

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA



FACOLTÀ DI INGEGNERIA

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

Tesina

Metodi alternativi al trattamento con glutaraldeide nei sostituti valvolari biologici

Relatrice:

Prof.ssa MONICA DETTIN

Laureanda:

CRISTINA CAVINATO

Anno Accademico: 2011/2012

Indice

Prefazione	i
1. Il cuore	1
1.1 Aspetti anatomici	1
1.2 Anatomia funzionale	3
1.3 Elettrofisiologia cardiaca	4
1.4 Ciclo cardiaco	6
2. Le valvole cardiache	10
2.1 Anatomia delle valvole del cuore	10
2.2 Principali valvulopatie	13
2.2.1. Stenosi aortica	16
2.2.2. Insufficienza aortica	17
2.2.3. Stenosi mitralica	18
2.2.4. Insufficienza mitralica	19
2.2.5. Prolasso mitralico	19
2.2.6. Valvulopatie tricuspидali	20
2.2.7. Valvulopatie polmonari	21
3. Sostituzione chirurgica delle valvole	23
3.2 Aspetti generali	23
3.1 Sostituti valvolari convenzionali	24
3.1.1. Protesi meccaniche	25
3.1.2. Protesi biologiche	30
3.1.3. Confronto tra bioprotesi e protesi meccaniche	33
3.2 Sostituti valvolari percutanei	36

4. Ingegneria tissutale e matrici biologiche	39
4.1 Decellularizzazione	40
4.1.1. Metodi di decellularizzazione	41
4.1.2. Effetti sulla protesi	44
4.2 Ripopolamento cellulare	45
4.3 Fissazione delle biopotesi con glutaraldeide	49
4.3.1. Principi	49
4.3.2. Comportamento meccanico	52
4.3.3. Grado di antigenicità	55
4.3.4. Il ruolo della glutaraldeide nella calcificazione	56
4.4 Strategie per prevenire la calcificazione	58
4.4.1. Inibitori della reazione di calcificazione	59
4.4.2. Modificazione o rimozione delle componenti calcificabili	60
4.4.3. Miglioramenti nella fissazione con glutaraldeide	61
4.5 Uso di sostanze diverse dalla glutaraldeide	63
4.5.1. PhotoFix	64
4.5.2. Composti epossidici	65
4.5.3. Acil azidi	66
4.5.4. Carboimmidi	67
4.5.5. Genipin	68
4.5.6. Reuterin	69
4.6 La ricerca avanzata e gli sviluppi futuri.	70
4.7 Conclusioni	74
Bibliografia	77

Prefazione

Con l'aumento dell'età media della popolazione anche il numero di patologie degenerative delle valvole cardiache è in generale crescita.

Attualmente, quasi il 30% dei decessi è dovuto a malattie cardiovascolari, che di conseguenza costituiscono la principale causa di morte in Europa; ogni anno, infatti, si stimano più di 4,3 milioni di morti a seguito di tali patologie, 2 milioni nella sola Unione Europea [1].

Le valvulopatie, in genere dette VHD (*Valvular Heart Diseases*), rappresentano una cospicua parte delle malattie cardiovascolari; di esse la stenosi aortica e l'insufficienza mitralica degenerativa sono le più comuni con un'occorrenza rispettivamente del 43% e 31% sul totale delle valvulopatie diagnosticate.

Nonostante l'intervento di sostituzione valvolare cardiaca abbia portato ad un aumento della sopravvivenza e della qualità della vita, approssimativamente il 60% dei pazienti sottoposti a tale operazione sviluppa gravi complicanze collegate alla protesi valvolare nei 10 anni successivi all'impianto [3].

Le valvole protesiche convenzionali attualmente utilizzate possono essere di due tipologie: meccaniche o biologiche. Fanno parte del gruppo delle protesi meccaniche più tipi di strutture, che variano per la forma e il funzionamento, composte con materiali non biologici, come carbonio pirolitico, metalli e polimeri; le protesi biologiche, invece, sono costituite da un tessuto di origine umana o animale che può essere o meno associato ad una struttura di sostegno non biologica.

Entrambe queste tipologie di valvole presentano dei limiti attribuibili, per le prime, alla necessità di terapie anticoagulanti a vita per impedire le malattie tromboemboliche e, per le seconde, alla limitata durata nel tempo legata ad eventuali degenerazioni strutturali, o alla scarsa disponibilità nel caso di sostituti di origine umana.

Le protesi biologiche, denominate anche bioprotesi, sono probabilmente la scelta migliore per la somiglianza all'assetto della valvola originaria sana e al basso rischio di tromboembolia, in virtù del quale non è richiesta l'assunzione a lungo termine di farmaci anticoagulanti.

Tuttavia, il loro svantaggio principale, ossia il progressivo deterioramento in vivo della parte biologica, può richiedere un'ulteriore intervento di sostituzione della valvola dopo un periodo relativamente breve, che si riduce ulteriormente nei pazienti di giovane età.

In particolare, l'impianto di bioprotesi valvolari di origine animale è una forma di xenotrapianto e, come tale, provoca una risposta immunitaria avversa, cellulare e umorale, più accentuata.

Al fine di ridurre i rischi di rigetto e degenerazione all'interno dell'organismo, tali strutture vengono fissate con uno specifico composto organico reticolante: la glutaraldeide.

La formazione di particolari legami tra la glutaraldeide e le proteine del tessuto innestato permette di rallentare l'azione immunitaria dell'organismo ma provoca, al tempo stesso, l'irrigidimento e la calcificazione dei tessuti. Tali svantaggi, di conseguenza, limitano l'utilizzo delle protesi tessutali e la loro preponderanza sulle protesi meccaniche.

In questa tesina sono valutati nuovi metodi, alternativi o aggiuntivi al trattamento con glutaraldeide, mirati ad eliminare gli effetti detrimenti introdotti da quest'ultima.

Capitolo 1

Il cuore

1.1 Aspetti anatomici

Il cuore (figura 1.1) è un organo cavo, impari e mediano, situato nella regione del mediastino medio, al di sopra del diaframma e tra i due polmoni; esso è in contatto con lo sterno e le cartilagini intercostali, frontalmente, ed è in prossimità della colonna vertebrale, posteriormente. L'organo fibromuscolare ha la basilare funzione di spingere il sangue in tutti gli organi e i tessuti del corpo, che lo rende l'organo centrale dell'apparato circolatorio. Ha forma triangolare prismatica e presenta quindi una base, tre lati e due margini.

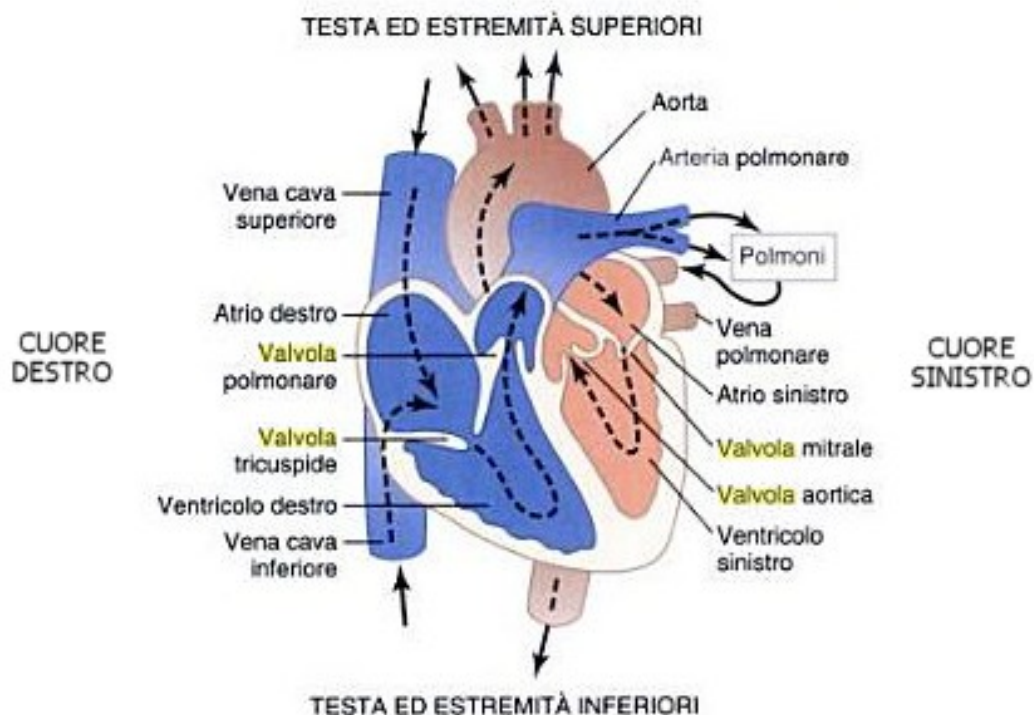


Figura 1.1: Struttura del cuore e direzione del flusso sanguigno [4].

L'apparato cardiaco è costituito da due pompe separate: un cuore destro, che pompa il sangue verso i polmoni, e un cuore sinistro, che pompa il sangue verso gli organi periferici. A sua volta ciascuna di queste due parti è una struttura pulsante a due camere; ognuna di esse è composta di un atrio, di piccole dimensioni e localizzato nella parte superiore, e un ventricolo, di dimensioni maggiori e situato in corrispondenza dell'apice del cuore.

Le due camere destre servono a pompare il sangue venoso ai polmoni, dove viene ossigenato per poi tornare alla parte sinistra del cuore che pompa il sangue arterioso in tutto il corpo. In particolare l'atrio è una debole pompa a iniezione che aiuta il sangue a fluire nel ventricolo; quest'ultimo rappresenta la principale forza di pompaggio che fa avanzare il sangue nel circolo polmonare, nel caso del ventricolo destro, e nel circolo periferico, nel caso del ventricolo sinistro. Le camere di sinistra (soprattutto il ventricolo) sono più spesse e forti di quelle di destra. Gli atri sono separati dai ventricoli da un disco di tessuto fibroso, nel quale sono inserite le valvole cardiache. Un setto muscolare interatriale separa l'atrio destro dall'atrio sinistro, e un setto interventricolare divide il ventricolo destro dal ventricolo sinistro; grazie a ciò, dopo la nascita, non avviene alcuna comunicazione tra la parte destra e la parte sinistra del cuore.

Gli orifizi che mettono in comunicazione le cavità cardiache con gli organi del corpo permettono il flusso del sangue in determinati vasi efferenti e sono anch'essi protetti da valvole che impediscono il reflusso. Posteriormente al cuore si trovano due vasi sanguigni: la vena cava superiore e la vena cava inferiore; essi, sfociando nell'atrio destro, riportano al cuore il sangue privo di ossigeno dai tessuti delle parti, rispettivamente, al di sopra e al di sotto del cuore. Superiormente, nella faccia anteriore del muscolo, si ha la compresenza dei due principali vasi arteriosi: a sinistra l'aorta e a destra l'arteria polmonare, continuazione dei ventricoli corrispondenti. L'aorta rappresenta l'arteria più grande e rilevante del corpo umano. Essa trasporta il sangue ossigenato a tutte le parti del corpo tramite la circolazione sistemica. L'arteria polmonare e le sue due diramazioni sono le uniche arterie che trasportano sangue venoso, ossia ad alta concentrazione di anidride carbonica e povera di ossigeno, partendo dal cuore e raggiungendo i polmoni. Infine, situati tra questi grandi vasi, ci sono le vene polmonari di destra e di sinistra che si collegano all'atrio sinistro e permettono al cuore di ricevere il sangue arterioso ricco di ossigeno e povero di biossido di carbonio.

In sezione trasversale, la parete del cuore presenta tre tonache, che dall'interno verso l'esterno sono:

- Endocardio: strato più interno, presente anche nei vasi sanguigni, composto da cellule endoteliali con la funzione di favorire lo scorrimento del sangue all'interno del cuore ed evitarne la coagulazione;
- Miocardio: strato intermedio dato da fibre muscolari cardiache, di spessore superiore rispetto alle altre due tonache e che si ispessisce ulteriormente in corrispondenza dei ventricoli;
- Epicardio: composto da uno strato continuo di cellule epicardiche, un tessuto connettivale ricco di collagene, contenente capillari linfatici e sanguigni e fibre nervose;

All'esterno delle tre tonache, una membrana spessa circa 20 μm avvolge il cuore e le radici di alcuni dei vasi efferenti; tale avvolgimento prende il nome di pericardio. Esso è formato da un sacco fibroso esterno costituito da tessuto connettivo denso, e da un sacco sieroso interno a doppia parete che, riflettendosi su se stesso, avvolge il cuore. I due foglietti del pericardio sieroso delimitano una cavità, ridotta ad uno spazio virtuale, nel quale un liquido chiaro e roseo permette al cuore una buona libertà di movimento, minimizzando gli attriti [5-6]

1.2 Anatomia funzionale

La muscolatura cardiaca si compone di unità disposte in una struttura a rete tridimensionale, mantenuta tale da continue separazioni e ricombinazioni. Come nel muscolo scheletrico, anche il tessuto muscolare del cuore presenta una struttura striata. Essa è costituita dalle cosiddette fibre miocardiche, cellule con un unico nucleo centrale, di forma allungata a Y irregolare, le cui estremità si connettono ad incastro mediante giunzioni di ancoraggio meccanico e giunzioni comunicanti. Nel citoplasma delle fibre sono presenti miofibrille, in fascetti disposti nel senso dell'asse maggiore della fibra, nei quali sono individuabili diverse bande chiare e bande scure ripetute.

I sarcomeri (così si chiamano le unità costituenti la miofibrilla) sono poi composti da filamenti sottili di actina e da altri più grossi di miosina in ordine alternato e parallelo. Questi

due tipi di proteine, scivolando l'una sull'altra determinano la contrazione muscolare e l'accorciamento del muscolo fino ad un terzo delle sue originarie dimensioni. Il fenomeno è messo in atto dalle teste globulari della miosina, dotate di proprietà enzimatiche che garantiscono l'energia necessaria idrolizzando l'ATP.

1.3 Elettrofisiologia cardiaca

Le cellule muscolari cardiache, per contrarsi, necessitano di uno stimolo elettrico che deve poi diffondersi in maniera sincrona in tutto il muscolo cardiaco. Il funzionamento del sistema si basa sulla continua transizione tra lo stato di riposo, in cui la fibra miocardica ha un potenziale di circa -90mV rispetto all'esterno, e lo stato di eccitazione cellulare o potenziale d'azione [4]. Il potenziale d'azione delle singole cellule muscolari del cuore è fenomeno “tutto o nulla” (a soglia), transitorio, caratterizzato da una fluttuazione elettrica lungo la superficie della membrana cellulare. Le sue fasi principali sono:

1. Rapida depolarizzazione fino a circa $+30\text{mV}$ (potenziale a punta), causata dall'apertura, sulla membrana, di canali rapidi per il sodio;
2. Parziale ripolarizzazione, per l'entrata dell'anione cloro che abbassa il potenziale verso 0 mV ;
3. *Plateau* di circa 200 ms , a fronte di un aumento della concentrazione interna di calcio compensata dalla diminuzione del potassio;
4. Lenta ripolarizzazione verso il ripristino del potenziale di riposo, dominata dalla corrente di potassio che riduce le cariche positive interne alla cellula.

Sebbene il cuore sia collegato al sistema nervoso autonomo, l'attività di contrazione cardiaca è completamente autosufficiente e provocata da una struttura intrinseca di conduzione. Questo struttura si compone di centri e di vie situati all'interno del cuore, che sono:

- Il nodo senoatriale (SA): striscia ellissoidale di miocardio specializzato lunga circa 10 mm e situata nella cosiddetta *crista terminalis*, sporgenza situata tra l'atrio destro e la vena cava superiore;
- Il nodo atrioventricolare (AV): secondo nodo situato nella zona inferiore del

setto interatriale e di costituzione identica al precedente;

- Le vie internodali: bande poste a collegare i due nodi presentati;
- Il fascio di His: cordone di cellule miocardiche specializzate che, in continuità con il nodo AV, si addentra nel setto interventricolare e qui si divide in due branche che si diramano nei miocardi del ventricolo destro e sinistro;
- Fibre di Purkinje: cellule terminali di conduzione del cuore con una spiccata capacità conduttiva.

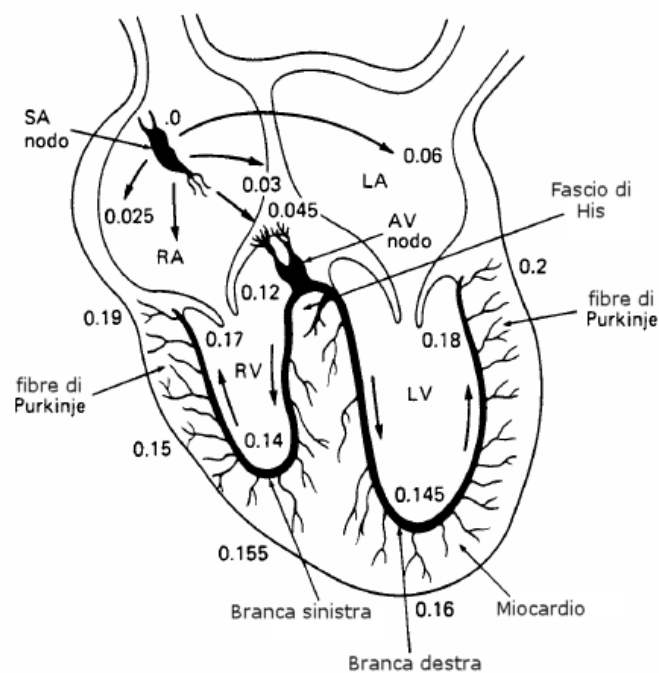


Figura 1.2: Propagazione dell'impulso nel cuore. I numeri indicano gli intervalli di tempo dal generarsi dell'impulso nel nodo AV.

Il nodo senoatriale funziona come un avviatore dell'attività del cuore. Qui le cellule del miocardio specializzato hanno la capacità di depolarizzarsi spontaneamente (automatismo) e generare un potenziale *pacemaker* a massima velocità. Si parla di *pacemaker* “ectropico” quando, invece, lo stimolo parte da cellule al di fuori del nodo SA. L'attività *pacemaker* è in parte controllata dal sistema nervoso autonomo: viene stimolata dai nervi simpatici e inibita mediante i nervi parasimpatici.

La propagazione avviene lungo il miocardio atriale sinistro, e poi nelle altre zone, per effetto di fenomeni di depolarizzazione, in primo luogo della membrana esterna dei centri e delle vie di trasmissione e, poi, delle membrane delle altre fibre miocardiche.

La trasmissione dei potenziali d'azione tra cellule limitrofe è permessa dalla presenza di un genere specifico di connessioni contenenti giunzioni comunicanti o dischi intercalari (*gap junction*). Una via preferenziale conduce lo stimolo all'atrio sinistro, dopodiché la precedenza in termini di ritmicità passa dal nodo SA al nodo AV.

Gli atri e i ventricoli riescono a lavorare come parti indipendenti poiché il tessuto connettivo che riveste il perimetro delle valvole cardiache non presenta dischi intercalari e ciascun atrio è isolato dal suo corrispettivo ventricolo; Il nodo AV è quindi l'unica via di conduzione ai ventricoli ed è anche la sede del ritardo di conduzione più rilevante. La conduzione ventricolare inizia nel fascio di His e l'estesa rete di fibre di Purkinje permettono che le cellule siano velocemente eccitate. Attraverso il setto intraventricolare, poi, la stimolazione passa ai muscoli papillari, per impedire l'estroffessione delle valvole AV, al resto del tessuto miocardico [4-7]

1.4 Ciclo cardiaco

Tutti gli eventi che hanno luogo nel periodo di un battito fanno parte del ciclo cardiaco. Principalmente, infatti, si osservano due parti diverse, la sistole e la diastole, che a riposo hanno una durata rispettivamente di 0,3 e 0,5 s circa; la prima è un'operazione di contrazione cardiaca, la seconda, invece, consiste in un intervallo di rilasciamento e riempimento (resting). La figura 1.3 mostra come esse si suddividano ulteriormente in vari periodi.

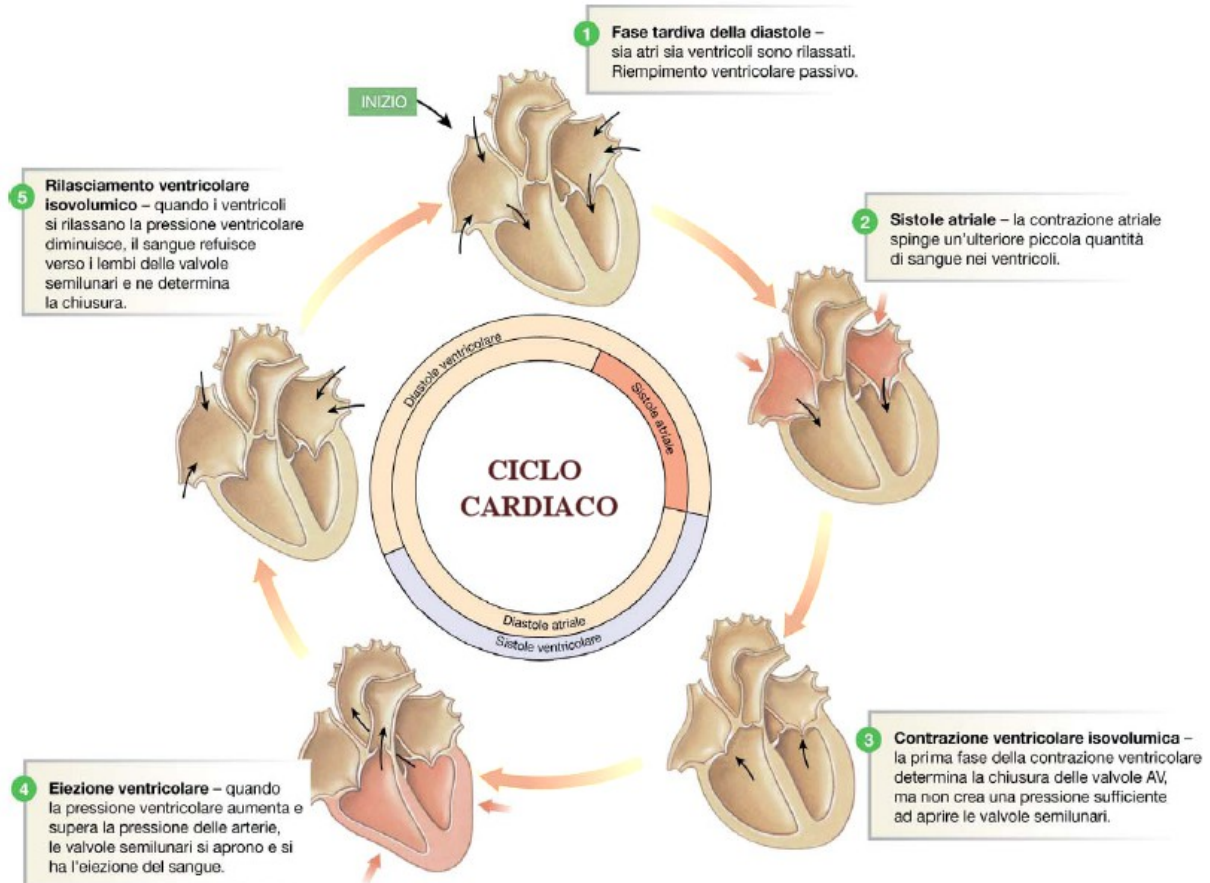


Figura 1.3: Fasi fondamentali del ciclo di funzionamento del cuore; le raffigurazioni mostrano le direzioni del flusso sanguigno, mentre nei riquadri ogni passaggio è descritto brevemente.

Si pone particolare attenzione alla registrazione dei potenziali elettrici generati in conseguenza dell'attività cardiaca; l'Elettrocardiogramma (ECG) illustra gli eventi meccanici principali del ciclo cardiaco. L'onda P è causata dalla depolarizzazione in diffusione nelle cellule atriali; essa è seguita dall'atto di contrazione e l'aumento percettibile della pressione atriale. A 0,16 secondi circa dalla formazione dell'onda P, si presenta il complesso QRS, prova della depolarizzazione ventricolare. Poco dopo l'aumento di pressione indica l'inizio della sistole ventricolare, che termina in concomitanza con la fine dell'onda T ventricolare. L'onda lenta T è causata dalle fibre ventricolari in rilassamento e alla fase di ripolarizzazione.

Nel suo insieme, l'elettrocardiogramma permette di riconoscere alterazioni della frequenza cardiaca, il percorso dell'onda potenziale nel cuore e le sue eventuali deformazioni, ischemie o

infarti che provocano regioni di sofferenza miocardica, casi di aumento del volume delle cellule del ventricolo (ipertrofia). La figura 1.4 illustra il tracciato di un normale elettrocardiogramma accompagnato da altri tracciati clinici comuni.

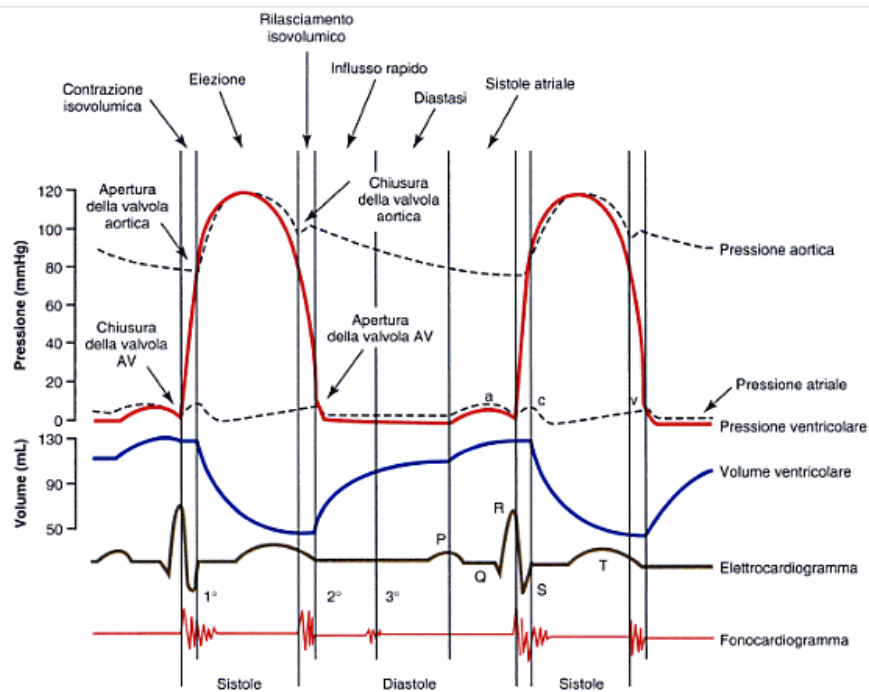


Figura 1.4: Eventi del ciclo cardiaco relativi alla funzione del ventricolo sinistro che mostrano i cambiamenti della pressione atriale sinistra, della pressione ventricolare sinistra, della pressione aortica, del volume ventricolare, l'elettrocardiogramma e la misura di un fonendoscopio posto sul torace [4]

Capitolo 2

Le valvole cardiache

2.1 Anatomia delle valvole del cuore

Nel cuore sono poste quattro valvole, il cui ruolo principale è regolare il flusso del sangue in modo che esso proceda in un'unica direzione durante la contrazione ed il riempimento delle camere cardiache. Le valvole sono costituite da foglietti di tessuto fibroelastico flessibili ma molto resistenti dette lembi, rivestite, su entrambi i lati, da un sottile strato endoteliale che si continua con quello delle camere cardiache e dei grossi vasi. Per stupirsi dell'incredibile lavoro di queste strutture, basti pensare che un cuore umano ha un ritmo tale da battere all'incirca 100800 volte in un giorno portando le valvole ad aprirsi, richiudersi e resistere alla pressione del sangue centinaia di milioni di volte nella vita di un uomo.

L'apertura e la chiusura di queste uscite non sono legate a nessun controllo nervoso o muscolare bensì sono in funzione delle variazioni pressorie interne al cuore, quindi della sola azione di spinta del sangue. L'orientamento della valvola stessa è essenziale per permettere al sangue di fluire nella giusta direzione attraverso atri e ventricoli.

La microstruttura di tutte le valvole cardiache è costituita principalmente da collagene, elastina e glicosaminoglicani (GAGs); collagene, elastina e GAGs compongono la matrice extracellulare (ECM). La disposizione di questi componenti in modo differente permette di riconoscere tre principali strati delle cuspidi valvolari: la ventricolare, prossima alla superficie ventricolare e ricca di elastina; la fibrosa o arteriosa, prossima alla superficie aortica e ricca di collagene; la spongiosa, posta nel mezzo e ricca di glicosaminoglicani (figura 1.5).

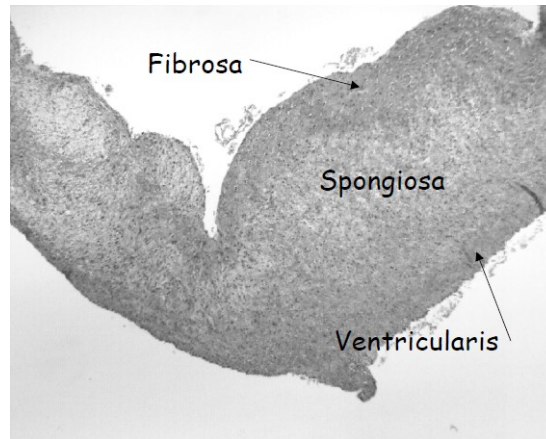


Figura 1.5: Fotografia di una sezione di tessuto valvolare; si notano le tre lamine di cui è composta: fibrosa, spongiosa e ventricularis.

Nel cuore ci sono quindi quattro valvole, e sono [75] :

- valvola tricuspide;
- valvola mitrale o bicuspid;
- valvola aortica con tre cuspidi semilunari;
- valvola polmonare con tre cuspidi semilunari.

Le prime due strutture sono regolatori atrio-ventricolari e collegano le camere superiori e inferiori. Esse possono essere classificate come apparati composti da: annulus, cuspidi (o lembi), commissure, orifizio, corde tendinee e muscoli papillari. Le cuspidi sono membrane fini e lucide, dai bordi irregolari. Nel cuore normale c'è un'ampia sovrapposizione dei lembi mobili nella posizione chiusa, essendo la superficie di tessuto quasi doppia alla effettiva larghezza del foro. In una zona rugosa di quest'ultima si inseriscono le corde tendinee, che originano dai muscoli papillari che, come già detto, sono funzionalmente utili per evitare protusioni dei lembi durante la sistole ventricolare. Mentre l'annulus fibroso e le commissure rappresentano un aggancio al miocardio circostante, l'orifizio valvolare consente il passaggio del sangue nella diastole.

La valvola tricuspide è posta tra le due camere del cuore destro e si compone di un lembo anteriore, uno mediale e uno o due posteriori.

La valvola mitrale, invece, ha sede nel lato opposto e consta di quattro cuspidi: il lembo

CAPITOLO 2. LE VALVOLE CARDIACHE

anteriore (aortico) e il lembo posteriore (murale) sono le più grandi, e le due cuspidi commessurali hanno minori dimensioni.

In un cuore normale, durante il riempimento ventricolare, i lembi valvolari sono chiusi a formare una specie di imbuto per il passaggio del sangue dagli atri ai ventricoli.

L'imboccatura che dal ventricolo sinistro immette nell'aorta e quella che dal ventricolo destro sfocia nel tronco polmonare dispongono di dispositivi regolatori che prendono il nome di, rispettivamente, valvola polmonare semilunare e valvola aortica semilunare.

Le valvole semilunari o arteriose sono strutturalmente molto diverse dalle valvole atrio-ventricolari. Esse sono formate da tre cuspidi equidimensionate, lisce, a forma di nido di rondine o di tasca. Una caratteristica distintiva di tali assetti è l'assenza di un anello circolare di tessuto connettivale, qual era l'annulus nelle valvole atrio-ventricolari, che segni la fine delle arterie e l'origine dei lembi valvolari; bensì, esistono protuberanze della parete arteriosa a forma di tre tasche dilatate che prendono il nome di seni aortici di Valsalva.

Nella zona mediale della linea di chiusura di ciascun lembo si nota la presenza di un piccolo ispessimento nodulare e, ad ogni lato del nodulo, lungo tutta la bordatura della cuspidi, di semilune di tessuto molto sottile con striature parallele al bordo.

Le valvole semilunari si schiudono in modo completo quando, dalla contrazione dei ventricoli, il sangue viene proiettato nelle arterie; vengono poi richiuse dalla decontrazione successiva degli stessi ventricoli e assumono una forma di nido di rondine ermeticamente chiusa dai lembi.

Gli orifizi della vena cava e delle vene polmonari, a differenza delle precedenti, non presentano sistemi valvolari [7].

La figura 1.6 mostra in modo realistico le quattro valvole cardiache appena descritte.

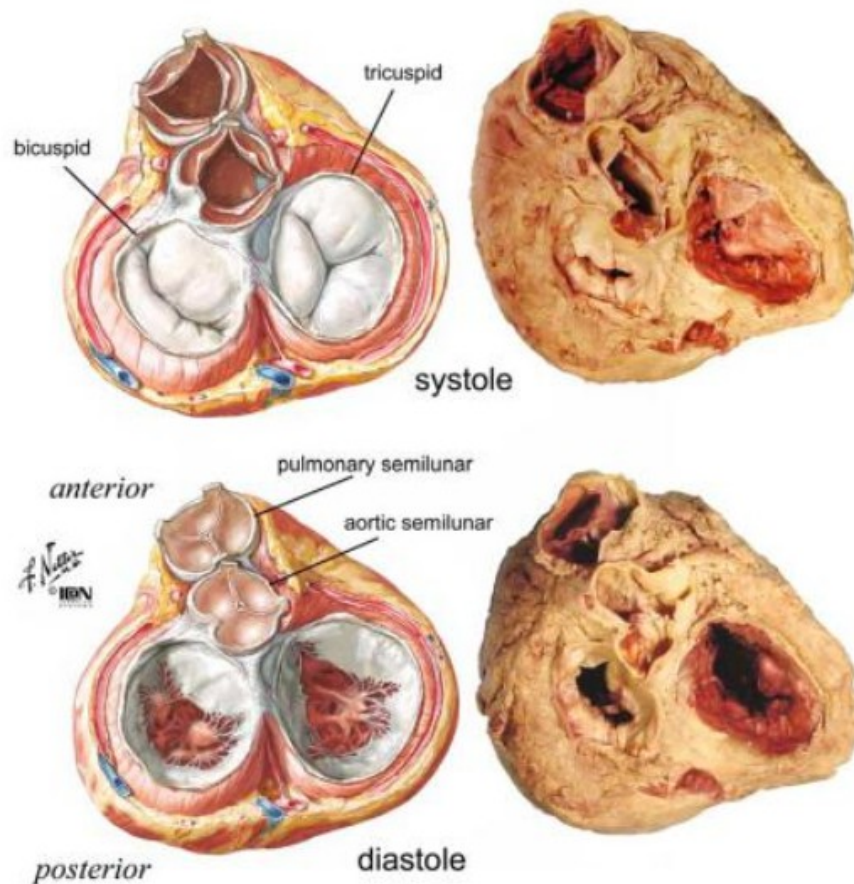


Figura 1.6: Valvole del cuore. Durante la sistole ventricolare, le valvole atrio-ventricolari si chiudono al fine di prevenire il rigurgito del sangue dai ventricoli agli altri. Durante la diastole ventricolare, le valvole atrio-ventricolari si aprono di conseguenza al rilassamento dei ventricoli e le valvole semilunari le seguono [7]

2.2 Principali valvulopatie

Le cardiopatie valvolari sono un ampio gruppo di patologie, acquisite o congenite, riguardanti le valvole atrio-ventricolari (tricuspide e mitrale) e/o le valvole semilunari arteriose (aorta e polmonare).

Prima del 1960, l'unica risorsa per lo studio del cuore era l'autopsia. I primi anni in cui le valvole cominciarono ad essere sostituite fornirono una ricca fonte di materiale necroscopico

mediante la quale le tecniche diventarono via via più raffinate. Tra il 1960 e 1970, molte migliaia di pazienti con malattie cardiache reumatiche subirono la sostituzione di una o più valvole cardiache. Poi, dal decennio successivo, gli enormi progressi nella profilassi antibiotica contro le infezioni batteriche cambiarono molto l'eziologia delle patologie del cuore e, perciò, la frequenza di febbre e cardiopatie di origini reumatiche scese drasticamente. Dagli anni '90 le operazioni di riparazione e asporto e la scelta di sostituti valvolari adatti sono diventati dei temi principali nello studio anatomico umano.

Valutando in modo generale l'ampio gruppo di alterazioni che determinano patologie valvolari, ci si può ricondurre ad una differenziazione prevalente: la stenosi e l'insufficienza.

Per stenosi valvolare si intende una diminuzione dell'area adibita al passaggio ematico attraverso l'orifizio valvolare, determinato dal restringimento della valvola stessa, e di conseguenza una modificazione del comportamento pressorio del sangue.

L'insufficienza valvolare, o rigurgito valvolare, è l'incapacità delle valvole, a causa di alterazioni anatomico-funzionali, di chiudere perfettamente i propri lembi, e la conseguenziale formazione di un flusso retrogrado di sangue.

Con alta frequenza e diversa misura, stenosi e insufficienza possono combinarsi nella stessa struttura, realizzando così una steno-insufficienza, o anche presentarsi in più di una valvola.

Entrambe le patologie possono essere collegate a diverse cause; principalmente si possono suddividere in valvulopatie congenite, ovvero alterazioni dello sviluppo embrionale presenti già dalla nascita, e valvulopatie acquisite successivamente che a loro volta sono:

- Degenerative, dovute all'usura della struttura e prevalentemente in pazienti anziani ;
- Infettive, successivamente ad endocarditi;
- Ischemiche, durante un infarto miocardico acuto;
- Traumatiche (molto rare);
- Secondarie, in relazione a forti dilatazioni del ventricolo e/o dei grandi vasi efferenti.

Nel settore destro del cuore, comprendente valvola tricuspide e valvola polmonare, il regime pressorio minore della circolazione polmonare implica un numero esiguo di queste disfunzioni, spesso di origini congenite; questo, però, non si ripropone nell'organo sinistro e le alterazioni dell'orifizio mitralico e aortico sono molto più comuni.

A seguito di questa breve spiegazione, è interessante valutare l'occorrenza, in termini numerici, di operazioni di sostituzione valvolare nel mondo occidentale degli ultimi anni (Tabella 1.1).

Tabella 1.1: Tipo di patologie valvolari in pazienti interessati da sostituzione di valvola aortica e/o mitrale o riparazione. Baylor University Medical Center (Dallas), 1993-2006 [2].

Valve dysfunction	Number of patients (%)
1. Aortic stenosis (AS)	985 (53)
2. Mitral stenosis (MS)	129 (7)
3. MS + AS	54 (3)
4. Aortic regurgitation (AR) [†]	326 (17)
5. Mitral regurgitation (MR)	313 (17)
6. MS + AR	10 (<1)
7. MR + AR	28 (1)
8. AS + MR	27 (1)
9. Tricuspid stenosis + MS + AS	0
Totals	1872 (100%) [‡]

In Europa le percentuali con cui vengono diagnosticate le specifiche anomalie sulle valvulopatie totali riscontrate risulta essere:

Tabella 2: Condizioni patologiche alle valvole cardiache in termini di percentuali; situazione relativa all'anno 2008.

Valvulopatia	Percentuale casi
Stenosi aortica	43%
Insufficienza mitralica	31%
Insufficienza aortica	13%
Stenosi mitralica	12%
Lesioni valvolari destre	1%

Circa il 20% di questi pazienti è affetto da lesioni valvolari multiple, e più frequentemente sono anomalie del cuore sinistro con effetti secondari sulle valvole delle camere destre [1, 8-10].

2.2.1 Stenosi aortica

Il restringimento patologico del lume dell'aorta, caratterizzato dall'ostruzione al flusso del sangue in uscita dal ventricolo sinistro nella sistole ventricolare, si riscontra nella valvulopatia chiamata stenosi aortica.

L'organo cardiaco può adeguarsi al sovraccarico di pressione combinando allo sviluppo di gradiente pressorio transvalvolare un'ipertrofia di tipo concentrico della cavità ventricolare; la massa muscolare del miocardio cresce senza che il ventricolo si dilati e causa maggior rigidità e minor possibilità di distensione passiva.

In un soggetto adulto normale medio l'area valvolare aortica è circa 2.5-3 cm²; in caso di stenosi un orifizio di 1.5-2 cm² è indice di stenosi lieve, mentre un valore di 1-1.5 cm² caratterizza una stenosi moderata e, infine, se è inferiore a circa 0.8 cm² è considerato una stenosi critica.

La sede dell'ostruzione può presentarsi, anche in modo combinato, in tre livelli: sottovalvolare, valvolare e sopra valvolare [17].

Si distinguono una forma acquisita e una congenita. La forma acquisita è calcifico-degenerativa senile oppure data da artrite reumatoide o reumatismo articolare acuto; nella forma congenita la valvola ha una malformazione (per esempio nel numero delle cuspidi) tale da determinare un flusso turbolento che causa deterioramento delle cuspidi, e in seguito rigidità, fibrosi e calcificazione (figura 1.7) [8-10].

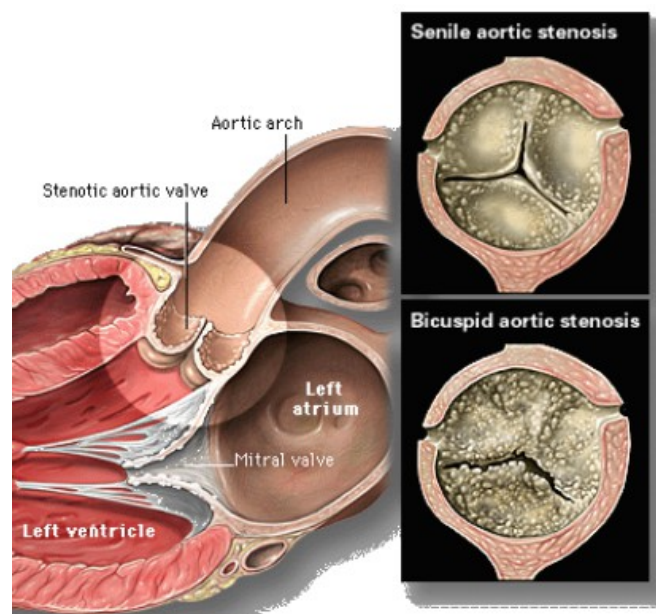


Figura 1.7: Rappresentazione di due esempi di stenosi aortica.

Un test diagnostico con elettrocardiogramma può riscontrare le tracce di un ipertrofia ventricolare sinistra e un sovraccarico sistolico dalla derivazione assiale sinistra; l'onda R tende ad avere voltaggio maggiore, il tratto ST risulta di livello inferiore e l'onda T è negativa (figura 1.8).

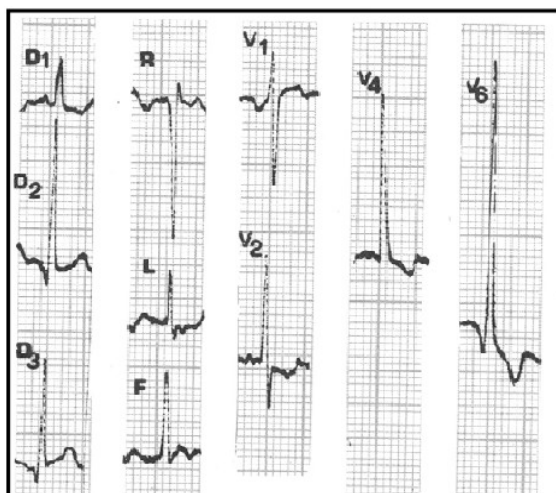


Figura 1.8: Tracciati elettrocardiografici che evidenziano le irregolarità patologiche della stenosi aortica.

2.2.2 Insufficienza aortica

L'insufficienza aortica, o rigurgito aortico, si basa su un reflusso diastolico dall'aorta al ventricolo sinistro per effetto di una lesione delle cuspidi semilunari oppure del primo tratto dell'aorta con un coinvolgimento delle cuspidi; la chiusura imperfetta dei tessuti provoca una diminuzione dell'efflusso di sangue in uscita con un ulteriore sforzo del cuore, che deve agire con forza maggiore.

La patologia può avere luogo progressivamente, in modo cronico, permettendo che il difetto venga compensato dal ventricolo, oppure in forma acuta, rapida e spesso con effetti gravi.

Nella insufficienza cronicizzata il ventricolo riesce a compiere un adattamento al sovraccarico con una dilatazione ventricolare e una leggera ed eccentrica ipertrofia. Tale bilanciamento, tuttavia, non riesce a mantenere inalterata l'attività sistolica per molto tempo, arrivando all'insufficienza ventricolare sinistra.

Il caso patologico acuto non lascia il tempo di sviluppare una compensazione di risposta; il risultato è un rapido aumento volumetrico del ventricolo, con una pressione ventricolare post-

diastole improvvisamente più alta.

In passato la malattia reumatica e la sifilide erano le cause primarie del rigurgito aortico; dopo la diminuzione radicale di questi casi l'incidenza maggiore è legata a malformazioni congenite, infiammazioni dell'endocardio, lesioni parietali o ipertensione arteriosa [8-10].

Nel test diagnostico con elettrocardiogramma, il sovraccarico del ventricolo sinistro può essere evidenziato da un aumento della tensione del complesso QRS. Nella fase iniziale, le onde T sono alte e positive nelle derivazioni precordiali sinistre e poi si invertono con un sottoslivellamento del tratto ST.

2.2.3 Stenosi mitralica

In un soggetto adulto normale l'orifizio mitralico situato tra l'atrio e il ventricolo sinistro ha un'area di circa 4-5 cm²; quando quest'area si riduce e, durante la fase di diastole, il normale flusso del sangue tra le due camere viene ostacolato si parla di stenosi mitralica. In rapporto al grado di restringimento si distinguono tre stadi: il livello lieve-moderato che presenta un'area valvolare di 2-1 cm², il livello severo con un'area di 1-0.6 cm² e il livello serrato con aree inferiori a 0.5 cm².

L'ostruzione al flusso nel cuore sinistro determina, in primo luogo, la diminuzione del riempimento del ventricolo e un aumento pressorio e dilatatorio della cavità atriale con l'alterazione e la congestione della circolazione polmonare. Nelle fasi avanzate del problema, il volume sanguigno nelle vene polmonari aumenta, portando a livelli elevati anche il regime pressorio nell'arteria polmonare. In queste condizioni anche il ventricolo destro soffre di sovraccarico e avvia uno sviluppo ipertrofico delle sue pareti; le compensazioni ventricolari possono non essere sufficienti a impedire l'insufficienza della valvola tricuspidaica e tutta la circolazione sistemica subisce delle alterazioni gravi [17].

Generalmente la stenosi mitralica è dovuta a malattie di eziologia reumatica dove il comportamento infiammatorio induce l'ispessimento e la cicatrizzazione dei lembi fino alla parziale fusione delle commisure e all'ipomobilità. Meno frequentemente è causato da altre patologie come malattie autoimmuni (Lupus Erimatoso Sistemico), calcificazione massiva dell'anello valvolare, infiammazione dell'endocardio, od occlusioni dell'orifizio di origine trombotica [8-10].

Un test clinico mediante ECG può evidenziare la presenza di una fibrillazione atriale, dell'ingrandimento atriale e di sovraccarichi al ventricolo destro.

2.2.4 Insufficienza mitralica

L'incompleta chiusura della valvola bicuspidale durante la sistole ventricolare causa il rigurgito di una quantità variabile di sangue nell'atrio sinistro. L'eziologia del fenomeno può essere primitiva, per un'anomalia congenita dell'apparato mitrale, oppure secondaria, a fronte di un danno localizzato o di una dilatazione della camera ventricolare sinistra. L'acquisizione, nei casi più comuni, può avvenire attraverso alterazioni degenerative, alcune malattie reumatiche che deformano e accorciano i lembi, la rottura dei muscoli papillari e delle corde tendinee a seguito di cardiopatie ischemiche o endocarditi infettive.

Come per il rigurgito a livello aortico, anche per questo caso si ha un caso acuto e un caso cronico, in cui la frazione di rigurgito che ritorna all'atrio in fase di sistole può arrivare anche al 70%; La forma acuta è di solito dovuta alla perforazione dei lembi, alla rottura delle corde tendinee oppure a disfunzioni dei muscoli papillari; la forma cronica si presenta a seguito di malattie reumatiche o del tessuto connettivo, prolasso mitralico [8-10].

Un esame con l'elettrocardiogramma può sottolineare i segni di una fibrillazione atriale o un sovraccarico ma, in generale, non dà molte informazioni utili; il test clinico più consigliato è l'ecocardiogramma.

2.2.5 Prolasso mitralico

La sindrome da prolasso mitralico consiste in una deformazione dell'apparato valvolare mitralico con conseguenze importanti, sulla protusione dei lembi oltre il piano atrio-ventricolare durante la sistole ventricolare.

Tale patologia in genere è indipendente dalle altre valvulopatie e la sua incidenza è attualmente del 4-5% dell'intera popolazione. Nel 90% dei casi non si presentano effetti di rigurgito mentre, nella situazione opposta, una fluttuazione esagerata o un'infiammazione batterica possono generare un'insufficienza mitralica progressiva [17].

L'elettrocardiogramma può risultare normale o evidenziare, soprattutto nella derivazione

inferiore, segmenti ST alterati e onde T invertite.

2.2.6 Valvulopatie tricuspидali

I vizi tricuspидali sono estremamente infrequenti come patologie isolate e si associano facilmente ad una valvulopatia mitralica o aortica.

La stenosi tricuspидale è il restringimento dell'ostio tricuspидalico con conseguente ostacolo al passaggio ematico nel canale atrio-ventricolare di destra. Essa trova la sua origine soprattutto nella malattia reumatica e nell'endocardite infettiva, per via congenita oppure come effetto secondario di altre patologie. In un soggetto sano l'area valvolare in questione è in genere di 6-7 cm²; una valvola stenotica presenta in genere un orifizio di grandezza inferiore a 2 cm².

L'ostacolo spaziale provoca l'aumento della pressione atriale destra e la riduzione del riempimento ventricolare destro. La circolazione venosa sistemica acquista un regime pressorio maggiore e lo stato di congestione passiva implica problematiche anche a livello di fegato, reni e milza [17].

Basandosi su un test clinico con ECG, il segnali di un sovraccarico atriale destro si leggono da un onda P superiore a un voltaggio di 0.25 mV nelle derivazioni precordiale V1 e periferica D2.

L'insufficienza della tricuspide è contraddistinta da un ritorno del sangue nella camera superiore destra quando il relativo ventricolo si contrae, con un'eccedenza di volume ematico in entrambe la cavità e nelle vene cave. Si può operare una distinzione tra i rigurgiti primitivi e secondari: la tipologia primitiva può essere in forma congenita oppure acquisita per via reumatica, degenerativa, infettiva o ischemica; il tipo secondario si instaura invece in relazione ad un sovraccarico preesistente del ventricolo destro, dovuto ad un' ipertensione polmonare nella maggioranza dei casi [8-10].

Con l'elettrocardiogramma, in pazienti affetti da insufficienza tricuspидale, si evidenziano in modo frequente i segnali di sovraccarico ventricolare destro e fibrillazione atriale.

2.2.7 Valvulopatie polmonari

Le patologie della valvola polmonare sono rare e in genere secondarie o congenite; l'occorrenza di malattie reumatiche ed endocarditi infettive è molto inferiore rispetto alle altre sedi. L'anomalia più comune è l'insufficienza secondaria alla dilatazione dell'annulus provocata da ipertensione polmonare; essa è comunque oscurata dalle ben più gravi conseguenze della circolazione modificata.

In caso di stenosi valvolare le cuspidi valvolari risultano ispessite, ipomobili ed inoltre il tronco può essere dilatato [8-10].

Capitolo 3

Sostituti valvolari cardiaci

3.1 Aspetti generali

Le stenosi aortica e mitralica sono i più comuni disturbi valvolari in età adulta. Con l'aumento generale della speranza di vita nella popolazione anche queste problematiche si fanno più rilevanti: una stenosi aortica moderata aumenta dal 2,5 % degli individui fino ai 75 anni all'8,1 % all'età di 85,7 anni. Una volta riscontrata la presenza di una stenosi aortica, l'area dell'orifizio valvolare decresce con un tasso medio di 0.1 cm² per anno. Dopo un lungo periodo di latenza, i pazienti possono sviluppare sintomi di angina, sincope e insufficienza cardiaca, con stenosi via via più grave [12-13].

Dopo l'insorgenza dei sintomi, il rischio di morte improvvisa è molto alto e la sopravvivenza è in media di 2-3 anni; la sostituzione chirurgica è in alcuni casi l'unico rimedio efficace.

Il rimpiazzo della valvola aortica risulta il più comune intervento alle valvole cardiache, in particolare in pazienti anziani, con una occorrenza del 60-70 %. Esso è necessario per la patologia severa, sintomatica e calcificata ed è consigliato anche nella situazione in cui il paziente presenta stenosi severa e asintomaticità o stenosi lieve-moderata in rapida progressione.

Il rischio di mortalità nel periodo precedente o immediatamente successivo all'intervento chirurgico è di circa 3-4 %, aumentando al 5,5-6,8 % quando è associato ad un *by-pass* aortocoronarico già presente nel paziente.

Il rigurgito della valvola mitrale è il secondo motivo più comune per la sostituzione valvolare negli adulti più anziani; Esso colpisce il 2,3 % circa della popolazione dai 60 ai 69 anni e il 5,5 % degli individui di età superiore [12-13].

Chi ne è affetto ad un livello lieve o moderato può rimanere asintomatico per molti anni; per

pazienti ad uno stadio cronico severo, in contrasto con quanto concerne la stenosi aortica, la riparazione della valvola è considerata un'opzione ed è maggiormente consigliata.

Un intervento chirurgico di sostituzione valvolare convenzionale permette di rimuovere una valvola malata e rimpiazzarla con una valvola meccanica o biologica. Tutto ciò richiede, in linea di massima, l'anestesia generale, l'apertura chirurgica longitudinale della parte anteriore del torace attraverso lo sterno e un *by-pass* cardio-polmonare. Un intervento di questo tipo dura normalmente da 3 a 6 ore; il paziente viene dimesso dall'ospedale dopo una settimana circa e il recupero dura, di solito, dalle 6 alle 12 settimane in assenza di complicanze [11-13]. La terapia post-operatoria varia soprattutto in rapporto alla tipologia di valvola installata.

3.2 Sostituti valvolari convenzionali

Lo scopo basilare di un sostituto valvolare è quello di avvicinarsi il più possibile alle seguenti condizioni di idealità:

1. Emocompatibilità: il materiale deve dare bassa o nulla azione trombogenica, emolitica e denaturante;
2. Sicurezza: non ci devono essere cedimenti strutturali e complicanze intrinseche alla protesi per un tempo pari all'aspettativa di vita del portatore;
3. Performance emodinamica: la nuova valvola deve ricomporre un flusso transprotesico il più simile possibile a quello fisiologico originale, privo di resistenze, rigurgiti durante la diastole e turbolenze e mantenendo il gradiente di pressione nella norma.

Inoltre, per una buona versatilità, la protesi dev'essere reperibile in varie dimensioni, adatte alla conformazione fisica e alla corporatura specifiche del portatore, non deve creare particolari difficoltà di impianto e dev'essere in parte radiopatica per eventuali analisi ai raggi X.

Fin dai primi anni cinquanta sono stati implementati più di ottanta diversi modelli valvolari convenzionali. In generale tutti si possono suddividere in due macrogruppi: le protesi meccaniche e le protesi biologiche.

Le differenze basilari nella scelta di una tipologia rispetto all'altra sono correlate al deterioramento strutturale, superiore nelle bioprotesi, e al rischio di tromboembolia, maggiore nelle valvole artificiali.

Per confrontare le caratteristiche funzionali dei sostituti valvolari cardiaci verrà preso a modello il sostituto della valvola aortica [14].

3.2.1 Protesi meccaniche

Le protesi meccaniche, o artificiali, sono costruite principalmente con materiali metallici, polimerici e carbonio pirolitico; questi materiali danno un'ottima garanzia di durata nel tempo perché, in linea generale, si tratta di elementi non eccessivamente deformabili dalle sollecitazioni meccaniche a cui vengono sottoposti.

In particolare il carbonio pirolitico ha rappresentato, a metà degli anni settanta, periodo della sua scoperta, un enorme passo in avanti dal punto di vista ingegneristico grazie alle sue incredibili proprietà di resistenza, durezza, inerzia chimica e leggerezza.

Lo scheletro su cui si basa la struttura protesica è composto da uno a più elementi mobili (*occluders*) differentemente vincolati, attraverso un alloggiamento specifico (*housing*), ad una parte ben fissata al tessuto miocardico, ossia la base vera e propria della valvola (*sewing ring*). L'area effettiva di passaggio ematico consiste in una parte in cui appoggia l'elemento mobile (*seating area*), che può essere a sovrapposizione, quando l'occlusore è di larghezza maggiore rispetto all'orifizio, o a pieno orifizio se, invece, l'occlusore è più piccolo dell'apertura.

A loro volta le valvole meccaniche si possono ripartire in funzione alla loro struttura in *caged-ball*, *single-tilting-disk* e *bileaflet-tilting-disk* [15].

Il modo con cui il sangue circola attraverso l'apertura è definito dal tipo di conformazione scelto: il flusso ematico può essere permesso solo lungo i bordi interni del meccanismo artificiale, essere centrale oppure essere una combinazione dei due diversi tipi (figura 3.1).

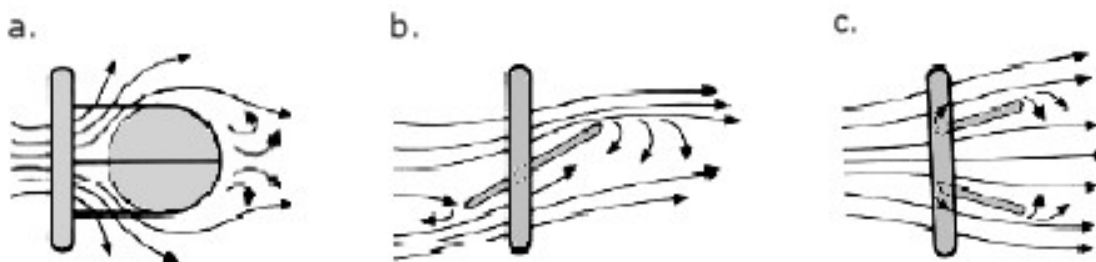


Figura 3.1: Schematizzazione del flusso ematico attraverso i diversi tipi di valvole meccaniche; *ball and cage* (a), *single-tilting-disk* (b), *bileaflet-tilting-disk* (c)

Le prime valvole cardiache artificiali furono impiantate nel 1952 dal dott. Hufnagel ed ebbero una struttura a *caged-ball*; esse utilizzavano una sfera di polietilene ospitata in una gabbia in polimetilmetacrilato che ne restringeva il campo di movimento.

La *ball and cage valve*, o valvola a palla, rappresenta quindi una prima generazione di meccanismi protesici con un elemento centrale di chiusura e un flusso del sangue di tipo periferico. Di esse si possono distinguere due sottogruppi: le protesi a palla ingabbiata e le protesi a disco ingabbiato, anche se quest'ultime sono state una soluzione presto accantonata.

La valvola a palla di Starr-Edward rappresenta la più vecchia struttura valvolare artificiale tuttora in uso, mantenendo il primato sulle altre per la più lunga prestazione prevista all'impianto. Il progetto originario trae spunto da un antico sistema di chiusura delle bottiglie poiché la sfera mobile si muove, forzata dalla pressione del flusso del sangue, da un punto ad un altro della gabbia. Se nell'aorta la pressione è minore rispetto alla regime pressorio creato dal cuore nel ventricolo sinistro la sfera si apre, allontanandosi dal cuore fino al blocco di metallo. Il sangue riesce a fluire verso l'aorta finché, con il rilasciamento isovolumetrico del ventricolo, la pressione in questa camera si riduce e il sangue rifluisce indietro; analogamente a come prima permetteva la chiusura della valvola semilunare, ora il sangue chiude l'orifizio della protesi, riportando la pallina nella posizione di partenza. La figura 3.2 descrive una struttura semplificata di tale protesi.

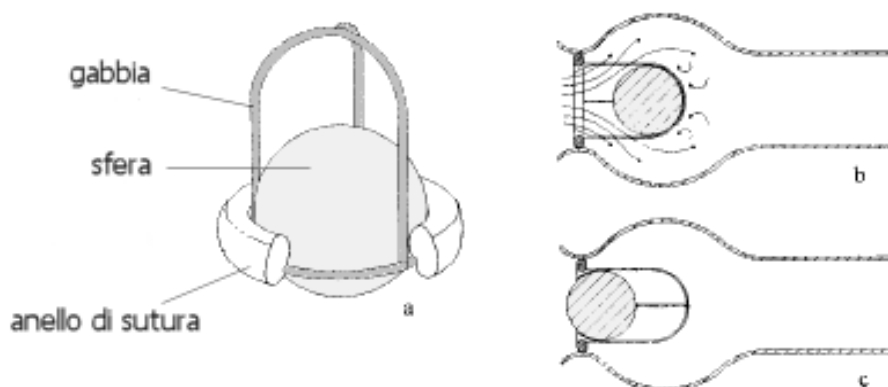


Figura 3.2: Struttura di una protesi valvolare *ball and cage* (a) e relativo funzionamento in eiezione (b) e rilasciamento (c) ventricolare.

I materiali impiegati nella valvola di Starr-Edwards sono la gomma siliconica trattata con un particolare procedimento di modellamento ad alte temperature (Silastic) per la sfera di occlusione, la lega Co-Ni-Cr-Mo (stelliti) per la gabbia, e il Teflon o il polipropilene per l'anello.

Il difetto principale che caratterizza la struttura è rappresentato dal suo ingombro, molto superiore a quello relativo alle cuspidi naturali: esso, in un rilevante numero di pazienti potrebbe causare emolisi e trombosi clinicamente significative. Il secondo difetto è dato, poi, dal flusso periferico del sangue rispetto alla sfera, differente da quello fisiologico di tipo centrale, che causa forti distorsioni del movimento ematico e occlusioni.

Un ultimo grave danno, rivelato dalle analisi microscopiche su alcuni alloggiamenti asportati, è la realizzazione di un processo di usura che libera in circolo silicio sotto forma di frammenti.

Negli anni che seguirono le prime esperienze di sostituzione, si capì che, per andare a buon fine, ogni prototipo valvolare doveva attenersi alle “nove regole sulle protesi di valvola cardiaca” [14] :

- Prevenzione di ogni evento tromboembolico;
- Lunga durata;
- Semplicità e stabilità nell'impianto;
- Riduzione di turbolenze nel flusso sanguigno;

- Riduzione dell'emolisi;
- Riduzione del rumore;
- Aumento della biocompatibilità;
- Preservazione dei tessuti cardiaci vicini;
- Miglioramento dei metodi di sterilizzazione e conservazione.

Per poco più di 10 anni le strutture *ball and caged* rimasero le uniche sul mercato. Al fine superare le problematiche che permanevano nello sviluppo delle valvole a sfera si passò ad una seconda generazione: le valvole a singolo disco oscillante (*tilting disk*). Queste strutture comprendono un disco centrale incernierato, rispetto ad un anello circolare di sostegno, mediante due prolungamenti. I prolungamenti sono montanti fissati saldamente all'anello metallico per garantire l'apertura e la chiusura passive dell'orifizio, seguendo il flusso sanguigno in modo passivo (figura 3.3). Il disco si apre in modo obliquo rispetto al piano dell'anello, con un'angolazione massima di 75° nelle protesi valvolari aortiche e 70° in quelle della valvola mitrale. Inizialmente i materiali di costruzione erano di tipo polimerico mentre, ora, la quasi totalità delle protesi monodisco in commercio sono di grafite ricoperta con carbonio pirolitico.

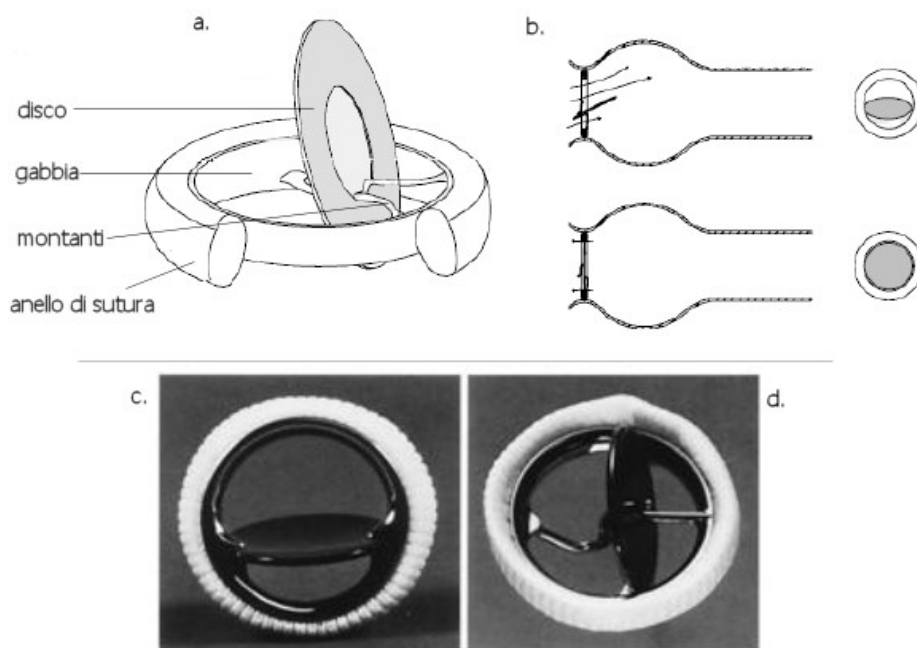


Figura 3.3: Struttura di una valvola a *single-tilting-disk* (a), movimento passivo del disco (b) ed esempi reali di protesi Omniscience (c) e Medtronic-Hall (d).

Grazie a questa nuova conformazione a basso profilo si ha raggiunto un sostanziale miglioramento, sia per quanto riguarda il controllo del flusso ematico, che viene molto meno distorto, sia per le importanti proprietà anticoagulanti del materiale usato.

Vi sono in uso, al momento, due maggiori valvole monodisco. La valvola chiamata Omniscience è costituita da un alloggiamento in titanio e un anello di sutura in velluto di Teflon, in cui si muove il disco di carbonio pirolitico; la seconda tipologia, molto simile alla prima e chiamata Medtronic, ha un piccolo foro centrale nel disco pirolitico in cui passa il montante sigmoide centrale.

La terza e ultima generazione fu introdotta nel 1977 con i primi impianti di valvole a due emidischi oscillanti (*bileaflet valves*) che si vedono in figura 3.4. Le caratteristiche innovative che essa presenta sono la divisione della struttura mobile in due dischi di forma semicircolare tali che, se aperti totalmente, formano tre aperture, ai due lati e centralmente, attraverso cui può continuare il flusso. La rotazione per l'apertura è garantita da quattro perni, o cardini, situati parallelamente lungo il diametro.

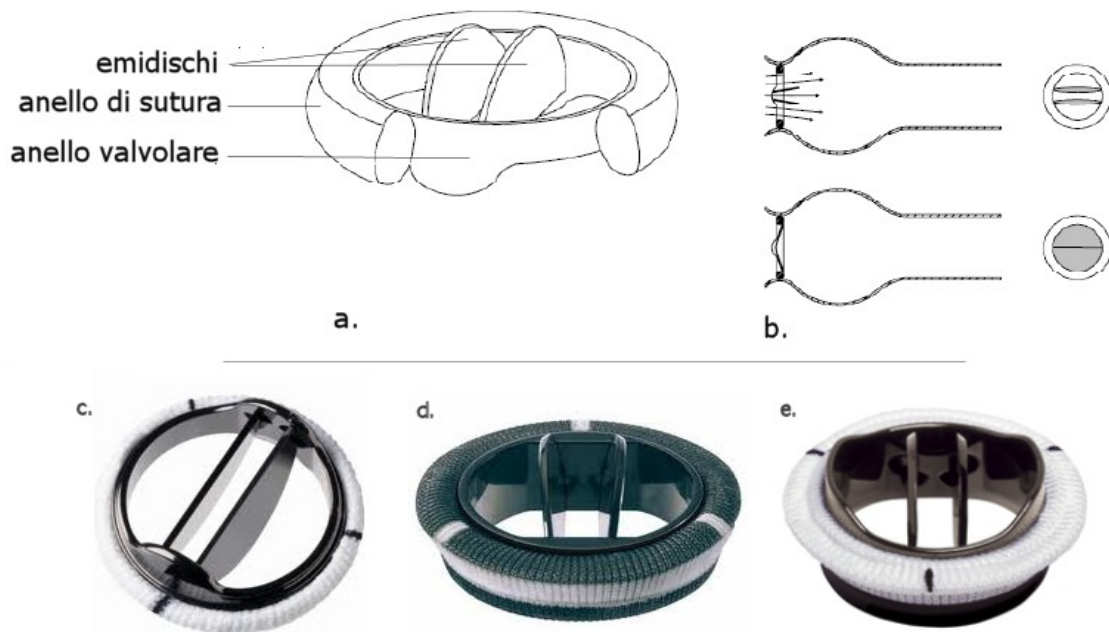


Figura 3.4: Struttura di una valvola a *bileaflet-tilting-disk* (a), movimento della parte mobile (b) ed esempio di valvola *bileaflet* St Jude Medical(c), CarboMedics(d) e On-X(e)

La posizione aperta permette un angolo massimo di 85° tra una semiluna e il piano della valvola; invece, in posizione chiusa i due emidischi formano un angolo ottuso di 120° . Nella maggior parte dei casi, la struttura interna è data da un elemento di grafite rivestito di carbonio pirolitico e, inoltre, l'aggiunta di un 5-10 in percentuale di peso di tungsteno permette la visibilità della valvola ai raggi X.

Come si poteva vedere dalla figura 3.1, la particolare fluidodinamica di questo tipo di protesi si avvicina incredibilmente a quella fisiologica del sangue nelle valvole originarie, in contrapposizione con il flusso turbolento e strettamente periferico delle protesi *cage-ball*. Per di più le linee di corrente sanguigna, a differenza del *single-tilting-disk* nel quale sono deviate da un lato, sono simmetriche e di direzione parallela all'asse della struttura.

Le valvole *bileaflet* sono largamente impiegate e in tutto il mondo si contano più di due milioni di impianti, sia in posizione aortica che mitralica. Attualmente, sul mercato si trovano quattro principali protesi *bileaflet*: la St. Jude Medical (dal 1977), la CarboMedics (dal 1986), la On-X (dal 1996) e la ATS Medical (dal 1992)[15].

Lo svantaggio che inevitabilmente permane, nella terza come nella seconda generazione di sostituti, è un piccolo flusso retrogrado di 5-10 ml per battito.

3.2.2 Protesi biologiche

Con il termine bioprotesi si definisce generalmente un sostituto valvolare composto da una parte di origine biologica, prelevata soprattutto da animali, e una parte artificiale, metallica o polimerica; in questo modo non si hanno più elementi meccanici mobili, bensì è il materiale stesso a deformarsi passivamente sotto la guida del flusso sanguigno.

Il principale beneficio nell'uso di questa strategia è il basso rischio di tromboembolia, in virtù del quale non è richiesta una terapia anticoagulante a lungo termine. Fino a circa tre mesi dall'operazione di sostituzione la formazione di tromboemboli è ancora un rischio rilevante; superato questo periodo, in genere, il paziente non ha più la necessità di farmaci anticoagulanti. Tuttavia la degradazione in vivo del materiale, a seguito di un processo di calcificazione e ai cicli di fatica, porta una durata limitata di circa 10-15 anni.

Una prima classificazione distingue tre diversi gruppi di sostituzione bioprotesica:

- *Autografts* : valvole cardiache costruite prelevando tessuto dal paziente stesso durante l'intervento (pericardio, fascia lata, valvola polmonare);
- *Homografts* o *Allografts* : valvole naturali umane ottenute dal cuore espantato di un donatore vivente o da cadavere;
- *Xenografts*: letteralmente sono valvole trapiantate da una specie ad un'altra; in questo caso si ricavano da specie animali (porcine o di pericardio bovino).

L'introduzione delle bioprotesi, anche dette protesi tessutali, avvenne nel 1962, quando Ross e Barrett-Boyes riuscirono a compiere con successo le prime sostituzioni di valvole aortiche prelevate da cuore umano. Le strutture, dopo l'espanto, venivano trattate con liquidi ad azione microbica rapida e reimpiantate dopo un breve lasso di tempo. Tuttavia, questi omoinnesti non si diffusero, a causa della forte degenerazione che queste valvole subivano in pochi anni dalla sostituzione. I primi innesti di valvole animali avvennero, invece, per opera di Binet, Duran, Carpentier e Langlois nel 1965 e, in modo prevedibile, ottennero anch'essi scarsi risultati.

Nel 1969 l'uso innovativo della glutaraldeide da parte di Carpentier e dei suoi collaboratori permise un grande miglioramento nella conservazione dei tessuti biologici. L'importanza della glutaraldeide sta nel fatto che questa ha un effetto citotossico apprezzabile sulle cellule dei tessuti, diminuendo la loro immunogenicità e rendendoli molto meno fragili davanti a fenomeni degenerativi.

Dal 1971 le protesi porcine fissate in glutaraldeide si usano come eteroinnesti nelle operazioni sostitutive di valvole aortiche e mitraliche. Le valvole vengono separate dal resto dei tessuti cardiaci del maiale senza alcuna frammentazione dei lembi o degli altri apparati, dopodiché si suturano su un'impalcatura rigida (*stent*) che garantisce la forma tridimensionale e costituisce. Però, anche un limite sterico.

Attualmente, sfruttando la straordinaria affinità anatomica tra il cuore umano e quello del maiale, si utilizzano tre tipologie di protesi porcine: la valvola Hancock (dal 1971 con successive modifiche), la valvola Carpentier-Edwards (dal 1975 con successive modifiche) e la valvola Medtronic-Intact (dal 1984); in figura 3.5 si può osservare degli esempi di tali strutture.

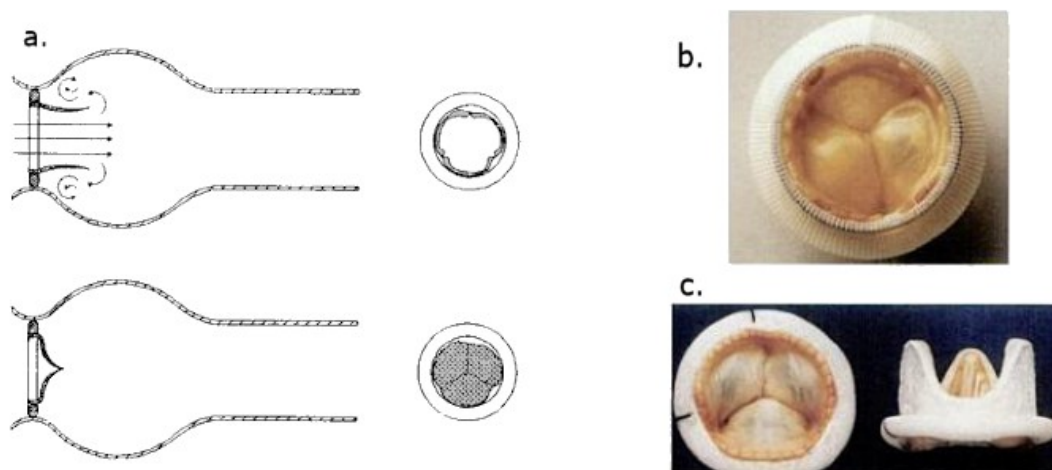


Figura 3.5: (a) Come la protesi porcina segue il flusso sanguigno; Esempi di valvole Hancock (b) e Carpentier-Edwards (c) [16].

Per ovviare ai possibili effetti di ostruzione, calcificazione e degenerazione dello *stent* rigido, dagli ultimi anni '80, sono entrate nella pratica cardiaca le protesi *stent-less*, senza *stent*, che presentano proprietà emodinamiche e antitrombogene superiori.

Le protesi di pericardio bovino (figura 3.6) furono introdotte nel 1966, prima su *stent* in titanio e successivamente su *stent* di materiale polimerico. Il tessuto, ottenuto in strisce di spessore costante e di circa 0.4 mm, viene suturato esternamente sul supporto valvolare.

La scelta di utilizzare su questo specifico tessuto viene motivata dal design superiore, che determina un orifizio valvolare più largo rispetto agli eteroinnesti porcini e, quindi, una minore resistenza idraulica a valvola aperta. Per quanto concerne il trattamento di fissazione, questo è analogo a quello impiegato per le valvole porcine. Occorre però tenere presente che, durante il trattamento con glutaraldeide, è necessario deformare il pericardio affinché ottenga e mantenga la geometria spaziale di una valvola.



Figura 3.6: Esempi di valvole pericardiche bovine (Carpentier-Edwards a destra e Sorin Pericarbon a sinistra) [16].

Parallelamente allo sviluppo delle valvole eterologhe, continua anche la pratica chirurgica con homografts, seppur sfavorita dalla limitata disponibilità di donatori; solitamente la valvola umana viene prima ottenuta esportando l'intera radice aortica o polmonare e, successivamente, trattati con crioconservazione (-196° C).

3.2.3 Confronto tra bioprotesi e protesi meccaniche

Prima di valutare vantaggi e svantaggi di ogni tipo è importante considerare che l'impianto di qualsiasi sostituto valvolare muta la valvulopatia originaria in un'altra infermità meno grave, che è la protesi; si può in definitiva concordare con l'affermazione: «Nessuna protesi è meglio di qualsiasi protesi» [18].

Come conseguenza all'ultima affermazione, si fanno avanti importanti domande circa la capacità, di ciascun tipo di protesi, di offrire una più lunga sopravvivenza o il minor rischio di complicanze.

La caratteristica comune a tutti i tipi di protesi artificiale attualmente impiegati è rappresentato da una durata certamente superiore alle protesi biologiche, che può teoricamente ampliarsi a tutta la vita: secondo un rapporto di *American College of Cardiology/American Heart Association*, dopo 11 anni dall'operazione si apprezza una quasi completa assenza di difetti strutturali [19]. Il loro svantaggio dominante, invece, è rappresentato dalla terapia di anticoagulanti orali necessaria durante tutto il resto della vita e che può causare eventi emorragici gravi, in particolare in persone con più di 70 anni. Si stima che, senza tali farmaci, aumenterebbe del 34 % il rischio di trombosi e tromboembolia, che tuttavia permane in piccola parte anche con la terapia costante: l'incidenza di malattie trombotiche in presenza della terapia è di 0,5 - 3 % annuo per le valvole in posizione aortica e 0,5 - 5 % annuo per quelle in posizione mitrale [20-21].

Le valvole meccaniche sono particolarmente indicate ai pazienti che già ricorrono a farmaci antitrombotici per fibrillazioni atriali ricorrenti, e ai pazienti più giovani, per i quali la somministrazione di anticoagulanti non è controindicata e la lunga durata della protesi costituisce un grande vantaggio.

Una particolarità del meccanismo artificiale è, poi, quella di essere soggetto ad un certo grado di rumorosità, non udibile nelle valvole tessutali, e caratteristico per ciascun tipo di protesi.

La situazione post-operatoria per le valvole di origine biologica, invece, è in genere molto diversa rispetto alle loro avversarie meccaniche.

Il rischio di incorrere in tromboembolismo in questo caso si abbassa significativamente a 0,2 - 3,8 % per la sostituzione in sito aortico e 0,3 - 5,1 % in sito mitralico; esso è quindi molto simile a quello presente nei portatori di valvole meccaniche con terapia anticoagulante. Nei primi tre mesi dopo il posizionamento della bioprotesi il pericolo sembra, comunque, essere più alto e, per questo, è spesso consigliata la terapia orale [20-21].

Quindi, ad eccezione dei primi mesi e di casi particolari di fattori di rischio addizionali, quali una fibrillazione atriale, delle capacità sistoliche ridotte nel ventricolo sinistro, la presenza di altre protesi valvolari, trombi nell'atrio sinistro, o degli eventi tromboembolici passati, non servono farmaci anticoagulanti. Ciò elimina le possibili minacce di emorragia che tali trattamenti potrebbero portare.

Il limite negativo delle bioprotesi è la veloce degradazione delle parti biologiche non più vive che compongono la struttura; I problemi strutturali, come l'usura delle valvole, la calcificazione, le fratture, gli strappi e l'interruzione della linea di sutura con l'annulus riducono notevolmente la durata della protesi.

Molti studi a riguardo hanno dimostrato come un intensificato deposito di calcio sia comune negli eteroinnesti con *stent* dopo 6-8 anni dall'impianto; in particolare, questa degenerazione è più rapida quanto più giovane è il paziente o in caso di un metabolismo del calcio anomalo. Difatti, le valvole biologiche hanno un tasso di fallimento più elevato nei pazienti più giovani. Dopo 15 anni di *follow-up*, solo un terzo dei pazienti di età compresa tra i 16-39 anni che hanno affrontato una sostituzione di bioprotesi in posizione aortica è rimasto libero da deterioramento strutturale della valvola; al contrario, meno del 10% di quelli oltre i 70 anni al momento dell'impianto hanno avuto tali complicazioni [22]. Per queste ragioni, le bioprotesi valvolari sono più comunemente usate in persone che hanno già superato i 65 anni di vita. Un'inversione di tendenza, sia negli USA che in Europa, negli ultimi anni ha portato un incremento dell'utilizzo delle bioprotesi, a discapito delle valvole meccaniche, e per di più in pazienti sempre più giovani (figura 3.7).

Le ragioni della crescente predominanza delle nuove generazioni di protesi tessutali si possono così riassumere:

- Le nuove valvole biologiche hanno maggior durata e performance emodinamica migliori;
- Le tecniche utilizzate per la chirurgia, la fissazione, l'anticalcificazione hanno subito

sostanziali perfezionamenti;

- Le percentuali di reintervento per i pazienti, in particolare per quelli oltre i 65 anni, si abbassano sempre di più;
- L'età media nei paesi occidentali tende ad aumentare negli anni e, quindi, anche i pazienti sottoposti a sostituzione valvolare sono mediamente più anziani;
- I pazienti giovani sono spesso riluttanti nell'accettare i limiti e gli effetti imposti dalle terapie anticagulanti;
- Alcuni studi hanno dimostrato un'apparente superiorità delle protesi biologiche per quanto concerne la sopravvivenza della persona operata, in particolare se di età superiore ai 65 anni.

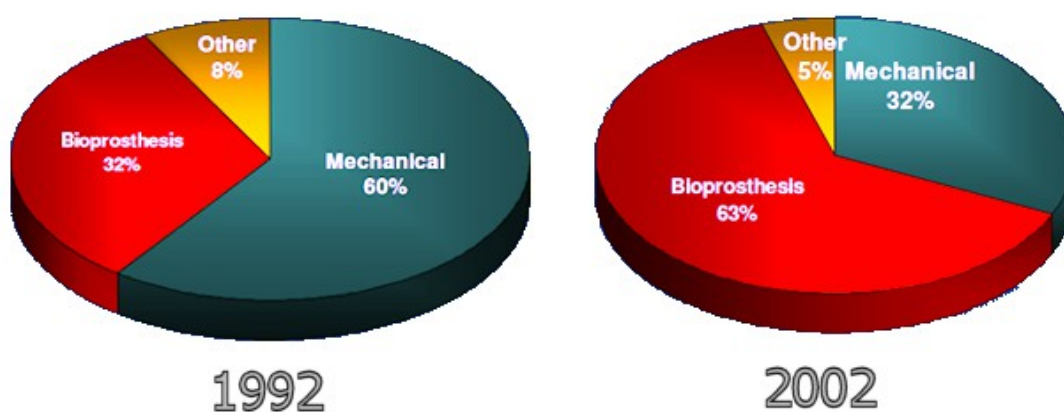


Figura 3.7: Andamento della scelta sul tipo di protesi per interventi di sostituzione valvolare in USA a dieci anni di distanza [76].

Tuttavia è necessario precisare, per le trattazioni che verranno fatte nel prossimo capitolo, che le protesi tessutali che subiscono pretrattamenti di crioconservazione e di fissazione con glutaraldeide non vengono ripopolate dalle cellule del paziente *in vivo*.

Alla luce di quanto presentato, la ricerca attualmente si sta focalizzando sulla comprensione e sul superamento dei fenomeni che determinano la degenerazione strutturale delle valvole biologiche.

3.3 Sostituti valvolari percutanei

L'impiego delle valvole percutanee può essere considerato l'ultima frontiera della cardiologia interventistica. Fino al decennio scorso le tecniche di tipo percutaneo per il trattamento delle valvulopatie si limitavano unicamente ad operazioni di valvuloplastica quando il paziente era fortemente a rischio o soffriva di particolari cardiopatie congenite.

Attualmente, in pazienti che, per vari motivi, non possono sostenere l'approccio cardiocirurgico tradizionale è disponibile una nuova tecnica non chirurgica di sostituzione valvolare effettuata in operatorie "ibride", cioè a metà tra le sale tradizionali di cardiocirurgia e di emodinamica; la tecnica risparmia al paziente la sternotomia ed il ricorso alla circolazione extracorporea. Con la sostituzione percutanea della valvola cardiaca si procede all'inserimento di una valvola cardiaca artificiale utilizzando un catetere; tale intervento oltre ad essere meno invasivo dell'analogo a cuore aperto, risulta anche più veloce.

Il primo impianto di una protesi aortica percutanea venne effettuato nel 2002 da Cribier [23], per via anterograda, in un paziente con stenosi aortica severa. Tale metodica, denominata TAVI (*Transcatheter Aortic Valve Implantation*), consentiva di espandere in situ la valvola artificiale, le cui pareti esterne venivano pressate contro la valvola nativa, sempre mediante cateterismo cardiaco percutaneo. La prima esperienza di Cribier venne seguita da numerose altre, dislocate in diversi centri, che ne confermarono la fattibilità.

Attualmente tutte le valvole cardiache possono essere potenzialmente trattate, anche se l'utilizzo maggiore di questa tecnica è associato alle disfunzioni della valvola aortica.

Sul mercato sono disponibili principalmente due tipi di protesi per la sostituzione percutanea: Edwards-Sapien, valvola in tessuto pericardico equino su uno *stent* in acciaio inox espandibile tramite palloncino; Medtronic CoreValve, valvola in pericardio bovino su *stent* in Notinol (NiTi) autoespandibile [77-78] (figura 3.8).

Per ultima elencata, nel caso fosse impossibile l'introduzione per via *trans-femorale*, ossia attraverso l'arteria femorale, esiste la possibilità di usare la via *trans-ascellare*. Si presenta anche una terza via, denominata *trans-apicale*, attraverso l'apice del ventricolo sinistro, che tuttavia si può includere nei metodi cardiocirurgici. La scelta della via di introduzione è sostanzialmente legata alla dimensione delle arterie periferiche: più le arterie sono piccole o malate, più è consigliabile la scelta della via trans-apicale poiché la via femorale potrebbe comportare rischi maggiori.

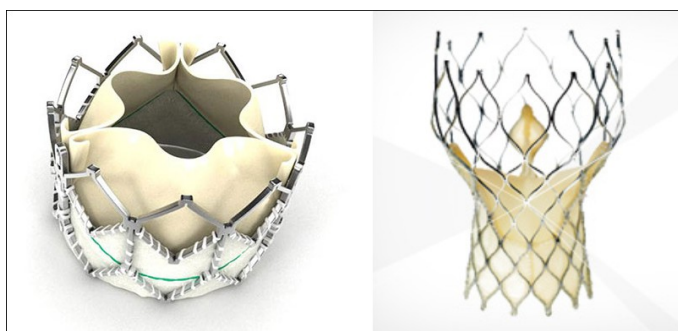


Figura 3.8: Rappresentazioni delle valvole percutanee Edwards-apien, a sinistra, e Medtronic CoreValve a destra.

La protesi biologica, prima dell'impianto, viene ancorata allo *stent* e crimpata, ossia pressata per farla aderire perfettamente al catetere. Successivamente, l'apertura della valvola cardiaca malata viene eseguita con l'ausilio di un palloncino che, gonfiato, dilata la valvola nativa, permettendo il successivo posizionamento della protesi. Tutto ciò avviene sotto la guida fluoroscopica e la visione diretta del cardiocirurgo.

A causa di importanti problematiche non risolte, questa strategia non sostituisce ancora l'operazione chirurgica classica, bensì si utilizza come tecnica di “salvataggio” nelle situazioni più a rischio con i metodi convenzionali.

Allo stato attuale, infatti, la TAVI presenta numerosi limiti e rischi tra i quali:

- accesso periferico limitato, principalmente dovuto alla dimensione dei sistemi di rilascio della protesi: l'accesso venoso femorale necessita di una puntura transettale e può causare danni funzionali anche irreversibili alla valvola;
- durata non ancora accertata in mancanza di *follow-up* a medio e lungo termine;
- difficoltà nel posizionamento durante l'intervento;
- eventuali spostamenti, poiché le TAVI si pongono in sede valvolare senza la tradizionale cucitura a cuore aperto; le dimensioni del sostituto rispetto all'anello valvolare sono di cruciale importanza;
- la presenza di valvola aortica malformata bicuspidica può costituire una controindicazione a tale operazione, in quanto si presenta il rischio di apertura incompleta della protesi;
- calcificazioni valvolari asimmetriche possono causare, durante l'impianto, una compressione eccessiva delle arterie coronarie.

In conclusione, la TAVI rappresenta al momento solo una via alternativa, da valutare con studi clinici a lungo termine nell'arco dei prossimi anni.

Capitolo 4

Ingegneria tissutale e matrici biologiche

Per trovare una soluzione agli svantaggi che l'impianto di protesi biologiche o meccaniche porta nel paziente, è stata sviluppata una nuova classe di procedure denominata “ingegneria tissutale valvolare cardiaca”.

Con il termine “ingegneria tissutale” si identifica una serie di tecniche per la rigenerazione di tessuti del corpo umano mediante la semina di cellule del ricevente su strutture dette *scaffolds*. Spesso la colonizzazione si ottiene in appositi reattori (bioreattori).

Lo *scaffold* biodegradabile e biorisorbibile può essere ottenuto mediante:

- la decellularizzazione delle valvole cardiache native per omoinnesti ed eteroinnesti, quindi di origine umana o di specifici animali;
- la creazione di valvole di origine interamente artificiale partendo da dei biomateriali polimerici di sintesi, biocompatibili e biodegradabili.

Attualmente tali *scaffolds* possono essere (1) seminati con le cellule del ricevente *in vitro* e, successivamente, impiantati *in vivo* (*Tissue Engineering*) oppure (2) impiantati direttamente *in vivo* a contatto quindi con le cellule circolanti endogene ed evitando la fase di ripopolamento *in vitro*.

Una matrice (*scaffold*) biologica è, senza ombra di dubbio, la struttura che assomiglia maggiormente all'assetto originario della matrice extracellulare; una matrice artificiale, invece, è potenzialmente trombogena e non fornisce la ricellularizzazione necessaria ad ottenere un tessuto vivente, essendo difficilmente ottenibile con i giusti parametri di resistenza, flessibilità e funzionalità [24].

Lo *scaffold* biologico presenta una struttura perfetta per ricevere le cellule di un eventuale

organismo ospite, provvedendo a fornire tutti gli elementi necessari a modulare i processi biologici e fornendo segnali biochimici per i recettori cellulari superficiali.

Per essere utilizzato come *scaffold*, il materiale biologico deve prima superare un processo di “pulizia” chiamato decellularizzazione, in modo da evitare la fase di rigetto. Le cellule del ricevente da seminare sullo *scaffold* biologico potranno essere differenziate o staminali.

La figura 4.1 riassume i passaggi appena descritti.

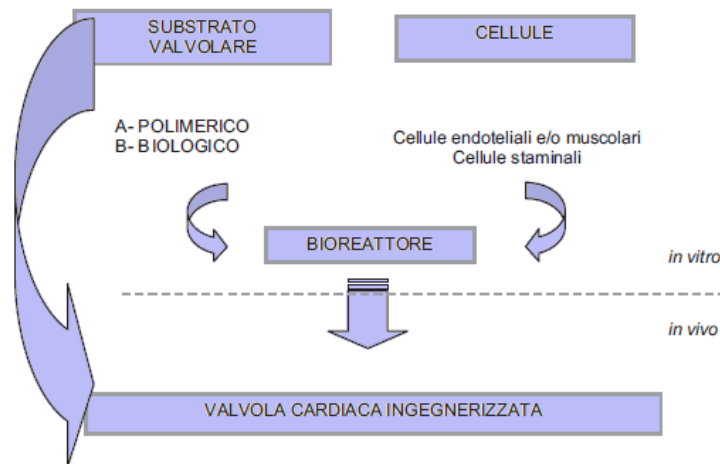


Figura 4.1: Schema a blocchi del processo di creazione delle valvole cardiache ingegnerizzate [24].

4.1 Decellularizzazione

La decellularizzazione è una tecnica mediante la quale tutti i fattori immunogenici, proteine, carboidrati e acidi nucleici delle cellule vengono eliminati senza causare alterazioni rilevanti alle proprietà strutturali ed emodinamiche del tessuto. Dopo la decellularizzazione la valvola si riduce a matrice extracellulare (ECM) [25].

Nell'ambito della *Tissue Engineering*, il tessuto acellulare ottenuto viene ripopolato dalle cellule dell'organismo ricevente, con una maturazione direttamente *in vivo* mediante le cellule autologhe circolanti e residenti, oppure con la semina di cellule accresciute *in vitro*, l'incubazione in un bioreattore e la successiva maturazione definitiva *in vivo*; la matrice totalmente ripopolata risulterebbe così “invisibile” al sistema immunitario dell'ospite, poiché sarebbe circondata da cellule endoteliali riconosciute come *self* ed, eventualmente,

rimodellata. Le gravi problematiche intrinseche al trapianto dall'animale all'uomo, quali il rigetto iperacuto dello *xenografts* e la possibile trasmissione di agenti patogeni, verrebbero in questo modo debellate.

Il primo passo nello sviluppo di questo approccio si ebbe nel 1987 con S. Goldstein della CryoLife Inc, società ben nota nel campo biomedico per la crioconservazione degli *homografts*.

4.1.1 Metodi di decellularizzazione

I metodi tipici per la decellularizzazione di valvole aortiche e polmonari sperimentati prevedono, per prima cosa, di rompere le membrane cellulari attraverso la lisi in soluzioni iper- e ipo-toniche o mediante metodi fisici, e, successivamente, di estrarre i detriti cellulari con vari detergenti e agenti enzimatici. L'uso di enzimi consente di degradare i frammenti di DNA cellulare, ma può deteriorare anche la matrice extracellulare e, pertanto, alcuni autori hanno introdotto nelle miscele di decellularizzazione anche degli inibitori enzimatici.

In letteratura sono riportati molti metodi per la decellularizzazione di diversi organi e tessuti. La figura 4.2 mostra come, in linea generale, si può fare un distinguo tra tecniche fisiche, chimiche ed enzimatiche [26].

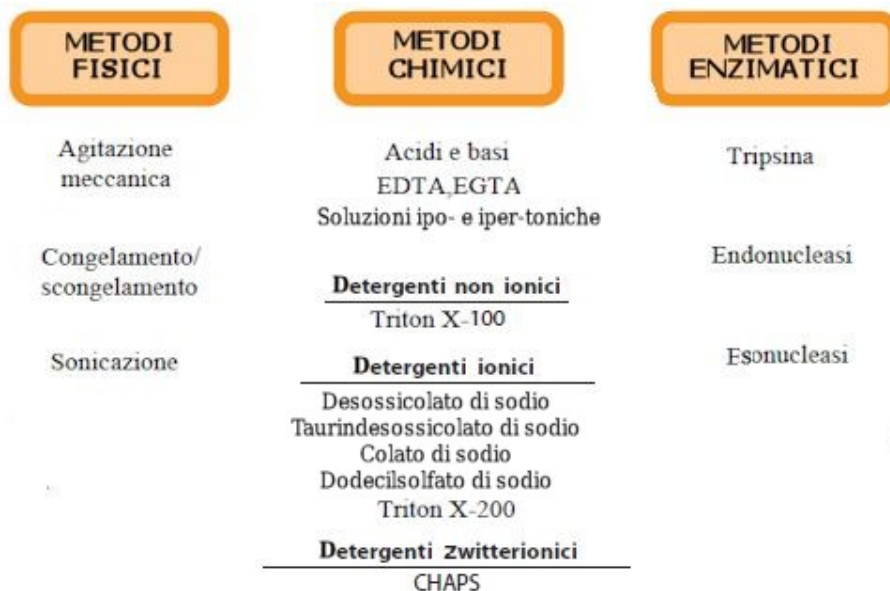


Figura 4.2 : Esempi di tecniche usate per decellularizzare tessuti e organi. (Abbreviazioni: CHAPS indica 3-[(3-colamidopropil)dimetilammonio]-1-propanosulfonato, EDTA e EGTA indicano, in ordine, l'acido tetracetico etilene diamine e l'acido tetracetico glicol etilene).

Come è già stato accennato in precedenza, i detergenti e gli altri agenti chimici ed enzimatici vengono adoperati per le loro capacità peculiari; nella loro scelta, gli effetti negativi che tali sostanze possono avere sulla struttura della matrice extracellulare giocano un ruolo fondamentale. Le tabelle 4.1-4.2 offrono una descrizione di alcuni di questi agenti.

Tabella 4.1-4.2: Esempi di agenti chimici ed enzimatici comunemente impiegati per la decellularizzazione di organi e tessuti [29].

METODI CHIMICI	AZIONE SPECIFICA	EFFETTI E DANNI ALLA ECM
Acidi/ basi	Solubilizzazione del citoplasma, denaturazione di proteine e acidi nucleici	Possibili alterazioni alle fibre di collagene ed elastina. Perdita dei glicosaminoglicani (GAGs)
Soluzioni ipo- e iper-toniche	Provocano la lisi della membrana cellulare con uno shock osmotico e la distruzione dell'interazione DNA-proteine	Non eliminano completamente tutti i residui cellulari dalla matrice
Agenti chelanti: EDTA, EGTA	Grazie al legame di queste sostanze agli ioni metallici, viene impedita l'adesione cellulare all'ECM. Sono solitamente associati agli agenti enzimatici	Eliminazione di GAGs
Detergenti non ionici: Triton X-100 (polietilenglicole p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenilettere)	Distruzione dell'interazione DNA-proteine, lipide-lipide, proteina-lipide. Mantiene intatta l'interazione proteina-proteina	Possibili alterazioni al collagene e all'ultrastruttura della matrice. Perdita di GAGs e dei fattori di crescita cellulare
Detergenti ionici: SDS (sodio dodecilsolfato), Triton X-200, SD (sodio deossicolato)	Solubilizzazione delle membrane citoplasmatica e nucleare e possibile denaturazione proteica	Rimuovono completamente i residui cellulari dai tessuti ma alterano anche l'ultrastruttura della matrice, eliminando GAGs e fattori di crescita
Detergenti zwitterionici: CHAPS	Permettono una buona rimozione cellulare; rispecchiano le azioni sia dei detergenti ionici che di quelli non ionici	Possibili alterazioni al collagene e all'ultrastruttura della matrice. Eliminazione di GAGs e di fattori di crescita

METODI ENZIMATICI	AZIONE SPECIFICA	EFFETTI E DANNI ALLA ECM
Tripsina	Rompe i legami peptidici dell'Arginina e della Lisina a livello del terminale carbossilico	Se l'uso è prolungato si possono avere deterioramenti strutturali della laminina, dell'elastina, della fibronectina e dei GAGs
Endonucleasi	Catalizza l'idrolisi dei legami interni all' RNA e al DNA	Difficile allontanamento dai tessuti
Esonucleasi	Catalizza l'idrolisi dei legami terminali dell' RNA e del DNA	Difficile allontanamento dai tessuti

I detergenti più usati per la decellularizzazione di innesti valvolari, *homografts* o *xenografts*, sono il sodio colato (SC), il sodio desossicolato (SD), il sodio dodecilsofato (SDS), il Triton X-100 (TX) e gli agenti enzimatici tripsina ed endonucleasi.

In figura 4.3 si possono qualitativamente distinguere le modificazioni strutturali causate da quattro di questi agenti osservate con uno strumento di microscopia a scansione elettronica [27].

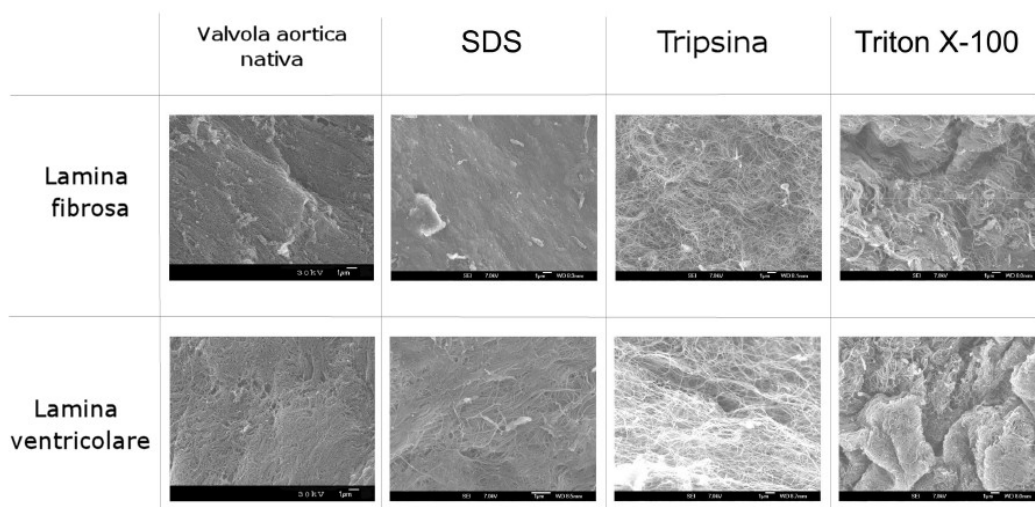


Figura. 4.3: Analisi al microscopio a scansione elettronica (SEM) della lamina aortica e della lamina ventricolare di cuspidi valvolari aortiche porcine. Il SDS preserva una fitta rete di collagene e pori di piccole dimensioni; Triton X-100 e tripsina sciolgono la rete di collagene dilatando i pori.

E' importante notare che gli agenti utilizzati per l'estrazione cellulare possono essere molto dannosi per lo *scaffold*: essi possono degradare o denaturare le proteine della matrice e

lasciare detriti tossici o cariche residue, influenzando dannosamente sulla funzione meccanica e sulla risposta cellulare. Con lo scopo di portare il procedimento a buon fine, i detergenti sono combinati assieme secondo particolari protocolli, con specifici parametri di tempo e composizione, fortemente dipendenti dalla tipologia di tessuto da trattare. Alcuni studi, per esempio, hanno osservato che applicando un metodo basato solo sull'uso di tripsina, perciò puramente enzimatico, il risultato è infruttuoso su una valvola aortica di topo ma garantisce una decellularizzazione ottimale se adottato sulla valvola polmonare porcina. Vengono effettuati più volte dei test meccanici per determinare parametri come la pressione di rottura, la resistenza di rottura e in generale l'integrità meccanica dei tessuti modificati.

La morfologia del tessuto varia notevolmente da processo a processo, spesso mostrando un'elevata porosità, collassi locali della microstruttura ed evidenziando che alcune caratteristiche della matrice non sono facilmente misurabili con delle tecniche convenzionali [29].

I protocolli brevettati dai diversi gruppi di ricerca sono ormai decine se non centinaia; in letteratura si trovano vari esempi che associano più detergenti tra cui:

- SC e Triton-100 (metodo *TRICOL*)[30];
- SD e SDS (Metodo *Hannover*);
- SDS e tripsina [31];
- SD e Triton X-100 [32];
- Triton X-100 e tripsina (Harverich *et al.*).

4.1.2 Effetti sulla protesi

E' fondamentale definire meglio quale sia il processo che, sulla struttura ingegnerizzata impiantata, induce l'azione infiammatoria e immunologica dell'organismo. Le valvole biologiche che subiscono una decellularizzazione presentano un risultato migliore rispetto alle stesse strutture senza tale trattamento, dal punto di vista della risposta infiammatoria, immunologica e calcificativa. Tuttavia, particolari studi condotti da Simon *et al.* [32] hanno dimostrato che la rimozione cellulare su valvole porcine, messa in atto con più protocolli differenti, non è sufficiente a rendere queste strutture immunologicamente inerti. Infatti, le decellularizzazioni incomplete sono associate alla presenza, sulle membrane delle cellule rimanenti, di particolari determinanti antigenici (per esempio l'epitopo α -gal delle cellule

endoteliali valvolari porcine) noti per essere responsabili di stimoli infiammatori precoci e rigetti iperacuti. È stato inoltre confermato che la matrice cellulare è potenzialmente in grado di causare l'adesione e l'attivazione delle piastrine, e perciò è anch'essa immunogenica [33]. L'impianto in un animale di uno *scaffold* acellulare senza una ricellularizzazione *in vitro*, rispetto all'impianto di una bioprotesi non decellularizzata, mostra un andamento negativo nella rigenerazione delle fibre di collagene e dei GAGs del tessuto interstiziale; questo comportamento suggerisce un ulteriore studio sull'estensione della decellularizzazione in rapporto ai danni strutturali che essa produce.

Ulteriori esperienze del gruppo di ricerca di Simon hanno constatato come uno stesso tipo di *scaffold* porcino, decellularizzato con protocolli brevettati da Dohmen *et al.* e impiantato su pazienti pediatriche, crea delle forti infiltrazioni infiammatorie e una scarsa ripopolazione cellulare *in vivo* [33]. La stessa tecnica, applicata dal gruppo di ricerca di Lubeck [34] a *homografts* decellularizzati e criopreservati produce una risposta immunologica nettamente inferiore; alcuni parametri meccanici esaminati, quali il modulo elastico e la resistenza agli sforzi, sono sovrapponibili agli stessi parametri misurati in *homografts* solo criopreservati, ma la risposta infiammatoria risulta minore.

Una delle differenze sostanziali tra innesti umani e porcini si può ritrovare, per esempio, nella trasmigrazione verso le strutture protesiche dei monociti, la prima linea d'azione immunitaria; nel caso degli eteroinnesti acellulari questa migrazione viene mitigata ma non del tutto eliminata come invece avviene negli omooinnesti acellulari. Si ha così che gli omooinnesti ingegnerizzati, in linea teorica, rappresentano lo *scaffold* valvolare perfetto; oltre a conservare le sue proprietà meccaniche, dopo una fase *in vitro* di ricellularizzazione con cellule autologhe, sono potenzialmente in grado di rimodellarsi *in vivo*.

4.2 Ripopolamento cellulare

Quando la fase di decellularizzazione viene ultimata, si può intervenire con l'aggiunta della componente cellulare. Come detto in precedenza, vi sono due differenti possibilità: *in vitro-seeding*, ossia la semina dello *scaffold* con differenti tipi di cellule coltivate *in vitro* prima dell'impianto nell'ospite, e *in vivo-seeding*, che consiste nell'impianto nel paziente dello

scaffold che verrà ripopolato *in vivo* dalle cellule autologhe.

Tra le cellule e la matrice extracellulare si stabilisce una relazione di per sé stretta e dipendente. Pertanto, nella rigenerazione cellulare *in vitro*, il tipo di cellule utilizzate e la loro fonte sono fattori critici per il funzionamento e il successo clinico del costrutto ingegnerizzato. Da un punto di vista ideale, l'elemento cellulare dev'essere in grado di proliferare o auto-rinnovarsi come richiesto e, ancora, originare i tipi eterogenei di cellule necessari a formare un tessuto funzionale come quello nativo. La scelta ricade, in primo luogo, sulle cellule autologhe o sulle cellule allogene. Un elemento autologo limita il rischio di esporre l'organismo ad agenti trasmissibili pericolosi; esso ha una probabilità minore di provocare rigetto o invocare una risposta immunitaria avversa, e quindi riduce o annulla la necessità di dure terapie immunosoppressive. Tale scelta evita anche di incrementare il pericolo di infezione, cancro ed effetti tossici dell'immunosoppressione.

Nella valvola cardiaca normale, si trovano cellule endoteliali, come rivestimento superficiale, e cellule interstiziali. Il primo tipo di cellule regola l'azione immunitaria e infiammatoria dell'organismo, limitando così la trombogenicità del tessuto; il secondo gruppo, invece, costituisce una popolazione cellulare che rappresenta un fenotipo variabile, da fibroblasti a miofibroblasti a poche cellule muscolari lisce, in grado di sintetizzare i costituenti della matrice extracellulare e di rimodellare la valvola in relazione a una stimolazione meccanica e biochimica. Quest'ultima proprietà si rifà al fatto che i fattori biomeccanici e l'azione dei fattori di crescita possono portare modifiche nello stato contrattile delle cellule interstiziali e nella loro sintesi proteica.

La semina *in vitro* di cellule adulte specializzate, quali sono le cellule interstiziali e endoteliali, sulle valvole ingegnerizzate, in definitiva, ha l'obiettivo non solo di creare una struttura simile a quella nativa, ma anche di mantenere la stessa vitalità cellulare. Queste cellule tessuto-specifiche vengono ottenute da arterie e vene periferiche ed espanse *in vitro*. I prelievi da vena giugulare e da vene safena permettono di ottenere la maggior concentrazione di cellule, che dimostrano inoltre buone capacità di biosintesi dell'ECM; altre fonti sono per esempio l'arteria carotide e i lembi di valvola tricuspide. L'utilizzo di tali cellule garantisce buoni risultati, sia nel caso di semina su *scaffold* biologici che nel caso di semina su *scaffold* sintetici biodegradabili [35].

Un'alternativa praticabile risulta la semina di cellule staminali; grazie alle loro peculiari caratteristiche, quali la capacità di autorigenerarsi, la multipotenzialità (caratteristica delle cellule staminali progenitrici) e la plasticità, tali cellule primitive sono le candidate migliori

per soddisfare gli obiettivi preposti alla rigenerazione cellulare. L'interesse maggiore è riposto nelle cellule staminali multipotenti del midollo osseo; queste unità sono in grado di svilupparsi in linee cellulari multiple; in particolare, le staminali ematopoietiche hanno potenziale specifico per le cellule del sangue, le staminali endoteliali generano le componenti cardiovascolari e le staminali mesenchimali maturano in osteociti, condrociti, miociti, cellule dello stroma, fibroblasti, adipociti, derma e altre cellule del tessuto connettivo.

Un caso interessante, studiato negli ultimi anni, è l'uso del cordone ombelicale umano come fonte di cellule progenitrici di cellule endoteliali e fibroblasti; il tessuto così ingegnerizzato dimostra una buona capacità di crescita e riorganizzazione dell'ECM e anche proprietà di sforzo-deformazione del tutto sovrapponibili a quelle dei tessuti autologhi nativi [36].

Una volta scelto il tipo di cellule adatto, queste, in numero adeguato, vengono coltivate *in vitro* e seminate sullo *scaffold*.

Affinché il processo di ricellularizzazione vada a buon fine e le cellule staminali compiano la differenziazione adeguata, è necessario che l'ambiente di coltura *in vitro* sia un'imitazione quanto migliore possibile dell'ambiente fisiologico; si utilizza dunque un bioreattore dinamico. Questo dispositivo permette di riprodurre fedelmente le condizioni che si manifestano in vivo nel tessuto stesso, monitorando alcuni fattori fondamentali come ad esempio la temperatura, il pH, la concentrazione di gas, l'umidità, l'apporto di nutrienti e la rimozione dei prodotti di scarto; per provvedere alla crescita del tessuto, il meccanismo deve poter inviare anche citochine, fattori di crescita, ormoni steroidei, proteine morfogenetiche e ioni con un dosaggio prestabilito. La capacità del bioreattore dinamico di indurre, all'interno dell'ambiente simulato, particolari sollecitazioni meccaniche consente alle cellule di percepire le proprietà fisiche del substrato e rispondere di conseguenza. La loro risposta consiste nell'aumento dell'espressione dei geni di alcune proteine della matrice e nella deposizione di tali componenti nelle direzioni principali di deformazione, creando un effetto chiamato *stress shielding*.

I bioreattori di ultima generazione garantiscono la variazione continua degli stimoli, ricreando così condizioni di pressione e di flusso pulsato sistolico e diastolico attraverso la valvola. La figura seguente riassume i principali fattori che partecipano al processo descritto finora.

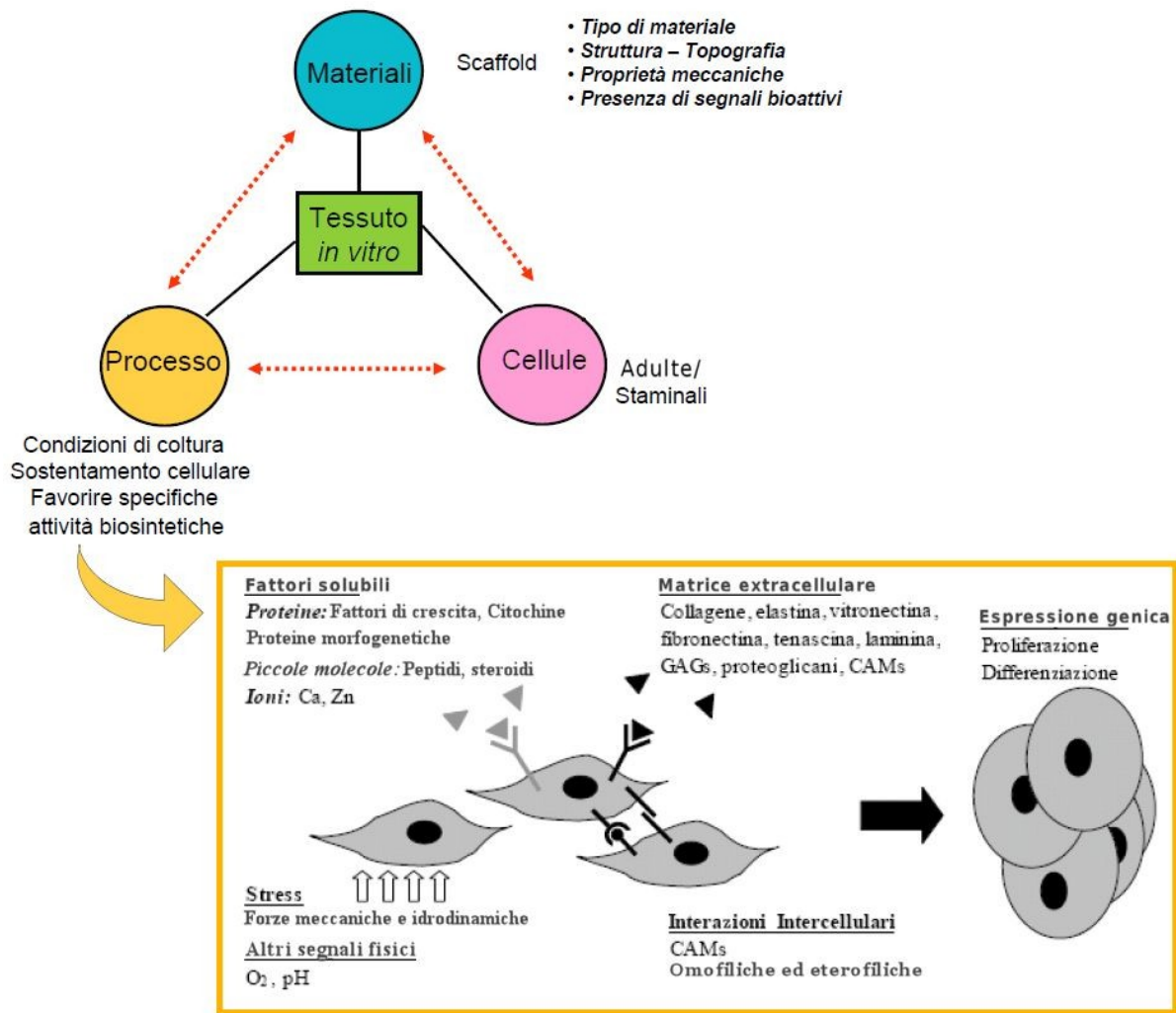


Figura 4.4: Schema a blocchi della strategia di ricellularizzazione *in vitro* con annessa una finestra riassuntiva sui principali fattori e proprietà introdotti o modificati mediante il processo di neomorfogenesi *in vitro*.

4.3 Fissazione delle bioprotesi con glutaraldeide

La durata limitata delle bioprotesi valvolari è il principale fattore che influenza negativamente la scelta di questi innesti negli interventi di sostituzione. Come già accennato in precedenza, al fine di ridurre i rischi di rigetto e degenerazione *in vivo*, le strutture vengono fissate con una particolare sostanza chimica: la glutaraldeide.

4.3.1 Principi

La fissazione in istopatologia ha lo scopo primario di ritardare i processi degenerativi post-mortali che hanno luogo nei tessuti, conservando nel modo migliore tutte le componenti tessutali e non alterando la struttura dell'innesto; la degenerazione del tessuto non più vivo è innescata dagli enzimi autolitici presenti in tutte le cellule e, per questa ragione, il fissativo mira a penetrare rapidamente e in modo omogeneo il tessuto per bloccare all'istante l'attività enzimatica. Il fissativo ideale, inoltre, non altera la reattività degli elementi che compongono il tessuto trattato. In genere, questo tipo di sostanze interviene sulle proteine e sui lipidi, mentre i glicidi, specialmente se a basso peso molecolare, vengono solamente inclusi tra le proteine fissate e possono diffondere in acqua. Un ulteriore obiettivo di questa tecnica è la protezione della matrice da agenti estrinseci potenzialmente dannosi; la glutaraldeide, infatti, ha un effetto citotossico ad ampio spettro, perciò agisce, oltre che sulle cellule, anche su molti microrganismi che potrebbero invadere i tessuti e danneggiarli.




Considerando una generica aldeide rappresentata in figura 4.5, il gruppo carbonile è un gruppo polare poiché l'ossigeno è più elettronegativo del carbonio e attrae con forza maggiore gli elettroni del doppio legame. Da questo fatto dipendono la solubilità in acqua delle aldeidi a catena corta e la reattività del carbonio con agenti nucleofili.



Figura 4.5: Formula di struttura di un'aldeide generica.

La reazione del gruppo aldeidico con i gruppi funzionali presenti nella matrice induce la fissazione. Nelle proteine sono presenti molti gruppi chimici potenzialmente reattivi (tabella 4.3). Per questa e per moltissime altre ragioni, le proteine sono le maggiori responsabili delle caratteristiche morfologiche e funzionali dell'innesto considerato. Inoltre, la fissazione coinvolge altri tipi di molecole legate alle proteine che possono anche essere trattenute nel reticolo creato dalla polimerizzazione del composto bifunzionale.

Tabella 4.3: Alcuni esempi di gruppi laterali e relativi aminoacidi che possono partecipare alla reazione di fissazione aldeidica.

Gruppi laterali	Formula di struttura	Aminoacidi
Gruppi amminici, imminici	$\begin{array}{cc} & \\ =C-NH_2 & -C=NH \end{array}$	lisina, arginina
Gruppi sulfidrilici	-SH	cisteina
Gruppi amidici	$\begin{array}{c} -C=O \\ \\ NH_2 \end{array}$	glutamina, asparagina
Gruppi fenolici		tirosina
Anelli imidazolici		istidina
Anelli aromatici		Triptofano

La glutaraldeide è un composto organico, liquido, oleoso e incolore, la cui formula bruta è $CH_2(CH_2CHO)_2$ [79]. Essa è una dialdeide di sintesi che viene prodotta industrialmente per ossidazione del ciclopentene e dalla *reazione di Diels-Alder* tra acroleina e metil-vinil-etero seguita da idrolisi. Come le altre dialdeidi, in soluzione tende a disporsi in forma ciclica (figura 4.6).

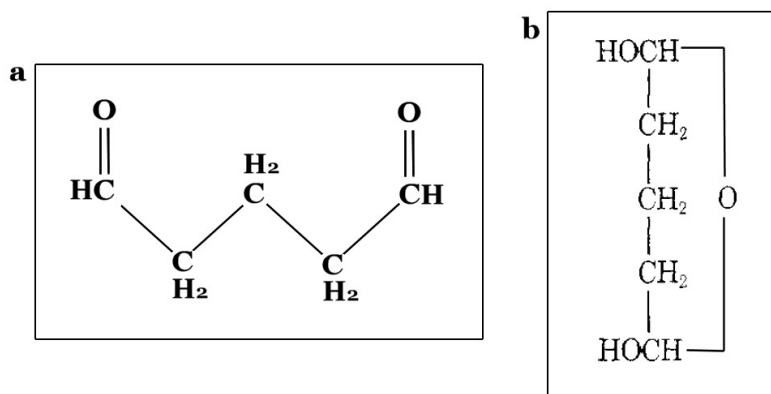


Figura 4.6: Formula strutturale della glutaraldeide (a), forma idrata ciclica (b).

La particolarità dell'aldeide glutarica rispetto a un'aldeide generica è quella di possedere due gruppi aldeidici e quindi di reagire con due gruppi distinti. La ricerca ha indicato il gruppo laterale dell'aminoacido lisina come gruppo reagente ideale nella reazione. Perciò la reazione coinvolge nella formazione di immine secondarie (o Basi di Schiff) come schematizzato in figura 4.7.

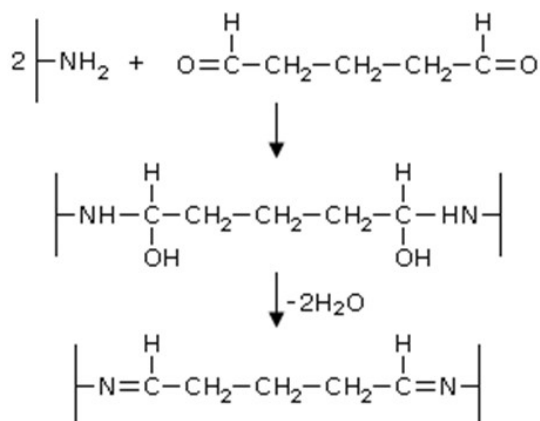


Figura 4.7: Reazione tra la glutaraldeide e due gruppi amminici.

La glutaraldeide monomerica polimerizza facilmente per condensazione, dando luogo a catene allungate. Essa, quindi, si infila nel tessuto valvolare dalla superficie verso l'interno ma con un grado di penetrazione relativamente basso (inferiore a 0.5mm) rispetto a molecole più piccole come la formaldeide; a questo punto, essa reagisce con le fibre di collagene e ne causa la reticolazione chimica, generando i legami chimici crociati (*cross-links*) con le catene polipeptidiche (figura 4.8). La formazione di tali legami rende molto stabile il tessuto contro la degradazione chimica ed enzimatica.

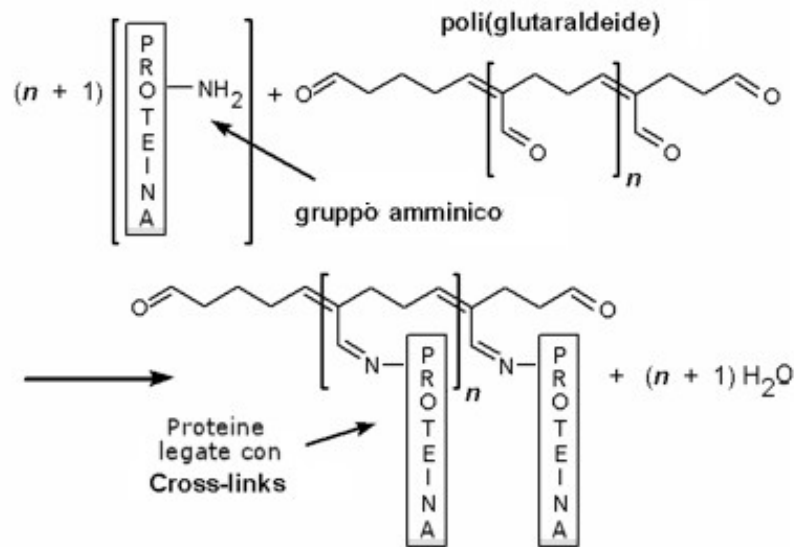


Figura 4.8: Aspetti pratici della fissazione; reazione della poli(glutaraldeide) con i gruppi amminici delle proteine [80].

Per preservare in modo ottimale le proprietà meccaniche della struttura, la geometria del collagene originariamente presente nel tessuto fresco dovrebbe, idealmente, essere mantenuta inalterata. Variando la pressione a cui viene effettuata la fissazione in glutaraldeide si possono ottenere risultati completamente diversi; per esempio, a partire da una pressione di 4 mmHg si assiste a significative riduzioni della geometria tipica e arrivando a una pressione di 100 mmHg si distrugge completamente la struttura [41].

4.3.2 Comportamento meccanico

Il processo di fissazione con glutaraldeide presenta anche alcuni svantaggi tra i quali l'alterazione delle proprietà meccaniche con un aumento rilevante della rigidità del materiale o della rigidezza della struttura. Questi cambiamenti sono stati identificati come alterazioni delle proprietà di flessione del tessuto, in opposizione con le proprietà di trazione, e possono portare a instabilità quando il materiale si flette durante il ciclo cardiaco, producendo punti di eccessivo stress e lacerazioni.

Un parametro importante, alla base delle caratteristiche di flessione del tessuto, è lo sforzo di taglio, una proprietà particolarmente difficile da misurare; la sua importanza è notevole

considerando che la funzione primaria delle valvole cardiache è quella di flettersi in posizione aperta o chiusa durante il ciclo cardiaco e si verificano complessi mutamenti di forma sia in sistole che in diastole. Le forze di trazione si presentano particolarmente in diastole, quando la valvola è sottoposta ad un gradiente di pressione significativo. Le forze di taglio, invece, si sviluppano in entrambe le fasi del ciclo; gli strati interni del tessuto scivolano l'uno sull'altro, modellando la loro posizione per ridurre al minimo le tensioni sviluppate. Se lo sforzo di taglio non si verifica, il tessuto si inarca in risposta alla forza di compressione che si presenta ad ogni deformazione flessionale.

Vesely *et al.* [39] hanno esaminato il comportamento in curvatura di cuspidi aortiche porcine trattate con glutaraldeide confrontandolo con quello di cuspidi non trattate. L'esperimento è stato condotto su 35 strisce di tessuto fresco o trattato, ripetutamente flesse con raggi di curvatura variabile oppure costante e mediante flessione radiale o circonferenziale. L'apparecchiatura consisteva in un attuatore lineare e una microcella di carico combinati con una montatura specifica per il tessuto, come nello schema in figura 4.9. Le valvole aortiche da trattare sono state immerse in glutaraldeide tampone fosfato al 0,5% e conservate in questa soluzione per almeno 24 ore a 22°C. Tutte le valvole poi sono state incise per l'asportazione delle cuspidi.

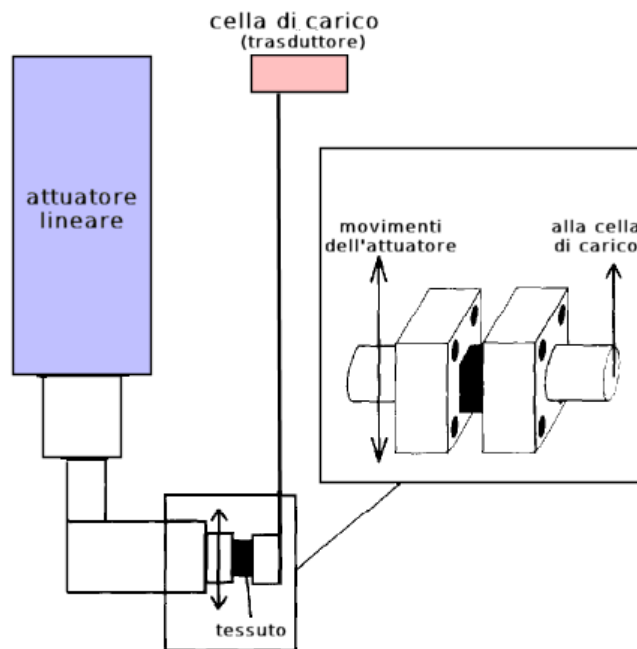


Figura 4.9 : Schematizzazione dell'apparato usato da Vesely *et al.* nella loro esperienza. L'attuatore è un motore ad azione piezo-elettrica; la doppia freccia indica il movimento del motore che si traduce in una forza di taglio sul tessuto ancorato al sistema di test, mentre l'altra indica la misura della forza diretta al trasduttore.

Utilizzando una tecnica di microscopia con luce polarizzata per valutare lo sforzo di taglio interno, si sono ottenuti dati che mostrano una significativa differenza tra i due tessuti. I risultati di tale studio dimostrano come la bioprotesi porcina aumenti fino a quattro volte la sua rigidità flessionale dopo la fissazione aldeidica.

I grafici in figura 4.10 e 4.11 mostrano in modo chiaro come le curve sforzo-deformazione e le curve di rilassamento dello stress siano marcatamente diverse nei due tipi di campioni. Il tessuto fresco ha una lunga zona di incubazione, in cui il modulo dello sforzo di taglio resta a valori molto bassi; questo risultato è correlato alla struttura della porzione di cuspidi in cui avviene applicata la più intensa forza di taglio. Per il tessuto fissato non è presente una zona di incubazione e la curva taglio-deformazione è pressoché lineare. Il tessuto si dimostra molto più rigido nella fascia delle piccole deformazioni, ma, per limitazioni dovute alla cella di carico, a questi valori non può essere confrontato con il tessuto fresco. I cambiamenti osservati sono in parte dovuti alla reticolazione delle fibre di collagene generata dalla fissazione e, se la reticolazione è sufficientemente estesa, essa può contribuire a una maggiore rigidità a bassi livelli di deformazione e alla perdita della zona di incubazione.

Un altro effetto arrecato al tessuto dalla glutaraldeide è la disidratazione; infatti il volume della lamina spongiosa della valvola viene ridotto dal processo fissativo, modificando in questo modo le proprietà elastiche del materiale.

Le alterazioni della struttura influenzano la valvola nei suoi comportamenti in chiusura ed apertura; l'estremo irrigidimento del tessuto a bassi livelli di sforzo di taglio provoca deformazioni di flessione minime, ragione per cui la struttura valvolare è autoportante dopo la fissazione con glutaraldeide. Il tessuto irrigidito, successivamente, verrà sottoposto ad uno stress di compressione e trazione più alto durante lo svolgimento delle sue funzioni, accrescendo l'incidenza di delaminazioni e collassi. Al contrario, il tessuto fresco è estremamente duttile, proprietà che gli permette di flettersi facilmente secondo le complesse geometrie necessarie durante il ciclo cardiaco.

Sebbene condizioni diverse di fissazione determinino alterazioni più o meno marcate, si può affermare che l'effetto della glutaraldeide è molto maggiore sul comportamento di risposta allo sforzo di taglio, quindi tangenziale, rispetto alle proprietà di trazione normale. Ciò spiega perché i test di sforzo di taglio siano un ottimo metodo per verificare le caratteristiche delle bioprotesi e testare le loro funzionalità prima di eventuali test *in vivo*.

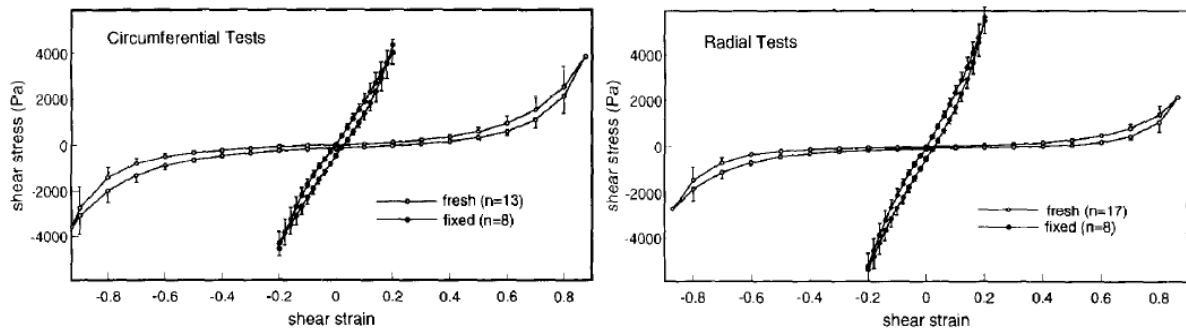


Figura 4.10: Relazione tra lo sforzo al taglio e la deformazione subita. Queste curve mostrano i valori medi per le prove di sforzo al taglio, con la deviazione standard, associati a ciascun livello di deformazione.

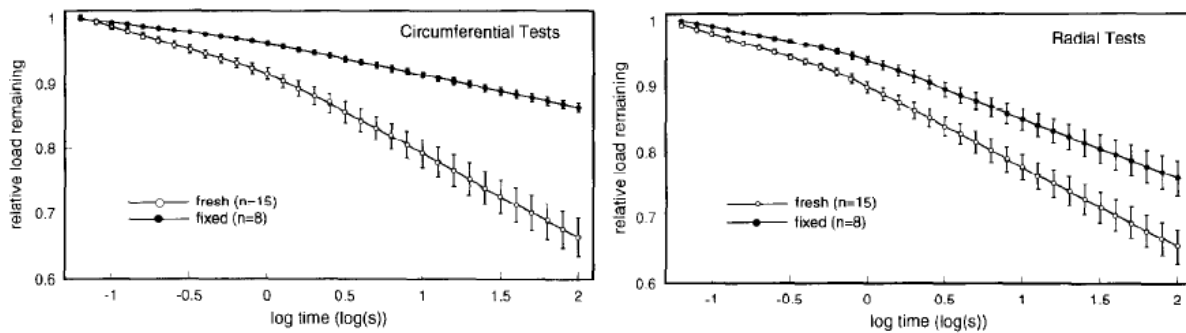


Figura 4.11: Rilassamento agli sforzi del tessuto misurato dopo una fase di deformazione. Il rilassamento nei campioni trattati avviene in modo più lento per entrambi i grafici, I valori sono normalizzati rispetto al valore di carico iniziale [39].

4.3.3 Grado di antigenicità

La formazione dei legami crociati tra la glutaraldeide e le proteine del tessuto permette di rallentare l'azione immunitaria sugli *homografts* ed *xenografts* impiantati e, quindi, una più lenta degenerazione nel tempo. Ciò avviene prevenendo la visualizzazione dei determinanti antigenici grazie alla devitalizzazione delle cellule tessutali e alla stabilizzazione delle triple eliche del collagene.

È però di fondamentale importanza considerare che l'immunogenicità, sebbene ridotta, non viene mai completamente eliminata.

Nella preparazione di valvole biologiche commerciali vengono usate basse dosi di fissativo (fino a 1%) che non alterano in modo significativo i recettori di membrana o le glicoproteine strutturali. Pertanto, il tessuto continua a suscitare una parte delle risposte immunitarie

cellulari e umorali. Molti studi dimostrano che incrementando il numero e la densità di legami crociati l'antigenicità può essere ridotta, come illustrato nella figura 4.12 [40].

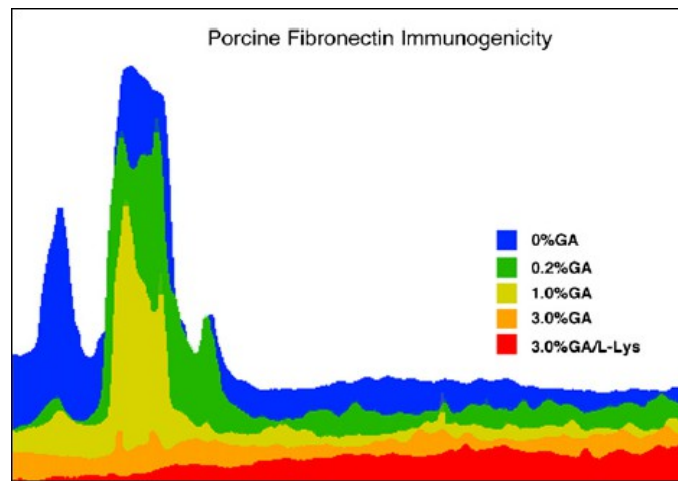


Figura 4.12: Densitometria di fibronectina porcina usando diluizione 1:100 di siero di coniglio: il diagramma semplificato dimostra la necessità di una maggiore densità di reticolazioni per mitigare l'immunogenicità residua. (Abbreviazione GA = Glutaraldeide)

4.3.4 Il ruolo della glutaraldeide nella calcificazione

La calcificazione è la causa principale della compromissione funzionale delle bioprotesi valvolari trattate con aldeide glutarica. La fissazione induce una grande disponibilità di calcio intracellulare a seguito del danneggiamento della membrana plasmatica, che prevede, assieme ai residui fosfolipidici della cellula, la formazione e il deposito di molecole di fosfato di calcio. Questo meccanismo di calcificazione distrofica si verifica in quanto il normale passaggio degli ioni calcio attraverso la membrana viene alterato nelle cellule rese non vitali dalla fissazione. In condizioni normali la concentrazione extracellulare di calcio è circa 1 mg/mL e quella interna alla cellula è da 1000 a 10000 volte inferiore; quando invece la cellula non è più vitale, il meccanismo di pompaggio che mantiene tale gradiente di concentrazione non è più disponibile.

Il calcio può legarsi al fosforo, il quale è contenuto principalmente nella membrana e nel nucleo cellulari e funge da nucleatore. Il deposito è solitamente localizzato sul tessuto cuspidale (calcificazione intrinseca), ma depositi calcifici estrinseci alle cuspidi possono

evolversi in trombi o vegetazioni endocardiche (calcificazione estrinseca). In generale, però, entrambe le tipologie si concentrano nei siti in cui la deformazione meccanica è maggiore per la flessione della valvola.

L'accumulo di questi sali non è un processo passivo ma è regolato da vari fattori, induttivi e inibitori, confrontabili con quelli che agiscono nel processo di mineralizzazione del tessuto osseo. I depositi possono allargarsi e fondersi, con la conseguente formazione di noduli solidi che irrigidiscono e indeboliscono il tessuto.

Le analisi patologiche di tessuti valvolari espantati da pazienti umani o di modelli animali hanno chiarito molti aspetti di questo importante problema clinico che sono riassunti nella figura 4.13.

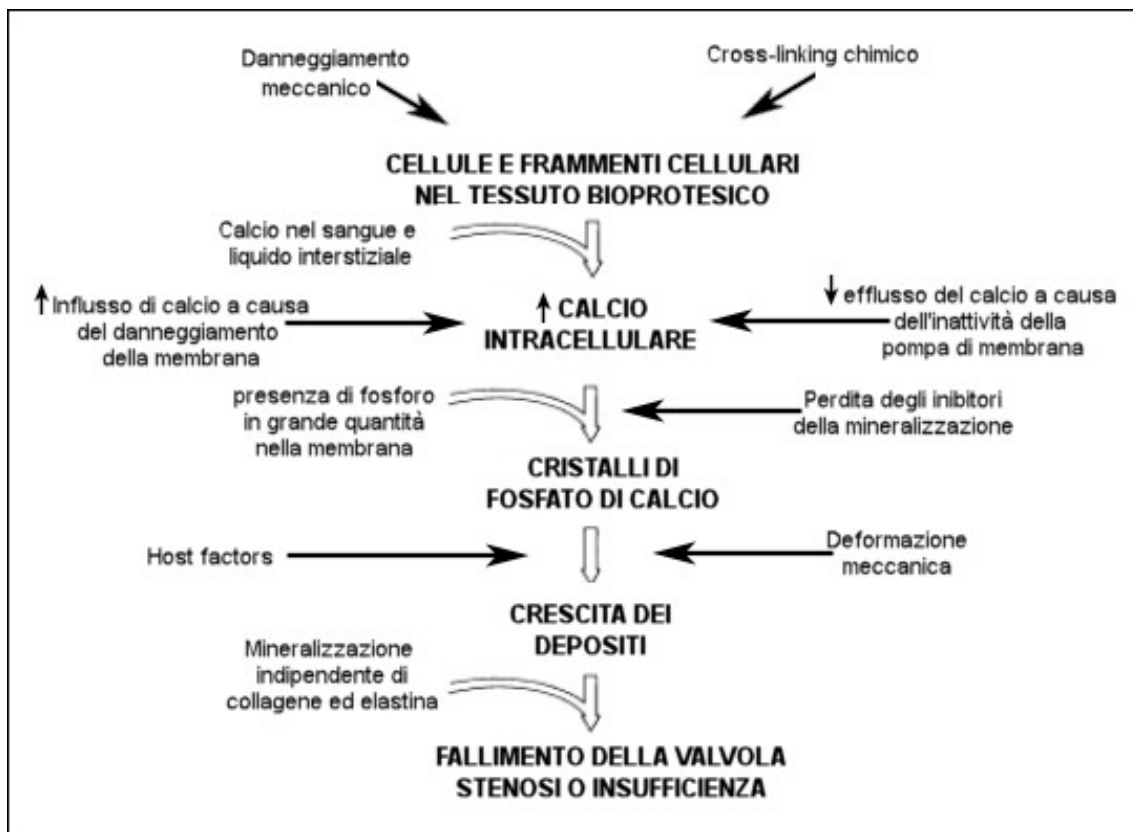


Figura 4.13: Modello schematico dei vari fattori che intervengono nella calcificazione del tessuto valvolare fino a richiedere la sostituzione della valvola danneggiata [43].

I fattori determinanti la mineralizzazione includono elementi del metabolismo dell'ospite, la struttura e la composizione dell'innesto e fattori meccanici; inoltre, cofattori naturali e inibitori giocano un ruolo indiretto ma importante.

E' stato dimostrato che i legami crociati prodotti dal fissativo stabilizzano e modificano gli elementi ricchi di fosforo e calcificabili contenuti nella bioprotesi; queste strutture, una volta impiantate nell'organismo e, quindi, esposte all'alto livello di concentrazione di calcio del fluido extracellulare, sono in grado di mineralizzare. Inoltre, anche se può sembrare paradossale, un trattamento di fissazione che utilizza una concentrazione più bassa di glutaraldeide non è sempre consigliato. Particolari studi su modelli di pecora, infatti, hanno constatato che, a distanza di 6 settimane dall'impianto, soluzioni di glutaraldeide a 3% riducono del 38% la calcificazione in sede valvolare aortica rispetto a soluzioni di glutaraldeide a 0,2% [42].

Le reticolazioni create dalla glutaraldeide favoriscono la calcificazione del collagene ma l'estensione del processo non è correlato al numero di legami incrociati. A sua volta, l'elastina calcifica indipendentemente dalle concentrazioni e dal metodo usati nella fissazione.

4.4 Strategie per prevenire la calcificazione

A fronte di tutte le problematiche legate alla calcificazione, alcuni gruppi di ricerca hanno considerato i seguenti interventi per la prevenzione di tale processo nelle protesi valvolari biologiche trattate con glutaraldeide [43] :

- funzionalizzare il tessuto della valvola cardiaca fissata con glutaraldeide con sostanze che inibiscono il processo calcificativo;
- eliminare o modificare le componenti della bioprotesi che vanno incontro più facilmente alla calcificazione;
- modificare il fissaggio con glutaraldeide;

Un ulteriore metodo, che verrà approfondito nel prossimo paragrafo, ha l'obiettivo di non fare uso della glutaraldeide bensì di sviluppare trattamenti di *cross-linking* completamente diversi. L'impianto sottocutaneo in ratti e l'impianto in sede valvolare in animali di grandi dimensioni (ovini e bovini) sono stati ampiamente usati per esaminare le possibili strategie di anticalcificazione. Purtroppo, non sempre i trattamenti che sembrano efficaci sull'impianto sottocutaneo si dimostrano idonei quando si riproducono sul tessuto da impiantare in sede valvolare. In ogni modo, tutti le tecniche di anticalcificazione testate devono soddisfare scrupolosi requisiti di efficacia e sicurezza; tali tecniche non possono ostacolare le prestazioni

emodinamiche della valvola o modificare i tempi di apertura e chiusura, devono dimostrare la loro efficacia terapeutica e non possono generare alcun effetto tossico, infiammatorio, immunologico o di altro genere.

Una terapia con agenti di inibizione della calcificazione a livello sistemico può risultare efficace, ma la sicurezza è un aspetto incerto; in particolare, essa può interferire con il metabolismo del calcio e la calcificazione di tipo fisiologico, ad esempio causando limitazioni nella crescita del tessuto osseo.

Un modo per superare queste avversità è quello di studiare il rilascio del farmaco in una zona limitata, vicina al sito della protesi valvolare e la concentrazione dev'essere confinata unicamente in questa zona.

Il metodo più accreditato per ottenere risultati clinici a breve termine soddisfacenti, efficaci e sicuri si basa sulla modificazione del substrato, legando ad esso degli inibitori oppure trasformando o eliminando le componenti calcificanti.

4.4.1 Inibitori della reazione di calcificazione

Gli esperimenti condotti mediante impianti sottocutanei in modelli animali hanno potuto testare la farmacodinamica di alcune sostanze inibitorie per la calcificazione, come ad esempio i bis-fosfonati, gli ioni trivalenti di ferro e alluminio e l'acido amino-oleico.

I bis-fosfonati sono una classe di farmaci in grado di inibire il riassorbimento osseo, somministrati in relazione a patologie come l'osteoporosi. A livello sperimentale, l'applicazione di composti bifosfonati, come l'etano-1-idrossi-1,1-bifosfonato, ad azione sistemica o locale, inibisce la formazione distrofica di cristalli di idrossiapatite nei tessuti bioprotetici valvolari [44].

Gli ioni metallici trivalenti di ferro e alluminio, usati sotto forma di sali come FeCl_3 e AlCl_3 , ritardano la reazione di calcificazione inibendo la fosfatasi alcalina; quest'ultima sostanza è un enzima che svolge un ruolo importante nella formazione e nell'accrescimento osseo e che regola, quindi, anche la mineralizzazione del fosfato di calcio.

È stato inoltre dimostrato, mediante uno studio condotto da Bailey *et al.* su impianti sottocutanei nei ratti, che lo ione alluminio riesce a legarsi all'elastina impedendone così la calcificazione [45].

L'acido 2-amino-oleico è un detergente che si lega covalentemente al tessuto della protesi

biologica grazie a una reazione aldeide-ammina con i gruppi aldeidici liberi della glutaraldeide, riuscendo così a legarsi al tessuto. Sia in un impianto sottocutaneo a breve termine (21 giorni) che in un impianto valvolare a termine più lungo (5 mesi), l'utilizzo di questo detergente ha permesso un rallentamento della nucleazione dei depositi di fosfato di calcio; ciò è in parte spiegato dal fatto che i legami della glutaraldeide con l'acido 2-amino-oleico riducono la diffusione di Ca^{2+} nel tessuto protesico. I risultati degli studi *in vivo*, però, mostrano che l'effetto anticalcificante che si ha sul tessuto delle cuspidi non si estende alle pareti aortiche, dove il tempo di ritardo di diffusione del detergente non permette di raggiungere un livello di concentrazione sufficiente per resistere al flusso di calcio [46].

Sia negli omoinnesti che nelle protesi suine e pericardiche il tessuto delle cuspidi si dimostra più incline alla calcificazione rispetto ai tessuti circostanti [47]. Si prenda in considerazione, però, che le bioprotesi di tipo *stent-less* sono formate dalla struttura valvolare più una porzione maggiore di parete aortica; aggiungendo il fatto che il *trend* di utilizzo di tali strutture sta aumentando nel corso degli anni rispetto alle tradizionali valvole su *stent*, l'anticalcificazione parziale prodotta dall'acido 2-amino-oleico può non essere sufficiente. Una soluzione prevede di combinare le terapie anticalcificanti per permettere una prevenzione simultanea in entrambi i tessuti: in questo caso l'acido 2-amino-oleico può essere accompagnato da ioni alluminio che agiscono sull'elastina di cui è ricca la radice aortica. Il trattamento con l'acido 2-amino-oleico è utilizzato da Medtronic per bioprotesi Freestyle™ *stent-less* attualmente in commercio.

4.4.2 Modificazione o rimozione delle componenti calcificabili

Un secondo approccio, completamente differente dal precedente, non mira ad impedire direttamente la reazione tra calcio e fosforo, bensì va direttamente ad eliminare o modificare, prima dell'innesto della protesi, quelle componenti tessutali e cellulari che permettono al calcio di cristallizzare.

Il trattamento con etanolo di valvole porcine, innestate con impianti sottocutanei nei ratti e sostituzione valvolare mitralica negli ovini, permette di estrarre quasi tutti i fosfolipidi e il colesterolo dalle cuspidi, alterando permanentemente la conformazione del collagene [48]. Attualmente questo pretrattamento usato in combinazione con lo ione alluminio è impiegato nei test clinici di valvole *stent-less*.

Gran parte dei detergenti usati nei protocolli di decellularizzazione, e richiamati nel capitolo precedente, sono tensioattivi (detti anche surfattanti) che permettono di estrarre le molecole fosfolipidiche della membrana cellulare e non solo.

Di conseguenza, le stesse tecniche di decellularizzazione del tessuto valvolare fanno parte di questo approccio.

La principale considerazione da fare con tutti questi metodi di estrazione è sulla capacità, che le accomuna, di intaccare l'integrità strutturale del materiale a base di collagene.

4.4.3 Miglioramenti nella fissazione con glutaraldeide

Il pretrattamento convenzionale con glutaraldeide è la tecnica più usata per la preparazione delle bioprotesi, ma il suo ruolo nel favorire la calcificazione e le tante lacune sulla conoscenza della dinamica della reticolazione suggeriscono di operare delle modifiche. Ciò è stato preso in considerazione da più gruppi di ricerca, con il fine di trovare procedimenti più vantaggiosi o alternativi rispetto al metodo tradizionale.

Zilla *et al.* [42] hanno, per esempio, adottato una metodo di fissazione del tessuto valvolare ad elevata concentrazione di glutaraldeide (da 5 a 10 volte superiore allo standard), che inibisce la mineralizzazione nei test sottocutanei. Ciononostante, l'eccessiva rigidità della protesi non sembra favorire l'uso clinico.

Un insieme distinto di strategie mira a rendere meno reattivo il tessuto fissato con la dialdeide sfruttando reazioni di riduzione o bloccando le estremità aldeidiche libere.

La riduzione è stata suggerita per eliminare le aldeidi residue e stabilizzare le labili reticolazioni con il collagene; gli agenti di riduzione, come il boroidruro di sodio (NaBH_4) e il sodio cianoboroidruro (NaBH_3CN), sono infatti usati per ridurre le aldeidi ad alcoli [49]. In ogni modo, per evitare qualsiasi problema dipendente da residui tossici, la specie riducente più indicata è il boroidruro di sodio.

Per quanto concerne il blocco delle estremità aldeidiche reattive, Grimm *et al.* [50] hanno analizzato il legame delle aldeidi in eccesso con l'acido L-glutammico in ambiente acido; sebbene il meccanismo con cui avviene la reazione non sia completamente noto, l'acido L-glutammico migliora sensibilmente la biocompatibilità e l'anticalcificazione, permettendo una maggiore proliferazione cellulare *in vitro* come anche *in vivo*. Il pH acido favorisce la

depolimerizzazione delle catene di glutaraldeide che, di conseguenza, è più facilitata a legarsi alle proteine tessutali e non lasciare gruppi aldeidici liberi. Sono stati proposti anche la glicina, la L-lisina e la diammina come bloccanti delle aldeidi libere ma esse hanno effetti meno efficaci a lungo termine.

Una metodologia diversa dalle precedenti consiste nell'introduzione di ulteriori reticolazioni nella struttura del collagene per migliorare il processo di fissazione della glutaraldeide.

Gli studi di Nimni *et al.* [51] si basano sull'incremento dei legami crociati attraverso l'utilizzo di carbodiimmide ed esadiammina: la diammina introduce *crosslinks* aggiuntivi che abbassano l'antigenicità del tessuto e aumentano la resistenza contro la degradazione enzimatica.

In alternativa, la ripetizione sequenziale di trattamenti con glutaraldeide ed L-lisina introduce un alto numero di legami crociati; il materiale così creato risulta molto durevole ed elastico anche se meccanicamente più debole del materiale trattato in modo tradizionale [52]. In particolare, un esperimento di Zilla *et al.* [42] dimostra che l'incremento delle reticolazioni grazie sia a concentrazioni elevate di glutaraldeide che aggiungendo L-lisina permette buoni risultati meccanici e una riduzione significativa della calcificazione.

Un ultimo gruppo di strategie si serve di alcuni polimeri biocompatibili da incorporare al tessuto al fine di modificare la carica e di riempire gli spazi vuoti. Il solfato di protamina è una polipeptide basico ad elevato contenuto di L-arginina; in alcune esperienze condotte da Ezra e Golomb [53] esso è stato introdotto nel tessuto valvolare reticolato per compensare la carica netta positiva presente dopo la fissazione. Tale polimero, nell'impianto su un modello di ratto, ha comportato una diminuzione della calcificazione di 70 % rispetto alla sola glutaraldeide.

La modificazione del tessuto è stata effettuata anche utilizzando, successivamente al trattamento con l'aldeide, il glicole polietilenico, un polimero preparato per polimerizzazione dell'ossido di etile [81]. Gli studi sottocutanei con quest'ultimo agente mostrano un minor fissaggio delle piastrine sulla superficie una riduzione dell'80 % nella mineralizzazione, mentre negli esperimenti *in vitro* con soluzioni di fosfato di calcio la riduzione è del 50 % [54]. Tale risultato è dovuto alla riduzione dei gruppi aldeidici liberi e ad un effetto di riempimento degli spazi vuoti della struttura con conseguente potenziamento della biostabilità e degli effetti sinergici con il sangue.

Un altro possibile agente polimerico è l'ossido di polietilene solfonato che dimostra un'alta

biocompatibilità e un'ottima resistenza alla calcificazione. Gli esperimenti *in vitro* e *in vivo* nel ratto (impianto sottocutaneo) e nel cane (impianto valvolare) hanno visto una decrescita della calcificazione dell'innesto reticolato rispettivamente del 50 %, 65% e 80% [55].

Studi di tipo analogo sono stati effettuati usando l'eparina [56][82], un glicosaminoglicano con alta densità di carica negativa e utilizzato anche come farmaco anticoagulante iniettabile, e il chitosano [57][83], un polisaccaride biodegradabile derivante dalla chitina (figura 4.14).

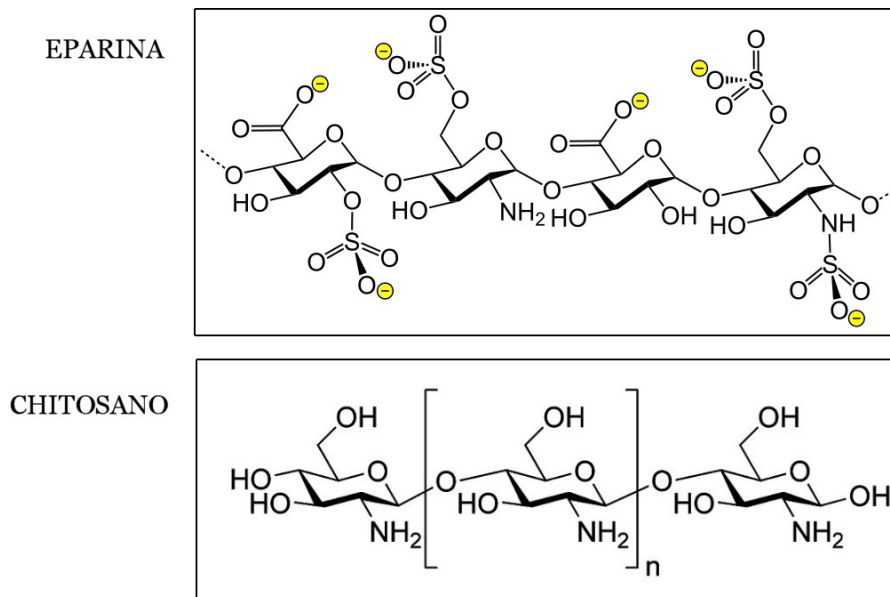


Figura 4.14: Strutture chimiche dell'eparina e del chitosano.

4.5 Uso di sostanze diverse dalla glutaraldeide

Negli ultimi anni è stato valutato un cospicuo numero di protocolli innovativi che eliminano completamente il trattamento con glutaraldeide. I gruppi funzionali fondamentali coinvolti nei nuovi trattamenti sono i gruppi amminici liberi, principalmente appartenenti a lisina e idrossilisina, e i gruppi carbossilici, forniti da acido aspartico e acido glutammico.

La sperimentazione *in vitro* e su modelli animali ha dato risultati più che soddisfacenti, mentre in pochi casi sono stati apportati studi clinici. Nei prossimi paragrafi sono esposti solo alcuni dei numerosi casi riportati in letteratura.

4.5.1 PhotoFix

Nella tecnica nota come PhotoFix™, il tessuto viene posto su un supporto e trattato con coloranti fotoattivi. Successivamente esso viene esposto ad una radiazione di lunghezza d'onda, intensità, periodo e temperatura controllate, per mezzo della quale il colorante reagisce con gli aminoacidi delle catene di collagene; in particolare, gli aminoacidi modificati da quest'azione sono la tirosina, l'istidina, il triptofano e la metionina. A reazione conclusa, il colorante può essere rimosso e rimangono solamente i legami crociati del collagene appena formati; la figura 4.15 descrive in termini semplificati l'ideale differenza con l'aldeide glutarica: le molecole di glutaraldeide irrigidiscono la struttura e favoriscono la calcificazione, mentre nella foto-ossidazione non incombe questa problematica.

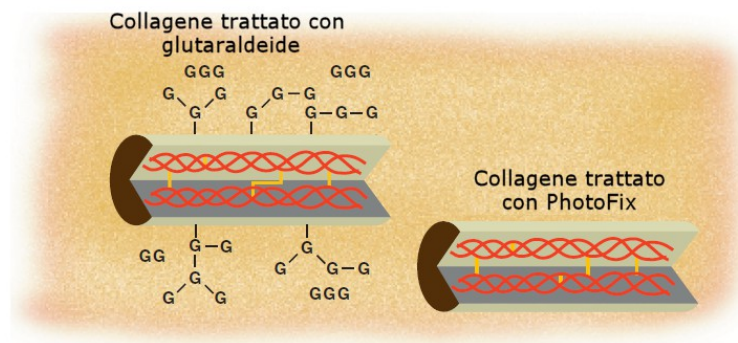


Figura 4.15 : Semplificazione della struttura del collagene nel trattamento con glutaraldeide o in quello con foto-ossidazione; con G si indica la molecola di glutaraldeide, mentre i segmenti trasversali sono *cross-links*.

La sperimentazione con l'impianto in modelli ovini di valvole da pericardio bovino trattate con questo sistema ha dimostrato che questo approccio è molto promettente: a due anni dall'impianto si notano livelli minimi di calcificazione e parziale endotelializzazione del tessuto [58]. Tuttavia, nei primi *trials* clinici, PhotoFix™ ha dato esiti fallimentari rispetto ai risultati ottenuti su modelli animali: insufficienze, lacerazioni, infezioni e trombosi si sono riscontrati con l'espianto dopo pochi mesi [59].

4.5.2 Composti epossidici

Da circa vent'anni i composti epossidici sono considerati per molti studiosi una valida alternativa alla fissazione con glutaraldeide, sia per la capacità di ridurre la calcificazione, sia per la flessibilità e l'aspetto naturale dei tessuti trattati [60].

Sono già stati usati molti tipi diversi di reagenti poliepossidici come ad esempio il glicerol poliglicidil etere ed i composti Denacol™ (EX-313, EX-512, EX-521, EX-810 e EX-861). Gli epossidi sono eteri ciclici in cui l'ossigeno è uno degli atomi che compongono un anello a tre termini, approssimativamente a forma di triangolo equilatero. Differenziandosi dagli altri eteri, essi presentano una reattività particolare a causa della tensione angolare presente tra i legami [84]; gli angoli di legame formati dall'anello, infatti, sono tutti di 60° , contro i $109,5^\circ$ del carbonio ibridizzato sp^3 (figura 4.16).

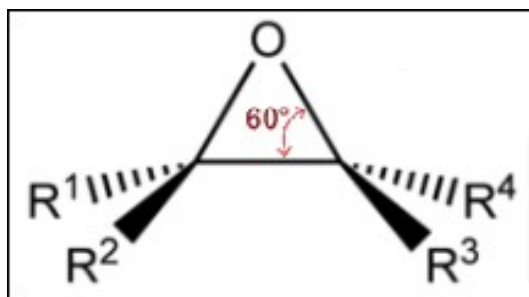


Figura 4.16 : Struttura di un generico epossido; è evidenziato l'angolo di legame all'interno della struttura ciclica .

Per questa caratteristica i gruppi epossidici sono suscettibili ad attacchi nucleofili, reagendo principalmente con i gruppi amminici della lisina e dell'idrossilisina. Inoltre, tali gruppi hanno la possibilità di reagire con il gruppo amminico dell'istidina, ammidi, fenolo, gruppi alcolici e, in relazione al pH, anche con i gruppi carbossilici acidi contenuti nel collagene dei tessuti valvolari.

I reagenti poliepossidici di lunghezza intermedia (con *backbones* di 17-25 atomi) e 4-5 gruppi epossidici sono particolarmente efficaci nel creare legami crociati tra le eliche di collagene. Per quando concerne le proprietà meccaniche, i tessuti trattati con questi nuovi composti risultano più leggeri e flessibili rispetto al trattamento con glutaraldeide.

Più esperimenti, però, sembrano dimostrare che il deposito di fosfati di calcio avviene comunque, malgrado le ottime potenzialità nel formare legami crociati, nella stessa misura rispetto alla glutaraldeide [61].

4.5.3 Acil azidi

Gli azoturi, detti impropriamente anche azidi, sono composti in cui l'azoto è legato ad un metallo o ad un gruppo organico [85].

Un particolare metodo di reticolazione consiste nella trasformazione dei gruppi carbossilici liberi del collagene in gruppi acil azidici che possono così reagire con i gruppi amminici non reagiti delle catene laterali adiacenti. Dagli studi effettuati su questo trattamento si dimostra che esso ha delle capacità di reticolazione simili a quelle della glutaraldeide e non ha effetti tossici. Inoltre i tessuti trattati presentano, rispetto ai tessuti con reticolazione tradizionale, la stessa resistenza alla degradazione chimica con bromuro di cianogeno e alla digestione enzimatica con collagenasi.

Purtroppo tali processi risultano anche lunghi e richiedono un'ampia fase di lavaggio per eliminare totalmente tutti i sottoprodotti della reazione [61].

Per ovviare a tale problematica e non necessitare di un intenso lavaggio, i gruppi carbossilici del tessuto possono essere direttamente trasformati in acil azidi mediante l'uso di difenilfosforazidato come riportato in figura 4.17; tuttavia per quest'alternativa è necessario eseguire la reticolazione in un mezzo non acquoso, possibilmente dimetilformammide.

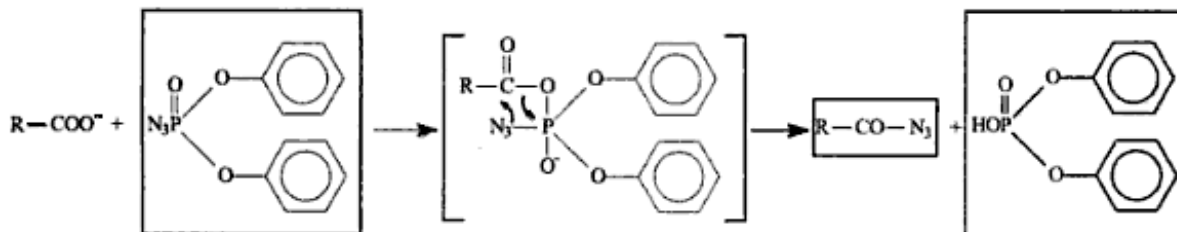


Figura 4.17: Formazione dell'acil azide a partire dal difenilfosfoazidato e dal gruppo carbossile [63].

Su substrati di collagene e glicosamminoglicani, la trasformazione in acil azidi ha dimostrato una ridotta calcificazione dopo l'impianto sottocutaneo nei ratti di durata superiore a tre mesi [64]; tuttavia non sono ancora disponibili dati *in vivo*.

4.5.4 Carboimmidi

Un carbodimide è un gruppo funzionale dato dalla formula $RN=C=NR$.

Il processo di reticolazione permesso da questo tipo di molecole implica l'attivazione dei gruppi carbossilici delle catene polipeptidiche seguita dalla reazione con le ammine libere di altri polipeptidi vicini, per formare legami crociati di tipo ammidico (figura 4.18).

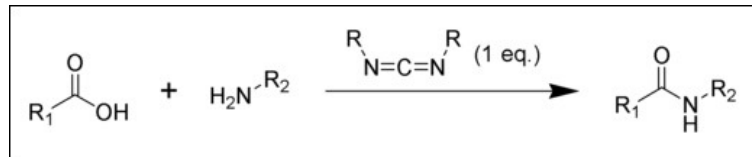


Figura 4.18: Il meccanismo di formazione dell'ammidico a partire dai gruppi funzionali carbossilico e amminico qui rappresentato in una sola reazione [86].

Le prime esperienze di *crosslinking* con questa metodologia risalgono, in letteratura, a circa trent'anni fa. Più recentemente, Olde Damink *et al.* hanno testato un carbodiimide solubile in acqua (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimide) sul collagene dermico ovino; i risultati ottenuti sono stati una diminuzione del contenuto di gruppi amminici liberi e un aumento della temperatura di contrazione, segni della creazione di più legami crociati. Il processo può essere accelerato grazie all'intervento di un catalizzatore specifico (N-idrossisuccinimide) che impedisce ad altre reazioni secondarie di avvenire [65].

In particolare, sia il carbodiimide solubile che il catalizzatore possono essere associate all'acido suberico e all'1,6-esandiammina in un metodo, denominato Ultifix™, che si offre come una buona alternativa alla fissazione tradizionale; tutti i composti utilizzati durante il processo di fissazione e i loro sottoprodotti sono solubili in acqua, per questo vengono rimossi con facilità con il lavaggio e non inducono reazioni tossiche. I tessuti valvolari porcini così trattati sono stati usati come impianti sottocutanei nei ratti per *trials* di 2,4,8 e 16 settimane. Dai risultati ottenuti si osserva che le cuspidi aortiche e il pericardio subiscono una leggera mineralizzazione, molto inferiore agli analoghi tessuti trattati con glutaraldeide; la parete aortica, invece, soffre dello stesso grado di calcificazione del campione con glutaraldeide [66-67].

4.5.5 Genipin

Il genipin (figura 4.19) è un agente reticolante naturale ottenuto dai frutti di *Gardenia jasminoides*. Questo composto iridoide è in grado di reagire spontaneamente con aminoacidi o proteine per formare un pigmento dal colore blu scuro, anche usato nella fabbricazione di coloranti alimentari.

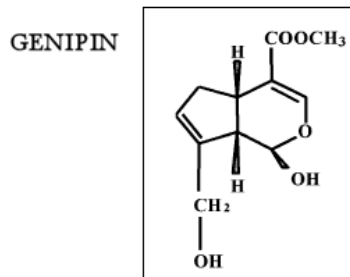


Figura 4.19: Struttura chimica del genipin usato come reticolante.

La flessibilità di utilizzo di questa sostanza è stata valutata in test *in vitro* e con innesti sottocutanei di valvole porcine nei ratti confrontati con un controllo fissato con glutaraldeide. Si è potuta osservare una resistenza alla degradazione enzimatica equivalente, affiancata ad un indice di biocompatibilità significativamente superiore in confronto alla glutaraldeide ed a una calcificazione minima; la citotossicità del genipin risulta circa 10000 volte più bassa mentre la capacità proliferativa delle cellule è approssimativamente 5000 volte superiore rispetto all'esposizione al fissativo tradizionale.

Il genipin è in grado di formare legami crociati nelle fibre di collagene sia di tipo inter-molecolare che di tipo intra-molecolare (figura 4.20);

L'aspetto sfavorevole di questo fissativo naturale sta nel fatto che produce una reazione di reticolazione lenta, durante la quale è necessario mantenere la sterilità per un lungo periodo di tempo [68-69].

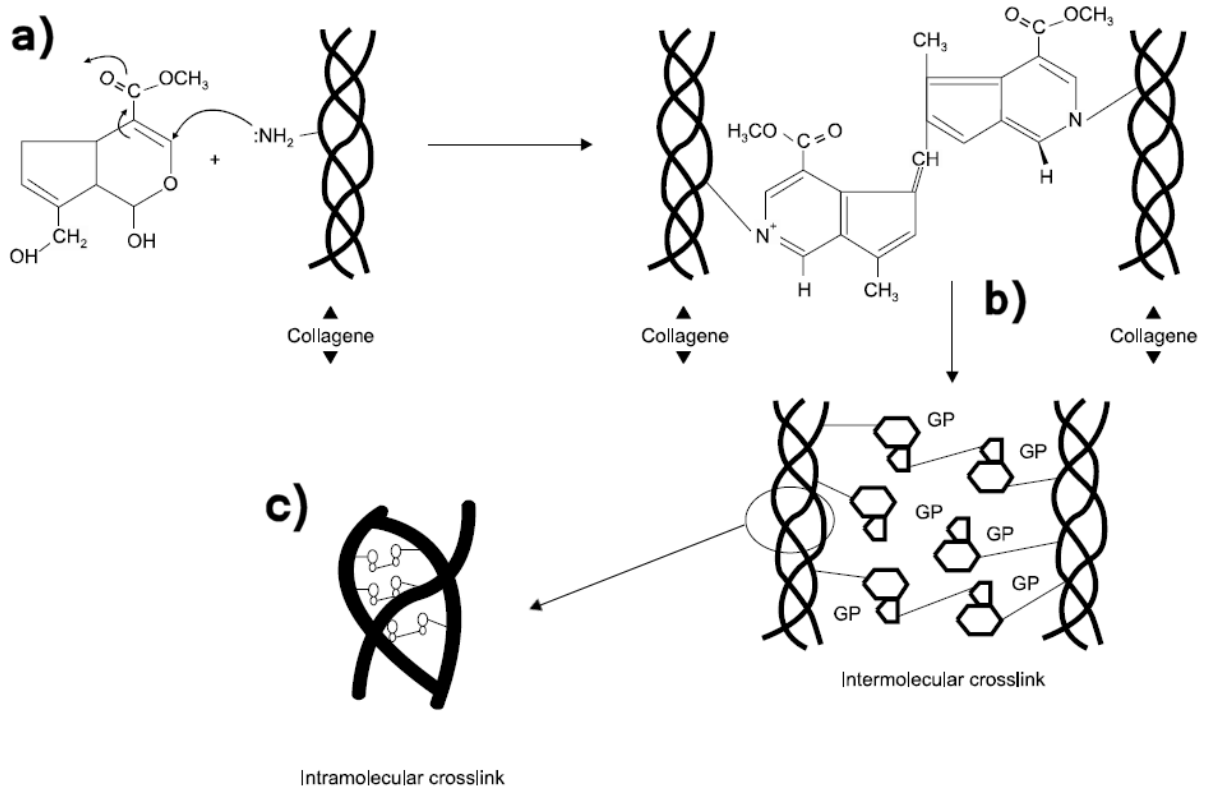


Figura 4.20: Presunto meccanismo di formazione del legame tra il genipin e i gruppi amminici liberi del collagene (a) ed illustrazione schematica dei legami crociati intermolecolari (b) e intramolecolari (c) [68].

4.5.6 Reuterin

Il reuterin (β -idrossipropionaldeide) è un agente antimicrobico ad ampio spettro prodotto dal *Lactobacillus reuteri*, batterio proveniente dal tratto gastrintestinale umano e animale. Tale composto è un aldeide a tre carboni che, usando il suo gruppo funzionale aldeidico, può reagire con i gruppi amminici liberi contenuti nei tessuti. La sua formula è mostrata in figura 4.21.

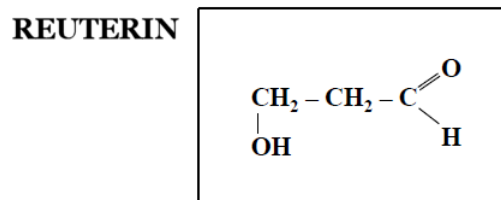


Figura 4.21: Formula chimica del reuterin.

Sung *et al.* hanno dimostrato, da un confronto tra la glutaraldeide e il reuterin, che entrambe queste sostanze svolgono un' azione antimicrobica nella sterilizzazione dei tessuti biologici; risulta, però, che il grado di reazione infiammatoria del secondo, con o senza sterilizzazione mediante etanolo, è significativamente inferiore rispetto al primo. I tessuti fissati con reuterin hanno una resistenza alla trazione e una resistenza alla degradazione *in vivo* comparabili con il metodo di fissazione tradizionale. Inoltre, la reticolazione con reuterin sembra prevenire la calcificazione ed ha un grado di biocompatibilità superiore rispetto alla glutaraldeide [70].

4.6 La ricerca avanzata e gli sviluppi futuri

Al momento la ricerca di un metodo che renda la bioprotesi immunologicamente inerte senza avvalersi di un fissativo calcificante e citotossico, qual è la glutaraldeide, è attualmente in corso. Molti gruppi di ricerca sembrano concentrarsi maggiormente sul raggiungimento del mascheramento immunitario senza la formazione di *crosslinks* con glutaraldeide.

In particolare vengono studiate le *tissue-engineered heart valves (TEHV)*, o meglio l'applicazione di metodi decellularizzativi, potenziali scaffold e la coniugazione con particolari peptidi. Da un lato vi è la ricerca di metodi per la decellularizzazione che danneggino sempre meno la matrice extracellulare permettendo la preservazione delle sue caratteristiche biochimiche e meccaniche; dall'altro si progettano modifiche in grado di rendere più veloce il ripopolamento dello *scaffold* da parte delle cellule del ricevente per ottenere, in un ultima istanza, un tessuto vivente.

Recentemente Gallo *et al.* [71], pubblicando i risultati preliminari dei loro studi, indicano il trattamento di decellularizzazione con il metodo TRICOL per le potenzialità di ripopolamento cellulare e adattamento strutturale che presentano i tessuti trattati. L'esperimento da loro condotto si basa sull'impianto di valvole aortiche porcine, decellularizzate con TRITON X-100 e colato di sodio (TRICOL) e in seguito trattate con Endonucleasi Benzonase per rimuovere completamente gli acidi nucleici. Le valvole vengono impiantate su un nuovo tipo di modello animale, il maiale vietnamita, in sostituzione della valvola polmonare; tale animale esibisce un meccanismo di coagulazione e una risposta infiammatoria molto più simili a quelli umani rispetto al modello ovino.

Le analisi ecocardiografiche dopo 15 mesi di *follow-up* evidenziano inalterate proprietà

biomeccaniche e fisiologiche e non mostrano segni di disfunzione delle valvole.

In tutti gli innesti il tessuto non presenta calcificazioni, degenerazioni, trombi o infiltrazioni infiammatorie e le cuspidi mantengono le loro flessibilità e motilità. Tuttavia, la velocità massima di flusso attraverso la valvola risulta significativamente più alta nei casi trattati rispetto al controllo, ossia all'animale a cui è stato escisso e subito rimpiantato il tratto d'uscita del ventricolo destro. Dal punto di vista macroscopico, dopo 15 mesi i bordi delle valvole espiantate presentano una lieve riduzione dello spessore; tale misura, seppur poco rilevante e non confrontabile con lo spessore del condotto originale, indica un adattamento dell'innesto alle dimensioni dell'orifizio relativamente al regime di pressione *in vivo*.

Gli esperimenti di marcatura con ^{35}S *in vitro* dei GAGs negli innesti dopo l'espianto verificano la presenza di cellule metabolicamente attive nello *scaffold*. Inoltre, la presenza di DNA nei sostituti espantati a 12 e a 15 mesi dall'impianto sembra compatibile con il processo di ripopolazione, sebbene non siano definiti i tipi e la distribuzione spaziale delle cellule coinvolte. A differenza delle bioprotesi fissate con glutaraldeide, gli innesti decellularizzati con TRICOL e Benzonase conservano quindi le potenzialità per essere ricellularizzati ed eventualmente rimodellati da parte delle cellule dell'ospite; il rimodellamento, però, non è stato ancora completamente verificato.

Un'esperienza diversa è stata invece la valutazione delle proprietà *in vitro* di un tessuto pericardico bovino acellulare coniugato con la sequenza peptidica RGD nel contributo di Dong *et al.*[72].

La matrice extracellulare del pericardio bovino decellularizzato può essere usata come *scaffold*; essa, tuttavia, presenta approssimativamente pori di 25 μm e una porosità del 60%, valori relativamente bassi, inadatti a migrazione, adesione e proliferazione cellulari. Pertanto, in questo esperimento, dopo il procollo di decellularizzazione (Triton X-100, DNase e RNase), il tessuto è stato immerso in acido acetico per un'ora: tale trattamento ha permesso di ampliare i pori e incrementare il grado di porosità del tessuto grazie alla protonazione dei gruppi amminici liberi del collagene e il conseguente allontanamento delle fibre adiacenti. Successivamente, la preparazione dello *scaffold* procede facendo reagire i gruppi carbossilici liberi della matrice con i peptidi RGD per aggiunta di 1-etil-3-dimetilammino-propil carboimmide cloridrato e N-idrossisuccinimmide. La matrice acellulare coniugata viene lasciata per 10 giorni in una cultura *in vitro* di cellule staminali mesenchimali isolate dal midollo osseo.

La sequenza peptidica RGD (Arg–Gly–Asp), caratteristica della fibronectina, del collagene e della tenascina, rappresenta una delle strutture che permettono l'adesione di particolari linee cellulari in modo da svolgere la loro funzione; il legame tra RGD e le integrine induce una serie di reazioni nel citoplasma che coinvolgono il citoscheletro e altre proteine che regolano l'adesione, la crescita e la migrazione cellulare. I peptidi RGD vengono anche utilizzati per stimolare l'adesione di cellule alle superfici dei biomateriali.

I tessuti completamente trattati (AA-RGD) vengono confrontati con campioni di pericardio bovino che hanno subito solo una parte della preparazione:

- la decellularizzazione (ABP);
- la decellularizzazione e l'immersione in acido acetico (AA);
- la decellularizzazione e la reazione con la sequenza peptidica (ABP-RGD).

Dopo l'impianto delle cellule mesenchimali, l'adesione cellulare al tessuto AA-RGD risulta amplificata dalla presenza della sequenza RGD legata al collagene più poroso: il numero di cellule e il contenuto di DNA del campione risulta significativamente superiori rispetto al tessuto ABP e, in modo differente, anche ad ABP-RGD ed AA. Tali differenze si possono valutare meglio in figura 4.21.

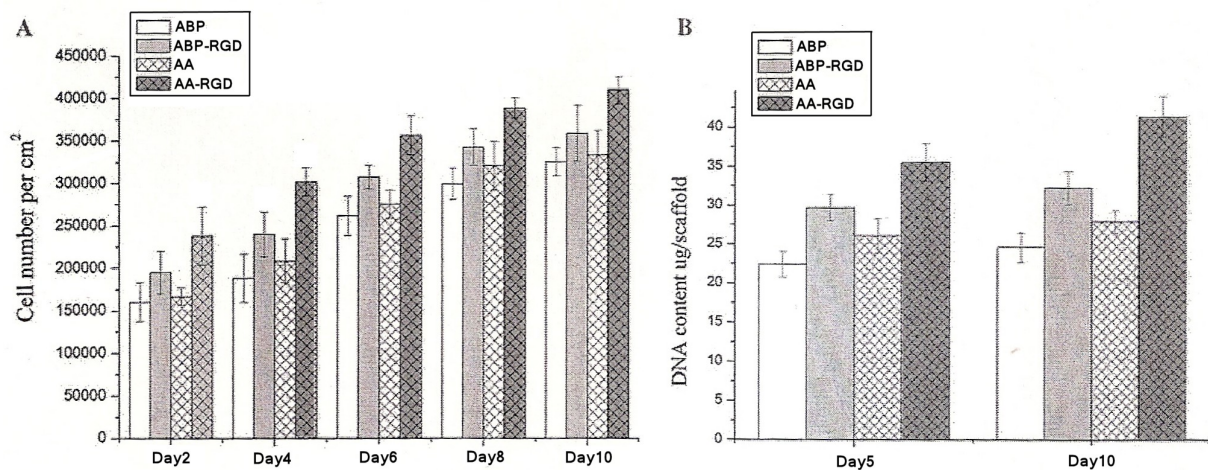


Figura 4.21: (A) proliferazione cellulare sui diversi campioni a 2,4,6,8 e 10 giorni dall'impianto *in vitro* delle cellule mesenchimali; (B) quantificazione del DNA nei 4 gruppi di campioni dopo 5 o 10 giorni nella cultura. (Abbreviazioni: ABP, pericardio bovino acellulare; AA, acellulare trattato con ac. acetico; -RGD, coniugato con RGD) [72].

Studi futuri potranno definire meglio il comportamento di questi *scaffold* ingegnerizzati *in vivo* e la differenziazione delle cellule mesenchimali.

In un recente studio, Jordan *et al.* hanno compiuto un passo ulteriore testando *in vivo* tessuti valvolari coniugati con anticorpi CD133. Le valvole porcine polmonari vengono dapprima decellularizzate (Triton X-100 e idrossido di ammonio), fissate con glutaraldeide e sterilizzate con raggi gamma; le matrici così ottenute si suddividono in tre gruppi:

1. valvole non ulteriormente trattate;
2. valvole seminate con cellule endoteliali autologhe e coltivate in un bioreattore per una settimana prima dell'impianto;
3. valvole che in 24 ore vengono trattate con N-etil-N'-3-(dimetilamminopropil)-carboimmide e N-idrossi succinimide e infine coniugate con l'anticorpo monoclonale CD133 (clone AC133), che riconosce l'epitopo CD133 delle cellule progenitrici endoteliali della pecora.

Ciascuna valvola viene poi impiantata su pecora in posizione polmonare per tre mesi.

Dopo tre mesi dall'operazione, il contenuto cellulare dei primi due gruppi risulta quasi identico, mentre molte più cellule sono distribuite da parte a parte della lamina spongiosa e fibrosa delle valvole coniugate. Non solo quest'ultime sono densamente popolate, ma tipi diversi di cellule sono differenziatamente distribuiti in tutto il tessuto; sia cellule endoteliali che cellule interstiziali sembrano essere migrate nella posizione anatomica appropriata. Nelle valvole che sono state seminate prima dell'impianto, invece, molte delle cellule vengono perse durante il primo mese a seguito del loro distaccamento dallo *scaffold*.

I tre gruppi presentano formazioni più o meno consistenti di nuove fibre di collagene lungo i bordi delle cuspidi. Tuttavia, nei primi due gruppi il contenuto di collagene e glicosaminoglicani tende a diminuire nel tempo; al contrario, nel tessuto coniugato con CD133, tale valore aumenta significativamente nel corso dei tre mesi di durata dell'impianto e le nuove fibre di collagene si estendono anche negli strati interni. I dati a riguardo evidenziano che le cellule interstiziali che migrano nel tessuto coniugato si attivano nella maturazione e nel rimodellamento dei lembi valvolari.

La valvola legata agli anticorpi risulta inoltre avere proprietà biomeccaniche più simili al tessuto valvolare originario rispetto agli altri due tipi di campioni testati.

In conclusione, malgrado la durata dell'impianto *in vivo* sia troppo limitata per poter fare molte considerazioni, questo studio dimostra che utilizzare una strategia per richiamare le cellule endogene verso la matrice può essere una tecnica più veloce e meno complessa della

semina dello *scaffold* con cellule autologhe; oltre a ciò, nel caso dei più pazienti giovani le valvole coniugate possono potenzialmente crescere con il paziente, riducendo il numero di reinterventi.

4.7 Conclusioni

Le protesi biologiche vengono usate comunemente come sostituti valvolari da ormai cinquant'anni e le loro caratteristiche sono state modificate nel tempo per ottenere migliori prestazioni e una risposta immunitaria avversa minore. La fissazione mediante glutaraldeide, il perfezionamento del *design* e lo sviluppo di strutture *stent-less* hanno permesso di plasmare una soluzione alternativa alle valvole meccaniche, in virtù della quale non è richiesta una terapia anticoagulante a lungo termine.

Tuttavia, il loro successo clinico è strettamente dipendente dal mantenimento della flessibilità e della motilità valvolari; di conseguenza, l'irrigidimento e la calcificazione dell'impianto protesico prodotti dal tradizionale trattamento con glutaraldeide, o forse dallo stesso protocollo di decellularizzazione, sono processi patologici che limitano la durata di funzionamento delle bioprotesi e, quindi, il loro utilizzo.

Sono veramente molti i gruppi di ricerca che hanno sperimentato o stanno ancora sperimentando, *in vitro* e *in vivo*, tecniche di reticolazione innovative: tali procedure in alcuni casi si dimostrano promettenti in quanto non inducono calcificazione e infiammazione. Questa tesina ha cercato di mettere in luce, seppur brevemente, alcune delle più interessanti procedure di modificazione chimica delle valvole cardiache sviluppate negli ultimi venticinque anni. Le pubblicazioni in merito alle conoscenze finora acquisite sono decine se non centinaia; tuttavia sembrano esserci pochi collegamenti tra quest'ultime e i vecchi trattamenti che vengono ancora usati nella preparazione della quasi totalità dei prodotti commerciali.

Dietro a questa scelta conservativa ci sono, in realtà, diverse argomentazioni.

Prima di tutto, come per tutti gli ambiti della ricerca scientifica, l'approfondimento di un concetto nuovo richiede l'impegno di tempo e denaro: un investimento conveniente solo se i risultati vengono utilizzati per trarne dei profitti.

La glutaraldeide è un agente di fissazione che si utilizza da più di quarant'anni, con scopi

clinici anche diversi dal trattamento della valvola cardiaca; di conseguenza i suoi meccanismi d'azione sono conosciuti e valutati attraverso molti dati clinici. Viceversa, sui processi alternativi, sviluppati più recentemente, non ci sono dati con lo stesso grado di affidabilità. I pochi gravi errori clinici del passato, come ad esempio l'applicazione clinica fallimentare della tecnica PhotoFix™, hanno frenato ulteriormente le sperimentazioni sull'uomo.

Un'altra considerazione può essere fatta sul confronto tra i numerosi casi riportati in letteratura: ciò che si riscontra è la difficoltà nella comparazione stessa degli studi dei diversi autori e nel giudicare quali di questi offrano le prestazioni migliori *in vivo*. Ciascun gruppo di ricerca sceglie un proprio modello animale e, di conseguenza, le procedure e i risultati associati differiscono di volta in volta.

La direzione presa negli ultimi anni di sperimentazioni mira alla costruzione di valvole cardiache sempre più “ingegnerizzate”. Uno degli approcci più promettenti sembra quindi essere l'uso delle strutture xenogeniche o allogeniche decellularizzate e modificate dal legame con particolari molecole bioattive, come l'anticorpo CD133 o la sequenza peptidica RDG, che stimolano il ripopolamento cellulare della protesi *in vivo*. Le proprietà di adesione, proliferazione, migrazione e potenziale differenziazione di diversi tipi di cellule, comprese le cellule staminali e progenitrici, sono i principali obiettivi da perseguire; il ripopolamento con cellule autologhe stabili e il rimodellamento dello *scaffold* in base alle condizioni fisiologiche in cui svolge la sua funzione sono i concetti su cui si fonderanno gli sviluppi futuri di questo settore.

Bibliografia

- [1] Allender S, Scarborough P, Peto V, Rayner M, Leal J, Luengo-Fernandez R, *European Cardiovascular Disease Statistics* Brussels: A European Heart Network, 2008.
- [2] Roberts WC, Ko JM, *Some observations on mitral and aortic valve disease*. Proc (Bayl Univ Med Cent). 2008; 21(3) : 282–299.
- [3] Hammermeister K, Sethi GK, Henderson WG, Grover FL, Oprian C, Rahimtoola SH. *Outcomes 15 years after valve replacement with a mechanical versus bioprosthetic valve: final report of the Veterans Affairs randomized trial*. J A Coll Cardiol 2000; 36 : 1152-8
- [4] Guyton AC, Hall JE, Zocchi L. *Fisiologia medica*. Elsevier, 11th edizione, 2010.
- [5] Goglia G, *Anatomia Umana*. Piccin-Nuova Libreria, 1999.
- [6] Young B, Lowe JS, Stevens, Heath AJW, *Wheater's Functional Histology, 5th edizione*. Churchill Livingstone, 2006.
- [7] Netter F H, *Atlante Di Anatomia Fisiopatologia E Clinica, volume I*. Masson, 2002.
- [8] Fegiz G, Marrano D, Ruberti U, *Manuale di Chirurgia Generale, Volume I*. Piccin Nuova Libreria, 1996.
- [9] Wang A, Bashore TM, *Valvular Heart Disease*. Humana Press Inc., 2009.
- [10] Newton J, Sabharwal N, Myerson S, Westaby S, Prendergast B, *Valvular Heart Disease*. Oxford University Press, 2011.
- [11] Sacchetti C, Ponassi G, *Metodologia diagnostica: semeiotica medica e diagnosi differenziale*. Piccin-Nuova Libreria, 1991.
- [12] Butany J, Ahluwalia MS, Munroe C, Fayet C, Ahn C, Blit P, Kepron C, Cusimano RJ, *Mechanical heart valve prostheses: Identification and evaluation*. Cardiovasc Pathol. 2003.
- [13] Ambler G, Omar RZ, Royston P, *Generic, simple risk stratification model for heart valve surgery*. Circulation. 2005; 112(2):224-31.
- [14] Harken DE, *Heart valves: Ten commandments and still counting*. Ann Thorac Surg 1989; 48 : S18-S19.
- [15] Gott VL, Alejo DE, Cameron DE, *Mechanical Heart Valves: 50 Years of Evolution*. Ann Thorac Surg, 2003; 76:S2230-S2239.

- [16] Grunckenmeier GL, Rahimtoola SH, Starr A. *Prosthetic heart valves*. In: Rahimtoola SH, (ed.): *Valvular Heart Disease*. Current Medicine; 1997, 13.9-13.11.
- [17] Nicolosi GL, *Trattato Di Ecocardiografia Clinica*. Piccini, 1999.
- [18] Alfieri O, "I criteri di scelta attuali del cardiocirurgo". *Incontri di Ecocardiografia 1998- Le protesi valvolari cardiache*. Knoll BASF Farma.
- [19] Bonow RO, Carabello B et al., *ACC/AHA 2006 guidelines for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines*. Circulation, 2006; 114(5) : e84-231.
- [20] Bettadapur MS, Griffin BP, Asher CR, *Caring for patients with prosthetic heart valves*. Cleve Clin J Med, 2002; 69(1) : 75-87.
- [21] Griffin BP, Thamilarasan M, *Choosing the most appropriate valve operation and prosthesis*. Cleve Clin J Med, 2002; 69(9) : 688-90, 693-4, 696-8 passim..
- [22] Bloomfield P, *Choice of heart valve prosthesis*. Heart. 2002; 87(6) : 583-589.
- [23] Cribier A, Eltchaninoff H, Bash A, Borenstein N, Tron C, Bauer F, Derumeaux G, Anselme F, Laborde F, Leon MB, *Percutaneous transcatheter implantation of an aortic valve prosthesis for calcific aortic stenosis: first human case description*. Circulation, 2002; 106(24) : 3006-8.
- [24] Dainese L, Barili F, Andreini D, Guarino A, Micheli B, Borsetti CA, Polvani G, Parolari A, Fusari M, Biglioli P, *Valvole cardiache ingegnerizzate: stato dell'arte*. AIM Publishing, 2008.
- [25] Brody S, Pandit A, *Approaches to heart valve tissue engineering scaffold design*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2007; 83 : 16-43.
- [26] Badylak SF, Taylor D, Uygun K, *Whole-Organ Tissue Engineering: Decellularization and Recellularization of Three-Dimensional Matrix Scaffolds*. Annu. Rev. Biomed. Eng, 2011; 13 : 27-53.
- [27] Liao J, Joyce EM, Sacks MS, *Effects of decellularization on the mechanical and structural properties of the porcine aortic valve leaflet*. Biomaterials, 2008 March; 29(8) : 1065-1074.
- [28] Samà C, *Metodi e protocolli di decellularizzazione e ricellularizzazione di tessuti biologici*. Tesi di laurea, Politecnico di Milano, 2010/2011.
- [29] Vesely I, *Heart Valve Tissue Engineering*. Circ Res. 2005; 97 : 743-755.
- [30] Spina M, Ortolani F, El Messlemani A, Gandaglia A, Bujan J, Garcia-Honduvilla N et al., *Isolation of intact aortic valve scaffolds for heart-valve bioprosthesis: extracellular matrix structure, prevention from calcification, and cell repopulation features*. J Biomed Mater Res A, 2003; 67(4) : 1338-50.
- [31] Wilcox HE, Korossis SA, Booth C, Watterson KG, Kearney JN, Fisher J et al., *Biocompatibility and recellularization potential of an acellular porcine heart valve matrix*. J Heart Valve Dis, 2005, 14 : 228-236.
- [32] Rieder E, Kasimir MT, Silderhumer G, Seebacher G, Wolner E, Simon P et al.,

- Decellularization protocols 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, 2004, 127 : 399-405.
- [33] Kasimir MT, Rieder E, Seebacher G, et al., *Decellularization does not eliminate thrombogenicity and inflammatory stimulation in tissue-engineered porcine heart valves.* J Heart Valve Dis, 2006; 15 : 278-86
- [34] Bechtel JFM, Müller-Steinhardt M, Schmidtke C, Brunswik A, Stierle U, Sievers HH, *Evaluation of the Decellularized Pulmonary Valve Homograft (SynerGraft).* J Heart Valve Dis, 2003; 12 : 734-40.
- [35] Mol A, Rutten MCM, Driessen NJB, Bouten CVC, Zund G, Baaijens FPT, Hoerstrup SP, *Autologous Human Tissue-Engineered Heart Valves Prospects for Systemic Application.* Circulation, 2006; 114 [suppl I] : I-152-I-158.
- [36] Schmidt D, Mol A, Neuenschwander S, Breymann C, Gössi M, Zund G, Turina M, Hoerstrup SP, *Living patches engineered from human umbilical cord derived fibroblasts and endothelial progenitor cells.* Eur J Cardiothorac Surg., 2005; 27(5) : 795-800.
- [37] Talman EA, Boughner DR, *Glutaraldehyde fixation alters the internal shear properties of porcine aortic heart valve tissue.* Ann Thorac Surg 1995; 60 : 369-373.
- [38] Salern M, Mauguen Y, Prangé T, *Revisiting glutaraldehyde cross-linking: the case of the Arg-Lys intermolecular doublet.* Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2010 ; 66 : 225-228.
- [39] Vesely I, Boughner D, *Analysis of the bending behaviour of porcine xenograft leaflets and of natural aortic valve material: bending stiffness, neutral axis and measurements.* J Biomech., 1989; 22(6-7) : 655-71.
- [40] Human P, Zilla P. *The possible role of immune responses in bioprosthetic heart valve failure.* J Heart Valve Dis 2001;10(4) : 460-6.
- [41] Bodnar E, Olsen EG, Ross DN, *Observations on glutaraldehyde-treated heterologous cardiac valves.* Thorax, 1979, 34 : 794-800.
- [42] Zilla P, Weissenstein C, Human P, Dower T, von Oppell UO, *High glutaraldehyde concentrations mitigate bioprosthetic root calcification in the sheep model.* Ann Thorac Surg, 2000; 70 : 2091-2095.
- [43] Schoen FJ, Levy RJ, *Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention.* Ann Thorac Surg 2005; 79 : 1072-80.
- [44] Johnston TP, Webb CL, Schoen FJ, Levy RJ. *Site-specific delivery of ethanehydroxy diphosphonate from refillable polyurethane reservoirs to inhibit bioprosthetic tissue calcification.* J Control Release 1993; 25 : 227- 40.
- [45] Bailey M, Xiao H, Ogle M, Vyavahare N, *Aluminum chloride pretreatment of elastin inhibits elastolysis by matrix metalloproteinases and leads to inhibition of elastin-oriented calcification.* Am J Pathol, Dec; 159(6) : 1981-6.
- [46] Chen W, Schoen FJ, Levy RJ, *Mechanism of Efficacy of 2-Amino Oleic Acid for*

- Inhibition of Calcification of Glutaraldehyde-Pretreated Porcine Bioprosthetic Heart Valves.* Circulation, 1994; 90(1) : 323-9
- [47] Kim KM, *Cells, rather than extracellular matrix, nucleate apatite in glutaraldehyde-treated vascular tissue.* J Biomed Mater Res, 2002 15; 59(4) : 639-45.
- [48] Vyavahare NR, Hirsch D, Lerner E, et al. *Prevention of calcification of glutaraldehyde-crosslinked porcine aortic cusps by ethanol preincubation: mechanistic studies of protein structure and water-biomaterial relationships.* J Biomed Mater Res 1998; 40 : 577– 85.
- [49] Borch RF, Bernstein MD, Durst HD, *The cyanohydrinborate anion as a selective reducing agent.* J Am Chem Soc. 1971, 93 : 2897-2904.
- [50] Grimm M, Grabenwoger M, Eybl E, Moritz A, Bock P, Muller MM, Wolner E, *Improved biocompatibility of bioprosthetic heart valves by L-glutamic acid treatment.* J. Card. Surg, 1992; 7 : 58-64.
- [51] Nimni ME, *The cross-linking and structure modification of the collagen matrix in the design of cardiovascular prosthesis,* J Card Surg, 1988; 3 : 523-533.
- [52] Raxworthy MJ, Lachs CM, Wood EJ, *Mechanical strength of glutaraldehyde crosslinked collagen suitable for use as a dermal implant.* Brit J Dermatol, 1988; 118 : 290.
- [53] Golomb, G, Ezra V, *Prevention of bioprosthetic heart valve tissue calcification by charge modification: effects of protamine binding by formaldehyde,* J Biomed Mater Res. 1991; 25 : 85-98.
- [54] Vasudev SC, Chandy T, Sharma CP, *The antithrombotic versus calcium antagonistic effects of polyethylene glycol grafted bovine pericardium,* J Biomater Appl, 1999. 14:48-66.
- [55] Park D, Lee WK, Yun JY, Han DK, Kim SH, Kim YH, Kim HM., Kim KT, *Novel anti-calcification treatment of biological tissues by grafting of sulphonated poly(ethyleneoxide),* Biomaterials, 1997; 18 : 47-51.
- [56] Chanda, J., Kuribayashi, R., Abe, T., *Heparin in calcification prevention of porcine pericardial bioprostheses,* Biomaterials, 1997; 18:1109-1114.
- [57] Chanda J, *Anticalcification treatment of pericardial prostheses,* Biomaterials, 1994; 15 : 465-469.
- [58] Westaby, S., Bianco, R. W., Katsumata, T., Termin, P., *The Carbomedics "Oxford" Photofix stentless valve (PSV),* Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg., 1999; 11:206-209.
- [59] Schoen FJ, *Pathologic findings in explanted clinical bioprosthetic valves fabricated from photooxidized bovine pericardium.* J Heart Valve Dis, 1998; 7(2) : 174-9.
- [60] Lee JM, Pereira CA, Kan LWK, *Effect of molecular structure of poly(glycidyl ether) reagents on crosslinking and mechanical properties of bovine pericardial xenograft materials.* J Biomed Mater Res. 1994; 28 (9) : 981-992;
- [61] Van Wachem PB, Brouwer LA, Zeeman R, Dijkstra PJ, Feijen J, Hendriks M, Cahalan PT, Van Luyn MJ, *In vivo behavior of epoxy-crosslinked porcine heart valve cusps and walls.* J Biomed Mater Res, 2000; 53 : 18-27

- [62] Petite H, Rault I, Huc A, Menasche P, Herbage D, *Use of acyl azide method for crosslinking collagen-rich tissues such as pericardium*, J Biomed Mat Res, 1990; 24 : 179-187.
- [63] Santagada V, Caliendo G, Peptidi e peptidomimetici. *Progettazione. Sintesi e caratterizzazione. Applicazione di nuove strategie sintetiche (chimica combinatoriale, microonde)*. Piccin, 2003.
- [64] Anselme K, Petite H, Herbage D, Abstract: *Inhibition of calcification in vivo by acyl azide cross-linking of a collagen-glycosaminoglycan sponge*. 1992; 12(4) : 264-273.
- [65] Olde Damink LHH, Dijkstra PJ, van Luyn LJA, van Wachem PB, Nieuwenhuis P, Feijen J, *Cross-linking of dermal sheep collagen using a water-soluble carbodiimide*. Biomaterials, 1996; 17 : 765-773.
- [66] Girardot JM, Girardot MN, Abstract: *Amide cross-linking: an alternative to glutaraldehyde fixation*. J Heart Valve Dis, 1996; 5(5) : 518-25.
- [67] Everaerts F, Torrianni M, van Luyn M, van Wachem P, Feijen J, Hendriks M, *Reduced calcification of bioprostheses, cross-linked via an improved carbodiimide based method*. Biomaterials, 2004; 24 : 5523-5530.
- [68] Yoo JS, Kim YJ, Kim SH, Choi SH, *Study on Genipin: A New Alternative Natural Crosslinking Agent for Fixing Heterograft Tissue*. Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2011; 44 : 197-207
- [69] Sung HW, Chang WH, Ma CY, Lee MH, *Crosslinking of biological tissues using genipin and/or carbodiimide*. J Biomed Mater Res. 2003 1;6 4A(3) : 427-38.
- [70] Sung HW, Chena CN, Changb Y, Liang HF, *Biocompatibility study of biological tissues fixed by a natural compound (reuterin) produced by Lactobacillus reuteri*. Biomaterials, 2002; 23(15) : 3203-14.
- [71] Gallo M, Naso F, Poser H, Rossi A, Franci P, Bianco R, Micciolo M, Zanella F, Cucchini U, Aresu L, Buratto E, Busetto R, Spina M, Gandaglia A, Gerosa G, *Physiological performance of a detergent decellularized heart valve implanted for 15 months in Vietnamese pigs: surgical procedure, follow-up, and explant inspection*. Artif Organs. 2012; 36(6) : E138-50.
- [72] Dong X, Wei X, Yi W, Gu C, Kang X, Liu Y, Li Q, Yi D, *RGD-modified acellular bovine pericardium as a bioprosthetic scaffold for tissue engineering*. J Mater Sci Mater Med. 2009; 20(11) : 2327-36.
- [73] Jordan JE, Williams JK, Lee SJ, Raghavan D, Atala A, Yoo JJ, *Bioengineered self-seeding heart valves*. J Thorac Cardiovasc Surg. 2012; 143(1) : 201-8.

Sitografia

- [74] <http://www.escardio.org/>
- [75] http://it.wikipedia.org/wiki/Valvola_cardiaca
- [76] <http://www.sts.org/national-database>
- [77] <http://www.edwards.com/products/transcathetervalve/>
- [78] <http://www.medtronic.com/corevalve/>
- [79] <http://en.wikipedia.org/wiki/Glutaraldehyde>
- [80] http://homepages.uconn.edu/~mb2225vc/MCB_2225/Fixation.html
- [81] http://it.wikipedia.org/wiki/Glicole_polietilenico
- [82] <http://en.wikipedia.org/wiki/Heparin>
- [83] <http://en.wikipedia.org/wiki/Chitosan>
- [84] <http://en.wikipedia.org/wiki/Epoxide>
- [85] <http://it.wikipedia.org/wiki/Azoturo>
- [86] <http://en.wikipedia.org/wiki/Carbodiimide>