

POLITECNICO DI MILANO

Scuola di Ingegneria Industriale e dell'Informazione
Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica



**COATING IN ALGINATO E GELATINA PER
L'IMPERMEABILIZZAZIONE DI SCAFFOLD
TUBOLARI IMPIEGATI NELL'INGEGNERIA DI
VASI DI PICCOLO CALIBRO**

RELATORE:
Prof.ssa Sara Mantero

TESI DI LAUREA MAGISTRALE DI:
Gabriella Mannara
Matr. 860933

Anno Accademico 2016/2017

Amico fratello Paolo,

a cui devo la vita.

*Il futuro appartiene a coloro
che credono nella bellezza dei propri sogni.*

[Eleanor Roosevelt]

Indice

SOMMARIO	1
1. Introduzione e stato dell'arte	2
2. Materiali e Metodi.....	4
3. Risultati.....	7
4. Conclusioni e sviluppi futuri.....	12
ABSTRACT	13
1. Introduction and state of art	14
2. Materials and methods	16
3.Results.....	19
4. Conclusions and future developments	24
1. INTRODUZIONE E STATO DELL'ARTE	25
1.1 Apparato cardiocircolatorio	26
1.1.1 Anatomia e struttura dei vasi sanguigni.....	26
1.1.2 Condizionamento biochimico e biomeccanico	29
1.1.3 Patologie cardiovascolari	31
1.1.4 Trattamenti standard delle patologie vascolari	34
1.2 Ingegneria dei tessuti	39
1.2.1 L'ingegneria dei tessuti applicata ai tessuti vascolari (TEVG)	39
1.2.2 Cellule utilizzate nell'ingegneria dei tessuti.....	40
1.2.3 Scaffold.....	44
1.2.3.1 Scaffold polimerici sintetici	47
1.2.3.2 Scaffold polimerici biologici	49
1.2.3.3 Scaffold naturali decellularizzati	51
1.2.4 Bioreattori	53
1.3 Obiettivo	58
.....	59

2. MATERIALI E METODI	59
2.1 Bioreattore utilizzato.....	60
2.2 Scaffold utilizzato	66
2.2.1 Impermeabilizzazione dello scaffold	67
2.3 Sintesi del gel.....	67
2.4 Caratterizzazione del gel.....	71
2.4.1 prove meccaniche a compressione non confinata.....	71
2.4.2 Analisi dei dati della prova UC.....	74
2.4.3 Prove di degradazione.....	76
2.5 Procedura di impermeabilizzazione di scaffold tubolari	78
2.5.1 Misure dello spessore del gel attraverso l'utilizzo di microscopio ottico.....	81
2.5.2 Prove preliminari di impermeabilizzazione dello scaffold	82
2.6 Prove su scaffold in PGA/PLLA	83
2.7 Analisi statistiche	83
.....	85
3. RISULTATI	85
3.1 Caratteristiche generali dei gel realizzati.....	86
3.2 Caratterizzazione meccanica del gel.....	87
3.2.1 Risultati prove di compressione non confinata.....	87
3.2.2 Risultati prove di degradazione	101
3.3 Risultati e misure con microscopio ottico.....	103
3.4 Risultati prove preliminari di impermeabilizzazione dello scaffold.....	104
3.5 Risultati prova con scaffold	105
4. CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI	109
APPENDICE	112
A.1 Prove a compressione non confinata.....	113
A.2 Prove di degradazione.....	120

BIBLIOGRAFIA	122
RINGRAZIAMENTI	126

Indice delle figure

Capitolo 1

Figura 1 Rappresentazione delle tuniche in diversi tipi di vasi sanguigni.	29
Figura 2 A: vaso sanguigno sano. B: vaso sanguigno con placca aterosclerotica.	32
Figura 3 Tecniche chirurgiche per aneurisma cerebrale.	35
Figura 4 Stent prima e dopo l'espansione.	35
Figura 5 Esempi di posizionamento di bypass in seguito ad occlusioni di vasi sanguigni.	38
Figura 6 Schematizzazione della formazione di una TEVG con scaffold.	40
Figura 7: Organizzazione e quantificazione della ECM a 90 giorni nello studio del gruppo di Shin'oka.	49
Figura 8: Esempi di protocolli di decellularizzazione.	53
Figura 9: schematizzazione delle proprietà della camera di coltura usata in questo lavoro di tesi.	57
Figura 10 Elementi principali del InBreath.	60

Capitolo 2

Figura 11 Mandrino per vasi di piccolo calibro.	61
Figura 12 Mandrino collegato con cavo coassiale attraverso connessione Luer-Lock.	62
Figura 13: orifizi per accedere alla camera dalle due estremità.	62
Figura 14 Disegno di uno dei modelli cilindrici ottenuti con Solid Works 2017.	63
Figura 15 Cilindro di lunghezza 12 mm.	64
Figura 16 Cilindro di lunghezza 23,65 mm.	64
Figura 17 Componenti utilizzati per il coating tubolare: 1) Camera di coltura; 2) Cavo coassiale legato al motore con primo ingresso alla camera di coltura; 3) Connettore Luer-Lock; 4) Scaffold tubolare in PGA/PLLA; 5) Cilindri per coprire i porti del mandrino; 6) Mandrino.	65
Figura 18 Camera di coltura dell'InBreath montata.	65
Figura 19: Scaffold in PGA/PLLA.	66
Figura 20: a) struttura chimica dell'alginato; b) meccanismo di interazione ionica tra alginato e cationi polivalenti.	67
Figura 21 Processo di preparazione del gel Alginato/Gelatina.	69
Figura 22: Campioni di differenti classi alloggiati in una Multiwell.	70

Figura 23: Schematizzazione dell'apparato sperimentale delle prove UC	71
Figura 24: Macchina da prova Enduratec.....	72
Figura 25: esempio di campione utilizzato per la prova di degradazione.	77
Figura 26: Scaffold in Ortovatt.....	78
Figura 27: A) Posizionamento dello scaffold in ovatta nel bioreattore InBreath, B) Inserimento del gel tramite siringhe con attacco luer lock, C) Collegamento della camera di coltura al motore a corrente continua.	80
Figura 28: Stereomicroscopio Nikon SMZ800.....	81
Figura 29: Circuito a perfusione: A) pompa roller; B) Camera di coltura; C) Reservoir contenente soluzione fisiologica.....	82

Capitolo 3

Figura 30: Campioni alloggiati in una multiwell.	86
Figura 31: Scaffold in Ortovatt. Fronte.	103
Figura 32: Scaffold in Ortovatt. Retro.....	104
Figura 33: Inserimento del gel A70/G30 all'interno dello scaffold in PGA/PLLA.....	106
Figura 34: Coating di gel A70/G30 in scaffold in PGA/PLLA. Fronte.	107
Figura 35: Coating di gel A70/G30 in scaffold in PGA/PLLA. Retro.....	107
Figura 36: Circuito di perfusione a flusso continuo contenente lo scaffold in PGA/PLLA.	108

Indice delle tabelle

Capitolo 1

Tabella 1 Stimoli biomeccanici tipici del tessuto vascolare. A destra sono riportati gli effetti di tali stimoli sulle cellule endoteliali e muscolari.....	30
Tabella 2 Fattori biochimici coinvolti nell'omeostasi vascolare.	31
Tabella 3: tipi di cellule utilizzate in TEVG.....	44
Tabella 4 Vantaggi e svantaggi degli scaffold naturali e sintetici.....	46

Capitolo 3

Tabella 5 Tipi di bioreattori e principali caratteristiche	56
Tabella 6: altezze dei campioni rilevate dalla prova.	73
Tabella 7: altezze dei campioni rilevate dalla prova.	74
Tabella 8: Medie degli sforzi calcolati a valle.....	87
Tabella 9: Deviazioni standard delle medie relative agli sforzi a valle.....	87
Tabella 10: Medie degli sforzi di picco.	88
Tabella 11: Deviazioni standard relative agli sforzi di picco.	88
Tabella 12: Medie dei moduli di rilassamento.	89
Tabella 13: Deviazioni standard relative alle medie dei moduli di rilassamento.....	90
Tabella 14: Medie dei moduli elastici.	91
Tabella 15: Deviazioni standard relative alle medie dei moduli elastici.	91
Tabella 16: Riassunto dei p-value ottenuti. I valori in grassetto sono quelli che rispettano la condizione $p\text{-value} < 0.05$	92
Tabella 17: A) Medie e deviazioni standard relative agli sforzi a valle. B) Medie e deviazioni standard relative agli sforzi di picco.	93

Appendice

Tabella 18: A) Medie e deviazioni standard relative ai moduli di rilassamento. B) Medie e deviazioni standard relative ai moduli elastici.	94
Tabella 19: Riassunto dei p-value ottenuti. I valori in grassetto sono quelli che rispettano la condizione $p\text{-value} < 0.05$	98

Tabella 20: Analisi statistica del peso dei campioni: i valori in grassetto sono quelli che rispettano la condizione $p\text{-value} < 0.05$	101
Tabella 21: Sforzi a valle dei campioni A10/G90.....	113
Tabella 22: Sforzi a valle dei campioni A30/G70.....	113
Tabella 23: Sforzi a valle dei campioni A50/G50.....	113
Tabella 24: Sforzi a valle dei campioni A70/G30.....	114
Tabella 25: Sforzi a valle dei campioni A90/G10.....	114
Tabella 26: Sforzi a valle dei campioni 100% Gelatina.....	114
Tabella 27: Sforzi di picco dei campioni A10/G90.....	114
Tabella 28: Sforzi di picco dei campioni A30/G70.....	115
Tabella 29: Sforzi di picco dei campioni A50/G50.....	115
Tabella 30: Sforzi di picco dei campioni A70/G30.....	115
Tabella 31: Sforzi di picco dei campioni A90/G10.....	115
Tabella 32: Sforzi di picco dei campioni 100% Gelatina.....	116
Tabella 33: Moduli di rilassamento dei campioni A10/G90.....	116
Tabella 34: Moduli di rilassamento dei campioni A30/G70.....	116
Tabella 35: Moduli di rilassamento dei campioni A50/G50.....	116
Tabella 36: Moduli di rilassamento dei campioni A70/G30.....	117
Tabella 37: Moduli di rilassamento dei campioni A90/G10.....	117
Tabella 38: Moduli di rilassamento dei campioni 100% Gelatina.....	117
Tabella 39: Moduli elastici dei campioni A10/G90.....	117
Tabella 40: Moduli elastici dei campioni A30/G70.....	118
Tabella 41: Moduli elastici dei campioni A50/G50.....	118
Tabella 42: Moduli elastici dei campioni A70/G30.....	118
Tabella 43: Moduli elastici dei campioni A90/G10.....	118
Tabella 44: Moduli elastici dei campioni 100% Gelatina.....	119
Tabella 45: Sforzi e moduli elastici relativi al campione 100% Alginato.....	119
Tabella 46: Pesi dei campioni di tutte le classi di gel.....	120
Tabella 47: Variazioni dei pesi di tutte le classi di gel.....	121

Indice dei grafici

Grafico 1: Esempio di grafico Sforzo-tempo di un campione 70A/30G.....	76
Grafico 2: Sforzi a valle delle classi di gel in funzione della forza applicata.	88
Grafico 3: Sforzo di picco delle classi di gel in funzione della forza applicata.	89
Grafico 4: Modulo di rilassamento delle classi di gel in funzione della deformazione.	90
Grafico 5: Modulo elastico del gel delle classi di gel in funzione della deformazione.....	91
Grafico 6: Sforzi a valle di 100% Gelatina in funzione della forza applicata.....	93
Grafico 7: Sforzi di picco di 100% Gelatina in funzione della forza applicata.....	94
Grafico 8: Modulo di rilassamento del 100% Gelatina in funzione della deformazione. ..	95
Grafico 9: Modulo elastico del 100% Gelatina di gel in funzione della deformazione.	95
Grafico 10: Sforzi a valle di 100% Alginato in funzione della forza applicata.....	96
Grafico 11: Sforzi di picco di 100% Alginato in funzione della forza applicata.	96
Grafico 12: Modulo di rilassamento del 100% Alginato in funzione della deformazione.	97
Grafico 13: Modulo elastico del 100% Alginato di gel in funzione della deformazione...	97
Grafico 14: Sforzi a valle di 100% Gelatina e 100% Alginato in funzione della forza applicata.....	99
Grafico 15: Sforzi di picco di 100% Gelatina e 100% Alginato in funzione della forza applicata.....	99
Grafico 16: Modulo di rilassamento del 100% Gelatina e 100% Alginato in funzione della deformazione.	100
Grafico 17: Modulo elastico del 100% Gelatina e 100% Alginato di gel in funzione della deformazione.	100
Grafico 18: Andamento delle prove di degradazione nel tempo.	101

SOMMARIO

1. Introduzione e stato dell'arte

Le patologie cardiovascolari costituiscono una delle principali cause di mortalità nel mondo, determinando oltre 17 milioni di morti all'anno. La loro elevata incidenza, rende necessario superare le problematiche connesse all'impiego di protesi vascolari e vasi autologhi per la sostituzione di vasi di piccolo calibro (diametro < 5 mm). In tal contesto si colloca l'ingegneria dei tessuti, la disciplina che si occupa di superare *in vitro* i limiti connessi alle soluzioni tradizionali.

Affinchè possa essere generata una protesi vascolare ingegnerizzata, è necessario seguire tale procedura (Fig. 1):

- Scelta ed espansione *in vitro* della popolazione cellulare estratta dal paziente;
- Scelta dello *scaffold* (supporto strutturale) con architettura, geometria, composizione chimica e superficiale dipendenti dalla tipologia del tessuto che si vuole ricreare;
- Scelta e utilizzo di un bioreattore adeguato che fornisca gli stimoli chimici e fisici, le condizioni sperimentali riproducibili e comparabili a quelle fisiologiche.

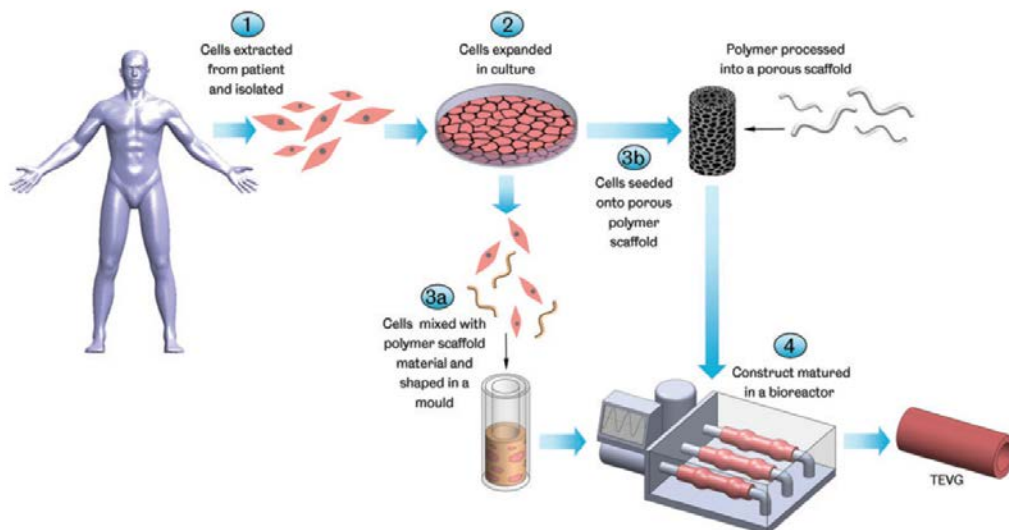


Figura 1: Schematizzazione della formazione di una TEVG con scaffold.

Gli *scaffold* per la ricostruzione dei vasi sanguigni in vitro permettono l'adesione e la crescita sia delle cellule endoteliali (EC) sia di quelle della muscolatura liscia (VSMC), in quanto devono riprodurre la struttura nativa del tessuto fisiologico in cui la tunica intima e la tunica media sono anatomicamente distaccate ma funzionalmente unite. Pertanto, da un lato deve essere possibile realizzare l'endotelio della superficie del lume dello scaffold, dall'altro favorire l'adesione delle VSMC sulla superficie esterna. Gli scaffold naturali, realizzati per mezzo della matrice decellularizzata, offrono il vantaggio di ottenere una struttura più naturale, legata alla presenza di proteine ultrastrutturali tridimensionali e mostrano una capacità di rigenerazione vascolare superiore, garantendo l'adeguato attecchimento, la proliferazione e la migrazione cellulare. Tuttavia, i tessuti decellularizzati hanno una disponibilità limitata e presentano difficoltà relative all'adesione delle VSMC durante la procedura della semina.

Considerati questi svantaggi, si è deciso di utilizzare uno scaffold di origine polimerica come il PGA/PLLA. Esso infatti, pur essendo meno biocompatibile, garantisce proprietà meccaniche più prestanti, il che lo rende più idoneo per la realizzazione di graft sottoposti a pressione arteriosa, come i vasi sanguigni.

Tuttavia, utilizzare una struttura porosa comporta nuove problematiche quando la si vuole inserire in un bioreattore a perfusione che stimoli meccanicamente il costrutto, per ottenere un graft vascolare con proprietà meccaniche simili a quelle del vaso nativo. Infatti, le VSMC sono fisiologicamente sottoposte ad una deformazione ciclica pari al 10%, che induce il mantenimento del fenotipo contrattile e l'allineamento circonferenziale lungo la parete del vaso. Le EC sono invece esposte ad uno sforzo di taglio alla parete pari a 0,5-2 Pa che promuove l'orientamento longitudinale in direzione del flusso sanguigno.

Per ricreare in vitro queste stimolazioni meccaniche mediante perfusione pulsatile ed effettuare una co-coltura cellulare, bisogna evitare che volumi di fluido fuoriescano attraverso i pori dello scaffold. È dunque di fondamentale importanza rendere la superficie interna dello scaffold impermeabile.

Pertanto, l'obiettivo di questo lavoro è produrre un coating polimerico per impermeabilizzare il lume di scaffold tubolari porosi per l'ingegnerizzazione di vasi di piccolo calibro. Tale coating, da un lato permette un'adesione cellulare e dall'altro è in

grado di rendere impermeabile la superficie dello scaffold stesso. Questo processo avrà il compito di garantire la messa in perfusione dello scaffold con un flusso continuo simil-fisiologico.

Una volta generato il coating di gel, lo si caratterizzerà meccanicamente attraverso prove di compressione non confinata e prove di degradazione.

Infine, si testerà l'impermeabilità del coating polimerico, inserito nel lume dello scaffold realizzato, attraverso un circuito a perfusione continua.

2. Materiali e Metodi

Per poter impermeabilizzare in modo riproducibile e affidabile uno scaffold poroso tubolare, è stato necessario identificare una metodologia semplice ed efficace che garantisse la riproducibilità del coating tubolare. Si è deciso dunque di utilizzare una versione precedentemente modificata del bioreattore commerciale *InBreath* (Fig. 2).



Figura 2: A) Bioreattore *InBreath*. B) Camera di coltura con scaffold alloggiato.

Data la modularità del dispositivo, si è scelto di utilizzare un mandrino forato con diametro interno di 2,5 mm e diametro esterno di 5 mm. Inoltre, grazie alla sua particolare forma, è possibile seminare le cellule su entrambe le superfici dello scaffold tubolare. Esso infatti, presenta un condotto coassiale collegato all'ambiente esterno per mezzo di due orifizi, uno collocato sulla parete della camera di coltura e l'altro, posto sull'albero cilindrico cavo sullo stesso lato del motore rotativo. Questo tipo di configurazione è utile anche per l'iniezione simmetrica del gel effettuata per l'impermeabilizzazione dello scaffold. Infatti,

attraverso i due accessi, è più semplice garantire l'uniformità del gel lungo tutta la superficie interna dello scaffold.

Attraverso il software Solidworks 2017 (Fig. 3) sono stati disegnati una serie di porta scaffold di lunghezza inferiore rispetto a quella massima consentita (65 mm). Essi sono stati impiegati per utilizzare scaffold di lunghezze variabili. Per mezzo di questi oggetti, i fori presenti sul mandrino vengono coperti così da evitare la fuoriuscita di gel nella camera di coltura.

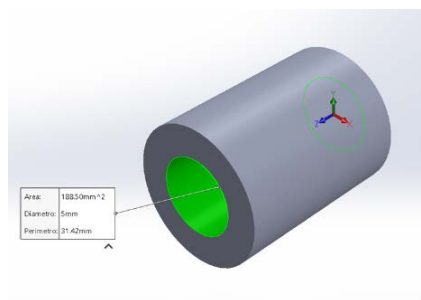


Figura 3: Modello cilindrico ottenuto con Solidworks 2017.

Sono state realizzate cinque tipologie di gel composte da differenti percentuali di alginato 8% w/v e gelatina 6% w/v per valutare l'effetto impermeabilizzante dell'alginato e quello adesivo della gelatina. Complessivamente:

- ✓ 10-90: soluzione formata al 10% da alginato 8% e al 90% da gelatina 6%
- ✓ 30-70: soluzione formata al 30% da alginato 8% e al 70% da gelatina 6%
- ✓ 50-50: soluzione formata al 50% da alginato 8% e al 50% da gelatina 6%
- ✓ 70-30: soluzione formata al 70% da alginato 8% e al 30% da gelatina 6%
- ✓ 90-10: soluzione formata al 90% da alginato 8% e al 10% da gelatina 6%

Il gel è stato caratterizzato meccanicamente attraverso prove a compressione non confinata e prove di degradazione.

Le prove UC consentono la deformazione del provino in direzione radiale e la conseguente essudazione di fluido nella medesima direzione. Esse sono utili per determinare il modulo di Young del campione in condizioni stazionarie.

Le prove di degradazione invece, servono per capire se il gel immerso nel PBS è stabile nel tempo o se subisce un processo di degradazione.

Il gel realizzato serve per effettuare un coating per l'impermeabilizzazione di scaffold tubolari porosi. Inoltre, sono state eseguite prove preliminari di realizzazione del coating su scaffold in Ortovatt:

- Analisi del comportamento delle diverse tipologie di gel quando sono inserite nel lume del mandrino;
- Misurazioni e fotografie attraverso stereomicroscopio per poter verificare l'uniformità e lo spessore del coating;
- Analisi dell'effettiva impermeabilizzazione del gel in alginato e gelatina attraverso un circuito (Fig. 4) che simula un flusso continuo all'interno del mandrino.

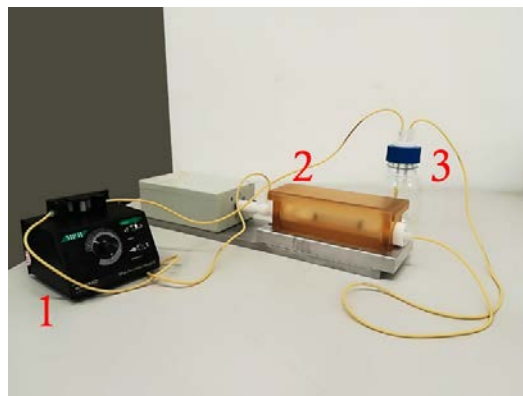


Figura 4: Circuito a perfusione: A) pompa roller; B) Camera di coltura; C) Reservoir contenente soluzione fisiologica.

In fine si è deciso di effettuare una prova completa su uno scaffold in PGA/PLLA. Si è scelto uno scaffold tubolare con un diametro di $d=9\text{mm}$ e si è deciso di realizzare un coating di circa 1.3 mm.

Una volta realizzato il coating, sono state effettuate misure dello spessore del gel per verificare la sua uniformità e prove di tenuta all'interno del circuito di perfusione.

3. Risultati

Le concentrazioni differenti di alginato o gelatina impiegate nella realizzazione delle varie classi di gel hanno mostrato delle caratteristiche differenti che rispecchiano le proprietà dei materiali costituenti: all'aumentare della percentuale di alginato, il gel realizzato risulta più viscoso e reticola in meno tempo. Viceversa, aumentando la percentuale di gelatina, esso risulta più fluido, reticola meno e in più tempo. Inoltre, anche dal punto di vista cromatico si nota una differenza: i campioni con una percentuale di alginato più bassa (e quindi di gelatina più alta) risultano essere più chiari, quasi bianchi, mentre quelli con una percentuale di alginato più alta sono più scuri, tendenti al giallino (Fig. 5).

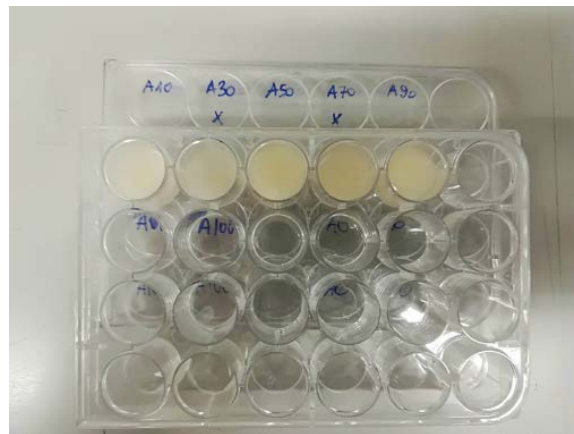


Figura 5: Campioni alloggiati in una multiwell.

I grafici che seguono mostrano i valori di sforzi e moduli elastici ottenuti applicando una rampa di spostamenti costante via via crescenti (Grafici 1-2). I campioni sono sottoposti a deformazioni del 5%, 10%, 15%, 20% del proprio spessore per un tempo di 120s.

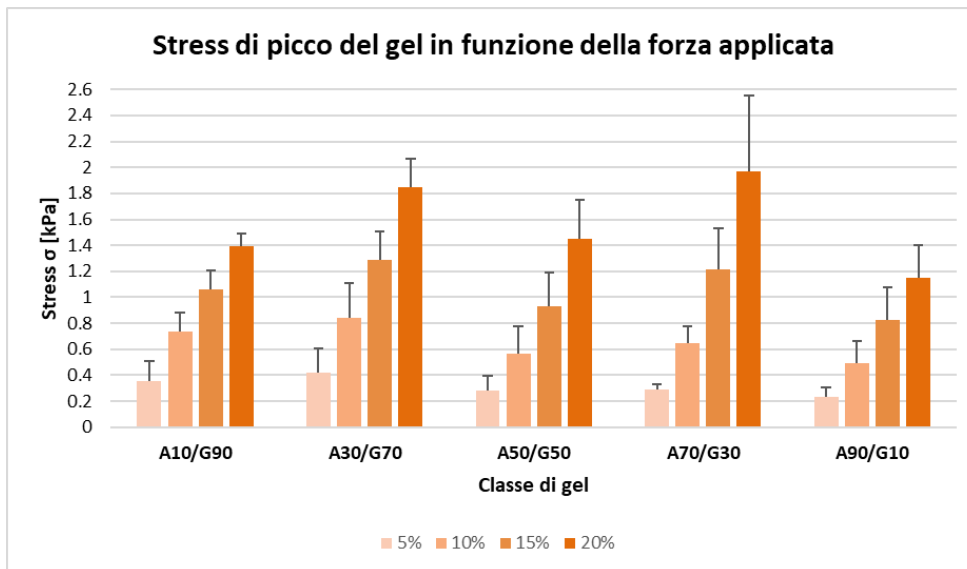
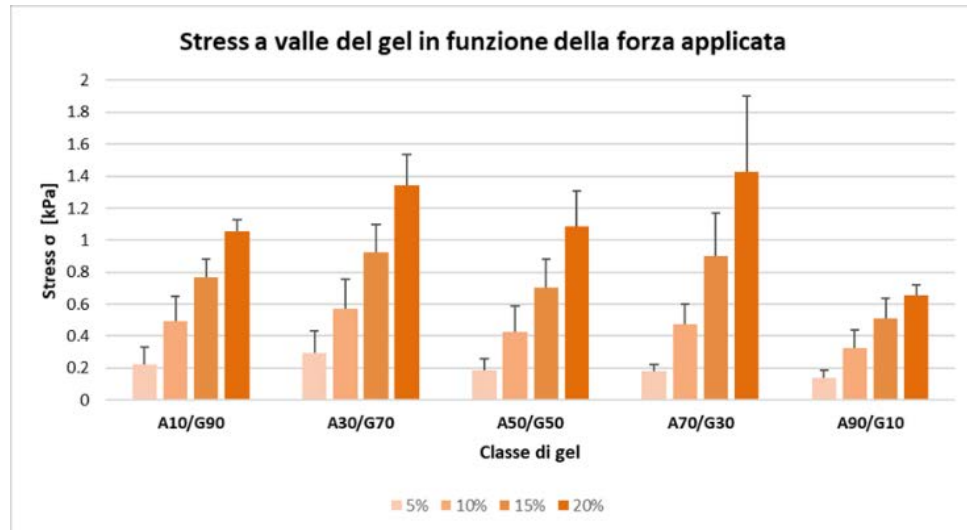


Grafico 1: A) Stress a valle delle classi di gel in funzione della forza applicata. B) Stress di picco delle classi di gel in funzione della forza applicata.

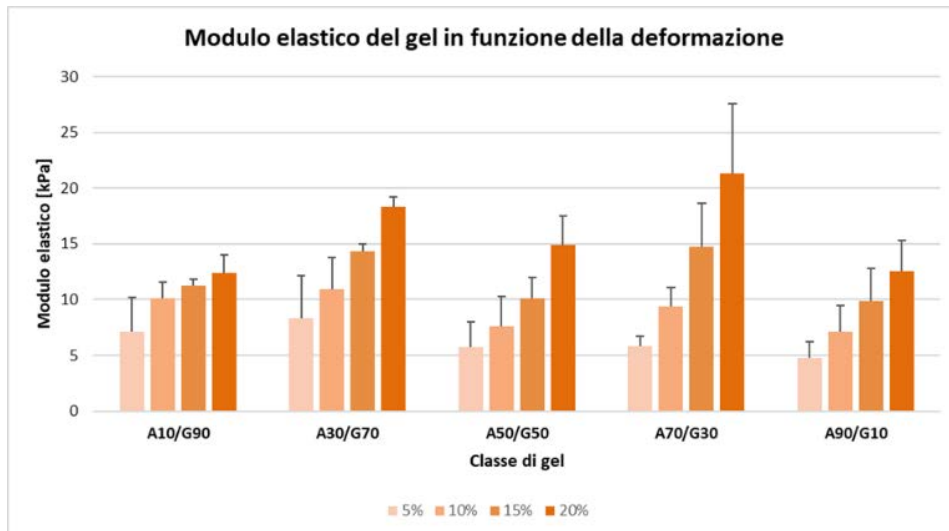
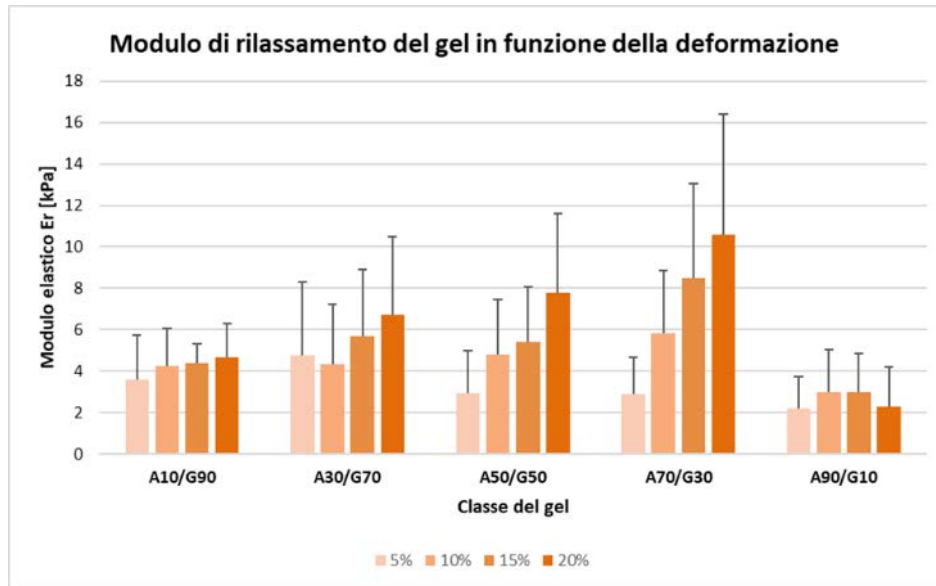


Grafico 2: A) Modulo di rilassamento delle classi di gel in funzione della deformazione. B) Modulo elastico delle classi di gel in funzione della deformazione.

Dall' analisi statistica è emerso che non esiste differenza significativa tra i valori di sforzi registrati per ogni rampa di deformazione al variare della concentrazione di alginato o gelatina, indipendentemente dai valori di sforzi analizzati. Inoltre, non esistono differenze significative nemmeno tra i valori dei moduli elastici e di rilassamento esaminati.

Pertanto, la concentrazione dei componenti non è una variabile da tenere in considerazione per la scelta della classe di gel.

Inoltre, dall'analisi dell'andamento dei p-value è possibile supporre che la differenza tra le diverse classi possa essere significativa all'aumentare della percentuale della deformazione applicata.

Un'altra condizione in cui si suppone che la differenza tra le diverse classi sia significativa è quella in cui il gel sia immerso nel mezzo di coltura, anche a fronte dell'aspetto dei campioni durante e dopo le prove di degradazione.

Successivamente si è deciso di sottoporre a compressione non confinata anche i campioni di Alginato 100% e Gelatina 100% e di confrontarli con le classi di gel precedentemente analizzate.

Dall'analisi statistica è emerso che non esiste differenza significativa né tra i valori di sforzi registrati per ogni rampa di deformazione, né tra quelli dei moduli elastici e di rilassamento esaminati. Questo risultato è coerente con la letteratura: i gel in alginato o in gelatina hanno di per sé una rigidità meccanica molto limitata e molto adattabile alle particolari applicazioni in cui sono impiegati. Infatti, le loro proprietà meccaniche sono influenzate dalle diverse strategie adottate per la loro formazione e dall'uso di molecole con strutture chimiche diverse utilizzate nel cross-linking.

I risultati delle prove di degradazione sono riassunti nel seguente grafico (Grafico 3):

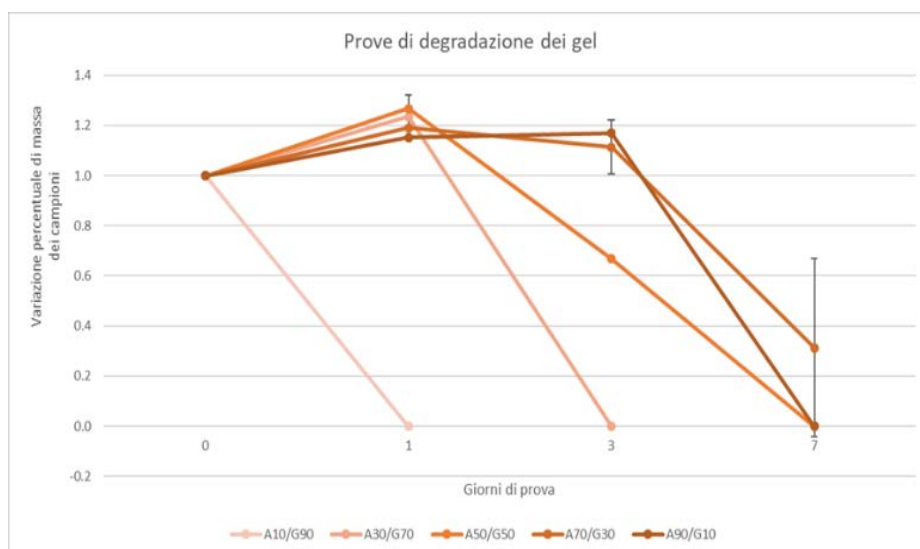


Grafico 3: andamento delle prove di degradazione nel tempo.

Le diverse quantità di alginato e gelatina presenti all'interno dei campioni, influenzano i tempi di degradazione: al giorno 1, i campioni A10/G90 sono già degradati e al giorno 3 anche i campioni A30/G70. Per quanto riguarda le altre 3 classi di gel, i tempi di degradazione sono confrontabili: tutti i campioni sono degradati al settimo giorno.

I risultati ottenuti non sono quelli aspettati visto che dalla letteratura è emerso che questi tipi di gel risultano essere stabili almeno per 21 giorni (tempo massimo per una coltura dinamica). Le motivazioni possono risiedere nel fatto che è stato modificato il protocollo: in questi studi, per esempio, veniva utilizzato il medium e veniva sostituito ogni due giorni.

Dall'analisi con lo stereomicroscopio, effettuate sullo scaffold in *Ortovatt* è emerso che il coating realizzato è uniforme indipendentemente dalla classe di gel scelta.

Dalla simulazione del circuito a perfusione continua è stato dimostrato che gli scaffold con gel di classe A10/G90 e A30/G70 sono poco impermeabili. Gli altri, con gel del tipo A50/G50, A70/G30 e A90/G10 invece, sono tutti e tre confrontabili. Essi garantiscono una buona impermeabilità durante un flusso continuo di un'ora.

Infine, è stata effettuata una prova completa su uno scaffold in PGA/PLLA impermeabilizzandolo con il gel A70/G30. Dal momento che non sono state ottenute differenze statisticamente significative dalle prove a compressione non confinata, la scelta di questa composizione è stata dettata da tali motivazioni:

1. La composizione A90/G10 è stata esclusa poiché un comportamento troppo viscoso, dovuto all'alta percentuale di alginato, potrebbe rendere più difficoltosa la fuoriuscita del gel dai fori presenti sul mandrino nella fase di impermeabilizzazione.
2. Alla luce dei risultati ottenuti dalle prove di degradazione, si è deciso di escludere le classi A10/G90 e A30/G70. Infatti, la presenza di una percentuale alta di gelatina, potrebbe sì favorire l'adesione cellulare, ma incrementerebbe anche la cinetica di degradazione del gel stesso. Inoltre, la velocità con cui le cellule degradano il gel non deve essere eccessivamente rapida: in questo modo le cellule hanno un tempo sufficiente per riprodursi e inserirsi all'interno dei pori presenti nella parte interna dello scaffold per occluderli.

Una volta realizzato il coating di gel sono state effettuate le misure dello spessore del gel per verificare la sua uniformità (Fig. 6):

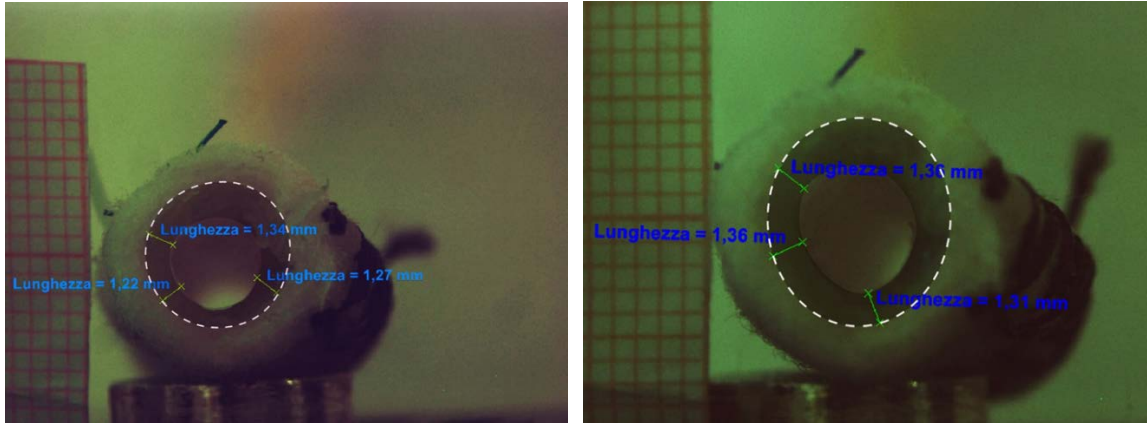


Figura 6: Coating di gel A70/G30 in scaffold in PGA/PLLA. Fronte e Retro.

Il coating ottenuto è omogeneo.

In conclusione, è stata effettuata una simulazione di circuito a perfusione con flusso continuo. È stata dimostrata l'effettiva impermeabilità del gel e la tenuta dello scaffold per tutto il tempo della prova (un'ora).

4. Conclusioni e sviluppi futuri

In conclusione, accoppiando questi gel di alginato/gelatina con il metodo sperimentale per creare un rivestimento in gel uniforme tubolare, si è in grado di coprire uniformemente la superficie luminale degli scaffold porosi. In questo modo è possibile supporre l'ottenimento di due grandi risultati: il confinamento delle EC nello strato luminale dello scaffold a doppia struttura, fornendo potenzialmente uno scaffold in grado di riprodurre la struttura anatomica dei vasi sanguigni; la riduzione delle perdite del medium (iniettato nel lume) a causa della porosità, consentendo la perfusione dello scaffold con portate conosciute.

In definitiva, la possibilità di effettuare un'indagine approfondita sul comportamento cellulare rappresenta sicuramente un possibile sviluppo futuro dello scaffold tubolare poroso impermeabilizzato realizzato in questo lavoro di tesi.

ABSTRACT

1. Introduction and state of art

Cardiovascular disease is one of the leading causes of mortality in the world, resulting in over 17 million deaths a year. Their high incidence makes it necessary to overcome the problems related to the use of vascular prostheses and autologous vessels for the replacement of small-caliber vessels (diameter <5 mm). In this field there is tissue engineering, the discipline that deals with overcoming the limits connected to traditional solutions in vitro.

In fact, to generate an engineered vascular graft, it is necessary to follow this procedure (Fig. 1):

- In vitro selection and expansion of the cell population extracted from the patient;
- Choice of the scaffold (structural support) with architecture, geometry, chemical and surface composition depending on the type of fabric to be created;
- Choice and use of an adequate bioreactor that provides the chemical and physical stimuli, the experimental conditions that can be reproduced and compared to the physiological ones.

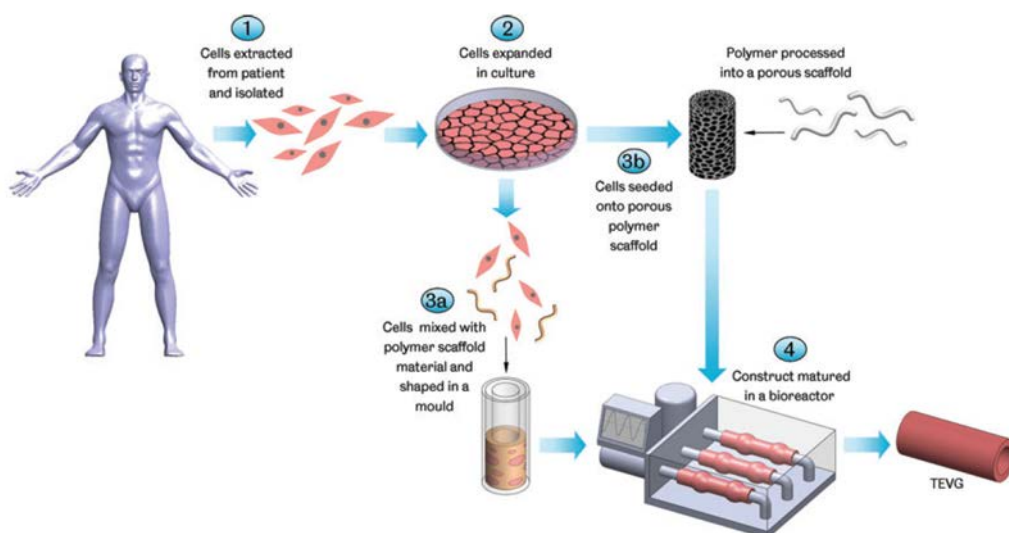


Figure 1: Schematization of the formation of a TEVG with scaffold.

The scaffolds for the reconstruction of blood vessels *in vitro* allow the adhesion and growth of both endothelial cells (EC) and vascular smooth muscle cells (VSMC), as they must reproduce the native structure of the physiological tissue in which the intima and the media are anatomically detached but functionally united. Therefore, on the one hand it must be possible to realize the endothelium on the lumen surface of the scaffold and on the other hand, it must be possible to favor the adhesion of VSMC on the external surface of the scaffold. The natural scaffolds, made of decellularized matrix, offer the advantage of obtaining a more natural structure, linked to the presence of three-dimensional ultrastructural proteins and showing a superior vascular regeneration capacity, guaranteeing proper engraftment, proliferation and cell migration. However, decellularized tissues have limited availability and present difficulties related to VSMC adhesion during the sowing procedure.

Given these disadvantages, it was decided to use a scaffold of polymeric origin such as PGA/PLLA. In fact, although it is less biocompatible, it guarantees more performing mechanical properties, which makes it more suitable for the production of vascular grafts.

However, using a porous structure involves new problems when you want to insert it in a perfusion bioreactor that mechanically stimulates the construct, to obtain a vascular graft with mechanical properties similar to those of the native vessel. In fact, the VSMCs are physiologically subjected to a cyclic deformation equal to 10%, which induces the maintenance of the contractile phenotype and the circumferential alignment along the vessel wall. The ECs, on the other hand, are exposed to a wall shear stress of 0.5-2 Pa which promotes the longitudinal orientation in the direction of the blood flow.

In order to recreate these mechanical stimulations *in vitro* by pulsatile perfusion and to effect a cellular co-culture, it is necessary to avoid that volumes of fluid escape through the pores of the scaffold. It is therefore of fundamental importance to make the internal surface of scaffold waterproof.

Therefore, the objective of this work is to produce a polymeric coating to waterproof the porous tubular scaffold lumen for the engineering of small-caliber blood vessels. This coating, on the one hand, allows cell adhesion and on the other, it is able to make the

surface of the scaffold waterproof. This process will have the task of ensuring perfusion of the scaffold with a continuous physiological-like flow.

Once the gel coating is generated, it will be mechanically characterized by unconfined compression tests and degradation tests.

Finally, the impermeability of the polymer coating will be tested, inserted in the lumen of the scaffold realized, through a continuous perfusion circuit.

2. Materials and methods

In order to reproduce a tubular porous scaffold in a reproducible and reliable manner, it was necessary to identify a simple and effective methodology that would guarantee the reproducibility of the tubular coating. It was therefore decided to use a previously modified version of the *InBreath* commercial bioreactor (Fig. 2).



Figure 2: A) *InBreath* bioreactor. B) Culture chamber with scaffold.

Given the modularity of the device, it was decided to use a drilled mandrel with an internal diameter of 2.5 mm and an outer diameter of 5 mm. Moreover, thanks to its particular shape, it is possible to seed the cells on both surfaces of the tubular scaffold. In fact, it has a coaxial conduit connected to the external environment by means of two orifices, one located on the wall of the culture chamber and the other, placed on the hollow cylindrical shaft on the same side of the rotary engine. This type of configuration is also useful for the symmetrical injection of the gel made for waterproofing the scaffold. In fact, through the

two accesses, it is easier to guarantee uniformity of the gel along the entire internal surface of the scaffold.

Through the software Solidworks 2017 (Fig. 3), a series of cover scaffold have been designed. They have been used to custom scaffolds of varying lengths. By means of these objects, the holes present on the mandrel are covered so as to prevent gel from escaping into the culture chamber.

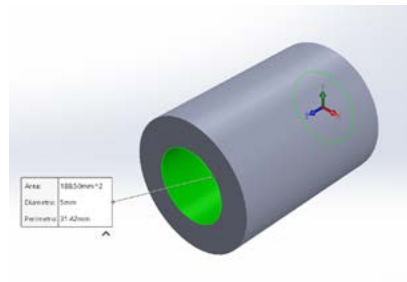


Figure 3: Cylindrical model obtained with Solidworks 2017.

Five types of gel have been created, made up of different percentages of 8% w/v alginate and 6% w/v gelatin to evaluate the waterproofing effect of alginate and the gelatin adhesive. Overall:

- ✓ 10-90: 10% solution formed from 8% alginate and 90% from 6% gelatin
- ✓ 30-70: 30% solution formed from 8% alginate and 70% from 6% gelatin
- ✓ 50-50: 50% solution formed from 8% alginate and 50% from 6% gelatin
- ✓ 70-30: 70% solution formed from 8% alginate and 30% from 6% gelatin
- ✓ 90-10: 90% solution formed from 8% alginate and 10% from 6% gelatin

The gel has been mechanically characterized by non-confined compression tests and degradation tests.

The UC tests allow the specimen to be deformed in the radial direction and the consequent fluid exudation in the same direction. They are useful for determining the Young's modulus of the sample under stationary conditions.

Degradation tests, on the other hand, serve to understand if the gel immersed in PBS is stable over time or if it undergoes a degradation process.

The realized gel is used to carry out a coating for the waterproofing of porous tubular scaffolds. Furthermore, preliminary tests have been carried out on the scaffold coating in *Ortovatt*:

- Analysis of the behavior of different types of gels when they are inserted in the lumen of the spindle;
- Measurements and photographs through stereomicroscope in order to verify the uniformity and thickness of the coating;
- Analysis of the effective waterproofing of the gel in alginate and gelatine through a circuit (Fig. 4) that simulates a continuous flow inside the spindle.

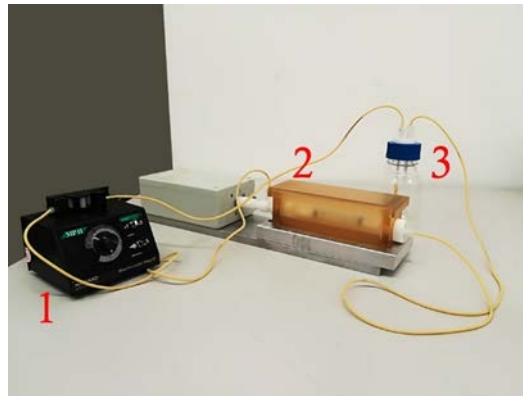


Figure 4: Perfusion circuit: A) roller pump; B) Culture chamber; C) Reservoir containing physiological solution.

Finally it was decided to carry out a complete test on a scaffold in PGA/PLLA. A tubular scaffold with a diameter of $d = 9\text{mm}$ was chosen and it was decided to realize a coating of about 1.3 mm.

Once the coating was made, measurements of the thickness of the gel were carried out to verify its uniformity and tightness tests within the perfusion circuit.

3. Results

The different concentrations of alginate or gelatine used in the realization of the various gel classes have shown different characteristics which reflect the properties of the constituent materials: as the percentage of alginate increases, the gel obtained is more viscous and cross-linked in less time. Vice versa, increasing the percentage of gelatin, it is more fluid, reticulates less and in more time. Moreover, also from the chromatic point of view one can notice a difference: samples with a lower alginate percentage (and therefore higher gelatin) are lighter, almost white, while those with a higher percentage of alginate are darker, tending to yellow (Fig. 5).

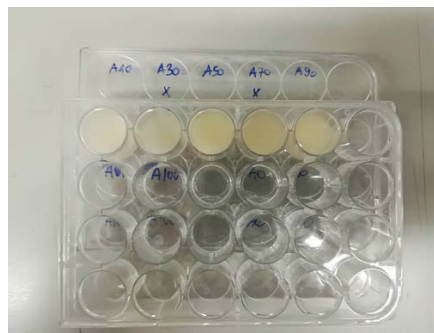


Figure 5: Samples housed in a multiwell.

The following graphs show the stress values and elastic modules obtained by applying a ramp of constant displacements progressively increasing (Fig. 6-7). The samples are subjected to deformations of 5%, 10%, 15%, 20% of their thickness for a time of 120s.

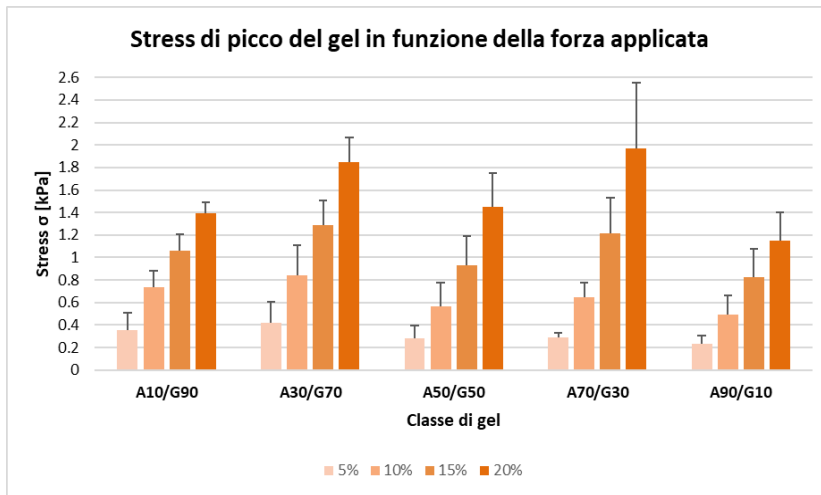
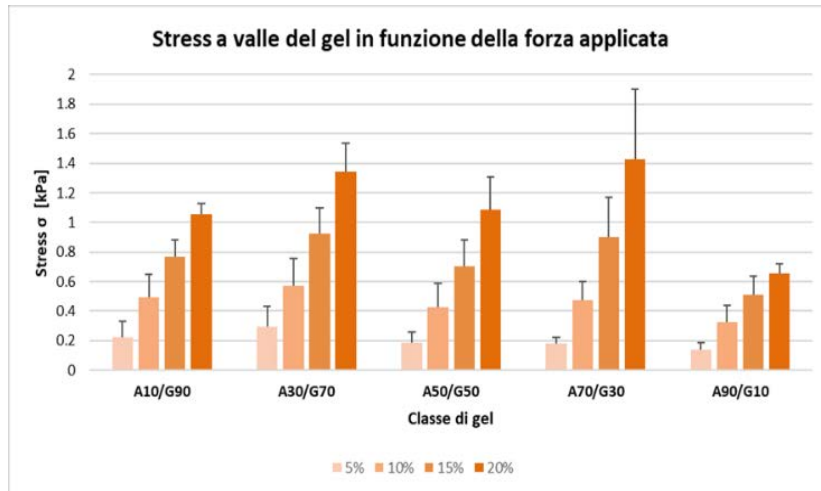
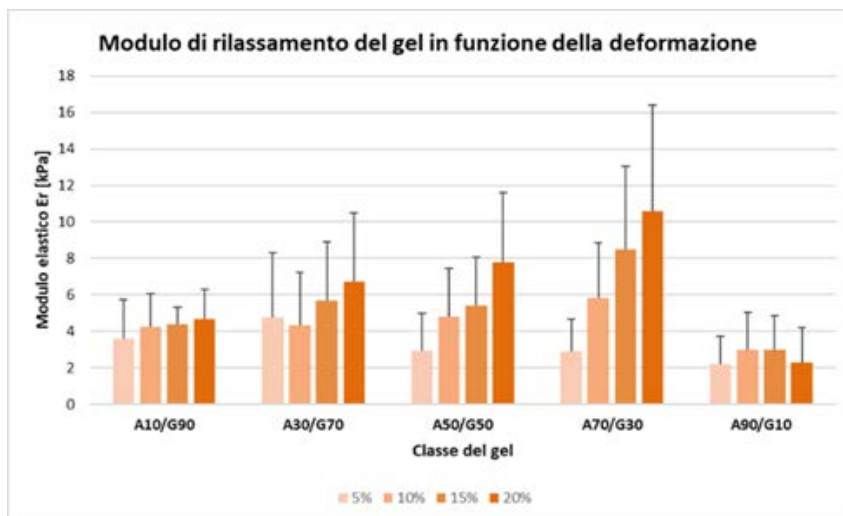


Figure 6: A) Stress downstream of the gel classes as a function of the applied force. B) Peak stresses of the gel classes as a function of the applied force.



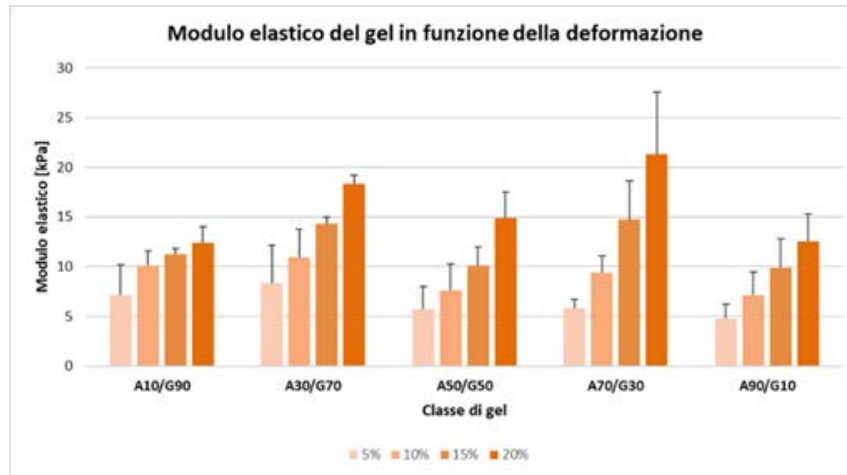


Figure 7: A) Relaxation module of the gel classes according to the deformation. B) Elastic module of the gel classes according to the deformation.

A statistical analysis showed that there is no significant difference between the stress values recorded for each strain ramp when the alginate or gelatin concentration varies, regardless of the stress values analyzed. Furthermore, there are no significant differences even between the values of the elastic and relaxation modules examined.

Therefore, the concentration of the components is not a variable to take into account when choosing the gel class.

Moreover, from the analysis of the trend of the p-values it is possible to suppose that the difference between the different classes can be significant as the percentage of the applied deformation increases.

Another condition in which the difference between the different classes is supposed to be significant is that in which the gel is immersed in the culture medium, also in relation to the appearance of the samples during and after the degradation tests.

Subsequently, it was decided to subject the samples of 100% Alginate and 100% Gelatin to non-confined compression and to compare them with the previously analyzed gel classes.

From the statistical analysis it emerged that there is no significant difference between the stress values recorded for each deformation ramp, nor between those of the examined elastic and relaxation modules. This result is consistent with the literature: alginate or gelatin gels have in themselves a very limited mechanical rigidity and very adaptable to the particular applications in which they are used. In fact, their mechanical properties are

influenced by the different strategies adopted for their formation and by the use of molecules with different chemical structures used in cross-linking.

The results of the degradation tests are summarized in the following graph (Fig. 8):

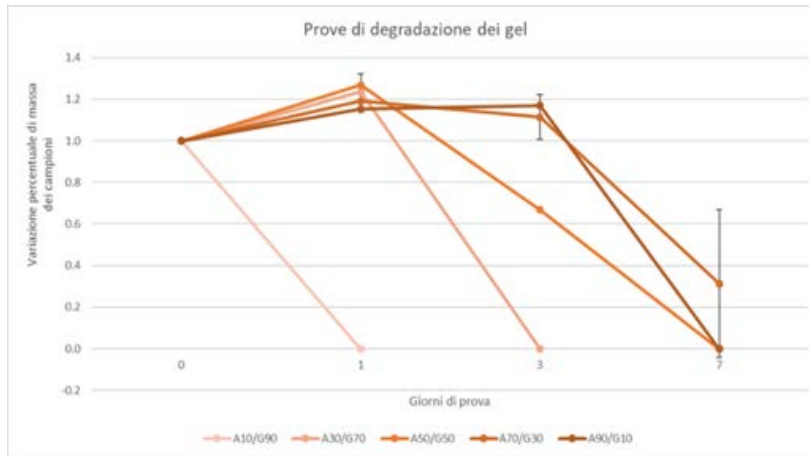


Figure 8: trend of degradation tests over time.

The different amounts of alginate and gelatine present in the samples, influence the degradation times: at day 1, the samples A10/G90 are already degraded and at day 3 also the samples A30/G70. As for the other 3 classes of gels, degradation times are comparable: all the samples are degraded on the seventh day.

The results obtained are not those expected since the literature has shown that these types of gel are stable for at least 21 days (maximum time for a dynamic culture). The reasons may lie in the fact that the protocol has been modified: in these studies, for example, the medium was used and was replaced every two days.

From the analysis with the stereomicroscope, carried out on the *Ortovatt* scaffold, it has emerged that the realized coating is uniform regardless of the chosen gel class.

From the simulation of the continuous perfusion circuit, it has been shown that gel shelves of class A10/G90 and A30/G70 are not very waterproof. The others, with gel type A50/G50, A70/G30 and A90/G10 instead, are all three comparable. They guarantee good impermeability during a one hour continuous flow.

Finally, a complete test was carried out on a PGA/PLLA scaffold, waterproofing it with A70/G30 gel. Since no statistically significant differences were obtained from non-

confined compression tests, the choice of this composition was dictated by such motivations:

1. The composition A90/G10 has been excluded because a too viscous behavior, due to the high percentage of alginate, could make it more difficult for the gel to escape from the holes present on the mandrel during the waterproofing phase.

2. From results obtained from the degradation tests, it was decided to exclude the A10/G90 and A30/G70 classes. In fact, the presence of a high percentage of gelatin, could favor cell adhesion, but also increases the degradation kinetics of the gel itself. Furthermore, the rate at which cells degrade the gel must not be excessively rapid: in this way the cells have sufficient time to reproduce and insert themselves inside the pores present in the inner part of the scaffold to occlude them.

Once the gel coating was carried out, the thickness of the gel was measured to verify its uniformity (Fig. 9):

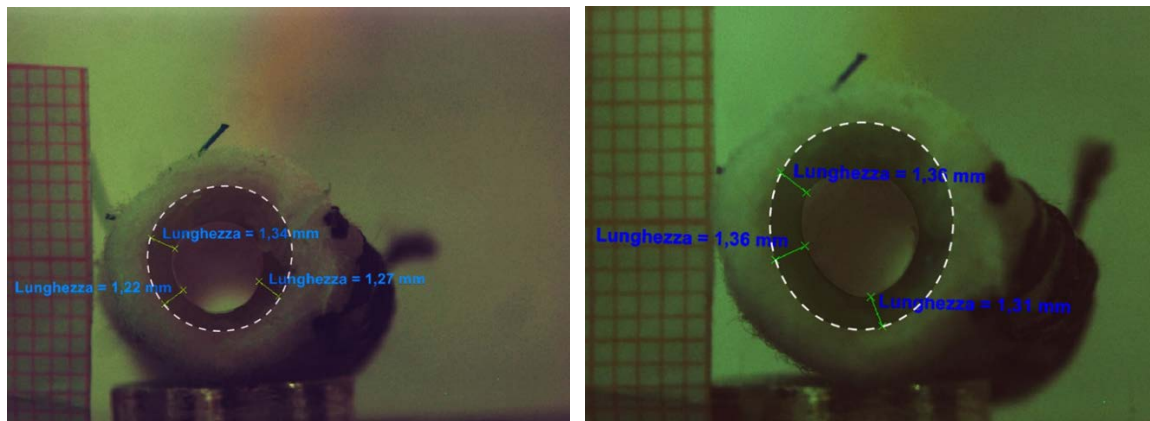


Figure 9: A70/G30 gel coating in PGA/PLLA scaffolds. Front and back.

The obtained coating is homogeneous.

In conclusion, a perfusion circuit simulation with continuous flow was performed. The actual impermeability of the gel and the holding of the scaffold was demonstrated throughout the test (one hour).

4. Conclusions and future developments

In conclusion, by coupling these alginate / gelatin gels with the experimental method to create a uniform tubular gel coating, it is able to uniformly cover the luminal surface of the porous scaffolds. In this way it is possible to suppose the obtaining of two great results: the confinement of the ECs in the luminal layer of the double structure scaffold, potentially providing a scaffold able to reproduce the anatomical structure of the blood vessels; the reduction of medium losses (injected into the lumen) due to the porosity, allowing the perfusion of the scaffold with known flow rates.

Ultimately, the possibility of carrying out an in-depth investigation of cellular behavior certainly represents a possible future development of the tubular scaffold.

1. INTRODUZIONE E STATO DELL'ARTE

1.1 Apparato cardiocircolatorio

Le patologie correlate al malfunzionamento dell'apparato cardiocircolatorio sono considerate la prima causa di morte nel mondo, come indicato dalle statistiche della WHO (World Health Organization)¹.

In Italia, nel 2010 (ultimo dato di mortalità disponibile), si sono verificati 220.539 decessi per malattie del sistema circolatorio (95.952 negli uomini e 124.587 nelle donne).² Nel 2015 circa 17.7 milioni di persone sono morte proprio a causa delle CVDs (Cardiovascular Diseases), valore che rappresenta il 31% dei decessi a livello mondiale in quell'anno¹.

Alcuni fattori di rischio tra cui fumo, diabete, obesità, colesterolemia, ipertensione arteriosa e scarsa attività fisica, aumentano significativamente la percentuale di incidenza delle malattie cardiocircolatorie. Risulta tuttavia possibile prevenire e monitorare tali patologie adottando uno stile di vita sano, evitando vizi come alcol e fumo e seguendo una dieta equilibrata^{1 2}. Anche il sesso, l'età e familiarità alla malattia incidono sulla percentuale di incidenza: con l'avanzare dell'età gli eventi letali medi tendono ad aumentare. L'aumento progressivo dell'età media della popolazione fa presumere che i numeri di tali decessi possano raddoppiare².

Per tali ragioni, l'attenzione del seguente lavoro di tesi è focalizzata principalmente sullo studio dell'apparato circolatorio e sulle patologie ad esso correlate, proponendo un metodo alternativo per affrontarle.

1.1.1 Anatomia e struttura dei vasi sanguigni

L'apparato circolatorio è costituito dal cuore, dai vasi sanguigni e dai vasi linfatici. Da una parte esso permette l'apporto di ossigeno e sostanze nutritive a tutte le cellule e i tessuti del nostro corpo; dall'altra permette di eliminare sostanze di scarto e anidride carbonica ottenute dal metabolismo cellulare.

I vasi sanguigni sono suddivisi in base alla loro funzione e struttura^{3 4}:

- *Arterie*: sono condotti che trasportano il sangue ad alta pressione, pertanto presentano uno spessore delle pareti consistente e resistente. Sono caratterizzati inoltre da una grande elasticità (compliance), che rende il condotto capace di supportare i cambiamenti di volume e di pressione interni dovuti al flusso pulsatile del sangue. Per questo tipo di caratteristiche i vasi arteriosi sono in grado di sopportare forti stress meccanici senza fratturarsi.

In base alle caratteristiche strutturali, le arterie possono essere suddivise in:

- Arterie di *grosso calibro* (con un diametro superiore a 6mm);
- Arterie di *medio o piccolo calibro* (con un diametro compreso tra 0.1mm e 6mm);
- *Arteriole* (con un diametro inferiore a 100 μ m).

Dalle arteriole si passa alla *rete di vasi capillari*, costituiti da pareti molto sottili con un singolo strato di cellule endoteliali piatte, che effettuano lo scambio di fluidi e di sostanze nutritive ai tessuti di interesse.

- *Venule*: sono condotti che convergono nel sistema venoso. Essi trasportano il sangue ricco di sostanze di scarto e di anidride carbonica. Sono costituite da sottili pareti muscolari e convogliano nelle vene, strutture analoghe per funzione ma di dimensioni maggiori.
- *Vene*: contrariamente a quello che accade nelle arterie, queste sono sottoposte a basse pressioni; per tal motivo non necessitano di pareti robuste e elastiche. La differenza principale tra arterie e vene è costituita dalla presenza in queste ultime di valvole “a nido di rondine” che impediscono al sangue di rifluire per effetto della forza di gravità.

La parete vascolare è costituita da un tessuto dalla struttura particolarmente complessa e diversificata da zona a zona in relazione alla specifica funzione richiesta. In termini generali la parete di ogni segmento vascolare è costituita da tre strati concentrici, chiamati *tuniche*, che dall'interno verso l'esterno sono (Fig. 1):

- *Tunica intima*: è costituita da un singolo strato di cellule endoteliali (EC), appiattite e lisce, che sono direttamente in contatto con il sangue che scorre nel vaso, e da un sottile strato subendoteliale contenente fibre di collagene (membrana basale). Essa

presenta una permeabilità selettiva per alcune sostanze, come acqua e zuccheri, che possono passare dai tessuti al sangue e viceversa.

- *Tunica media*: costituisce generalmente lo strato più spesso della parete ed ha strutture differenti nelle diverse parti del sistema vascolare. È caratterizzata dalla presenza di cellule muscolari lisce (VSMC), da fibre elastiche e collagene. La funzione di questo strato è conferire elasticità e contrattilità al vaso per resistere alla forza dettata dalla pressione sanguigna. Dal momento che nelle arterie di grosso calibro la pressione esercitata dal fluido è elevata, la componente elastica è predominante a discapito di quella contrattile. Viceversa, nelle vene sottoposte a minor pressione e deputate al ritorno venoso, la componente muscolare liscia è predominante.
- *Tunica avventizia*: è composta principalmente da fasci di fibre di collagene non compatti in direzione longitudinale. Sono presenti anche in minore quantità fibre di elastina e cellule muscolari. Questo strato ha la funzione di protezione del vaso e permette l'ancoraggio ad altre strutture formando una sorta di continuità tra vaso ed altri tipi di tessuto. All'interno della tunica avventizia inoltre scorrono fibre nervose e vasi linfatici. Nel caso di vasi di grandi dimensioni la tunica avventizia è perfusa da un sistema di piccoli vasi detti "vasa vasorum" deputati al trasporto di ossigeno e sostanze nutritive ai tessuti delle pareti del vaso.

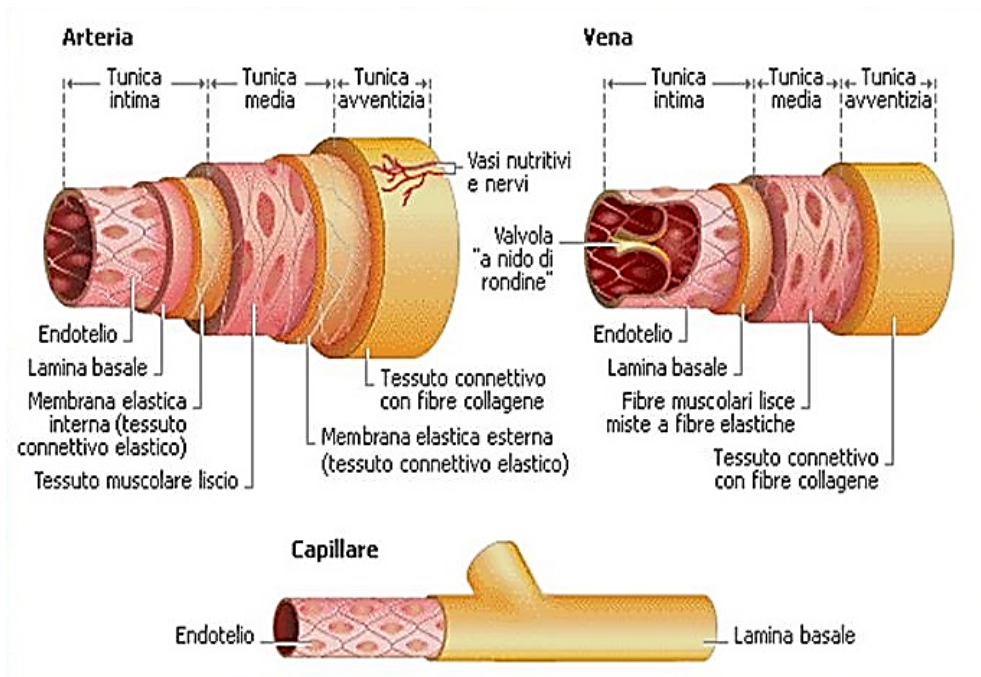


Figura 7 Rappresentazione delle tuniche in diversi tipi di vasi sanguigni.

1.1.2 Condizionamento biochimico e biomeccanico

In vivo, l'ambiente biochimico fisiologico e la stimolazione meccanica dovuta al flusso pulsatile del sangue e al battito cardiaco hanno un ruolo importante nello sviluppo della regolazione vascolare, nel rimodellamento e nella guarigione delle ferite. Disturbi del normale flusso ematico possono contribuire alla generazione di malattie cardiovascolari tra cui l'aterosclerosi e l'ipertensione.⁵

Le VSMC e le EC sono le cellule principali regolatrici dell'omeostasi vascolare. Le cellule endoteliali sono principalmente sottoposte ad uno sforzo di taglio alla parete (WSS: wall shear stress) causato dallo scorrimento di sangue all'interno dei vasi che tende ad allineare le EC longitudinalmente nella direzione del flusso, modulando l'attivazione di recettori, fattori di trascrizione e l'espressione genica e proteica.⁶ Biochimicamente i meccanotrasduttori coinvolti in questi processi sono: i canali di attivazione di stretch (SA), le integrine e le molecole-1 di adesione di piastrine e di cellule endoteliali (PECAM).⁵ In vivo, il range fisiologico a cui sono esposte le EC è pari a $5-20 \text{ dyne/cm}^2$ ($0,5-2 \text{ Pa}$), valore che inibisce i processi infiammatori e la formazione di trombi. Infatti, WSS laminari

modulano la produzione di ossido nitrico (NO), una molecola con caratteristiche antiinfiammatorie e anticoagulanti che inibisce l'adesione piastrinica.⁷ Anche le EPC (cellule endoteliali progenitrici) sono sottoposte ad uno WSS pari a circa 0,1- 2.5 dyne/cm² (0,01-0,25 Pa) che permette loro di differenziare in EC. Inoltre, sia le EC che le EPC sono caratterizzate dalla presenza sulla superficie di marcatori tipici quali CD31 (fattore di adesione cellulare piastrinico), VE-cadherin (caderina vascolare endoteliale), il VEGFR1 (fattore di crescita endoteliale vascolare) e il vWF (fattore di von Willebrand) (Tab. 1)⁷.

Le VSMC invece, sono sottoposte a una deformazione circonferenziale ciclica pari al 10% causata dalle variazioni pulsatili della pressione sanguigna.⁷ Questa deformazione meccanica modula adesione, proliferazione, vitalità, apoptosi e allineamento circonferenziale delle VSMC stesse lungo la parete del condotto⁶. Essa inoltre è in grado di indurre le VSMC ad esprimere il fenotipo contrattile caratterizzato dall'espressione di α -actina (α -SMA), miosina (SM22) e calponina (marcatori di differenziazione rispettivamente iniziali, finali e centrali)⁷.

Tabella 1 Stimoli biomeccanici tipici del tessuto vascolare. A destra sono riportati gli effetti di tali stimoli sulle cellule endoteliali e muscolari.

Biomechanical factor	Physiological value	Effect on cells
Shear stress (SS)	0.1-2.5 dyne/cm ² (EPCs) 5-20 dyne/cm ² (ECs)	<ul style="list-style-type: none"> ↑ EC alignment and differentiation ↑ expression of CD31, VE-cadherin, vWF, Flk-1 ↑ production of NO ↓ production of VCAM1, ICAM1 ↑ expression of KLF2
Cyclic strain	~10%	<ul style="list-style-type: none"> ↑ VSMC alignment and differentiation ↑ expression of α-SMA, SM22, calponin ↑ VSMC contractile phenotype ↑ apoptosis of differentiated VSMCs ↓ VSMC proliferation ↓ EC apoptosis ↑ EC viability

EC: Endothelial cell; EPC: Endothelial cell progenitor; VE: Vascular endothelial; VSMC: Vascular smooth muscle cell.

I fattori biochimici rappresentano l'altro elemento chiave per mantenere la omeostasi vascolare: essi sono responsabili della migrazione cellulare, proliferazione, differenziamento in cellule vascolari e apoptosi sia per le EC che per le VSMC⁷ (Tab. 2).

Tabella 2 Fattori biochimici coinvolti nell'omeostasi vascolare.

Biochemical factor	Effect on cells
VEGF	↑ EC proliferation ↑ EC migration ↑ vasculogenesis ↑ PDGF activation ↑ activation Ang-2-mediated TNF- α ↓ VSMC proliferation
PDGF (and its isoforms)	↑ VSMC proliferation in static condition (PDGF-AB, PDGF-BB) ↓ VSMC proliferation, when coupled with 10% deformation (PDGF-AA) Modulate contractile/synthetic phenotype of VSMCs, synergistically with bFGF
bFGF	↑ VSMC proliferation in static condition ↑ EC proliferation and differentiation Modulate contractile/synthetic phenotype of VSMCs, synergistically with PDGF-BB
TGF-β	↑ VSMC proliferation in static condition
TNF-α	↑ VSMC apoptosis ↑ VSMC proliferation and migration ↑ production of VCAM1, ICAM1 (enhanced when coupled with SS) ↓ KLF2 expression
KLF2	Modulate VEGF activation Modulate TNF- α inflammatory activity
Erg	Modulate EC motility and migration (cytoskeletal organization) ↓ TNF- α -induced inflammation
ILs	↑ VSMC migration (IL-1, IL-8, IL-17, IL-18, IL-20) ↑ angiogenesis (IL-2, IL-8, IL-15) ↓ VSMC proliferation (IL-10) ↓ stability of VCAM1 and ICAM1 (IL-10, IL-19) ↓ TNF- α inflammatory activity (IL-19) ↓ VSMC motility (IL-19)
EC: Endothelial cell; VSMC: Vascular smooth muscle cell.	

1.1.3 Patologie cardiovascolari

Le malattie più frequenti che coinvolgono l'apparato cardiovascolare sono:

- *Ipertensione arteriosa e aterosclerosi*^{3 4}
- *Aneurisma*^{3 4}
- *Trombosi*^{3 4}
- *Ischemia vascolare*^{3 4}

L' *ipertensione arteriosa* è una condizione patologica in cui la pressione del sangue arterioso risulta essere molto elevata rispetto a quella considerata normale. Si parla di ipertensione quando la pressione diastolica supera i 90mmHg e quando quella sistolica supera i 130mmHg. Tale incremento della pressione non è dannoso in sé ma può

aumentare il rischio dell'insorgere di altri tipi di patologie quali ictus, ischemie e altre disfunzioni legate al sistema cardiovascolare. Inoltre al crescere dei valori di pressione, aumentano gli shear stress alle pareti dei vasi sanguigni e conseguentemente si formano microlesioni sulle stesse, nelle quali si depositano placche fibroadipose (ateromi) tipiche dell'*aterosclerosi* (Fig. 2). Anatomicamente l'ateroma comporta il deposito sotto la tunica interna dell'arteria di lipidi, rappresentati soprattutto dal colesterolo trasportato dalle LDL (low density lipoprotein). I monociti del sangue vengono reclutati dalla parete e si trasformano in macrofagi che fagocitano queste sostanze estranee e provocano localmente eventi infiammatori, che determinano la proliferazione di cellule muscolari e la formazione di una capsula fibrotica che può divenire calcifica. Questi fenomeni culminano nella distruzione del tessuto elastico e muscolare e nella formazione di un tessuto simil-cicatriziale. L'arteria tende così ad indurirsi e ad ostruirsi. Gradualmente il lume dell'arteria tende a restringersi (stenosi), prima in modo non influente sulla fluidodinamica, poi via via sempre più critico, causando anomalie del flusso che a loro volta possono alimentare lo stato patologico. Inoltre, la diminuzione progressiva del passaggio del sangue, causata dalla stenosi, porta ad una minore irrorazione dei tessuti, che soffrono prima in modo temporaneo (dolori al momento degli sforzi fisici), poi in modo permanente. Quando il restringimento dell'arteria diventa totale e si ha l'occlusione, i tessuti vanno incontro a morte cellulare (necrosi).

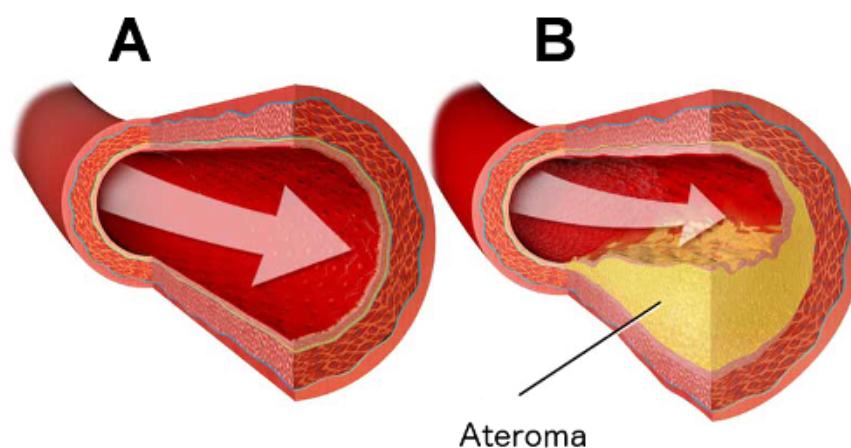


Figura 8 A: vaso sanguigno sano. B: vaso sanguigno con placca aterosclerotica.

L'*aneurisma* (letteralmente dilatazione) si forma per il progressivo sfiancamento di un tratto della parete arteriosa. Si tratta di un fenomeno meccanico dovuto da una parte alle sollecitazioni indotte sulla parete e dall'altra ad una alterazione delle proprietà meccaniche della parete stessa. Le tipologie principali di aneurisma sono: cerebrale e aortico. Gli aneurismi più comuni sono quelli legati all'aorta addominale (AAA). Le cause di tale dilatazione sono ancora ignote. A parte gli intuibili effetti di compressione locale che un aneurisma può causare a discapito delle pareti vascolari, il pericolo più evidente legato a tale dilatazione è una improvvisa rottura della stessa. L'emorragia che ne deriva, esercita un'azione negativa più dal punto di vista chimico che meccanico con gravissime conseguenze (coma, morte) anche in presenza di uno stravasato di sangue relativamente modesto. Nella maggior parte dei casi, l'aneurisma risulta essere asintomatico.

La *trombosi* è un processo patologico che dà luogo alla formazione di una massa semisolido aderente alla parete vascolare almeno in un punto, detta trombo, formata dai costituenti del sangue all'interno del sistema vascolare. È possibile distinguere diversi tipi di trombi: arteriosi, venosi e vegetazioni valvolari. I trombi arteriosi generalmente si formano su una superficie endoteliale lesa, si presentano come masse compatte, bianche e tendono a rimanere parietali. Essi possono aumentare di volume fino a riempire tutto il lume vascolare: in questo caso, diventando occlusivi, impediscono il regolare afflusso di sangue nei tessuti. I trombi venosi si formano in quei compartimenti venosi dove la stasi ematica è più accentuata e tendono a diventare sempre occlusivi. Poiché questi trombi si formano in un ambiente di stasi sanguigna, contengono più globuli rossi imbrigliati ed assomigliano ad un coagulo. Infine, i trombi che si sviluppano sulle valvole cardiache vengono detti "vegetazione": sono formati da diramazioni molto friabili che possono staccarsi ed embolizzare.

L'*ischemia vascolare* è quella condizione patologica che impedisce il regolare afflusso di sangue negli organi. Essa si verifica in seguito ad un trombo o ad una stenosi: due condizioni che compromettono il lume dei vasi sanguigni, rendendoli incapaci di svolgere le proprie funzioni fisiologiche. Le conseguenze di tale disfunzione possono essere molteplici e di diversa gravità: si passa dal dolore toracico a riposo, mancanza di respiro, nausea e vomito (angina instabile) causati da un'ostruzione che si risolve rapidamente,

all'infarto miocardico in cui le cellule non ricevono abbastanza ossigeno e muoiono. Se l'ischemia non viene diagnosticata e curata in tempi brevi sopraggiunge la morte.

1.1.4 Trattamenti standard delle patologie vascolari

I trattamenti standard delle malattie vascolari sono molto invasivi e invalidanti.⁸ Per questo motivo, la prevenzione ha un ruolo fondamentale in questo ambito.

È importante innanzitutto misurare la pressione arteriosa: l'*ipertensione* (paragrafo 1.1.3) è una delle cause principali delle disfunzioni cardiache e vascolari.

La cura dell'*ipertensione* ha come scopo quello di riportare i valori pressori all'interno del range fisiologico. Infatti, attraverso un corretto stile di vita (un'alimentazione povera di sale e ipocalorica e aumentando l'attività fisica) e con l'utilizzo di farmaci specifici è possibile ridurre la pressione sanguigna. I farmaci antiipertensivi agiscono attraverso meccanismi diversi, possono essere: diuretici, regolatori ormonali, calcioantagonisti (che riducono l'eccessiva costrizione arteriolare), beta bloccanti e così via. La riduzione della pressione arteriosa è un processo che deve essere effettuato gradualmente: infatti, se ciò non avvenisse, nei primi giorni di terapia aumenterebbe il rischio di compromettere la adeguata perfusione degli organi e dei tessuti. Ovviamente non tutti gli individui reagiscono allo stesso modo alla malattia: alcuni possono convivere per anni senza presentare altri tipi di problemi, altri invece non tollerano l'eccessiva pressione e sviluppano altre patologie in breve tempo.

In numerosi casi, la prevenzione e uno stile di vita sano non sono sufficienti per evitare l'insorgenza di patologie più importanti.

Per quanto riguarda gli *aneurismi*, allo stato attuale non esistono delle alternative alla chirurgia.

Un aneurisma cerebrale, ad esempio, viene trattato con una tecnica mininvasiva, cioè favorendo la formazione di un trombo attraverso l'inserimento di appositi filamenti

metallici, oppure con un intervento invasivo, ponendo una particolare clip metallica alla sezione espansa che permetterà il riempimento del sito con un coagulo (Fig. 3).

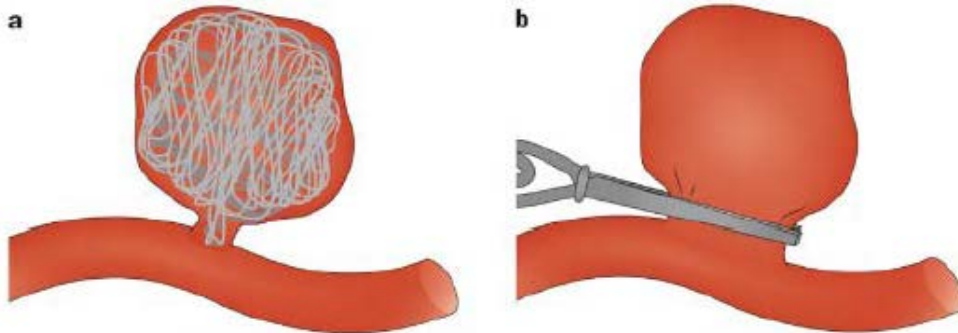


Figura 9 Tecniche chirurgiche per aneurisma cerebrale.

Per quanto riguarda un aneurisma aortico-addominale invece, viene prediletta un'operazione chirurgica che presuppone l'utilizzo di uno **stent** (Fig. 4): una struttura tubolare la cui parete porosa è tenuta da una maglia metallica o polimerica. Esso viene inserito attraverso un catetere generalmente posizionato nell'arteria femorale dell'inguine e fatto espandere nel luogo di interesse fino a quando il suo diametro è pari a quello del lume. In questo modo viene ripristinata la corretta fluidodinamica del vaso. Il vero problema è la trombosi che ne può derivare: lo stent, una volta appoggiato alla parete, crea delle rugosità metalliche che, fino a quando non vengono ricoperte dalla neointima del vaso, costituiscono zone di disturbo fluidodinamico, formazione di trombo a attivazione piastrinica. Al fine di evitare tali complicazioni vengono utilizzati farmaci anticoagulanti.

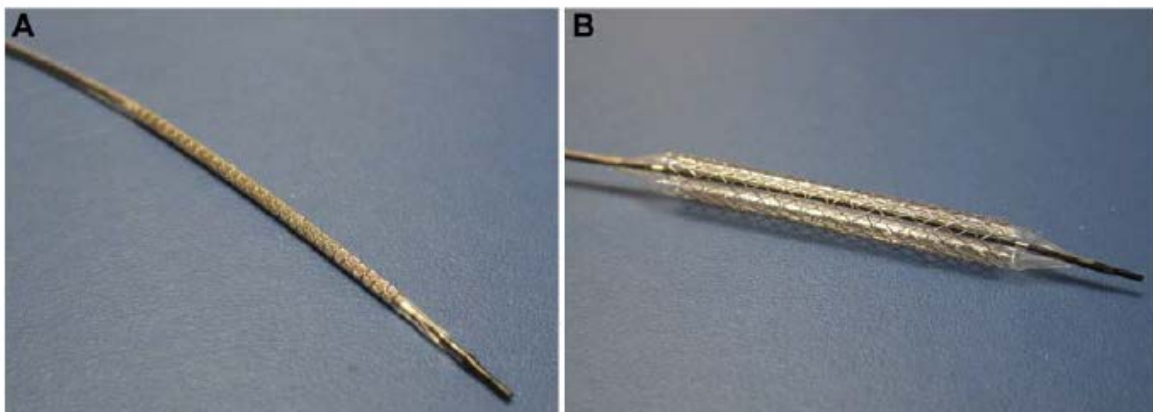


Figura 10 Stent prima e dopo l'espansione.

Per eliminare il rischio di gravi embolie polmonari, è necessario diagnosticare la *trombosi* nel minor tempo possibile. I primi segnali che fanno presagire la presenza di un trombo sono molto soggettivi e variano da paziente a paziente (rossore, cianosi, dolore spontaneo ed edema). Per prima cosa in casi sospetti, il medico effettua un test di compressione che permette di stabilire se la vena collassa o meno (infatti una vena completamente comprimibile non presenta trombi). Tuttavia, per vene più profonde ciò non basta e si effettua un'indagine più specifica con tecniche diagnostiche quali l'ecocolordoppler e il power-doppler. Nelle 24 ore successive alla diagnosi e prima dell'intervento chirurgico, è importante somministrare al paziente farmaci contenenti alte dosi di eparina. L'eparina infatti, essendo un anticoagulante, evita la formazione di un'ulteriore accumulo di placca nella già presente occlusione, minimizzando la possibilità di un distaccamento della placca trombotica dalla parete.

Come già accennato nel paragrafo 1.1.3, l'*ischemia vascolare* se non viene diagnosticata in tempo può portare alla morte improvvisa del paziente.

Le tecniche diagnostiche utilizzate per indagare sul quadro clinico dell'attività cardiaca compromessa dalla presenza di una di queste patologie sono varie:

- **Elettrocardiogramma:** riproduzione grafica dell'attività elettrica del cuore durante il suo funzionamento, registrata dalla superficie del corpo.
- **Ecocardiografia:** tecnica diagnostica sempre più utilizzata in ambito cardiologico (non invasiva) che si basa sull'utilizzo di ultrasuoni (in un intervallo di frequenza compreso fra 2 e 10 MHz) e che permette di visualizzare la morfologia e il funzionamento del cuore.
- **Ecografia Doppler:** tecnica non cruenta e non invasiva utilizzata in medicina per lo studio della situazione anatomica e funzionale dei vasi sanguigni, arteriosi e venosi, e del cuore in tempo reale ed in maniera contemporanea (Duplex-Scanner). Essa sfrutta la velocità di trasmissione di ultrasuoni nei tessuti.
- **Angiografia:** rappresentazione a scopo diagnostico dei vasi sanguigni o linfatici del corpo umano tramite una tecnica che prevede l'infusione di un mezzo di contrasto idrosolubile all'interno dei vasi e la generazione di immagini mediche.

Come per l'aneurisma, anche per la cura di tali patologie si procede con un intervento chirurgico che prevede l'utilizzo di stent e la somministrazione di farmaci anticoagulanti e antiaggreganti. Gli stent funzionano molto bene per vasi di grosso calibro (con un diametro > 6mm) e meno efficacemente per vasi con piccolo lume.⁹ I sostituti vascolari di piccolo calibro rappresentano la maggior parte della domanda e si sono rilevati generalmente inadeguati a causa della formazione di nuovi aneurismi, infezioni, ateromi e trombosi. Queste problematiche sono causate principalmente dalla diminuzione della velocità del flusso del sangue presente nei piccoli vasi, che porta a zone di accumulo e ristagno.⁹

In alternativa all'inserimento di una protesi vascolare si può effettuare un intervento che prevede l'utilizzo di un *bypass* (Fig. 5): viene interposto un altro vaso che è collegato a monte e a valle dell'ostruzione. Si crea così un percorso alternativo per il sangue che scorrerà nel nuovo percorso proprio per la riduzione della resistenza del nuovo vaso.⁸

I materiali che sono utilizzati per la realizzazione del *bypass* possono essere di vario tipo: provenienti dal paziente stesso (spesso viene prelevato un tratto della vena safena o dell'arteria mammaria), materiale crioconservato (da donatore cadavere opportunamente decellularizzati) oppure materiali sintetici (soprattutto in Dacron e Gore-Tex).

Le complicanze legate a questo tipo di trattamento endoprotesico possono essere causate da fattori direttamente inerenti la protesi, a errori dell'operatore e a fattori correlabili all'anatomia del paziente. Quelle più frequenti sono: la migrazione, la rottura della protesi, la separazione tra i vari segmenti nelle protesi modulari, l'occlusione e la stenosi della protesi. Inoltre l'inserimento della protesi crea problemi emodinamici causati dal mancato allineamento e dalla "compliance mismatch" tra graft e arteria.

In definitiva, la scelta del tipo di intervento da applicare al paziente spetta al chirurgo, dopo aver accuratamente analizzato il quadro clinico del paziente.

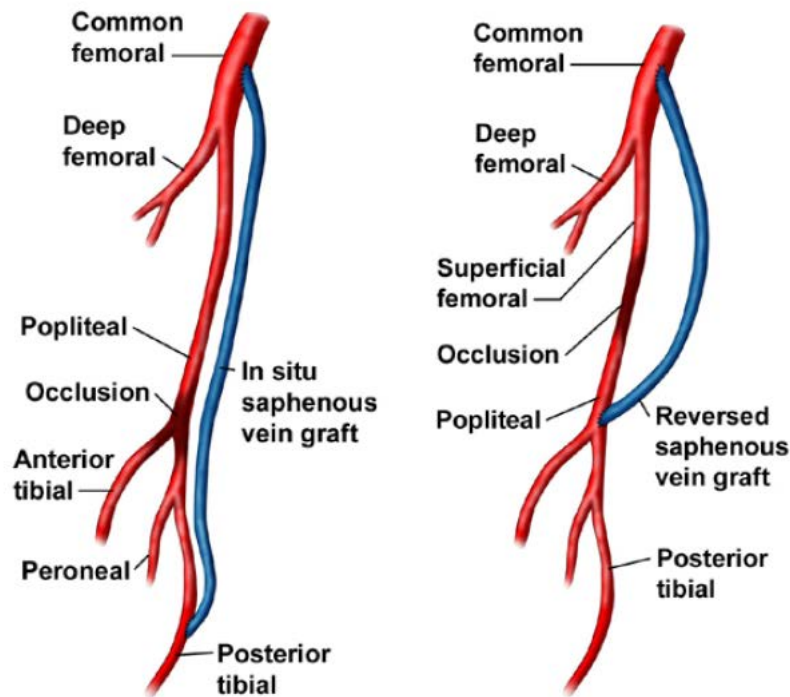


Figura 11 Esempi di posizionamento di bypass in seguito ad occlusioni di vasi sanguigni.

Riassumendo, le principali problematiche correlate alle soluzioni cliniche attuali sono:

- Invasività dell'intervento chirurgico.
- Occlusione delle protesi (soprattutto in vasi di piccolo calibro) con formazione di aneurismi, ateromi e possibili trombi.
- Terapia anticoagulante a vita.
- Risposta infiammatoria dovuta all'inserimento di materiali estranei all'organismo del paziente.
- Problemi emodinamici dovuti alle diverse proprietà meccaniche tra protesi e tessuto nativo.

I problemi correlati all'impiego di protesi vascolari sono molteplici soprattutto per quanto riguarda vasi con diametri inferiori a 6mm. Quindi i sostituti che sono stati utilizzati si sono rilevati inadeguati.⁹ In questo contesto si colloca l'ingegneria dei tessuti con l'obiettivo di superare i limiti qui esaminati.

1.2 Ingegneria dei tessuti

Il termine Tissue engineering è stato introdotto per la prima volta dagli organizzatori del Isth Congress NSF nel 1988 per identificare “l'insieme dei principi e dei metodi delle scienze mediche ed ingegneristiche atti a stabilire le relazioni fondamentali tra struttura e funzioni di tessuti sani o patologici di mammiferi”. Nel tempo il concetto di ingegneria dei tessuti ha subito notevoli evoluzioni passando attraverso molteplici definizioni continuamente arricchite e perfezionate. Le definizioni, riportate nel seguito, introdotte dagli scienziati Langer e Vacanti, racchiudono in maniera completa ed esaustiva i principi essenziali sui quali si fonda tale scienza: “L'Ingegneria dei Tessuti è quel settore interdisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e delle scienze che studiano la vita per lo sviluppo di sistemi in grado di restituire, conservare e migliorare le funzioni del tessuto”¹⁰; “Il suo obiettivo primario è quello di ripristinare le funzionalità dei tessuti mediante l'impianto di elementi “viventi” che siano in grado, in tempi clinicamente accettabili, di diventare parte integrante dell'organismo in cui vengono introdotti, con ridotti margini di insuccesso postimpianto”¹¹.

1.2.1 L'ingegneria dei tessuti applicata ai tessuti vascolari (TEVG)

L'utilizzo di un vaso ingegnerizzato con la capacità di crescere, rimodellarsi, e riadattarsi *in vivo*, senza la necessità di effettuare una chirurgia con tessuti autologhi, ha grossi vantaggi.⁹ Essendo una parte integrata del network vascolare, la TEVG deve rispettare alcuni requisiti di progettazione. Per prima cosa il costrutto tubulare è un condotto attraversato dal flusso di sangue, quindi deve sopportare la pressione esercitata da quest'ultimo senza scoppiare o favorire la formazione di aneurismi. Inoltre, la caduta di pressione del flusso sanguigno lungo la lunghezza dell'innesto, deve essere sufficientemente piccola e le proprietà della superficie luminale devono essere tali da non innescare i meccanismi responsabili della formazione di trombi. Per evitare i problemi attuali associati all'utilizzo di bypass, il costrutto deve possedere una compliance tale per cui non previene la formazione di sollecitazioni elevate ed essere di una geometria compatibile con il flusso sanguigno. Dal punto di vista immunologico invece, il costrutto

deve essere fatto da materiali citocompatibili e biocompatibili in modo da evitare risposte immunogeniche, come un'inflammatione cronica o un'attivazione del sistema immunitario. Infine la TEVG deve essere facilmente manipolata e suturata per poter essere facilmente impiantata.⁹

La generazione di una protesi vascolare ingegnerizzata si basa sulla seguente procedura (Fig. 6):

- Scelta ed espansione *in vitro* della popolazione cellulare estratta dal paziente;
- Scelta dello *scaffold* (supporto strutturale) con architettura, geometria, composizione chimica e superficiale dipendenti dalla tipologia del tessuto che si vuole ricreare;
- Scelta e utilizzo di un bioreattore adeguato che fornisca gli stimoli chimici e fisici, le condizioni sperimentali riproducibili e comparabili a quelle fisiologiche.

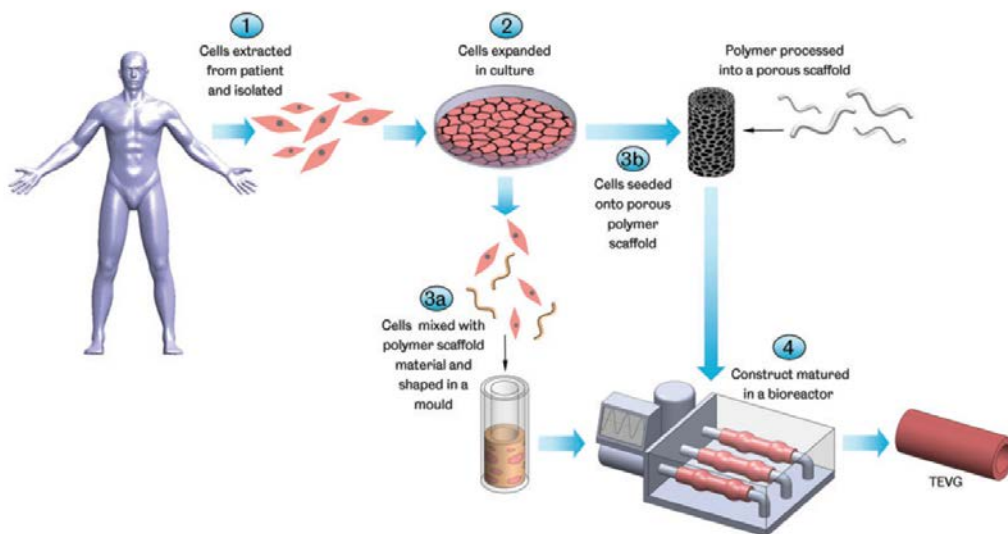


Figura 12 Schematizzazione della formazione di una TEVG con scaffold.

1.2.2 Cellule utilizzate nell'ingegneria dei tessuti

Le cellule che vengono impiegate nell'ingegneria dei tessuti (Tab.3) sono suddivise in due grandi categorie: cellule staminali (SCs), che possono proliferare un numero infinito di volte e differenziarsi in diversi tipi fenotipi a seconda degli stimoli applicati; cellule

autologhe adulte, già differenziate, in grado di duplicarsi un numero finito di volte. Il tipo di cellule utilizzate può influenzare direttamente la struttura, il processo di produzione del vaso e, in definitiva, il suo rendimento in vivo.¹²

Le cellule vascolari autologhe adulte, come le SMC (cellule della muscolatura liscia), le EC (cellule endoteliali) e i fibroblasti, sono state impiegate in molti casi nella creazione di TEVG. Esse possono essere coltivate per lunghi periodi in bioreattori o seminate direttamente su scaffold prima dell'impianto. Nonostante la loro popolarità, l'uso di queste cellule presenta diversi inconvenienti: la loro estrazione richiede biopsie dei vasi sanguigni. Tali tecniche risultano essere invasive e causano morbilità nel sito donatore. Inoltre, in alcuni casi, non è possibile estrarre le cellule a causa della qualità o della disponibilità del vaso. Un altro grosso problema è la limitazione delle capacità rigenerative e riproduttive di queste cellule che riduce i tempi di coltura in vitro e può influenzare la riuscita dell'innesto in vivo. Sebbene siano stati fatti alcuni miglioramenti in tal senso con l'impiego della terapia genica, non sono stati ottenuti i risultati sperati sulle proprietà rigenerative¹³.

Viste le limitazioni che hanno le cellule autologhe, sono stati fatti vari studi per testare il comportamento delle cellule staminali:

- *Cellule progenitrici*: possono essere isolate dal sangue o dal midollo spinale in modo meno invasivo rispetto alle cellule adulte. Hanno capacità proliferative e rigenerative più accentuate. Le cellule progenitrici del muscolo liscio derivate dal midollo osseo ovino hanno prodotto TEVG più forti e più resistenti in vitro rispetto all'utilizzo diretto di SMC vascolari adulti. Inoltre è stato dimostrato che una volta impiantati in vivo, producono più elastina¹⁴;
- *Cellule mononucleari del midollo spinale (MB-MNC)*: possono essere estratte dal midollo osseo e includono al loro interno le cellule mesenchimali e quelle staminali emopoietiche. Un estratto di MB-MNC può generare vari tipi di cellule, tra cui le cellule endoteliali, quelle della muscolatura liscia e i fibroblasti: questa caratteristica è uno strumento prezioso per la ricostruzione di vasi. Per dimostrare il contributo delle MB-MNC all'istogenesi, il gruppo di Matsumura le ha etichettate con fluorescenza verde, seminate su uno scaffold biodegradabile e impiantate nella vena cava inferiore di cane. Dalle analisi immunohistochimiche è emerso che dopo 8

settimane sul costrutto erano presenti sia le cellule endoteliali che quelle della muscolatura liscia. Questi risultati forniscono prove dirette che l'uso di queste cellule consente la creazione di autograft vascolari¹⁵;

- *Cellule staminali mesenchimali (MSC)*: è possibile estrarle dalle cellule mononucleari del midollo spinale, dal sangue e da altri tessuti inclusi quello adiposo, i muscoli e il fegato. Sono in grado di differenziarsi in SMC grazie all'effetto positivo che la stimolazione meccanica ed alcuni fattori di crescita ha su di loro¹⁶. Esse possiedono anche qualità antitrombogeniche permettendo così il loro impiego in TEVG^{17,18};
- *Cellule staminali del tessuto adiposo (ASC)*: tali cellule sono contenute all'interno del tessuto adiposo stesso. Esse sono in grado di differenziarsi sia in SMC che in EC e sono utilizzate come risorsa per l'ingegneria di tessuti vascolari. Le cellule staminali del tessuto adiposo (facilmente reperibile) possono essere estratte in grosse quantità. È stato dimostrato che queste cellule mantengono un alto potenziale di differenziamento e un numero di cellule esoso indipendentemente dall'età del paziente: questo rappresenta un vantaggio visto che i principali pazienti trattati sono anziani.⁹ Zhang e i colleghi hanno dimostrato che l'isolamento delle ASC prelevate da 53 pazienti (50-89 anni) in età avanzata non hanno un impatto negativo sul raccolto delle cellule staminali prelevate; piuttosto, sono stati osservati numeri più alti di cellule staminali nei donatori più anziani (> 70 anni) rispetto ai più giovani.¹⁸
- *Cellule staminali del tessuto muscolare*: queste cellule sono state utilizzate in molti studi di TEVG *in vivo*. Una volta seminate su scaffold e impiantate nell'aorta di topi¹⁹, questi nuovi costrutti si sono ben integrati con i tessuti circostanti e sono state popolate da EC e SMC. Nonostante ci siano risultati soddisfacenti, queste cellule possono essere ottenute solo con una biopsia muscolare, pratica molto invasiva e dolorosa.
- *Cellule staminali dei follicoli piliferi (HF-derived SC)*: i follicoli piliferi (HF) sono organi di piccole dimensioni contenenti cellule di origine ectodermica e mesodermica. Anatomicamente gli HF possono essere suddivisi in 4 regioni: infundibolo, istmo, regione soprabulbare e bulbo. Poiché, per tutta la loro vita, i follicoli piliferi sono sottoposti a molti cicli di crescita, è stato supposto che

contenessero cellule staminali.²⁰ Tuttavia la nicchia che raccoglie tali staminali è stata scoperta solo all'inizio degli anni 90: essa è nel rigonfiamento dell'istmo. Sono state utilizzate per la ricellulizzazione di SIS (biomateriale naturale) e di arterie ombelicali, precedentemente decellularizzate, per la realizzazione di graft vascolari. HF-derived SC sembrano essere simili alle MSC ottenute dal midollo spinale, sebbene con una maggiore capacità di proliferare in coltura. Possono anche avere bassa immunogenicità, mostrando il loro potenziale come cellule allogene²¹.

- *Cellule staminali embrionali (ESC)*: queste cellule sono ottenute dal preimpianto di embrioni durante la fase di blastocisti. Sono classificate tra le migliori cellule utilizzate nella medicina rigenerativa per la loro pluripotenza e plasticità ma la loro applicazione mostra molti ostacoli, soprattutto in Italia, per motivi etici. Alcuni studi scientifici hanno dimostrato la capacità di queste cellule di formare vasi sanguigni impiantabili e tessuto scheletrico vascolarizzato.²² Sono stati fatti alcuni studi su animali ma non ancora sul modello umano.
- *Cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC)*: la creazione di cellule staminali pluripotenti indotte è una delle scoperte biomedicali più importanti dei nostri tempi. È stato dimostrato che anche le iPSC, come le ESC, possono differenziare in una vasta varietà di tipi cellulari a seconda del protocollo che viene applicato. La capacità proliferativa, così come la funzionalità delle cellule vascolari ottenute dalle iPSC sembra dipendere dal tipo di protocollo di differenziamento e dall'origine delle iPSC stesse. Ad esempio, nello studio del gruppo di Hibino le iPSC murine sono state differenziate in fenotipi di SMC ed EC e sono state utilizzate per costruire un TEVG. Tale costrutto è rimasto all'interno della vena cava inferiore del modello murino per 10 settimane dopo l'impianto.²³
- *Cellule non autologhe*: la possibilità di utilizzare cellule non autologhe nell'ingegneria dei tessuti vascolari potrebbe eliminare i problemi con la qualità e la variazione delle cellule associati alla specificità delle cellule del paziente. Inoltre, evitando la coltura cellulare delle autologhe è possibile ridurre i tempi per ottenere i graft. In questo modo infatti, essi risultano immediatamente disponibili e pronti all'uso. Le cellule allogene sono state impiegate con successo in trattamenti per altri tessuti, in particolare per la pelle, in cui i fibroblasti allogeneici del derma sono

stati utilizzati in prodotti approvati dalla FDA, come Apligraf® e Dermagraft®, senza presentare problemi immunologici. L'Heureux e colleghi hanno sperimentato un TEVG prodotto da fibroblasti allogenici nella clinica. Essi hanno dimostrato che nonostante la pervietà sia limitata, non è presente una risposta immunitaria avversa. Va anche notato, tuttavia, che l'uso di cellule endoteliali allogeniche in un TEVG è improbabile a causa della loro elevata immunogenicità.²⁴

Tabella 3: tipi di cellule utilizzate in TEVG

RANGE OF CELL TYPES EMPLOYED IN TEVG DEVELOPMENT			
Cell type	Specific cells	Advantages	Disadvantages
Autologous Somatic Adult cells	Vascular SMCs Vascular Fibroblasts Vascular ECs Dermal Fibroblasts	Proven by a number of groups in TEVG manufacture. In the case of vascular cells, TEVGs comprise the same cells as native blood vessels.	Harvest of vascular cells is invasive and may be limited by vessel quality or availability. Limited replicative and regenerative potential.
Progenitor cells	Bone marrow-derived smooth muscle progenitor cells Vascular EPCs	May be isolated from bone marrow or blood. Compared with adult cells, show greater replicative and regenerative capacity and may be cultured for extended periods to generate more robust TEVGs.	Certain progenitor cells may be depleted in elderly patients.
Natural stem cells	BM-MNCs MSCs Adipose tissue stem cells Muscle-derived stem cells Hair follicle stem cells	Isolated from bone marrow and contain various stem cells. Can generate SMCs, fibroblasts, and ECs. May be extracted from bone marrow, blood, adipose tissue, and liver. Able to differentiate into SMCs. Assist EC colonization of TEVGs. Possess some antithrombotic qualities. May be isolated from adipose tissue biopsies. Able to differentiate into SMCs and ECs. Patient age appears to have little effect on cell numbers and differentiation potential. Some success shown <i>in vivo</i> with seeded TEVGs integrating with the native tissue well. Hair follicles represent an abundant and easily harvested source of stem cells. Can differentiate into SMCs. Greater proliferative potential in culture compared with bone marrow-derived MSCs.	Bone marrow harvest is invasive. Little ability to differentiate into ECs Only early <i>in vitro</i> work reported. Muscle biopsies are invasive and painful. Only early <i>in vitro</i> work reported.
iPSCs	Various adult and embryonic cell sources	Great potential to generate cells for vascular tissue engineering from various adult or embryonic cells.	Differentiated cells produced from iPSCs show varied proliferative potential depending on the original cells used in iPSC generation, highlighting cell source as an important factor.
Nonautologous cells	Allogenic fibroblasts (many other possible cells yet to be explored)	Time taken to expand patients' own cells in culture avoided. Variation in cell quality between patients avoided. Off-the-shelf grafts possible. A wide variety of cell types, both human and animal, may potentially be used.	Potential immunological issues. Regulatory approval may be challenging.

EPCs, endothelial progenitor cells; MSC, mesenchymal stem cells; iPSCs, induced pluripotent stem cells.

1.2.3 Scaffold

Lo scaffold, il cui utilizzo è stato proposto agli inizi del 1990 da Langer¹⁰, è una struttura capace di sostenere la formazione di tessuti bidimensionali e tridimensionali, favorendo l'adesione, la proliferazione e la migrazione cellulare. Esso ha inoltre la funzione di supplire temporaneamente alle caratteristiche funzionali di cui il tessuto in formazione risulta deficitario. Il ruolo dello scaffold è dunque paragonabile a quello della matrice extracellulare *in vivo*.

Per poter impiegare uno scaffold in applicazioni dell'ingegneria tissutale occorre che questo presenti una serie di caratteristiche²⁵:

- *biocompatibilità*: è la non tossicità unita alla capacità di interagire con la risposta immunitaria dell'organismo prevenendo il rigetto e mitigando la reazione infiammatoria o l'incapsulamento.
- *biodegradabilità e bioassorbibilità*: il tempo di degradazione dei materiali che costituiscono l'impalcatura deve essere strettamente coordinato a quello della formazione del nuovo tessuto. Una degradazione troppo rapida della matrice non permette la formazione di un tessuto robusto e completo mentre tempi troppo lunghi inducono la formazione di tessuto attorno allo scaffold imperfetto o incompleto. Quindi regolare in maniera opportuna la degradazione dello scaffold permette al tessuto, da poco formatosi, di sostituire la funzione portante che aveva l'impalcatura.
- *macro e micro struttura*: un modello di scaffold ottimale deve favorire la proliferazione cellulare e la produzione di matrice extracellulare, specifica per le cellule, che dovrebbe sostituire il ruolo di supporto dello scaffold dopo la degradazione di questo. Quindi affinché le cellule riproducano i loro fenotipi originari differenziati, lo scaffold tridimensionale temporaneo deve imitare le funzioni fisiologiche della matrice extracellulare originaria.
- *bioattività*: è la capacità di instaurare un solido legame tra tessuto naturale e biomateriale. È possibile ottenere ciò favorendo non solo le interazioni tra materiali e tessuto biologico ma anche la crescita di quest'ultimo sulla superficie del materiale.
- *porosità*: una elevata porosità dello scaffold, con pori aperti e interconnessi, consente la diffusione, la penetrazione, l'adesione e la proliferazione cellulare. La microporosità ed un'opportuna interconnessione dei pori favoriscono la formazione di una rete di vascolarizzazione (angiogenesi), fattore indispensabile per ottenere un'efficace rigenerazione. La dimensione dei pori dovrà variare in base alla natura del tessuto ed inoltre deve essere tale da garantire un adeguato apporto di nutrienti ed un'efficiente eliminazione delle scorie.

- *proprietà meccaniche*: la stabilità e la resistenza meccanica devono risultare tali da resistere all'impianto e alle condizioni di carico tipiche delle sollecitazioni presenti nei tessuti in vivo. Inoltre, tali proprietà devono offrire al tessuto neorigenerato un ambiente con il corretto livello di sollecitazione.
- *processabilità*: il materiale deve risultare facilmente lavorabile in maniera tale da assumere le caratteristiche morfologiche e dimensionali volute tramite un processo riproducibile.
- *sterilizzazione*: ogni dispositivo da utilizzare in ambito clinico deve essere obbligatoriamente sottoposto a processi di sterilizzazione quindi il materiale utilizzato deve resistere a tali processi senza degradarsi.
- *elevato rapporto superficie/volume*: affinché uno scaffold possa ospitare l'elevato numero di cellule richiesto per sostituire o riparare tessuti, occorre un elevato rapporto tra l'area della superficie interna ed il volume dello scaffold.
- *topografia e chimica di superficie*: la morfologia e la funzionalità chimica della superficie (proprietà che dipende dal materiale) sono aspetti fondamentali per l'adesione delle cellule, la loro migrazione e la segnalazione intracellulare in vitro.

In base al tipo di polimero utilizzato, gli scaffold si dividono in sintetici o biologici (Tab. 4).

Tabella 4 Vantaggi e svantaggi degli scaffold naturali e sintetici.

Pro e contro dei materiali naturali e sintetici per la realizzazione di scaffold per l'ingegneria dei tessuti.		
	Pro	Contro
Materiali naturali (Collagene, fibrina, alginato, etc.)	<ul style="list-style-type: none"> - Biocompatibili, biodegradabili, non tossici o immunogenici - Mimano la matrice extracellulare nativa (struttura, composizione e stimoli effettivi) - Efficiente trasporto dei nutrienti e sottrazione dei prodotti di scarto dalle cellule 	<ul style="list-style-type: none"> - Possibile trasmissione di agenti patogeni - Richiedono modifiche e tecniche di processamento - Proprietà Meccaniche e di degradazione dipendenti dall'applicazione - Variabilità dovuta all'eterogeneità naturale
Materiali sintetici (PGA, PLA, PLGA, etc.)	<ul style="list-style-type: none"> - Relativamente biocompatibili - Facili da maneggiare - Processi di degradazione controllati - Proprietà meccaniche e architettoniche controllabili - Nessun rischio di trasmissione di agenti patogeni 	<ul style="list-style-type: none"> - Necessaria modifica della superficie per migliorare le interazioni cellulari - Proprietà meccaniche e di degradazione influenzate dalle tecniche di processamento - Il processo di degradazione può produrre prodotti di scarto che possono causare reazioni indesiderate o risposte infiammatorie

1.2.3.1 Scaffold polimerici sintetici

La maggior parte degli scaffold impiegati nelle TEVG sono costruiti da polimeri sintetici biodegradabili. Questi polimeri sono degradati dalla scissione idrolitica dei legami estere. Il tasso di degradazione può essere modulato da molteplici fattori, tra cui il peso molecolare, il rapporto superficie-volume e la cristallinità.

Rispetto ai polimeri di natura biologica, come il collagene, i polimeri sintetici sono meno biocompatibili e ostacolano l'attecchimento cellulare, ma garantiscono proprietà meccaniche più prestanti, il che li rende più idonei per la realizzazione di graft sottoposti a pressione arteriosa.²⁶

Uno dei polimeri più studiati è PGA, il materiale utilizzato da Greisler nei suoi primi studi nel 1980. Esso è realizzato attraverso la polimerizzazione ad apertura anulare di glicolide. È un poliesteri che degrada per idrolisi del legame estere, lasciando l'acido glicolico che viene ulteriormente catabolizzato in acqua e anidride carbonica.²⁵ Le proprietà meccaniche e il profilo di degradazione del PGA ne fanno un candidato attraente per l'ingegneria del tessuto vascolare.

L'acido polilattico (PLA) è simile nella struttura al PGA, con l'aggiunta di un singolo gruppo metilico, che lo rende più idrofobo. Pertanto, si degrada più lentamente rispetto a PGA. Il PLA è disponibile sia come miscela racemica che come un enantiomero puro (acido poli-L-lattico [PLLA]), che impiega ancora più tempo a degradarsi. Come il PGA, anche il PLA è stato utilizzato in molte applicazioni cliniche, compresa l'ingegneria dei tessuti.²⁶

Il PLA ha tre forme isomeriche, tra cui il PLLA che è quello più studiato in ambito cardiovascolare. Esso infatti è caratterizzato da una buona resistenza a trazione e una deformazione limitata, sfaccettature importanti in ambito arterioso.

Il policaprolattone (PCL) è un poliesteri alifatico lineare ottenuto per polimerizzazione con l'apertura dell'anello dell' ϵ -caprolattone, utilizzando come catalizzatore l'ottoato stannoso. Esso è uno dei polimeri biodegradabili più idrofobici e resistenti alla degradazione. Confrontando il PCL con i polimeri sopra citati, si rileva che possiede una temperatura di

transizione vetrosa, cioè circa pari a -60°C . Questo significa che tale polimero rimarrà stabile sia a temperatura ambiente che durante la refrigerazione.

Il poliidrossialcanoato (PHA) è un poliestere prodotto da microbi (come i batteri) in condizioni nutritive limitate e con eccesso di carbonio. Il PHA, a differenza degli altri polimeri sintetici, mostra una buona biocompatibilità, motivo per il quale risulta attraente per la costruzione di condotti vascolari. Nonostante esso sostenga l'attecchimento e la proliferazione cellulare, è stato dimostrato che genera una risposta infiammatoria acuta e prolungata.²⁵

Gli scaffold possono anche essere costruiti da copolimeri di due o più componenti, come il copolimero di ϵ -caprolattone e acido lattico (PCLA) e del copolimero dell'acido glicolico e acido lattico (PLGA). Essi sono caratterizzati da proprietà e tempi di degradazione intermedi. Tali proprietà possono essere regolate con precisione variando il rapporto delle componenti dei monomeri. Tuttavia, alcune caratteristiche, come immiscibilità, polimerizzazione ridotta e cristallinità possono causare tempi di degradazione più rapidi.

Alcuni gruppi di studiosi hanno anche testato la degradazione rapida degli scaffold (FD). Tra questi, Wu e i colleghi hanno creato scaffold di poliglicerolo-sebacato (PGS) / PCL elettrofilati impiantati in un modello di aorta di ratto. Essi all'inizio non hanno seminato nessuna cellula e 3 mesi dopo l'interposizione del costrutto nell'aorta addominale del ratto hanno ottenuto i seguenti risultati: lo scaffold è degradato rapidamente, facilitando la formazione di neoarterie con pulsazioni sincrone; strati endoteliali e di muscolatura liscia (con elastina, collagene e glicosaminoglicano) si sono formati mostrando proprietà meccaniche simili a quelle del vaso nativo.²⁷

Il gruppo di Shin' oka²⁸ (Fig. 7) invece ha sviluppato graft vascolari da utilizzare in pazienti pediatrici con problemi cardiovascolari. Infatti, tale tecnica è una soluzione particolarmente adatta nei bambini poiché permette al tessuto di crescere, rimodellarsi e ripararsi in vivo senza dover sottoporre il paziente a più interventi man mano che cresce. In questo studio è stato utilizzato uno scaffold poroso caratterizzato da un copolimero degradabile di poliacrile di poli-L-lattide (PLLA) e poli- ϵ -caprolattone (PCL), rinforzata con poliglicolide (PGA), sul quale sono state seminate cellule autologhe mononucleari del midollo osseo. Tale innesto è stato impiantato come condotto polmonare extracardiaco in pazienti con un solo ventricolo fisiologico. Nella maggior parte dei pazienti, i graft non hanno presentato problemi: nessuna rottura improvvisa, nessuna formazione di aneurisma,

nessuna infezione. Solo per un esiguo numero di casi è stato necessario intervenire con una angioplastica.

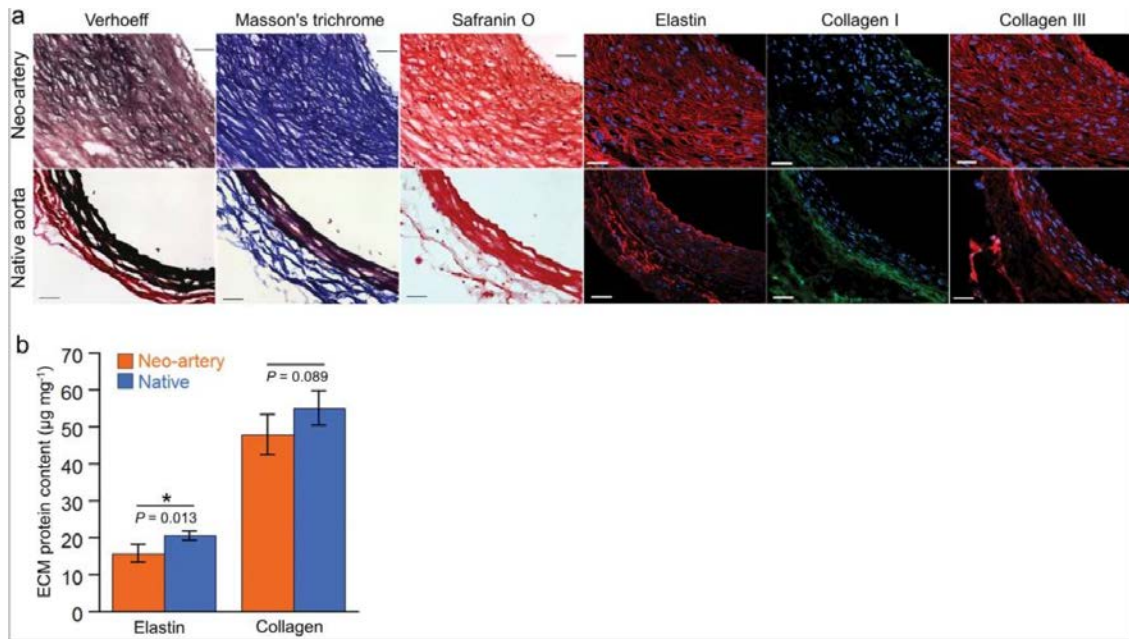


Figura 13: Organizzazione e quantificazione della ECM a 90 giorni nello studio del gruppo di Shin'oka. (a) colorazione Verhoeff, colorazione Masson e colorazione safranina mostrano elastina (nera), collagene (blu) e glicosaminoglicansina (rossa). La colorazione immunofluorescente mostra la distribuzione di elastina (rosso), collagene I (verde) e collagene III (rosso). In alto: espianto giorno 90, in basso: aorta nativa. (b) Quantificazione dell'elastina ($n = 4$) e del collagene totale ($n = 4$). I dati rappresentano la media \pm deviazione standard.

1.2.3.2 Scaffold polimerici biologici

Ci sono una serie di strategie impiegate per la creazione di TEVG che prevedono l'utilizzo di materiali biologici, come proteine e polisaccaridi. I polimeri naturali estratti da fonti animali hanno le componenti della matrice extracellulare maggiormente accurate, motivo per il quale rappresentano una scelta adatta per la realizzazione di scaffold. Infatti, tali tipi di costrutti, a differenza di quelli sintetici, sono più idonei all'adesione cellulare e sono più biocompatibili. Pur non attivando la risposta infiammatoria nel tessuto ospite che contiene tali materiali, le proprietà meccaniche di questi polimeri e il profilo di biodegradazione sono peggiori rispetto ai sintetici.²⁹ I componenti principali della ECM, come il collagene e l'elastina, sono stati maggiormente studiati come materiale da scaffold per la rigenerazione vascolare.

Il *collagene* è la proteina della ECM più abbondante presente nel nostro corpo e ne sono stati identificati di diversi tipi. L'eccellente supporto meccanico fornito da una struttura vascolare di collagene lo rende un materiale sommo per la realizzazione di scaffold. L'ingegneria del tessuto vascolare basata su questo materiale è stata introdotta per la prima volta da Weinberg e Bell nel 1986. Con il passare del tempo, l'integrità degli scaffold a base di collagene è stato migliorato attraverso la modifica della densità e dell'orientamento delle fibre, l'aggiunta di collegamenti incrociati e utilizzando specifiche tecniche di sagomatura.^{30 31} Inoltre è stata utilizzata una stimolazione meccanica durante la coltura in vitro. Il gruppo di Schutte ha dimostrato che, utilizzare un bioreattore per applicare un condizionamento meccanico ciclico, migliora l'organizzazione del tessuto e aumenta significativamente la forza dei graft vascolari a base di collagene.³² Se si effettua una reticolazione degli scaffold di collagene mediante glicazione o radiazione ultravioletta, si ha un miglioramento delle caratteristiche meccaniche dei graft. In un costrutto con collagene inserito in un sistema venoso (caratterizzato da bassa pressione), sono state osservate eccellenti proprietà meccaniche. Per la realizzazione di un sistema arterioso invece, il costrutto in collagene è stato ottenuto attraverso mesh segmentate e microporose in poliuretano (PU). L'agente reticolante più efficiente è il glutaraldeide, tuttavia la sua citotossicità ha portato all'utilizzo di altri cross-linker chimici come dimetilsuberimidato e l'azoturo con gruppi acilici.³³ Tuttavia gli scaffold a base di collagene hanno mostrato una natura più rigida e meno elastica. Gli amminoacidi di scarto derivanti dalla degradazione del collagene risultano essere un potenziale trombogenico e attivano la formazione di coaguli. Inoltre, l'utilizzo di materiale xenogenico o allogenico aumenta il rischio di immunogenicità. Infine l'alto costo del collagene puro ne riduce l'uso nell'ambito della TEVG.²⁵

L'*elastina* conferisce conformità ai vasi sanguigni. Le pareti delle arterie sono ricche di elastina che immagazzina energia elastica e alte sollecitazioni per assicurare un flusso sanguigno uniforme. L'aggiunta di elastina in scaffold di collagene ne migliora le proprietà meccaniche e biologiche. Ryan³⁴ e il suo gruppo di ricerca hanno utilizzato elastina insolubile in combinazione con il collagene come base di uno scaffold biomimetico per l'ingegneria dei tessuti cardiovascolari. In particolare, durante la valutazione meccanica, l'elastina, in dipendenza dalla sua concentrazione, è risultata in grado di ridurre gli sforzi di trazione e compressione, non alterando la microarchitettura dello scaffold e mantenendo

la sua porosità nel range ideale per l'ingegneria dei tessuti. Inoltre, l'aggiunta di elastina ai gel di collagene ha migliorato la capacità proliferativa delle cellule endoteliali mentre ha significativamente inibito l'iperplasia di SMC.

La *fibrina* è un componente ematico fondamentale responsabile dell'emostasi, che è stato ampiamente utilizzato come scaffold di biopolimeri nell'ingegneria dei tessuti. Il vantaggio dell'utilizzo di fibrina sta nel fatto che è isolabile direttamente dal sangue del paziente. Inoltre, questi scaffold permettono livelli alti di proliferazione cellulare, una distribuzione uniforme delle cellule in una struttura tridimensionale e una buona adesione. Gli svantaggi più significativi risiedono nella loro bassa resistenza meccanica e nel loro rapido deterioramento.³⁵

Nell'ambito della rigenerazione del tessuto vascolare, è stata utilizzata la *gelatina* come agente di rivestimento per migliorare l'attaccamento cellulare. Le somiglianze con il collagene, la sua origine naturale e il basso costo sono i principali fattori trainanti che inclinano gli ingegneri dei tessuti vascolari verso la selezione di questo polimero. Inoltre, l'immunogenicità offerta dalla gelatina è molto ridotta e la sua degradabilità è apprezzabile. La gelatina deriva dal collagene denaturando la tripla conformazione elicoidale. I principali amminoacidi che la costituiscono sono la prolina e la glicina, motivo per il quale è molto simile al collagene.³⁶

Per migliorare la stabilità, prolungare ulteriormente il suo tempo di degradazione e migliorare la sua naturale resistenza all'acqua è necessario far reticolare la gelatina.

Uno dei principali svantaggi della gelatina è la sua solubilità; si dissolve a temperature pari o superiori a 37 ° C e diventa gel a temperature più basse, cioè intorno alla temperatura ambiente. Questo limita la sua applicazione in trapianti a lungo termine.²⁵

1.2.3.3 Scaffold naturali decellularizzati

Gli scaffold naturali decellularizzati sono una particolare categoria di scaffold biologici che sfruttano la struttura e le prestazioni meccaniche dell'ECM dei tessuti naturali evitando

qualsiasi reazione immunologica avversa grazie all'eliminazione del materiale antigenico del tessuto nativo. Essi sono stati impiegati come sostituti vascolari in vasi patologici.⁹

Un esempio di applicazione di scaffold decellularizzati è lo studio di Syedain e colleghi³⁷ che hanno impiantato scaffold di tessuto ingegnerizzati decellularizzati all'interno di agnelli e li hanno valutati fino all'età adulta. Al termine dello studio, il peso degli agnelli è aumentato del 366% mentre il diametro e il volume dello scaffold sono aumentati rispettivamente del 56% e del 216%. Con tali risultati è stata dimostrata la crescita somatica di questo scaffold completamente biologico.

La decellularizzazione viene spesso ottenuta mediante processi quali abrasioni meccaniche, digestione enzimatica e applicazione di tensioattivo chimico. Inoltre, la matrice decellularizzata offre i vantaggi legati alla presenza delle proteine ultrastrutturali tridimensionali e alle loro proprietà funzionali. Tali scaffold mostrano una capacità di rigenerazione vascolare superiore, garantendo l'adeguato attecchimento, la proliferazione e la migrazione cellulare.²⁵

Dunque, i vantaggi di questo approccio sono quelli dovuti all'inclusione di una struttura più naturale, contenente proteine funzionali utili per promuovere il reclutamento cellulare. Uno svantaggio invece, è dato dalla possibile risposta immunogenica dovuta agli antigeni delle cellule residue rimaste sulla matrice extracellulare, in seguito al processo di decellularizzazione. Infatti, numerosi studi hanno dimostrato che le tecniche di decellularizzazione non possono rimuovere il 100% del materiale cellulare: è stato definito un valore limite relativo alla quantità di DNA residuo nel tessuto decellularizzato. Affinché il tessuto possa essere ritenuto decellularizzato, la quantità di DNA presente deve essere minore di 50 ng/mg ECM. Sotto questa soglia le probabilità di rigetto o infezioni sono minime ma non nulle.³⁸

Altre due problematiche riguardano la disponibilità e l'adesione cellulare. I vasi destinati ad essere utilizzati come protesi vascolari hanno, solitamente, origine porcina e, non essendo disponibili in grandi quantità, non riescono a soddisfare la elevata richiesta di sostituti vascolari. Infine, si è visto che il tessuto decellularizzato è un ottimo scaffold per l'adesione e la migrazione delle EC, ma che allo stesso tempo presenta difficoltà di semina delle SMC vascolari. Infatti, in vitro, le VSMC tendono a scivolare via dalla parete esterna

dello scaffold e a non aderire. Poiché il vaso sanguigno è anatomicamente composto sia da cellule muscolari che da endoteliali, la situazione di ricellularizzazione ottimale si ottiene in condizioni di co-coltura, cioè seminando EC e VSMC sul lato del lume e sulla superficie esterna dello scaffold rispettivamente.

In figura sono riassunti alcuni dei processi di decellularizzazione (Fig. 8).³⁸

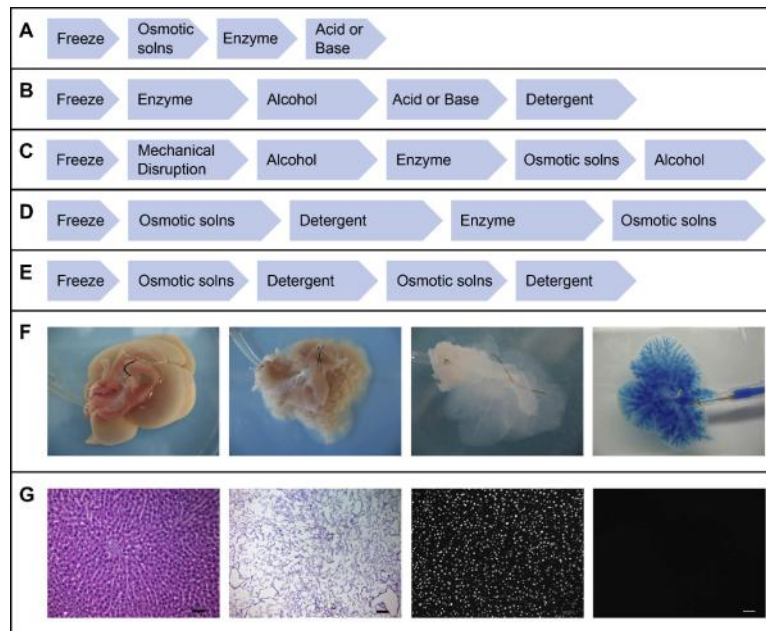


Figura 14: Esempi di protocolli di decellularizzazione per (A) laminati sottili come pericardio, (B) laminati più spessi come derma, (C) grassi, tessuti amorfi come adiposo, (D) tessuti composti o interi organi semplici come la trachea, e (E) interi organi vitali. Le lunghezze delle frecce rappresentano i tempi di esposizione relativi per ogni fase di elaborazione. I passaggi di risciacquo per la rimozione dell'agente e i metodi di sterilizzazione non sono indicati per semplificare il confronto. (F) Immagini rappresentative dell'aspetto grossolano del fegato di ratto intatto sottoposto a decellularizzazione: (da sinistra a destra) prima, durante e dopo la decellularizzazione; fegato decellularizzato perfuso con colorante blu. (G) microfotografie rappresentative che non mostrano colorazione nucleare dopo decellularizzazione di interi organi: (da sinistra a destra) fegato di ratto nativo H & E; fegato ECM decellularizzato H & E; DAPI di fegato di ratto nativo; fegato-ECM DAPI. Le barre della scala sono 50 μ m.

In questo lavoro di tesi sono stati utilizzati scaffold polimerici in PGA/PLLA.

1.2.4 Bioreattori

I bioreattori sono generalmente definiti come dispositivi in cui i processi biologici e/o biochimici si sviluppano in condizioni ambientali e operative strettamente monitorate e controllate.³⁹ Essi possono aiutare la produzione di tessuti funzionali 3D come segue: (1)

mantenendo una concentrazione cellulare uniforme all'interno dello scaffold durante la semina cellulare, (2) controllando i parametri microambientali (es. Temperatura, pH, pressione, tensione dell'ossigeno, metaboliti, molecole regolatorie, shear stress) e i parametri astatici (ad esempio alimentazione, rimozione dei rifiuti), (3) facilitando il trasferimento di massa e, cosa più importante, (4) consentendo un'automatizzazione del processo.⁴⁰ Inoltre, i bioreattori sono tutti quei dispositivi, progettati e realizzati nei laboratori di ricerca di molte parti del mondo per condurre colture cellulari dinamiche, ovvero per sollecitare cellule in coltura mediante l'applicazione di stimoli biofisici controllati e riproducibili.⁴¹ Attraverso l'utilizzo di tali dispositivi si propone di riprodurre in vitro il complesso insieme di sollecitazioni cui i tessuti sono sottoposti durante lo sviluppo in vivo, allo scopo di determinare nei tessuti ingegnerizzati una struttura, e conseguentemente una funzionalità, più simile a quella dei tessuti nativi. È noto infatti, come l'applicazione di stimoli fisici (compressione, trazione, sollecitazione idrodinamica o elettrica, ecc.), alterando la distribuzione e l'organizzazione degli elementi strutturali all'interno ed all'esterno delle cellule, determini la fisiologia cellulare (fenomeni di proliferazione, differenziamento e attività biosintetica) e, ad un livello più alto, l'omeostasi dei tessuti⁴². In questo senso i bioreattori, intesi come sistemi per l'applicazione di stimoli biofisici controllati e riproducibili, rappresentano uno strumento imprescindibile per l'ingegnerizzazione di tessuti funzionali e contribuiscono a superare le limitazioni imposte dalle tradizionali procedure di coltura «statiche».

I modelli tradizionali per lo studio delle risposte cellulari, basati su colture monostrato in piastre di Petri e fiasche, pur essendo semplici, consolidati e poco costosi, consentono un ragionevole controllo delle condizioni di coltura, ma falliscono nel rappresentare in maniera significativa le interazioni tridimensionali e le sollecitazioni biofisiche dell'ambiente di sviluppo nativo. I bioreattori, invece, in quanto strumenti utili ad instaurare e mantenere colture cellulari su scaffold 3D, possono rappresentare ottimi sistemi modello, ovvero «piattaforme altamente funzionali per la presentazione controllata di sollecitazioni microambientali». Tali sistemi risultano di enorme utilità anche per ridurre il ricorso ai modelli animali, che, anche se certamente fedeli dal punto di vista biologico, sono molto costosi, determinano forti implicazioni etiche e offrono un controllo limitato sulle condizioni dello studio per via dell'alta variabilità tra soggetti, nonché una ridotta

possibilità di osservazioni in tempo reale; inoltre, spesso essi non rappresentano in maniera significativa la fisiologia e la patologia umane.⁴¹

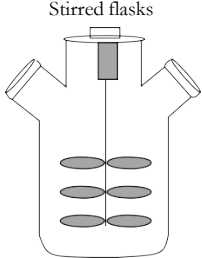
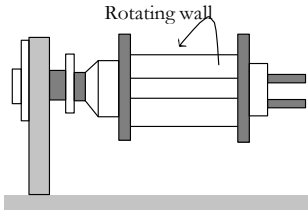
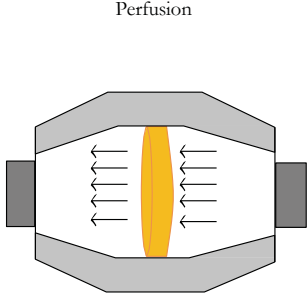
Quindi, per la progettazione di un bioreattore e per il suo impiego nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti è necessario che siano rispettate alcune specifiche di progetto:

- *Citocompatibilità*: i materiali all'interno della camera di coltura, che devono essere a contatto almeno una volta con le cellule o con il medium, devono essere citocompatibili;
- *Affidabilità*: i componenti del bioreattore devono poter essere impiegati per più giorni anche in modo continuativo e senza la continua supervisione dell'operatore;
- *Sterilizzabilità e sterilità*: il bioreattore deve poter essere sterilizzato e mantenere la sua sterilità dall'inizio del suo utilizzo fino alla fine;
- *Conformità con le procedure di laboratorio GMP*: riguarda sia la sicurezza dell'operatore che la pulizia e la decontaminazione del sistema; infatti durante la conduzione di uno studio devono essere adottate tutte le misure atte a garantire la prevenzione dei rischi derivanti dall'utilizzo di reagenti e materiali biologici.
- *Facile impiego e montaggio sotto cappa a flusso laminare*;
- *Versatilità*: possibilità di impiegare lo stesso sistema in applicazioni diverse;
- *No cross-contaminazione*: possibilità di avere una coltura di più campioni in parallelo senza avere cross-contaminazioni;
- *Semina automatica*: prevede un aumento di sterilità del sistema visto che viene meno la necessità di intercessione dell'operatore;
- *Aumento del trasporto di nutrienti e gas dal terreno di coltura ai costrutti ingegnerizzati*;
- *Stimolazione fisica dei costrutti durante il loro sviluppo*;
- *Ingombro ridotto*: compattazione del sistema e minimizzazione dell'ingombro;
- *Automazione e controllo*: il sistema deve essere automatizzato e sottoposto ad un'unità di controllo;
- *Stand-alone*: capacità di mantenere le condizioni di temperature, umidità e pH senza dover essere posti all'interno di un incubatore.

Nella tabella (Tab. 5) che segue sono riassunti le principali caratteristiche dei bioreattori utilizzati nell'ingegneria dei tessuti.

Tabella 5 Tipi di bioreattori e principali caratteristiche.

Table : Comparison of engineering parameters in different TE bioreactors.

Bioreactor type	General descriptions	Mass transfer mechanism	Shear stress	Special usage	Tissue	Considerations
Static culture	Batch culture with no flow of nutrient	Diffusion (high)	Very low	Cell proliferation	—	Homogeneous structure of cell constructs and nutrient diffusion limitations
	Magnetically stirring of medium	Convection (high)	High	Dynamic seeding of scaffolds	Cartilage	Appropriate scaffold and balance between increasing mass transfer and modulating shear stresses
	Rotating at a speed so the constructs in the reactor are maintained "stationary" in a state of continuous free fall	Convection (high)	Low	Tissue constructs which need dynamic laminar flow	Cartilage, bone and skin	Operating conditions (e.g., speed of rotating) especially for growing large tissue mass
	Flow of medium over or through a cell population or bed of cells	Convection (moderate) and diffusion (high)	Moderate	Tissues physico-chemically and environmentally relevant to human tissues	Epithelial cells, intestinal, bone, cartilage, and arteries	Seeding and attachment of human cells especially within the scaffold body

In questo lavoro di tesi è stato utilizzato un bioreattore con una camera in cui è alloggiato mandrino roteante: il dispositivo consente la semina e la coltura confinata su entrambe le superfici di una matrice tubolare posta sul mandrino. Con questo tipo di apparato si ha la possibilità di: permettere una rotazione del mandrino, e conseguentemente dello scaffold, intorno al proprio asse longitudinale; esporre il costruito alternativamente alla fase liquida e gassosa; mischiare il medium (Fig. 9).

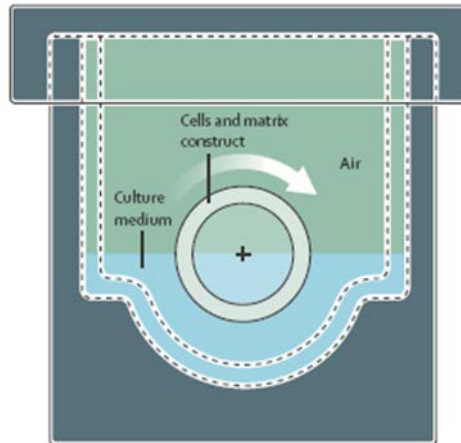


Figura 15: schematizzazione delle proprietà della camera di coltura usata in questo lavoro di tesi.

Infine, grazie al doppio accesso alla camera è possibile impermeabilizzare la matrice tubolare.

1.3 Obiettivo

In questo capitolo è stato fatto un quadro generale in cui si inserisce questo lavoro di tesi: si cercherà di affrontare i problemi collegati alle patologie vascolari in vasi di piccolo calibro (diametro < 5 mm) tramite l'applicazione dell'ingegneria tissutale.

In particolare, l'obiettivo di questo lavoro è quello di creare un coating polimerico per impermeabilizzare il lume di scaffold polimerici tubolari porosi applicabili per l'ingegnerizzazione di vasi di piccolo calibro.

A tal scopo, si svilupperà un coating di gel impermeabilizzante che da un lato permette una eventuale adesione cellulare e dall'altro sia in grado di rendere impermeabile la superficie dello scaffold tubolare poroso. Tale processo avrà il compito di garantire la messa in perfusione di quest'ultimo.

Una volta realizzato il gel, esso sarà caratterizzato meccanicamente attraverso prove di compressione non confinata e prove di degradazione.

Successivamente, si testerà l'impermeabilità del coating polimerico, inserito nel lume dello scaffold realizzato, attraverso un circuito a perfusione continua.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Bioreattore utilizzato

Il bioreattore utilizzato in questo lavoro di tesi è l'*InBreath*. Esso è un bioreattore adeguato alla rigenerazione di organi tubolari quali trachea/bronchi, vasi sanguigni, esofago e intestino (Fig. 10), prodotto da Harvard Apparatus–Regenerative Technology in collaborazione con il Politecnico di Milano (Sara Mantero e M. Adelaide Asnaghi) e l'università di Barcellona.⁴³ Si tratta di un bioreattore a doppia camera progettato per la semina e la coltura cellulare su entrambe le superfici (interna ed esterna) dello scaffold tubolare ed è caratterizzato da un movimento rotazionale attorno all'asse longitudinale del mandrino. Infatti, esso, non solo semplifica la procedura di semina cellulare e migliora lo scambio di ossigeno tra le cellule, ma conferisce anche gli stimoli idrodinamici necessari per simulare *in vitro* l'ambiente in cui si trovano le cellule *in vivo*.

L' *InBreath* è formato principalmente da tre componenti⁴⁴:

- La camera di coltura polimerica, in cui alloggia il costrutto. La presenza del mandrino, che collega la camera al motore, permette alla camera di essere facilmente rimossa dal motore (per esempio in fase di posizionamento del costrutto).
- Un motore a corrente continua che mette in rotazione il mandrino.
- Un'unità di controllo posizionata esternamente all'incubatore che permette di variare la velocità di rotazione senza influenzare le condizioni ambientali di coltura.

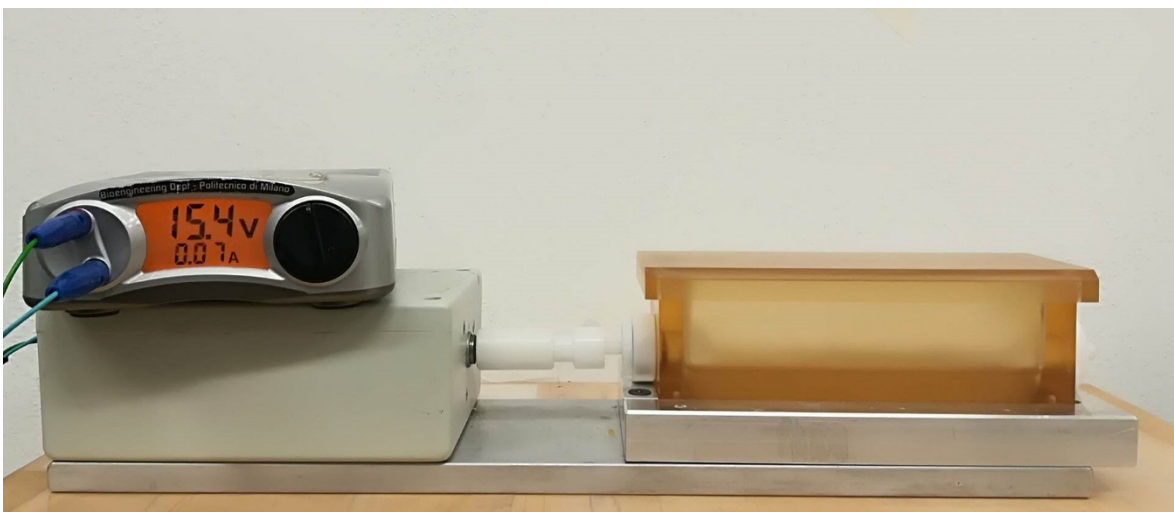


Figura 16 Elementi principali del *InBreath*

Per il mantenimento della sterilità in condizione di coltura, è stato utilizzato un coperchio di tipo *Petri-Like*.

Una particolarità dell'*InBreath* è la sua modularità. Infatti, a seconda dell'applicazione in cui viene impiegato è possibile scegliere la forma del mandrino e gli afferraggi adatti.

In questo caso, visto che stiamo trattando vasi di piccolo calibro, è stato scelto un mandrino di diametro interno di 2,5 mm e diametro esterno di 5 mm. Esso è caratterizzato dalla presenza di fori da 0.1 mm posti a 0.5 mm di distanza l'uno dall'altro (Fig. 11).



Figura 17 Mandrino per vasi di piccolo calibro

Il mandrino è collegato attraverso un attacco che prevede il principio del Luer-Lock all'albero del motore (Fig. 12). In questo modo il moto rotatorio dettato dal motore a corrente continua viene trasferito interamente al mandrino (mandrino e albero solidali) indipendentemente dal senso di rotazione imposto dal motore.

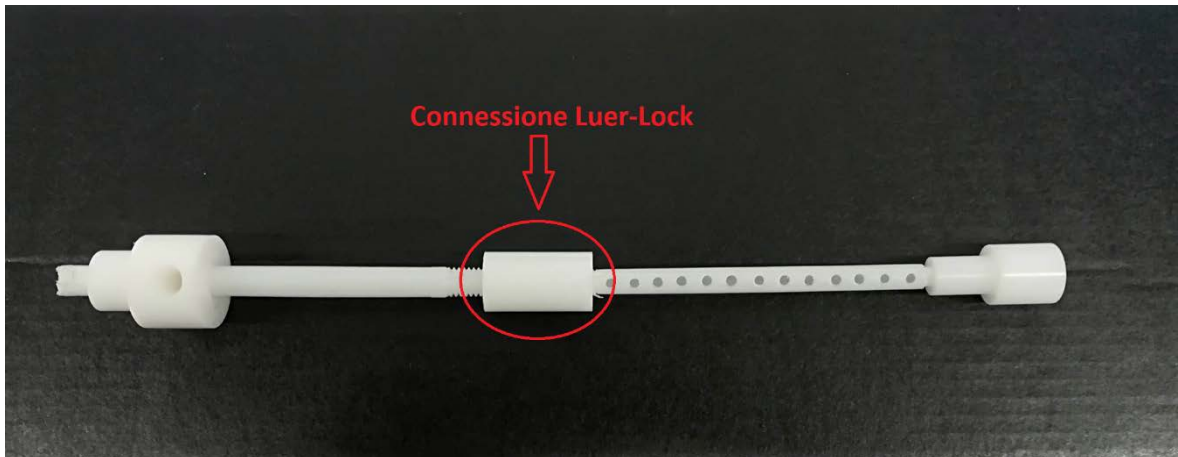


Figura 18 Mandrino collegato con cavo coassiale attraverso connessione Luer-Lock

Infine, grazie alla particolare forma del mandrino, è possibile seminare le cellule su entrambe le superfici dello scaffold tubolare. Esso infatti, presenta un condotto coassiale collegato all'ambiente esterno per mezzo di due orifici, uno collocato sulla parete della camera di coltura e l'altro, posto sull'albero cilindrico cavo sullo stesso lato del motore rotativo (Fig 13). Questo tipo di configurazione è utile anche per l'iniezione simmetrica del gel effettuata per l'impermeabilizzazione dello scaffold. Infatti, attraverso i due accessi, è più semplice garantire l'uniformità del gel lungo tutta la superficie interna dello scaffold.

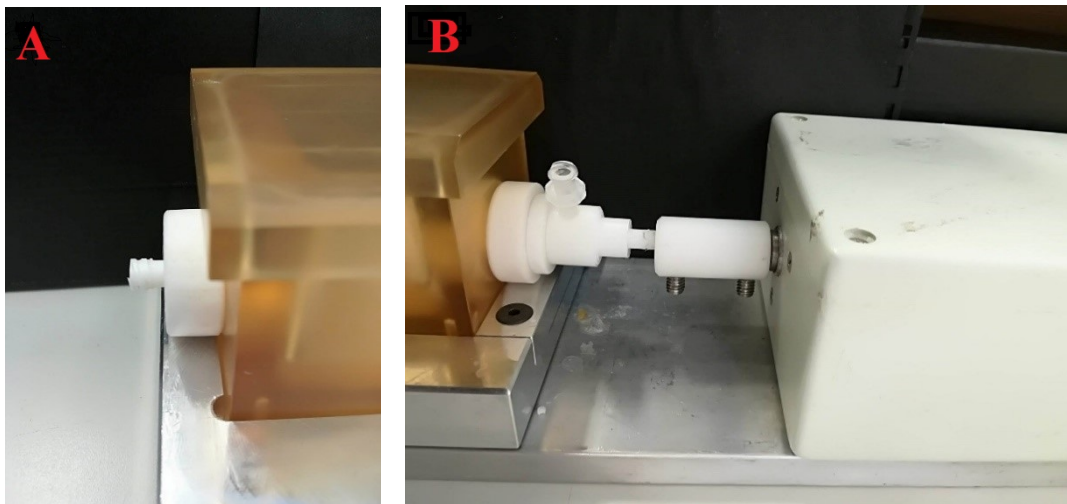


Figura 19: orifici per accedere alla camera dalle due estremità.

Per poter impermeabilizzare scaffold di lunghezza inferiore a quella massima consentita (65 mm) sono stati realizzati una serie di porta scaffold caratterizzati da lunghezze

differenti che coprono i fori presenti sul mandrino stesso evitando la fuoriuscita del gel nella camera di coltura. Per la realizzazione di questi cilindri è stato prima effettuato un disegno attraverso il software Solidworks 2017 (Fig. 14).

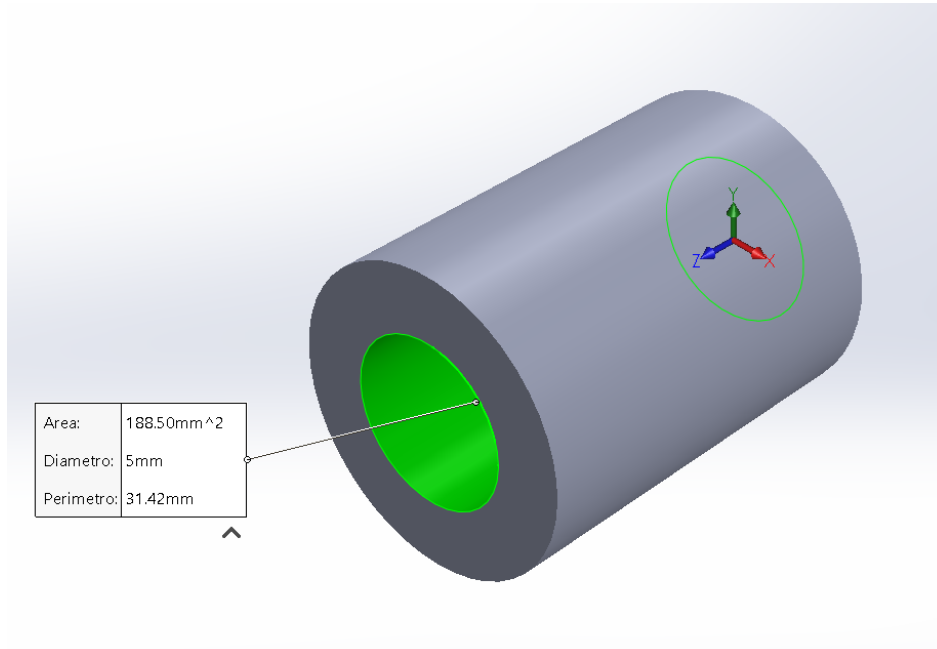


Figura 20 Disegno di uno dei modelli cilindrici ottenuti con Solid Works 2017

I disegni ottenuti sono stati stampati per mezzo di filamenti di PLA (di spessore 1.75 mm) attraverso la stampante 3D Prusa i3. I cilindri hanno tutti un diametro interno di 5 mm (uguale a quello esterno del mandrino del bioreattore) e lunghezza variabile (12 mm e 23,65 mm) (Fig.15-16).

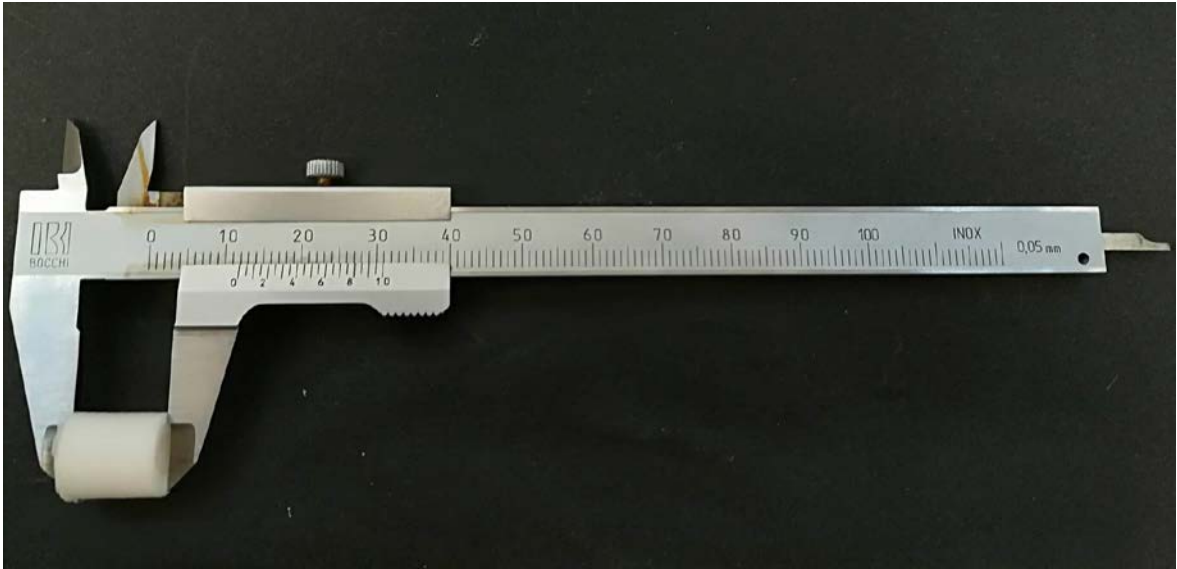


Figura 21 Cilindro di lunghezza 12 mm



Figura 22 Cilindro di lunghezza 23,65 mm

I componenti necessari per il coating tubolare sono rappresentati nella figura successiva (Fig. 17).

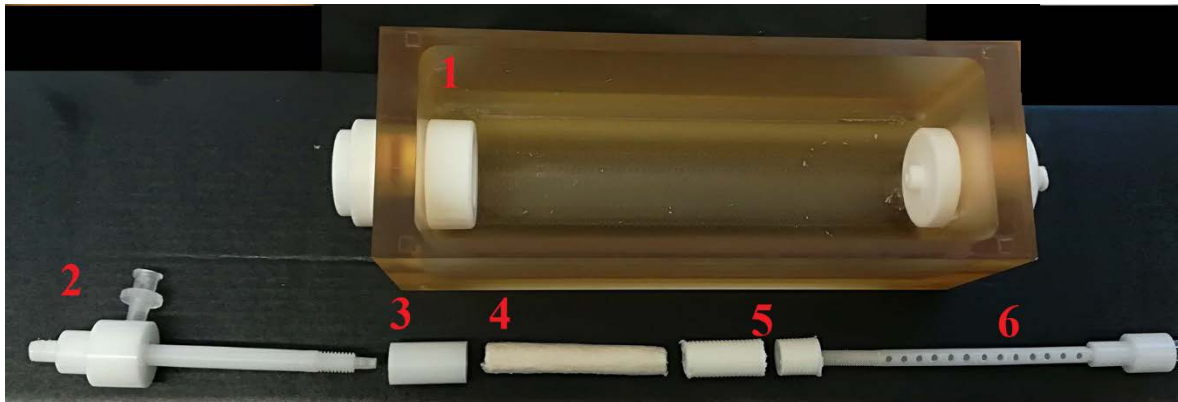


Figura 23 Componenti utilizzati per il coating tubolare: 1) Camera di coltura; 2) Cavo coassiale legato al motore con primo ingresso alla camera di coltura; 3) Connettore Luer-Lock; 4) Scaffold tubolare in PGA/PLLA; 5) Cilindri per coprire i porti del mandrino; 6) Mandrino.

La camera di coltura con tutti i pezzi montati è nella figura che segue. (Fig. 18)

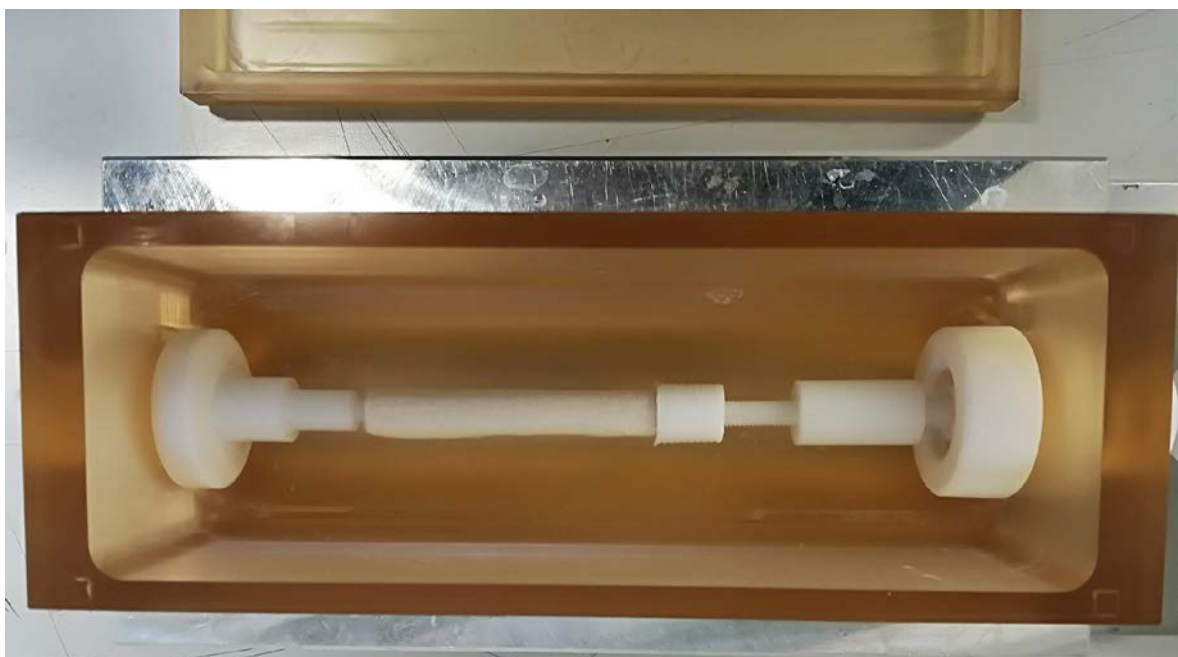


Figura 24 Camera di coltura dell'InBreath montata.

2.2 Scaffold utilizzato

È stato utilizzato lo scaffold 20/80 PGA/PLLA biofelt non woven. Esso è di derivazione sintetica, facilmente lavorabile e prodotto a livello industriale.

La struttura di base del polimero è formata da fibre di acido poliglicolico (PGA) e fibre di acido poli-L lattico (PLLA).

In questo lavoro di tesi si è scelto di utilizzare uno scaffold tubolare poroso di PGA/PLLA caratterizzato da una lunghezza variabile (da 3 cm a 5 cm), un diametro interno pari a 9 mm e uno spessore di 3 mm (Fig. 19).



Figura 25: Scaffold in PGA/PLLA.

Questo scaffold è biorassorbibile e la struttura è definita “felt-like”, ottenuto sia da un processo di cardatura (per rendere le fibre parallele) sia da un processo ad ago-punzone, che permette una perfetta integrazione delle fibre polimeriche non-woven nel materiale di feltro coesivo. Questo tipo di struttura offre molteplici vantaggi: la superficie per l'adesione cellulare è ampia e ha una elevata densità di pori. Infatti, è stato dimostrato che scaffold altamente porosi sono in grado di promuovere una rapida adesione e proliferazione cellulare, formando in poco tempo strutture tridimensionali altamente organizzate di tessuto.⁴⁵ Questo copolimero è spesso usato come scaffold nella vascular

tissue engineering (VTE) per le sue buone proprietà meccaniche e l'elevata porosità che induce l'adesione delle VSMC e delle EC.

2.2.1 Impermeabilizzazione dello scaffold

Per potere inserire lo scaffold tubolare poroso in un circuito a perfusione è necessario renderne impermeabile la superficie del lume in modo tale che il fluido non fuoriesca attraverso i pori. In questo caso, si è pensato a un coating di gel fatto di alginato e gelatina con uno spessore pari a 1.5 mm.

2.3 Sintesi del gel

Il gel viene prodotto utilizzando due composti in diverse percentuali:

- Alginato 8% w/v (A7003, Sigma Aldrich). L'alginato è un polisaccaride naturale che, grazie alla sua eccellente biocompatibilità e biodegradabilità, viene utilizzato in numerose applicazioni e ricerche in ambito biomedico. È un polisaccaride anionico e idrofilico ottenuto da alghe brune e batteri. Esso è formato da residui di due monosaccaridi (acido D-mannuronico e acido L-guluronico). Due blocchi di catene polimeriche adiacenti possono essere reticolati con cationi polivalenti (ad esempio Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+}) attraverso interazioni con i gruppi carbossilici, favorendo la formazione di un gel reticolato (Fig. 20).⁴⁶

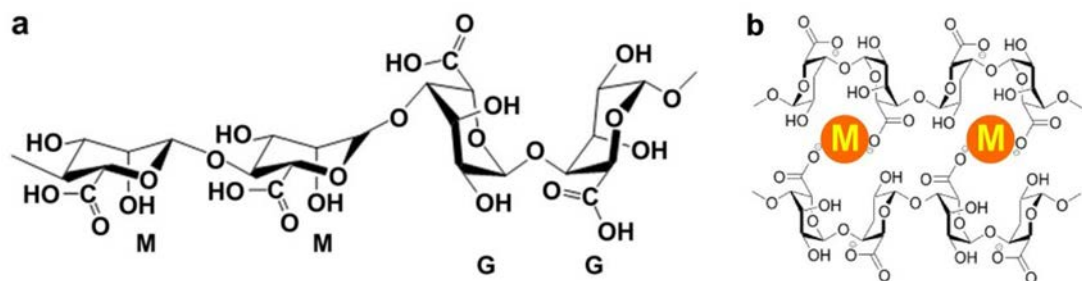


Figura 26: a) struttura chimica dell'alginato; b) meccanismo di interazione ionica tra alginato e cationi polivalenti.

Per ottenere il gel di alginato si miscela la polvere di alginato con acqua deionizzata (dH_2O), si aggiunge 300 mM di sodio carbonato ($NaHCO_3$, 71692, Sigma Aldrich) e 40 mM di idrossido di sodio ($NaOH$, S5761, Sigma Aldrich) per ottenere un pH circa pari a 7 compatibile con la vitalità cellulare. Si ripone la soluzione così ottenuta su un agitatore magnetico e solo quando quest'ultima risulta omogenea e senza grumi è possibile rimuovere il becker dalla piastra agitante.

La concentrazione della polvere di alginato scelta in questo lavoro di tesi è 8 % w/v.

- Gelatina al 6% w/v (G9391, Sigma Aldrich). La gelatina è un polimero ampiamente utilizzato nell'industria biomedica, farmaceutica e alimentare. Si ottiene dalla denaturazione del collagene, tramite la rottura delle strutture a tripla elica in molecole a singolo filamento utilizzando processi di idrolisi acida (gelatina di tipo A) o basica (gelatina di tipo B). Le due diverse gelatine possiedono differenti profili di rilascio dei fattori di crescita cellulare. Rispetto al collagene, la gelatina è meno immunogenica, pur conservando i gruppi funzionali presenti nel collagene che promuovono l'adesione, la migrazione, il differenziamento e la proliferazione cellulare⁴⁷. In questo lavoro di tesi è stata utilizzata la gelatina di tipo B ottenuta da pelle bovina.

Come per l'alginato, per ottenerne il gel, si miscela la polvere di gelatina con acqua deionizzata (dH_2O) e la si pone su un agitatore magnetico a 40° C. Solo quando la miscela risulta omogenea si rimuove dalla piastra agitante.

La concentrazione della polvere di gelatina scelta è al 6% w/v.

Sono state realizzate cinque tipologie di gel composte da differenti percentuali di alginato e gelatina per valutare l'effetto impermeabilizzante dell'alginato e quello adesivo della gelatina complessivamente:

- ✓ 10-90: soluzione formata al 10% da alginato 8% e al 90% da gelatina 6%
- ✓ 30-70: soluzione formata al 30% da alginato 8% e al 70% da gelatina 6%
- ✓ 50-50: soluzione formata al 50% da alginato 8% e al 50% da gelatina 6%
- ✓ 70-30: soluzione formata al 70% da alginato 8% e al 30% da gelatina 6%
- ✓ 90-10: soluzione formata al 90% da alginato 8% e al 10% da gelatina 6%

Una volta preparate le soluzioni di alginato e gelatina, si procede con la sintesi del gel (Fig. 21).

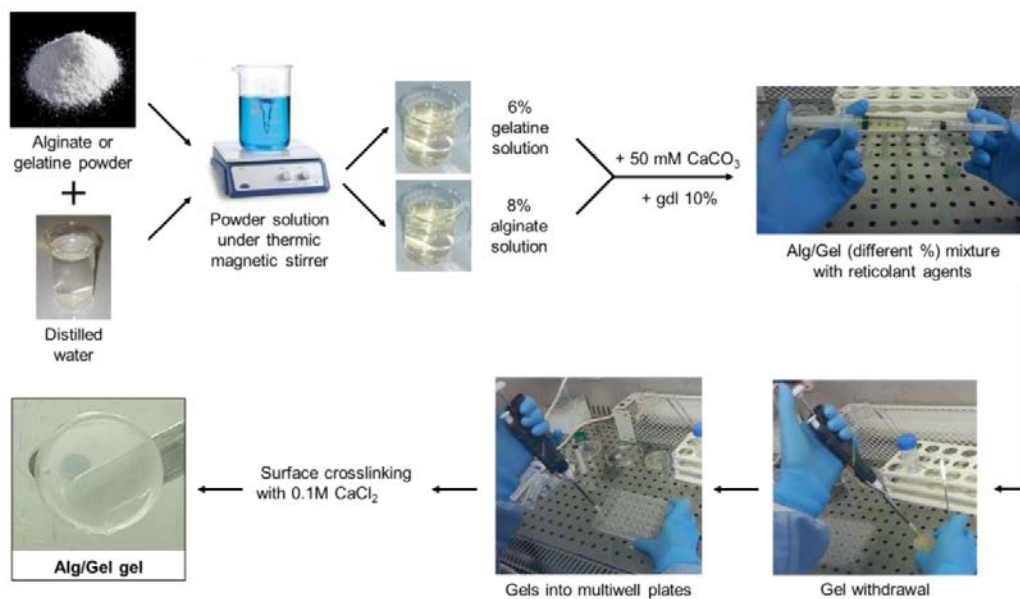


Figura 27 Processo di preparazione del gel Alginato/Gelatina

I reagenti utilizzati per la reticolazione del gel sono:

- 1) Calcio Carbonato ($CaCO_3$, C4830, Sigma Aldrich) 50mM in acqua deionizzata. Il $CaCO_3$ funziona da agente reticolante, rilasciando ioni Ca^{2+} che favoriscono la reticolazione delle catene polimeriche.
- 2) Glucono- δ -Lattone (GDL , G4750, Sigma Aldrich) al 10% in acqua deionizzata. Il GDL abbassa il pH della soluzione: poiché il $CaCO_3$ non è solubile in acqua a pH neutro, l'aggiunta di GDL favorisce la dissociazione di ioni Ca^{2+} .

- 3) Calcio Cloruro ($CaCl_2$, 499609, Sigma Aldrich) 0.1M. Il $CaCl_2$ è funzionale alla seconda reticolazione delle catene polimeriche presenti nell'alginato grazie al rilascio di ioni Ca^{2+} .

La procedura utilizzata per la creazione del coating prevede:

- 1) Miscelare le soluzioni di Alginato 8% e Gelatina 6% nelle percentuali desiderate (10-90, 30-70, 50-50, 70-30, 90-10);
- 2) Miscelare la soluzione ottenuta con la sospensione di $CaCO_3$ 50 mM;
- 3) Miscelare il composto con la soluzione di *GDL* 10% del volume;
- 4) Prelevare il volume di soluzione tale per cui si formino dei campioni di gel con spessore pari a 2 mm e inserirlo nella multiwell (Fig. 22);
- 5) Posizionare il gel in frigorifero overnight per far reticolare il gel;
- 6) Eseguire la seconda reticolazione dei campioni con la soluzione di $CaCl_2$ 0.1M in rapporto 1:1 rispetto al volume di gel per 10 minuti circa.

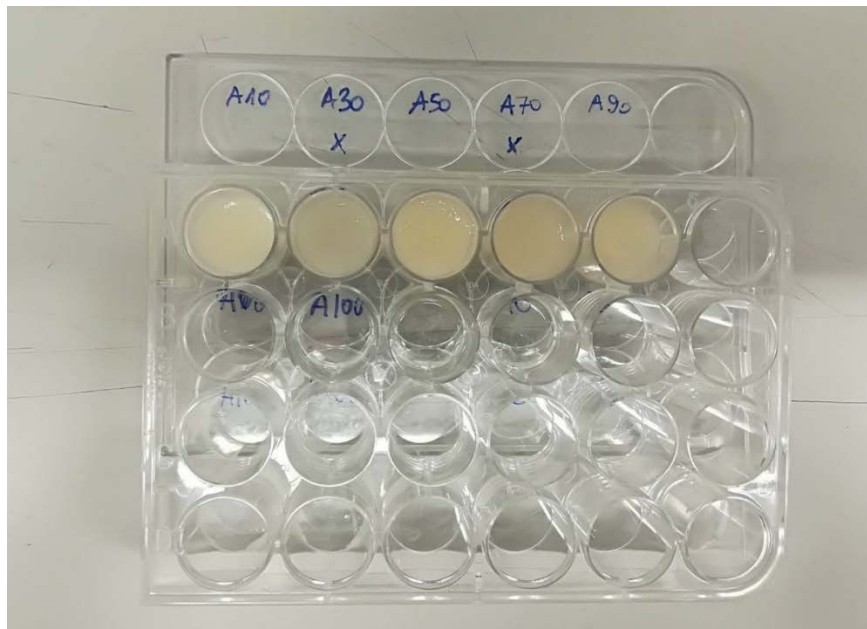


Figura 28: Campioni di differenti classi alloggiati in una Multiwell

2.4 Caratterizzazione del gel

Per la caratterizzazione del gel sono state eseguite prove a compressione non confinata e prove di degradazione.

2.4.1 prove meccaniche a compressione non confinata

Le prove UC consentono la deformazione del provino in direzione radiale e la conseguente essudazione di fluido nella medesima direzione (Fig. 23). Queste prove sono utili per determinare il modulo di Young del campione in condizioni stazionarie:

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon_z} \quad (1)$$

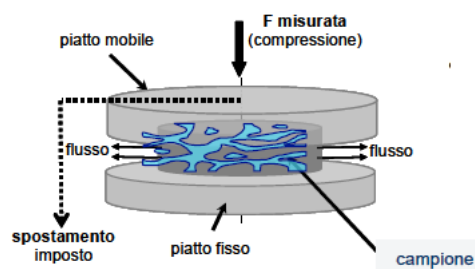


Figura 29: Schematizzazione dell'apparato sperimentale delle prove UC

Sono state eseguite prove di compressione non confinata su 4 campioni di gel (con diametri pari a $d=20\text{mm}$) preparati per le diverse percentuali di alginato e gelatina. È stato osservato il rilassamento successivo allo sforzo: avendo imposto uno spostamento costante sul campione è stata registrata la risposta del materiale in termini di sforzo assiale.

La macchina ad attuazione elettromagnetica monoassiale utilizzata per eseguire le prove di caratterizzazione meccanica è l'EnduraTEC ELF® 3200 (Fig. 24).

Le sue componenti principali sono: l'attuatore meccanico, il trasduttore di spostamento, LVDT (Linear Variable Displacement Transducer), e il trasduttore estensimetrico, ossia la cella di carico. Nella parte superiore della macchina si trova l'attuatore meccanico che trasmette il suo carico tramite il pistone al campione sottostante. Il trasduttore di spostamento invece misura la sollecitazione applicata dall'attuatore con una risoluzione del micrometro. Infine, la cella di carico (posta nella parte inferiore del telaio) misura la forza esercitata sul sistema. La macchina è posta in controllo di spostamento e la forza impiegata sul fondo scala è di 22N.

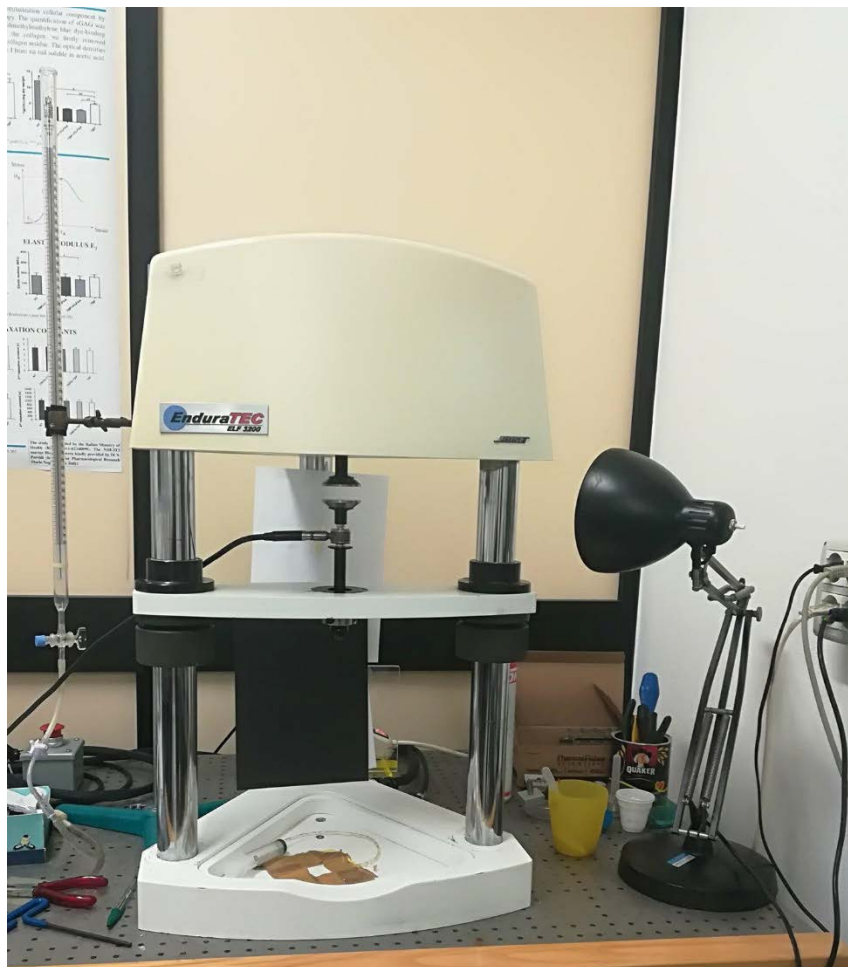


Figura 30: Macchina da prova Enduratec

I segnali acquisiti dalla centralina della macchina vengono inviati al pc ed elaborati grazie ad un software di interfaccia tra operatore e computer: il Wintest® Digital Control System. Esso permette di attuare diversi tipi di test creando svariati protocolli di interesse: per

ciascuna prova vengono inseriti i valori relativi ai vari parametri e, a prova ultimata, è possibile visualizzare i risultati ottenuti.

La prova è stata eseguita secondo la seguente procedura:

1. preparazione dei campioni (nelle 5 composizioni);
2. alloggiamento del campione sul piatto inferiore facendo attenzione a posizionarlo il più possibile in asse con l'attuatore;
3. abbassamento del piatto superiore al fine di arrivare a contatto con il campione (avvalendosi del comando di controllo spostamento della macchina nel canale assiale);
4. Rilevamento dell'altezza del campione;
5. Impostazione di una prova multirampa da 4 cicli di spostamento del piatto superiore in direzione dell'asse di simmetria del provino e con verso tale da comprimerlo: si effettuano le misurazioni considerando uno spostamento del pistone con velocità pari all' 1% dello spessore iniziale. Le deformazioni a cui sono stati sottoposti i campioni sono del 5%, 10%, 15%, 20% dello spessore per un tempo di 120s;
6. Esecuzione della prova in controllo di spostamento;
7. Acquisizione delle misure dal display.

Nella seguente tabella (Tab. 6) vengono riportati i dati utili dei campioni analizzati:

Tabella 6: altezze dei campioni rilevate dalla prova.

Altezza dei campioni [mm]				
A10/G90	A30/G70	A50/G50	A70/G30	A90/G10
10.3	9.1	9.5	9.5	9.7
10.1	8.8	9.9	10.2	11.1
9.9	10.1	10.9	9.6	8.6
9.6	9.01	10.9	10.7	9.1

In fine sono stati preparati dei campioni al 100% di alginato o al 100% di gelatina e sono stati sottoposti a compressione non confinata con la stessa procedura descritta in precedenza.

Nella tabella successiva (Tab. 7) vengono riportati le altezze di questi nuovi campioni:

Tabella 7: altezze dei campioni rilevate dalla prova.

Altezza dei campioni [mm]	
A100	G100
7.38	6.636
	7.38
	8

2.4.2 Analisi dei dati della prova UC

I dati ottenuti dalle prove sperimentali sono stati elaborati con Excel con la seguente procedura:

1. Dai dati ricavati nella prova sperimentale sono state copiate la colonna dei tempi, degli spostamenti e della forza in un foglio di calcolo;
2. Sono stati calcolate le deformazioni attraverso la formula:

$$\varepsilon = \frac{l-l_0}{h} \quad (2)$$

Dove l_0 è la posizione iniziale del campione e h è l'altezza del campione;

3. Sono stati calcolati gli sforzi attraverso la formula:

$$\sigma = \frac{F-F_0}{\pi \frac{d^2}{4}} \quad (3)$$

Dove F_0 è la forza nell'istante iniziale e d il diametro del campione;

4. Sono stati realizzati dei grafici Sforzo-tempo (Grafico 1) per capire l'andamento della prova.
5. Il modulo elastico E di rilassamento per la prima deformazione è stato calcolato come:

$$E = \frac{\sigma_{5\%,valle}}{\varepsilon_{5\%}} \quad (4)$$

Dove $\sigma_{5\%,valle}$ è lo sforzo calcolato alla fine della prima rampa e $\varepsilon_{5\%}$ è pari a 0.05;

6. Successivamente sono stati calcolati i moduli elastici E_i di rilassamento per le altre deformazioni come:

$$E_i = \frac{\sigma_i - \sigma_{i-1}}{\Delta\varepsilon} \quad (5)$$

Dove σ_i è lo sforzo iniziale nell'intervallo di deformazione corrente, σ_{i-1} è lo sforzo iniziale nell'intervallo di deformazione precedente e $\Delta\varepsilon = 0.05$ è la deformazione incrementale.

7. Il modulo elastico E è stato calcolato anche in corrispondenza del primo sforzo di picco σ_{picco} come:

$$E = \frac{\sigma_{5\%,picco}}{\varepsilon_{5\%}} \quad (6)$$

8. Successivamente sono stati calcolati i moduli elastici E_i di rilassamento per le altre deformazioni come:

$$E_i = \frac{\sigma_{picco(i)} - \sigma_{valle(i-1)}}{\Delta\varepsilon} \quad (7)$$

Dove $\sigma_{picco(i)}$ è lo sforzo di picco nell'intervallo di deformazione corrente, $\sigma_{valle(i-1)}$ è lo sforzo iniziale nell'intervallo di deformazione precedente e $\Delta\varepsilon = 0.05$ è la deformazione incrementale.

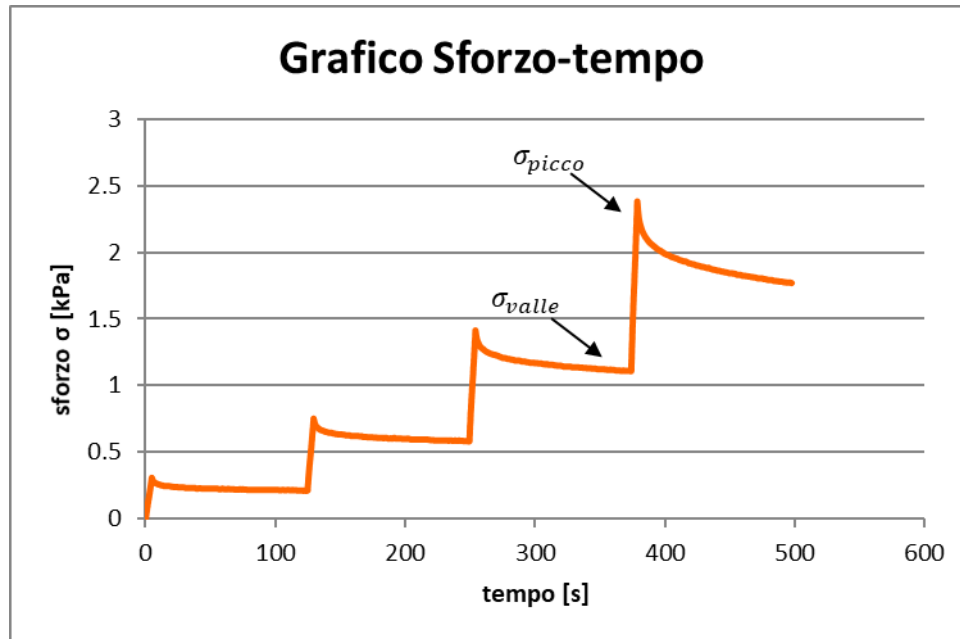


Grafico 4: Esempio di grafico Sforzo-tempo di un campione 70A/30G.

2.4.3 Prove di degradazione

I gel polimerici sono materiali in grado di assorbire un'enorme quantità di soluzione e di gonfiarsi (swelling).

È di fondamentale importanza capire se il gel immerso nel PBS è stabile per tutta la durata di una coltura dinamica o se invece subisce un processo di degradazione.

Le prove di degradazione sono state eseguite secondo la seguente procedura:

1. preparazione di 4 campioni di gel di alginato e gelatina per ciascuna delle composizioni (10-90, 30-70, 50-50, 70-30, 90-10) (paragrafo 2.3);
2. esecuzione della seconda reticolazione;
3. prima pesatura dei campioni (giorno 0);
4. immersione di ciascun campione in 3 ml di PBS;
5. posizionamento dei campioni in un boiler per mantenere i campioni a 37 °C per tutta la durata della prova;

I time point scelti per la pesatura dei campioni sono: giorno 0 (realizzazione del gel), giorno 1, 3 e 7 giorni.

Ad ogni time point, i campioni sono stati prelevati dall'alloggiamento della multiwell e sono stati pesati.

Per analizzare il contenuto di acqua presente all'interno di ciascun campione vale la seguente relazione:

$$\Delta W_{wet/wet} = \frac{w_{wet}(t)}{w_{wet}(0)} \cdot 100 \quad (8)$$

Dove $w_{wet}(t)$ è il peso dei campioni a ciascun time point.

Nella figura che segue vi è un esempio di campione utilizzato per la prova descritta (Fig. 25).

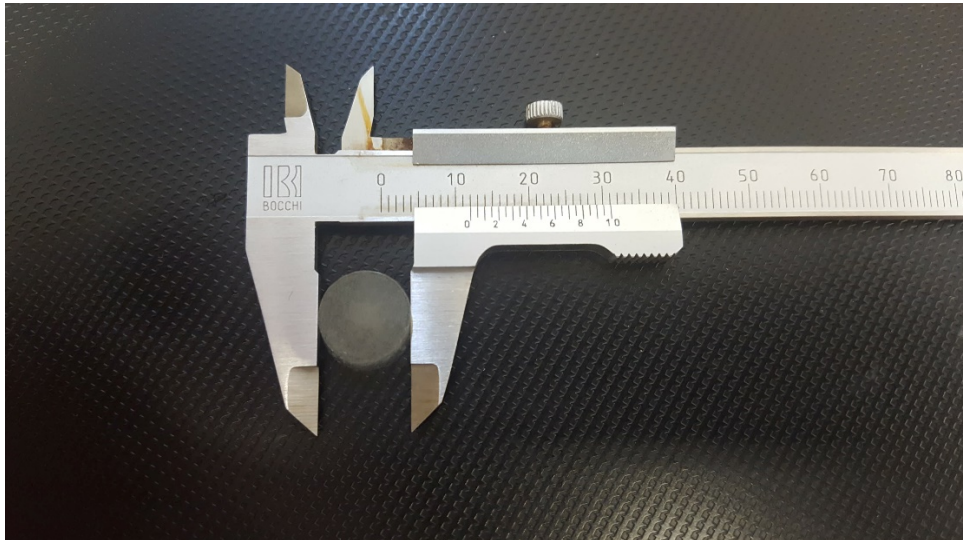


Figura 31: esempio di campione utilizzato per la prova di degradazione.

2.5 Procedura di impermeabilizzazione di scaffold tubolari

Il gel realizzato serve per effettuare un coating per l'impermeabilizzazione di scaffold tubolari porosi.

Le prove preliminari di realizzazione del coating sono state effettuate su scaffold in *Ortovatt*, cioè ovatta non sterile utilizzata in ambito ortopedico (Fig. 26).

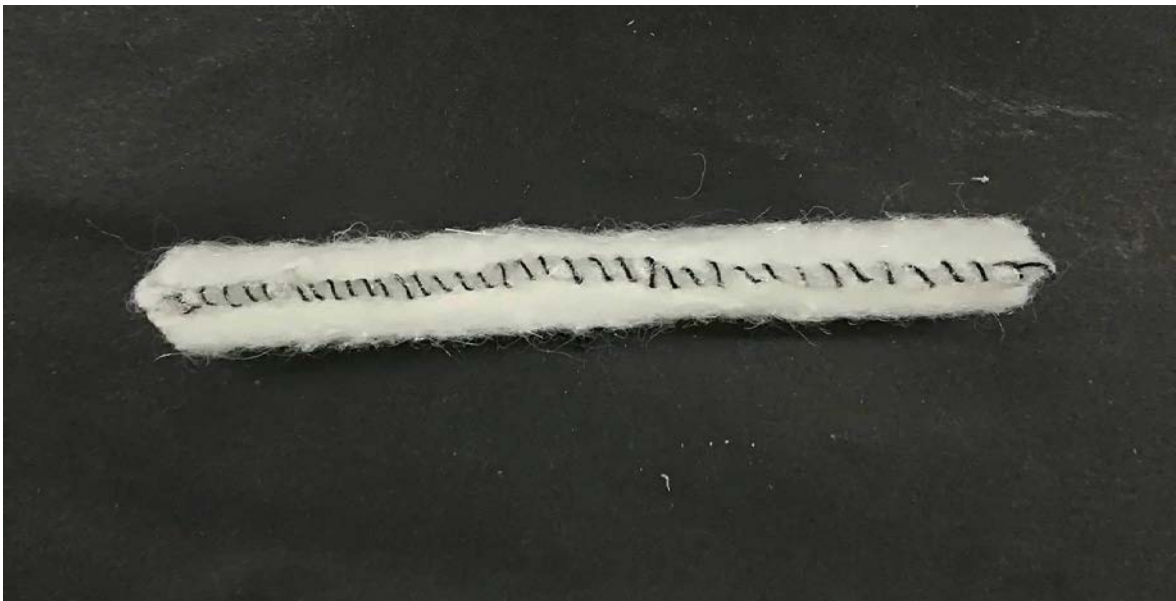
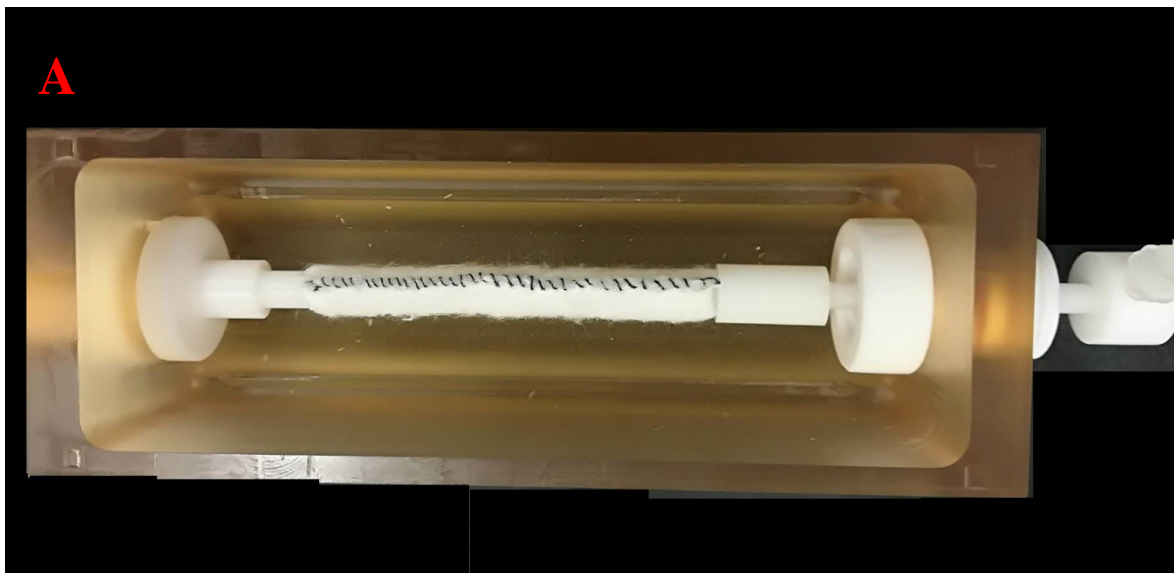


Figura 32: Scaffold in Ortovatt

Si è deciso di analizzare il comportamento delle diverse tipologie di gel quando vengono inserite all'interno del lume del mandrino. I cinque gel, avendo composizione diversa, presentano anche viscosità e tempi di reticolazione differenti. Queste caratteristiche potrebbero influenzare la fuoriuscita dai fori del mandrino stesso.

La procedura dell'esperimento deve essere ripetuta cinque volte (una per ogni tipologia di gel), e prevede:

1. Preparazione delle composizioni del gel di alginato 8% e gelatina 6% nella percentuale desiderata;
2. Posizionamento dello scaffold nel bioreattore InBreath (Fig 27 A);
3. Dopo aver miscelato il gel con il $CaCO_3$ e il GDL , inserimento del gel (tramite gli accessi del bioreattore) all'interno dello scaffold (Fig. 27 B);
4. Collegamento della camera di coltura con il motore a corrente continua e all'unità di controllo, imponendo allo scaffold una rotazione pari a 5 giri al minuto in modo da uniformare lo strato interno di gel (Fig. 27 C).
5. Lasciare ruotare lo scaffold nel bioreattore *overnight* in modo tale che il gel completi la prima reticolazione;
6. Rimozione del gel rimasto all'interno del mandrino tramite un punzone in acciaio inossidabile e aggiunta del $CaCl_2$ per la seconda reticolazione;
7. Rimozione dello scaffold dal mandrino;



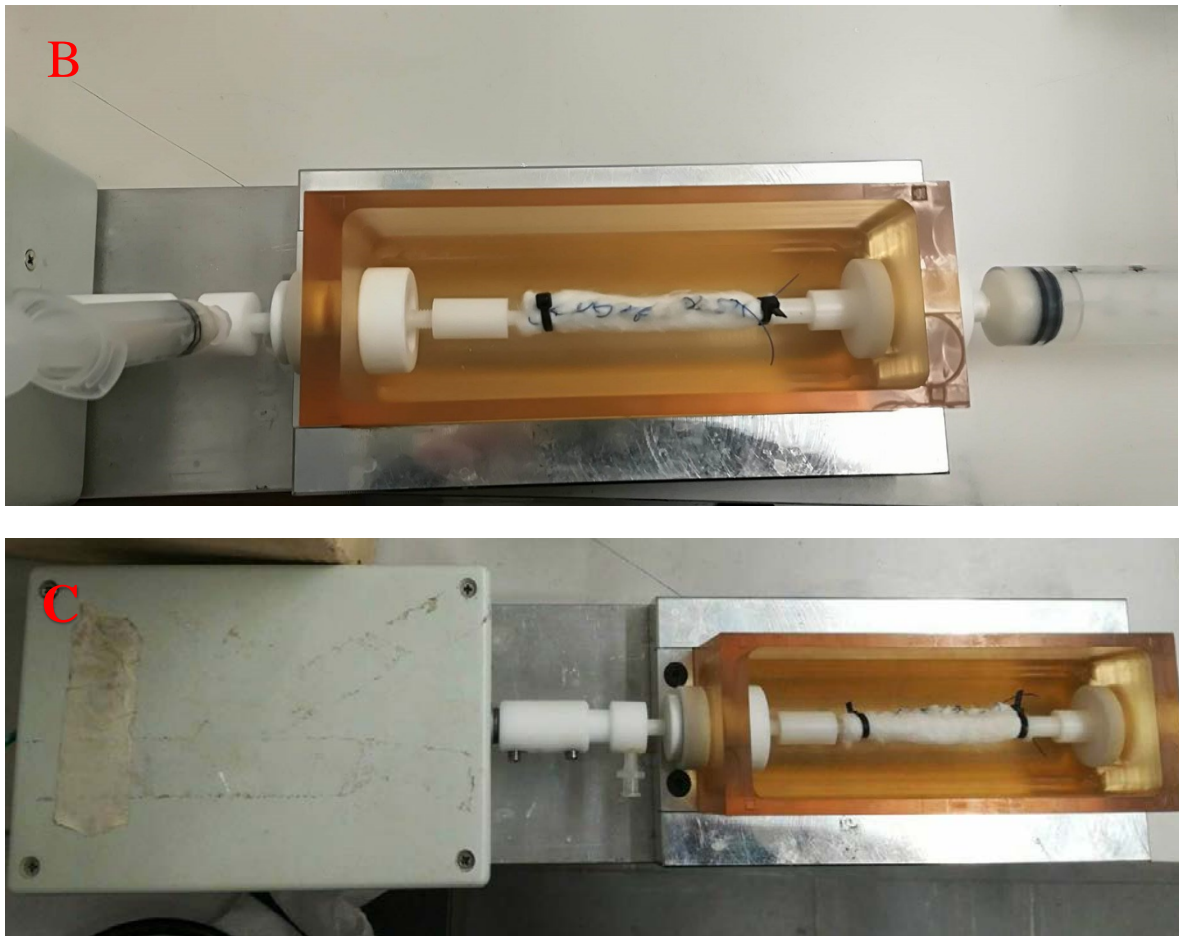


Figura 33: A) Posizionamento dello scaffold in ovatta nel bioreattore InBreath, B) Inserimento del gel tramite siringhe con attacco luer lock, C) Collegamento della camera di coltura al motore a corrente continua.

Il coating di gel serve per impermeabilizzare scaffold tubolari porosi per poterli mettere in un circuito a perfusione continua in modo tale da simulare approssimativamente il comportamento *in vivo* del vaso nativo.

2.5.1 Misure dello spessore del gel attraverso l'utilizzo di microscopio ottico

Sono state effettuate misure e fotografie attraverso uno stereomicroscopio (Fig. 28) per poter verificare l'uniformità e lo spessore del coating. Ciascuno scaffold analizzato è stato fotografato sia nella sua sezione anteriore che in quella posteriore.

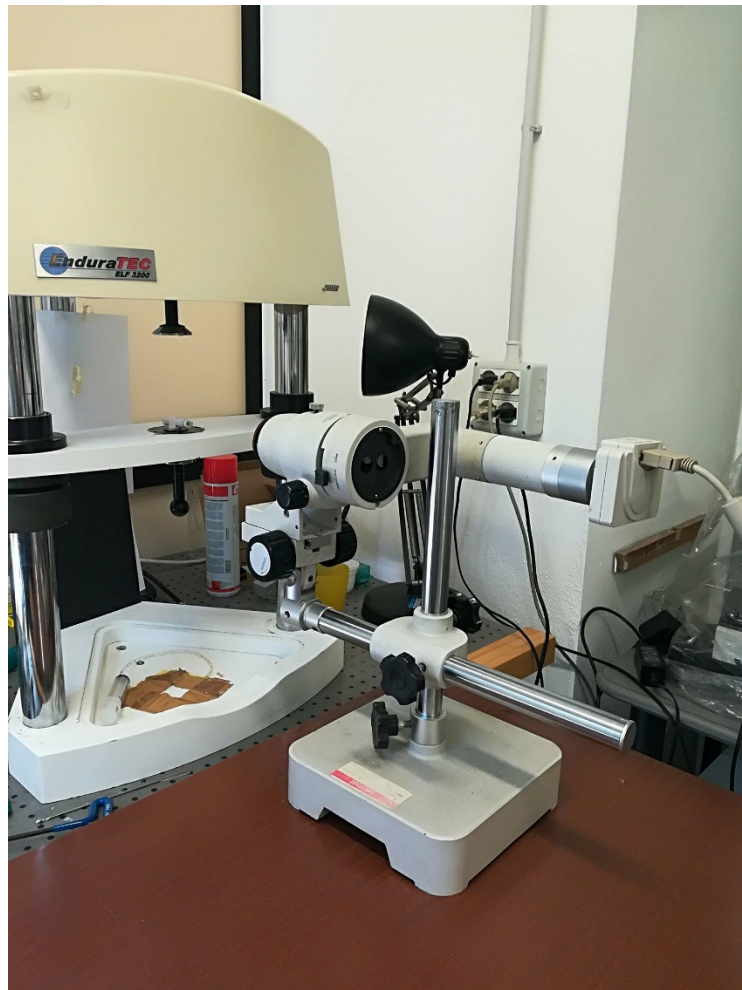


Figura 34: Stereomicroscopio Nikon SMZ800

Lo stereomicroscopio utilizzato è lo Stereomicroscopio Nikon SMZ800. Esso è collegato ad una telecamera digitale Nikon TV Lens C-0.6x, che permette di catturare le immagini con una risoluzione di 5Mpx e di elaborarle mediante un software di acquisizioni di

immagini Nikon Nis-Elements D2.20. Tramite questo software, sono state effettuate le misurazioni per verificare lo spessore del coating di gel nel lume degli scaffold.

2.5.2 Prove preliminari di impermeabilizzazione dello scaffold

Per poter analizzare l'effettiva impermeabilizzazione del gel in alginato e gelatina è stato preparato un circuito (Fig. 29) che simula un flusso continuo all'interno del mandrino.

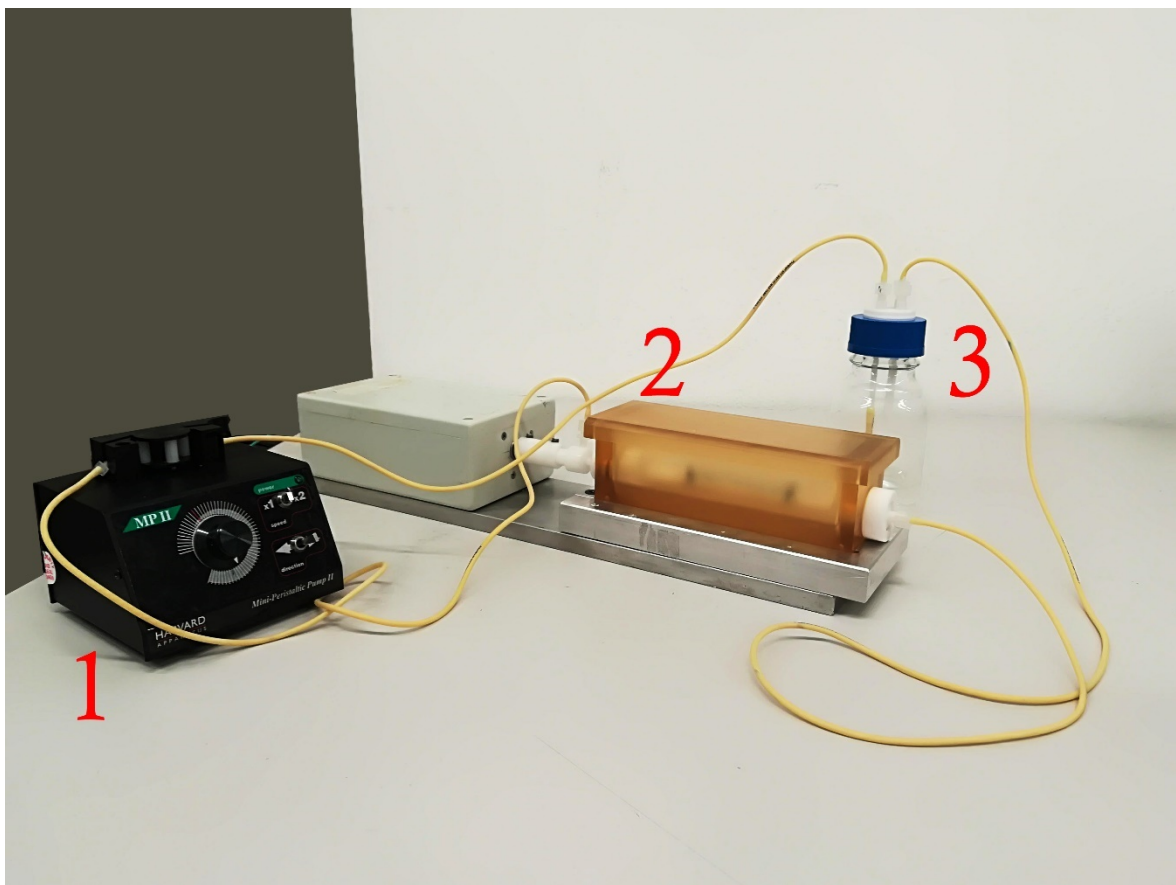


Figura 35: Circuito a perfusione: A) pompa roller; B) Camera di coltura; C) Reservoir contenente soluzione fisiologica.

I componenti del circuito idraulico utilizzato per la perfusione sono:

- pompa *MP II Mini-Peristaltic Pump MA1 70-2027* prodotta da Harvard Apparatus–Regenerative: garantisce una portata che varia tra 0.8 ml/min a 7.00 ml/min per un solo tubo;
- tubi in PharMed BTP (1/16inch): meno permeabili ai gas e ai vapori rispetto al silicone, ma idonei per la coltura cellulare;
- un Reservoir contenente la soluzione fisiologica utilizzata per la prova.

Si è deciso di lasciare lo scaffold in perfusione continua per circa un'ora.

2.6 Prove su scaffold in PGA/PLLA

In fine si è deciso di effettuare una prova completa su uno scaffold in PGA/PLLA. Si è scelto uno scaffold tubolare con un diametro di $d=9\text{mm}$ e si è deciso di realizzare un coating di circa 1.3 mm.

Una volta realizzato il coating di gel sono state effettuate misure dello spessore del gel per verificare la sua uniformità e prove di tenuta all'interno del circuito di perfusione.

2.7 Analisi statistiche

In seguito alle prove meccaniche e di degradazione è stata condotta un'analisi statistica⁴⁸ dei risultati. In primo luogo, è stato condotto un test di Shapiro-Wilk per verificare se le distribuzioni degli sforzi e dei moduli elastici sono normali.

In seguito, è stato effettuato un test di Kruskal-Wallis, un metodo non parametrico per confrontare le distribuzioni di più di due gruppi indipendenti di osservazioni, quali le 5 classi di gel.

Esso è stato effettuato secondo la seguente procedura:

1. si definiscono il valore nullo e il valore alternativo da utilizzare come ipotesi dello studio:

H_0 : ciascun gruppo che ha la stessa distribuzione di valori nei gruppi analizzati;
 H_1 : il gruppo che non ha la stessa distribuzione di valori tra i gruppi analizzati;

2. si raccolgono i dati dai campioni dei gruppi;
3. si calcola il valore del test statistico specifico rispetto a H_0 :
per prima cosa si classificano tutti i valori n e si calcola la somma dei ranghi in ciascun gruppo denominate $R_1 \dots R_k$. A questo punto il test statistico è dato da:

$$H = \frac{12}{n(n+1)} \sum \frac{R_i^2}{n_i} - 3(n+1) \quad (9)$$

4. Si confrontano i valori statistici ottenuti dal test con valori ricavati da una distribuzione di probabilità nota;
5. Si interpretano i p-value ottenuti e i risultati:
se i p-value hanno valori significativi (per esempio p-value < 0.05), si procede con il test non parametrico applicato a due classi di campioni per volta. A questo punto si sceglie un ulteriore livello di significatività più restrittivo rispetto al precedente (per esempio p-value < 0.005).

Il test è stato effettuato per gli stress e per i moduli elastici per verificare se i valori ottenuti per le diverse rampe di deformazione sono statisticamente comparabili o meno. Successivamente il test è stato eseguito per i pesi dei campioni ottenuti nei vari check point di riferimento. Per tutti i test è stato applicato un livello di significatività con p-value < 0.05.

3. RISULTATI

3.1 Caratteristiche generali dei gel realizzati

Le concentrazioni differenti di alginato o gelatina impiegate nella realizzazione delle varie classi di gel hanno mostrato delle caratteristiche differenti che rispecchiano le proprietà dei materiali costituenti: all'aumentare della percentuale di alginato, il gel realizzato risulta più viscoso e reticola in meno tempo. Viceversa, aumentando la percentuale di gelatina, esso risulta più fluido, reticola meno e in più tempo. Inoltre, anche dal punto di vista cromatico si nota una differenza: i campioni con una percentuale di alginato più bassa (e quindi di gelatina più alta) risultano essere più chiari, quasi bianchi, mentre quelli con una percentuale di alginato più alta sono più scuri, tendenti al giallino (Fig. 30).

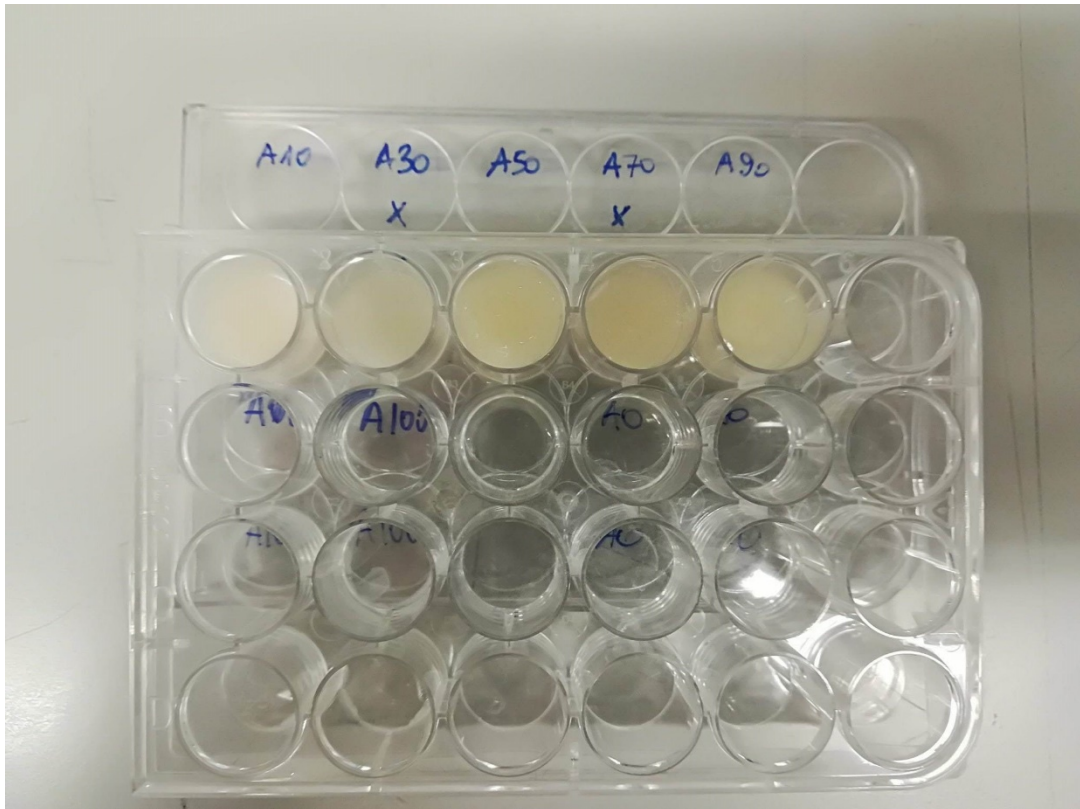


Figura 36: Campioni alloggiati in una multiwell.

3.2 Caratterizzazione meccanica del gel

Il gel è stato caratterizzato attraverso prove di compressione non confinata e prove di degradazione.

3.2.1 Risultati prove di compressione non confinata

Le prove hanno permesso di ottenere i valori degli sforzi calcolati all'inizio (al picco) e alla fine (a valle) di ogni rampa di deformazione applicata (Appendice A1).

Nelle tabelle seguenti (Tab. 8-9) sono riassunti i valori medi degli sforzi a valle delle rampe e le corrispondenti deviazioni standard.

Tabella 8: Medie degli sforzi calcolati a valle.

MEDIE SFORZI A VALLE σ [kPa]					
	A10/G90	A30/G70	A50/G50	A70/G30	A90/G10
5%	0.226000041	0.29777866	0.184699153	0.180640739	0.1384648
10%	0.491788829	0.569933482	0.425500382	0.473485639	0.327063408
15%	0.766331176	0.926281199	0.703703083	0.89842904	0.513274691
20%	1.056789031	1.344301432	1.08368523	1.427618846	0.655718366

Tabella 9: Deviazioni standard delle medie relative agli sforzi a valle.

DEVIAZIONI STANDARD (relativi agli sforzi a valle)					
	A10/G90	A30/G70	A50/G50	A70/G30	A90/G10
5%	0.10531517	0.135954834	0.072478649	0.044439962	0.049209514
10%	0.156576866	0.186708147	0.160330621	0.128836663	0.11185849
15%	0.116791722	0.172905846	0.178836244	0.274243726	0.125651794
20%	0.071837224	0.191530328	0.223255142	0.470383994	0.066920821

Il grafico sottostante (Grafico 2) rappresenta gli sforzi a valle delle rampe di deformazioni applicate (5%, 10%, 15%, 20%) per le diverse classi di gel analizzate.

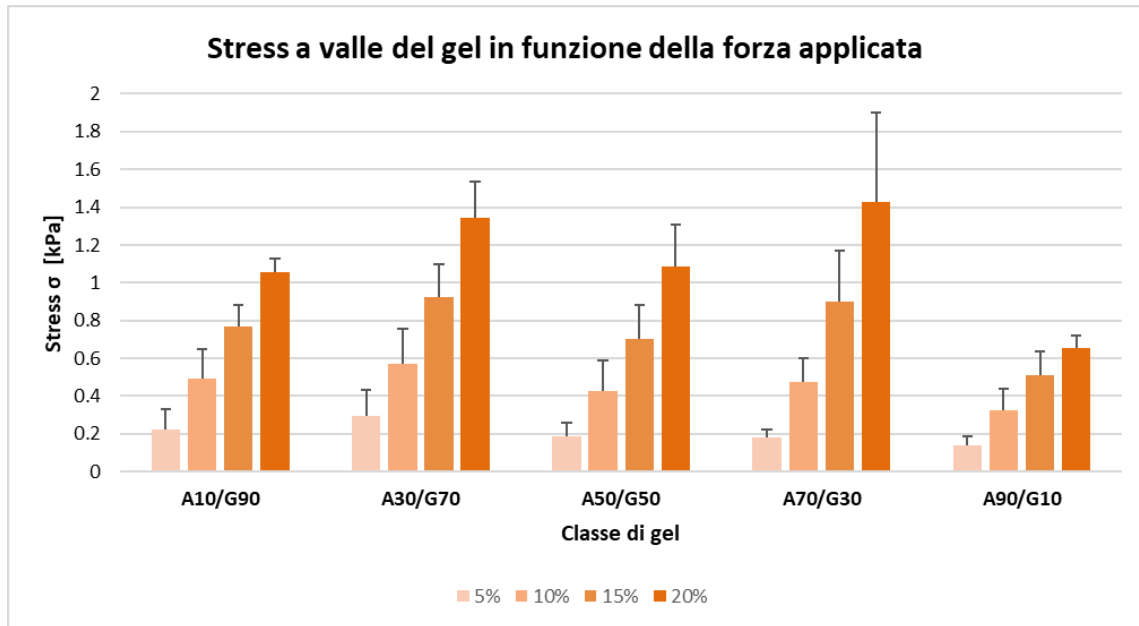


Grafico 5: Sforzi a valle delle classi di gel in funzione della forza applicata.

È possibile osservare che indipendentemente dalla classe di gel analizzata, il comportamento del gel esaminato è confrontabile a quello delle altre classi.

Nelle tabelle seguenti (Tab. 10-11) sono riassunti i valori medi degli sforzi di picco delle rampe e le corrispondenti deviazioni standard.

Tabella 10: Medie degli sforzi di picco.

MEDIE SFORZI DI PICCO σ [kPa]					
	A10/G90	A30/G70	A50/G50	A70/G30	A90/G10
5%	0.354914693	0.418576522	0.285682455	0.289661319	0.237140311
10%	0.732906799	0.843519226	0.567386045	0.650146422	0.494970716
15%	1.058377897	1.227081742	0.932645786	1.214349376	0.822033359
20%	1.392602496	1.847784568	1.449102368	1.967946269	1.146708683

Tabella 11: Deviazioni standard relative agli sforzi di picco.

DEVAZIONI STANDARD (relativi agli sforzi a picco)					
	A10/G90	A30/G70	A50/G50	A70/G30	A90/G10
5%	0.154688637	0.188949837	0.114041034	0.04425909	0.073349367
10%	0.151553821	0.265261862	0.205539569	0.129464197	0.168202615
15%	0.147948135	0.230145801	0.254687099	0.31729424	0.257946634
20%	0.097988907	0.220308868	0.297460134	0.583923784	0.257697742

Il grafico sottostante (Grafico 3) rappresenta gli sforzi di picco sulle rampe di deformazioni applicate (5%, 10%, 15%, 20%) per le diverse classi di gel analizzate.

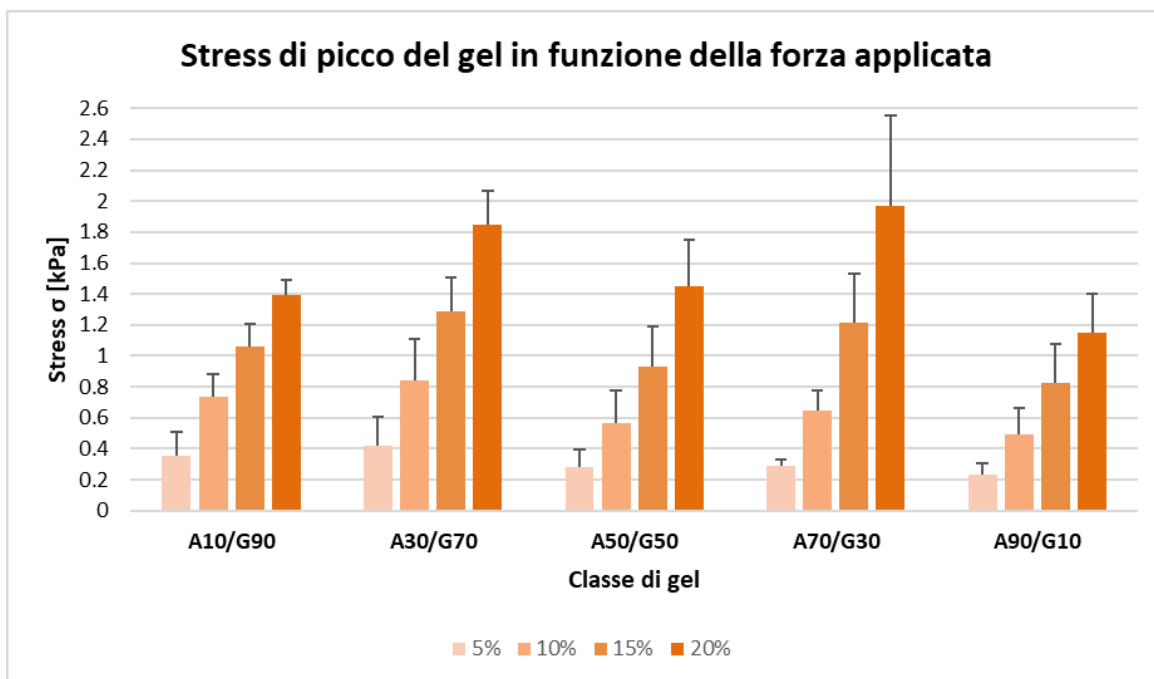


Grafico 6: Sforzo di picco delle classi di gel in funzione della forza applicata.

Dai valori di sforzi finali sono stati ricavati i moduli di rilassamento medi e le corrispondenti deviazioni standard (Tab. 12-13).

Tabella 12: Medie dei moduli di rilassamento.

MEDIE DEI MODULI ELASTICI DI RILASSAMENTO E_r [kPa]					
	A10/G90	A30/G70	A50/G50	A70/G30	A90/G10
5%	3.616000651	4.749183502	2.941180847	2.890251831	2.215436808
10%	4.252620606	4.354479243	4.822390756	5.856897998	3.017577721
15%	4.392677559	5.691380765	5.395350189	8.498868007	2.979380535
20%	4.647325672	6.697240005	7.766755231	10.58379612	2.279098785

Tabella 13: Deviazioni standard relative alle medie dei moduli di rilassamento.

DEVIAZIONI STANDARD (in riferimento a Er)					
	A10/G90	A30/G70	A50/G50	A70/G30	A90/G10
5%	2.106303408	3.536994372	2.054217518	1.789681318	1.503420422
10%	1.795748223	2.892454455	2.644688959	3.000429	2.017492153
15%	0.937621795	3.194093396	2.671680351	4.568468851	1.869864007
20%	1.634992303	3.779559636	3.823583118	5.829498809	1.939549666

Il grafico sottostante (Grafico 4) rappresenta i moduli di rilassamento in funzione delle rampe di deformazioni applicate (5%, 10%, 15%, 20%) per le diverse classi di gel analizzate.

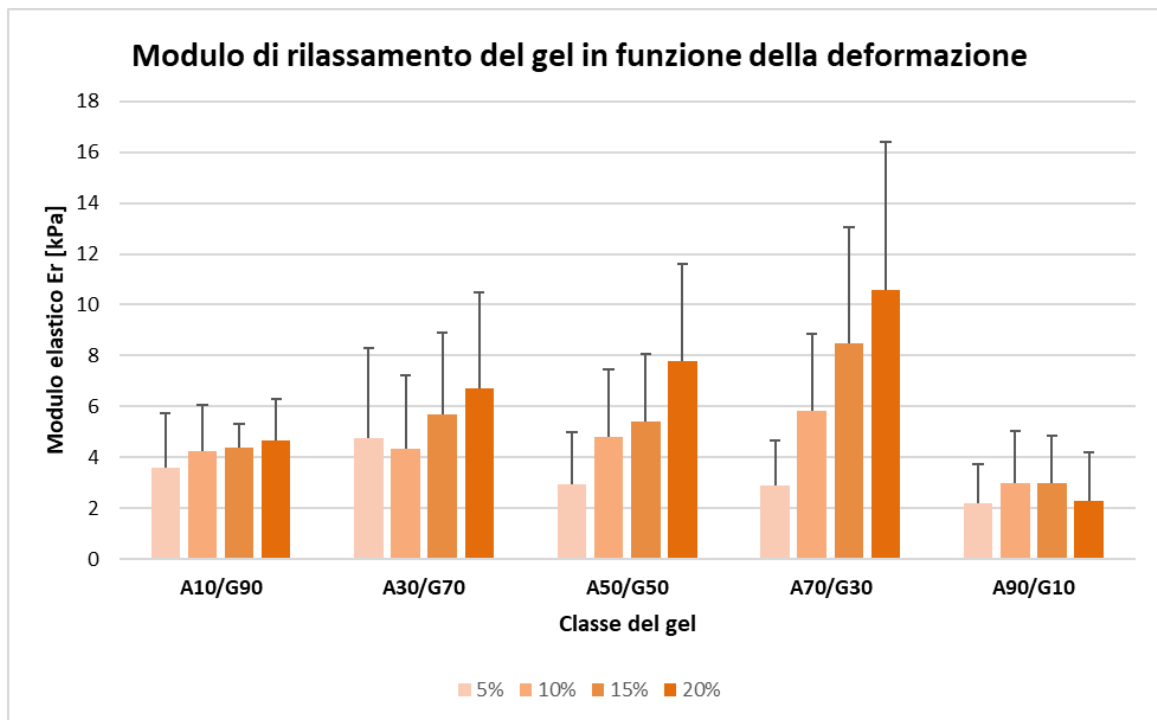


Grafico 7: Modulo di rilassamento delle classi di gel in funzione della deformazione.

Dai valori di sforzi iniziali sono stati ricavati i moduli elastici medi e le corrispondenti deviazioni standard (Tab. 14-15).

Tabella 14: Medie dei moduli elastici.

MEDIE DEI MODULI ELASTICI E [kPa]					
	A10/G90	A30/G70	A50/G50	A70/G30	A90/G10
5%	7.098293863	8.37153043	5.713649096	5.793226381	4.742806216
10%	10.09358289	10.90049656	7.604163484	9.364654952	7.123758594
15%	11.23472116	14.35415075	10.11752101	14.76954418	9.877132671
20%	12.40132417	18.30118411	14.90490069	21.32512096	12.59230965

Tabella 15: Deviazioni standard relative alle medie dei moduli elastici.

DEVIAZIONI STANDARD (in riferimento a E)					
	A10/G90	A30/G70	A50/G50	A70/G30	A90/G10
5%	3.093772732	3.778996733	2.28082068	0.885181802	1.466987343
10%	1.518211148	2.848857335	2.672120367	1.726718787	2.377358051
15%	0.547550324	0.646292988	1.904654765	3.876822408	2.908189105
20%	1.653157663	0.948673392	2.570206325	6.217427176	2.715821856

Il grafico sottostante (Grafico 5) rappresenta i moduli elastici in funzione delle rampe di deformazioni applicate (5%, 10%, 15%, 20%) per le diverse classi di gel analizzate.

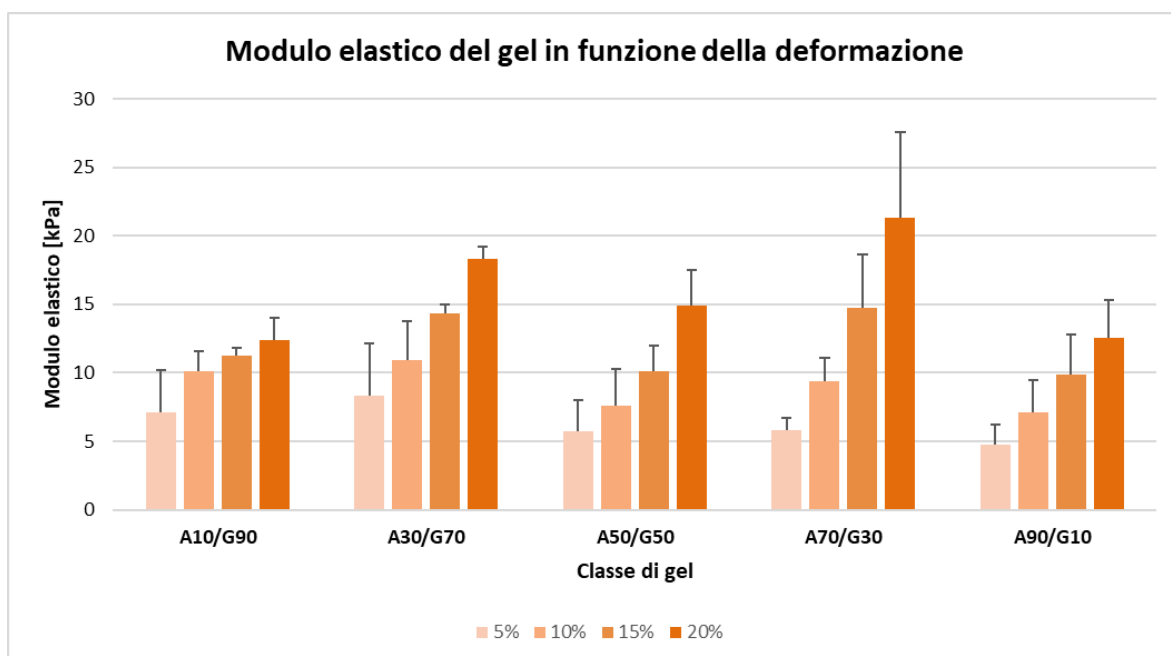


Grafico 8: Modulo elastico del gel delle classi di gel in funzione della deformazione.

È stata effettuata un'analisi statistica dei risultati ottenuti.

Al test di Shapiro-Wilk è risultato che la distribuzione dei valori di sforzo (a picco e a valle), di modulo elastico e di modulo di rilassamento non è normale, pertanto è necessario utilizzare il test di Kruskal-Wallis per studiare la significatività statistica della differenza tra i valori al variare della concentrazione di alginato o gelatina.

Dal test di Kruskal-Wallis è emerso che non esiste differenza significativa tra i valori di sforzi registrati per ogni rampa di deformazione al variare della concentrazione di alginato o gelatina, indipendentemente dai valori di sforzo analizzati. Inoltre, non esistono differenze significative nemmeno tra i valori dei moduli elastici e di rilassamento analizzati.

Pertanto, la concentrazione dei componenti non è una variabile da tenere in considerazione per la scelta della classe di gel.

Inoltre, dall'analisi dell'andamento dei p-value è possibile supporre che la differenza tra le diverse classi possa essere significativa all'aumentare della percentuale della deformazione applicata. Infatti, dalla tabella seguente (Tab. 16) si nota che il p-value diventa progressivamente più piccolo al crescere della deformazione.

Un'altra condizione in cui si suppone che la differenza tra le diverse classi sia significativa è quella in cui il gel sia immerso nel mezzo di coltura, anche a fronte dell'aspetto dei campioni durante e dopo le prove di degradazione.

Tabella 16: Riassunto dei p-value ottenuti. I valori in grassetto sono quelli che rispettano la condizione $p\text{-value} < 0.05$.

	E rilassamento	E	Sforzo a valle	Sforzo a picco
5%	0.25	0.536	0.25	0.536
10%	0.424	0.145	0.181	0.15
15%	0.033	0.053	0.064	0.114
20%	0.015	0.029	0.017	0.047

Alla luce dei risultati ottenuti, si è deciso di analizzare dei campioni di 100% Gelatina e 100% Alginato.

Nelle tabelle seguenti (Tab. 17 A/B) sono riassunti i valori medi degli sforzi a valle e di picco delle rampe e le corrispondenti deviazioni standard.

Tabella 17: A) Medie e deviazioni standard relative agli sforzi a valle. B) Medie e deviazioni standard relative agli sforzi di picco.

MEDIE E DEV. ST. SFORZI A VALLE σ [kPa]			MEDIE E DEV. ST. SFORZI DI PICCO σ [kPa]		
CAMPIONI G100			CAMPIONI G100		
5%	0.054112554	0.037029811	5%	0.095492743	0.065595372
10%	0.152788388	0.106653356	10%	0.225203718	0.16644403
15%	0.354914693	0.28908943	15%	0.485421441	0.389903796
20%	0.849885409	0.629935856	20%	1.009835752	0.772271487

I grafici seguenti (Grafici 6-7) rappresentano gli sforzi a valle e di picco delle rampe di deformazioni applicate (5%, 10%, 15%, 20%) per il 100% Gelatina.

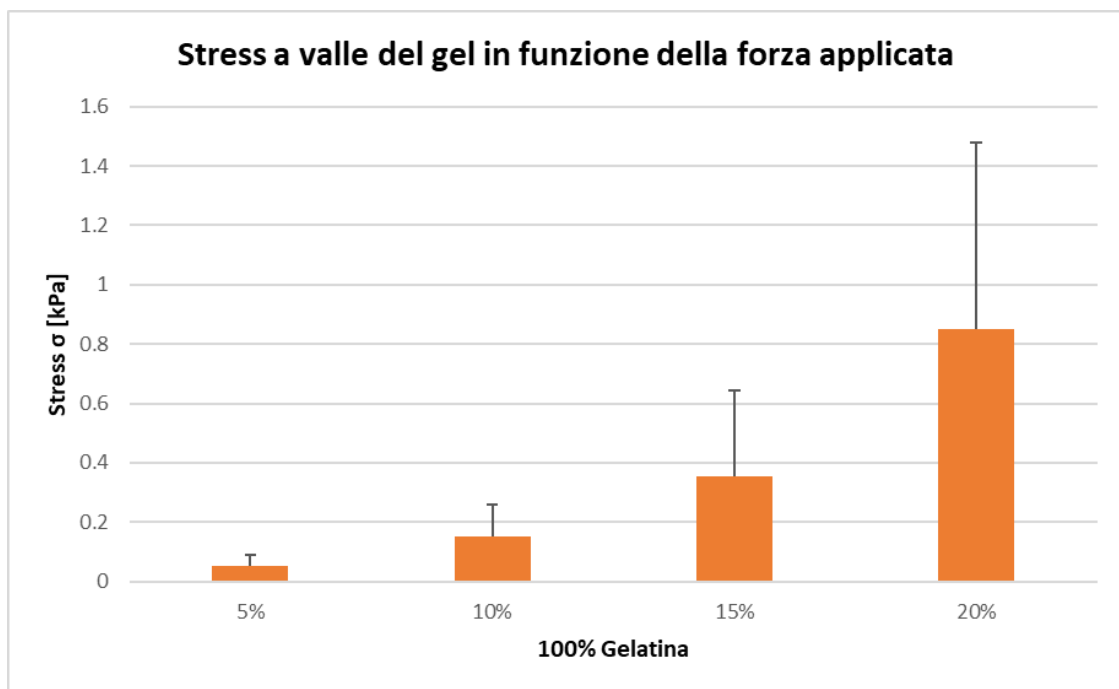


Grafico 9: Sforzi a valle di 100% Gelatina in funzione della forza applicata.

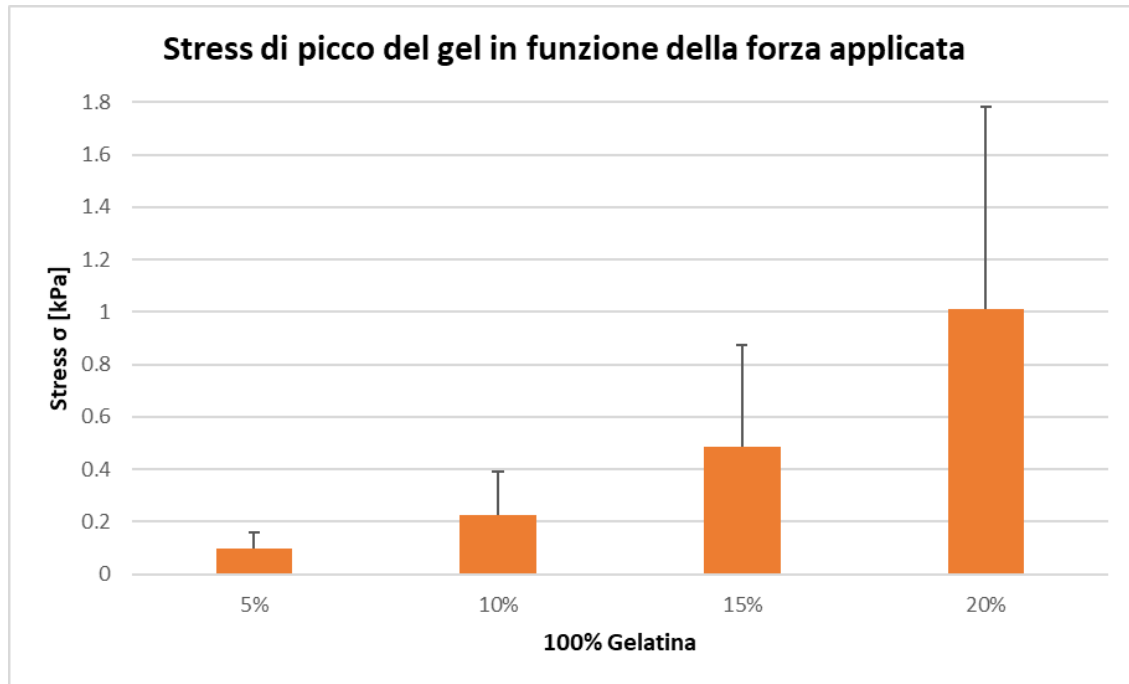


Grafico 10: Sforzi di picco di 100% Gelatina in funzione della forza applicata.

Dai valori di sforzi iniziali e finali sono stati ricavati i moduli di rilassamento e i moduli elastici medi con le corrispondenti deviazioni standard (Tab. 18 A/B).

Tabella 18: A) Medie e deviazioni standard relative ai moduli di rilassamento. B) Medie e deviazioni standard relative ai moduli elastici.

MEDIE E DEV. ST. DEI MODULI E_r [kPa]			MEDIE E DEV. ST. DEI MODULI E [kPa]		
CAMPIONI G100			CAMPIONI G100		
5%	1.082251082	0.204644147	5%	1.909854851	1.311907437
10%	1.973516679	0.709860313	10%	3.72421696	2.832534072
15%	4.042526101	3.522940743	15%	7.543926662	6.555313832
20%	9.899414311	5.788093851	20%	15.59714795	15.87474634

I grafici seguenti (Grafici 8-9) rappresentano i moduli di rilassamento e i moduli elastici in funzione delle rampe di deformazioni applicate (5%, 10%, 15%, 20%) per il 100% Gelatina.

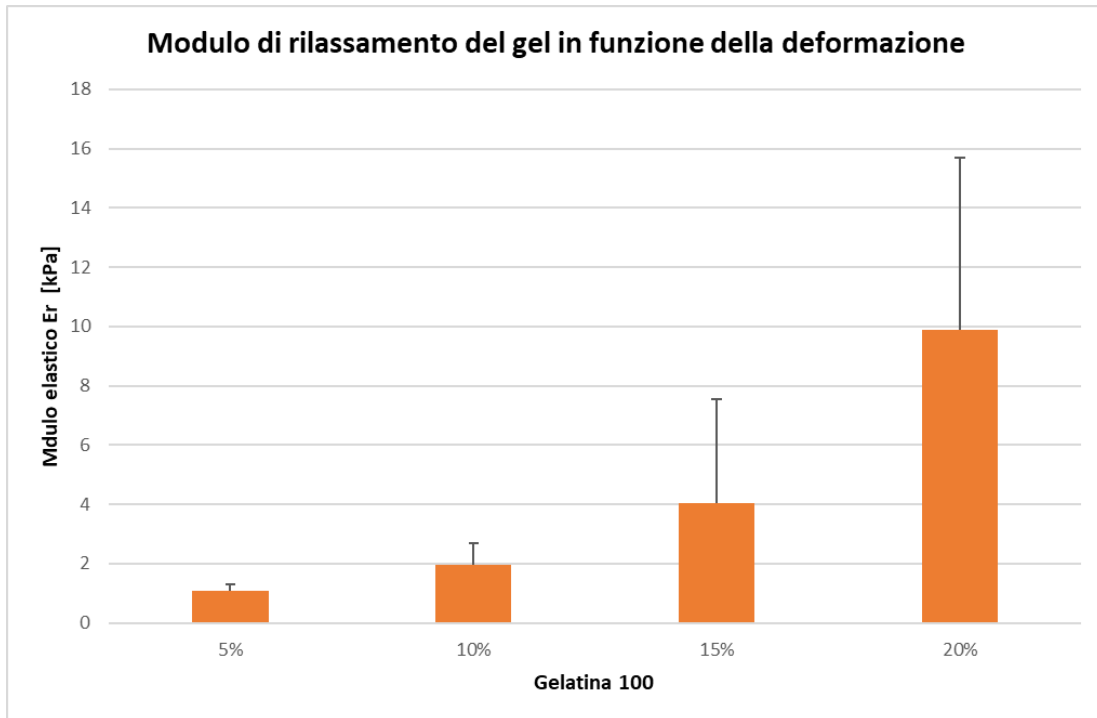


Grafico 11: Modulo di rilassamento del 100% Gelatina in funzione della deformazione.

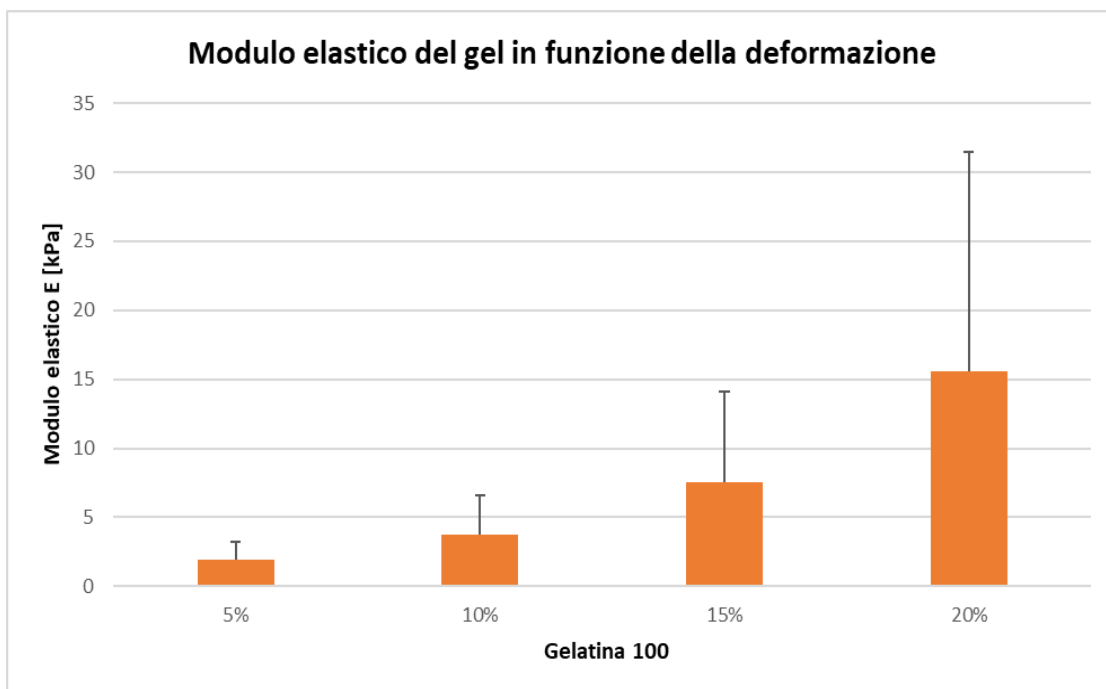


Grafico 12: Modulo elastico del 100% Gelatina di gel in funzione della deformazione.

Per quanto riguarda l'alginato, è stato possibile analizzare un solo campione.

I grafici seguenti (Grafici 10-11) rappresentano gli sforzi a valle e di picco sulle rampe di deformazioni applicate (5%, 10%, 15%, 20%) per il 100% Alginato.

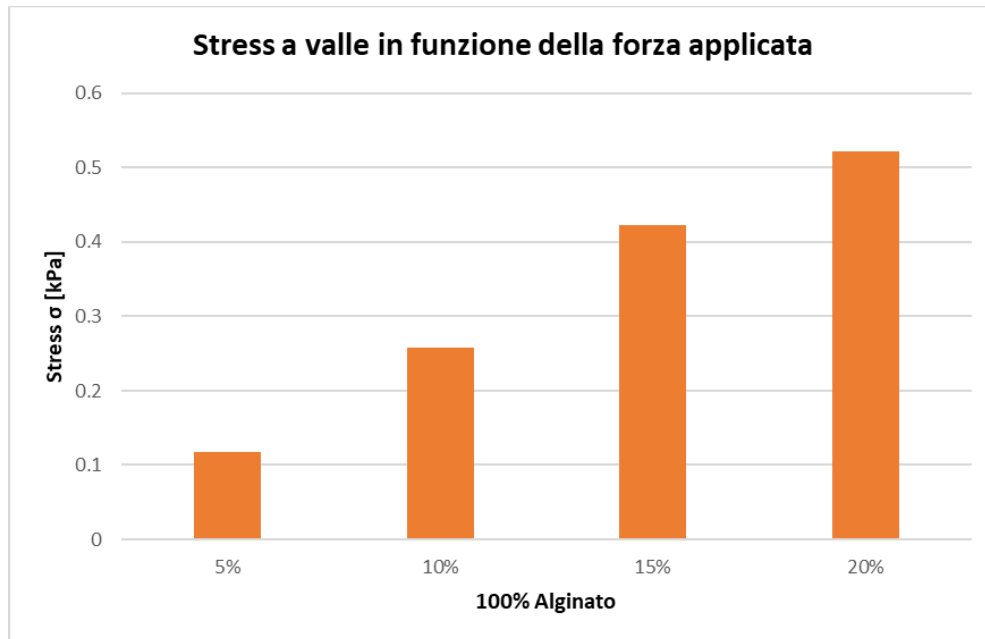


Grafico 13: Sforzi a valle di 100% Alginato in funzione della forza applicata.

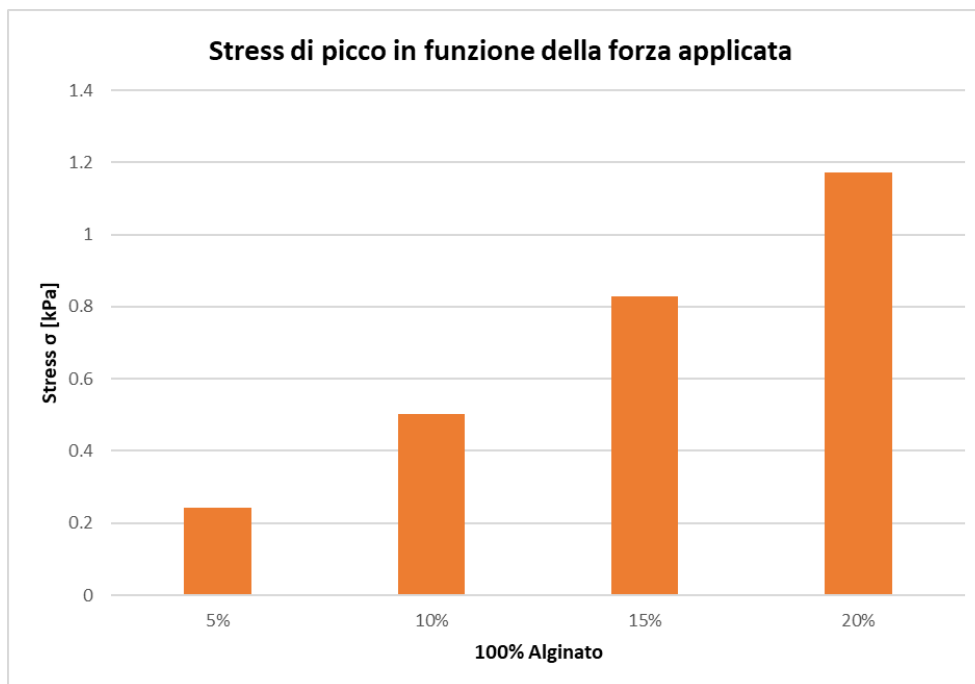


Grafico 14: Sforzi di picco di 100% Alginato in funzione della forza applicata.

I grafici seguenti (Grafici 12-13) rappresentano i moduli di rilassamento e i moduli elastici in funzione delle rampe di deformazioni applicate (5%, 10%, 15%, 20%) per il 100% Alginato.

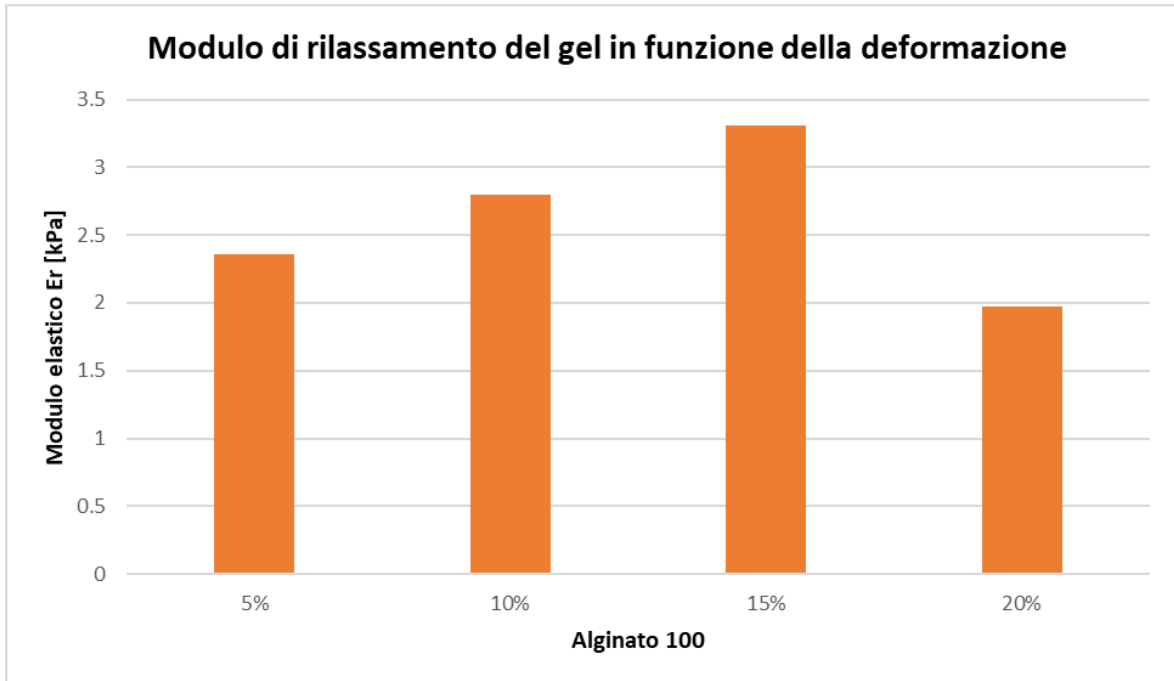


Grafico 15: Modulo di rilassamento del 100% Alginato in funzione della deformazione.

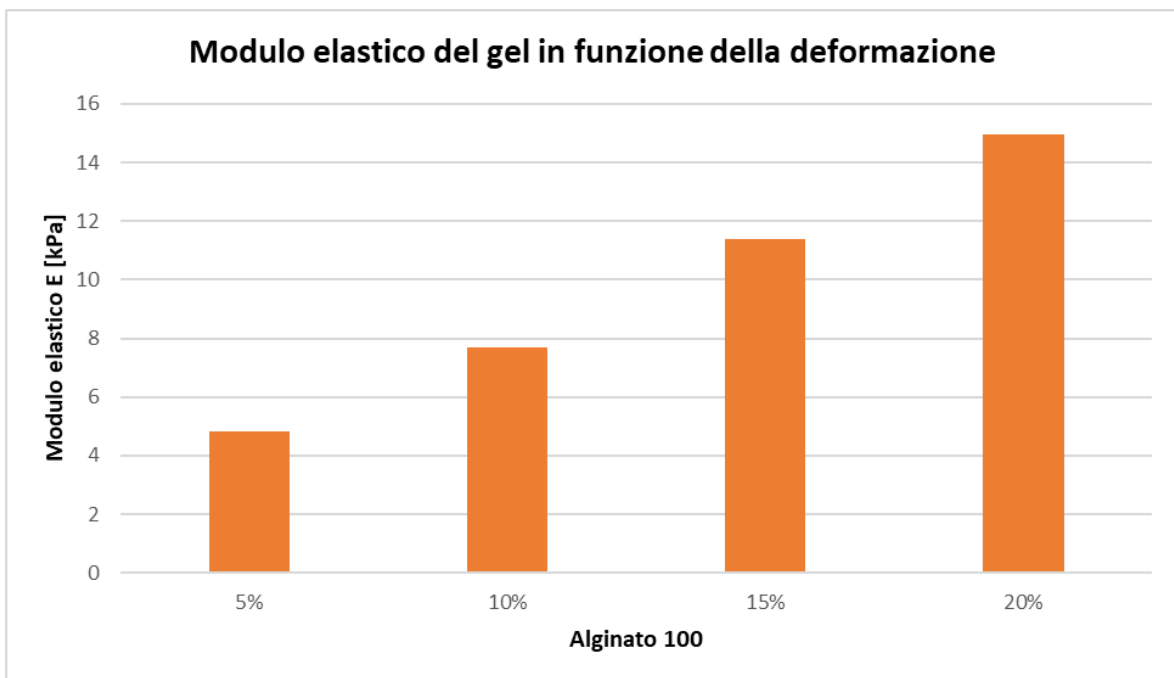


Grafico 16: Modulo elastico del 100% Alginato di gel in funzione della deformazione.

Alla luce dei dati ottenuti dalla prova di compressione non confinata sui campioni ottenuti dalle diverse percentuali di alginato e gelatina, è stata effettuata una seconda analisi statistica confrontando tali valori anche con il 100% Gelatina e il 100% Alginato.

Tabella 19: Riassunto dei p-value ottenuti. I valori in grassetto sono quelli che rispettano la condizione $p\text{-value} < 0.05$.

	E rilassamento	E	Sforzo a valle	Sforzo a picco
5%	0.053	0.119	0.053	0.119
10%	0.121	0.068	0.046	0.054
15%	0.077	0.106	0.038	0.078
20%	0.011	0.092	0.026	0.097

Dal test di Kruskal-Wallis è emerso che non esiste differenza significativa né tra i valori di sforzi registrati per ogni rampa di deformazione, né tra quelli dei moduli elastici e di rilassamento analizzati (Tab. 19). Questo risultato è coerente con la letteratura: i gel in alginato o in gelatina hanno di per sé una rigidità meccanica molto limitata e molto adattabile alle particolari applicazioni in cui sono impiegati. Infatti, le loro proprietà meccaniche sono influenzate dalle diverse strategie adottate per la loro formazione e dall'uso di molecole con strutture chimiche diverse utilizzate nel cross-linking.⁴⁹

Infine si è deciso di confrontare un campione di 100% Gelatina con un 100% Alginato. Nei grafici che seguono (Grafici 14-15) sono rappresentati gli sforzi a valle e di picco sulle rampe di deformazioni applicate (5%, 10%, 15%, 20%) per il 100% Gelatina e il 100% Alginato.

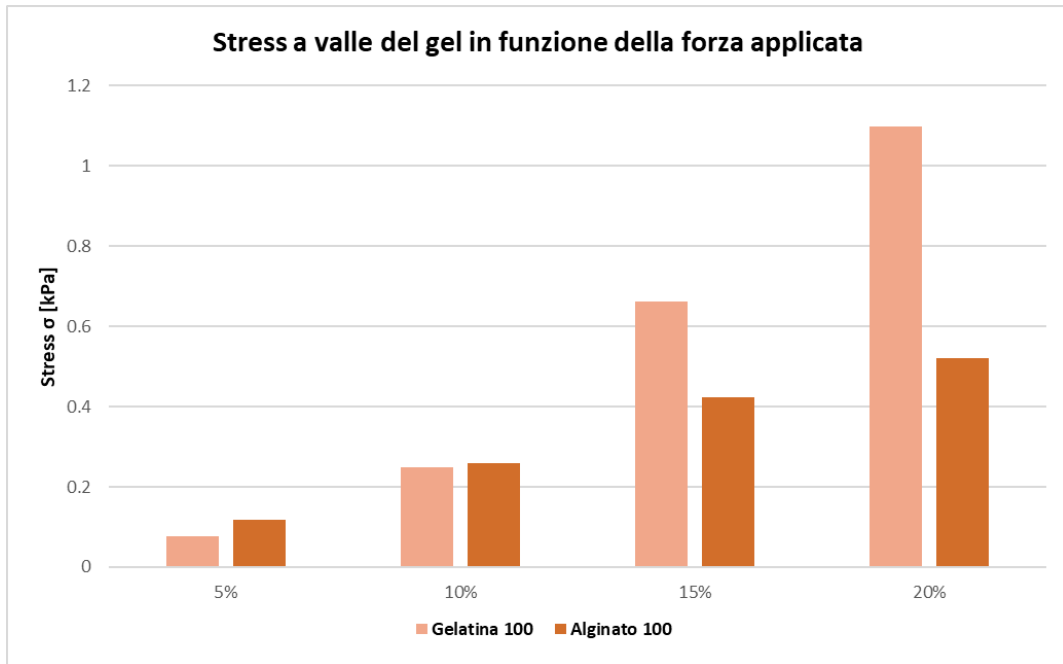


Grafico 17: Sforzi a valle di 100% Gelatina e 100% Alginato in funzione della forza applicata.

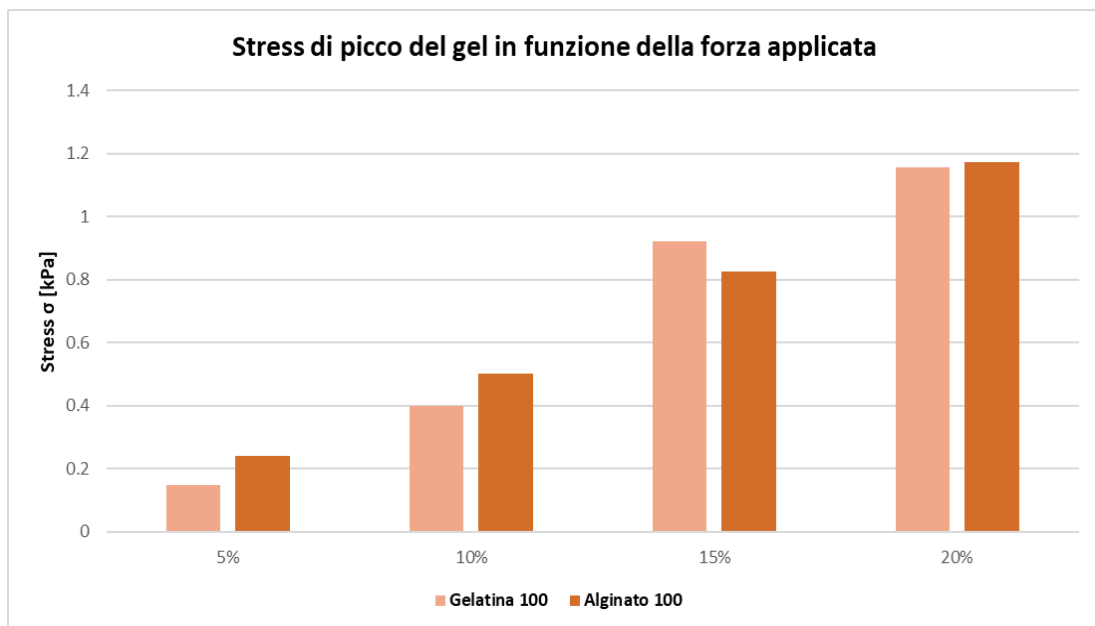


Grafico 18: Sforzi di picco di 100% Gelatina e 100% Alginato in funzione della forza applicata.

I grafici seguenti (Grafici 16-17) rappresentano i moduli di rilassamento e i moduli elastici in funzione delle rampe di deformazioni applicate (5%, 10%, 15%, 20%) per il 100% Gelatina e il 100% Alginato.

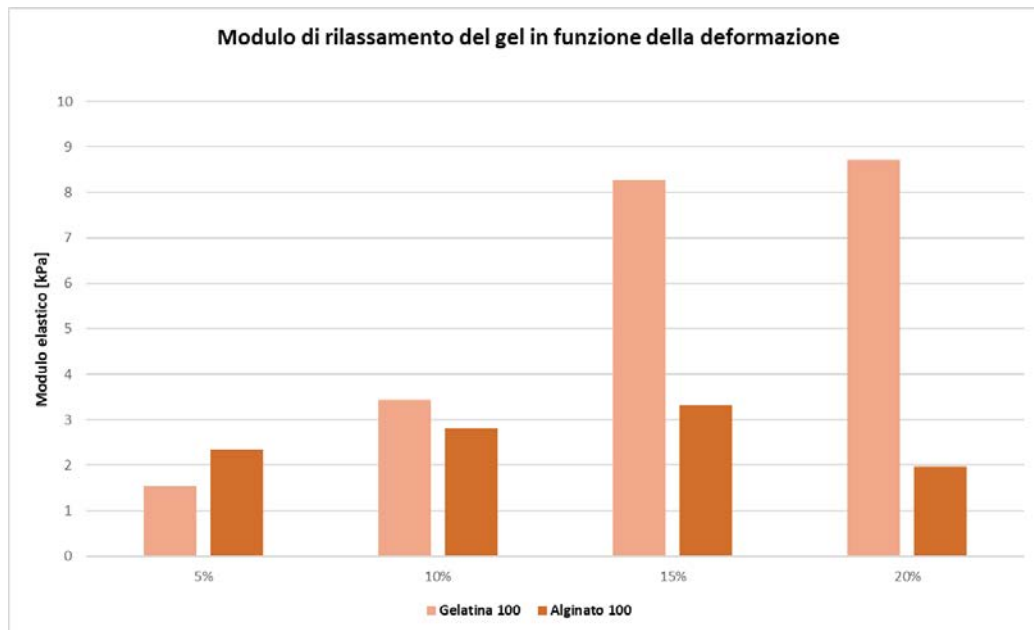


Grafico 19: Modulo di rilassamento del 100% Gelatina e 100% Alginato in funzione della deformazione.

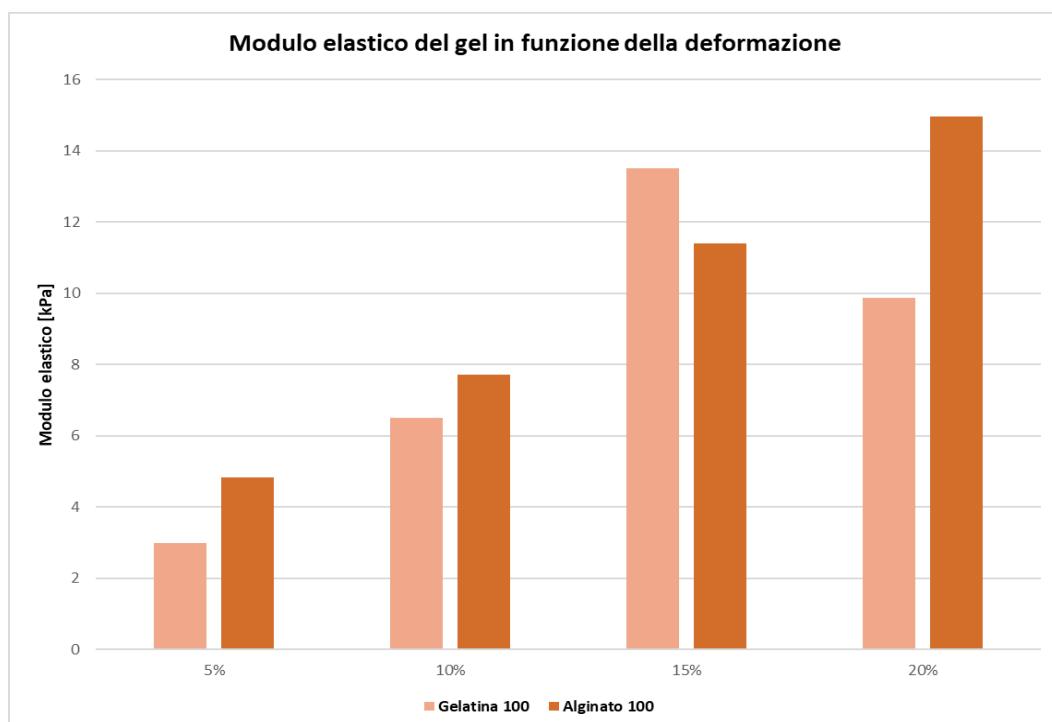


Grafico 20: Modulo elastico del 100% Gelatina e 100% Alginato di gel in funzione della deformazione.

Dall'analisi dei grafici ottenuti, si nota che, l'alginato è molto più sensibile alle deformazioni impresse dalle rampe rispetto alla gelatina.

3.2.2 Risultati prove di degradazione

Applicando la formula 8 è stata analizzata la variazione del peso umido (PESO WET) dei campioni, valutandone la stabilità nel tempo per le diverse tipologie di gel (Grafico 18). Come ci si poteva aspettare, si è osservato, un incremento iniziale dei pesi (Appendice A2) dei campioni dovuti all'assorbimento del PBS da parte del gel.

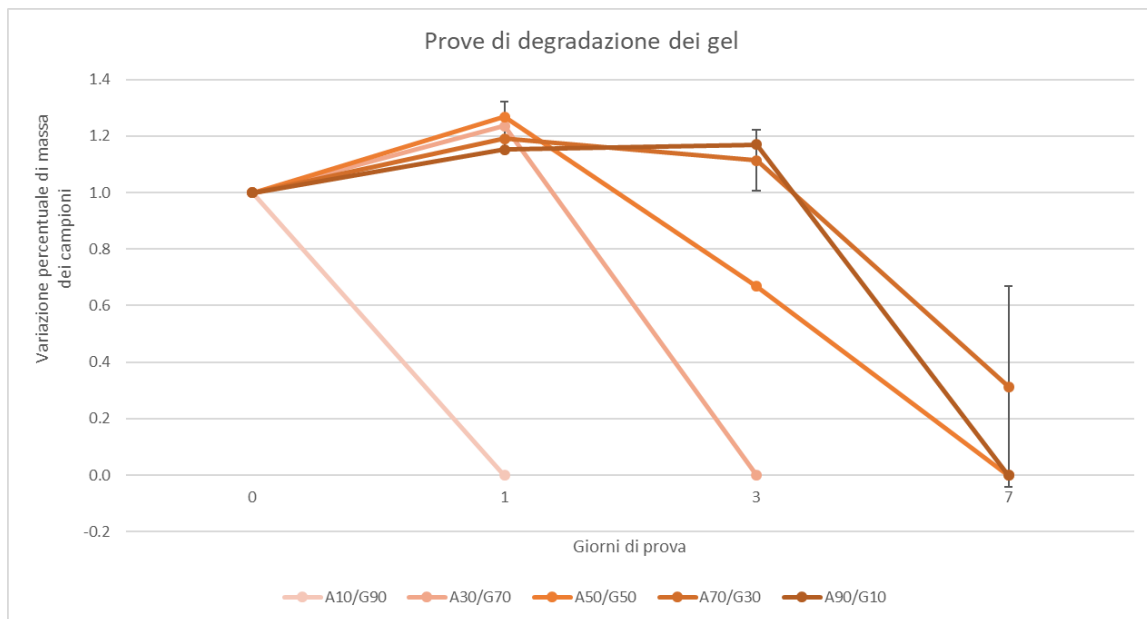


Grafico 21: Andamento delle prove di degradazione nel tempo.

Le diverse quantità di alginato e gelatina presenti all'interno dei campioni, influenzano i tempi di degradazione: al giorno 1, i campioni A10/G90 sono già degradati e al giorno 3 anche i campioni A30/G70. Per quanto riguarda le altre 3 classi di gel, i tempi di degradazione sono confrontabili: tutti i campioni sono degradati al settimo giorno.

Tabella 20: Analisi statistica del peso dei campioni: i valori in grassetto sono quelli che rispettano la condizione $p\text{-value} < 0.05$.

	peso campioni
giorno 0	0.017
giorno 1	0.0077
giorno 3	0.00437
giorno 7	0.077

L'analisi statistica conferma che i campioni non sono confrontabili, in quanto ognuno di essi ha un tempo di degradazione differente (Tab. 20).

I risultati ottenuti non sono quelli aspettati visto che dalla letteratura è emerso che queste tipologie di gel risultano essere stabili almeno per 21 giorni (tempo massimo per una coltura dinamica). Le motivazioni possono risiedere nel fatto che è stato modificato il protocollo: in questi studi, per esempio, veniva utilizzato il medium e veniva sostituito ogni due giorni^{50 51}.

Una possibile soluzione al problema potrebbe essere quella di aumentare le quantità dei sali responsabili della reticolazione in modo da avere un gel più reticolato che quindi abbia una velocità di degradazione più lenta.

3.3 Risultati e misure con microscopio ottico

Dopo aver caratterizzato meccanicamente il gel, si è passato alla realizzazione di scaffold in *Ortovatt* all'interno dei quali è stato iniettato il gel grazie all'utilizzo del bioreattore.

Lo strato di gel impermeabilizzante, contenuto all'interno dello scaffold, è stato analizzato per mezzo dello stereomicroscopio. Lo scaffold è stato fotografato sia nella parte anteriore (Fig. 31) che posteriore (Fig. 32) del campione. Tramite il programma di acquisizione delle immagini Nikon Nis-Elements D2.20, sono state effettuate le misurazioni dello spessore del gel ottenuto.

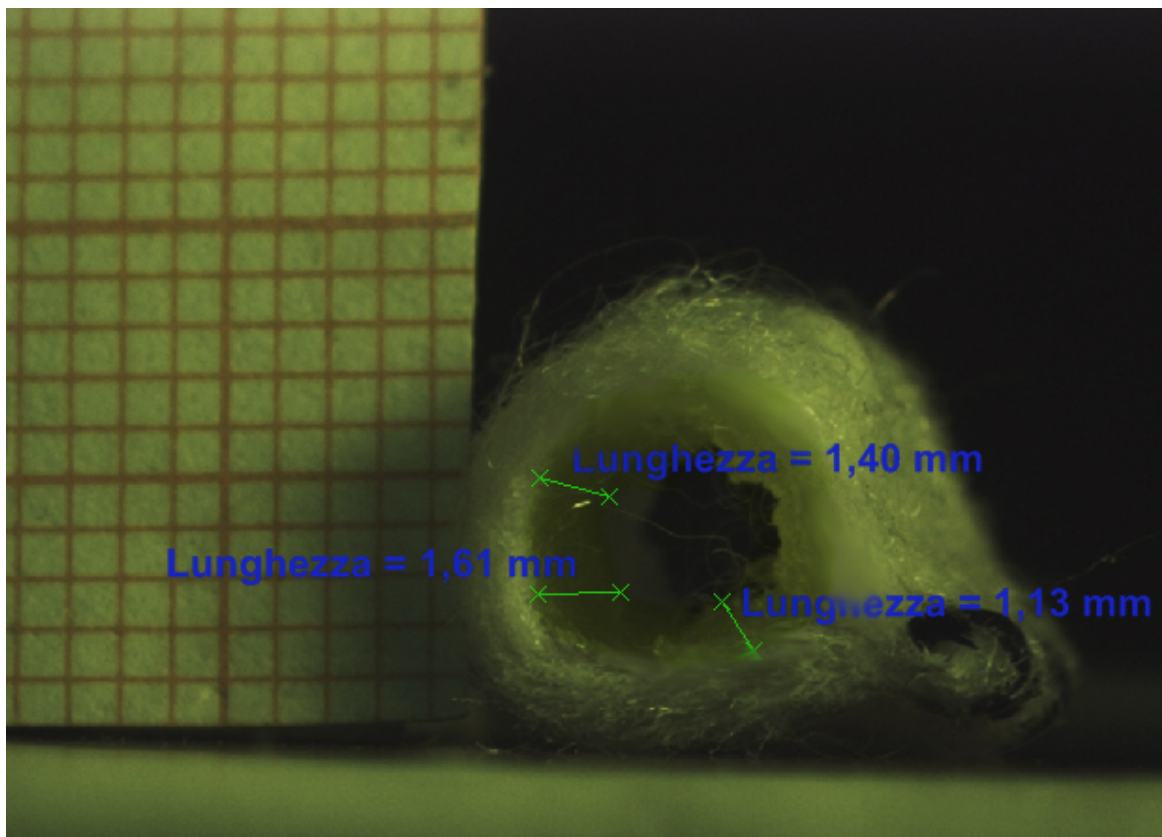


Figura 37: Scaffold in Ortovatt. Fronte.

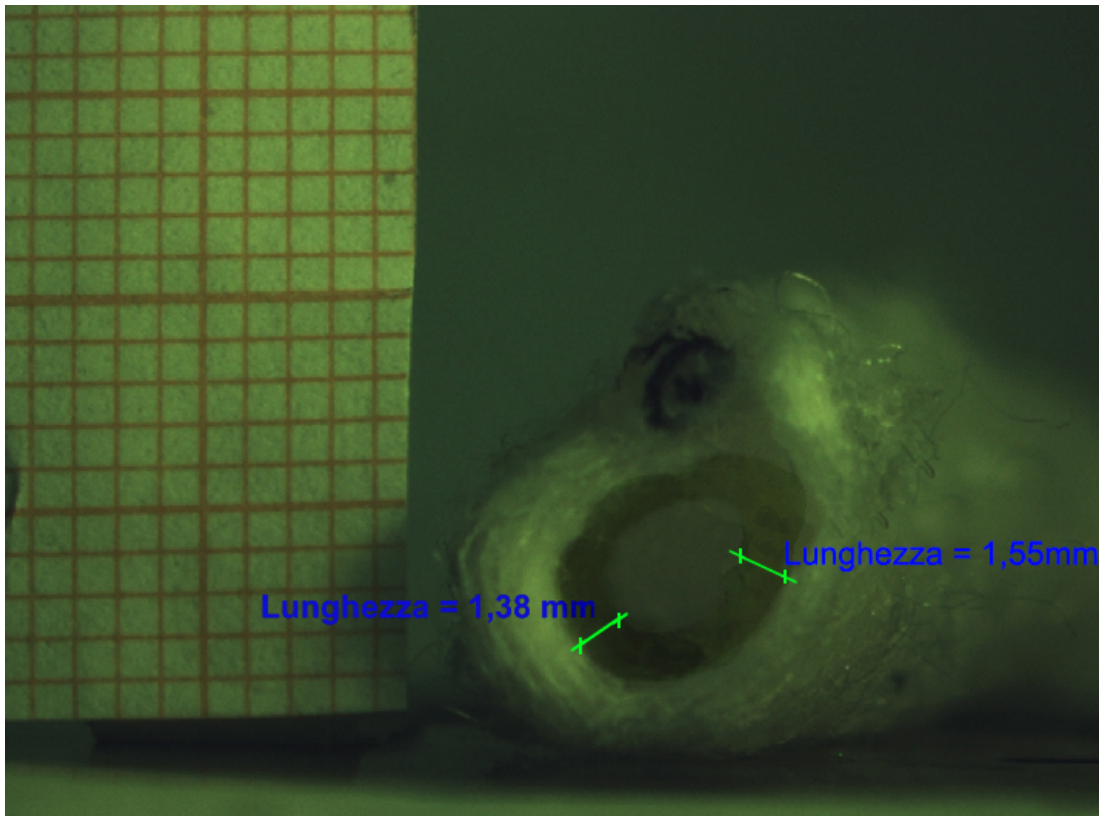


Figura 38: Scaffold in Ortovatt. Retro.

Il coating ottenuto per i vari scaffold è sempre relativamente omogeneo indipendentemente dalla classe di appartenenza del gel in questione. Inoltre, lo spessore del gel è circa 1.5 mm così come era stato stabilito.

3.4 Risultati prove preliminari di impermeabilizzazione dello scaffold

Sono state effettuate delle simulazioni di un circuito a perfusione per poter testare l'effettiva impermeabilità dei gel realizzati.

Nella fase di formazione dei gel, una maggiore percentuale di gelatina rispetto all'alginato permette una migliore fluidità. Nella simulazione a perfusione invece la maggioranza di alginato permette una tenuta e impermeabilità migliore.

Gli scaffold con gel di classe A10/G90 e A30/G70 si sono dimostrati poco impermeabili già da subito. Gli scaffold con gel del tipo A50/G50, A70/G30 e A90/G10 invece sono tutti

e tre confrontabili. Essi garantiscono una buona impermeabilità durante un flusso continuo di un'ora.

3.5 Risultati prova con scaffold

Si è deciso di effettuare una prova completa su uno scaffold in PGA/PLLA. È stato realizzato uno scaffold tubolare di lunghezza 62,7 mm, un diametro interno di $d = 9\text{mm}$. Il coating, che ci si è fissato di realizzare, è caratterizzato da uno spessore di circa 1.3 mm.

Poiché non sono state rilevate differenze significative nella caratterizzazione meccanica delle diverse classi di gel, si è deciso che il gel da utilizzare per impermeabilizzare lo scaffold tubolare poroso sia il A70/G30.

Questa scelta è stata anche dettata dalle seguenti osservazioni:

3. La composizione A90/G10 è stata esclusa poiché un comportamento troppo viscoso, dovuto all'alta percentuale di alginato, potrebbe rendere più difficoltosa la fuoriuscita del gel dai fori presenti sul mandrino del bioreattore utilizzato.
4. Alla luce dei risultati ottenuti dalle prove di degradazione, si è deciso di escludere le classi A10/G90 e A30/G70. Infatti, la presenza di una percentuale alta di gelatina, potrebbe sì favorire l'adesione cellulare, ma incrementerebbe anche la cinetica di degradazione del gel stesso. Inoltre, la velocità con cui le cellule degradano il gel non deve essere eccessivamente rapida: in questo modo le cellule hanno un tempo sufficiente per riprodursi e inserirsi all'interno dei pori presenti nella parte interna dello scaffold per occluderli.

In questo contesto, il 70-30 risulta un buon compromesso tra le diverse classi di gel analizzate.

Analogamente a quanto è stato effettuato con lo scaffold in *Ortovatt*, è stato impermeabilizzato lo scaffold in PGA/PLLA utilizzando il bioreattore *InBreath*.

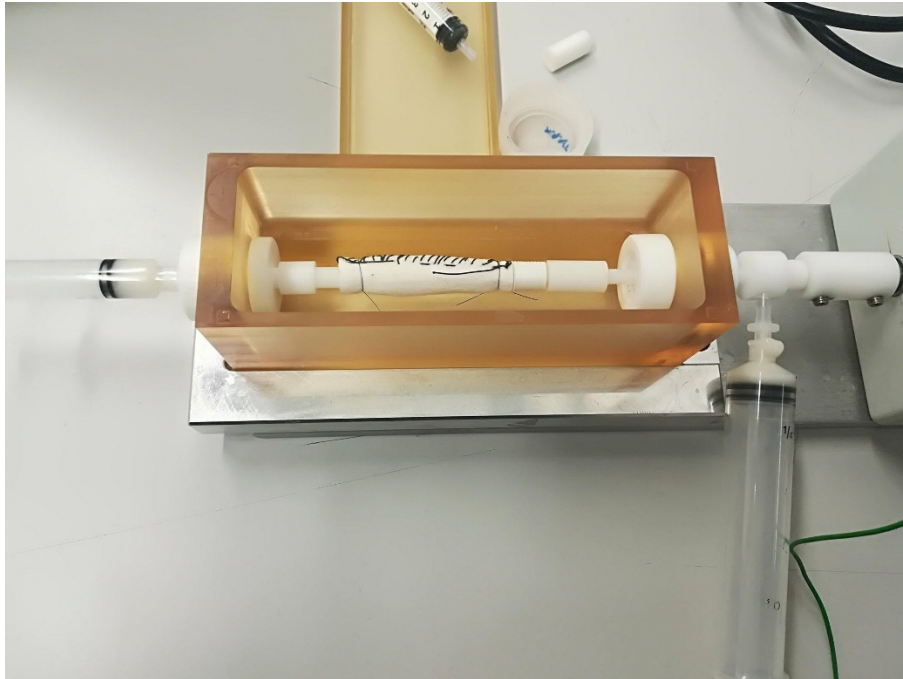


Figura 39: Inserimento del gel A70/G30 all'interno dello scaffold in PGA/PLLA.

Una volta realizzato il coating di gel (Fig. 33) sono state effettuate le misure dello spessore del gel per verificare la sua uniformità.

Lo strato di gel impermeabilizzante, contenuto all'interno dello scaffold, è stato analizzato per mezzo dello stereomicroscopio. Lo scaffold è stato fotografato sia nella parte anteriore (Fig. 34) che posteriore (Fig. 35) del campione. Tramite il programma di acquisizione delle immagini (Nikon Nis-Elements D2.20) sono state effettuate le misurazioni dello spessore del gel ottenuto.

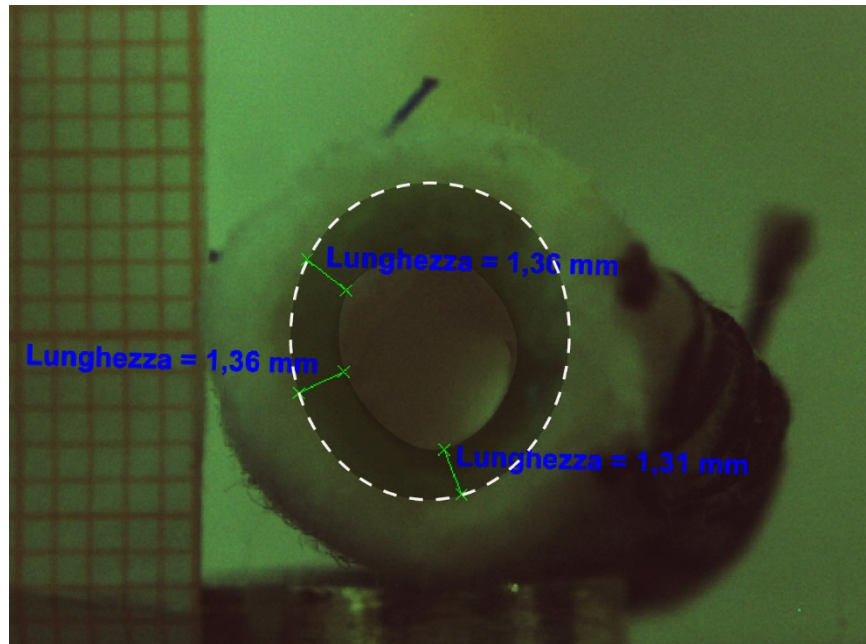


Figura 40: Coating di gel A70/G30 in scaffold in PGA/PLLA. Fronte.

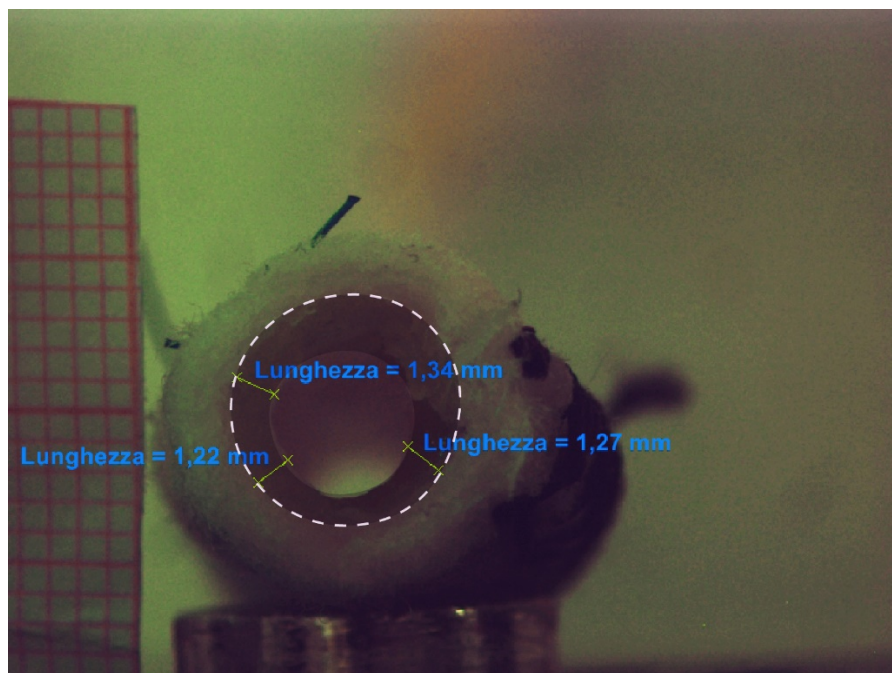


Figura 41: Coating di gel A70/G30 in scaffold in PGA/PLLA. Retro.

Il coating ottenuto è relativamente omogeneo. Inoltre, lo spessore del gel è circa 1.3 mm così come era stato stabilito.

In conclusione, è stata effettuata una simulazione di circuito a perfusione (Fig. 36) per poter testare l'effettiva impermeabilità del gel e la tenuta dello scaffold.

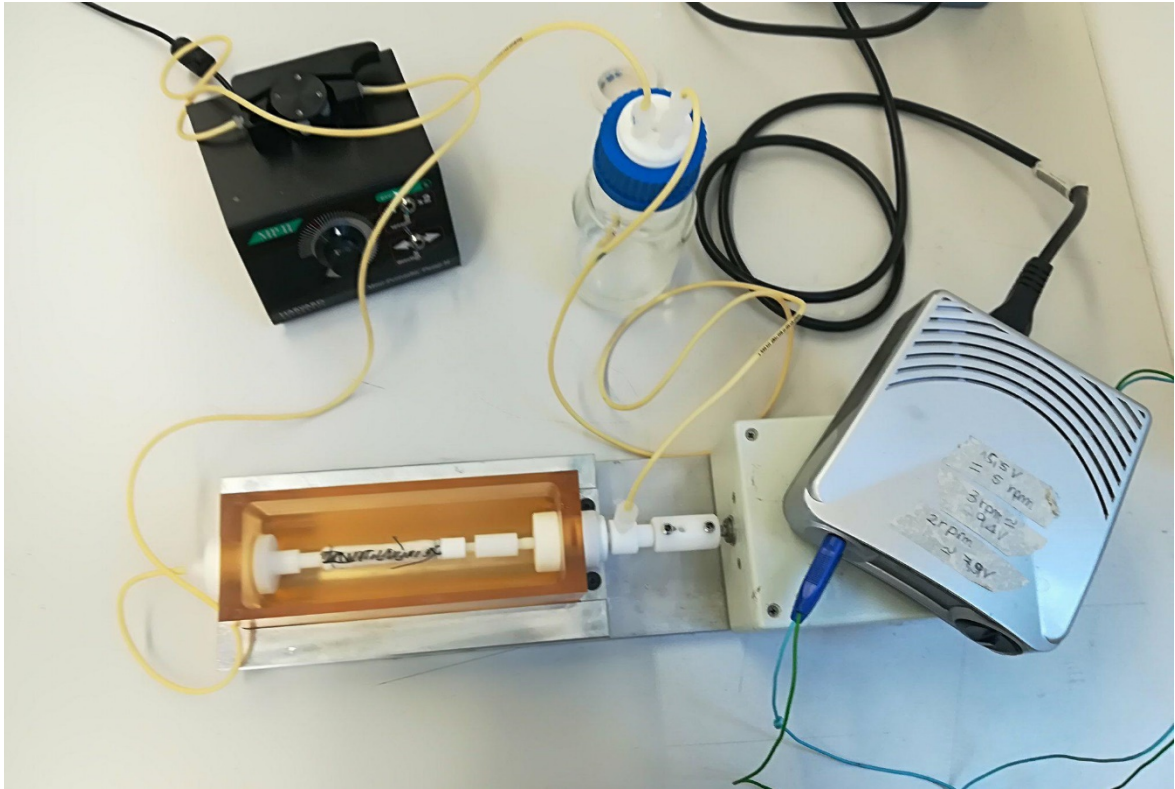


Figura 42: Circuito di perfusione a flusso continuo contenente lo scaffold in PGA/PLLA.

Lo scaffold realizzato e il suo coating di gel garantiscono una buona impermeabilità durante un flusso continuo di un'ora.

4. CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

Le patologie cardiovascolari costituiscono una delle principali cause di mortalità nel mondo, determinando oltre 17 milioni di morti all'anno. La loro elevata incidenza, rende necessario superare le problematiche connesse all'impiego di protesi vascolari e vasi autologhi per la sostituzione di vasi di piccolo calibro (diametro < 5 mm). A tal proposito, l'ingegneria dei tessuti si pone come possibile soluzione. Il successo di questa disciplina si basa sulla natura dello scaffold, sulla popolazione delle cellule seminate e sulle stimolazioni meccaniche, fisiche e biochimiche.

In tale contesto si colloca questo lavoro di tesi, in cui si propone la realizzazione di un coating di gel per impermeabilizzare scaffold polimerici porosi tubolari da perfondere in prima approssimazione con un flusso continuo simil-fisiologico.

Infatti, attraverso il coating di gel, da un lato è possibile ottenere l'endotelizzazione del lume dello scaffold e dall'altro favorire l'adesione delle VSMC sulla superficie esterna. Si ottiene così un tentativo di riproduzione della struttura di un vaso fisiologico. Di fatti, in questo modo la tunica intima e la tunica media sono anatomicamente separate ma funzionalmente unite.

Per poter impermeabilizzare lo scaffold, è stato utilizzato un bioreattore di tipo *InBreatH*. Esso permette la realizzazione di un coating uniforme attraverso due ingressi speculari che sono posti ai due lati della camera. Inoltre, sono stati realizzati dei cilindri cavi da applicare sul mandrino per poter impermeabilizzare scaffold di lunghezze differenti evitando la fuoriuscita del gel in punti non voluti.

Poiché l'*InBreatH* è un bioreattore versatile, si potrebbe pensare di effettuare alcune modifiche: si potrebbe cercare di ottenere un coating ancora più sottile e un diametro esterno dello scaffold paragonabile alle dimensioni reali di un vaso di piccolo calibro (<5 mm). Inoltre, poiché l'accesso alla camera dal lato del motore risulta instabile, si potrebbe considerare una soluzione alternativa, magari più simile a quella ottenuta tramite connessione Luer-lock che si trova al lato opposto della camera.

Per quanto riguarda la caratterizzazione meccanica dei gel, sono state effettuate sia prove di compressione non confinata che prove di degradazione dei gel.

Dalle prime è emerso che il comportamento del gel è statisticamente indipendente dal tipo di composizione scelta. Infatti, le classi di gel ottenute, sottoposte ad una deformazione via via crescente (5%, 10%, 15%, 20%), hanno tutte modulo di rilassamento, modulo elastico e sforzi statisticamente confrontabili. Inoltre, questo risultato è stato confermato dai risultati ottenuti testando i campioni di 100% Gelatina e 100% Alginato.

Dalle prove di degradazione invece, è emerso che la quantità di alginato e gelatina influenzano i tempi di degradazione: una maggiore quantità di gelatina fa degradare il campione in brevissimo tempo. Aumentando la percentuale di alginato la situazione migliora, ma dopo 7 giorni dall'inizio della prova i campioni sono tutti degradati indipendentemente dalla classe di appartenenza. Questo risultato è in contrasto rispetto a quello atteso. Da alcuni studi in letteratura, tali tipi di gel, erano risultati stabili nel tempo e non si degradavano a contatto con il terreno di coltura. Queste differenze possono essere emerse sia perché in questo lavoro di tesi è stato usato PBS e non medium, sia perché non sono state rispettate le condizioni di sterilità evidentemente necessarie per una buona riuscita della prova.

Successivamente, il gel realizzato e caratterizzato meccanicamente, è stato iniettato all'interno del lume dello scaffold in *Ortovatt* per poter effettuare ulteriori analisi per scegliere la classe di gel da utilizzare per impermeabilizzare uno scaffold in PGA/PLLA.

Dal test è emerso che a condizione che la soluzione di gel sia stata immediatamente iniettata dopo l'aggiunta di GDL, agente che definisce il grado di gelificazione, la percentuale di alginato non ha influenzato la distribuzione omogenea del gel sul lume dello scaffold. Infatti con questa accortezza, il processo di reticolazione è iniziato solo nel bioreattore, permettendo così la fuoriuscita uniforme del gel dai fori del mandrino.

Dalle analisi effettuate attraverso stereomicroscopio è emerso che il coating è omogeneo e si distribuisce uniformemente lungo tutto il mandrino, indipendentemente dalla classe di gel scelto.

Dalle analisi di simulazione di circuito a perfusione continua, è sorto che le classi di gel con una percentuale di alginato almeno del 50% sono impermeabili per tutta la durata della prova.

Infine, l'ultima parte di questo lavoro di tesi si è focalizzata sulla realizzazione del coating dello scaffold in PGA/PLLA.

Per tale scopo è stata scelta la classe di gel A70/G30 per le motivazioni descritte nel paragrafo 3.5.

Sono state effettuate delle misurazioni attraverso stereomicroscopio e una simulazione di circuito a flusso continuo che confermano i risultati che erano stati ottenuti con il coating in *Ortovatt*.

In conclusione, accoppiando questi gel di alginato/gelatina con il metodo sperimentale per creare un rivestimento in gel uniforme tubolare, si è in grado di coprire uniformemente la superficie luminale degli scaffold porosi. In questo modo è possibile supportare l'ottenimento di due risultati rilevanti: il confinamento delle EC nello strato luminale dello scaffold a doppia struttura, fornendo potenzialmente uno scaffold in grado di riprodurre la struttura anatomica dei vasi sanguigni; la riduzione delle perdite del medium (iniettato nel lume) a causa della porosità, consentendo la perfusione dello scaffold con portate conosciute.

In definitiva, la possibilità di effettuare un'indagine approfondita sul comportamento cellulare rappresenta sicuramente un possibile sviluppo futuro dello scaffold tubolare poroso impermeabilizzato realizzato in questo lavoro di tesi.

APPENDICE

A.1 Prove a compressione non confinata

Nelle tabelle seguenti (Tab. dalla 21 alla 32) sono riassunti i valori degli sforzi a valle e di picco presi dalla curva Sforzo-tempo.

Tabella 21: Sforzi a valle dei campioni A10/G90.

SFORZI A VALLE σ [kPa]				
CAMPIONI A10/G90				
	1	2	3	4
5%	0.10185925	0.184619734	0.343774677	0.273746502
10%	0.257831226	0.550676103	0.582507092	0.576140894
15%	0.592056888	0.8403381	0.821239506	0.81169021
20%	0.986761481	1.14591559	1.082253613	1.012225438

Tabella 22: Sforzi a valle dei campioni A30/G70.

SFORZI A VALLE σ [kPa]				
CAMPIONI A30/G70				
	1	2	3	4
5%	0.401070457	0.120957757	0.261014107	0.40807232
10%	0.716197244	0.296028194	0.636619772	0.630888719
15%	1.069521218	0.674816959	0.986760647	0.974025974
20%	1.524704355	1.075887415	1.416478994	1.360134963

Tabella 23: Sforzi a valle dei campioni A50/G50.

SFORZI A VALLE σ [kPa]				
CAMPIONI A50/G50				
	1	2	3	4
5%	0.210084525	0.155971844	0.267379679	0.101859164
10%	0.483831027	0.366056369	0.611153552	0.238732415
15%	0.833971902	0.662084563	0.814871403	0.467915533
20%	1.14591559	1.066338119	1.327349121	0.792591617

Tabella 24: Sforzi a valle dei campioni A70/G30.

SFORZI A VALLE σ [kPa]				
CAMPIONI A70/G30				
	1	2	3	4
5%	0.216450723	0.206900942	0.181436635	0.117774658
10%	0.585690191	0.541125541	0.47428173	0.292845095
15%	1.110901503	1.050420168	0.929464868	0.50292962
20%	1.772986066	1.699770817	1.492873366	0.744845134

Tabella 25: Sforzi a valle dei campioni A90/G10.

SFORZI A VALLE σ [kPa]				
CAMPIONI A90/G10				
	1	2	3	4
5%	0.08276057	0.178253536	0.181436635	0.11140846
10%	0.194169031	0.436084544	0.401070457	0.276929601
15%	0.350140875	0.655718366	0.534760609	0.512478917
20%	0.572957795	0.703464848	0.630253575	0.716197244

Tabella 26: Sforzi a valle dei campioni 100% Gelatina.

SFORZI A VALLE σ [kPa]			
CAMPIONI G100			
	1	2	3
5%	0.079577285	0.076394194	0.060478737
10%	0.184619302	0.248281131	0.178253119
15%	0.257830405	0.662083015	0.499745353
20%	0.814871403	1.098166539	1.486503692

Tabella 27: Sforzi di picco dei campioni A10/G90.

SFORZI DI PICCO σ [kPa]				
CAMPIONI A10/G90				
	1	2	3	4
5%	0.181436211	0.289661319	0.541125541	0.407435702
10%	0.509294627	0.773491215	0.840336134	0.80850522
15%	0.837153043	1.145912911	1.117265088	1.133180545
20%	1.298701299	1.515151515	1.426024955	1.330532213

Tabella 28: Sforzi di picco dei campioni A30/G70.

SFORZI DI PICCO σ [kPa]				
CAMPIONI A30/G70				
	1	2	3	4
5%	0.566590272	0.171886937	0.369238605	0.566590272
10%	1.00903998	0.451998981	0.907181054	1.005856888
15%	1.454672778	0.970842883	1.384644767	1.352813853
20%	2.040361599	1.531066972	1.925770308	1.893939394

Tabella 29: Sforzi di picco dei campioni A50/G50.

SFORZI DI PICCO σ [kPa]				
CAMPIONI A50/G50				
	1	2	3	4
5%	0.286478228	0.442449707	0.175070028	0.238731856
10%	0.604787369	0.83078686	0.343773873	0.490196078
15%	1.012223071	1.231856379	0.627069009	0.859434683
20%	1.578813344	1.757066463	1.059969442	1.400560224

Tabella 30: Sforzi di picco dei campioni A70/G30.

SFORZI DI PICCO σ [kPa]				
CAMPIONI A70/G30				
	1	2	3	4
5%	0.311942959	0.331041508	0.286478228	0.229182582
10%	0.754392666	0.728927935	0.649350649	0.467914439
15%	1.416475681	1.441940413	1.241405653	0.757575758
20%	2.384135472	2.298192004	2.075375605	1.114081996

Tabella 31: Sforzi di picco dei campioni A90/G10.

SFORZI DI PICCO σ [kPa]				
CAMPIONI A90/G10				
	1	2	3	4
5%	0.15597148	0.299210593	0.299210593	0.194168577
10%	0.29284441	0.627069009	0.639801375	0.420168067
15%	0.502928444	1.063152534	0.996307614	0.725744843
20%	0.805322129	1.406926407	1.263687293	1.110898905

Tabella 32: Sforzi di picco dei campioni 100% Gelatina.

SFORZI DI PICCO σ [kPa]			
CAMPIONI G100			
	1	2	3
5%	0.114591291	0.149605297	0.117774382
10%	0.238731856	0.401069519	0.261013496
15%	0.391520244	0.923096511	0.627069009
20%	1.00903998	1.155462185	1.874840845

Nelle tabelle seguenti (Tabelle dalla 33 alla 44) sono riassunti i valori dei moduli di rilassamento e dei moduli elastici ricavati conoscendo gli sforzi corrispondenti.

Tabella 33: Moduli di rilassamento dei campioni A10/G90.

MODULI ELASTICI DI RILASSAMENTO E_r [kPa]				
CAMPIONI A10/G90				
	1	2	3	4
5%	2.037184992	3.69239468	6.875493542	5.474930042
10%	3.119439519	7.321127382	4.774648293	6.047887837
15%	6.684513256	5.793239929	4.774648293	4.710986316
20%	7.894091845	6.111549815	5.220282133	4.010704566

Tabella 34: Moduli di rilassamento dei campioni A30/G70.

MODULI ELASTICI DI RILASSAMENTO E_r [kPa]				
CAMPIONI A30/G70				
	1	2	3	4
5%	8.021409132	2.419155135	5.220282133	8.085071109
10%	6.302535746	3.501408748	7.512113314	4.456338407
15%	7.066479473	7.575775291	7.002817496	6.811831564
20%	9.103662745	8.021409132	8.594366927	7.766761223

Tabella 35: Moduli di rilassamento dei campioni A50/G50.

MODULI ELASTICI DI RILASSAMENTO E_r [kPa]				
CAMPIONI A50/G50				
	1	2	3	4
5%	4.201690498	2.037183272	5.347593583	3.119436885
10%	5.474930042	2.737465021	6.875477464	4.201690498
15%	7.002817496	4.583662361	4.074357016	5.920563883
20%	6.238873769	6.493521678	10.24955437	8.085071109

Tabella 36: Moduli di rilassamento dei campioni A70/G30.

MODULI ELASTICI DI RILASSAMENTO Er [kPa]				
CAMPIONI A70/G30				
	1	2	3	4
5%	4.329014452	4.138018844	3.628732702	2.355493158
10%	7.384789359	6.684491979	5.856901906	3.501408748
15%	10.50422624	10.18589254	9.103662745	4.201690498
20%	13.24169127	12.98701299	11.26816997	4.83831027

Tabella 37: Moduli di rilassamento dei campioni A90/G10.

MODULI ELASTICI DI RILASSAMENTO Er [kPa]				
CAMPIONI A90/G10				
	1	2	3	4
5%	1.655211408	3.565070725	3.628732702	2.228169203
10%	2.228169203	5.156620156	4.392676429	3.310422816
15%	3.119436885	4.392676429	2.673803044	4.710986316
20%	4.456338407	0.954929659	1.909859317	4.074366543

Tabella 38: Moduli di rilassamento dei campioni 100% Gelatina.

MODULI ELASTICI DI RILASSAMENTO Er [kPa]			
CAMPIONI G100			
	1	2	3
5%	1.591545709	1.527883881	1.209574739
10%	2.100840336	3.437738732	2.35548765
15%	1.464222052	8.276037688	6.429844665
20%	11.14081996	8.721670486	19.73516679

Tabella 39: Moduli elastici dei campioni A10/G90.

MODULI ELASTICI E [kPa]				
CAMPIONI A10/G90				
	1	2	3	4
5%	3.628724217	5.793226381	10.82251082	8.148714031
10%	8.116883117	11.73287497	9.899414311	10.62515915
15%	11.56098803	11.7965368	10.58696206	10.99439776
20%	14.01196842	13.35625159	11.95569137	10.28138528

Tabella 40: Moduli elastici dei campioni A30/G70.

MODULI ELASTICI E [kPa]				
CAMPIONI A30/G70				
	1	2	3	4
5%	11.33180545	3.437738732	7.384772091	11.33180545
10%	12.08938121	6.671759613	12.88515406	11.95569137
15%	14.65495289	13.4262796	14.89686784	14.43850267
20%	19.23860453	16.98497581	18.5828877	18.3982684

Tabella 41: Moduli elastici dei campioni A50/G50.

MODULI ELASTICI E [kPa]				
CAMPIONI A50/G50				
	1	2	3	4
5%	5.729564553	8.848994143	3.50140056	4.774637128
10%	7.69574739	11.19811561	4.838298956	6.684491979
15%	10.50446142	12.36949325	7.754010695	9.842118666
20%	14.91626687	18.12452254	11.83473389	14.74407945

Tabella 42: Moduli elastici dei campioni A70/G30.

MODULI ELASTICI E [kPa]				
CAMPIONI A70/G30				
	1	2	3	4
5%	6.23885918	6.62083015	5.729564553	4.583651642
10%	10.76521518	10.44053985	9.300993125	6.951871658
15%	16.57117392	18.01629743	15.29157117	9.199134199
20%	25.38197097	24.95543672	22.8100331	12.15304304

Tabella 43: Moduli elastici dei campioni A90/G10.

MODULI ELASTICI E [kPa]				
CAMPIONI A90/G10				
	1	2	3	4
5%	3.1194296	5.984211867	5.984211867	3.88337153
10%	4.201680672	8.944486886	9.173669468	6.175197352
15%	6.175197352	12.51591546	11.84746626	8.969951617
20%	9.014514897	14.89050166	14.5021645	11.96205755

Tabella 44: Moduli elastici dei campioni 100% Gelatina.

MODULI ELASTICI E [kPa]			
CAMPIONI G100			
	1	2	3
5%	2.291825821	2.992105933	2.35548765
10%	3.183091418	6.493506494	5.220269926
15%	4.138018844	13.49630761	12.54138019
20%	15.02419149	9.867583397	37.49681691

Nella tabella seguente (Tab. 45) sono riassunti i dati relativi al campione 100% Alginato che è stato testato.

Tabella 45: Sforzi e moduli elastici relativi al campione 100% Alginato.

CAMPIONE A100				
	σ_{valle}	σ_{picco}	E_{ril}	E
5%	0.117774382	0.241914948	2.35548765	4.838298956
10%	0.257830405	0.502928444	2.801120448	7.703081232
15%	0.423351159	0.827603769	3.310415075	11.39546728
20%	0.522026993	1.171377642	1.973516679	14.96052967

A.2 Prove di degradazione

Nelle tabelle seguenti (Tabelle 46-47) sono riassunti i pesi dei campioni e le loro variazioni misurate rispetto al giorno zero.

Tabella 46: Pesi dei campioni di tutte le classi di gel.

PESI [g]					
		giorno 0	giorno 1	giorno 3	giorno 7
A10/G90	1	0.76000	0.00000	0.00000	0.00000
	2	0.79000	0.00000	0.00000	0.00000
	3	0.74000	0.00000	0.00000	0.00000
	4	0.70000	0.00000	0.00000	0.00000
A30/G70	1	0.62000	0.73000	0.00000	0.00000
	2	0.71000	0.83000	0.00000	0.00000
	3	0.78000	1.06000	0.00000	0.00000
	4	0.72000	0.89000	0.00000	0.00000
A50/G50	1	0.60000	0.77000	0.00000	0.00000
	2	0.68000	0.83000	0.45000	0.00000
	3	0.72000	0.92000	0.34000	0.00000
	4	0.65000	0.84000	1.00000	0.00000
A70/G30	1	0.88000	1.07000	1.05000	0.33000
	2	0.78000	0.92000	0.95000	0.00000
	3	0.88000	1.00000	0.88000	0.00000
	4	0.91000	1.12000	0.95000	0.80000
A90/G10	1	0.71000	0.83000	0.83000	0.00000
	2	0.75000	0.86000	0.85000	0.00000
	3	0.61000	0.73000	0.75000	0.00000
	4	0.81000	0.89000	0.93000	0.00000

Tabella 47: Variazioni dei pesi di tutte le classi di gel.

VARIAZIONI DEI PESI [g/g]					
		giorno 0	giorno 1	giorno 3	giorno 7
A10/G90	1	1.00000	0.00000	0.00000	0.00000
	2	1.00000	0.00000	0.00000	0.00000
	3	1.00000	0.00000	0.00000	0.00000
	4	1.00000	0.00000	0.00000	0.00000
A30/G70	1	1.00000	1.17742	0.00000	0.00000
	2	1.00000	1.16901	0.00000	0.00000
	3	1.00000	1.35897	0.00000	0.00000
	4	1.00000	1.23611	0.00000	0.00000
A50/G50	1	1.00000	1.28333	0.00000	0.00000
	2	1.00000	1.22059	0.66176	0.00000
	3	1.00000	1.27778	0.47222	0.00000
	4	1.00000	1.29231	1.53846	0.00000
A70/G30	1	1.00000	1.21591	1.19318	0.37500
	2	1.00000	1.17949	1.21795	0.00000
	3	1.00000	1.13636	1.00000	0.00000
	4	1.00000	1.23077	1.04396	0.87912
A90/G10	1	1.00000	1.16901	1.16901	0.00000
	2	1.00000	1.14667	1.13333	0.00000
	3	1.00000	1.19672	1.22951	0.00000
	4	1.00000	1.09877	1.14815	0.00000

BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organization. Cardiovascular diseases, Fact Sheet. 2017:0-4.
2. Ministero della Salute. Struttura demografica, qualità della vita e mortalità. *Relaz sullo stato Sanit del Paese 2012-2013*. 2014:39-71.
3. Redaelli A, Montecvecchi F. *Biomeccanica. Analisi Multiscala Dei Tessuti Biologici*. Pàtron editore - Bologna; 2007.
4. Martini FH, Timmons MJ, Tallitsch RB. *Anatomia Umana*. EdiSES editore - Napoli; 2008.
5. Jufri NF, Mohamedali A, Avolio A, Baker MS. Mechanical stretch: physiological and pathological implications for human vascular endothelial cells. *Vasc Cell*. 2015;7(1):8. doi:10.1186/s13221-015-0033-z.
6. Shyu K-G. Cellular and molecular effects of mechanical stretch on vascular cells and cardiac myocytes. *Clin Sci*. 2009;116(5):377-389. doi:10.1042/CS20080163.
7. Tresoldi C, Pellegata AF, Mantero S. *Cells and Stimuli in Small -Caliber Blood Vessel Tissue Engineering*. Vol 10. Regenerative medicine; 2015.
8. Pennati G.; Pietrabissa R.; Appunti del corso di Progettazione di Endoprotesi. 2015;Protesi va:1-27.
9. Pashneh-Tala S, MacNeil S, Claeysens F. The Tissue-Engineered Vascular Graft—Past, Present, and Future. *Tissue Eng Part B Rev*. 2015;22(1):ten.teb.2015.0100. doi:10.1089/ten.teb.2015.0100.
10. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science (80-)*. 1993;260(5110):920-926. doi:10.1007/978-3-642-02824-3.
11. Vacanti JP, Langer R. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet*. 1999;354:S32-S34. doi:10.1016/S0140-6736(99)90247-7.
12. Raimondi MT. Appunti del corso Technologies of rigenerative medicine. 2016:47-86.
13. McKee, J. Andrew; Soma SRB, Boyer MJ., Hamad NM., Lawson JH., Laura E. Niklason; Counter Christopher M. Human arteries engineered in vivo. *EMBO reports* 4, 633–638. 2003.
14. Liu JY, Swartz DD, Peng HF, Gugino SF, Russell JA, T.Andreadis. S. functional tissue-engineered blood vessels from bone marrow progenitors cells. *Cardiovasc Res*. 2007;75(3):618-628.
15. Matsumura G, Miyagawa-Tomita S, Shin'Oka T, Ikada Y, Kurosawa H. First evidence that bone marrow cells contribute to the construction of tissue-engineered vascular autografts in vivo. *Circulation*. 2003;108(14):1729-1734. doi:10.1161/01.CIR.0000092165.32213.61.
16. Gong Zhaodi; Niklason Laura E.; Small-diameter human vessel wall engineered from bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hMSCs). *FASED J*. 2008;22(6): 163.

17. Hashi, Craig K.; Zhu, Yiqian; Yang, Guo-Yuan; Young, William L.; Hsiao Benjamin S.; Wang, Karin; Chu, Benjamin; Li S. Antithrombogenic property of bone marrow mesenchymal stem cells in nanofibrous vascular grafts. 2007.
18. Zhang P, Moudgill N, Hager E, et al. Endothelial Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells from Elderly Patients with Cardiovascular Disease. *Stem Cells Dev.* 2011;20(6):977-988. doi:10.1089/scd.2010.0152.
19. Nieponice A, Soletti L, Guan J, et al. *In Vivo* Assessment of a Tissue-Engineered Vascular Graft Combining a Biodegradable Elastomeric Scaffold and Muscle-Derived Stem Cells in a Rat Model. *Tissue Eng Part A.* 2010;16(4):1215-1223. doi:10.1089/ten.tea.2009.0427.
20. Krawiec, J.T.; Vorp DA. Adult stem cell-based tissue engineered blood vessels: a review. *Biomaterials.* 2012.
21. Reynolds AJ, Lawrence C, Cserhalmi-Friedman PB, Christiano AM, Jahoda CAB. Trans-gender induction of hair follicles. *Nature.* 1999;402(6757):33-34. doi:10.1038/46938.
22. Wang Y, Yin P, Bian G-L, et al. The combination of stem cells and tissue engineering: an advanced strategy for blood vessels regeneration and vascular disease treatment. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):194. doi:10.1186/s13287-017-0642-y.
23. Hibino N, Duncan DR, Nalbandian A, Yi T, Qyang Y, Breuer CK. Evaluation of the Use of an iPS Cell Sheet for the Construction of Tissue Engineered Vascular Grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2012;143(3):696-703. doi:10.1016/j.jtcvs.2011.06.046.Evaluation.
24. Wystrychowski W, McAllister TN, Zagalski K, Dusserre N, Cierpka L, L'Heureux N. First human use of an allogeneic tissue-engineered vascular graft for hemodialysis access. *J Vasc Surg.* 2014;60(5):1353-1357. doi:10.1016/j.jvs.2013.08.018.
25. Thottappillil N, Nair PD. Scaffolds in vascular regeneration: Current status. *Vasc Health Risk Manag.* 2015;11:79-91. doi:10.2147/VHRM.S50536.
26. Ong CS, Zhou X, Huang CY, Fukunishi T, Zhang H, Hibino N. Tissue engineered vascular grafts: current state of the field. *Expert Rev Med Devices.* 2017;14(5):383-392. doi:10.1080/17434440.2017.1324293.
27. Wu W, Allen RA, Wang Y. Fast-degrading elastomer enables rapid remodeling of a cell-free synthetic graft into a neoartery. *Nat Med.* 2012;18(7):1148-1153. doi:10.1038/nm.2821.
28. Hibino N, McGillicuddy E, Matsumura G, et al. Late-term results of tissue-engineered vascular grafts in humans. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2010;139(2):431-436.e2. doi:10.1016/j.jtcvs.2009.09.057.
29. Boccafoschi F, Rajan N, Habermehl J, Mantovani D. Preparation and characterization of a scaffold for vascular tissue engineering by direct-assembling of collagen and cells in a cylindrical geometry. *Macromol Biosci.* 2007;7(5):719-726. doi:10.1002/mabi.200600242.
30. Achilli M, Lagueux J, Mantovani D. On the effects of UV-C and pH on the

- mechanical behavior, molecular conformation and cell viability of collagen-based scaffold for vascular tissue engineering. *Macromol Biosci.* 2010;10(3):307-316. doi:10.1002/mabi.200900248.
31. Girton TS, Oegema TR, Grassl ED, Isenberg BC, Tranquillo RT. Mechanisms of Stiffening and Strengthening in Media-. *J Biomech Eng.* 2000;122(June).
 32. Schutte SC, Chen Z, Brockbank KGM, Nerem RM. Cyclic Strain Improves Strength and Function of a Collagen-Based Tissue-Engineered Vascular Media. *Tissue Eng Part A.* 2010;16(10):3149-3157. doi:10.1089/ten.tea.2010.0009.
 33. Charulatha V, Rajaram A. Influence of different crosslinking treatments on the physical properties of collagen membranes. *Biomaterials.* 2003;24(5):759-767. doi:10.1016/S0142-9612(02)00412-X.
 34. Ryan AJ, O'Brien FJ. Insoluble elastin reduces collagen scaffold stiffness, improves viscoelastic properties, and induces a contractile phenotype in smooth muscle cells. *Biomaterials.* 2015;73:296-307. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.09.003.
 35. De la Puente P, Ludeña D. Cell culture in autologous fibrin scaffolds for applications in tissue engineering. *Exp Cell Res.* 2014;322(1):1-11. doi:10.1016/j.yexcr.2013.12.017.
 36. Sell SA, McClure MJ, Garg K, Wolfe PS, Bowlin GL. Electrospinning of collagen/biopolymers for regenerative medicine and cardiovascular tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009;61(12):1007-1019. doi:10.1016/j.addr.2009.07.012.
 37. Syedain Z, Reimer J, Lahti M, Berry J, Johnson S, Tranquillo RT. Tissue engineering of acellular vascular grafts capable of somatic growth in young lambs. *Nat Commun.* 2016;7:1-9. doi:10.1038/ncomms12951.
 38. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak DVM. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials.* 2011;32(12):3233-3243. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.01.057.An.
 39. Martin I, Wendt D, Heberer M. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 2004;22(2):80-86. doi:10.1016/j.tibtech.2003.12.001.
 40. Salehi-nik N, Amoabediny G, Pouran B, et al. Engineering Parameters in Bioreactor ' s Design: A Critical Aspect in Tissue Engineering. *Biomed Res Int.* 2015;2013(3):15 pages. doi:http://dx.doi.org/10.1155/2013/762132.
 41. Riboldi SA, Mantero S. I bioreattori : piattaforme per la fabbricazione di prodotti per terapie avanzate. 2007:163-190.
 42. Korossis S et al. Bioreactors in tissue engineering. *Top Tissue Eng.* 2005;(2):1-23. doi:10.1007/978-3-642-21913-9_11.
 43. BIOREACTORS InBreath 3D Bioreactor for Hollow Organs , Bronchus , Trachea & Blood Vessels. 2009;30:8999.
 44. Asnaghi MA, Jungebluth P, Raimondi MT, et al. A double-chamber rotating bioreactor for the development of tissue-engineered hollow organs: From concept to clinical trial. *Biomaterials.* 2009;30(29):5260-5269. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.07.018.
 45. Cellon revolutions in cell and tissue culture. Biofelt scaffolds from BMS.

- <http://www.cellon.lu/biofelt-scaffold.html>.
46. Sun J, Tan H. Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications. *Materials (Basel)*. 2013;6(4):1285-1309. doi:10.3390/ma6041285.
 47. Zhu JMRE. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffold. *Expert Rev Med Devices*. 2011;8(5):607-626.
 48. Aviva; Sabin. *Medical Statistics at a Glance*. terza ediz. (Blackwell W, ed.); 2009.
 49. K. Y. Lee DJM. Alginate : properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci*. 2012;37(1):106-126. doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003.Alginate.
 50. Giuseppe M Di, Law N, Webb B, et al. Mechanical behaviour of alginate-gelatin hydrogels for 3D bioprinting. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2018;79(September 2017):150-157. doi:10.1016/j.jmbbm.2017.12.018.
 51. Tresoldi C. Vascular Tissue Engineering: coupled approach between a computational model and experimental strategies for in vitro pulsatile perfusion cultures on three-dimensional tubular scaffolds. 2016;(August).

RINGRAZIAMENTI

Un sentito ringraziamento innanzitutto alla Prof.ssa Sara Mantero i cui insegnamenti e la cui disponibilità sono stati indispensabili non solo per la realizzazione di questo lavoro, ma anche per acquisire un approccio scientifico ed affrontare le difficoltà sempre con la lucidità e la fiducia necessarie.

Un ringraziamento particolare alla Prof.ssa Paola Petrini che, con grande disponibilità, mi ha fornito gli strumenti necessari per imparare a realizzare i coating di gel.

Ringrazio inoltre la Prof.ssa Federica Boschetti, non solo per la disponibilità dimostratami nella realizzazione delle prove meccaniche ma anche per i preziosi consigli nell'interpretazione dei risultati.

Grazie alle mie amiche e compagne di università Giorgia, Martina, Laura e Simona con cui ho condiviso gioie e dolori in questi anni. Un grazie particolare ad Elisa e Fabio, per il sostegno ricevuto in questo ultimo mese di tesi.

Grazie ai ragazzi di Svoltastudenti, non solo per aver arricchito il mio percorso di esperienze extracurricolari, ma soprattutto per essere una grande famiglia.

Grazie alle mie amiche di sempre, ad Alessia, Agnese, Francesca, Federica, Ylenia, Marita, per essermi state vicine anche se a 900 chilometri di distanza.

Grazie a Fabio, per avermi dimostrato che la nostra amicizia è più unica che rara.

Grazie ad Alessio e Tommaso, per essere stati il sostegno più grande in questi ultimi mesi.

Grazie ai miei nonni, zii, cugini, tutti. Vivere lontano da casa mi ha fatto capire che siete voi i pilastri portanti della mia vita. In particolare volevo ringraziare le mie sorelle acquisite: Francesca, Luana e Teresa, per essere sempre presenti nelle ricorrenze importanti della mia vita.

Un ringraziamento speciale alla mia famiglia, a mio padre, a mia madre, a mio fratello e a Benedetta per avermi insegnato che non c'è nessuna sfida che non siamo in grado di

affrontare. Se sono giunta a questo traguardo lo devo soprattutto a voi, che avete sempre creduto in me, anche quando io non ci credevo più.

Infine, desidero ringraziare la famiglia Gatti tutta, per avermi fatto sentire “a casa” fin da subito. In particolare un grazie “specialissimo” al mio Riki per l’affetto che mi ha dimostrato rimanendo sempre al mio fianco, aiutandomi a superare le difficoltà e facendomi trascorrere i momenti migliori della mia vita.

Grazie a tutti voi, per essere qui a condividere con me questo momento di gioia!

Gabriella