

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN CARDIOCHIRURGIA
CICLO XX : TISSUE ENGINEERING NELLE VALVOLE
CARDIACHE BIOLOGICHE

INGEGNERIA TISSUTALE COME NUOVO
APPROCCIO AL TRATTAMENTO DELLE
PATOLOGIE VALVOLARI CARDIACHE

Coordinatore: ***Chiar.mo Prof. Tiziano Gherli***

Dottorando: ***Dott. Alessandro Maria Budillon***

Introduzione

Fino ad oggi la medicina si è basata essenzialmente su tre modelli operativi nel caso in cui un organo o parte di esso risultino compromessi:

- 1) un approccio di tipo biochimico – molecolare
- 2) la ricostruzione chirurgica
- 3) la sostituzione dell'organo.

Il primo orientamento ha enormi prospettive, rappresentate principalmente dai farmaci biotecnologici ma, allo stato attuale, oltre un certo grado di entità del danno, diventa un trattamento esclusivamente sintomatico.

Il secondo, notevolmente invasivo, non sempre porta ad una risoluzione totale del problema e troppo spesso il risultato non garantisce una qualità di vita accettabile.

La terza linea è stata fino ad oggi ostacolata da numerosi problemi. Fino a pochi anni fa' la sostituzione di organi veniva effettuata facendo uso di elementi xenobiotici, quali organi provenienti da donatori umani compatibili, organi artificiali od animali. Nel primo caso, al di là dei problemi di rigetto oggi arginabili farmacologicamente in modo abbastanza soddisfacente, è noto come il limite principale sia la disponibilità di componenti del corpo umano, che risulta cronicamente insufficiente di fronte alla richiesta.

Il secondo tipo di sostituzione risulta attuabile solo per sostituire funzioni semplici di tipo meccanico come quella del cuore; molto più difficoltosa diviene qualora ci si avvalga di organi più complessi come ad esempio il fegato.

Infine, negli ultimi anni si stanno sviluppando linee di ricerca orientate verso il miglioramento della compatibilità uomo/animale attraverso un'opera di *mascheramento* di specifiche proteine animali presenti nell'organo, che rappresentano il bersaglio del sistema immunitario del paziente, onde evitare il rigetto.

Da ciò è nata l'esigenza di una nuova fonte per la realizzazione di organi o parti di essi ed è realistica la prospettiva che tale fonte sarà rappresentata dall'**ingegneria tissutale**.

Questa ha infatti l'obiettivo di ovviare ai problemi che sono stati sopra illustrati basandosi sul presupposto che l'unico modo sicuro che abbiamo per far tollerare completamente all'organismo un tessuto trapiantato, sia quello di operare la sostituzione con un componente autologo appartenente all'organismo stesso.

Ciò presuppone la ricerca di tecniche che permettano di coltivare *in vitro* il componente da trapiantare: se le conoscenze attuali consentono la coltivazione di cellule umane, l'ingegneria tissutale deve spingersi oltre ed arrivare a riprodurre la struttura e la funzione. Tali tecniche si basano sul fatto che studi su colture hanno messo in risalto come le cellule hanno un comportamento metabolico, morfologico e funzionale dipendente dalla loro disposizione geometrica nello spazio e dalla variazione delle forze fisiche dell'ambiente di coltura. E' per questo motivo che sono state progettate intelaiature polimeriche bio-erodibili a geometria variabile, bi- e tridimensionali, che consentissero una coltivazione morfologicamente determinata delle cellule e che poi scomparissero "assorbite" dal tessuto

stesso; ed è per controllare le componenti fisiche agenti sulle cellule, che sono stati progettati ambienti di coltura dinamici come i *bioreattori*.

In questa direzione sono stati compiuti notevoli progressi, visto che, per citare alcuni esempi, la generazione e il trapianto di epidermide in pazienti ustionati è una tecnica ormai commercializzata negli Stati Uniti e in Europa; l'impiego, nell'ambito di interventi sull'uomo di cornea e congiuntiva costruite in vitro, rappresenta ormai una possibilità concreta; già si è tentato (per ora solo su animali) di ricostruire e trapiantare strutture più complesse come vescica e fegato.

In ambito cardiovascolare, l'allungamento dell'età media è responsabile della continua ascesa di malattie cardiache ed in particolare delle valvulopatie ed è per questo che oggi la ricerca e l'impegno sono rivolti alla creazione, tramite l'uso delle tecniche di ingegneria tissutale, di valvole cardiache che più si avvicinano alle caratteristiche di quelle native.

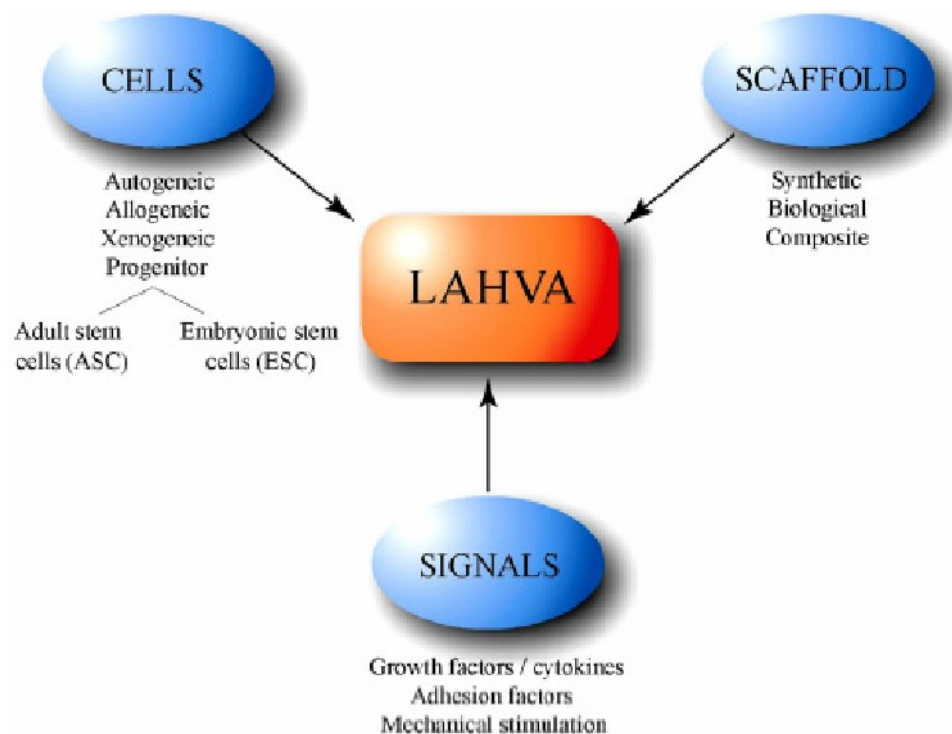
Le valvole cardiache vengono distinte in valvola del cuore destro e valvole del cuore sinistro; in ognuno dei "cuori" sono presenti una valvola atrio-ventricolare ed una valvola semilunare. Le malattie delle valvole del cuore destro (tricuspide e polmonare), ove vige una pressione più bassa, sono in genere dovute a problemi congeniti e/o meno frequenti.

Le malattie delle valvole del cuore sinistro (mitrale e aorta) sono più frequenti e di carattere prevalentemente acquisito; inoltre poiché la valvola mitralica è formata non solo dalla valvola ma anche dall'apparato sottovalvolare ed è fortemente complessa nel suo movimento, l'ingegneria tissutale si è, almeno attualmente, rivolta solo ed esclusivamente alla realizzazione di valvole aortiche.

Naturalmente per poter usufruire di queste innovative tecniche i componenti della valvola devono essere di natura autologa, è quindi fondamentale che il tessuto prelevato dal proprio

corpo, oltre a possedere intrinsecamente cellule che opportunamente isolate, accresciute numericamente, impiantate e “funzionanti,” siano di facile reperimento con minimo se non nullo danno al paziente.

Scopo di questo studio è riuscire a dimostrare che una fonte di donazione cellulare utilizzabile per la costruzione di valvole cardiache mediante le più moderne tecniche di ingegneria tissutale esiste ed è data dalla Vena Grande Safena.



Epidemiologia

Ancora oggi in tutto il mondo la valvulopatia ed in particolare quella aortica è una delle più frequenti cause di morbidità e mortalità (20.000 morti/anno).

Con l'allungamento della vita ogni anno negli Stati Uniti più di 100.000 pazienti, e nel mondo circa 300.000, sono colpiti da patologia valvolare che necessita di un intervento chirurgico.

Nei pazienti affetti da valvulopatia cardiaca avanzata, l'intervento più comune è rappresentato dalla sostituzione valvolare; tuttavia nel 60% dei casi si verificano entro 10 anni dall'intervento serie complicazioni correlate alla protesi utilizzata.

Protesi valvolari cardiache attualmente disponibili

Fin dai primi anni '50, sono stati implementati più di 80 modelli di valvola cardiaca.

Si possono distinguere le protesi valvolari in **meccaniche** e **biologiche**:

Le valvole meccaniche, composte principalmente da metallo e carbonio, sono classificate in base alla loro struttura in *caged-ball dal 1960*, *single-tilting dal 1969* e *bileaflet-tilting-disk dal 1970*.

Le valvole biologiche possono essere *eterologhe*, composte da tessuto porcino o bovino (valvola o pericardio rispettivamente) montate su di un supporto metallico e non, oppure *omologhe*, ossia valvole umane aortiche prelevate da cadavere.

Le protesi valvolari differiscono una dall'altra per diverse caratteristiche, incluse durata, trombogenicità e profilo emodinamico.

Con rare eccezioni le protesi meccaniche sono molto durevoli, il più delle volte 20 o 30 anni; per contro le protesi biologiche devono essere sostituite tra i 10 e i 15 anni (10-20% delle protesi omologhe e 30% delle protesi eterologhe).

Le valvole meccaniche sono trombogeniche e quindi il loro utilizzo richiede una terapia anticoagulante a lungo termine (potenziale trombogenico alto nelle protesi caged-ball, basso nelle protesi bileaflet-tilting-disk ed intermedio nelle single-tilting-disk); mentre non è richiesto di norma con l'uso delle protesi biologiche.

Le protesi, sia biologiche che meccaniche, hanno un proprio profilo emodinamico ed un'effettiva area orificiale: piccola nelle biologiche eterologhe e nelle meccaniche, simile alla valvola nativa nelle biologiche omologhe.

Quindi sulla base di queste caratteristiche, le valvole meccaniche sono da preferirsi nei pazienti giovani o con un'aspettativa di vita superiore a 10/15 anni, oppure che richiedano una terapia anticoagulante per altre ragioni; le valvole biologiche sono da preferirsi nei pazienti anziani o con un'aspettativa di vita inferiore ai 10/15 anni o che non possono (o non vogliono) affrontare una terapia anticoagulante a vita.

Concludendo possiamo dire che le protesi di valvole cardiache oggi utilizzabili presentano potenziali complicazioni quali: trombogenicità, limitata durata, infiammazione del sito d'impianto e, più importante, assoluta mancanza di potenziale di crescita e di rimodellamento, ed è alla riduzione di questa complicazione che oggi è rivolta la ricerca.

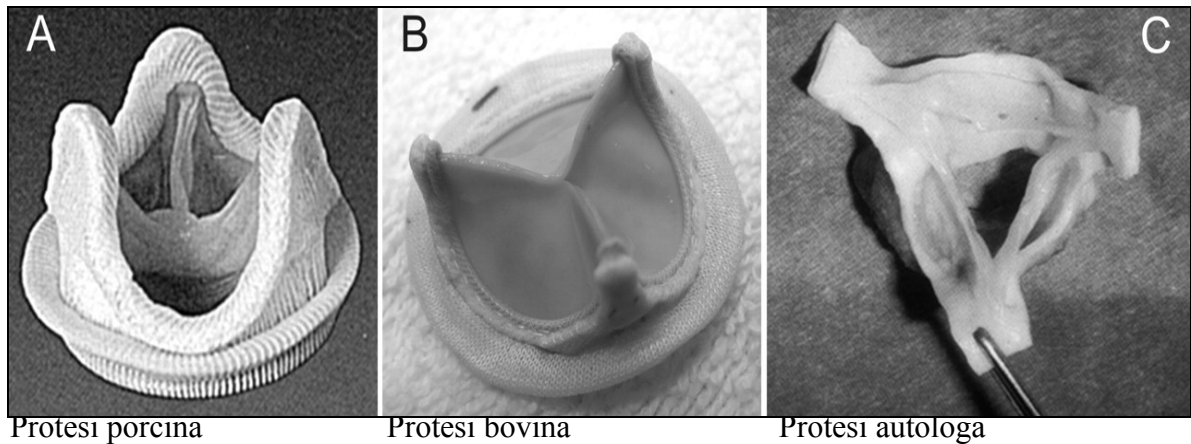
Le tecniche di ingegneria tissutale, da poco introdotte, fino ad ora hanno portato a risultati solo parziali e, quando applicate a matrici tissutali native, sono fortemente condizionate dalle indispensabili procedure di decellularizzazione preventiva, le quali non dovrebbero compromettere irrimediabilmente le loro caratteristiche composizionali, fisico-chimiche, strutturali, biomeccaniche, emodinamiche, di refrattarietà alla calcificazione e di predisposizione al ripopolamento cellulare.

L'obiettivo sta nella realizzazione di una bioprotesi valvolare che risponda a detti requisiti, individuando una tecnica di decellularizzazione ottimale e di ripopolamento cellulare adeguato e stabile “ in vitro”, quale indicatore di biocompatibilità e di potenzialità rigenerativa spontanea “ in vivo”.

Il traguardo dovrebbe consistere nella realizzazione di sostituti valvolari popolati da cellule vitali appartenenti all'ospite ricevente e il cui stroma sia soggetto a turn-over, in altre parole, bioprotesi capaci di acquisire il significato di autogenicità e dotate della capacità di rinnovamento tissutale e, quindi, anche di accrescimento con l'età.

L'obiettivo finale consiste nella realizzazione di valvole cardiache che rispondano ai requisiti indispensabili che un sostituto cardiaco valvolare deve possedere, ossia: configurazione anatomica, struttura, composizione e prestazioni meccaniche ed emodinamiche equivalenti a quelle delle valvole native sane, oltre a proprietà di refrattarietà alla calcificazione, di durata nel tempo, con eventuale capacità di accrescimento, e acquisizione di carattere di autogenicità.

Tutto ciò implica l'individuazione del modo più idoneo per eliminare la componente cellulare originale dei segmenti vascolari valvolari (VVS, valvulated vascular segments), infliggendo il minor danno possibile alla matrice extracellulare ed evitando così di compromettere la potenzialità nei confronti di un nuovo ripopolamento da parte di cellule appartenenti all'ospite ricevente.

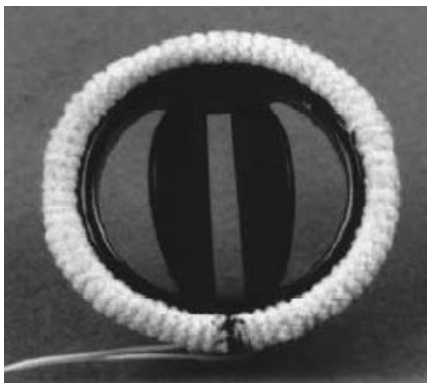




Protesi meccanica Caged-Ball



Protesi meccanica Single-Tilting.Disk



Protesi meccanica Bileaflet-Tiltig Disk

Anatomia

Le valvole cardiache sono formazioni fibrose rivestite da endocardio ed inserite sul contorno degli anelli che limitano i rispettivi orifizi atrioventricolari, aortico e polmonare.

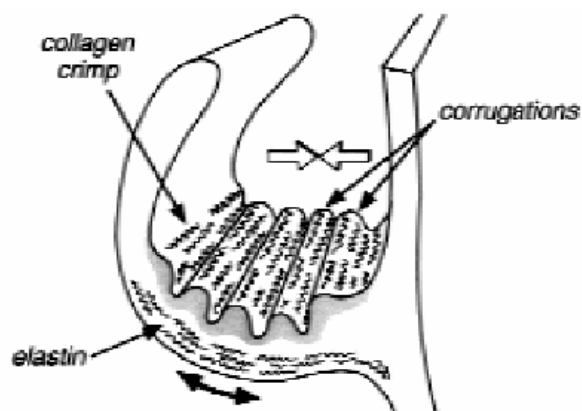
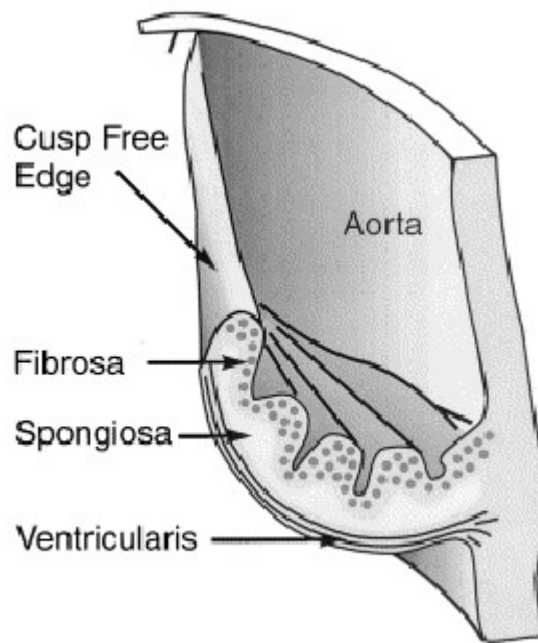
Le cuspidi delle valvole atrioventricolari sono costituite dalla giustapposizione di due lamine fibrose, una *lamina assiale*, rivolta verso l'asse centrale del ventricolo, ed una *lamina parietale* che prospetta verso la parete ventricolare. La lamina assiale è formata da uno strato superficiale, ricco di fibre elastiche, e da uno strato profondo con fasci collagene e tessuto mucoso. Mentre lo strato superficiale si riconosce già a livello dell'impianto della cuspidi sull'anello fibroso, quello profondo compare solo ad una certa distanza dall'anello.

La lamina parietale è costituita anch'essa da uno strato superficiale di natura elastica ed uno profondo di fibre collagene.

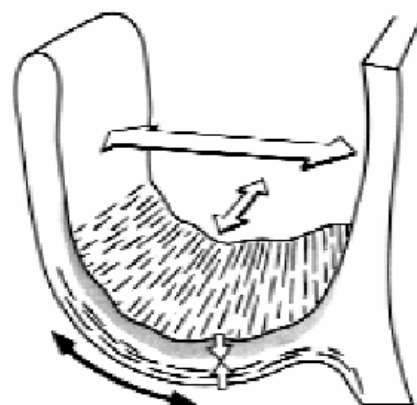
Le valvole semilunari risultano di tre lamine sovrapposte: una lamina assiale rivolta verso l'asse del vaso, una lamina media ed una lamina parietale rivolta verso la parete arteriosa. Tanto la lamina assiale che quella parietale sono di tessuto connettivo fibroso con ricca componente elastica. La lamina media ha anch'essa una struttura fibrosa, ma contiene una discreta quantità di tessuto mucoso.

I movimenti dei lembi valvolari sono passivi e l'orientamento delle valvole cardiache assicura l'unidirezionalità del flusso sanguigno attraverso il cuore. Infatti si ritiene che la chiusura delle valvole cardiache durante la diastole sia provocato principalmente dalle correnti vorticose del sangue che si formano dietro i lembi e, nelle valvole atrioventricolari,

dalle corde tendinee e dai muscoli papillari che, stirati durante il riempimento ventricolare, esercitano tensione sui bordi liberi delle valvole



Systole



Diastole

Definizione e scopi

Il termine Engineering Tissue letteralmente significa : Coltivazione di tessuti biologici in laboratorio.

Il raggiungimento di tale scopo presuppone la collaborazione di almeno tre filoni della ricerca: la biologia cellulare, la tecnica della coltura cellulare e la ricerca sui materiali.

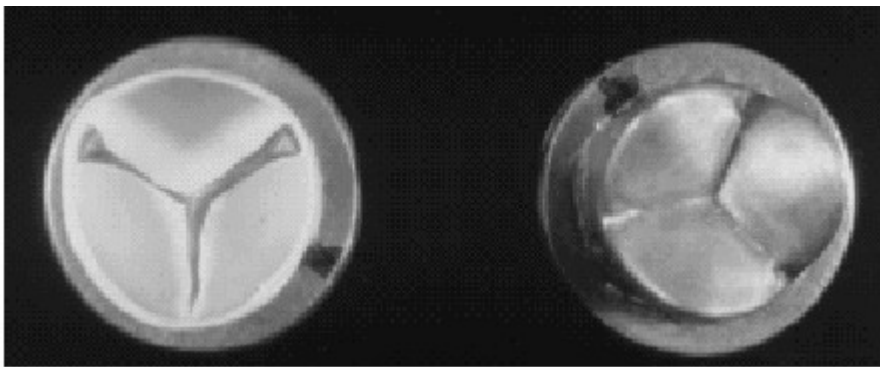
Più complesso è il tessuto più difficile è la sua coltivazione. E' per questo motivo che sinora i ricercatori hanno realizzato soltanto tessuti relativamente semplici come epidermide, cartilagine ed ossa. Una delle sfide più importanti riguarda la vascolarizzazione del tessuto. Le opzioni sono due: o si fa in modo che nel tessuto coltivato crescano sin dall'inizio anche i vasi sanguigni destinati alla sua irrorazione, o si provvede a inserirvi gli opportuni fattori di crescita che, in un secondo momento, stimolerebbero l'angiogenesi nel tessuto trapiantato.

La tecnica di coltura cellulare ha come scopo lo sviluppo di bioreattori, ossia di dispositivi in grado di fornire un ambiente adeguato alla crescita del tessuto affinché, una volta trapiantato, sia in grado di assolvere la propria funzione. Ad esempio, date le forti sollecitazioni meccaniche alle quali è sottoposta una valvola cardiaca, il bioreattore utilizzato per la sua rigenerazione deve imitare il battito cardiaco.

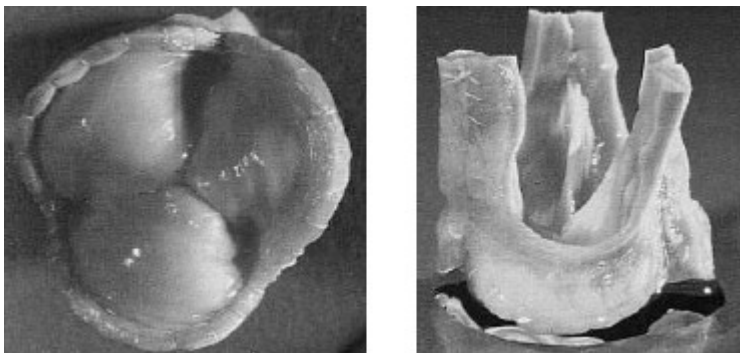
La ricerca sui materiali si occupa dello sviluppo di sostanze innocue per l'organismo, che fungono da supporto (scaffold) durante la crescita del tessuto. Una delle possibilità per

ottenere uno *scaffold* di questo tipo consiste nell'impiegare materiali biologici del donatore o materiale biologico eterologo entrambi precedentemente trattati.

Ad esempio, previo trattamento di decellularizzazione, le valvole cardiache di origine suina, possono divenire una matrice di collagene devitalizzata ideale per la colonizzazione da parte di cellule umane. In linea di conto entrano naturalmente anche materiali sintetici purchè presentino le caratteristiche necessarie.



Scaffold poroso di valvola cardiaca e stampo in alluminio (visione dall'alto)



Valvola porcina decellularizzata (visione dall'alto e di lato)

Costruzione di una valvola cardiaca biologica mediante tecniche convenzionali

Oggi in commercio esistono tre tipi di valvole biologiche: valvola porcina, valvola di pericardio bovino e valvole prelevate da cadavere (Homograft). Le valvole prelevate dal maiale non necessitano di essere sagomate ad un supporto al contrario di quelle costruite con pericardio bovino.

Entrambi i tipi di valvole Xenograft prima di essere impiantati devono necessariamente subire un processo di pre-trattamento con Gluteraldeide.

Il pre-trattamento cui vengono sottoposte le valvole xenograft con gluteraldeide serve a preservare ed aumentare la resistenza del tessuto alla degradazione chimica ed enzimatica, e a ridurre la immunogenicità del tessuto stesso.

La calcificazione della valvola biologica xenograft, così come la rottura dei lembi (leaflets) (evento sicuramente influenzato dalla calcificazione) sono tra gli insuccessi di un impianto di xenograft oltre ad una reazione di immunogenicità.

Il fissaggio della valvola in gluteraldeide è una delle prime cause di calcificazione del tessuto biologico; ma al momento non esistono altri metodi di fissaggio efficaci. Quindi dopo il fissaggio, per prevenire conseguenti calcificazioni, viene effettuata l'estrazione della gluteraldeide residua, seguita poi da un processo di detossicazione. In seguito, per una migliore protezione del materiale biologico, vengono applicati diversi trattamenti anticalcificanti.

Diversi sono i requisiti affinché un trattamento anticalcificante risulti efficace, tra questi: una inibizione effettiva e prolungata della calcificazione, una adeguata performance della valvola in termini di emodinamica e di curabilità, l'assenza di infiammazione a livello locale e sistemico, l'assenza di interazioni sangue-superficie (emolisi, adesione delle piastrine), l'assenza di tossicità e di potenziale infezione.

Il processo di degenerazione degli xenograft inizia sulle membrane delle cellule morte, che sono in maggioranza composte da fosfolipidi e colesterolo. Poi si diffonde formando cristalli di calcio in collagene ed elastina. Quindi conoscere l'interazione tra calcificazione e fosfolipidi è fondamentale. Oggi esistono diverse tecniche per ridurre la calcificazione tissutale ed uno di questi è il modello Linx ossia applicando etanolo al 95% si ha una rimozione dalle membrane cellulari dei fosfolipidi del 94% e del colesterolo del 99% e si previene il riassorbimento dei lipidi in vivo; inoltre si verifica un cambio permanente della struttura a tripla elica del collagene, dal quale deriva in seguito il blocco dei siti attivi del calcio e infine la rimozione dei gruppi inattivi della gluteraldeide.

Altro metodo per migliorare la curabilità e la performance della valvola biologica attualmente in uso è l'utilizzo del trattamento Bilinx ovvero etanolo ed alluminio in modo che l'alluminio si lega permanentemente all'elastina, prevenendo così l'attacco del calcio; si lega stabilmente ai gruppi fosfo-esteri, siti di iniziazione della calcificazione, e inibisce l'attività dell'alcalin-fosfatasi: enzima di sintesi ossea.

Gli homograft, ottenuti da cadaveri umani, vengono sottoposti a Criopreservazione e conservati a -196°C . La qualità della valvola dipende dal protocollo di crioconservazione adottato, dal tempo intercorso tra il prelievo e l'impianto e da eventuali sbalzi di temperatura che possono verificarsi in una qualsiasi fase delle preparazione.

L'insuccesso del loro uso è legato al progressivo deterioramento per rottura e perforazioni delle cuspidi a lungo termine; per il loro scarso reperimento e per le complicate tecniche di impianto.

Per ovviare a queste complicazioni che rendono l'uso delle valvole biologiche, sia homograft che xenograft, “NON OTTIMALE” oggi con le tecniche di ingegneria tissutale si cerca di generare una valvola “OTTIMALE”.

Costruzione di una valvola cardiaca mediante tecniche di ingegneria tissutale

Per ricostruire una valvola cardiaca con tecniche di ingegneria tissutale si procede attraverso:

- costruzione di uno scaffold sintetico o decellularizzazione di valvola nativa per ottenere uno scaffold biologico;
- preparazione della coltura cellulare da utilizzare per la “semina” in vitro;
- semina delle cellule accresciute in vitro sullo scaffold ed incubazione mediante l'utilizzo di un bioreattore.

Le strade intraprese dai vari gruppi di ricerca che si occupano di ricostruzione di valvole cardiache sono sostanzialmente due:

- ricostruzione di valvole completamente artificiali a partire da biomateriali (polimeri sintetici quali PGA; PLA; PLLA; PHA; etc) bicompatibili e biodegradabili;
- decellularizzazione di valvole cardiache native da donatori della stessa specie (allo trapianto) o di specie diverse (xenotrapianto)

I principali svantaggi dell'approccio puramente basato sull'utilizzo di biomateriali di sintesi sono principalmente le difficoltà nella costruzione di una struttura tridimensionale stabile, resistente alla trazione e allo stesso tempo flessibile e provvista di cuspidi funzionali;

pronunciata trombogenicità dei polimeri utilizzati per la costruzione dello scaffold; scarsa adesione cellulare e conseguente scarsa rigenerazione cellulare.

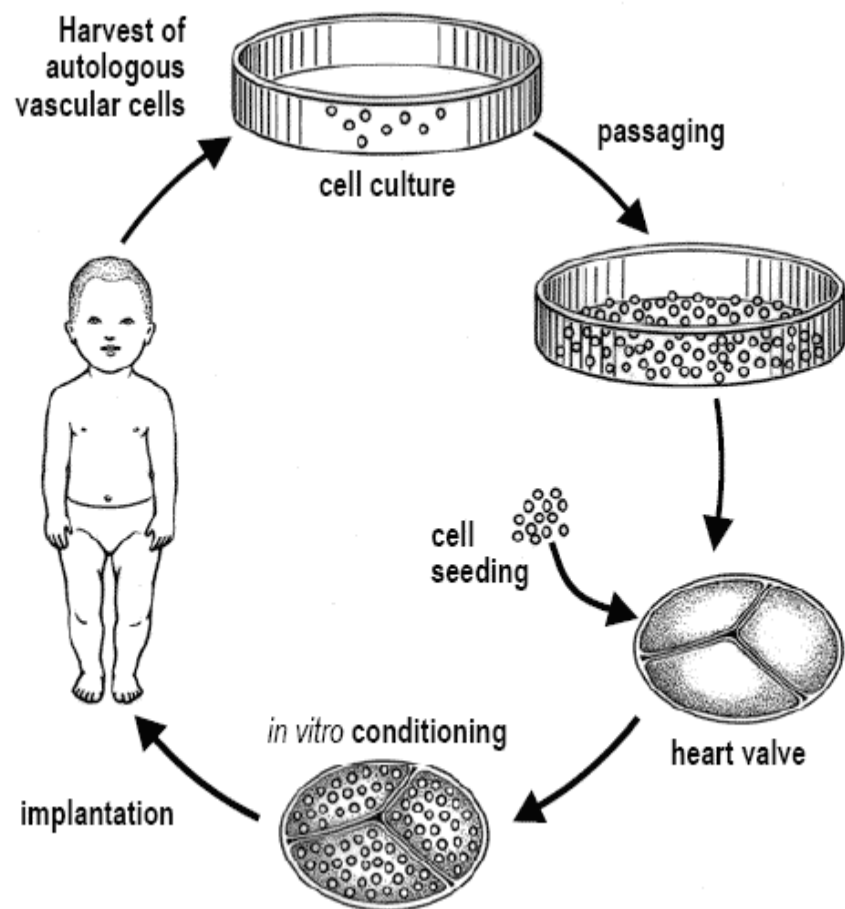
L'utilizzo di scaffold biologici può essere un'alternativa per il superamento di questi inconvenienti in quanto da un punto di vista morfologico è sicuramente una struttura che più si avvicina a quella reale ma , per poter essere utilizzato in ambito clinico, lo scaffold deve essere sottoposto ad una particolare procedura di “lavaggio” detta decellularizzazione. Questo tipo di matrice contiene la struttura ed i componenti ottimali per ospitare le cellule dell'organismo ricevente, fornendo un ambiente ideale per i recettori cellulari di superficie e una riserva per i fattori di crescita che modulano i processi biologici quali: angiogenesi, vasculogenesi, migrazione e proliferazione cellulare.

La procedura generale adottata per decellularizzare lo scaffold di una valvola cardiaca biologica, homograft e/o xenograft, consiste nei seguenti passi:

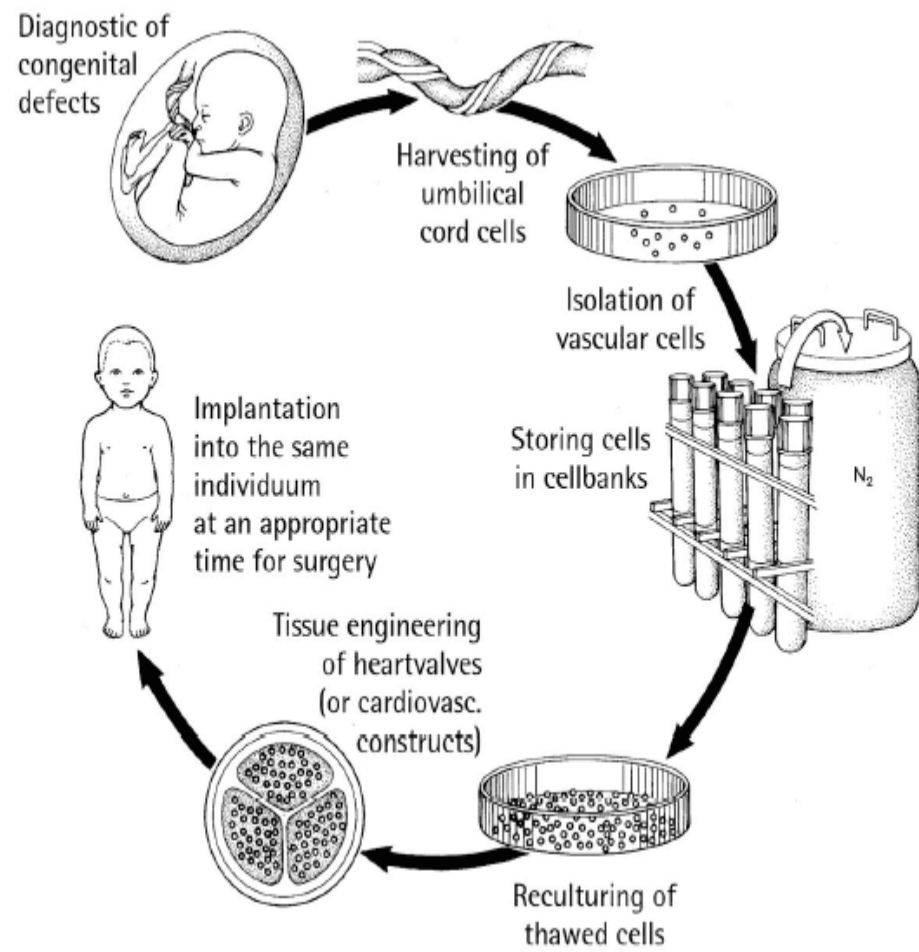
- disinfezione della valvola prelevata in condizioni di sterilità mediante lavaggio a temperatura ambiente con soluzione di iodopovidone e PBS (Phosphate Buffered Saline) sterile
- trattamento decellularizzante con tripsina/EDTA
- incubazione a 4°C in soluzione antibiotica per 12 ore
- ulteriore lavaggio con BPS per altre 24 ore per rimuovere i residui cellulari ancora presenti
- conservazione in soluzione salina (Hanks buffered) a 4°C in attesa di essere utilizzata per l'impianto e la semina

Nella maggior parte degli approcci all'ingegneria tissutale cardiovascolare le cellule da utilizzare per la semina in vitro sono raccolte da tessuti di donatori autologhi:

Cellule staminali adulte ASC



Cellule staminali embrionali ESC



Le cellule staminali adulte normalmente vengono derivate da siti facilmente reperibili quali per esempio: arterie periferiche (arteria radiale), vene (grande vena safena), cellule del sangue o cellule del midollo osseo (cellule staminali mesenchimali MSCs) queste ultime mostrano, rispetto alle altre, una maggiore capacità di proliferazione ed hanno il potenziale di differenziarsi in diversi tipi cellulari.

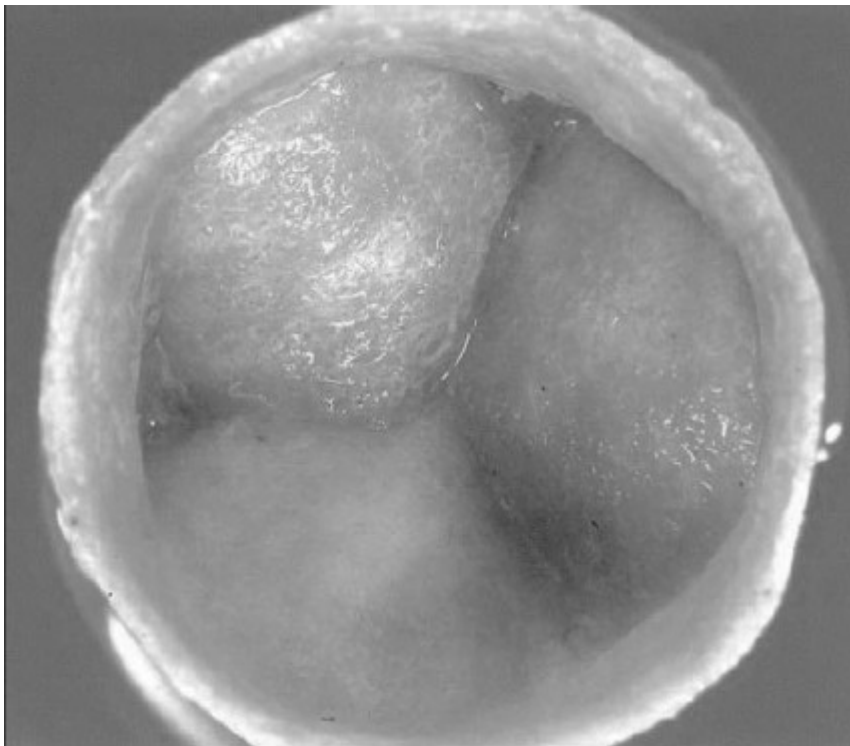
Le cellule staminali embrionali vengono invece reperite o dagli embrioni o dal cordone ombelicale.

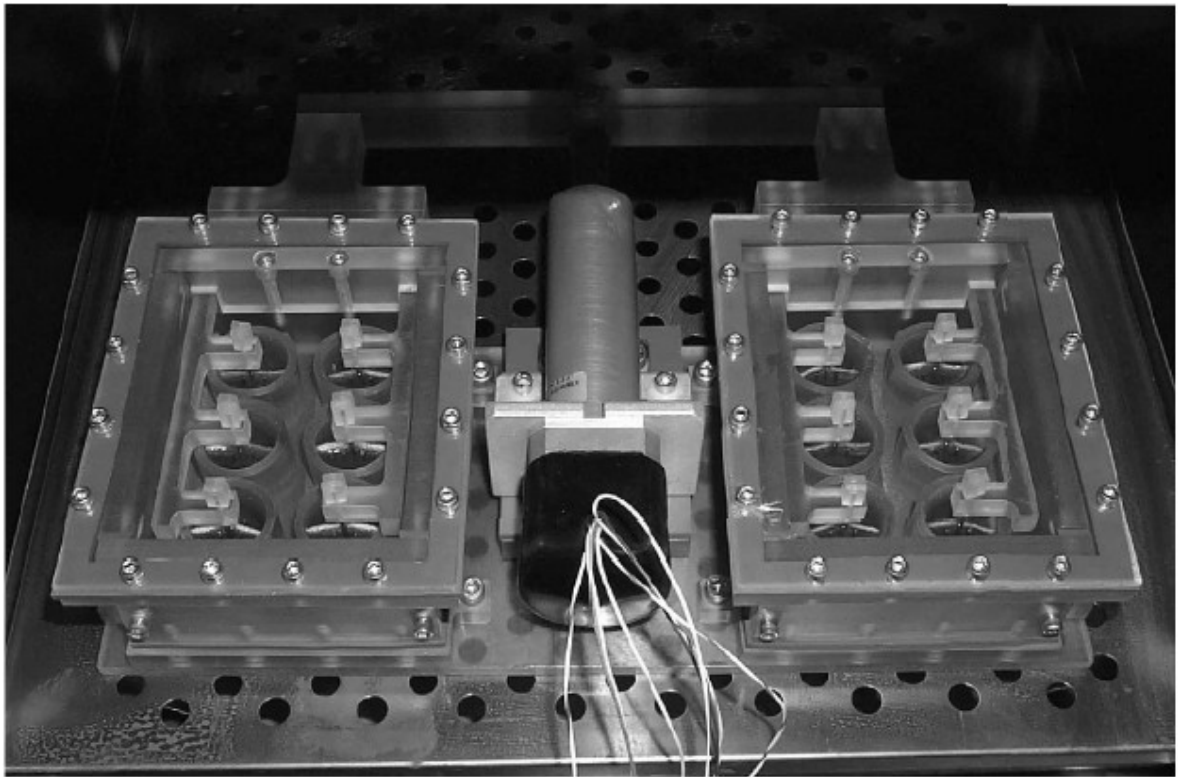
Una volta reperito il tessuto è necessario differenziare la linea cellulare desiderata e successivamente espanderla utilizzando tecniche di coltura standard.

Le cellule coltivate in vitro vengono seminate sullo scaffold, quindi il manufatto viene messo in coltura in un bioreattore che crea le condizioni ideali per la crescita cellulare (temperatura, grado di umidità, ecc.).

Per la realizzazione delle valvole cardiache con tecniche di ingegneria tissutale non vengono utilizzati i bioreattori statici ma i bioreattori dinamici che oltre a fornire un ambiente biologico attivo, creano da subito le condizioni di normale utilizzo proprie di una valvola cardiaca, ossia un sistema di pompaggio che mette la valvola nelle condizioni di stress tipiche del flusso sanguigno in pressione. I moderni bioreattori permettono di variare con continuità il flusso e la pressione d'esercizio. L'ultima fase consiste nell'impianto della valvola “ vivente” formata da tessuto autologo e ricostruito con tecniche d'ingegneria tissutale.

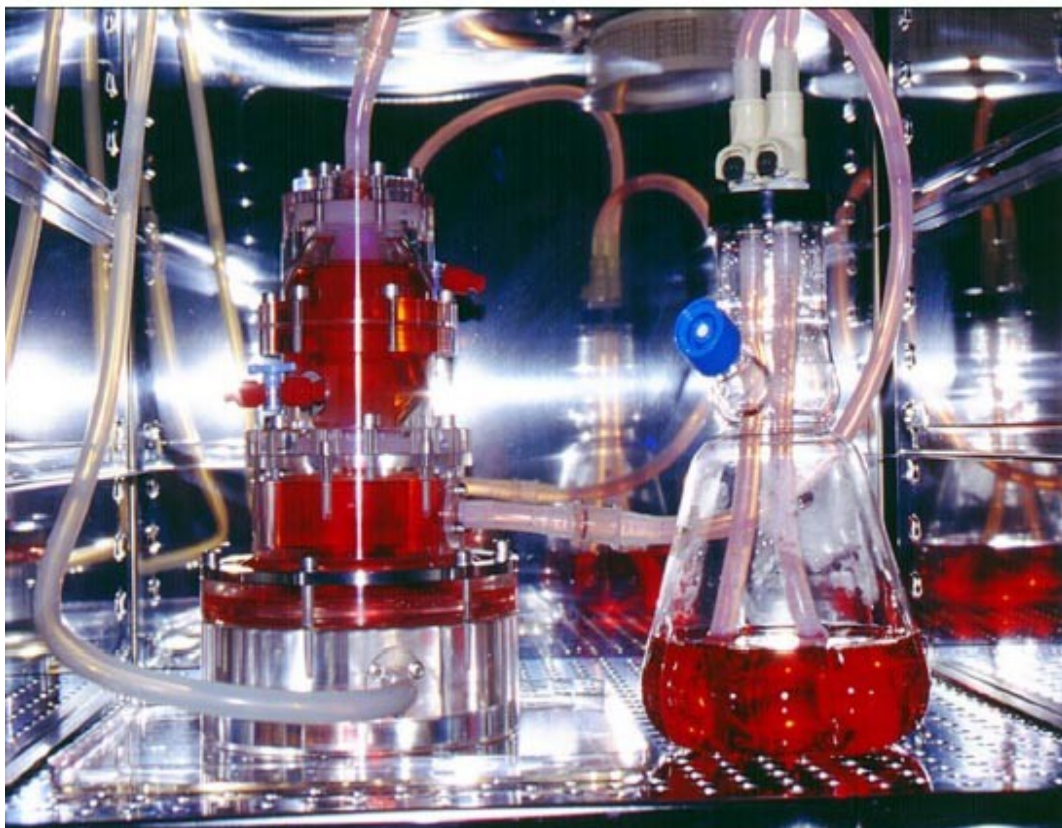
Valvola cardiaca ricostruita con tecniche di ingegneria tissutale riseminata con miofibroblasti dopo 14 giorni di trattamento in vitro con un bioreattore a flusso pulsatile





Bioreattore appositamente dedicato alla ricostruzione di valvole cardiache perché in grado di sottoporre la valvola in fase di crescita a stress meccanico

:



Particolare della porzione centrale del bioreattore che contiene la
valvola in coltivazione

Nostra esperienza

La sostituzione di una valvola cardiaca rappresenta la procedura più comune nelle patologie valvolari “end-stage”

Sia che essa avvenga con protesi meccanica sia che essa avvenga con protesi biologica lo svantaggio più grande, fatto salvo le peculiarità di ogni singola protesi, è la mancanza di sviluppo, riparazione e rimodellamento delle valvole impiantate.

Oggi le strutture cardiovascolari “viventi”, come le valvole cardiache, possono essere ricostruite in vitro usando i principi dell’ingegneria tissutale.

Senza dubbio alcuno, ogni settore o fase della ricerca in questo campo è un punto cruciale: dalla scelta dello scaffold alla scelta della sorgente cellulare e al metodo di condizionamento in vitro.

Il tessuto “*ideale*” è rappresentato da cellule proprie del paziente; in questo modo usando cellule autologhe il rischio di complicanze immunologiche dopo l’impianto è ridotto.

Le cellule utilizzate per la costruzione di bio-valvole devono avere le seguenti caratteristiche:

non immunogeniche,

altamente proliferative,

di facile reperibilità,

in grado di differenziarsi in tessuto con funzioni specializzate.

Scopo di questo progetto di ricerca è il reperimento di sorgenti cellulari, da utilizzare per la costruzione di valvole cardiache con tecnica di bioingegneria, da tessuti di facile accesso quale appunto la *Vena Grande Safena*.__

Il prelievo di vena grande safena risulta semplice, non comporta un eccessivo insulto fisico e psichico per il paziente e può essere praticato antecedentemente ed indipendentemente all'intervento sulla valvola cardiaca; avendo così il tempo necessario per la realizzazione della valvola di bio-ingegneria.

Nell'ambito delle cellule isolate dal tessuto di vena safena è stata posta l'attenzione sull'isolamento prima e la crescita poi dei miofibroblasti che per la loro funzione nel tessuto valvolare umano normale ricoprono un ruolo cruciale per il corretto sviluppo e funzionamento della bio-valvola.

Infatti analizzando la struttura anatomica della valvola aortica nativa e la letteratura internazionale l'idea di ricercare miofibroblasti nelle vene periferiche (in questo studio la grande vena safena) risulta essere fortemente incoraggiante.

I principali tipi di cellule nelle valvole cardiache sono le cellule interstiziali valvolari (VICs) e le cellule endocardiche valvolari (VECs).

I VICs si crede che siano responsabili del mantenimento delle strutture valvolare.

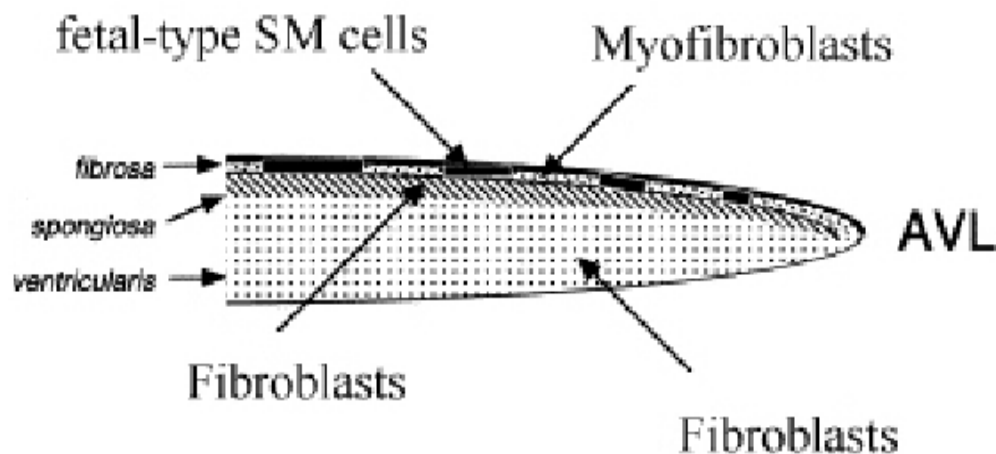
Tre distinti fenotipi di VICs sono stati identificati nelle valvole cardiache:

fibroblasti,

miofibroblasti

cellule muscolari lisce di tipo fetale (SMC).

Le SMC e i miofibroblasti sono essenzialmente localizzati nella fibrosa, mentre i fibroblasti sono segregati nella ventricolare. La spongiosa è in generale lo strato più povero di cellule e mostra un modello di fibroblasti leggermente differente.



I miofibroblasti sono caratterizzati da importanti fibre di stress associate con l'espressione di alfa actina del muscolo liscio e si pensa che siano coinvolti nella proliferazione e migrazione.

I fibroblasti sono caratterizzati da importanti organuli sintetici e secretori e si pensa che siano importanti nella regolazione della matrice. Sintetizzano collagene, elastina, proteoglicani, fibronectina, fattori di crescita, citochine così come matrice delle metalloproteinasi (MMPS) e i loro inibitori tissutali.

Le SMC sono in grado di contrarsi per mantenere una limitata forza valvolare intrinseca e sostenere le pressioni emodinamiche.

La VECs formano un rivestimento funzionale attorno a ogni lembo di valvola cardiaca.

Presumibilmente i VEC agiscono per mantenere una superficie valvolare non trombogenica simile all'endotelio vascolare, si pensa che i VECs regolino i sottostanti VICs

Un gran numero di tipi cellulari sono stati utilizzati per creare strutture di ingegneria tissutale.

Nella maggior parte degli studi i miofibroblasti sono seminati su una impalcatura per fornire un iniziale ancoraggio di cellule e la produzione di matrice extracellulare.

Quindi, le cellule endoteliali sono seminate sulla struttura per fornire una copertura endoteliale.

I tessuti da cui prelevare cellule da utilizzare nella costruzione di valvole cardiache con tecniche di ingegneria tissutale sono svariati, così come si può evincere dalla letteratura internazionale: Shinoka et al (1996) selezionarono fibroblasti e cellule muscolari lisce da arteria femorale di pecora; Shinoka et al (1997) selezionarono fibroblasti e cellule endoteliali dal derma sempre di pecora; Zeltinger et al (2001) selezionarono fibroblasti da derma umano; Steinhoff et al (2000) selezionarono miofibroblasti e cellule endoteliali da arteria carotide di ovino; Jockenhoevel et al (2001) selezionarono miofibroblasti da aorta ascendente umana.

Tutti questi, ed altri ricercatori usarono le cellule isolate per la realizzazione di valvole cardiache con tecniche di ingegneria tissutale ma i risultati ottenuti non ebbero seguito non tanto perchè la valvola non fu realizzata ma soprattutto perchè era troppo indaginoso reperire il tessuto da cui estrarre le cellule.

Considerando la fonte delle cellule alcuni studi descrivono l'uso di cellule ottenute da vene invece che da arterie: Cebotari et al (2002) e Bader et al (1998) selezionarono cellule

endoteliali da vena safena umana con il raggiungimento di una insemminazione e colonizzazione di cellule endoteliali su una scaffold (impalcatura) e questo ha prodotto la formazione di un monostrato endoteliale vitale.

Schnell et al (2001) confrontarono l'uso di miofibroblasti ottenuti da vene periferiche umane con quelli di parete aortica umana come possibile fonte cellulare per costruzioni di tessuti cardiovascolari per l'ingegneria tissutale. Strutture seminate con miofibroblasti di vene periferica erano superiori sia per qualità di fibre collagene che per stabilità meccanica rispetto a strutture seminate con miofibroblasti aortici.

Discussione

I pazienti arruolati sono stati informati preventivamente dello studio che si stava realizzando tramite apposito modulo di Consenso Informato.

Sono stati arruolati otto pazienti da sottoporre ad intervento di rivascolarizzazione miocardica mediante by-pass aortocoronarico tramite condotto arterioso e venoso (grande vena safena); un segmento di vena è stata utilizzata per il nostro studio.

Il frammento di tessuto di vena safena è stato lavato più volte con DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline- Soluzione Salina Tamponata) allo scopo di rimuovere il sangue e gli eventuali coaguli presenti al suo interno. E' stato sezionato longitudinalmente e messo su terreno di coltura per la sua duplicazione e conservazione.

Naturalmente per vedere se nella parete della vena sono presenti miofibroblasti è necessario allontanare le cellule endoteliali e pertanto il vaso è stato perfuso con soluzione di collagenasi CLS II allo 0,5% in DPBS contenente 0.7 mM di CaCl_2 e MgCl_2 e quindi lasciato agire per 15 minuti incubando la vena a 37°C al 5% di CO_2 in termostato. Il terreno così ottenuto veniva rinnovato ogni tre/quattro giorni.

Al termine dell'incubazione, recuperata la soluzione di collagenasi, è stata lavata ripetutamente la vena con RPMI 1640, integrato con il 20% di NBCS (New Born Calf Serum), utilizzando almeno tre volumi di tampone di lavaggio per ogni volume di collagenasi impiegato.

Il tampone recuperato era raccolto in provette da 50 ml e centrifugato per 10 minuti alla velocità di 250 giri/minuto

Le cellule del fondo sono state risospese nel medium di coltura delle HUVEC, composto da Medium 199 (Hank's salts-Lglutamine-Na bicarbonate), integrato con 20% NBCS, 50µg/ml di fattore di crescita, 50µg/ml di eparina, 100 U/ml di penicillina e 100µg/ml di streptomycin, secondo quanto descritto da Thornton et al (1983), e quindi trasferite in piastre da 25 cm² precedentemente rivestite da soluzione di gelatina al 2%. Abbiamo così isolato ed eliminato le cellule endoteliali dal tessuto di partenza.

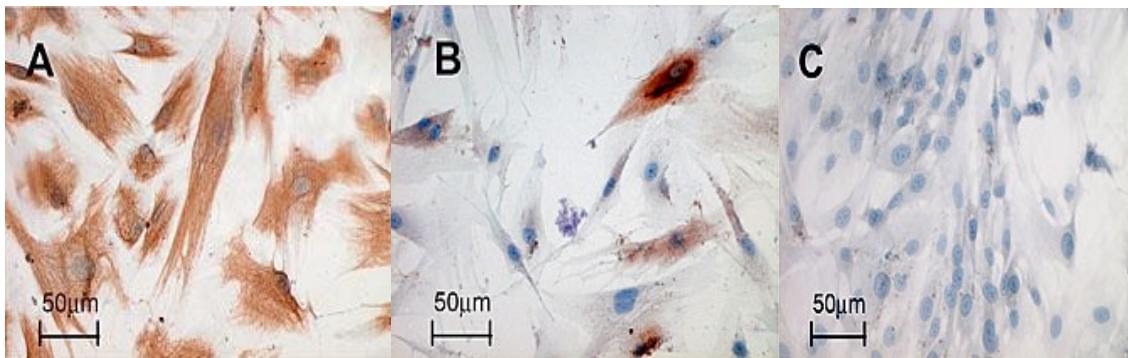
Per ricercare ed eventualmente isolare i miofibroblasti dal tessuto di vena safena de- endotelizzato si procede con metodica immunoistochimica.

La caratterizzazione con metodica immunuistochimica fenotipica del miofibroblasto permette di evidenziare una certa eterogeneità di cellule e più precisamente: fenotipo V, è rappresentato da cellule miobibroblastiche che esprimono la vimentina; fenotipo VA, sono miofibroblasti positivi per vimentina e α muscolo liscio; fenotipo VAD, positivo per vimentina, α muscolo liscio e desmina; fenotipo VD, positivo per vimentina e desmina e il fenotipo VA(D)M, dove la desmina può o non essere presente.

Miofibroblasti V

Miofibrloblasti A

Miofibroblasti D



Tutti questi fenotipi danno miofibroblasti normalmente presenti nei tessuti umani dove la loro espressione numerica è in ragione del diverso ruolo che dette cellule devono svolgere.

Usando il Ventana Medical Systems cercheremo la presenza di anticorpi: anti-vimentina; anti-desmina (clone 3B4 e D33) ed anti α -muscolo liscio (α -SMA clone 1A4).

Prima di sottoporre il tessuto cellulare a tipizzazione immunoistochimica si è provveduto alla sua crescita in appositi terreni di coltura.

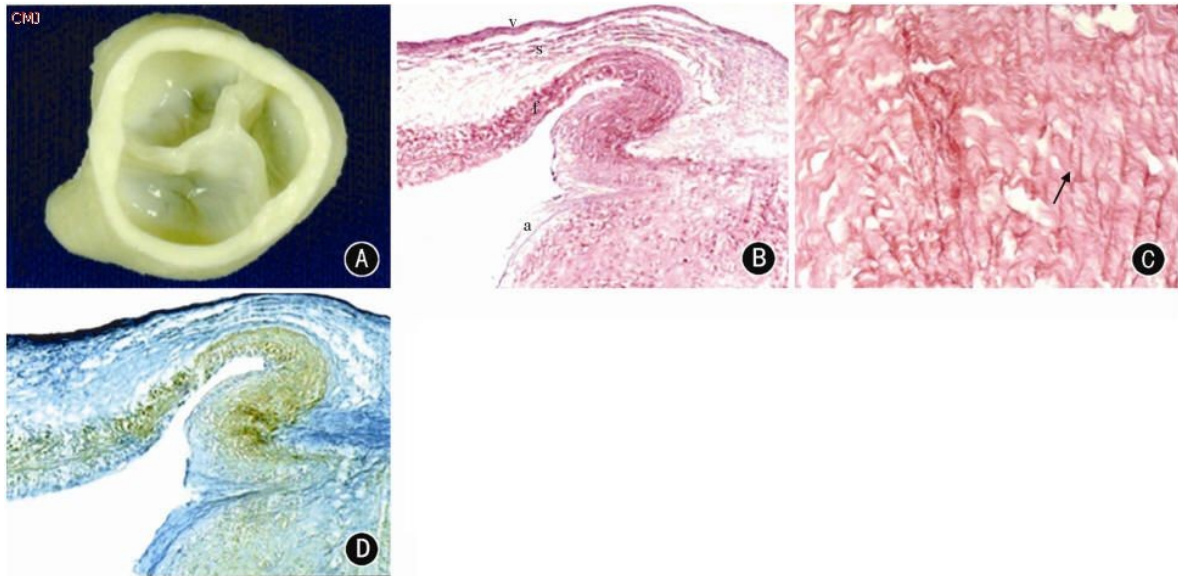
Il terreno di coltura consiste di DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) con supplemento di 10% di siero bovino (PCS), 1% di Glutamax piruvato di sodio e 1% di soluzione antibiotica-antimicotica (10 U/ml penicillina 6 sodio, 10µm/ml streptomicina solfato, 25µm/ml anfotericina B in 0,85% di soluzione salina).

Il tutto è irrigato con soluzione PBS (soluzione tampone con fosfato sodio e potassio) a pH 7.4.

Il tessuto è stato trasferito nei dischi di coltura contenenti terreno di crescita Petri, (rinnovato ogni 4 giorni) e conservato in ambiente con temperatura ed umidità controllata (5% di CO₂ a 37°C). Dopo 2-3 settimane si è iniziato ad osservare una proliferazione cellulare che ha necessitato di altri 4 passaggi completi prima di ottenere una coltura cellulare sufficiente a permettere la ricerca di specifici anticorpi per la presenza di miofibroblasti.

La caratterizzazione cellulare del tessuto di vena safena ha evidenziato, con la tecnica immunoistochimica, la presenza di vimentina, di α muscolo liscio e l'assenza di desmina. questo vuol dire che nella parete delle vene da noi analizzate è presente il tipo V e VA di miofibroblasti che entrano nella composizione dei lembi valvolari aortici di valvola nativa. Pertanto il tessuto di vena safena è stato scelto perché può essere prelevato facilmente con un piccolo intervento chirurgico che, con una piccola incisione cutanea, ci permette di prelevare una quantità sufficiente di tessuto. In più l'estrazione di un piccolo segmento di vena è funzionalmente ben tollerato dal paziente.

In sintesi abbiamo dimostrato che miofibroblasti presenti nella Vena Grande Safena rappresentano una promettente alternativa, di facile accesso, al reperimento di cellule per la costruzione di valvole biologiche cardiache mediante tecniche di ingegneria tissutale



A Valvola aortica umana decellularizzata

B Rappresentazione dei vari strati del lembo di valvola aortica

A lamina arteriosa

F lamina fibrosa

S lamina spongiosa

V lamina ventricolare

C Rappresentazione di fibre collagene (freccia)

D Rappresentazione dei componenti extracellulari

Blu..... Elastina

Giallo ... Collagene

Verde.....Glicosamminoglicani GAG

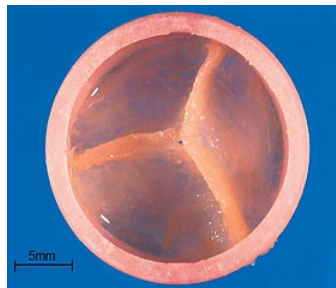
Tre diverse valvole aortica costruite con tecniche di ingegneria tissutale e tessuti autologhi umani



Valvola costruita con miofibroblasti



Valvola costruita con cellule midollari



Valvola costruita con cellule staminali

Bibliografia

- 1) Bonow Ro, Carabello B, de Leon Jr AC, Edmunds Jr LH, Fedderly MD, Freed MD, et al. (1998). Guidelines for the managements with valvular heart disease: executive summary. Report of the American College of Cardiology/American Heart Association. Circulation98: 1949-1984.
- 2) Mitchell RN, Jonas R, Schoen FJ: Structure-function correlations in cryopreserved allograft cardiac valves. Ann. Thorac. Surg. 60; S108-13, 1995.
- 3) Albertucci M, Wong k, Petrou m et al: The use of unstented valves for aortic valve replacement. Review of a twenty-three year experience. J. Thorac. Cardiovasc. Surg, 107, 152-161,1994.
- 4) Schoen FJ, Levy JR, Nelson AC, Bernhard WF, Nashef A, Hawley M: Onset and progression of experimental bioprosthetic heart valve calcification. Lab. Invest. 52, 523-532,1985.
- 5) Ortolani F, Petrelli L, Tubaro F, Spina M, and Marchini M: Novel ultrastructural features as revealed by phthalocyanine reactions indicate cell priming for calcification in subdermally implanted aortic valves. Connect. Tiss. Res. 43: 1-12, 2002.
- 6) Schoen FJ and Levy RJ: Founder's Award, 25th Annual Meeting of the Society for Biomaterials, perspectives. Providence, RI, April 28-May 2, 1999. Tissue heart valves: current challenges and future research perspectives. J. Biomed. Mater. Res., 15, 439-465, 1999.

- 7) Schmidt CE and Baier JM: Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. *Biomaterials*, 21: 2215-2231, 2000.
- 8) Rabkin E, Schoen FJ (2002). Cardiovascular tissue engineering. *Cardiovasc Path* 11: 305–317.
- 9) Shin'oka T, Ma PX, Shum-Tim D et al.: Tissue engineered heart valves: analogous valve leaflet replacement study in a lamb model. *Circulation*, 94: II164-II168, 1996.
- 10) Shin'oka T, Tissue engineered heart valves: autologous cell seeding on biodegradable polymer scaffold. *Artif. Organs*, 26: 402-406, 2002.
- 11) 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*, 108: 1729-1734, 2003.
- 12) Perry TE, Kaushal S, Sutherland FWH, Guleserian KJ, Bischoff J, Sacks M and Mayer JE: Bone marrow as a cell source for tissue engineering heart valves. *Ann. Thorac. Surg.*, 75:761-767,2003.
- 13) Curtil A, Pegg DE and Wilson A: Repopulation of freeze-dried porcine valves with human fibroblasts and endothelial cells. *J. Heart Valve Dis.* 6: 296-306, 1997.
- 7) Steinhoff G, Stock U, Karim N, Mertsching H, Timke A, Meliss RR, Pething K, Haverich A. (2000). Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits. *Circulation* 102[suppl II]: III50-III55.
- 14) Bader A, Schilling T, Teebken OE, Brandes G, Herden T, Steinhoff G and Haverich A: Tissue engineering of heart valves--human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 14(3): 279-284, 1998.

- 15) Vesely I: The hybrid autograft/xenograft aortic valve. *J. Heart Valve Dis.* 6: 292-295, 1997.
- 16) Spina M, Ortolani F, El Messlemani A, Gandaglia A, Bujan J, Garcia-Honduvilla N, Vesely I, Gerosa G, Casarotto D, Petrelli L and Marchini M: Isolation of intact aortic valve scaffolds for heart valve bioprostheses: extracellular matrix structure, prevention from calcification and cell repopulation features. *J. Biomed. Mater. Res.* 67: 1338-1350, 2003.
- 17) Rieder E, Kasimir MT, Silberhumer G, Seebacher G, Wolner E, Simon P and Weigel G: Decellularization protocol of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 127: 399-405, 2004.
- 18) Bertipaglia B, Ortolani F, Gerosa G, Spina M, Pauletto P, Casarotto D, Marchini M and Sartore S: Cell characterization of porcine aortic valve and decellularized leaflets repopulated with aortic valve interstitial cells. *Ann. Thorac. Surg.* 78: 1274-1282, 2003.
- 19) Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 16: 381-390, 1966.
- 20) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Morman MA, Simnetti DW, Craig S, Marshak DR: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 284:143-7, 1999.
- 21) Shinoka T, Breuer CK, Tanel RE, Zund G, Miura T, Ma PX, Langer R, Vacanti JP, Mayer JE. Tissue engineering of heart valves: valve replacement study in a lamb model. *Ann Thora cSurg.* 1995; 60: S513–S516
- 22) Shinoka T, Ma PX, Shum-Tim D, Breuer CK, Cusick RA, Zund G, Langer R, Vacanti

- JP, Mayer JE. Tissue-engineered heart valves: autologous valve leaflet replacement study in a lamb model. *Circulation*. 1996; 94: III64–III68
- 23) Hoerstrup SP, Sodian R, Daebritz S, Wang J, Bacha EA, Martin DP, Moran AM, Guleresian J, Sperling JS, Kaushal S, Vacanti JP, Schoen FJ, Mayer JE. Functional living trileaflet heart valves grown in vitro. *Circulation*. 2000; 102: III44–III49
- 24) Sodian R, Hoerstrup SP, Sperling JS, Daebritz S, Martin DP, Moran AM, Kim BS, Schoen FJ, Vacanti JP, Mayer JE. Early in-vivo experience with tissue-engineered trileaflet heart valves. *Circulation*. 2000; 102: III22–III29
- 25) Sutherland FWH, Perry TE, Yu Y, Sherwood MC, Rabkin E, Masuda Y, Garcia A, McLellan DL, Engelmayer GC, Sacks MS, Schoen FJ, Mayer JE. From stem cells to viable autologous semilunar heart valve. *Circulation*. 2005; 111: 2783–2791
- 26) Jockenhoevel S, Zund G, Hoerstrup SP, Schnell AM, Turina M. Cardiovascular tissue engineering: a new laminar flow chamber for in vitro improvement of mechanical tissue properties. *ASAIO J*. 2002; 48: 8–11
- 27) Mol A, Bouten CVC, Zund G, Guenter C, Visjager JF, Turina MI, Baaijens FPT, Hoerstrup SP. The relevance of large strains in functional tissue engineering of heart valves. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2003; 51: 78–83
- 28) Engelmayer GC, Rabkin E, Sutherland FW, Schoen FJ, Mayer JE, Sacks MS. The independent role of cyclic flexure in the early in-vitro development of an engineered heart valve tissue. *Biomater*. 2005; 26: 175–187
- 29) Mol A, van Lieshout MI, Dam GC, Hoerstrup SP, Baaijens FPT, Bouten CVC. Fibrin as a cell carrier in cardiovascular tissue engineering applications. *Biomater*. 2005;26:3113–3121

- 30) Mol A, Driessen NJB, Rutten MCM, Hoerstrup SP, Bouten CVC, Baaijens FPT. Tissue engineering of human heart valve leaflets: a novel bioreactor for a strain-based conditioning approach. *Ann Biomed Eng.* 2005; 33: 1778–1788
- 31) Schnell AM, Hoerstrup SP, Zund G, Kolb S, Sodian R, Visjager JF, Grunenfelder J, Suter A, Turina M. Optimal cell source for cardiovascular tissue engineering: venous vs. aortic human myofibroblasts. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2001; 49: 221–225
- 32) Cesarone CF, Bolognesi C, Santi L. Improved microfluorimetric DNA determination in biological material using 33258 hoechst. *Analyt Biochem.* 1979; 100:190–197
- 33) Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim Biophys Acta.* 1986;883:173–177
- 34) Huszar G, Maiocco J, Naftolin F. Monitoring of collagen and collagen fragments in chromatography of protein mixtures. *Analytic Biochem.* 1980; 105: 424–429
- 35) Rutten MCM, Wijlaars MW, Strijkers GJ, Peters GWM, Bouten CVC, Baaijens FPT. The valve exerciser: a mechanics-based bioreactor for physiological loading of tissue-engineered aortic valves. Abstract, 13th conference of the European Society of Biomechanics 2002 Wroclaw ,Poland
- 36) Marquez S, Hon RT, Yoganathan AP. Comparative hydrodynamic evaluation of bioprosthetic heart valves. *J Heart Valve Dis.* 2001; 10: 802–811
- 37) Schürch W, Seemayer TA, Gabbiani G. The myofibroblast. *Am J Surg Pathol.* 1998; 22: 141–147

- 38) Stradins P, Lacis R, Ozolanta I, Purina B, Ose V, Feldmane L, Kasyanov V. Comparison of biomechanical and structural properties between human aortic and pulmonary valve. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2004; 26: 634–639
- 39) Simon P, Kasimir MT, Seebacher G, Weigel G, Ullrich R, Salzer-Muhar U, Rieder E, Wolner E. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve synergraft in pediatric patients. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2003; 23: 1002–1006
- 40) Xing Y, Warnock JN, He Z, Hilbert SL, Yoganathan AP. Cyclic pressure affects the biological properties of porcine aortic valve leaflets in a magnitude and frequency dependent manner. *Ann Biomed Eng.* 2004; 32: 1461–1470
- 41) Driessen NJB, Mol A, Bouten CVC, Baaijens FPT. Modeling the mechanics of tissue-engineered human heart valve leaflets. *J Biomech.* 2006