue dal cuore alla periferia sono detti arterie, mentre il ritorno al muscolo cardiaco è affidato alle vene. I capillari, invece, sono responsabili del collegamento tra i due tipi di vasi e sono deputati allo scambio di sostanze tra sangue e tessuti (Figura 1).

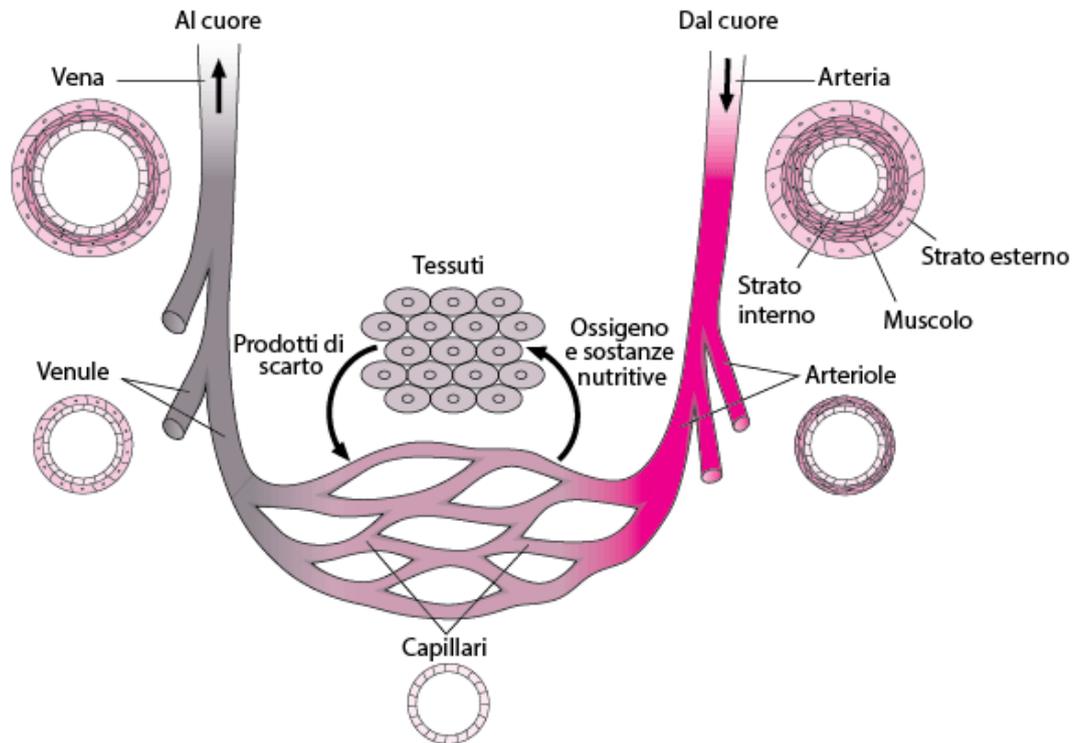


Figura 1: Flusso sanguigno

(<https://www.msmanuals.com/it/casa/multimedia/table/vasi-sanguigni-flusso-sanguigno>)

Le arterie e le vene presentano la stessa tipologia di parete ma con spessore diverso (Awad et al., 2018; Hasan et al., 2014). Questa è costituita da tre strati di tessuto, detti tonache, che circondano la cavità, il lume:

- Tonaca intima, ovvero la parte più interna del vaso sanguigno. È formata da uno strato di cellule endoteliali adiacenti a un tessuto connettivo, chiamato membrana basale e contenente un numero variabile di fibre elastiche;
- Tonaca media, lo strato intermedio. È costituita da fasci concentrici di tessuto muscolare liscio immersi in una rete di tessuto connettivo. A seguito dello stimolo proveniente dal sistema simpatico, il muscolo provoca la contrazione o il rilassamento delle fibrocellule con conseguente vasocostrizione o vasodilatazione;
- Tonaca avventizia corrispondente allo strato più esterno. È caratterizzata dalla presenza di fibre di collagene disperse in fibre elastiche.

Le fibre di collagene sono costituite da proteine che collegano i diversi strati e conferiscono resistenza elastica alle pareti dei vasi. Inoltre, il tessuto connettivo elastico contiene fibre formate da elastina, una proteina che permette ai vasi di espandersi e contrarsi in seguito alla variazione della pressione interna. Una rappresentazione dettagliata dei vasi sanguigni è riportata in Figura 2.

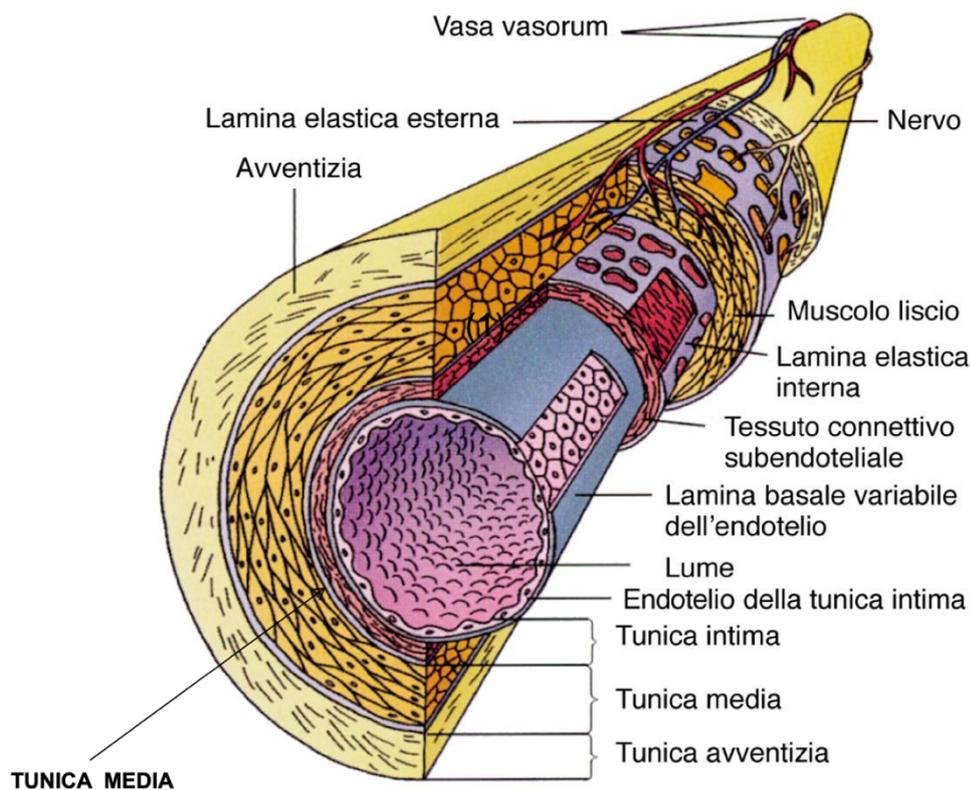


Figura 2: Struttura dei vasi sanguigni

(https://www.unife.it/medicina/radiologiamedica/insegnamenti/anatomia-istologia-e-genetica-umana-nelle-scienze-radiologiche/modulo-di-anatomia-umana-di-base/3_vasi)

Le arterie e le arteriole presentano pareti muscolari relativamente spesse per adattare il proprio diametro a cambiamenti continui di pressione e controllare il flusso sanguigno. Le vene e le venule invece, presentano pareti molto più sottili e sono meno muscolari in quanto la pressione al loro interno è inferiore e perché devono potersi dilatare per accogliere un maggior volume di sangue. I capillari sono vasi di calibro molto ridotto che garantiscono lo scambio per diffusione di sostanze nutritive. Il loro numero varia in base all'attività metabolica del tessuto che irrorano, ad esempio, organi come fegato, reni, muscoli, sistema nervoso presentano un'estesa rete capillare. Solo le cartilagini, la cornea e il cristallino ne sono privi. Hanno pareti sottili formate da un unico strato di endotelio circondato da una membrana basale. La distribuzione del sangue al loro interno è regolata dalla muscolatura liscia delle pareti delle arteriole e dagli sfinteri precapillari (che collegano arteriole e capillari) il cui rilassamento o contrazione aumenta o riduce l'afflusso di sangue.

1.3 Patologie vascolari

Le malattie cardiovascolari (CVD) sono una classe di malattie che colpiscono il cuore o i vasi sanguigni (vene e arterie). Possono essere causate da una combinazione di fattori di rischio socioeconomici, comportamentali e ambientali, tra cui ipertensione, dieta non equilibrata, colesterolo alto, diabete, inquinamento atmosferico, obesità, uso di tabacco, malattie renali, inattività fisica, uso dannoso di alcol e stress. Anche la storia familiare, l'origine etnica, il sesso e l'età possono influenzare il rischio di malattie cardiovascolari di una persona (European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation, 2011).

Il "World Heart Report", lanciato al World Heart Summit 2023 che si è svolto a Ginevra dal 19 al 21 maggio 2023, fornisce la prima analisi approfondita dei dati di rischio e mortalità per CVD nel mondo (<https://world-heart-federation.org/>). Il report afferma che queste patologie rappresentano circa il 33% dei decessi globali con 18,6 milioni di morti ogni anno e sono così la principale causa di morte per entrambi i sessi. Facendo un confronto con i dati degli anni precedenti si nota un aumento del 60% del numero di morti: da 12,1 milioni nel 1990 a 20,5 milioni nel 2021 (<https://www.osservatoriomalattierare.it/malattie-rare/ipercolesterolemia-familiare/>).

Le CVD sono processi patologici che interessano più comunemente il sistema arterioso e comportano il restringimento progressivo delle arterie fino alla loro parziale o completa ostruzione, a seguito della formazione di placche all'interno dei vasi, chiamate ateromi o placche aterosclerotiche. La principale patologia correlata all'ostruzione dei vasi è l'aterosclerosi (Xu et al., 2016), malattia cronica e progressiva a carico delle pareti delle arterie che perdono elasticità e subiscono un processo di ispessimento e indurimento. Questo fenomeno è causato dalla formazione di placche costituite da lipidi, cellule infiammatorie, colesterolo, calcio e materiale fibrotico presenti nel sangue. Le arterie in queste condizioni determinano una riduzione del flusso ematico o un'ostruzione completa (Figura 3). Il blocco di un vaso sanguigno a causa di aterosclerosi è all'origine di attacco cardiaco (infarto del miocardio) e ictus. In seguito alla comparsa dei primi segnali la malattia cardiovascolare è generalmente in uno stadio avanzato. L'aterosclerosi, infatti, è asintomatica fino a quando non compromette il flusso del sangue, processo irreversibile e in continua espansione. L'aterosclerosi è comunemente associata all'invecchiamento. Tuttavia, livelli elevati di colesterolo nel sangue, ipertensione arteriosa, fumo di sigaretta, diabete mellito e familiarità possono favorirne la comparsa anche in età giovanile. Un'alimentazione ricca di grassi, il consumo eccessivo di alcolici, un'attività fisica insufficiente e una condizione di sovrappeso possono contribuire all'insorgenza della malattia.

L'aterosclerosi è alla base di molte altre malattie cardiovascolari come: coronaropatia (ostruzione delle arterie coronarie), ictus ischemico (morte di una parte del tessuto cerebrale come conseguenza all'insufficiente apporto di ossigeno dovuto all'ostruzione di un'arteria), ictus emorragico (l'arteria danneggiata si rompe provocando una fuoriuscita di sangue che fa pressione nella scatola cranica), angina pectoris, aneurisma aortico, insufficienza cardiaca, cardiopatia ischemica cronica e cardiopatia ischemica ipertensiva.

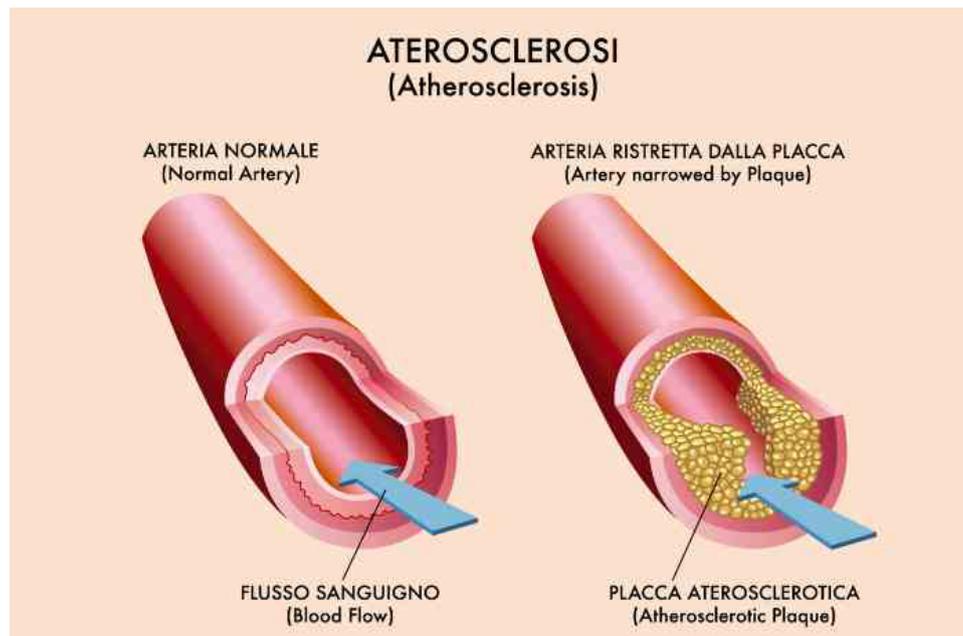


Figura 3: Formazione di placca aterosclerotica

(<https://www.nurse24.it/studenti/patologia/aterosclerosi.html>)

Il processo aterosclerotico inizia con la deposizione di lipoproteine nello strato intimale dell'arteria e nella muscolatura liscia sottostante (Rafieian-Kopaei et al., 2014). Le particelle lipoproteiche sono composte da proteine, fosfolipidi e lipidi come colesterolo e trigliceridi. Una delle lipoproteine aterogene più importanti è la lipoproteina a bassa densità ricca di colesterolo (LDL). Quest'ultima può accumularsi nell'intima vascolare grazie alla sua capacità di infiltrarsi nell'endotelio o di aderire ai componenti della matrice extracellulare come i proteoglicani. L'intrappolamento delle lipoproteine a bassa densità determina un aumento della concentrazione di LDL nell'intima e una maggiore durata della loro permanenza nella lesione. Entrambi questi fattori portano all'ossidazione spontanea e all'ossidazione cellulare delle particelle intrappolate aumentando la permeabilità dell'endotelio vascolare a monociti e linfociti T che migrano così all'interno della parete. Con il passare del tempo queste cellule si evolvono in macrofagi ed ingeriscono le LDL ossidate accumulando vacuoli lipidici nello spazio citoplasmatico (foam cells o cellule schiumose). Le foam

cells secernono sostanze infiammatorie e fattori di crescita che inducono proliferazione delle fibrocellule muscolari lisce. Tale situazione porta alla formazione di una capsula fibrosa che ricopre l'accumulo adiposo.

Nei casi più gravi queste placche possono andare incontro ad ulteriori complicazioni per deposizione di tessuto connettivo da parte dei fibroblasti e il deposito di calcio nella lesione associati a sclerosi o indurimento delle arterie. Infine, la superficie irregolare del vaso provoca la formazione di coaguli e trombosi, che porta all'improvvisa ostruzione del flusso sanguigno. L'iperlipidemia e l'iperglicemia sono correlate a un aumento del danno ossidativo che influisce sullo stato antiossidante e sui livelli di lipoproteine. Quindi la placca (o ateroma) è costituita da una parte centrale lipidica ricoperta da un cappuccio fibroso. Considerando l'origine multifattoriale è importante approcciare la malattia sotto tutti i punti di vista (<https://www.humanitas.it/malattie/aterosclerosi/>). Le strategie terapeutiche prevedono la modifica di tutti i fattori di rischio cardiovascolare e l'adozione di uno stile di vita sano e corretto, ovvero: una dieta varia ed equilibrata, limitato consumo di alcol, fumo e attività fisica di tipo aerobico. Nel caso in cui questo approccio non risulti sufficiente il medico può prescrivere l'assunzione di farmaci:

- per ridurre i livelli di colesterolo (in particolare le statine);
- per rallentare la progressione dell'aterosclerosi (ACE-inibitori);
- per ridurre la pressione arteriosa (ACE-inibitori, betabloccanti, calcio-antagonisti e diuretici);
- per controllare malattie specifiche come il diabete o per alleviare disturbi invalidanti, come il dolore alle gambe (tipico della claudicatio intermittens);
- per ridurre il rischio di formazione di coaguli di sangue (trombi) intravascolari (gli antiaggreganti piastrinici).

In caso di aterosclerosi grave con ipoperfusione o infarto di organi importanti possono essere necessari interventi di correzione chirurgica quali:

- Angioplastica: procedura endovascolare mini-invasiva che prevede l'introduzione, sotto guida di raggi-X, di un catetere con un piccolo palloncino posizionato all'estremità (<https://healthy.thewom.it/terapie/stent-cardiaco-angioplastica-coronarica/>). Una volta raggiunto l'ateroma il palloncino viene gonfiato dilatando le pareti dell'arteria, appiattendolo l'ateroma e ripristinando di conseguenza il normale flusso sanguigno. Negli ultimi anni all'angioplastica è stata associata all'applicazione di stent, piccole protesi tubulari a maglie metalliche applicate permanentemente nell'arteria a livello della placca. Il procedimento è simile a quello dell'angioplastica tradizionale. Dopo aver dilatato le pareti con il palloncino si

procede all'applicazione dello stent che viene fatto aderire alla parete interna dell'arteria impedendole di richiudersi. Esiste la possibilità che con il passare del tempo lo stent vada incontro a chiusura, processo chiamato restenosi ed associato alla crescita eccessiva di tessuto in corrispondenza dello stent, come risposta immunitaria dell'organismo nei confronti del materiale estraneo innestato. Recentemente sono stati introdotti anche stent a rilascio farmacologico in grado di liberare lentamente un farmaco che riduce la probabilità che lo stent si richiuda nel lungo periodo.

- Endoarteriectomia: è una procedura chirurgica endovascolare che prevede la rimozione di materiale aterosclerotico che occlude o restringe il lume di un'arteria, per esempio l'arteria carotide o femorale. Viene eseguita praticando un'incisione vicino all'arteria da trattare. Di conseguenza il flusso al suo interno viene interrotto temporaneamente, affinché l'arteria possa essere aperta e ripulita. Si procede quindi con la rimozione della placca e della superficie interna danneggiata. Il vaso viene poi ricucito attraverso sutura o con l'utilizzo di patch tissutali. Infine, viene ripristinato il flusso. Questo tipo di intervento viene effettuato quando l'occlusione è pari o superiore al 60% del vaso, oppure quando il vaso è ristretto del 50% e il paziente è stato colpito da ictus. I tempi di ripresa sono lunghi e necessita di frequenti controlli.
- Bypass: si basa sulla creazione chirurgica, attraverso condotti arteriosi o venosi, di una via alternativa che permetta al sangue ossigenato di raggiungere il muscolo cardiaco a valle del condotto vascolare ostruito (<https://www.humanitas.it/cure/intervento-di-bypass-aortocoronarico/>). Si crea un ponte artificiale costituito da un tratto di vaso sanguigno sano e ben funzionante che permette di aggirare l'ostacolo. Si trattano con questo metodo i condotti che non possono essere sottoposti ad angioplastica. Solitamente vengono utilizzate l'arteria mammaria o l'arteria radiale dell'arto superiore (non dominante in quanto la perfusione dell'avanbraccio deve essere garantita da altre arterie). Come ultima scelta può essere usata la vena safena che si estende dalla gamba alla coscia (ha però dimensioni ridotte rispetto alle arterie, il bypass risulta in genere ostruito del 60-65% dopo 10 anni). (<https://www.msmanuals.com/it-it/professionale/disturbi-dell-apparato-cardiovascolare/esami-e-procedure-cardiovascolari/intervento-di-bypass-aorto-coronarico>).

Impianti, trapianti e dispositivi biomedici impiantabili sono diventati soluzioni tradizionali per un'ampia varietà di problemi di salute e il loro utilizzo nelle pratiche mediche, per applicazioni terapeutiche, prevenzione o diagnosi, è in costante aumento (Kzhyshkowska et al., 2015). Tuttavia,

nei pazienti si osservano spesso reazioni immunitarie avverse contro questi materiali estranei. Queste possono portare a problemi gravi e immediati, come dolore intenso, infiammazione eccessiva o rigetto del materiale/tessuto impiantato. L'infiammazione cronica e i conseguenti cambiamenti patologici nel microambiente dell'impianto possono essere dannosi per la funzione a lungo termine dei materiali/tessuti impiantati. Inoltre, le reazioni immunitarie causano anche un significativo deterioramento della qualità della vita dei pazienti, dato che i loro problemi di salute non sono completamente risolti e influenzano la loro vita quotidiana. I fallimenti degli impianti e dei trapianti hanno un impatto economico negativo derivante dai costi di ulteriori interventi chirurgici e/o dal trattamento degli effetti collaterali, nonché dal prolungamento del ricovero ospedaliero e dall'aumento dei costi dell'assistenza sanitaria. Lo sviluppo di strategie per evitare o escludere effetti collaterali indesiderati nell'uso di dispositivi e impianti biomedici rappresenta una sfida importante. Per trovare soluzioni a tali reazioni immunitarie avverse, è necessario affrontare questo problema nella fase iniziale dello sviluppo del prodotto e della preparazione preoperatoria dei tessuti/materiali. Tuttavia, nonostante i significativi progressi compiuti negli ultimi decenni nel campo dell'ingegneria biomedica, attualmente non è disponibile alcuna tecnologia sicura e definitiva per controllare le reazioni immunitarie avverse di un ospite contro dispositivi, impianti e trapianti biomedici.

1.4 Tissue Engineering

La sostituzione o riparazione di tessuti e organi dovuta a malattie, lesioni e difetti dello sviluppo è diventata una delle principali preoccupazioni sanitarie ed economiche. Alcuni tessuti umani non sono in grado di autorigenerarsi, come nel caso dell'insorgenza di malattie cardiovascolari. Attualmente, l'uso di tessuti e organi donati è la pratica clinica più adottata per affrontare questa situazione (Hasan et al., 2014). Tuttavia, a causa della ridotta disponibilità e del crescente invecchiamento della popolazione, la dipendenza dai tessuti e dagli organi donati non è un approccio pratico. Altre problematiche sono legate all'inadeguatezza funzionale e strutturale del tessuto, all'eccessiva variabilità anatomica e diverse preoccupazioni sono dovute alla loro funzionalità a lungo termine. Per rispondere a questa fondamentale esigenza medica, l'ingegneria dei tessuti (TE) è diventata un'opzione promettente. La TE e la medicina rigenerativa (RM) sono campi multidisciplinari che combinano conoscenze e tecnologie provenienti da diversi rami come la biologia, la chimica, l'ingegneria, la medicina, la farmaceutica e la scienza dei materiali per sviluppare terapie e prodotti per la riparazione o la sostituzione di tessuti e organi danneggiati.

I termini ingegneria tissutale e medicina rigenerativa spesso vengono usati in modo intercambiabile, anche se in realtà non coincidono:

- L'ingegneria tissutale si concentra sulla ricerca e sviluppo di supporti ingegneristici, composti da materiali innovativi, per la sostituzione o riparazione di tessuti;
- La medicina rigenerativa fa ampio utilizzo di cellule staminali (cellule non specializzate, in grado di differenziarsi nei tanti tipi diversi di cellule presenti nel corpo umano) con lo scopo di stimolare i meccanismi di riparazione del corpo.

La definizione di TE si è evoluta negli anni, ma una delle prime e più citate è sicuramente quella fornita dai Dr. Vacanti e Dr. Langer: "L'ingegneria dei tessuti è un campo interdisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e delle scienze della vita allo sviluppo di sostituti biologici che ripristinano, mantengono o migliorano la formazione dei tessuti." (Langer and Vacanti, 1993).

Per quanto riguarda la chirurgia cardiovascolare, la combinazione dei progressi emergenti nella fabbricazione dei tessuti e nell'ingegneria delle cellule staminali promette nuove strategie per l'ingegneria dei vasi sanguigni. Queste riprendono non solo le proprietà meccaniche dei vasi nativi ma anche la loro funzione biologica (Song et al., 2018). Gli innesti sintetici per la sostituzione dei vasi arteriosi occlusi furono introdotti per la prima volta negli anni '50 in seguito a complicazioni chirurgiche associate al prelievo di vasi, alla frequente carenza di innesti allogenici e al rigetto immunologico di grandi vasi di origine animale.

Quando si progettano innesti avanzati è fondamentale una conoscenza approfondita del tessuto biologico originario, poiché la comprensione degli elementi strutturali che lo costituiscono è necessaria per la progettazione del biomateriale e la scelta di una fonte cellulare adatta (Song et al., 2018). Negli ultimi decenni l'ingegneria dei tessuti vascolari si è evoluta per generare costrutti che abbiano la capacità di imitare il tessuto originale: incorporano la funzionalità di questi strati strutturali, resistono agli stress fisiologici inerenti al sistema cardiovascolare e promuovono l'integrazione nel tessuto ospite senza provocare rigetto immunologico (Chang and Niklason, 2017). In questo approccio le cellule vengono seminate o incapsulate in impalcature costituite da un polimero biodegradabile (Hasan et al., 2014). Si prevede che le cellule producano matrice extracellulare (ECM) mentre il polimero viene degradato gradualmente creando il tessuto desiderato. I metodi principali per la fabbricazione di scaffold includono: autoassemblaggio molecolare, idrogel, tecniche di colata di solventi e lisciviazione di particelle, separazione di fase indotta termicamente e processo di elettrofilatura. Quest'ultima è una tecnica versatile per la fabbricazione di fibre su scala nano-micro, ed ha un grande potenziale per imitare il microambiente

dell'ECM naturale. È noto che nei tessuti naturali la matrice extracellulare è una rete tridimensionale di fibre proteiche strutturali e polisaccaridiche di diametro compreso tra 50 e 500 nm (Hasan et al., 2014). L'elettrofilatura si è evoluta per consentire la fabbricazione di scaffold in nanofibra in questo intervallo di dimensioni e oltre. Tuttavia, nonostante i progressi nella farmacologia, nella scienza dei materiali e nella fabbricazione di dispositivi, questi innesti vascolari sintetici non hanno ridotto significativamente la mortalità complessiva in quanto continuano a presentare una serie di carenze che ne hanno limitato l'impatto (Nugent and Edelman, 2003). Queste includono: alti tassi di rigetto per i vasi di piccolo diametro (< 6 mm), dovuti a risposta immunitaria del sistema e conseguente occlusione del vaso (che porta a trombosi, aneurisma e iperplasia intimale), scetticismo in campo pediatrico a causa dell'incapacità di crescita degli innesti che richiede interventi ripetuti, e la suscettibilità alle infezioni (Nugent and Edelman, 2003; Song et al., 2018). Da questa prima descrizione delle fasi previste in questo tipo di studio, è facile evincere che ci sono tre componenti principali: le cellule, lo scaffold e il bioreattore (Figura 4). Queste rappresentano la "triade dell'ingegneria tissutale", e la loro combinazione sembra essere essenziale per il successo delle applicazioni (Wang et al. 2017).

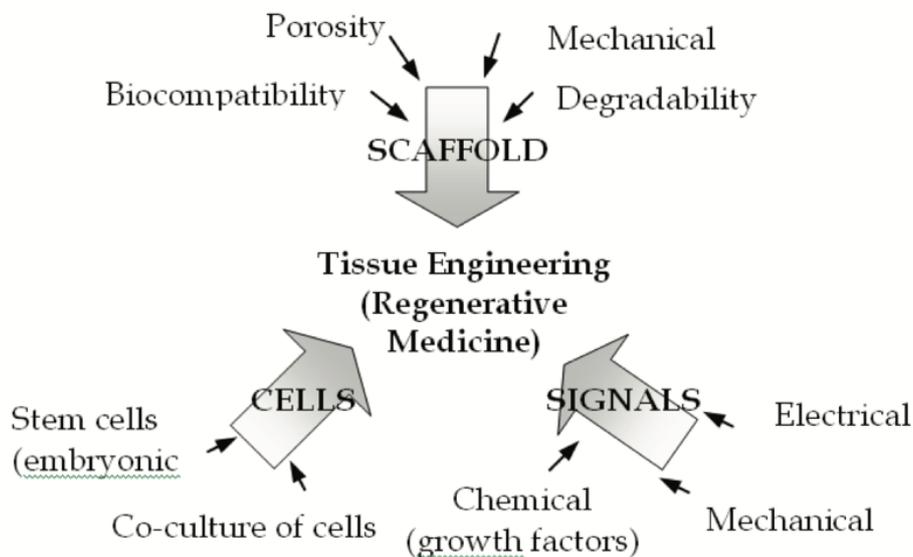


Figura 4: Componenti principali ingegneria tissutale

(Plunkett and O'Brien, 2011)

1.5 Risorse cellulari

Il primo passo per la creazione di un tessuto ingegnerizzato è senza dubbio la scelta della fonte cellulare, essendo le cellule gli elementi costitutivi di tutti i tessuti viventi. L'utilizzo di cellule autologhe è una delle più grandi innovazioni in questo campo in quanto non producono risposta immunitaria, quindi, eliminano la necessità di immunosoppressori e i loro effetti collaterali. Tuttavia, non è sempre possibile utilizzarle: il tessuto del paziente potrebbe essere patologico (compromettendo la possibilità di ottenere le cellule semplicemente da una biopsia), hanno disponibilità limitata e richiedono un lungo periodo di coltura (Song et al., 2018).

Come detto in precedenza gran parte della ricerca attuale mira all'utilizzo di fonti allogeniche e xenogeniche per superare il problema della carenza di cellule autologhe. Tuttavia, queste fonti sono associate ad ulteriori importanti ostacoli come: rigetto immunitario, trasmissione di malattie, mancata corrispondenza tra il microambiente cellulare del donatore e quello del ricevente e considerazioni etiche, che limitano la loro diffusa adozione nelle applicazioni cliniche.

Con il progresso della tecnologia le cellule staminali stanno emergendo come alternative promettenti. Le cellule staminali sono cellule indifferenziate, presenti in ogni stadio della vita (embrionale, fetale, adulto) e all'origine delle cellule differenziate, ovvero gli elementi di tessuti e organi. Sono caratterizzate dalla capacità di subire, teoricamente, una serie infinita di duplicazioni, solitamente partendo da una singola cellula, e di differenziarsi in particolari fenotipi. A seconda del potenziale, quindi del numero di fenotipi che una cellula staminale può formare, si possono distinguere in quattro differenti categorie (Kolios et al., 2013):

- Totipotenti: sono le più indifferenziate e si trovano nelle prime fasi dello sviluppo. Sono in grado di generare tutte le cellule dell'organismo, svolgono un ruolo fondamentale durante lo sviluppo dell'embrione;
- Pluripotenti: sono in grado di differenziarsi in cellule che nascono dai 3 strati germinali (ectoderma, endoderma e mesoderma) da cui si sviluppano tutti i tessuti e gli organi;
- Multipotenti: si trovano nella maggior parte dei tessuti e si differenziano in cellule provenienti da un singolo strato germinale. Le cellule staminali mesenchimali (MSC) sono le cellule multipotenti più riconosciute. Possono derivare da una varietà di tessuti tra cui midollo osseo, tessuto adiposo, ossa, gelatina di Wharton, sangue del cordone ombelicale e sangue periferico;
- Unipotenti: possono auto rinnovarsi e rigenerarsi in un solo tipo cellulare specifico, sono spesso precursori di cellule completamente mature.

Un importante passo avanti è stata la recente scoperta di Takahashi e Yamanaka, i quali hanno generato cellule pluripotenti (chiamate cellule staminali pluripotenti indotte, iPSC) riprogrammando cellule differenziate adulte (Takahashi and Yamanaka, 2006).

Le cellule staminali embrionali sono quelle con una potenza maggiore, sono presenti nell'organismo da pochi giorni dopo la fecondazione fino alla nascita (Kolios et al., 2013). Possono essere generate in vitro con tecniche di clonazione terapeutica, ma il loro utilizzo provoca accesi dibattiti etici. Nell'organismo sviluppato invece sono presenti cellule staminali adulte, principalmente di tipo pluripotente, che presentano la tendenza a diminuire di numero con l'età.

1.6 Scaffold

I primi utilizzi di materiali non endogeni per la sostituzione di vasi risalgono alla Prima Guerra Mondiale (Hess 1985). I materiali sintetici vennero introdotti in passato per sostituire o ricostruire tessuti o parti malate nel corpo umano. La produzione di nuovi materiali, come il tetrafluoroetilene (Teflon) e il silicone, ha aperto un nuovo campo di ricerca che ha portato allo sviluppo di un'ampia gamma di dispositivi adatti all'applicazione clinica umana. Questi dispositivi potevano fornire supporto strutturale ma la componente funzionale del tessuto originale non veniva riprodotta. Gli studi di biologia cellulare, biologia molecolare e biochimica hanno consentito una migliore comprensione della ECM e della sua interazione con le cellule nei tessuti del corpo, nonché delle interazioni con i fattori di crescita e, di conseguenza, sono stati creati nuovi biomateriali in grado di integrare queste funzionalità. L'obiettivo è quindi l'utilizzo di specifici costrutti detti "scaffold", impiantati in modo permanente per ripristinare l'efficacia di un tratto vascolare che non è più in grado di svolgere la sua funzione di trasporto del sangue. I biomateriali di cui sono costituiti replicano la funzione biologica e meccanica della matrice extracellulare nativa presente nei tessuti del corpo, forniscono una struttura polimerica tridimensionale che sostiene la crescita cellulare e consentono inoltre il rilascio di fattori bioattivi appropriati nei siti desiderati del corpo (es. fattori di crescita e peptidi di adesione cellulare) (Rosso et al., 2005; Olson et al., 2011).

Nella maggior parte dei casi i trapianti vengono effettuati per sostituire i vasi arteriosi. Questo è dovuto alla maggiore pressione presente nelle arterie rispetto alle vene, che influisce notevolmente sul danno vascolare rendendo meno gravi le patologie legate ai vasi venosi.

Da tenere in considerazione è sicuramente la variazione di diametro dei diversi vasi presenti nel corpo umano. La sostituzione di vasi di grande diametro (> 6 mm), come l'aorta, è già stato effettuato con successo utilizzando polimeri sintetici. Tuttavia, la maggior parte delle vene e delle arterie

periferiche presentano un diametro inferiore ai 6 mm. Diversi studi hanno dimostrato, come detto in precedenza, che innesti di polimeri sintetici di piccolo calibro presentano molteplici problemi di vascolarizzazione e formazione di trombi. I tassi di fallimento sono troppo elevati, con pervietà periferica <25% in 3 anni dal trapianto, rispetto a >70% per innesto della vena autologa (Chang and Niklason, 2017). I primi tentativi di generare un vaso di piccolo calibro in vitro furono pubblicati nel 1986. Cellule muscolari lisce in un gel di collagene furono colate attorno a un mandrino per imitare il tessuto vascolare mediale di un'arteria muscolare. Dopo 1 settimana, lo strato di gel di collagene è stato ulteriormente supportato da una guaina in rete di Dacron. Il rivestimento esterno è stato colato con fibroblasti e incubato per altre due settimane per formare uno strato simile all'avventizia. Infine, la struttura tubolare è stata sfilata dal mandrino e le cellule endoteliali sono state seminate nel lume per 1 settimana. Sebbene si formasse uno strato endoteliale in grado di rilasciare prostaciclina per inibire l'aggregazione piastrinica, la resistenza alla rottura ottenuta con questi innesti era di soli 300 mm Hg, troppo bassa per resistere all'impianto arterioso (Weinberg and Bell, 1986). Nonostante questo tipo di arteria ingegnerizzata non sia mai stata impiantata con successo *in vivo*, questo lavoro è stato importante concettualmente per la ricerca poiché è servito come punto di partenza per la co-coltura di cellule endoteliali e per il supporto di cellule murali per l'ingegnerizzazione di strutture simili alle arterie (Chang and Niklason, 2017).

1.6.1 Requisiti scaffold

Come detto in precedenza, gli innesti vascolari ingegnerizzati hanno tre obiettivi principali: i) replicare la funzione biologica del vaso nativo; ii) facilitare la localizzazione e il trasporto di cellule bioattive in siti specifici del corpo, guidando così lo sviluppo di nuovi tessuti; iii) definire e mantenere una struttura tridimensionale per il sostegno e la crescita cellulare (Kim and Mooney, 1998).

I requisiti per gli scaffold, quindi, possono essere divisi in due categorie: una che riguarda la sfera biologica e l'altra le prestazioni meccaniche. Il materiale ideale per la loro fabbricazione deve essere: biocompatibile, biodegradabile, inerte, non tossico e non cancerogeno. Questo rende la protesi resistente a calcificazione, stenosi, trombosi, alle infezioni e quindi al rigetto (Matsuzaki et al., 2019). L'incorporazione di molecole attive è un possibile aiuto per l'ottenimento di queste prestazioni. Un altro requisito è la bioattività, ovvero la capacità del materiale di formare un legame diretto con il tessuto circostante. La matrice deve favorire l'ancoraggio delle cellule per la formazione del nuovo tessuto. Dal punto di vista chirurgico deve essere facilmente maneggiabile, suturabile e disponibile.

L'innesto sintetico inoltre deve avere proprietà meccaniche sufficienti a resistere alla pressione sanguigna, senza provocare perdite, e mantenere uno spazio potenziale per lo sviluppo dei tessuti. Il supporto fornito è solo temporaneo, il materiale viene piano piano degradato e sostituito dalla nuova matrice naturale prodotta dal corpo. La velocità di degradazione dello scaffold, quindi, assume una grande importanza e deve essere tale da coincidere con il tempo di ricostruzione del tessuto da parte dell'organismo (Matsuzaki et al., 2019).

Alcune caratteristiche delle protesi vengono gestite attraverso le diverse tecniche di fabbricazione, per esempio: la vascolarizzazione del tessuto ingegnerizzato, che deve essere promossa, viene controllata attraverso la porosità della matrice; la variazione della porosità influisce sulla proliferazione cellulare; le pareti devono essere flessibili per resistere ai carichi ciclici; lo spessore deve risultare compatibile con quello del vaso danneggiato, soprattutto in termini di elasticità.

Infine, nello sviluppo di qualsiasi prodotto di ingegneria tissutale, è necessario tenere conto dei requisiti di approvazione della Food and Drug Administration (FDA), fondamentale per l'immissione sul mercato e il successivo utilizzo clinico (Hasan et al., 2014).

1.6.2 Materiali impiegati

Gli scaffold usati in ingegneria tissutale possono essere fabbricati a partire da due classi di biomateriali: di derivazione naturale e sintetici (Rosso et al., 2006). I materiali presenti in natura sono composti da polipeptidi, polisaccaridi, acidi nucleici, idrossiapatiti o loro composti. Presentano alcuni vantaggi rispetto ai materiali sintetici, ovvero: eccellente attività fisiologica, proprietà meccaniche simili ai tessuti naturali e biodegradabilità. Per contro offrono una versatilità limitata: hanno caratteristiche specifiche, sia sotto il punto di vista meccanico che chimico, difficilmente modellabili e non sono riproducibili su larga scala, oltre al rischio di infezione virale e risposta immunitaria che derivano dal loro utilizzo. I materiali sintetici, invece, sono riproducibili su larga scala e possono essere lavorati per variarne le caratteristiche, quindi si possiede un maggiore controllo delle proprietà meccaniche e sui tempi di degradazione. Lo svantaggio è la mancanza di segnali di riconoscimento cellulare. Le interazioni, che avvengono attraverso adesione cellula-matrice, sono i precursori dello sviluppo del tessuto, e sono dunque indispensabili. Per ovviare a questo problema sono in corso studi per incorporare peptidi di adesione cellulare nei biomateriali, ottenendo così un materiale ibrido con i vantaggi di entrambi i tipi di matrice, naturale e sintetica (Rosso et al., 2006).

Attualmente i polimeri sintetici più usati per la produzione di protesi vascolari sono: poli(etilen-tereftalato) (PET o Dacron), politetrafluoroetilene espanso (ePTFE o Teflon) e poliuretani. Si tratta di materiali inerti (interagiscono in modo minimo con sangue e tessuti) e non biodegradabili, le protesi così prodotte e impiantate rimangono nel corpo per tutta la vita del paziente. Al contrario, i polimeri sintetici emergenti, ancora in fase sperimentale sono: poli(acido glicolico) (PGA), poli(acido lattico) (PLA), poli(ϵ -caprolattone) (PCL), poli(glicerol sebacato) (PGS). Si tratta di materiali biodegradabili, i quali agiscono come impalcatura temporanea e vengono lentamente consumati dall'organismo, permettendo quindi un'ottimizzazione delle interazioni tessuto-biomateriale (Matsuzaki et al., 2019). Le tipologie e le relative caratteristiche di questi polimeri sintetici sono:

- Dacron: Dacron è il nome commerciale del poli(etilen-tereftalato) o PET, un polimero termoelastico appartenente alla famiglia dei poliesteri. Fu introdotto nel 1939 e successivamente, nel 1950, fu sviluppato e brevettato da DuPont. I primi innesti vascolari così realizzati furono impiantati per la prima volta da Julian nel 1957 e DeBakey nel 1958 (Hess 1985; Xue and Greisler, 2003). È molto utilizzato per la sua alta biocompatibilità e il basso tasso di rigetto (Tremblay et al., 2009). Forte, flessibile e durevole, la sua elevata stabilità gli permette di resistere per più di dieci anni dopo l'impianto senza un deterioramento significativo. Tuttavia, la risposta meccanica del Dacron è diversa da quella dell'aorta umana, comportando condizioni non ottimali che possono influenzare negativamente le funzioni cardiache (Xue and Greisler, 2003). La dissomiglianza è evidente quando si analizza la fibra stessa: il comportamento elastico delle fibre di poliestere corrisponde alle fibre di collagene mentre nessun componente dell'innesto svolge il ruolo della fibra di elastina, ovvero non c'è risposta elastica a basso stress (Singh et al., 2015). Le caratteristiche inoltre variano in base a come le fibre di PET vengono intrecciate durante la produzione della protesi. Gli innesti in Dacron clinicamente disponibili sono fabbricati in due forme: tessuti o a maglia (Figura 5). Gli innesti tessuti vengono prodotti intrecciando due gruppi di filati (ordito e trama) orientati a 90° gli uni rispetto agli altri, il che si traduce in una porosità limitata e uno scorrimento assiale minimo.

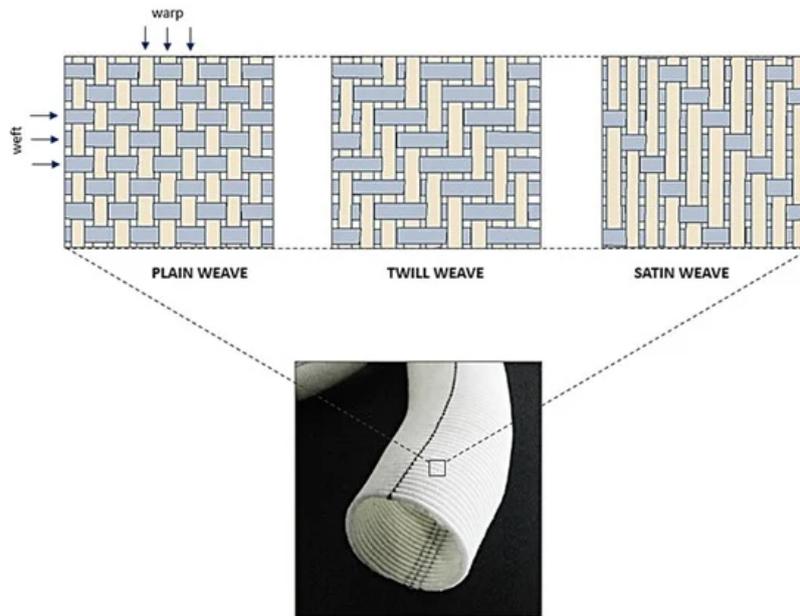


Figura 5: Innesti disponibili in diversi tipi di design della trama (semplice, twill e satinato)

(Singh et al., 2015)

La flessibilità, la distensibilità e la resistenza all'attorcigliamento possono essere migliorate con trattamenti successivi (crimpatura) ma, nonostante sia stata condotta molta ricerca sull'ottimizzazione delle proprietà meccaniche dell'innesto finito, la compliance/elasticità assiale è ancora un problema irrisolto e ha un'influenza diretta sulla pervietà a lungo termine (Singh et al., 2015). Gli innesti a maglia invece sono costituiti da una catena continua di anelli di filo interconnessi, avvolti a spirale attorno alla circonferenza della protesi (Figura 6).

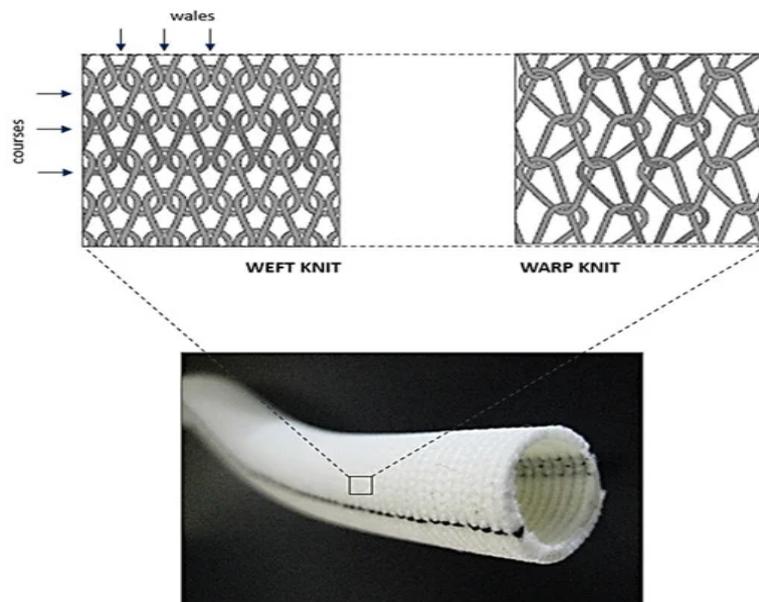


Figura 6: Rappresentazione delle tipologie più comuni di costruzioni a maglia

(Singh et al., 2015)

Questo tipo di struttura è molto più morbida, più flessibile, conforme e maneggevole rispetto alle strutture tessute. Tuttavia, sono state osservate anche elevata porosità e dilatazione a lungo termine (tendono a dilatarsi una volta impiantati nell'ambiente arterioso, più a causa della tecnica di fabbricazione che del polimero stesso). L'alta porosità rende necessari trattamenti di coating con sostanze come gelatina, collagene e albumina per prevenire lo stravasamento di sangue dopo l'intervento (Singh et al., 2015). Nonostante le differenti caratteristiche non sono state segnalate differenze cliniche riguardanti complicanze o pervietà tra i due tipi di produzione nel loro utilizzo come innesti aortici.

- **Teflon:** Teflon è il nome commerciale del politetrafluoroetilene (PTFE), un polimero appartenente alla classe dei perfluorocarburi (PFC). È stato brevettato da DuPont nel 1937 e il suo uso medico iniziò negli anni '60 con la produzione di valvole cardiache artificiali (Xue and Greisler, 2003). Solo successivamente, nel 1969, quando fu introdotta la forma espansa (ePTFE, chiamato anche Gore-tex dal suo inventore), venne usato come materiale di produzione per gli innesti vascolari. Questo perché le protesi ottenute per intreccio delle fibre di PTFE portavano alla formazione di emorragie ed aneurismi, a differenza dell'ePTFE. Il Teflon è sintetizzato a partire dal tetrafluoroetilene tramite polimerizzazione a catena, effettuata per via radicalica. È un materiale chimicamente inerte, non subisce deterioramento biologico all'interno dell'organismo, ha ottime proprietà dielettriche e antiaderenti, gli innesti così prodotti possiedono una superficie elettronegativa (il che minimizza la sua reazione con il sangue) (Puts et al., 2019). La forma espansa viene prodotta mediante un processo di riscaldamento, stiramento ed estrusione da cui si ottiene un materiale microporoso che favorisce maggiormente l'adesione solida dei tessuti. La struttura è costituita da noduli di PTFE interconnessi e orientati attraverso fibrille fini, con una distanza internodale media di 30 μm per un innesto standard (Xue and Greisler, 2003). Nonostante la differenza nelle proprietà chimiche e fisiche tra gli innesti in ePTFE e Dacron, i tassi di pervietà e la reazione dell'organismo ospite dopo l'impianto sono comparabili. Queste protesi infatti presentano svantaggi non trascurabili, come: fenomeni di colonizzazione batterica superficiale, rischio di trombosi per accumulo di materiale e limitazione del flusso, scarsa compliance (Xue and Greisler, 2003).
- **Poliuretano:** I poliuretani (PU) sono macromolecole contenenti legami uretanici [R – NH – CO – O – R']. A questa categoria appartengono numerosi materiali con caratteristiche anche molto differenti tra loro, utilizzabili in svariati ambiti. Furono originariamente sviluppati a

livello commerciale in Germania negli anni '30 come rivestimenti superficiali, schiume e adesivi. Contemporaneamente ne sono state valutate le proprietà per vari tipi di applicazioni mediche, infatti il PU è stato utilizzato per la prima volta come biomateriale nella produzione di pompe a rulli impiantabili, dispositivi di assistenza ventricolare e come rivestimento per i primi cuori artificiali. Da allora è stato ampiamente impiegato in molti campi biomedici (Boretos and Pierce, 1967). Sono state studiate molte vie per la sintesi del poliuretano ma quella più utilizzata rimane la reazione di poliaddizione tra un poliolo e un poliisocianato. A seconda della loro struttura possono essere suddivisi in: lineari (PU termoplastici, a segmenti), reticolati (PU termoindurenti) oppure espansi (schiume rigide e flessibili). Per la realizzazione di dispositivi impiantabili a contatto con il sangue e i tessuti molli (come ventricoli artificiali, protesi vascolari di piccolo calibro e valvole cardiache) viene utilizzato il PU lineare (Xue and Greisler, 2003). È un materiale che possiede eccellenti proprietà meccaniche, emocompatibilità, elevata resistenza all'abrasione e flessibilità. Queste caratteristiche rendono il PU interessante per la produzione di innesti vascolari (Gorna and Gogolewski, 2006). L'elevata elasticità consente la realizzazione di protesi di piccolo calibro con ottime proprietà chimico-fisiche e compliance. Il principale vantaggio dei poliuretani rispetto agli altri polimeri, nella realizzazione di protesi, risiede nella loro grande versatilità: attraverso un'appropriata selezione dei reagenti di base e dei loro rapporti stechiometrici, è possibile ottenere materiali con caratteristiche meccaniche, biocompatibilità e biodegradabilità completamente diverse. Tuttavia, presenta limiti *in vivo* legati alla scarsa stabilità e alla propensione a calcificazione dovuti a fenomeni di idrolisi e ossidazione, i quali riducono le probabilità di successo dell'impianto portando a perdita di prestazioni e di longevità (Wendels and Avérous, 2021). Inoltre, nonostante la biocompatibilità generalmente accettata del PU, permangono alcuni problemi di sicurezza durante ciascuna fase della sintesi: il poliisocianato è un composto tossico, i reagenti (polioli e poliisocianati) possono contenere impurità e, nel materiale finale, possono essere presenti residui di reagenti non reagiti, additivi e catalizzatori. Quindi, la purezza dei materiali di partenza, un rapporto stechiometrico controllato e la presenza di additivi, svolgono un ruolo fondamentale nel livello di biocompatibilità del prodotto finito (Wendels and Avérous, 2021). Un'altra preoccupazione relativa all'utilizzo del PU nella fabbricazione di scaffold è il potenziale effetto cancerogeno dei suoi prodotti di degradazione. Nel 1991 la FDA ha interrotto il commercio della schiuma PU come materiale di rivestimento superficiale delle

protesi mammarie, rilasciando una dichiarazione riguardante la formazione di 2,4-toluene diammina durante la degradazione del materiale, sostanza che ha dimostrato causare cancro al fegato negli animali usati per la sperimentazione (Xue and Greisler, 2003). Inoltre, i risultati presenti in letteratura relativi agli innesti di PU sono discrepanti a causa delle differenze adottate durante il processo (composizioni dei polimeri, metodi di fabbricazione, porosità e trattamenti di modifica superficiale). Quindi non si può affermare che gli scaffold in poliuretano siano migliori di quelli in ePTFE o Dacron.

- PGA: L'acido poliglicolico (PGA) è uno dei polimeri biorassorbibili più comunemente studiati nel campo delle protesi vascolari. È altamente cristallino e idrofilo, è stato utilizzato per la realizzazione della prima sutura riassorbibile. Perde la sua resistenza meccanica da 2 a 4 settimane dopo l'impianto a causa della degradazione idrolitica che avviene in vivo. Questo tipo di polimeri ha il vantaggio di non lasciare materiale estraneo nel corpo, limitando quindi la risposta immunitaria dell'organismo. Ha lo svantaggio, però, di subire frammentazione quando esposto agli ambienti biologici, il che si traduce nella formazione di prodotti di trasformazione più piccoli che possono rimanere o meno presenti nel sito d'impianto (Xue and Greisler, 2003). Il PGA in particolare si degrada in acido glicolico, che viene scomposto dalle cellule in acqua e anidride carbonica (sottoprodotti non tossici per l'organismo). Una caratteristica fondamentale dei polimeri biorassorbibili è che devono permettere la rigenerazione di un tessuto con proprietà strutturali idonee, prima della perdita per degradazione dell'integrità meccanica della protesi. Un'impalcatura realizzata solo in PGA non ha abbastanza resistenza per contrastare la pressione arteriosa. Ha, inoltre, una velocità di degradazione troppo elevata che non consente la formazione di un adeguato neo tessuto, portando a dilatazione aneurismatica e perdita di integrità del materiale (Matsuzaki et al., 2019). Il PGA può essere sintetizzato singolarmente o come copolimero, per esempio con il PLA, in modo da regolarne le caratteristiche chimico-fisiche variando il rapporto lattide:glicolide. Questa versatilità li rende clinicamente attraenti.
- PLA: L'acido polilattico (PLA) è un altro polimero biorassorbibile ampiamente utilizzato in ingegneria tissutale. È più idrofobo del PGA a causa della presenza di un gruppo metilico extra nella molecola di lattide, che limita l'affinità con l'acqua e si traduce in tempi di degradazione più lunghi (da 6 a 12 mesi). Le caratteristiche idrofobe, però, aumentano il pericolo di formazione precoce di trombi. La ricerca è volta alla riduzione di questa tendenza trombotica attraverso semina cellulare e/o modifiche chimiche della superficie (Matsuzaki et al., 2019).

L'acido lattico è una molecola chirale, dunque il suo polimero esiste in due forme stereoisomeriche: D-PLA e L-PLA. L'L-PLA possiede elevata resistenza meccanica e quando degradato produce L-lattico, molecola presente in natura, per questo viene maggiormente utilizzato per la fabbricazione di scaffold.

- PCL: Il poli(ϵ -caprolattone) è un poliesteri termoplastico alifatico, altamente biocompatibile e biodegradabile, caratteristiche che lo rendono molto attraente e utilizzato in campo biomedico. È un materiale semicristallino, possiede una temperatura di fusione bassa il che lo rende molto flessibile e facile da lavorare. Ha uno dei profili di degradazione più lenti tra quelli dei polimeri biodegradabili ed è idrofobo, quindi in alcuni casi può essere necessario migliorarne la capacità di adesione cellulare. Sono due i metodi seguiti per la sintesi del PCL: la polimerizzazione con apertura dell'anello dell' ϵ -caprolattone, catalizzata con iniziatori ionici, carbossilati metallici e alcossidi a temperatura maggiore di 120°C, oppure attraverso policondensazione dell'acido 6-idrossiesanoico, metodo limitato dalla bassa qualità dei prodotti (Figura 7) (Azari et al., 2022).

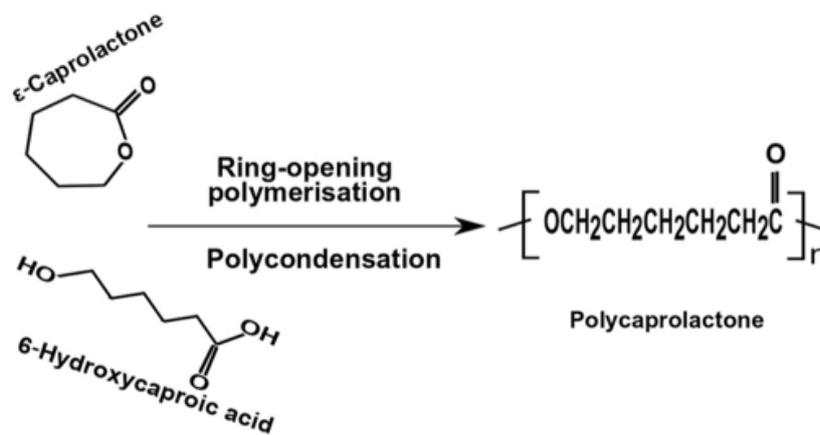


Figura 7: Schema sintesi poli(ϵ -caprolattone)

(Azari et al., 2022)

Uno dei motivi per cui il PCL è ampiamente utilizzato in ambito clinico è la sua ottima miscibilità in molti solventi. A temperatura ambiente è solubile per esempio in: cloroformio, toluene, benzene, tetracloruro di carbonio, cicloesano, tetraidrofurano, dimetil carbonato e diossano diclorometano. È insolubile in: acqua, alcoli, etere etilico ed etere di petrolio. In diversi solventi il PCL ha proprietà meccaniche differenti, il che ha permesso ai ricercatori di adattarlo ai vari impieghi. Grazie alla sua durata e facilità di manipolazione, il PCL viene utilizzato per produrre innesti adatti agli ambienti arteriosi. Sono stati condotti numerosi

studi *in vivo* per la valutazione di protesi elettrofilate impiantate in ratti, con intervalli di 3, 6 e 9 mesi. La pervietà dell'innesto era del 100% e non mostrava segni di trombosi. Nonostante questo, il materiale deve ancora essere completamente caratterizzato perché ha tempi di degradazione maggiori rispetto alla vita dei roditori (Matsuaki et al., 2019).

Alcuni dei dispositivi composti da PCL sono già stati approvati dalla FDA per l'uso nell'uomo. Spesso un singolo polimero non possiede tutte le proprietà richiesta da uno scaffold ideale. Il PCL è miscibile con altri polimeri, grazie a questo viene spesso impiegato in combinazione con materiali diversi, organici e inorganici (Malikmammadov et al., 2017);

- PGS: Il poli(glicerol sebacato) è un elastomero termoindurente morbido, estremamente versatile, biocompatibile e biorassorbibile, con proprietà meccaniche e degradabilità regolabili. Mostra un grande potenziale di applicazione nel campo biomedico: negli ultimi anni la ricerca ha fatto molti progressi nello sviluppo delle sue proprietà chimico-fisiche attraverso nuove reazioni di sintesi e di copolimerizzazione, rendendo disponibili un gran numero di sistemi polimerici basati sul PGS. Inizialmente è stato applicato nell'ingegneria dei tessuti morbidi ma il suo studio è stato poi esteso all'applicazione nella rigenerazione dei tessuti ossei, applicazioni dentali o per la somministrazione di farmaci (Vogt et al., 2021). Il PGS è stato sintetizzato come poliesteri resistente per la prima volta nel 2002 (Wang et al., 2002).

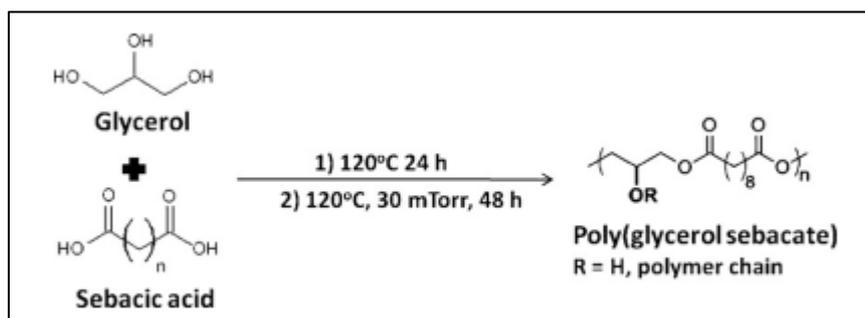


Figura 8: Schema sintesi PGS

(Rai et. al., 2012)

Composto da glicerolo e acido sebacico, viene preparato attraverso polimerizzazione in due fasi, eseguita in condizioni variabili di temperatura e tempo di reazione (Figura 8): un pre-polimero a catena lineare viene sintetizzato tramite pre-policondensazione, in seguito viene fatta avvenire la reticolazione per formare la struttura a rete tridimensionale. Sulla catena principale sono presenti gruppi idrossilici, tra cui si instaurano legami a idrogeno.

Il PGS risultante è un elastomero resistente e flessibile, con un comportamento sforzo-deformazione non lineare (ritorna allo stato iniziale anche dopo grandi deformazioni). Queste proprietà sono causate dalla reticolazione covalente e dalle interazioni a idrogeno. La sua degradazione lenta, una volta impiantato nell'ambiente fisiologico, lo rende un materiale stabile. Inoltre, entrambi i reagenti di sintesi sono stati approvati dalla FDA e sono direttamente rinvenibili nel processo di metabolismo umano (Sha et al., 2021). Il PGS non è immunogenico e citotossico. *In vivo* ha provocato una risposta infiammatoria minima e scarsa formazione di capsule fibrose. Per la realizzazione di scaffold venosi il PGS puro e non trattato viene spesso miscelato con altri polimeri sintetici o naturali, in modo da realizzare protesi con proprietà adatte. Infatti, il PGS puro presenta difficoltà di lavorazione a causa della sua bassa viscosità in soluzione. Una miscela ormai consolidata è PGS:PCL in solventi come cloroformio:etanolo in rapporti variabili, o tetraidrofurano. Produce scaffold stabili, che non necessitano di ulteriori lavorazioni, e variando il rapporto tra i polimeri si possono ottenere caratteristiche strutturali differenti.

Alle soluzioni polimeriche preparate per i vari processi di produzione degli scaffold possono essere aggiunte talvolta sostanze atte alla funzionalizzazione di questi ultimi. Una di queste è la quercetina, molto utilizzata in campo biomedico per le sue proprietà e caratteristiche.

La quercetina, in nomenclatura IUPAC 3, 3', 4', 5, 7-pentahydroxyflvanone, è un composto organico naturale appartenente alla famiglia dei flavonoidi, categorizzati come composti fenolici (Figura 9). La sua presenza è diffusa in molte piante e prodotti vegetali (ovvero alimenti fermentati e trasformati) come broccoli, pomodori, agrumi, uva, tè e caffè. Nella sua forma cristallina si presenta come un cristallo aghiforme giallo cedro brillante, del tutto insolubile in acqua fredda ma abbastanza solubile in alcool e lipidi (Li et al., 2016).

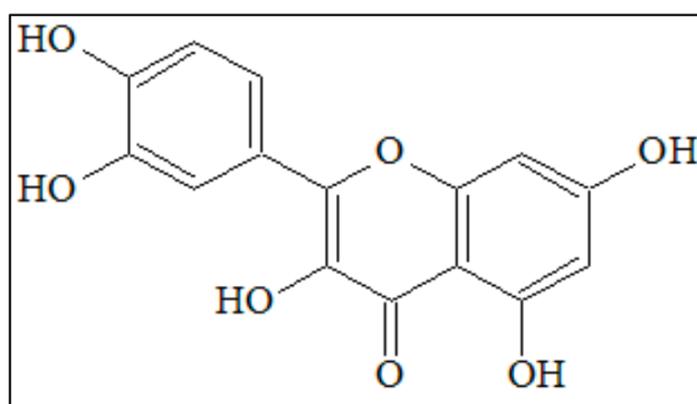


Figura 9: Quercetina

(<https://www.artoi.it/quercitina-e-bioflavonoidi/>)

Si tratta di un aglicone, senza zuccheri legati, e spesso si presenta sotto forma di glicoside (può essere legato al ramnosio o al rutinosio) (Formica and Regelson, 1995). La presenza del gruppo glicosilico modifica la solubilità (che risulta maggiore in acqua rispetto all'aglicone), l'assorbimento e gli effetti in vivo (Li et al., 2016). La quercetina è il flavonoide più frequentemente studiato in quanto è conosciuto per le sue ottime proprietà biologiche (Formica and Regelson, 1995):

- Antinfiammatorie: modificano la biosintesi degli eicosanoidi;
- Proteggono le lipoproteine a bassa densità dall'ossidazione, prevenendo così la formazione di placche aterosclerotiche;
- Antitrombotiche: prevengono l'aggregazione piastrinica;
- Antiipertensive e aritmiche: promuovono il rilassamento della muscolatura liscia cardiovascolare;
- Antitumorali: inibisce la proliferazione di alcuni tipi di cellule tumorali.

1.6.3 Tecniche di fabbricazione

Nel corso della storia sono stati riscontrati molti problemi nella realizzazione di modelli vascolari tridimensionali, soprattutto se di piccolo diametro. Con lo sviluppo di tecnologie come elettrofilatura e biostampa si è riusciti a ottenere vari metodi per la fabbricazione di costrutti 3D vascolarizzati e con caratteristiche precise (Kong and Wang, 2023).

Una delle tecniche di maggior interesse è l'elettrofilatura. Si tratta di un processo ampiamente utilizzato per la produzione di fibre elettrostatiche, a partire da soluzioni polimeriche o polimeri fusi, con diametri nel range nanometri-micrometri. Nell'ultimo decennio ha attirato l'attenzione di molti ricercatori grazie ai numerosi vantaggi che offre: le fibre elettrofilate possiedono un rapporto superficie/volume estremamente elevato, struttura dei pori controllabile, dimensioni, forma e composizione regolabili, in modo da ottenere le proprietà strutturali e meccaniche desiderate. È una tecnica semplice ed economica, molto versatile in quanto permette di trattare un'ampia varietà di polimeri. Le sue applicazioni sono innumerevoli, tra cui: nanocatalisi, produzione di scaffold per la TE, industria farmaceutica, indumenti protettivi, biomedicina, ingegneria ambientale, elettronica (Bhardwaj and Kundu, 2010).

L'elettrospinning è stato studiato per la prima volta da Zeleny nel 1914. Successivamente Formhals, tra il 1934 e il 1944, pubblicò una serie di brevetti che consistevano in un apparato sperimentale per la produzione di filamenti polimerici attraverso l'uso di una forza elettrostatica. Il lavoro di Taylor sui getti di liquido azionati elettricamente, del 1964, ha gettato le basi per l'elettrospinning (Taylor 1964).

Lui dimostrò che ad una certa tensione critica, la forma di equilibrio della goccia sospesa è un cono di angolo semi-verticale pari a $49,3^\circ$; quando la tensione applicata supera quella critica viene espulso un getto stabile di liquido (Zong et al., 2002). La configurazione tipica di un apparato per elettrofilatura è costituita dai seguenti componenti: alimentatore ad alta tensione, pompa a siringa, tubo capillare e ago di iniezione, collettore collegato a terra (può essere una piastra o un mandrino rotante) (Figura 10).

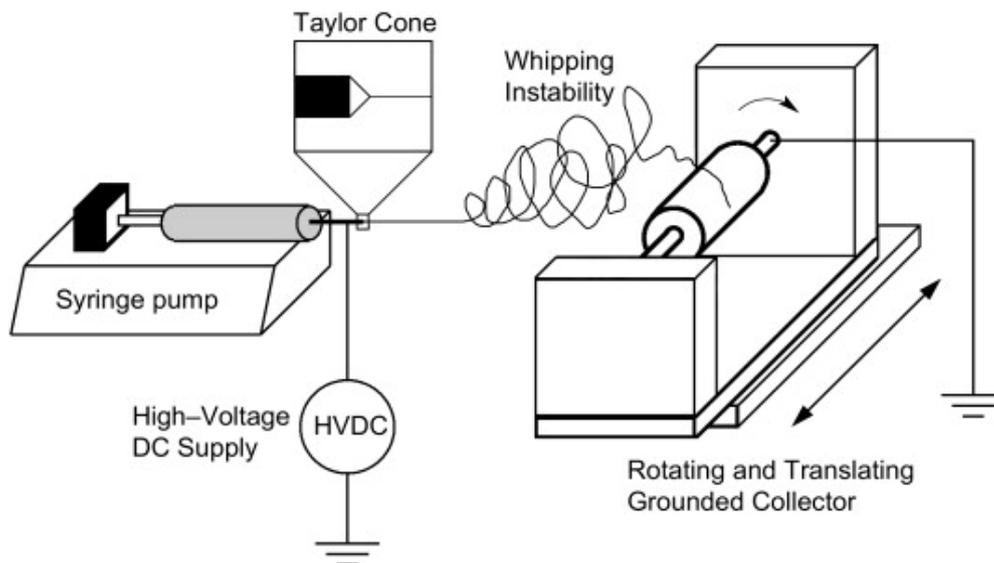


Figura 10: Schema processo elettrospinning

(Sill and von Recum, 2008)

L'operazione viene condotta a temperatura ambiente e in condizioni atmosferiche (Bhardwaj and Kundu, 2010). La maggior parte dei polimeri viene prima disciolta in solventi, successivamente caricata nella siringa e pompata a flusso lento nel capillare. Alla soluzione viene applicata un'elevata tensione continua che provoca l'instaurarsi di forze repulsive tra le cariche simili presenti nel liquido. Sotto questo ampio campo elettrico, la punta della goccia di materiale uscente dall'ago subisce una deformazione a forma di cono (cono di Taylor). Quando la tensione applicata è sufficientemente elevata da superare le forze superficiali che agiscono su tale cono, uno stretto getto di liquido si genera e viaggia verso il collettore, anch'esso caricato elettricamente ma con polarità opposta rispetto a quella della soluzione. Nel tragitto tra ago e collettore il solvente evapora e la fibra solida si deposita (Boudriot et al., 2006).

I parametri che regolano il processo di elettrofilatura influenzano la morfologia delle fibre prodotte e possono essere classificati in tre gruppi (Bhardwaj and Kundu, 2010):

- Parametri di processo: portata volumetrica, tensione applicata, dimensione e forma di ago e collettore e la distanza tra essi. Il valore della portata indica la quantità di soluzione trattata nell'unità di tempo. All'aumentare di quest'ultima, se mantenuta costante, il diametro delle fibre e la porosità aumentano (Sill and von Recum, 2008). Tuttavia, a flussi elevati, il tempo a disposizione del solvente per evaporare diminuisce, potrebbe quindi rimanere come residuo del prodotto finito. Per quanto riguarda la tensione applicata in letteratura sono riportati risultati contraddittori. In alcuni casi un aumento della tensione non ha alcun effetto sulle fibre, in altri viene riportato che potrebbero verificarsi sia aumento che diminuzione del diametro (Buchko et al., 1999; Larrondo and St John Manley, 1981; Zhang et al., 2005).

La distanza tra la punta dell'ago e il collettore influenza sia l'intensità del campo elettrico, sia il tempo che il getto impiega per raggiungere il collettore. Al diminuire della distanza il campo elettrico aumenta rendendo il getto instabile, il che può portare alla formazione di goccioline sulle fibre. Inoltre, in questo caso, il getto è più veloce e il solvente non ha il tempo di evaporare completamente (Sill and von Recum, 2008). Al contrario aumentando la distanza le fibre prodotte hanno dimensioni inferiori. Viene quindi prima fissato il campo elettrico da applicare e successivamente la distanza adatta per ottenere le proprietà desiderate.

- Parametri della soluzione: viscosità della soluzione, conduttività elettrica, peso molecolare del polimero, concentrazione e tensione superficiale. La conoscenza di questi parametri è fondamentale per la formazione di fibre uniformi, continue e stabili. La viscosità ha un ruolo fondamentale: se non è sufficientemente elevata si rischia la rottura del getto e la comparsa di gocce sulle fibre prodotte. Per regolare questo valore si può agire sul peso molecolare del polimero di partenza o sulla concentrazione della soluzione. A un aumento di questi due parametri consegue un aumento della viscosità. Sono quindi tutti e tre strettamente correlati tra loro. Mentre in genere si utilizzano sempre polimeri con elevato peso molecolare, esistono valori ottimali di viscosità, importanti nella determinazione dell'intervallo di concentrazione in cui si possono ottenere fibre continue (Bhardwaj and Kundu, 2010). Per quanto riguarda la dimensione di quest'ultime le ricerche indicano che: un aumento di concentrazione, viscosità e peso molecolare portano ad un aumento del diametro e quindi a una porosità maggiore. Anche la conducibilità elettrica ha un effetto diretto sul diametro delle fibre elettrofilate, ma opposto rispetto ai parametri sopra citati. Generalmente il

diametro diminuisce con l'aumento della conducibilità della soluzione (Sun et al., 2014). Per raggiungere valori adeguati è importante la scelta del solvente: è preferibile un solvente polare oppure può essere aggiunta alla soluzione una piccola quantità di sali, aumentando così gli ioni presenti. La tensione superficiale è influenzata maggiormente dal solvente e gioca un ruolo fondamentale nel processo. Se elevata causa instabilità del getto inibendo il processo di elettrofilatura e generando gocce sulle fibre, per questo sono preferibili valori di tensione superficiale inferiori (Haghi and Akbari, 2007).

- Parametri ambientali: le condizioni di temperatura ed umidità devono essere controllate per garantire che il processo si svolga in modo ottimale. L'aumento della temperatura diminuisce la viscosità della soluzione, e quindi provoca una diminuzione del diametro delle fibre. D'altra parte, velocizza l'evaporazione del solvente garantendo così l'eliminazione di possibili residui nel prodotto finito (De Vrieze et al., 2009). L'umidità relativa invece controlla il processo di solidificazione del getto: all'aumentare di questa si ha la formazione di una struttura porosa e diminuzione del diametro delle fibre (la velocità di solidificazione è minore, le fibre hanno il tempo di allungarsi maggiormente), se troppo elevata l'elettrofilatura della soluzione diventa difficile, quasi assente, e si osserva la presenza di perline sul materiale prodotto. Al contrario se troppo bassa la velocità di evaporazione del solvente può superare la velocità di uscita della soluzione dall'ago (il processo di solidificazione delle fibre è più veloce), provocando così l'intasamento di quest'ultimo (Haider et al., 2018).

L'elettrofilatura ha quindi la capacità di combinare le caratteristiche dei materiali sintetici e naturali, offre un elevato controllo sulle proprietà degli scaffold prodotti, e possibilità di ottimizzazione di quest'ultime (Hasan et al., 2014). Ma nonostante i numerosi vantaggi ci sono alcune problematiche da tenere in considerazione. Una limitazione è la scarsa infiltrazione cellulare in profondità dello scaffold, condizione che si verifica a causa dell'elevata densità di impacchettamento delle fibre. I piccoli diametri ricercati portano alla formazione di pori di dimensioni ridotte, inferiori rispetto alle dimensioni delle cellule che devono interagire con il materiale, limitandone la migrazione all'interno delle protesi (Bhardwaj and Kundu, 2010). Gli approcci più recenti consistono in procedure postproduzione (per esempio elettrospray, tecnica limitata da problemi di sterilità, tempo e stratificazione) o utilizzo di fibre sacrificali miscelate alle normali fibre a lenta degradazione (vengono rimosse dopo l'elettrofilatura in modo da aumentare la porosità degli scaffold) (Baker et al., 2008). Un'altra tecnica di fabbricazione per protesi cardiovascolari è la biostampa 3D. Si tratta di una tecnologia di stampa assistita da computer per l'assemblaggio rapido di tessuti, basata sulla

deposizione strato per strato di materiali biologici a formare una struttura tridimensionale (Groll et al., 2016). Lo scopo è la produzione di tessuti e organi ingegnerizzati in modo meccanizzato, organizzato e ottimizzato. Consente un elevato controllo della struttura in termini di forma dei materiali, deposizione multi-materiale, incorporazione di una popolazione cellulare differenziata, simulando così l'eterogeneità dei tessuti vascolari naturali (Lee and Yeong, 2016). Con questa tecnologia è possibile produrre scaffold di dimensioni dell'ordine dei micrometri-millimetri con elevata precisione (Kong and Wang, 2023). Le tradizionali tipologie di biostampa, che rimangono maggiormente utilizzate e ancora in via di sviluppo, sono: biostampa a getto d'inchiostro, biostampa laser assistita e biostampa per estrusione. Ad oggi però gli scaffold vascolari ottenuti con queste tecniche sono limitati a colture in vitro, in quanto non sono ancora in grado di svolgere correttamente le funzioni fisiologiche dei sistemi naturali.

1.7 Bioreattore

L'ultima fase prevista per lo studio dei sostituti cardiovascolari in ingegneria tissutale è il bioreattore. È stato dimostrato che la crescita di cellule e tessuti è maggiore in risposta a sollecitazioni meccaniche dinamiche rispetto alle condizioni di incubazione statica. Per un approccio di questo tipo si impiega il bioreattore, un dispositivo in grado di ricreare in vitro l'ambiente biologico e le condizioni biomeccaniche e biochimiche presenti in vivo (Barron et al., 2003).

Permette quindi di superare i problemi associati alle tradizionali condizioni di coltura statica (Freed et al., 2006), ovvero:

- Migliora la distribuzione cellulare mantenendo una concentrazione uniforme nello scaffold durante la semina, il che facilita le interazioni cellula-cellula;
- L'esposizione ad un determinato flusso di fluido migliora il trasporto di massa aumentando la velocità di diffusione dei nutrienti e di rimozione dei rifiuti;
- La stimolazione meccanica dovuta a miscelazione e perfusione del mezzo di coltura porta a flussi interstiziali che influenzano la differenziazione cellulare;
- Permette un aumento dei tassi di proliferazione e riduce la formazione di nuclei necrotici negli scaffold.

La progettazione del bioreattore deve essere il più semplice possibile in modo da rendere veloci le fasi di montaggio e smontaggio (Plunkett and O'Brien, 2011). In questo modo aumenta l'efficienza e diminuisce il tempo che gli scaffold passano fuori dall'incubatore. Inoltre, è preferibile evitare design dalle forme complesse, con molte rientranze e deviazioni di flusso, perché potrebbero portare alla

proliferazione di microrganismi dannosi per il tessuto coltivato. Grande importanza ha la selezione dei materiali che lo compongono in quanto devono essere tutti biocompatibili e bioinerti, utilizzabili a 37°C in atmosfera umida. Ogni componente deve essere sterilizzato prima di un nuovo utilizzo, in autoclave o mediante immersione in alcool. Queste condizioni escludono la maggior parte dei metalli e limitano l'uso di molte plastiche. Altre caratteristiche da considerare sono la flessibilità (soprattutto per i tubi, aiuta nella fase di assemblaggio) e la trasparenza (utile per il monitoraggio della struttura durante l'uso del dispositivo). Il sistema deve essere progettato in base all'applicazione specifica, tenendo conto di tutti i parametri da controllare ed includendo i sensori necessari. Le forze da applicare per la stimolazione cellulare sono molto piccole, quindi, la pompa deve avere un'elevata sensibilità e accuratezza. Inoltre, devono essere predisposti sistemi per la riduzione delle perdite di fluido dalle guarnizioni. Il problema principale dei bioreattori è la mancanza di protocolli specifici che guidino nel loro utilizzo (Ismadi et al., 2014). Le portate, velocità della pompa o volume del terreno di coltura non sono definiti. Cellule diverse hanno requisiti di coltura diversi, ma per ottimizzare il sistema è necessario stabilire delle linee guida base da adattare successivamente alle varie esigenze.

1.7.1 Tipi di bioreattore

Al giorno d'oggi sono disponibili molti tipi diversi di bioreattori. Una prima distinzione può essere fatta in base alla presenza o meno di flusso in sistemi statici o dinamici (Barron et al., 2003). Nel primo caso il trasferimento di massa avviene per diffusione molecolare, non vi è flusso di fluido sulla superficie dei costrutti in analisi. Questi dispositivi danno come risultato strutture non uniformi a causa della sedimentazione gravitazionale delle cellule (Plunkett and O'Brien, 2011). Nei sistemi dinamici invece la miscelazione e il flusso forzato, applicato attraverso e/o attorno allo scaffold, permettono un trasferimento di massa di tipo convettivo migliorando la struttura dei tessuti in crescita. Per lo sviluppo di sostituti cardiovascolari in Ingegneria Tissutale vengono usati generalmente i sistemi dinamici, di cui fanno parte: spinner flask (pallone rotante), bioreattori a pareti rotanti, bioreattori con flusso a perfusione.

- Lo spinner flask è una delle configurazioni più semplici (Bancroft et al., 2003). È costituito da un contenitore cilindrico in vetro in cui sono posti gli scaffold, posizionati in aghi appositi aderenti al coperchio del contenitore. Viene immesso abbastanza mezzo di coltura da coprire le impalcature in analisi, la miscelazione è garantita da un'ancoretta magnetica posizionata sul fondo (Figura 11).

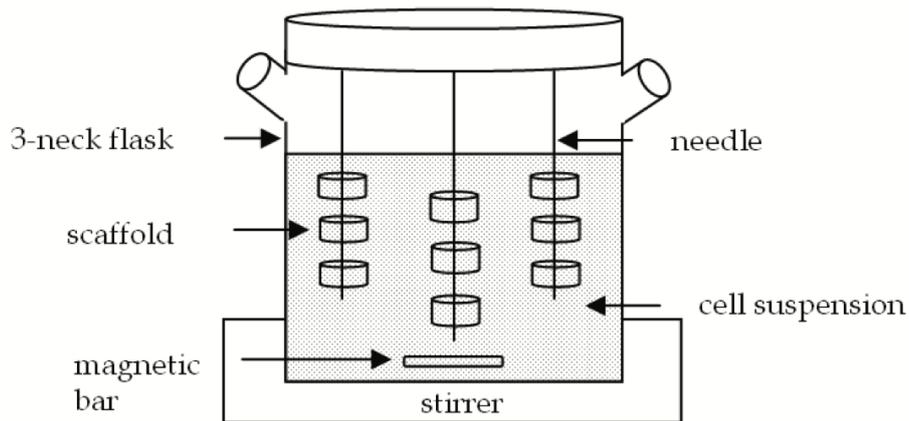


Figura 11: Bioreattore spinner flask

(Plunkett and O'Brien, 2011)

L'agitazione permette la formazione di flussi convettivi che mitigano i gradienti di concentrazione sulla superficie delle protesi e ne migliorano la differenziazione cellulare. Tuttavia, è stato dimostrato che la distribuzione avviene solo in superficie e che l'agitazione del mezzo di coltura genera flussi turbolenti, sfavorevoli per la formazione di tessuti (Ahmed et al., 2019).

- Il bioreattore a pareti rotanti è stato originariamente sviluppato per simulare gli effetti della microgravità (Bancroft et al., 2003). È adatto per l'analisi sia di colture in sospensione che di scaffold. La configurazione più utilizzata è costituita da due cilindri concentrici: quello più esterno è impermeabile e ruota in modo controllato, mentre il più interno è stazionario e permeabile ai gas. Gli scaffold sono posizionati nello spazio interno, rimangono in sospensione perché la caduta libera dovuta alla forza di gravità viene bilanciata dalle forze centrifughe dovute alla rotazione del cilindro esterno (Figura 12).

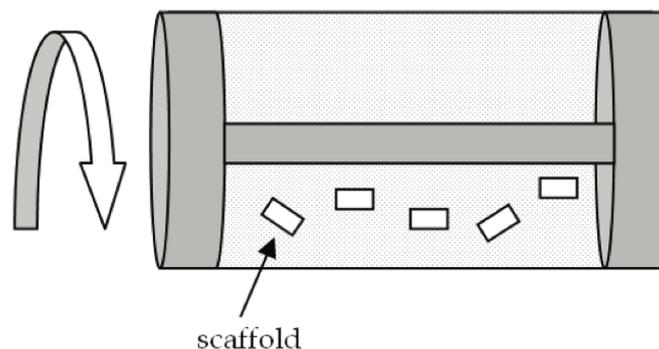
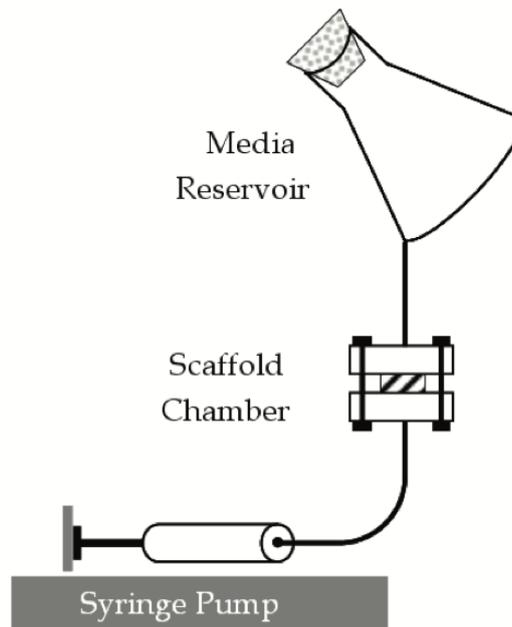


Figura 12: Bioreattore a pareti rotanti

(Plunkett and O'Brien, 2011)

All'interno del mezzo si sviluppano flussi laminari che applicando basse forze di taglio alle impalcature, migliora così l'efficienza di diffusione e la distribuzione cellulare (Plunkett and O'Brien, 2011).

- I bioreattori a perfusione permettono di migliorare il trasporto di massa fornendo un flusso non solo esterno agli scaffold ma anche interno e favorendo così il passaggio dei nutrienti attraverso la matrice porosa (Ahmed et al., 2019). Sono dispositivi versatili e possono essere installati in due configurazioni: chiusa, in cui il mezzo di coltura ricircola, oppure a passaggio singolo, in cui alla protesi viene fornito solo mezzo fresco. Questo tipo di bioreattore è generalmente costituito da una pompa, utilizzata per forzare il flusso attraverso l'impalcatura, e una camera in cui sono posizionati gli scaffold in analisi, collegati tra loro da tubi (Figura 13) (Plunkett and O'Brien, 2011).



*Figura 13: Bioreattore con flusso a perfusione
(Plunkett and O'Brien, 2011)*

La diffusione è fortemente influenzata dalla portata del mezzo di coltura. Per ottimizzare questa configurazione, quindi, bisogna trovare il giusto compromesso tra il trasferimento di massa dei nutrienti, la rimozione degli scarti e le forze di taglio applicate.

Confrontando i tre sistemi è stato dimostrato che, utilizzando la stessa portata e lo stesso tipo di impalcatura, le densità cellulari sono risultate più o meno le stesse mentre la loro distribuzione è risultata migliore con l'utilizzo del bioreattore a perfusione.

2. Materiali e metodi

2.1 Preparazione delle soluzioni polimeriche

Le protesi cardiovascolari in analisi sono state prodotte a partire da due polimeri: poli(ϵ -caprolattone) (PCL) (peso molecolare= 80000 g/mol), e poli(glicerolsebacato) (PGS) (peso molecolare= 2673 g/mol). Tutti i solventi e le sostanze chimiche utilizzate, se non esplicitato diversamente, sono stati forniti da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA), il PGS è stato sintetizzato seguendo il protocollo riportato in Wang et al., 2002. I due polimeri sono stati utilizzati per la preparazione di due soluzioni separate, concentrate al 20% m/v in una miscela di cloroformio:etanolo con un rapporto stechiometrico di 9:1 v/v. L'etanolo non era puro ma si trattava di una soluzione etanolo:quercetina con concentrazione pari a 5,5 mg/ml. Per ottenere la soluzione finale i due preparati sono stati miscelati in rapporto 1:1 v/v, a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) e sotto agitazione magnetica per almeno 2h prima del processo di elettrofilatura. La quercetina è un materiale fotosensibile, quindi la bottiglia di vetro utilizzata è stata tenuta coperta e lontana da fonti luminose. I solventi sono stati scelti per la loro volatilità, adatta al processo di elettrofilatura. La quercetina è stata utilizzata per l'ingegnerizzazione degli scaffold. L'incorporazione diretta di questa sostanza permette di ottenere costrutti vascolari in grado di modulare due fattori coinvolti nel processo di infiammazione post-impianto: la metalloproteinasi-9 e l'ossido nitrico sintasi endoteliale (Ferrari et al., 2023).

2.2 Processo di elettrofilatura

L'apparato di elettrofilatura utilizzato per la produzione di scaffold è quello rappresentato in Figura 13 (Spinbow s.r.l., San Giorgio di Piano, Italia). Il sistema era costituito da: una pompa a siringa (KDS-100, KD Scientific, Holliston, MA, USA), un alimentatore ad alta tensione (serie PCM, Spellman, NY, USA), un ago a punta piatta di calibro 16 e un collettore cilindrico (5,0 mm di diametro esterno e 13,0 cm di lunghezza) (Figura 14). La distanza verticale tra ago e collettore tubolare era di 18 cm.

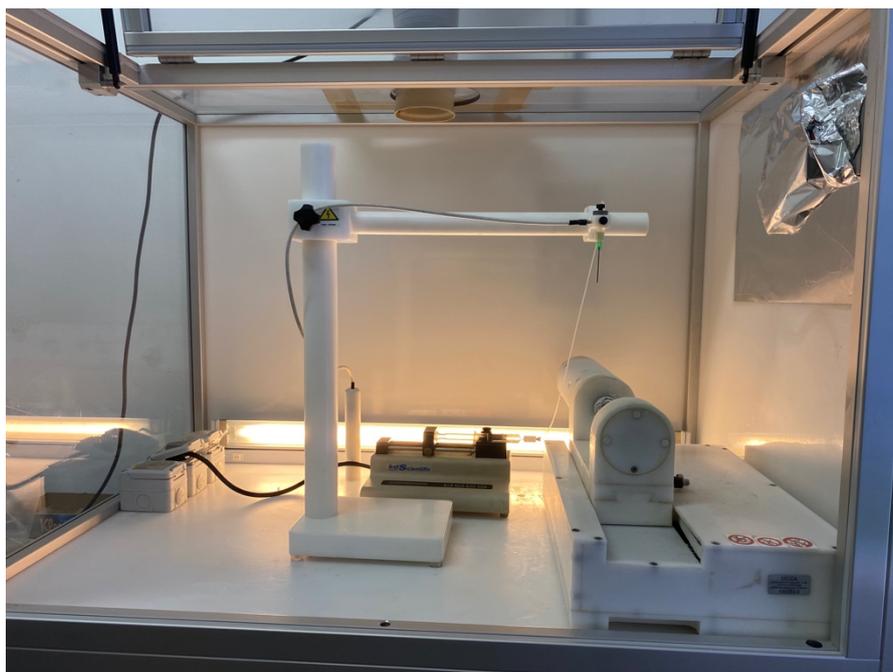


Figura 14: Elettrofilatore

La soluzione polimerica è stata caricata in una siringa di vetro da 5,0 ml (FORTUNA® OPTIMA®, Poulten & Graf GmbH, Wertheim, Germania). Il volume e la portata erogate dalla pompa erano rispettivamente 2,0 ml e 1,10 ml/h. La soluzione veniva spinta dalla siringa all'ago attraverso un capillare. La tensione è stata impostata a 17,0 kV e le velocità di rotazione e traslazione erano 500 rpm e 600 mm/min rispettivamente. Grazie al campo elettrico applicato le fibre caricate venivano raccolte in modo casuale dal collettore fino a formare il costruito tubolare. I parametri operativi sono stati mantenuti costanti per ogni scaffold prodotto.

Parametri per protesi da 5mm di diametro	
Volume	2 ml
Flusso volumetrico	1,10 ml/h
Distanza ago-collettore	18 cm
Tensione applicata agli elettrodi	17,0 kV
Velocità di rotazione collettore	500 rpm
Velocità traslazione collettore	600 mm/min

Tabella 1: Parametri per processo di elettrofilatura

2.3 Coating con gelatina

Dopo il processo di elettrofilatura gli scaffold sono stati rivestiti con uno strato di gelatina derivante da ossa bovine. Per il coating è stata preparata una soluzione di gelatina, con concentrazione pari a 67 mg/L, sotto agitazione magnetica per 1h a 60°C. Le protesi sono poi state poste su un agitatore meccanico e immerse nella soluzione per 1h, a 37°C e con velocità di rotazione pari a 135 rpm (Figura 15). La gelatina è utilizzata al fine di diminuire la porosità data dal processo di elettrofilatura. Le protesi rivestite sono poi state poste sotto raggi UV per 1h in modo da reticolare la gelatina in superficie, ridurre l'umidità del campione e sterilizzarlo.



Figura 15: Processo di rivestimento con gelatina

2.4 Bioreattore

Gli scaffold prodotti sono stati poi testati in un bioreattore ad alte prestazioni (APTUS Bioreactors) (Figura 16).



Figura 16: Bioreattore ad alte prestazioni (APTUS Bioreactors)

Il sistema è costituito da:

- Tre camere (compliance chamber, pulse dampener e reservoir) in cui viene inserita la soluzione salina da far fluire nella protesi in analisi;
- Una camera vascolare, nella quale vengono posizionate un massimo di tre protesi per prova;
- Una pompa peristaltica, la cui velocità determina il flusso;
- Una valvola a pinza, che simula il battito cardiaco;
- Due trasduttori che misurano la pressione in ingresso e in uscita dalla camera vascolare;
- Un flussimetro, il quale misura il flusso dell'intero sistema e calibrato attraverso il K-factor, valore di calibrazione fornito dal produttore;
- Tre pinze per il controllo della pressione e del flusso.

Il bioreattore è collegato attraverso la control box a un software che permette di monitorare gli andamenti di flusso e pressioni in/out nel tempo. Una rappresentazione schematica delle varie componenti del bioreattore è mostrata in Figura 17 e Tabella 2.

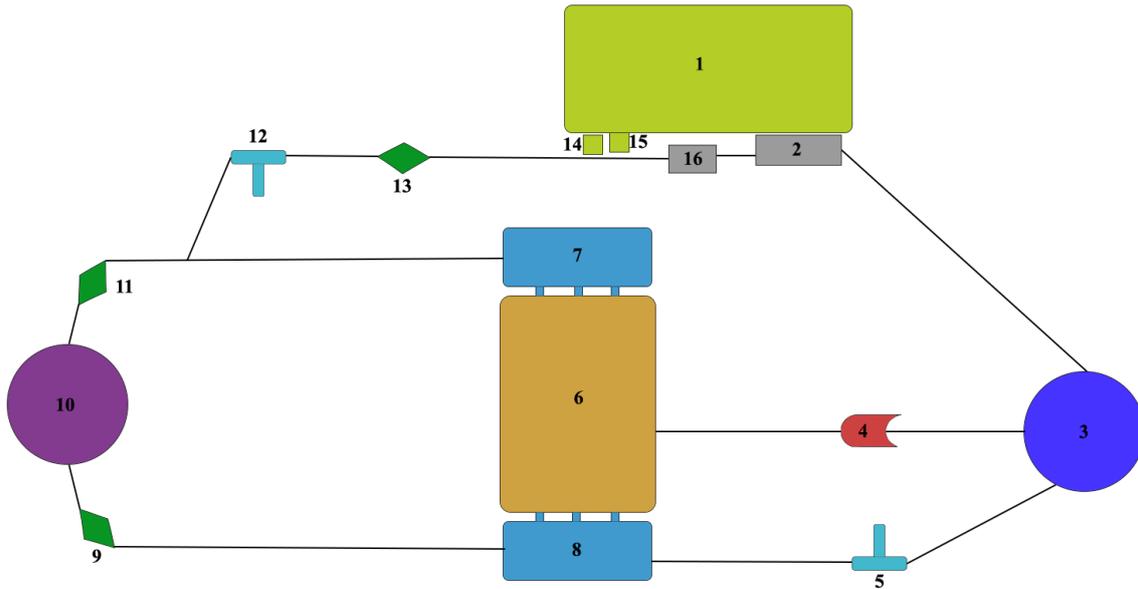


Figura 17: Schema bioreattore

1	Scatola di controllo
2	Pompa peristaltica
3	Reservoir
4	Flussimetro
5	Trasduttore pressione 2
6	Camera vascolare
7	Collettore d'ingresso
8	Collettore d'uscita
9	Pinza: abbassa la pressione sistolica
10	Compliance chamber
11	Pinza: alza la pressione sistolica
12	Trasduttore pressione 1
13	Pinza: alza entrambe le pressioni
14	valvola a manicotto per la generazione della forma d'onda 1
15	valvola a manicotto per la generazione della forma d'onda 2
16	Dampener

Tabella 2:Componenti bioreattore

La protesi viene quindi posizionata nella camera vascolare e connessa al sistema attraverso l'uso di specifici adattatori (Figura 18). Il bioreattore viene poi riempito con circa 600 ml di una soluzione salina (Phosphate Buffered Saline, PBS) contenente: cloruro di sodio (concentrazione finale 0,137M), cloruro di potassio (concentrazione finale 0,0027M), fosfato di sodio dibasico (0,01M) e fosfato di

potassio monobasico (0,0018M) in acqua deionizzata. Si tratta di una soluzione tampone, permette di mantenere il sistema a un pH neutro.

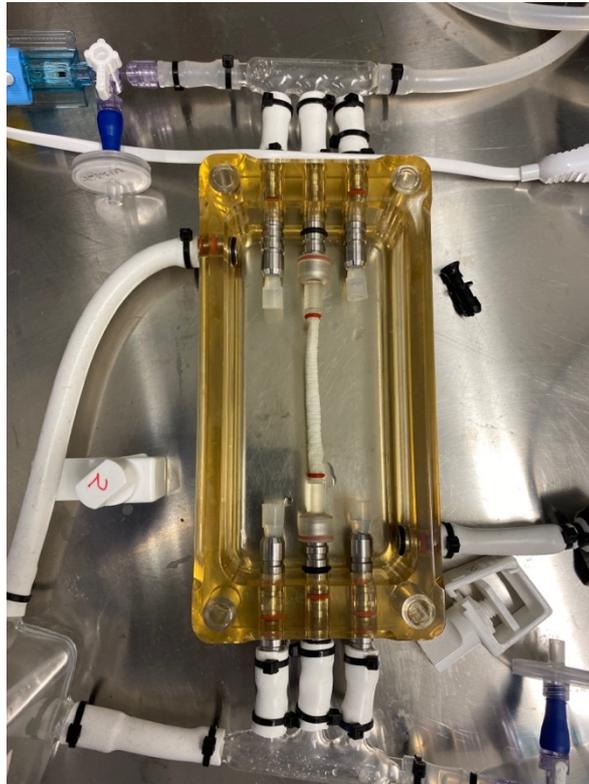


Figura 18: Posizionamento scaffold in bioreattore

Il test è stato svolto in triplicato variando il flusso (0,04 L/min, 0,074 L/min, 0,125 L/min). Ogni prova è durata 5 giorni e sono stati effettuati prelievi periodici da 70 ml (sostituiti poi con PBS fresco con lo scopo di mantenere invariato il volume di lavoro) per i successivi studi sull'influenza del flusso sui rilasci di gelatina e quercetina.

2.5 Quantificazione gelatina e quercetina

Per la fase di quantificazione i campioni sono stati prelevati in duplicato e successivamente utilizzati per l'analisi di gelatina e quercetina rispettivamente. Per entrambi gli esperimenti i campioni estratti dal bioreattore sono stati congelati, liofilizzati e trattati con l'aggiunta di 500 μ l di acqua per lo studio sui rilasci di gelatina, e 110 μ l di etanolo per quelli sulla quercetina. Prima di procedere con le successive analisi sono stati centrifugati a 4°C e 21000 rpm per 15 minuti in modo da separare le sostanze di interesse dai sali di PBS.

La gelatina è stata poi quantificata attraverso l'uso di due metodi colorimetrici: test BCA (bicinchoninic acid test) e test microBCA (Euroclone, Pero, Italia). Il test BCA prevede l'utilizzo di 200

μl di miscela reagente (soluzioni A e B in rapporto 50:1) aggiunta a 5 μl di campione e incubata per 30 minuti a 37°C. Il test microBCA è invece utilizzato per l'analisi di soluzioni più diluite (concentrazioni tra 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e prevede l'uso di 150 μl di miscela reagente (soluzioni A, B e C in rapporto 50:48:2) unita a 5 μl di campione e posta in incubatore per 2 ore.

Una soluzione standard è stata preparata per ottenere una curva di calibrazione necessaria per il calcolo della concentrazione dei campioni. Come proteina standard è stata scelta la BSA (albumina di siero bovino). Partendo da una soluzione madre in PBS, con una concentrazione di 10 mg/ml, sono state preparate diverse diluizioni per il test BCA (Tabella 3) e microBCA (Tabella 4).

Diluizione	Concentrazione BSA (mg/ml)	Volume BSA (ml)	Volume H ₂ O (ml)
A	4	0,4 da soluzione madre	0,6
B	3	0,75 da A	0,25
C	2	0,666 da B	0,334
D	1	0,5 da C	0,5
E	0,75	0,75 da D	0,25
F	0,5	0,666 da E	0,334
G	0,25	0,5 da F	0,5
H	0,125	0,5 da G	0,5
I	0,0625	0,5 da H	0,5
Bianco	-	-	-

Tabella 3: Diluizioni per saggio BCA

Diluizione	Concentrazione BSA (mg/ml)	Volume BSA (ml)	Volume H ₂ O (ml)
F	0,5	-	-
G	0,25	-	-
H	0,125	-	-
I	0,0625	-	-
J	0,04	0,128 da D	0,072
Bianco	-	-	-

Tabella 4: Diluizione per saggio microBCA: le soluzioni F, G, H, I sono le stesse utilizzate nel test BCA.

Per entrambe le metodologie l'assorbanza dei campioni è stata misurata a 540 nm con l'utilizzo di uno spettrofotometro.

Lo studio della quercetina è stato svolto invece attraverso analisi con spettrofotometro a 380 nm (lunghezza d'onda a cui corrisponde il picco di assorbimento della sostanza da identificare). Per il calcolo della concentrazione dei campioni sono state preparate soluzioni standard a diverse diluizioni (Tabella 5), partendo da una soluzione madre di concentrazione 2 mg/ml.

Diluizione	Concentrazione quercetina (mg/ml)	Volume (ml)	Volume EtOH (ml)
A	0,2	0,15 da soluzione madre	1,35
B	0,1	0,75 da A	0,75
C	0,0750	1,125 da B	0,325
D	0,0500	1 da C	0,5
E	0,0250	0,75 da D	0,75
F	0,0125	0,75 da E	0,75
G	0,008	0,96 da F	0,54
H	0,004	0,75 da G	0,75
I	0,002	0,75 da H	0,75
Bianco	-	-	-

Tabella 5: Diluizioni per curva calibrazione quercetina

2.6 Analisi in microscopia a scansione elettronica (SEM)

Per caratterizzare le proprietà degli scaffold, testati successivamente in bioreattore, sotto il punto di vista morfologico è stata condotta analisi in microscopia a scansione elettronica (Hitachi 2500, Tokyo, Japan). Sono state prelevate porzioni dei campioni prima e dopo il trattamento di coating con gelatina, e analizzati con tecnica SEM per studiare l'influenza della deposizione di questa proteina sulla morfologia delle fibre e la sua disposizione tridimensionale nel costrutto. Sono stati inoltre misurati i diametri medi delle fibre mediante software di elaborazione delle immagini (ImageJ, USA), in modo da poter valutare l'influenza del trattamento di coating su questo parametro.

2.7 Degradazione e swelling degli scaffold

Prima e dopo ogni test le protesi sono state pesate su bilancia analitica in modo da poter valutare la percentuale di degradazione e di rigonfiamento dopo il trattamento in bioreattore in diverse condizioni di flusso.

La percentuale di degradazione viene così definita:

$$\text{Degradazione \%} = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100$$

m_i = massa protesi prima del test in bioreattore;

m_f = massa protesi asciutta dopo test in bioreattore;

Questo valore rappresenta la perdita di massa degli scaffold dovuta alla degradazione della matrice polimerica e ai rilasci avvenuti durante l'analisi.

La percentuale di swelling delle protesi rappresenta invece la quantità di soluzione che le fibre hanno assorbito durante il test:

$$\text{Swelling \%} = \frac{m_b - m_i}{m_i} \times 100$$

m_i = massa protesi prima del test in bioreattore;

m_b = massa protesi bagnata dopo test in bioreattore;

2.8 Modello matematico per calcolo forze fluidodinamiche

La velocità di degradazione di gelatina e quercetina, tra le varie cause, può essere dovuta alle forze fluidodinamiche che si instaurano sulle pareti degli scaffold a causa del movimento interno del fluido. Per valutare l'influenza del flusso sui due rilasci è stata determinata la variazione degli sforzi sulle pareti degli scaffold, ipotizzando: condizioni stazionarie, flusso laminare, fluido newtoniano e incomprimibile, protesi di sezione circolare costante. La legge utilizzata è:

$$\tau_w = -\mu \frac{4U}{R}$$

τ_w = sforzi sulla parete [Pa];

μ = viscosità dinamica [Pa*s];

R= raggio [m]; D= diametro [m];

U= velocità media [m/s], calcolata come:

$$U = \frac{Q}{S}$$

Q= portata volumetrica [m³/s];

S= sezione trasversale [m²], calcolata come:

$$S = \pi \frac{D^2}{4}$$

Il segno meno dell'espressione rappresenta l'opposizione dello sforzo al flusso. Per gli esperimenti da noi svolti le ipotesi fatte sono tutte attendibili in quanto: il flusso è stato scelto e mantenuto costante nel bioreattore (condizioni stazionarie), i test si sono svolti a temperatura ambiente (considerabile costante quindi rimane invariata anche la densità del fluido), e le protesi hanno sezione circolare con irregolarità trascurabile. Per valutare se il flusso imposto era laminare è stato calcolato il numero di Reynolds (dove ρ è la densità del fluido):

$$Re = \frac{UD\rho}{\mu}$$

Se $Re < 2000$ il flusso può essere considerato laminare e l'equazione sopra riportata per il calcolo degli sforzi può essere ritenuta valida.

2.9 Caratterizzazione meccanica

Per caratterizzare le proprietà meccaniche degli scaffold trattati è stata effettuata una prova di trazione uniassiale (Zwick Roell BL-GRS010K 10kN) (Figura 19). Prima del test i campioni sono stati sezionati per poter svolgere l'analisi in quadruplicato. Ogni replicato è stato trattato con soluzione fisiologica per 30 secondi e le qualità meccaniche (sforzo, allungamento, modulo di Young) sono state valutate con una velocità di spostamento uniassiale pari a 20 mm/min.



Figura 19: Strumento Zwick Roell BL-GRS010K 10kN

3. Risultati e discussione

3.1 Degradazione degli scaffold

Lo studio della degradazione dei biomateriali usati in ingegneria tissutale è fondamentale in quanto questa influisce sia sull'adesione e proliferazione cellulare, sia sulla struttura del nuovo tessuto rigenerato dal corpo. Il tempo di degradazione degli scaffold deve essere simile al tempo che l'organismo impiega a sostituirlo, né troppo elevato né troppo basso, in quanto anche un tempo troppo lento può risultare negativo (contrastando l'infiltrazione cellulare e la crescita).

In Tabella 6 vengono riportati i dati di degradazione percentuale delle tre protesi testate, ottenuti a diversi valori di flusso.

Flusso volumetrico (L/min)	0,04 ± 0,01	0,074 ± 0,01	0,125 ± 0,05
Degradazione (%)	17,12 ± 0,51	24,68 ± 0,74	24,24 ± 0,73

Tabella 6: Degradazione (%) di protesi vascolari elettrofilate mantenute in bioreattore sotto diversi regimi di flusso.

I risultati ottenuti mostrano che la degradazione delle protesi mantenute sotto diversi regimi di flusso è molto simile. L'influenza dell'aumento di flusso sulla biodegradabilità del costruito è trascurabile.

È stato inoltre calcolato lo swelling percentuale, parametro che può influenzare le proprietà morfologiche, meccaniche dello scaffold e la risposta biologica, così come eventualmente i rilasci delle molecole bioattive con cui la protesi è ingegnerizzata. Si tratta di una misura dell'assorbimento, da parte delle fibre costituenti la protesi, della soluzione presente nel bioreattore (processo definito come swelling).

Flusso volumetrico (L/min)	0,04 ± 0,01	0,074 ± 0,01	0,125 ± 0,05
Swelling (%)	101,77 ± 5,09	63,99 ± 3,20	75,48 ± 3,77

Tabella 7: Swelling (%) di protesi vascolari elettrofilate mantenute in bioreattore sotto diversi regimi di flusso.

Osservando i risultati mostrati in Tabella 7 si può notare che in questo caso i valori di rigonfiamento sono simili per gli scaffold mantenuti a 0,074 L/min e 0,125 L/min, mentre un rigonfiamento maggiore si è avuto per la protesi mantenuta a valori di flusso pari a 0,04 L/min.

3.2 Influenza delle forze fluidodinamiche

Per ogni valore di flusso impostato nel bioreattore sono stati calcolati: velocità media, sforzi sulla parete e numero di Reynolds. I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 8.

Flusso (L/min)	$0,04 \pm 0,01$	$0,074 \pm 0,01$	$0,125 \pm 0,05$
Flusso Q (m ³ /s)	$6,67 \cdot 10^{-07}$	$1,23 \cdot 10^{-06}$	$2,08 \cdot 10^{-06}$
U (m/s)	0,03	0,06	0,11
τ_w	-0,05	-0,10	-0,17
Re	169,85	314,23	530,79

Tabella 8: Parametri fluidodinamici calcolati per $D = 0,005$ m, $\rho = 1000$ Kg/m³ e $\mu = 0,001$ Kg/m s

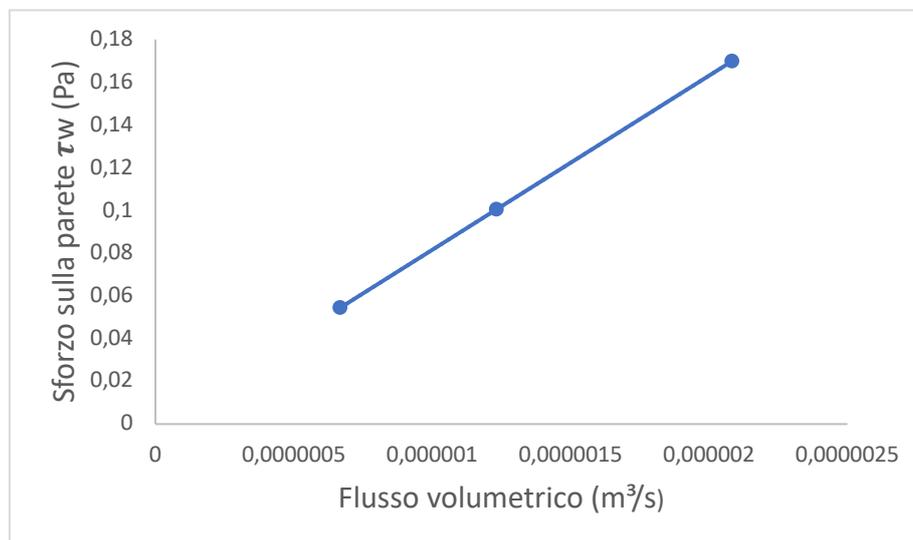


Figura 20: Grafico andamento τ_w in funzione del flusso

Dal grafico in Figura 20 è evidente che gli sforzi sulla parete aumentano in modo lineare con l'aumentare del flusso. La relazione è: $Q = 81529 \tau_w + 1 \cdot 10^{-16}$ ($R^2 = 1$)

3.3 Rilascio gelatina

Sono state analizzati scaffold con diametro costante ($D = 5$ mm) e quantità di gelatina crescenti per indagare l'influenza sui rilasci sia della variazione del flusso sia della massa depositata come coating sulle protesi studiate.

I dati sulla degradazione della gelatina sono stati ottenuti in termini di assorbanze attraverso le varie analisi sui campioni prelevati dal bioreattore. Si è passati poi alle concentrazioni tramite curva di calibrazione (Figura 21).

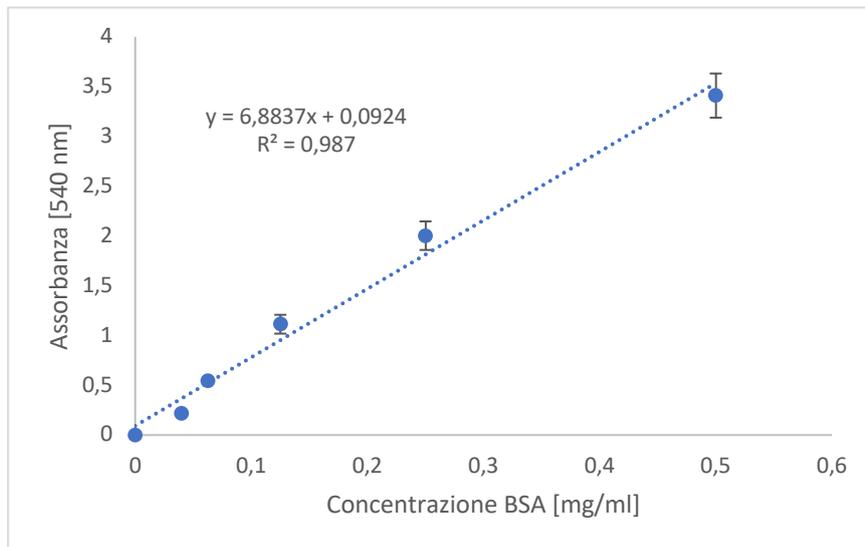


Figura 21: Curva calibrazione costruita con saggio microBCA. I dati sono riportati come valori medi \pm deviazione standard

I valori ottenuti permettono il calcolo della massa di gelatina cumulativa percentuale e di valutarne l'andamento in funzione del tempo. I risultati per le tre protesi testate ai diversi valori di flusso sono riportati in Figura 22. La pendenza di queste curve rappresenta il tasso di rilascio. Il suo andamento è utile per capire come varia la velocità di rilascio della gelatina nel tempo (Figura 23).

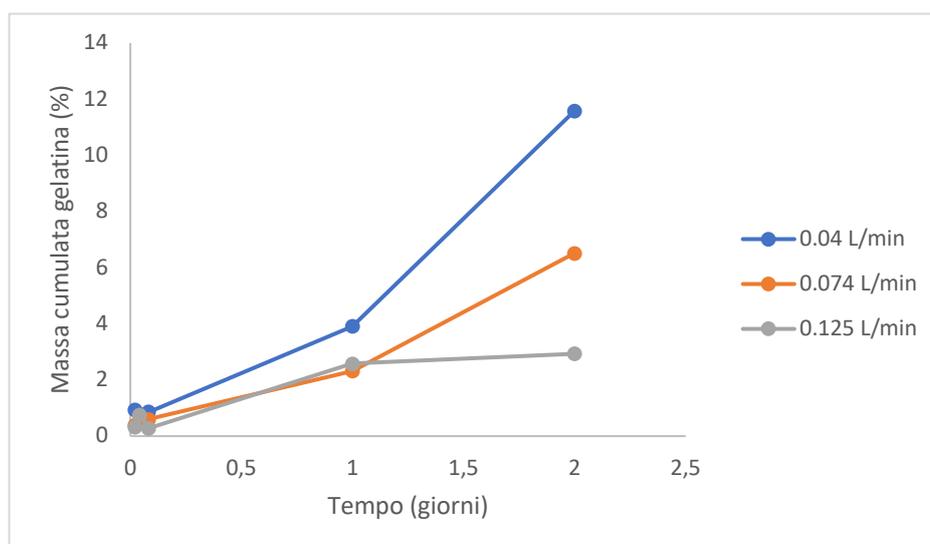


Figura 22: Massa cumulativa % di gelatina rilasciata nel tempo a diversi valori di flusso

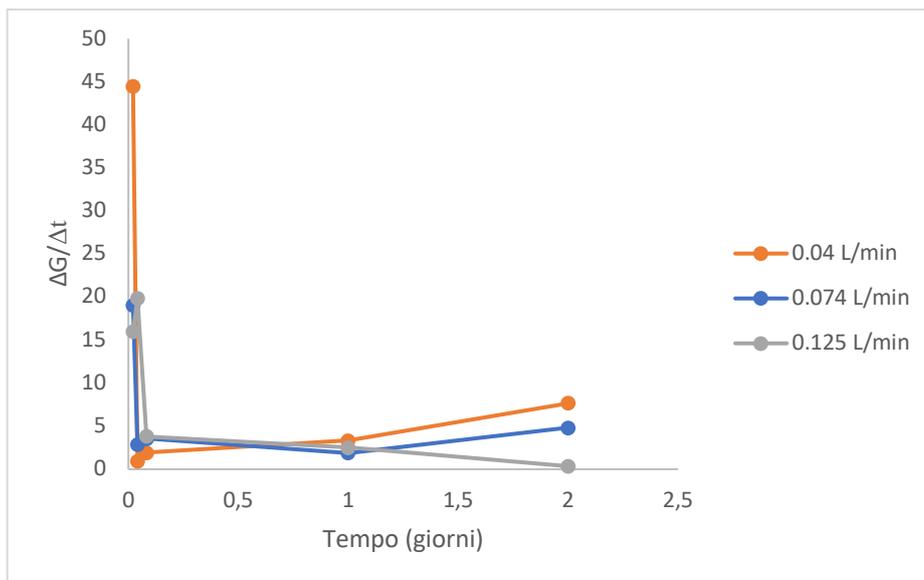


Figura 23 Andamento tassi di rilascio in funzione del tempo ai diversi valori di flusso

Dai grafici sopra riportati si può osservare che per tutti i valori di flusso l'andamento della quantità di gelatina rilasciata nel tempo è crescente. Il grafico in Figura 23 mostra una velocità di rilascio molto elevata nelle prime ore delle prove e successivamente valori inferiori ma sempre in aumento. Questo comportamento può essere spiegato tenendo in considerazione l'elevata solubilità della gelatina in soluzioni acquose e la modalità di deposizione sulla superficie delle protesi. Dai risultati ottenuti possiamo ipotizzare che quest'ultima si disponga in strati sul materiale elettrofilato e che quindi il suo rilascio sia influenzato in modo differente dai diversi valori di flusso (Figura 24).

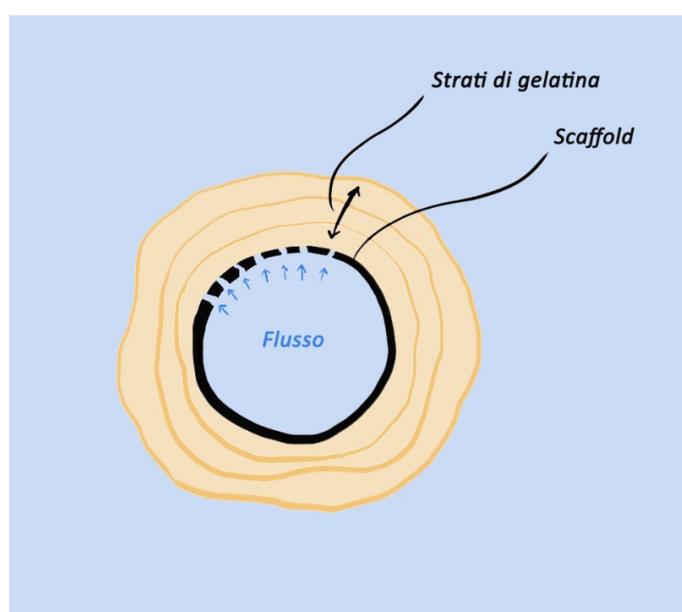


Figura 24: Rappresentazione qualitativa della deposizione della massa di gelatina sul costruito

L'elevato rilascio iniziale è dovuto sia alla degradazione dello strato più esterno di gelatina, debolmente in contatto con gli strati di gelatina sottostanti e il resto del materiale, sia all'estrema solubilità di questa proteina nel buffer impiegato nel bioreattore. Gli strati intermedi di gelatina, invece, sono responsabili di un rilascio maggiormente rallentato in quanto risentono solamente in maniera parziale del flusso applicato sino a quando gli strati superficiali non sono completamente rilasciati. Gli strati interni di gelatina risentono ancor meno del flusso applicato in quanto esternamente sono ricoperti da diversi strati di gelatina e internamente vi è una barriera dovuta al materiale polimerico. Una volta che gli strati esterni e intermedi sono stati degradati rimane solamente quello interno, responsabile del rilascio crescente registrato nella fase finale della sperimentazione. In questa fase lo strato interno risente della presenza del fluido da entrambe le parti: il liquido presente esternamente nella camera e il liquido interno allo scaffold. A separarli c'è la parete della protesi, ma si tratta di un materiale poroso e permeabile.

È stato dimostrato che all'aumentare dello spessore del coating di gelatina (quindi della quantità di materiale depositato sulla protesi) il rilascio di gelatina diminuisce (Tabella 9). Questo si può tradurre in un numero maggiore di strati presenti nella protesi con una maggior massa di gelatina depositata, che contrastano la degradazione di quest'ultima limitandone il contatto con la soluzione.

Flusso (L/min)	0,04 ± 0,01	0,074 ± 0,01	0,125 ± 0,05
Massa gelatina (mg)	13,67	16,06	27,91
Rilascio finale (%)	11,58	6,52	2,93

Tabella 9: Dati rilascio (%) gelatina considerati la massa iniziale e il flusso di lavoro.

I dati riportati in tabella mostrano inoltre come la variazione di flusso incida in misura minore sui valori di rilascio rispetto allo spessore di gelatina presente sulle protesi. Infatti, a parità di lunghezza e diametro, la protesi mantenuta a 0,125 L/min presentava uno spessore di gelatina maggiore rispetto alle altre protesi e questo ha influito in maniera preponderante sulla quantità di gelatina rilasciata. Ci si potrebbe aspettare che all'aumentare del flusso ci sia un aumento del rilascio di gelatina. I dati ottenuti dimostrano che questo fenomeno è controbilanciato dalla quantità di gelatina depositata sulla protesi. Questo avviene perché il flusso è solo interno allo scaffold mentre il rilascio maggiore avviene esternamente, nel liquido stazionario in cui sono immerse le protesi. Inoltre, avere una maggiore massa di gelatina depositata induce la formazione di diversi strati che trovano diverse barriere (ovvero gli strati di gelatina sovrastanti) che si oppongono al rilascio di gelatina. Un'ulteriore osservazione riguarda l'influenza della variazione del flusso sui rilasci nel

tempo. I grafici in Figura 22 e Figura 23 mostrano chiaramente che all'aumentare del flusso la gelatina raggiunge un rilascio stazionario per tempi minori. I tempi a cui sono state svolte le prove sono troppo brevi per poter osservare il rilascio fino alla fase stazionaria per le prove condotte a 0,04 L/min e 0,074 L/min, ma possiamo ipotizzare che il raggiungimento di un asintoto orizzontale avverrà a tempi maggiori (Figura 25).

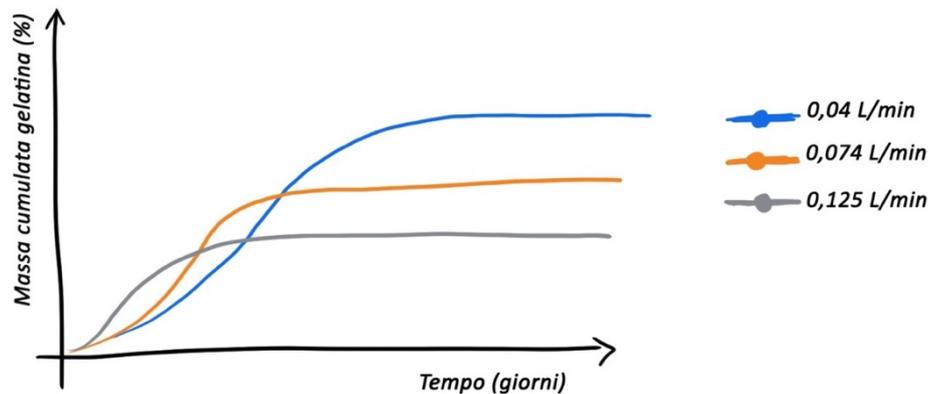


Figura 25: Rappresentazione qualitativa delle curve di rilascio di gelatina nel tempo

3.4 Rilascio quercetina

È stato studiato anche il rilascio della quercetina dagli scaffold in funzione del tempo per i diversi valori di flusso. Il suo rilascio ha funzione di modulazione del processo infiammatorio, che avviene successivamente all'impianto del costruito in vivo. I dati sono stati ottenuti in termini di assorbanze dalle analisi sui campioni prelevati durante i vari test in bioreattore. Si è passati poi alle concentrazioni tramite curva di calibrazione (Figura 26).

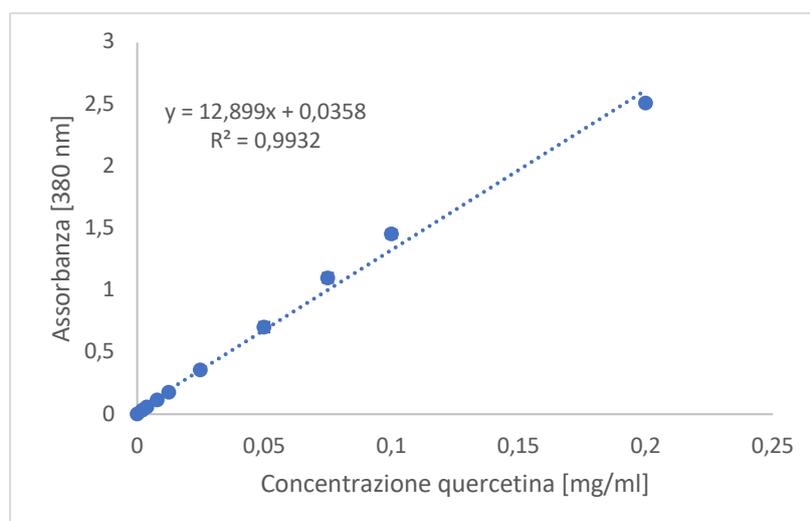


Figura 26: Curva calibrazione per soluzione quercetina-etanolo. I dati sono riportati come valori medi.

Grazie ai risultati così ottenuti sono stati studiati gli andamenti dei rilasci di quercetina nel tempo per i tre campioni posti ai diversi valori di flusso (Figura 27, Figura 28, Figura 29).

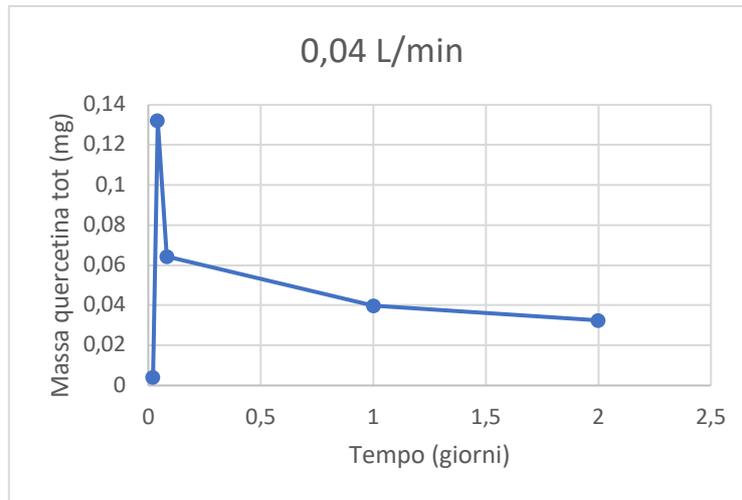


Figura 27: Rilascio quercetina nel tempo in regime di flusso pari a 0,04 L/min

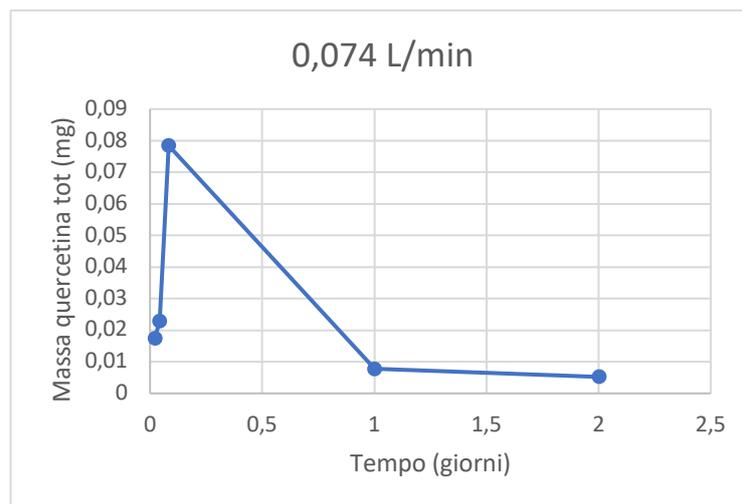


Figura 28: Rilascio quercetina nel tempo in regime di flusso pari a 0,074 L/min

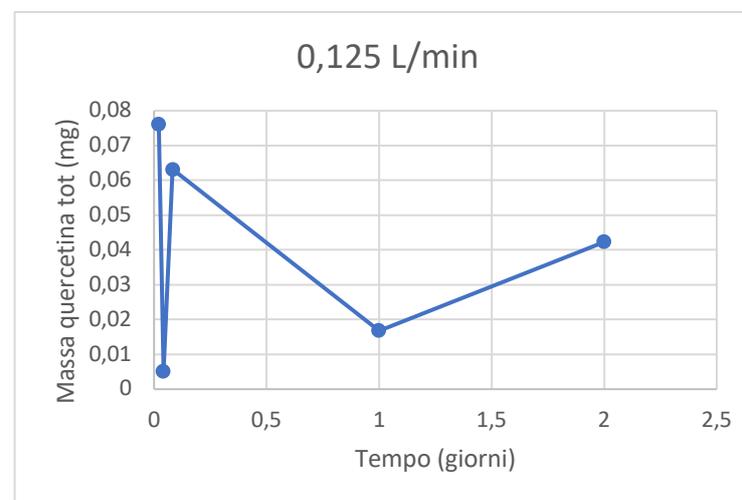


Figura 29: Rilascio quercetina nel tempo in regime di flusso pari a 0,125 L/min

Nelle prime ore di sperimentazione l'andamento del rilascio della quercetina è simile per tutti i flussi studiati, si può osservare un rilascio iniziale di quercetina molto sostenuto. Successivamente i grafici mostrano differenze tra i test svolti a flusso inferiore (0,04 e 0,074 L/min), che presentano un rilascio decrescente nel tempo, e maggiore (0,0125 L/min), il cui rilascio risulta essere invece crescente nel tempo.

Si può ipotizzare che questo comportamento sia dovuto alla disposizione della quercetina all'interno del materiale. La quercetina ha dimensioni dell'ordine degli Ångström, ovvero quattro ordini di grandezza inferiore rispetto alle dimensioni delle fibre (che risultano dell'ordine dei micrometri). Viene integrata direttamente nella soluzione polimerica durante la fase di preparazione delle protesi, è dunque presente tra le fibre in modo più o meno omogeneo. Una parte sarà posizionata intorno ai pori, facilmente raggiungibile dal flusso, la restante parte sarà dispersa nel resto della matrice, lontana dalla soluzione di buffer che fluisce (Figura 30).

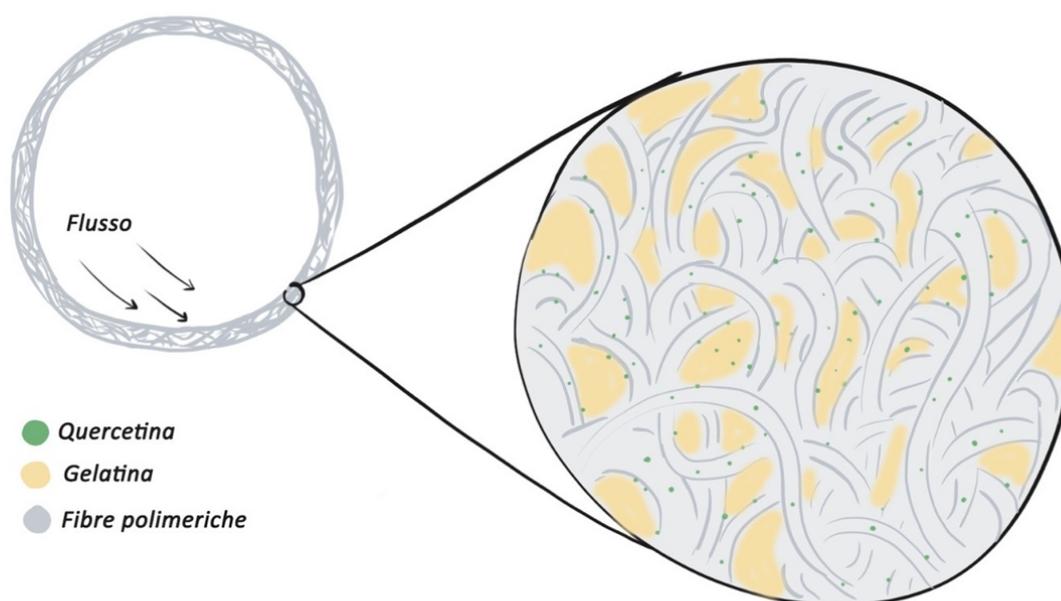


Figura 30: Rappresentazione qualitativa della disposizione delle molecole bioattive nello scaffold

Inoltre, nei pori è presente anche gelatina, depositata durante la fase di coating ed usata per rendere impermeabile il materiale. Questa caratteristica è stata osservata anche attraverso analisi in microscopia elettronica, condotta sulle protesi pre e post coating (Figura 31, Figura 32).

Il primo picco di rilascio della quercetina è probabilmente dovuto alla quercetina superficiale, che in presenza di ogni flusso testato viene rilasciata. La fase successiva di rilascio dipende, invece, fortemente dal flusso impiegato: per valori bassi di flusso la forza di attrito, che si genera sulla superficie interna della protesi, non è abbastanza forte da dissolvere la quercetina interna.

Contrariamente, per alti valori di flusso applicati, dopo il picco di rilascio iniziale la quercetina continuerà ad essere rilasciata (si veda Figura 20 per andamento sforzi in funzione del flusso).

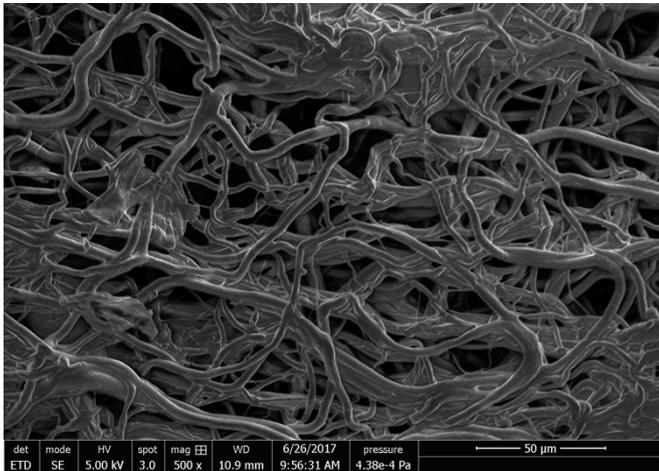


Figura 31: Immagine SEM protesi priva di molecole bioattive

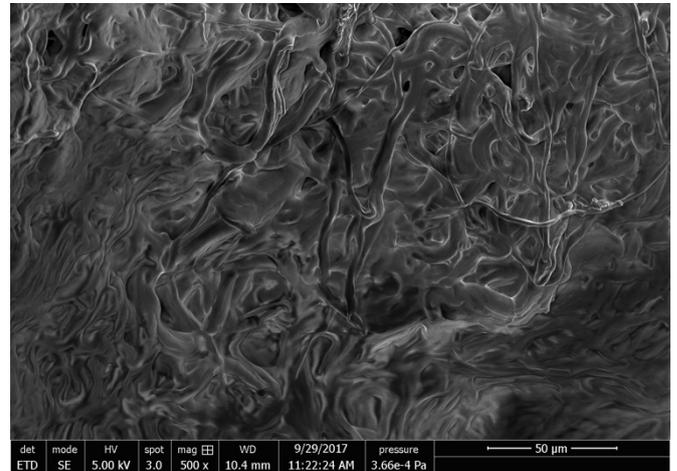


Figura 32: Immagine SEM protesi con gelatina

Campione	Diametro medio fibre (μm)
Prototipo privo di molecole bioattive	$4,59 \pm 1,30$
Prototipo con gelatina e quercetina	$4,46 \pm 1,36$

Tabella 10: Diametri medi delle fibre dei campioni analizzati.

3.5 Caratterizzazione meccanica

I risultati delle prove meccaniche di trazione uniassiale effettuate su tutti i campioni testati in bioreattore sono riportati in Tabella 11. Vengono mostrati inoltre il modulo di Young, il carico a rottura e l'allungamento percentuale dell'arteria umana, in modo da poter confrontare il comportamento meccanico degli scaffold in riferimento ad un'arteria nativa.

Flusso (L/min)	Modulo di Young (MPa)	Carico a rottura (MPa)	Allungamento %
$0,04 \pm 0,01$	$4,83 \pm 1,11$	$1,09 \pm 0,27$	$41,52 \pm 11,60$
$0,074 \pm 0,01$	$0,84 \pm 0,68$	$1,25 \pm 0,35$	$255,88 \pm 56,70$
$0,125 \pm 0,05$	0,73	$0,53 \pm 0,21$	$74,23 \pm 44,64$
Arteria umana (0,0114 L/min)	$2,580 \pm 0,34$	$1,130 \pm 0,06$	$46,54 \pm 11,32$

Tabella 11: parametri caratteristici prova di trazione uniassiale. I risultati ottenuti sono riportati in termini di valori medi di prove su quattro misure per ogni campione.

I risultati ottenuti mostrano che l'elasticità del costrutto aumenta all'aumentare del flusso. Il modulo di Young della protesi testata a flusso più basso è infatti circa sei volte più grande rispetto al valore per la protesi testata a flusso maggiore (4,83 MPa per 0,04 L/min rispetto a 0,73 Mpa per 0,125 L/min). Il modulo di Young non è stato influenzato dalla presenza della gelatina residua in quanto le protesi prima di essere testate, secondo i protocolli di trazione uniassiale, venivano immerse in soluzione fisiologica in modo da avere una completa idratazione del coating superficiale.

La percentuale di allungamento aumenta all'aumentare del flusso. I valori più bassi ottenuti per la prova a flusso maggiore si può ipotizzare siano dovuti alla presenza ancora elevata di gelatina dopo il trattamento in bioreattore (Tabella 9), che nonostante sia idratata influenza l'allungamento delle fibre. Considerando il flusso a cui è stata mantenuta l'arteria umana nell'organismo prima del campionamento, lo scaffold mantenuto a valori simili ha presentato caratteristiche meccaniche pienamente confrontabili.

4. Conclusioni

Le malattie cardiovascolari (CVD) sono patologie che interessano il cuore e i vasi sanguigni, più comunemente le arterie. Comportano il restringimento progressivo dei vasi, causato dalla formazione di placche chiamate ateromi, fino alla loro parziale o completa ostruzione. Questa classe di malattie rappresenta circa il 33% dei decessi globali e risulta in continuo aumento. Diventano necessari, dunque, interventi di bypass per la sostituzione del tratto di vaso danneggiato. Le opzioni ad oggi disponibili per questo tipo di trapianto consistono nell'utilizzo di: innesti autologhi (vengono usate in genere arterie mammarie o vene safene), allotrapianti (donatori), xenotrapianti (vasi animali) e protesi sintetiche (principalmente in Dacron e Teflon). L'utilizzo di innesti autologhi, vene provenienti da donatori e animali è limitato dalla bassa funzionalità a lungo termine e dalla ridotta disponibilità di donatori. Le protesi sintetiche di grosso diametro (> 6 mm) sono già state impiantate con successo, mentre gli innesti di piccolo diametro presentano una serie di problematiche legate a vascolarizzazione e formazione di trombi, con tassi di rigetto troppo elevati. Un'opzione promettente per la risoluzione di queste problematiche è la Tissue Engineering (TE), la quale si occupa dello sviluppo di supporti ingegneristici, costituiti da materiali innovativi, per la sostituzione e riparazione dei tessuti. In questo ambito il mio progetto di tesi si è focalizzato sull'ottimizzazione di innesti vascolari di piccolo calibro (5 mm), biodegradabili e biorisorbibili, funzionalizzati con gelatina ed ingegnerizzati con quercetina. La gelatina è stata utilizzata per ridurre la permeabilità del costrutto, la quercetina per contrastare la risposta infiammatoria dopo l'impianto *in vivo*.

Le protesi prodotte sono state ottenute tramite processo di elettrofilatura di una soluzione polimerica composta da due polimeri, PGS e PCL, in rapporto 1:1 v/v. Gli scaffold fabbricati sono stati successivamente testati in bioreattore ad alte prestazioni per diversi regimi di flusso in modo da valutare l'influenza della variazione del flusso sui rilasci di gelatina e quercetina nel tempo. Tramite questa procedura abbiamo studiato i migliori parametri per l'utilizzo del bioreattore ad alte prestazioni e ne abbiamo validato le modalità di utilizzo di ogni singolo componente.

Inoltre, sulle varie protesi in analisi, sono state depositate diverse quantità in massa di gelatina in modo da poter indagare l'influenza del coating sui rilasci delle sostanze bioattive. Al termine dei test in bioreattore gli scaffold sono stati caratterizzati dal punto di vista meccanico attraverso prova di trazione uniassiale. Sono stati determinati parametri quali modulo di Young, carico a rottura e allungamento percentuale, e confrontati con le caratteristiche meccaniche di un'arteria nativa.

Questo studio ha permesso alcune ipotesi fondamentali sul comportamento dei costrutti e dei rilasci di molecole bioattive in condizioni dinamiche, gettando le basi per un futuro approfondimento.

REFERENZE

Ahmed S, Chauhan VM, Ghaemmaghami AM, Aylott JW. New generation of bioreactors that advance extracellular matrix modelling and tissue engineering. *Biotechnol Lett.* 2019 Jan;41(1):1-25. doi: 10.1007/s10529-018-2611-7. Epub 2018 Oct 27. PMID: 30368691; PMCID: PMC6313369.

Awad NK, Niu H, Ali U, Morsi YS, Lin T. Electrospun Fibrous Scaffolds for Small-Diameter Blood Vessels: A Review. *Membranes (Basel).* 2018 Mar 6;8(1):15. doi: 10.3390/membranes8010015. PMID: 29509698; PMCID: PMC5872197.

Azari A, Golchin A, Mahmoodinia Maymand M, Mansouri F, Ardeshiryajimi A. Electrospun Polycaprolactone Nanofibers: Current Research and Applications in Biomedical Application. *Adv Pharm Bull.* 2022 Aug;12(4):658-672. doi: 10.34172/apb.2022.070. Epub 2021 Oct 3. PMID: 36415646; PMCID: PMC9675923.

Baker BM, Gee AO, Metter RB, Nathan AS, Marklein RA, Burdick JA, Mauck RL. The potential to improve cell infiltration in composite fiber-aligned electrospun scaffolds by the selective removal of sacrificial fibers. *Biomaterials.* 2008 May;29(15):2348-58. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.01.032. Epub 2008 Mar 3. PMID: 18313138; PMCID: PMC2292637.

Bancroft GN, Sikavitsas VI, Mikos AG. Design of a flow perfusion bioreactor system for bone tissue-engineering applications. *Tissue Eng.* 2003 Jun;9(3):549-54. doi: 10.1089/107632703322066723. PMID: 12857422.

Barron V, Lyons E, Stenson-Cox C, McHugh PE, Pandit A. Bioreactors for cardiovascular cell and tissue growth: a review. *Ann Biomed Eng.* 2003 Oct;31(9):1017-30. doi: 10.1114/1.1603260. PMID: 14582605.

Bhardwaj N, Kundu SC. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnol Adv.* 2010 May-Jun;28(3):325-47. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.01.004. Epub 2010 Jan 25. PMID: 20100560.

Boretos JW, Pierce WS. Segmented polyurethane: a new elastomer for biomedical applications. *Science*. 1967 Dec 15;158(3807):1481-2. doi: 10.1126/science.158.3807.1481. PMID: 6058690.

Boudriot U, Dersch R, Greiner A, Wendorff JH. Electrospinning approaches toward scaffold engineering--a brief overview. *Artif Organs*. 2006 Oct;30(10):785-92. doi: 10.1111/j.1525-1594.2006.00301.x. PMID: 17026578.

Buchko CJ, Chen LC, Shen Y, Martin DC. Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films. *Polymer* 1999 Dec;40(26):7397-7407. doi.org/10.1016/S0032-3861(98)00866-0.

Chang WG, Niklason LE. A short discourse on vascular tissue engineering. *NPJ Regen Med*. 2017;2:7. doi: 10.1038/s41536-017-0011-6. Epub 2017 Mar 27. PMID: 29057097; PMCID: PMC5649630.

Constantine A., Dimopoulos K. Physiology of the normal heart. *Medicine*. 2022 Jun;50(6):322-26. doi.org/10.1016/j.mpmed.2022.03.010.

De Vrieze S, Van Camp T, Nelvig A, Hagström B, Westbroek P, De Clerck K. The effect of temperature and humidity on electrospinning. *Journal of Material Science*. 2009 Mar 1; 44:1357–62. doi.org/10.1007/s10853-008-3010-6.

European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation; Reiner Z, Catapano AL, De Backer G, Graham I, Taskinen MR, Wiklund O, Agewall S, Alegria E, Chapman MJ, Durrington P, Erdine S, Halcox J, Hobbs R, Kjekshus J, Filardi PP, Riccardi G, Storey RF, Wood D; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG) 2008-2010 and 2010-2012 Committees. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Eur Heart J*. 2011 Jul;32(14):1769-818. doi: 10.1093/eurheartj/ehr158. Epub 2011 Jun 28. PMID: 21712404.

Ferrari PF, Aliakbarian B, Barisione C, Kahn CJF, Arab-Tehrany E, Palombo D, Perego P. Engineering of poly(caprolactone) and poly(glycerol sebacate) small-diameter vascular prosthesis with quercetin. *J*

Biomed Mater Res A. 2023 Oct;111(10):1500-1512. doi: 10.1002/jbm.a.37535. Epub 2023 May 2. PMID: 37128974.

Formica JV, Regelson W. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. Food Chem Toxicol. 1995 Dec;33(12):1061-80. doi: 10.1016/0278-6915(95)00077-1. PMID: 8847003.

Freed LE, Guilak F, Guo XE, Gray ML, Tranquillo R, Holmes JW, Radisic M, Sefton MV, Kaplan D, Vunjak-Novakovic G. Advanced tools for tissue engineering: scaffolds, bioreactors, and signaling. Tissue Eng. 2006 Dec;12(12):3285-305. doi: 10.1089/ten.2006.12.3285. PMID: 17518670.

Friedman SG, Lazzaro RS, Spier LN, Moccio C, Tortolani AJ. A prospective randomized comparison of Dacron and polytetrafluoroethylene aortic bifurcation grafts. Surgery. 1995 Jan;117(1):7-10. doi: 10.1016/s0039-6060(05)80223-5. PMID: 7809840.

Gorna K, Gogolewski S. Biodegradable porous polyurethane scaffolds for tissue repair and regeneration. J Biomed Mater Res A. 2006 Oct;79(1):128-38. doi: 10.1002/jbm.a.30708. PMID: 16779769.

Groll J, Boland T, Blunk T, Burdick JA, Cho DW, Dalton PD, Derby B, Forgacs G, Li Q, Mironov VA, Moroni L, Nakamura M, Shu W, Takeuchi S, Vozzi G, Woodfield TB, Xu T, Yoo JJ, Malda J. Biofabrication: reappraising the definition of an evolving field. Biofabrication. 2016 Jan 8;8(1):013001. doi: 10.1088/1758-5090/8/1/013001. PMID: 26744832.

Haghi AK, Akbari M. Trends in electrospinning of natural nanofibers. Phys Status Solidi. 2007 May 31;204(6):1830-34. doi.org/10.1002/pssa.200675301.

Haider A, Haider S, Kang IK. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. Arabian Journal of Chemistry. 2018 Dec;11(8):1165-88. doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.11.015.

HARRISON JH. Synthetic materials as vascular prostheses. II. A comparative study of nylon, dacron, orlon, ivalon sponge and teflon in large blood vessels with tensile strength studies. *Am J Surg*. 1958 Jan;95(1):16-24. doi: 10.1016/0002-9610(58)90736-0. PMID: 13487908.

Hasan A, Memic A, Annabi N, Hossain M, Paul A, Dokmeci MR, Dehghani F, Khademhosseini A. Electrospun scaffolds for tissue engineering of vascular grafts. *Acta Biomater*. 2014 Jan;10(1):11-25. doi: 10.1016/j.actbio.2013.08.022. Epub 2013 Aug 22. PMID: 23973391; PMCID: PMC3867370.

Hess F. History of (micro) vascular surgery and the development of small-caliber blood vessel prostheses (with some notes on patency rates and re-endothelialization). *Microsurgery*. 1985;6(2):59-69. doi: 10.1002/micr.1920060202. PMID: 3894875.

Ismadi MZ, Gupta P, Fouras A, Verma P, Jadhav S, Bellare J, Hourigan K. Flow characterization of a spinner flask for induced pluripotent stem cell culture application. *PLoS One*. 2014 Oct 3;9(10):e106493. doi: 10.1371/journal.pone.0106493. PMID: 25279733; PMCID: PMC4184809.

Kim BS, Mooney DJ. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends Biotechnol*. 1998 May;16(5):224-30. doi: 10.1016/s0167-7799(98)01191-3. PMID: 9621462.

Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*. 2013;85(1):3-10. doi: 10.1159/000345615. Epub 2012 Dec 13. PMID: 23257690.

Kong Z, Wang X. Bioprinting Technologies and Bioinks for Vascular Model Establishment. *Int J Mol Sci*. 2023 Jan 3;24(1):891. doi: 10.3390/ijms24010891. PMID: 36614332; PMCID: PMC9821327.

Kzhyshkowska J, Gudima A, Riabov V, Dollinger C, Lavalle P, Vrana NE. Macrophage responses to implants: prospects for personalized medicine. *J Leukoc Biol*. 2015 Dec;98(6):953-62. doi: 10.1189/jlb.5VMR0415-166R. Epub 2015 Jul 13. PMID: 26168797.

Labrosse M. *Cardiovascular Mechanics*. 1st ed. Boca Raton (FL): CRC Press; 2018. 1 p.

Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993 May 14;260(5110):920-6. doi: 10.1126/science.8493529. PMID: 8493529.

Larrondo L, St. John Manley R. Electrostatic fiber spinning from polymer melts. I. Experimental observations on fiber formation and properties. *J Polym Sci Polym Phys Ed*. 1981 Jun;19(6):909-20. doi.org/10.1002/pol.1981.180190601.

Lee JM, Yeong WY. Design and Printing Strategies in 3D Bioprinting of Cell-Hydrogels: A Review. *Adv Healthc Mater*. 2016 Nov;5(22):2856-2865. doi: 10.1002/adhm.201600435. Epub 2016 Oct 21. PMID: 27767258.

Li Y, Yao J, Han C, Yang J, Chaudhry MT, Wang S, Liu H, Yin Y. Quercetin, Inflammation and Immunity. *Nutrients*. 2016 Mar 15;8(3):167. doi: 10.3390/nu8030167. PMID: 26999194; PMCID: PMC4808895.

Malikmammadov E, Tanir TE, Kiziltay A, Hasirci V, Hasirci N. PCL and PCL-based materials in biomedical applications. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2018 May-Jun;29(7-9):863-893. doi: 10.1080/09205063.2017.1394711. Epub 2017 Nov 2. PMID: 29053081.

Matsuzaki Y, John K, Shoji T, Shinoka T. The Evolution of Tissue Engineered Vascular Graft Technologies: From Preclinical Trials to Advancing Patient Care. *Appl Sci (Basel)*. 2019 Apr;9(7):1274. doi: 10.3390/app9071274. Epub 2019 Mar 27. PMID: 31890320; PMCID: PMC6937136.

Nugent HM, Edelman ER. Tissue engineering therapy for cardiovascular disease. *Circ Res*. 2003 May 30;92(10):1068-78. doi: 10.1161/01.RES.0000073844.41372.38. PMID: 12775655.

Olson JL, Atala A, Yoo JJ. Tissue engineering: current strategies and future directions. *Chonnam Med J*. 2011 Apr;47(1):1-13. doi: 10.4068/cmj.2011.47.1.1. Epub 2011 Apr 26. PMID: 22111050; PMCID: PMC3214857.

Plunkett N, O'Brien FJ. Bioreactors in tissue engineering. *Technol Health Care*. 2011;19(1):55-69. doi: 10.3233/THC-2011-0605. PMID: 21248413.

Puts GJ, Crouse P, Ameduri BM. Polytetrafluoroethylene: Synthesis and Characterization of the Original Extreme Polymer. *Chem Rev.* 2019 Feb 13;119(3):1763-1805. doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00458. Epub 2019 Jan 28. PMID: 30689365.

Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Douidi M, Baradaran A, Nasri H. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *Int J Prev Med.* 2014 Aug;5(8):927-46. PMID: 25489440; PMCID: PMC4258672.

Rosso F, Marino G, Giordano A, Barbarisi M, Parmeggiani D, Barbarisi A. Smart materials as scaffolds for tissue engineering. *J Cell Physiol.* 2005 Jun;203(3):465-70. doi: 10.1002/jcp.20270. Erratum in: *J Cell Physiol.* 2006 Dec;209(3):1054. PMID: 15744740.

Sha D, Wu Z, Zhang J, Ma Y, Yang Z, Yuan Y. Development of modified and multifunctional poly(glycerol sebacate) (PGS)-based biomaterials for biomedical applications. *European Polymer Journal.* 2021 Dec 5;161:110830. doi.org/10.1016/j.

Sill TJ, von Recum HA. Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials.* 2008 May;29(13):1989-2006. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.01.011. Epub 2008 Feb 20. PMID: 18281090

Singh C, Wong CS, Wang X. Medical Textiles as Vascular Implants and Their Success to Mimic Natural Arteries. *J Funct Biomater.* 2015 Jun 30;6(3):500-25. doi: 10.3390/jfb6030500. PMID: 26133386; PMCID: PMC4598668.

Song HG, Rumma RT, Ozaki CK, Edelman ER, Chen CS. Vascular Tissue Engineering: Progress, Challenges, and Clinical Promise. *Cell Stem Cell.* 2018 Mar 1;22(3):340-354. doi: 10.1016/j.stem.2018.02.009. Erratum in: *Cell Stem Cell.* 2018 Apr 5;22(4):608. PMID: 29499152; PMCID: PMC5849079.

Sun B, Long YZ, Zhang HD, Li MM, Duvail JL, Jiang XY, Yin HL. Advances in three-dimensional nanofibrous macrostructures via electrospinning. *Progress in Polymer Science.* 2014 May;39(5):862-90 doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.06.002.

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):663-76. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024. Epub 2006 Aug 10. PMID: 16904174.

Taylor GI. Disintegration of water drops in an electric field. *Proc. R. Soc. Lond.* 1964 Jul 28;280(1382):383-97. <https://doi.org/10.1098/rspa.1964.0151>.

Tremblay D, Zigras T, Cartier R, Leduc L, Butany J, Mongrain R, Leask RL. A comparison of mechanical properties of materials used in aortic arch reconstruction. *Ann Thorac Surg*. 2009 Nov;88(5):1484-91. doi: 10.1016/j.athoracsur.2009.07.023. PMID: 19853098.

Vogt L, Ruther F, Salehi S, Boccaccini AR. Poly(Glycerol Sebacate) in Biomedical Applications-A Review of the Recent Literature. *Adv Healthc Mater*. 2021 May;10(9):e2002026. doi: 10.1002/adhm.202002026. Epub 2021 Mar 17. PMID: 33733604.

Wang Y, Ameer GA, Sheppard BJ, Langer R. A tough biodegradable elastomer. *Nat Biotechnol*. 2002 Jun;20(6):602-6. doi: 10.1038/nbt0602-602. PMID: 12042865.

Wang Y, Yin P, Bian GL, Huang HY, Shen H, Yang JJ, Yang ZY, Shen ZY. The combination of stem cells and tissue engineering: an advanced strategy for blood vessels regeneration and vascular disease treatment. *Stem Cell Res Ther*. 2017 Sep 15;8(1):194. doi: 10.1186/s13287-017-0642-y. PMID: 28915929; PMCID: PMC5603030.

Weinberg CB, Bell E. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science*. 1986 Jan 24;231(4736):397-400. doi: 10.1126/science.2934816. PMID: 2934816.

Wendels S, Avérous L. Biobased polyurethanes for biomedical applications. *Bioact Mater*. 2020 Oct 15;6(4):1083-1106. doi: 10.1016/j.bioactmat.2020.10.002. PMID: 33102948; PMCID: PMC7569269.

Witzleb E. *Human Physiology*. 2nd ed. Heidelberg (BE): Springer; 1989. 480p.

Xu S, Bendeck M, Gotlieb A.I. Cardiovascular Pathology. 4th ed. Academic Press; 2016. 85-124 p.

Xue L, Greisler HP. Biomaterials in the development and future of vascular grafts. J Vasc Surg. 2003 Feb;37(2):472-80. doi: 10.1067/mva.2003.88. PMID: 12563226.

Zhang C, Yuan X, Wu L, Han Y, Sheng J. Study on morphology of electrospun poly(vinyl alcohol) mats. European Polymer Journal. 2005 Mar;41(3):423-32. doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2004.10.027.

Zong X, Kim K, Fang D, Ran S, Hsiao BS, Chu B. Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. Polymer. 2002 Jul 1;43(16):4403-12. doi.org/10.1016/S0032-3861(02)00275-6.

SITOGRAFIA

<https://www.alleatiperlasalute.it/cardiologia/malattie-cardiovascolari-aterosclerotiche>

<https://healthy.thewom.it/terapie/stent-cardiaco-angioplastica-coronarica/>

<https://www.humanitas.it/cure/intervento-di-bypass-aortocoronarico/>

<https://www.humanitas.it/enciclopedia/anatomia/apparato-cardiocircolatorio/>

<https://www.humanitas.it/malattie/aterosclerosi/>

<https://www.msmanuals.com/it-it/professionale/disturbi-dell-apparato-cardiovascolare/esami-e-procedure-cardiovascolari/intervento-di-bypass-aorto-coronarico/>

<https://www.osservatoriomalattierare.it/malattie-rare/ipercolesterolemia-familiare>

<https://world-heart-federation.org/>