



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

TESI DI LAUREA IN
INGEGNERIA BIOMEDICA

(Laurea triennale DM 270/04)

DETERMINAZIONE DI DETERGENTI
RESIDUI IN VALVOLE BIOLOGICHE
DECELLULARIZZATE

Relatore: Prof.ssa Monica Dettin

Laureando: SIMONE FACCIOLI

ANNO ACCADEMICO 2012 – 2013

A mamma e papà.

A Giulia.

A tutta la famiglia e agli amici.

Per l'affetto, l'aiuto e la comprensione.

Riassunto

Ad oggi, il principale trattamento delle valvulopatie cardiache è costituito dalla sostituzione chirurgica della valvola patologica tramite l'utilizzo di protesi meccaniche o biologiche. La decellularizzazione è stata proposta come un trattamento alternativo nella preparazione del tessuto biologico, riducendo l'antigenicità del tessuto e, potenzialmente, inibendo o rallentando la calcificazione, principale causa di fallimento delle bioprotesi. Tuttavia, è stata evidenziata un'incompleta tolleranza immunologica dei tessuti così trattati, associata all'insorgenza di fenomeni infiammatori degenerativi, innescati, tra le varie cause, dalla presenza di residui cellulari reattivi, e dal permanere nel tessuto dei detergenti adoperati per la rimozione della componente cellulare eterologa.

Il presente lavoro di tesi cerca di quantificare per via cromatografica la permanenza di tracce di detergenti in valvole sottoposte a distinti protocolli di decellularizzazione. In particolare, sono stati investigati trattamenti che implicano l'impiego di detergenti anionici, quali desossicolato di sodio (SDC), sodio dodecil solfato (SDS), colato di sodio (COL) e taurodesossicolato di sodio (TDOC).

E' stato evidenziato come i detergenti anionici impiegati nei protocolli analizzati effettivamente permangono nella matrice, e in quantità diverse a seconda del metodo, anche dopo i numerosi lavaggi atti a rimuoverli.

Indice

INTRODUZIONE	1
Capitolo 1 - Le protesi valvolari cardiache	3
1.1 LE VALVOLE CARDIACHE.....	3
1.2 LE PROTESI MECCANICHE.....	6
1.3 LE BIOPROTESI.....	8
1.3.1 Sostituti valvolari percutanei.....	11
1.3.2 Ingegneria tessutale.....	12
1.4 PROTESI A CONFRONTO: PRO E CONTRO.....	14
1.5 LA CALCIFICAZIONE.....	16
1.5.1 Prevenzione.....	17
1.5.2 Glutaraldeide e altri fissativi.....	18
Capitolo 2 - La decellularizzazione	21
2.1 LA DECELLULARIZZAZIONE.....	21
2.1.1 I detergenti ionici.....	22
2.1.2 I detergenti non-ionici.....	23
2.2 I “NOSTRI” METODI DI DECELLULARIZZAZIONE.....	24
2.3 DETERGENTI RESIDUI.....	24
Scopo della tesi	26
PARTE SPERIMENTALE	27
Capitolo 3 - Materiali e metodi	27
3.1 MATERIALI.....	27
3.1.1 I reagenti.....	27
3.1.1.1 I detergenti.....	27
3.1.2 Strumentazione di laboratorio.....	28
3.1.2.1 High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	28
3.1.2.2 Analizzatore di massa.....	28

	Indice
3.1.2.3 Spettrofotometro	28
3.2 METODI	29
3.2.1 Preparazione digeriti	29
3.2.2 Protocolli di decellularizzazione	30
3.2.2.1 Metodi Tricol e Tritdoc	30
3.2.2.2 Metodo Dohmen	31
3.2.2.3 Metodo Haverich	31
3.2.3 Spettroscopia di assorbimento UV/Vis	31
3.2.4 Analisi cromatografica	32
3.2.5 Analisi di massa	33
3.3 PARTE SPERIMENTALE	35
3.3.1 Scelta del metodo	35
3.3.2 Saggio con blu di metilene	36
3.3.3 Processo cromatografico	36
Capitolo 4 - Risultati e discussioni	39
4.1 CROMATOGRAMMI	39
4.2 RETTE DI TARATURA	42
4.3 CAMPIONI	44
4.4 ANALISI DI MASSA	46
4.5 DISCUSSIONE	47
CONCLUSIONI	50
ABBREVIAZIONI	51
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	52

Introduzione

Il cuore è la “pompa” del corpo umano, il motore centrale della circolazione del sangue, la cui funzione è irrorare tutti i distretti, centrali e periferici, dell'organismo, portando nutrimento e ossigeno alle cellule: un organo senza il quale non sarebbe possibile vivere.

Svariate sono le malattie che lo bersagliano, compromettendone la funzionalità e mettendo a rischio, quindi, la vita stessa dell'essere umano. Tra queste ci sono le lesioni valvolari, che possono causare sia un restringimento della valvola (*stenosi*), sia un'insufficienza consistente nell'impossibilità delle valvole di chiudersi completamente (*prolasso*).

Un possibile rimedio consiste nella sostituzione chirurgica della valvola.

Le protesi valvolari cardiache vengono genericamente classificate in meccaniche, le quali sono costituite principalmente di metallo rivestito di carbonio pirolitico, e in bioprotesi, costituite da componenti biologici. Queste ultime, affinché possano essere impiantate nel paziente, devono essere trattate con diverse sostanze, per rimuovere le componenti cellulari ed evitare problemi immunologici post-impianto (ad esempio il cosiddetto “rigetto”).

Un fissativo chimico molto utilizzato per la preparazione di bioprotesi è la glutaraldeide, la quale è in grado di diminuire l'antigenicità del sostituto (induzione nell'organismo della produzione di anticorpi specifici), e di aumentare la resistenza del tessuto per quanto riguarda l'integrità e la durata del collagene: purtroppo la glutaraldeide è citotossica e costituisce un problema nel caso in cui venga deassorbita dalla protesi. La progressiva degenerazione dei tessuti, in particolare a causa del verificarsi di calcificazioni distrofiche, rappresenta, poi, ancora un grosso limite per l'uso clinico di protesi valvolari biologiche.

Diversi trattamenti sono stati testati per eliminare o ritardare la calcificazione, ma nessun metodo è ancora risultato abbastanza efficace.

La decellularizzazione è solitamente la prima fase nell'elaborazione del tessuto biologico delle protesi cardiovascolari. In teoria, la rimozione degli elementi cellulari non solo riduce l'antigenicità del tessuto, ma potenzialmente inibisce e rallenta anche la calcificazione, eliminando i focolai iniziali di depositi di calcio nelle membrane e nei detriti cellulari. La decellularizzazione può essere conseguita con processi fisici, chimici o enzimatici. Tra i più comunemente usati, ci sono quelli basati sull'utilizzo di detergenti quali

il *sodio dodecil solfato* (SDS), il *desossicolato di sodio* (SDC), *Triton X100*, il *colato di sodio* (COL), il *taurodesossicolato di sodio* (TDOC).

In letteratura manca, tuttavia, un confronto diretto tra i metodi che utilizzano diversi detergenti. Non è quindi semplice individuare quale detergente sia il più efficace nel rimuovere le componenti cellulari, quale rimanga nel tessuto in concentrazione minore, quale permetta la ricolonizzazione cellulare.

Lo studio riportato in questo elaborato cerca di colmare, almeno in parte, questa lacuna, determinando, per la prima volta, le concentrazioni residue di alcuni dei detergenti più usati nella decellularizzazione valvolare, direttamente nello *scaffold* della valvola.

Dopo un excursus introduttivo sulle varie protesi valvolari, sul trattamento di fissazione e sui meccanismi di calcificazione (Capitolo 1), dopo un'analisi dei metodi di decellularizzazione (Capitolo 2), verrà presentata la parte sperimentale dello studio.

Capitolo 1

Le protesi valvolari cardiache

In questo capitolo, dopo una breve descrizione anatomica e fisiologica delle valvole cardiache, si confronteranno le varie protesi attualmente in commercio, meccaniche e biologiche; successivamente si parlerà del meccanismo di calcificazione, causa principale del fallimento delle protesi biologiche.

1.1 Le valvole cardiache

Il cuore è un organo muscolare cavo che, in seguito a cicli di contrazione e decontrazione, è in grado di spingere il sangue a tutti gli organi e tessuti del corpo. È formato da 4 camere: due atri (destro e sinistro) di forma rotondeggiante, con parete sottile, e due ventricoli (destro e sinistro) di forma più allungata, con pareti più spesse. Tale differenza di spessore è correlata al carico di lavoro svolto; infatti, si possono distinguere:

- una piccola circolazione, in cui il sangue venoso proveniente dal corpo raggiunge l'atrio destro, passa al ventricolo destro e da qui viene spinto ai polmoni per permettere l'ossigenazione;
- una grande circolazione, in cui il sangue ossigenato proveniente dai polmoni viene convogliato all'atrio sinistro, passa al ventricolo sinistro e da qui viene pompato in tutto il corpo.

È evidente che le camere sottoposte a maggior carico propulsivo sono i ventricoli e tra questi in particolare il sinistro che presenta uno spessore normalmente maggiore del destro.

Il cuore, al suo interno, contiene quattro valvole (vedi Figura 1.1):

- due atrio-ventricolari (AV), una *bicuspidè* (o mitrale, posta tra l'atrio sinistro ed il ventricolo sinistro) e una *tricuspide* (tra l'atrio destro ed il ventricolo destro), costituite da 2 e 3 lembi rispettivamente, il cui compito è impedire il flusso retrogrado dagli atri ai ventricoli durante la fase di sistole (contrazione del cuore);
- due semilunari (SL), una *polmonare* (tra ventricolo destro e arteria polmonare) e una *aortica* (tra ventricolo sinistro ed aorta), entrambe con tre lembi a forma di nido di rondine, impediscono il riflusso dall'aorta e dalle arterie polmonari verso i ventricoli, durante la fase di diastole (rilassamento).

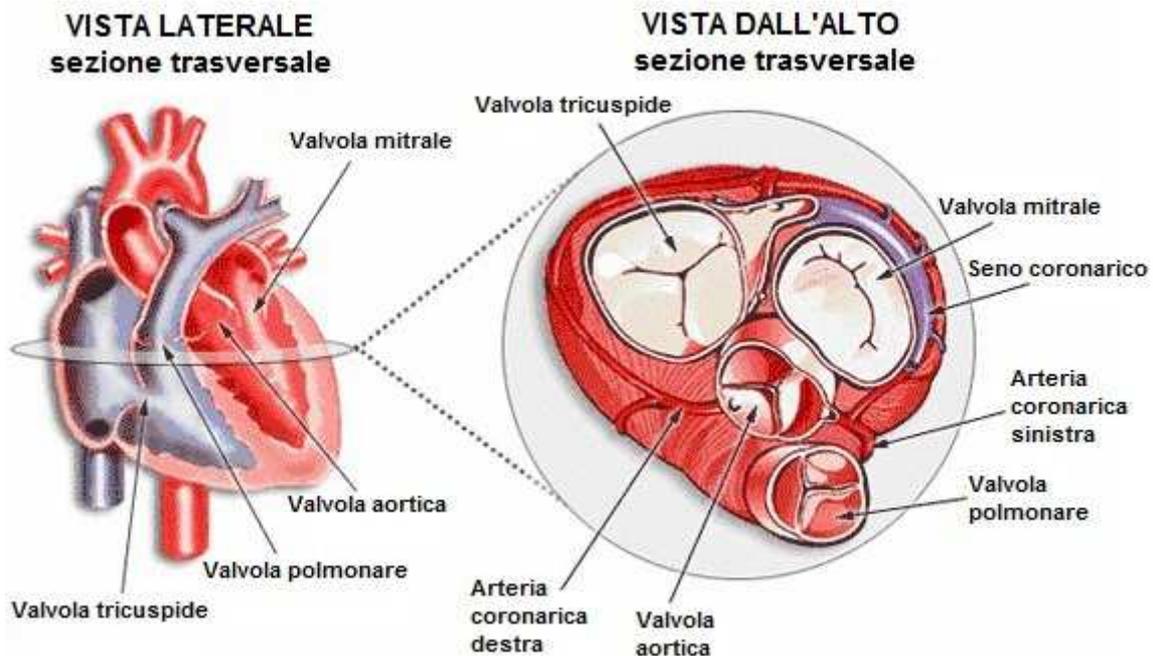


Figura 1.1 Struttura interna del cuore nella quale sono visibili le quattro valvole: tricuspide, mitrale, aortica e polmonare.

Una valvola è un “dispositivo di otturazione applicato ad una luce di efflusso che consente la chiusura di questa e, in generale, la regolazione della portata del fluido che l’attraversa”^[1].

Quelle cardiache, in questo caso, rendono possibile il passaggio unidirezionale anterogrado del sangue nei vasi e nel cuore, e sono determinanti nel dare il carattere ritmico al flusso ematico. Sono costituite da lembi sottili, flessibili e molto resistenti, di tessuto fibroso rivestito di endotelio, saldamente ancorate agli anelli valvolari.

Queste valvole vengono chiuse, e aperte, passivamente: la chiusura si verifica quando vi è un gradiente pressorio che spinge il sangue indietro, l’apertura nel caso opposto.

Le valvole AV sono normalmente aperte. Quando un ventricolo si contrae, tuttavia, la pressione del sangue costringe le cuspidi di una valvola AV a incontrarsi e a chiudere la valvola. La forza del sangue è spesso paragonata ad un forte vento che può causare l’aprirsi e il chiudersi di un ombrello. Ai lembi delle valvole AV si inseriscono, per mezzo delle corde tendinee, i muscoli papillari. Essi si contraggono simultaneamente alle pareti ventricolari, ma in contrasto a quanto ci si potrebbe aspettare, non aiutano le valvole a chiudersi. La loro funzione è invece quella di tirare i lembi delle stesse internamente verso i ventricoli al fine di prevenire un rigonfiamento troppo consistente verso gli atri.

Le valvole SL funzionano in maniera diversa. Esse sono normalmente chiuse: la contrazione di un ventricolo le apre, mentre quando questo si rilassa, il sangue nell’arteria spinge all’indietro, chiudendo la valvola. Gli alti valori pressori nelle arterie al termine della

sistole ventricolare fanno sì che queste valvole si chiudano di scatto e non in maniera dolce come quelle AV. Inoltre, a causa delle più ridotte aperture, la velocità di eiezione del sangue è molto più alta di quella presente nelle valvole AV, dove l'apertura è più larga. A causa poi della rapida chiusura e della più rapida eiezione, i margini delle valvole SL sono sottoposti ad una maggiore abrasione meccanica. Infine, le valvole SL non sono sostenute da corde tendinee.

E' possibile che una o più valvole del cuore non funzionino come dovrebbero; questo può essere dovuto a diverse cause: una valvola può essere strutturalmente anormale fin dalla nascita, e necessitare di riparazione o sostituzione più o meno immediata, oppure esistono malattie come la febbre reumatica, o infezioni batteriche che causano cicatrici o la distruzione totale delle valvole stesse (come ad esempio nell'endocardite batterica acuta). Il processo di invecchiamento di per sé, può causare l'indurimento e la calcificazione dei foglietti valvolari, o anche la loro rottura, a causa dell'enorme numero di volte che una valvola deve aprirsi e chiudersi durante il ciclo vitale. Infatti, il cuore batte circa 100.000 volte al giorno, e quindi le valvole si devono aprire, richiudere e resistere alla pressione del sangue alcune centinaia di milioni di volte durante la vita di ogni persona. Le valvole aortica e mitralica sono le più frequentemente colpite dai processi degenerativi, mentre la valvola tricuspide può essere danneggiata da un anormale aumento di pressione causato dalla disfunzione di altre valvole. Più raramente, anche la valvola polmonare può degenerare, anche se in genere questo accade in conseguenza di una anomalia già presente alla nascita. Quando una valvola si inspessisce ed indurisce a causa di qualche malattia, la valvola cessa di aprirsi in modo corretto ed il sangue fatica a passare (*stenosi*); quando invece una valvola si indebolisce ed i suoi foglietti vengono stirati, potrebbe non chiudersi più correttamente ed il sangue che l'ha attraversata tende a ritornare indietro (*insufficienza o prolasso*). Molto spesso, stenosi e insufficienza coesistono, in diversa entità, sulla stessa valvola, causando la *stenoinsufficienza*.

Tutti i tipi di disfunzione valvolare aumentano di molto il carico lavorativo del cuore, che tende a dilatarsi per compensare. Quando il cuore non riesce più a funzionare correttamente subentra lo scompenso cardiaco, ed infine un danno irreversibile al muscolo cardiaco. Le malattie che colpiscono le valvole cardiache si definiscono *valvulopatie*, ed il loro trattamento risolutivo è generalmente chirurgico. La terapia farmacologica ha, infatti, solo il compito di rallentare la progressione e controllare i sintomi, in modo tale che il paziente possa arrivare all'intervento chirurgico nelle migliori condizioni di stabilità clinica. Quando una valvola è talmente danneggiata da non essere riparabile, è necessario sostituirla.

La vecchia valvola viene quindi rimossa e la nuova valvola artificiale viene saldamente ancorata al suo posto.

Vi sono diversi tipi di protesi valvolari a disposizione del chirurgo, anche se principalmente tutte possono essere classificate in due grandi categorie: le valvole biologiche e le valvole meccaniche.

Le protesi valvolari vengono utilizzate da oltre 50 anni, e differiscono tra loro per diverse caratteristiche: il profilo emodinamico, la durata, l'effettiva area orificiale e la trombogenicità.

Nel mondo il numero di protesi impiantate è intorno a 250.000 all'anno, con un incremento annuale del 5-7%. Questa statistica evidenzia l'importanza che attualmente è associata alla ricerca di tecniche sempre più innovative nell'ambito dei sostituti valvolari e delle metodologie di intervento; lo scopo è migliorare il decorso post-operatorio ed eliminare la necessità di ulteriori operazioni chirurgiche dovute alla limitata durata delle protesi attualmente in uso ^[2-4].

1.2 Le protesi meccaniche

Tutte le valvole meccaniche hanno una struttura di base simile, con tre componenti essenziali: l'occlusore, l'alloggiamento e l'anello di sutura.

L'occlusore è di solito costituito da una o più parti mobili che possono essere una palla (come nelle valvole Starr-Edwards), un disco (flottante libero come nelle valvole Bjork-Shiley) o un foglio a cerniera, che può essere circolare o semicircolare.

L'alloggiamento può comprendere:

- una struttura a gabbia, che aiuta l'occlusore a muoversi guidando e limitando il suo movimento,
- una base, o corpo valvolare, ossia un anello in metallo (lega) o in grafite rivestita di carbonio pirolitico, che supporta la gabbia e fornisce la sede per l'occlusore.

L'occlusore si adatta nell'alloggiamento, il quale ha l'anello di sutura collegato per consentire l'impianto del dispositivo.

L'anello è costituito da tessuti sintetici, con o senza un riempitivo tra i vari strati. Le fibre di tale tessuto, formate per filatura, sono costituite, nella maggior parte delle protesi oggi in commercio, da polietilentereftalato, un poliestere a basso peso molecolare. Il Dacron, nome commerciale del polimero, è resistente e deformabile, generalmente considerato biostabile, caratterizzato dall'orientamento regolare delle catene.

Come precedentemente suggerito, le protesi meccaniche possono essere divise in tre categorie in base alla forma dell'otturatore (vedi Figura 1.2):

- a palla in gabbia;
- a disco oscillante;
- a doppio emidisco (*bileaflet*).

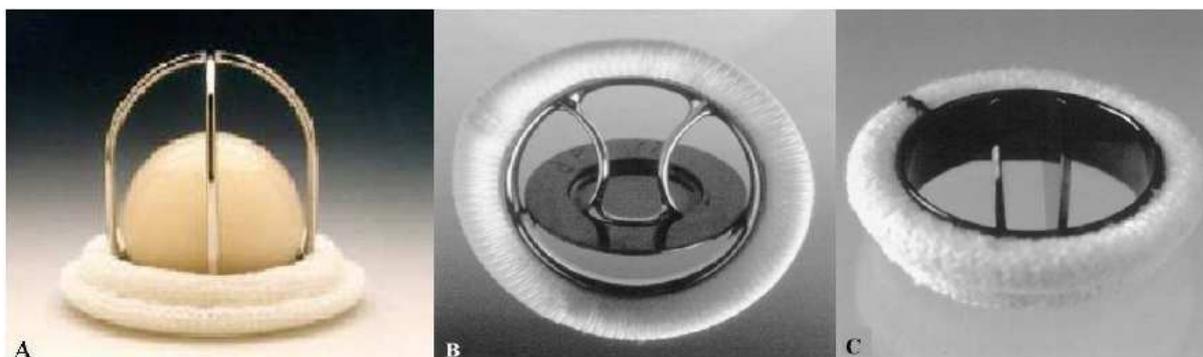


Figura 1.2 Modelli di valvole cardiache meccaniche: A) *caged-ball* (Starr-Edwards), B) *single-tilting-disk* (Medtronic-Hall), C) *bileaflet-tilting-disk* (St. Jude Medical)

In realtà esisterebbe una quarta tipologia, a disco non oscillante, o a disco in gabbia, ma per la tipologia di flusso e il comportamento generale, la si può considerare assieme a quella della palla in gabbia, essendone una piccola evoluzione. Tuttavia questi due tipi di valvole sono oramai superate poiché ci si è resi conto che causano una distorsione del flusso sanguigno.

Oltre alla forma geometrica dell'otturatore, le varie tipologie si differenziano anche in base al loro modello di flusso: le valvole a palla in gabbia presentano un flusso laterale, mentre quelle con disco inclinabile e le *bileaflet* hanno un flusso centrale (Figura 1.3).

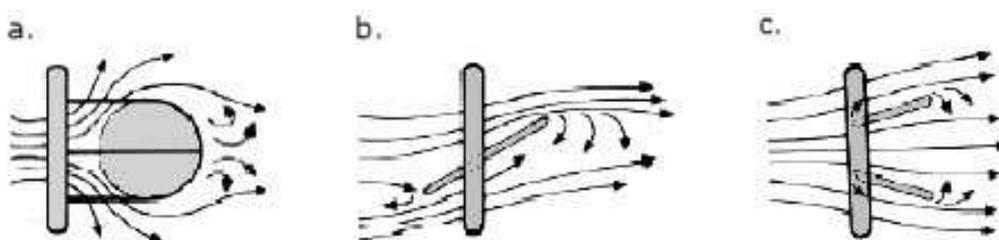


Figura 1.3 Schematizzazione del flusso ematico attraverso i diversi tipi di valvole meccaniche: a) *ball in cage*, b) *single-tilting-disk*, c) *bileaflet-tilting-disk*

Le protesi valvolari meccaniche sono formate principalmente da metallo o da grafite rivestiti di *carbonio pirolitico* (forma allotropica del carbonio con eccellenti doti di biocompatibilità), per aumentarne l'emocompatibilità^[5]. Essendo quindi costituite da materiali sintetici, è dimostrato che sono inevitabilmente trombogene e quindi il loro utilizzo richiede che il paziente segua una terapia anticoagulante a vita. Il maggiore svantaggio di

questo tipo di protesi è quindi dovuto all'alto potenziale di rischio di tromboembolismo, eventi emorragici ed infezioni; inoltre è molto difficile ottenere una valvola meccanica che riproduca fedelmente la forma di una valvola nativa.

Le valvole cardiache protesiche di ogni genere lavorano sul semplice principio di movimento passivo, in cui la chiusura dipende dai gradienti di pressione e dalle variazioni di flusso di sangue nel cuore.

La competenza dei sostituti valvolari si riferisce in generale alla struttura della protesi e, più specificamente, al modo in cui l'occlusore della protesi è disposto. La maggior parte dei dispositivi meccanici hanno un grado minimo di incompetenza (1-5%) costruito per consentire un "contro lavaggio" dei componenti per inibire la trombosi.

Attualmente il 90% delle valvole meccaniche impiantate è del modello a doppio disco che permette un profilo emodinamico più simile a quello fisiologico^[6, 7].

1.3 Le bioprotesi

I sostituti valvolari biologici si possono dividere in categorie in base al tessuto biologico di cui sono costituite:

- *heterograft*, costituiti da tessuto valvolare non umano (ad esempio valvole porcine trattate con aldeidi, o da tessuto pericardico bovino sistemato su un anello di sutura sintetico);
- *homograft*, con tessuto umano rimosso post mortem;
- *autograft*, con tessuto prelevato dai pazienti stessi.

Tutte le valvole protesiche hanno un anello di sutura ricoperto di tessuto che circonda la base della protesi, fornendo il sito di attacco nell'anello valvolare da cui la valvola nativa è stata rimossa.

Le bioprotesi valvolari generalmente imitano il flusso e le proprietà dei materiali della controparte nativa.

Gli interventi con *autograft* prevedono l'espianto della valvola polmonare autologa del paziente che viene impiegata per sostituire la valvola aortica (soggetta a maggiori stress meccanici), mentre in luogo della valvola polmonare viene posizionato un *homograft*.

Con questa tecnica (procedimento di Ross) si sono ottenuti degli ottimi risultati nell'applicazione in bambini e neonati, superiori ai risultati ottenuti con l'impiego di altre protesi aortiche. Le prestazioni emodinamiche si sono rivelate eccellenti; gli eventi tromboembolici sono stati rari, tanto che la terapia anticoagulante non è stata necessaria; il rischio di endocardite è basso. Inoltre, è stato dimostrato che nei bambini e negli adolescenti,

l'*autograft* cresce assieme al paziente^[8]. A causa della complessità tecnica e delle potenziali insidie, nonostante le prestazioni ragguardevoli, l'uso di questa procedura rimane limitato.

Popolare, anche se di limitata disponibilità, è la valvola *homograft* (o *allograft*), costituita da tessuto cardiaco umano prelevato o da cadavere o da donatore vivente (deceduto di morte cerebrale o che ha subito un trapianto cardiaco). Nel caso in cui l'*homograft* sia espianato da cadavere (Figura 1.4), questo viene sterilizzato con antibiotici, sottoposto a crio-preservatione in azoto liquido e conservato a -196°C fino all'intervento (anche per lunghi periodi di tempo). Nel caso di valvole prelevate da donatore vivente, la conservazione avviene a 4°C in un mezzo di cultura con penicillina, e vengono impiantate nel ricevente in tempi molto brevi, generalmente inferiori alle 48 ore. Questo tipo di valvole ha caratteristiche di flusso eccellenti ed un'incidenza estremamente bassa di complicazioni tromboemboliche ed endocarditi post-operatorie. Gli svantaggi di questo tipo di protesi sono la limitata disponibilità, l'alto costo di approvvigionamento e trattamento, e le maggiori richieste tecniche di inserimento rispetto a quelle di altri tipi di protesi^[9, 10].



Figura 1.4 *Homograft aortico prelevato da cadavere*

Le valvole biologiche più comunemente impiantate sono rappresentate dagli *heterograft* (o *xenograft*) fissati con glutaraldeide: sono costituite da tessuti biologici, di solito valvole aortiche porcine o valvole a tre cuspidi ottenute da pericardio bovino. Possono essere preparate applicando il tessuto su di un supporto (*stent*) di metallo o plastica, rivestito di tessuto sintetico, che ha il compito di sostenerlo mantenendo la struttura tridimensionale e di consentire un'applicazione più semplice al cuore. In generale, presentano flusso centrale, caratteristiche emodinamiche buone e hanno il pregio di non provocare alcun fastidioso rumore come può accadere per alcune valvole meccaniche. Il rischio di complicazioni tromboemboliche è basso, quindi, pazienti con una singola valvola bioprotesica non

necessitano di un trattamento anticoagulante, con tutti i conseguenti problemi; purtroppo vi è lo svantaggio del deterioramento del tessuto valvolare. Si è riscontrato che il rischio di cedimento del tessuto cresce con il passare degli anni. La presenza dello *stent* può inoltre causare una maggiore frizione e turbolenza del flusso ematico all'interno della valvola, compromettendone la durata e provocando stenosi residue e calcificazione. Per questi motivi sono state progettate le valvole porcine *stent-less*. In quest'ultime protesi, sono stati eliminati sia l'anello di sutura che lo *stent*. Questi accorgimenti hanno portato un miglioramento delle caratteristiche emodinamiche grazie ad un migliore e più libero scorrimento del sangue. L'impianto di queste valvole, d'altra parte, richiede una tecnica chirurgica più complessa rispetto alle valvole dotate di *stent* ed anello di sutura.

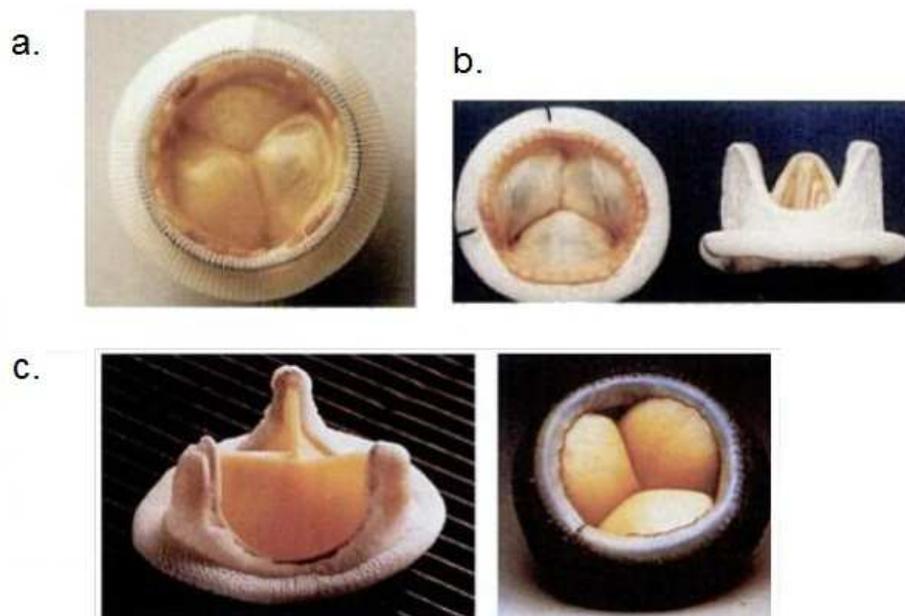


Figura 1.5 Esempi di valvole porcine (a) Hancock e b) Carpentier-Edwards); c) valvole pericardiche bovine (Carpentier-Edwards a destra e Sorin Pericarbon a sinistra)

La cuspidè coronarica destra porcina ha una struttura muscolare di sostegno alla sua base, che tende a promuovere la mineralizzazione precoce e la degenerazione dei tessuti. Per questo motivo, le ultime protesi hanno escluso questo sostegno, oppure la cuspidè coronarica destra è completamente sostituita con una sinistra o con una non coronarica: queste valvole sono comunemente indicate come “valvole composite”.

Negli ultimi 25 anni circa c'è stato lo sviluppo delle bioprotesi in pericardio bovino, trattate sempre con glutaraldeide: queste hanno una migliore emodinamica di quelle suine, e studi hanno dimostrato chiaramente una superiore durabilità degli *heterografts* in pericardio bovino rispetto a quelli porcini. I lembi di pericardio sono suturati esternamente ad un

supporto valvolare, determinando un lume valvolare più ampio di quello delle protesi porcine. Il tessuto viene sottoposto ad un processo di sterilizzazione per rimuovere i *marker* biologici ed eliminare la risposta immunitaria da parte dell'organismo ricevente. Durante il fissaggio con glutaraldeide il pericardio viene deformato in modo da ottenere la geometria finale. Inoltre, le protesi in pericardio hanno la possibilità di essere costruite con un ampio range di diametri poiché non sono vincolate alle dimensioni originarie della valvola, a differenza di quelle porcine^[11-13].

1.3.1 Sostituti valvolari percutanei

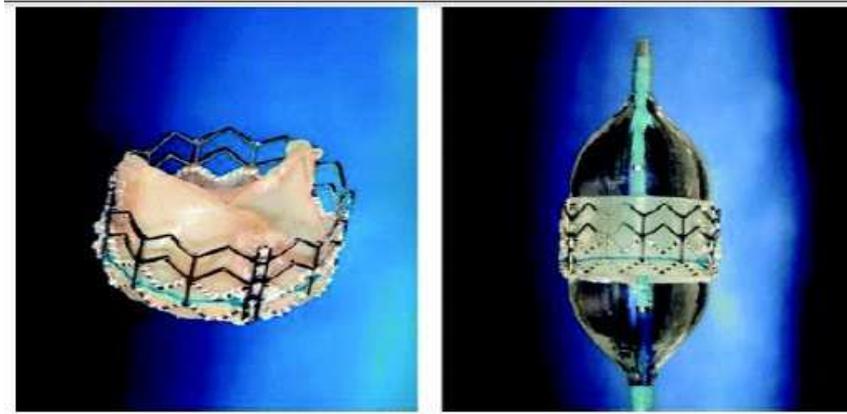
Attualmente a causa dell'invecchiamento della popolazione, per ridurre al minimo il rischio operatorio è cresciuta la necessità di nuove tecniche mini-invasive di riparazione valvolare. Nasce così l'offerta delle *valvole percutanee* (o *transcutanee*). Al momento queste sono ottenute con l'impiego di materiali biologici (il materiale di elezione è il pericardio animale) in struttura a tricuspide: i tre lembi valvolari vengono cuciti o fissati ad uno *stent* circolare, montato su di un catetere per il rilascio, che può essere generalmente di due tipi (Figura 1.6):

- *balloon-expanding*, dove il deposito avviene tramite l'espansione del palloncino che si trova sul catetere;
- *self-expanding*, tramite il ritiro dell'introduttore che guida il dispositivo in posizione e l'auto-espansione dello *stent*.

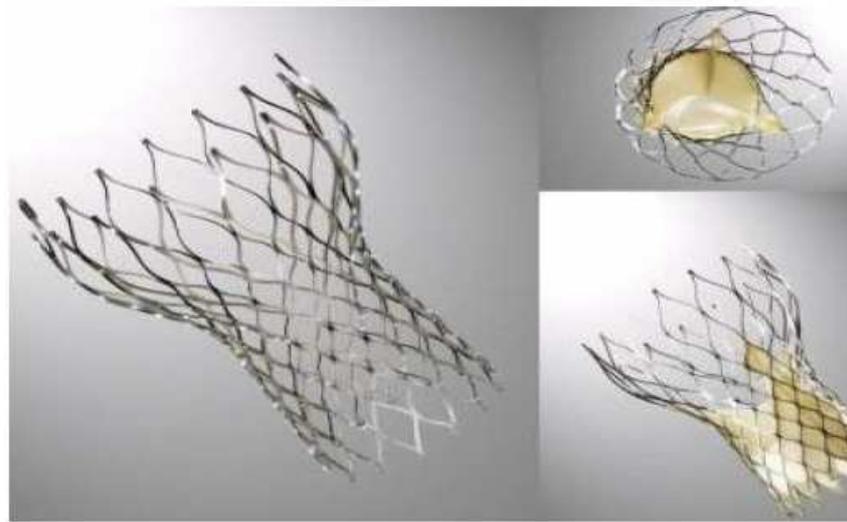
Queste tecniche non prevedono la rimozione della valvola aortica nativa, che viene invece utilizzata come base sulla quale inserire e "fissare" la protesi biologica. Indipendentemente dalla metodologia di rilascio utilizzata, la procedura prevede una iniziale valvuloplastica aortica con pallone, per fornire un passaggio allargato per l'inserimento di un dispositivo valvolare di diametro maggiore^[14, 15]. Per quanto riguarda le modalità di approccio alla valvola, il catetere può essere diretto al cuore attraverso:

- sistema venoso (approccio *anterogrado*), seguendo il verso del flusso sanguigno;
- sistema arterioso (approccio *retrogrado*), in verso opposto al flusso sanguigno;
- incisione dell'apice cardiaco (approccio *trans-apicale*).

Il trattamento percutaneo deve però superare evidenti ostacoli, a causa dei quali non è ancora possibile considerarlo un accettabile sostituto del trattamento chirurgico. La protesi percutanea dovrebbe, infatti, essere disponibile in misure diverse, avere un *design* biocompatibile, e non dovrebbe interferire con le strutture perivalvolari oltre che poter essere rilasciata attraverso cateteri dal lume inferiore.



a)



b)

Figura 1.6 a) valvola Cribier-Edwards, impiantata tramite meccanismo balloon-expanding
 b) Medtronic CoreValve, impiantata secondo il meccanismo di rilascio self-expanding

Allo stato attuale, i limiti principali dei dispositivi sono la durata, la difficoltà di posizionamento e il rischio di migrazione, non essendo suturata al tessuto naturale. E' da sottolineare però il fatto che una procedura chirurgica molto meno invasiva, come quella offerta da questi sistemi, potrebbe determinare un cambiamento sostanziale nelle indicazioni al trattamento di alcune malattie valvolari^[16, 17].

1.3.2 Ingegneria tessutale

L'ingegneria tessutale, o *tissue engineering*, consiste in una serie di tecniche che permettono, attraverso l'utilizzo combinato di materiali, cellule e segnali biochimici, la produzione di tessuti e forse, in un futuro non troppo lontano, di interi organi.

La ricerca attuale, per quanto ci riguarda, si sta muovendo verso lo sviluppo di un tessuto ingegnerizzato equivalente di valvola cardiaca. Due approcci possono essere utilizzati nella creazione di tale tessuto artificiale:

- l'approccio tradizionale, che prevede la semina su un'impalcatura (*scaffold*) *in vitro*, con la presenza di specifici segnali biochimici e biomeccanici prima dell'impianto,
- la rigenerazione guidata dei tessuti, che si basa sulla semina autologa *in vivo*.

Indipendentemente dal metodo adottato, la progettazione di una impalcatura in grado di supportare l'adesione, la proliferazione, la migrazione e la differenziazione delle cellule, la generazione di matrice extracellulare, e in grado di sopportare l'ambiente cardiovascolare, è di fondamentale importanza per il successo del costrutto di ingegneria tissutale.

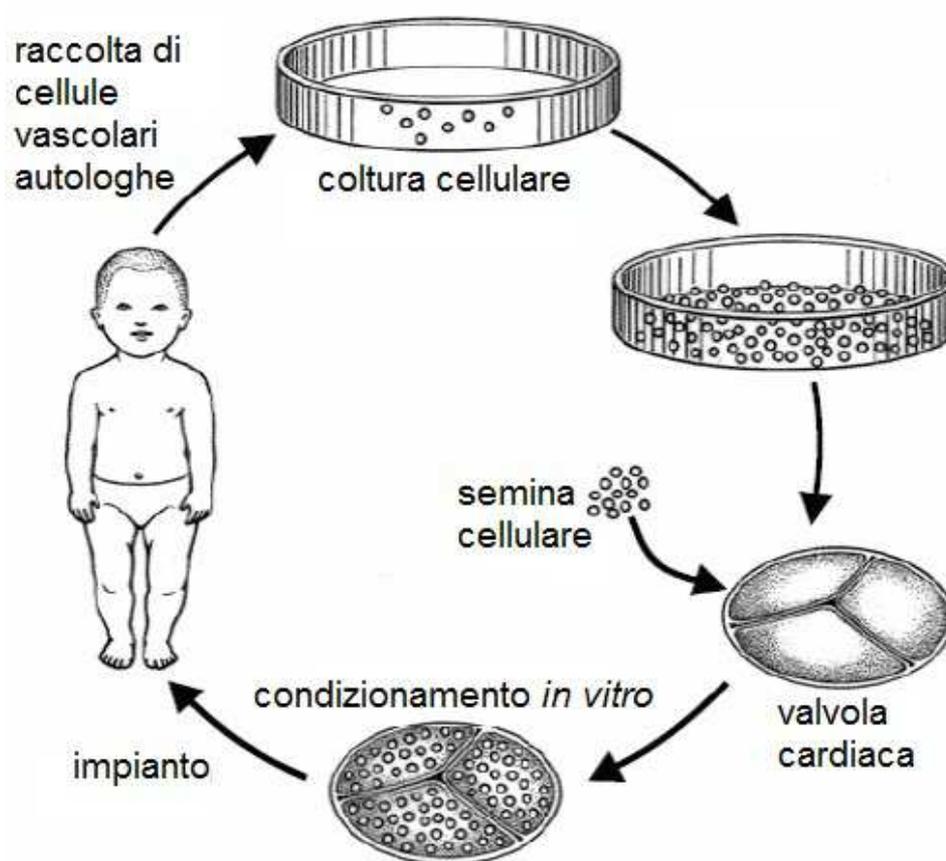


Figura 1.7 Schematizzazione della procedura di costruzione di una valvola cardiaca ingegnerizzata per paziente pediatrico. In questo caso la valvola viene preconditionata con coltura cellulare *in vitro*

È stato teorizzato che una valvola cardiaca ingegnerizzata ideale deve contenere cellule interstiziali rigeneranti per fornire un ricambio alla matrice, cellule endoteliali per fornire fattori antitrombogenici, un'impalcatura idonea con materiale di adeguate proprietà meccaniche e un tasso di degradazione ottimizzato per fornire un mezzo in cui le cellule

interstiziali e endoteliali possano crescere. Per raggiungere tali proprietà la ricerca ha studiato il potenziale dei materiali da varie fonti compresi i materiali sintetici, valvole cardiache decellularizzate e altri materiali biologici.

I polimeri sintetici biodegradabili (come PLA, PGA) offrono una serie di vantaggi rispetto ai materiali biologici: un maggiore controllo sulle proprietà meccaniche e sulle specifiche dei tassi di degradazione, della fabbricazione, della riproducibilità, e su quelle geometriche di progetto; l'acquisizione delle materie prime, la conservazione per periodi di tempo più lunghi, il numero minore di reazioni immunogeniche. Usando tecniche appropriate gli *scaffold* sintetici possono essere adattati per avere specifiche sulla porosità, sulle proprietà meccaniche, e sulla topografia di superficie, che influenzano il comportamento cellulare. Tuttavia, il loro potenziale di indurre una risposta tossica dovuta alla degradazione è una notevole limitazione.

I vantaggi dei materiali biologici, invece, includono la compatibilità con le cellule, una topografia e architettura ad esse familiare, proprietà meccaniche spesso simili al tessuto nativo, l'uso di materiale di derivazione naturale, e la minore probabilità di avviare una risposta immunitaria tossica. La ricerca sugli *scaffold* biologici comprende l'ottimizzazione delle tecniche di isolamento, di sterilizzazione, di conservazione e degradazione dell'impalcatura, la sua caratterizzazione, e le interazioni con le cellule.

I principali materiali biologici indagati per essere utilizzati come *scaffold*, a differenza delle valvole decellularizzate, sono acellulari, quindi non sono richieste tecniche di decellularizzazione aggressive e le conseguenze di una decellularizzazione incompleta non sono un problema. Anche se gli *scaffold* biologici sembrano essere una scelta ottimale, nessun materiale soddisfa tutti i requisiti, in particolare le richieste sulle proprietà meccaniche^[18].

1.4 Protesi a confronto: pro e contro

La ricerca di un sostituto ideale per le valvole ha avuto inizio fin dalla nascita della chirurgia cardiaca. Le caratteristiche essenziali di un dispositivo ideale sono state delineate da Dwight Harken negli anni '50. Queste caratteristiche includono durabilità, assenza di trombogenicità, capacità di fornire una normale emodinamica, assenza di danni agli elementi del sangue, e la praticità tecnica di inserimento in una posizione fisiologica nella circolazione. Ulteriori caratteristiche desiderabili includono resistenza alle infezioni e mancanza di immunogenicità. Se le valvole devono essere utilizzate nei bambini, anche la capacità di crescita deve essere inclusa.

Molte valvole protesiche e biologiche forniscono buone prestazioni di emodinamica, con tassi di rigetto non significativi. Tuttavia, nessuna valvola protesica sarà in grado di soddisfare il criterio di non-trombogenicità, perché una superficie non-trombogenica completamente emocompatibile non è ancora stata individuata.

Tutte le protesi valvolari e bioprotesi rimangono più suscettibili alle infezioni rispetto alle valvole native, una caratteristica che è collegata ai microfilm che coprono la maggior parte delle superfici protesiche impiantate. Le valvole native sono strutture viventi che continuamente rimodellano e riparano le loro biomolecole strutturali (collagene, elastina e GAGs), e poiché nessuna valvola bioprotetica attualmente in uso contiene cellule viventi, o viene ripopolata *in vivo*, queste hanno prevedibilmente una durata limitata. Continua il dibattito sulle cellule di una valvola *homograft*, ma non c'è alcuna prova che queste valvole abbiano cellule viventi interstiziali in grado di eseguire le funzioni di rimodellamento e la riparazione di una valvola normale. Poiché non è ancora disponibile una valvola protesica, bioprotetica o *homograft* che soddisfi tutti questi requisiti, la ricerca continua.

Le bioprotesi hanno una durata abbastanza breve, tra i 10 e i 15 anni (10-20 % delle protesi omologhe e 30 % delle protesi eterologhe), dovuto a fenomeni degenerativi, poiché i tessuti trattati hanno perso la capacità di rigenerarsi e quindi hanno resistenza meccanica limitata, e soprattutto ai fenomeni di calcificazione, che causano disfunzioni (insufficienza o stenosi) tali da necessitare spesso il re-intervento. Per ovviare alla calcificazione e aumentare la durata delle protesi è stato introdotto il trattamento con sostanze anti-calcificanti^[13]. I sostituti valvolari biologici sono da preferirsi nei pazienti anziani o con un'aspettativa di vita inferiore ai 10/15 anni o che non possono affrontare una terapia anticoagulante a vita per problemi o patologie della coagulazione.

Le valvole meccaniche, con rare eccezioni, hanno, invece, una durata media tra i 20 e i 30 anni, che le rende momentaneamente le protesi la cui funzionalità viene meno deteriorata nel tempo. Per questo motivo sono le più utilizzate nei pazienti giovani o con un'aspettativa di vita superiore ai 10-15 anni. Come riportato nel paragrafo §1.2, il loro utilizzo richiede che il paziente segua una terapia anticoagulante a vita.

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.

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. 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 migliore;
- le tecniche chirurgiche e i metodi di fissazione e 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 anticoagulanti;
- 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.

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^[6, 13, 19, 20].

1.5 La calcificazione

La progressiva degenerazione dei tessuti, in particolare a causa del verificarsi di calcificazioni distrofiche, rappresenta ancora un grosso limite per l'uso clinico di protesi valvolari biologiche.

La calcificazione di queste valvole si verifica a causa di processi chimici tra gruppi aldeidici liberi, fosfolipidi e altri componenti con ioni calcio nella circolazione^[21].

La calcificazione del tessuto inizia principalmente all'interno dei residui cellulari devitalizzati. La reazione è essenzialmente dovuta all'attrazione elettrostatica tra gli ioni calcio in circolazione nel liquido extracellulare e i fosfolipidi presenti nelle membrane o altri anioni presenti nei detriti cellulari dei tessuti fissati: tale interazione produce depositi minerali di fosfato di calcio. La calcificazione è accelerata dalla giovane età del ricevente, e da un aumentato stress meccanico. Studi recenti hanno suggerito che la calcificazione patologica sia regolata da fattori induttivi ed inibitori, quali quelli presenti nella fisiologica mineralizzazione dell'osso. La calcificazione può provocare stenosi a causa di un irrigidimento cuspidale. I depositi sono solitamente localizzati nel tessuto cuspidale (calcificazione intrinseca), ma depositi estrinseci alle cuspidi possono svilupparsi in trombi o in vegetazioni endocarditiche (calcificazione estrinseca).

I meccanismi responsabili della calcificazione sono multifattoriali, ma un semplice schema di principio è riportato in Figura 1.8^[22].

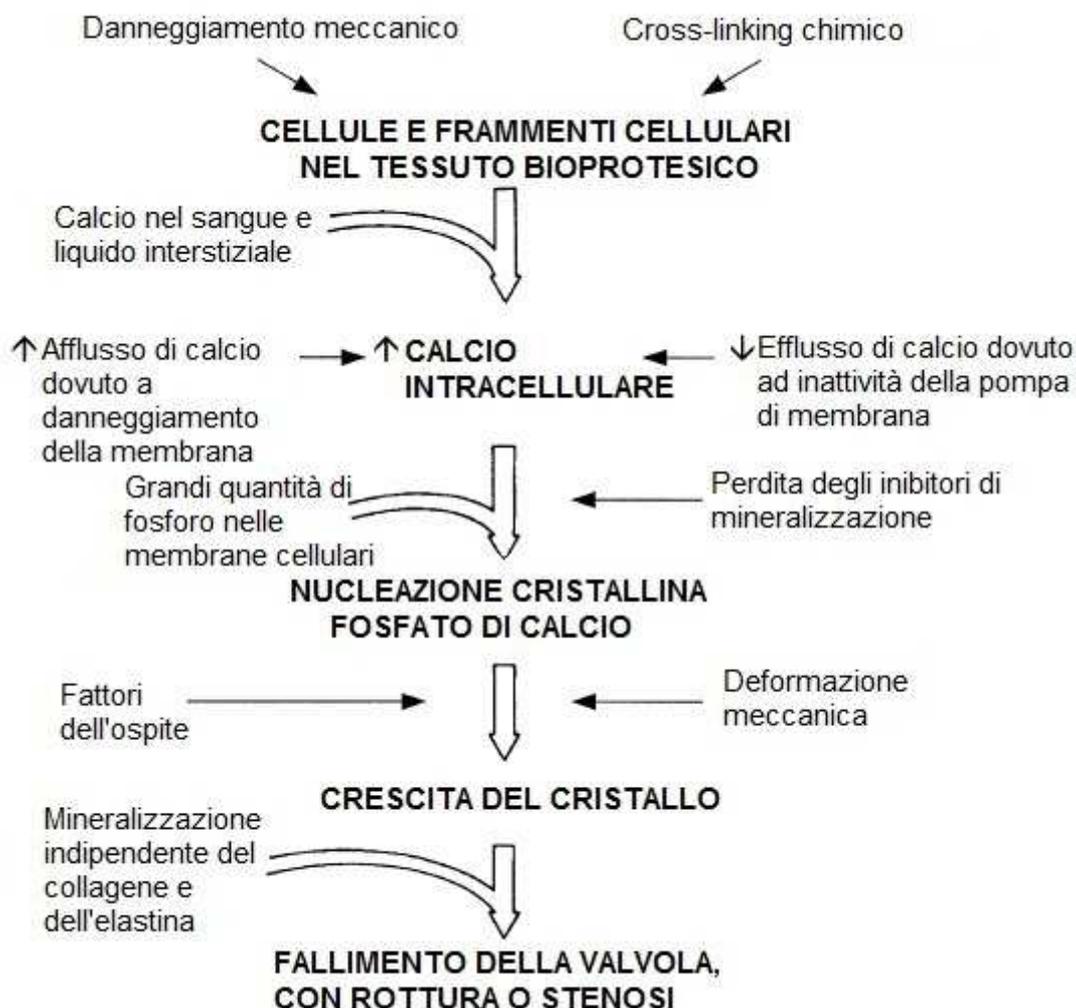


Figura 1.8 Schema di principio del meccanismo di calcificazione.

1.5.1 Prevenzione

Con la calcificazione e la sollecitazione meccanica da apertura e chiusura, la valvola si deteriora col tempo e cessa di funzionare adeguatamente, rendendo necessario un reintervento per la sua sostituzione. Per questo motivo è urgente trovare delle strategie per prevenire la formazione degli accumuli di calcio.

Tre strategie sono state studiate in tal senso:

- la terapia sistemica con agenti anticalcificanti;
- la terapia locale con dispositivi impiantabili di somministrazione di farmaci;
- la modificazione dei biomateriali, come la rimozione di un componente calcificabile, l'aggiunta di un agente esogeno, o l'alterazione chimica.

Uno svantaggio importante nell'uso sistemico di agenti anticalcificanti per prevenire la calcificazione patologica è la conseguente inibizione della formazione ossea fisiologica. Per evitare questo problema, sono stati studiati coimpianti di sistemi di rilascio di farmaci adiacenti alla protesi. Con una somministrazione di farmaco localizzata, la sua concentrazione efficace è limitata al sito dove è necessaria, e gli effetti collaterali sistemici vengono in tal modo evitati. L'approccio migliore progettabile a breve termine comporta la modifica del substrato, sia eliminando o modificando un componente calcificabile, sia legandogli un inibitore. Sono state studiate anche terapie combinate con più agenti che possono fornire una sinergia di effetti benefici per una prevenzione simultanea di calcificazione sia nelle cuspidi sia nella parete aortica, particolarmente vantaggiosa nelle valvole aortiche *stent-less*.

Alcuni composti, come i bifosfonati e gli ioni metallici trivalenti, sono stati approvati dalla *Food and Drug Administration (FDA)* come inibitori della formazione di idrossiapatite, in quanto inibiscono la calcificazione avvelenando la crescita dei cristalli di calcio e stabilizzando i minerali delle ossa; altri composti sono in grado di inibire la diffusione del calcio nelle cuspidi bioprotesiche; altri ancora, come vedremo meglio nel seguito, modificano e rimuovono i materiali calcificabili dal tessuto (etanolo e surfatanti)^[22].

1.5.2 Glutaraldeide e altri fissativi

La glutaraldeide viene utilizzata per il fissaggio di tessuti biologici eterologhi (vedi Figura 1.9), in quanto riduce la loro antigenicità e aumenta la resistenza del tessuto; inoltre, è efficace come agente stabilizzante e sterilizzante. È stato accertato però che proprio il processo di fissazione con glutaraldeide porta alla calcificazione dei tessuti, provocando reazioni infiammatorie e fornendo siti iniziali di deposizione del calcio nella matrice. Inoltre il rilascio di aldeidi risulta citotossico.

Tuttavia, il pretrattamento con glutaraldeide è, ad oggi, il metodo ancora più utilizzato per la preparazione dei tessuti per le valvole cardiache bioprotesiche.

Vari studi hanno comunque indagato su modifiche e alternative al trattamento convenzionale. Alcuni ricercatori hanno cercato di migliorare la fissazione con glutaraldeide o di modificare i tessuti dopo il trattamento con questo composto. Ad esempio, il fissaggio del tessuto bioprotesico (cuspidi e parete aortica) con concentrazioni estremamente elevate di glutaraldeide sembra inibire la calcificazione in impianti percutanei. Tuttavia, il tessuto fissato con queste concentrazioni risulta essere più rigido di quello che dovrebbe essere utilizzato in una bioprotesi clinicamente utile.

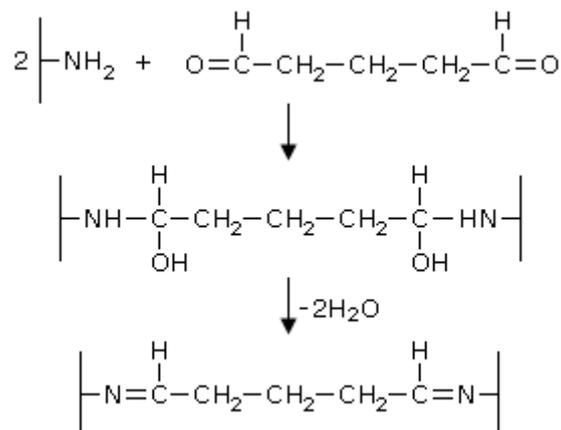


Figura 1.9 Reazione tra glutaraldeide e gruppi amminici laterali del collagene

Per ridurre la reattività dei gruppi aldeidici residui nel tessuto sono stati proposti trattamenti come^[22]:

- agenti riducenti (ad es. boro idruro di sodio, sodio cianoboroidruro);
- agenti che reagiscono con tali gruppi (acido L-glutammico, glicina, L-lisina, diammina);
- agenti che modificano la carica del tessuto (protamina);
- agenti che “mascherano” la superficie con polimeri biocompatibili (ossido di polietilene, polietilene glicole).

Altre strategie hanno proposto di sostituire la glutaraldeide con altri agenti reticolanti^[22]. Ad esempio la reticolazione del tessuto bioprotesico con composti epossidici (carbodiimmidi, acil azide e altri), riduce la calcificazione. In particolare, la reticolazione con epossidi ha suscitato notevole interesse grazie alla mantenuta flessibilità e all'aspetto naturale dei tessuti così trattati^[22]. In un altro processo chiamato *dye-mediated photo-oxidation* (foto-ossidazione mediata con colorante), il tessuto viene incubato in una tintura foto-ossidativa, in seguito viene esposto ad una luce con lunghezza d'onda specifica che viene assorbita dal colorante, causando la reticolazione. La conservazione foto-ossidativa inibisce sperimentalmente la calcificazione della valvola, ma i meccanismi responsabili di questo non sono ben compresi in questo momento. La valutazione clinica di bioprotesi fissate in questo modo, però, non ha fornito risultati soddisfacenti, in quanto si è osservata lacerazione delle cuspidi. Anche se alcune delle strategie alternative di trattamento dei tessuti hanno avuto un successo sperimentale *in vivo* e *in vitro*, la sperimentazione clinica è ancora distante dalla perfezione: è su questa direzione che ci si sta muovendo, alla ricerca di nuovi meccanismi e nuovi composti che migliorino la situazione attuale^[22].

Capitolo 2

La decellularizzazione

In questo capitolo si descriverà il meccanismo di decellularizzazione, in generale e in particolare come protocollo per prevenire la calcificazione.

2.1 La decellularizzazione

La decellularizzazione è stata proposta come un trattamento alternativo nella preparazione del tessuto biologico per protesi cardiovascolari. Essa riduce l'antigenicità del tessuto e, potenzialmente, inibisce o rallenta la calcificazione.

Vari risultati clinici sperimentali hanno dimostrato che, in seguito a decellularizzazione, gli innesti diventano più biocompatibili e, se ulteriormente fissati con glutaraldeide, presentano una maggiore resistenza alla calcificazione^[23].

Oltre a questo, la decellularizzazione è stata utilizzata con successo in una varietà di applicazioni di ingegneria tissutale e di medicina rigenerativa. La rimozione delle cellule da un tessuto o da un organo lascia una miscela complessa di proteine strutturali e funzionali che costituiscono la matrice extracellulare (ECM). Il tipo di *scaffold* ottenuto dalla decellularizzazione cambia a seconda di:

- tessuto di partenza (pericardio, valvola, etc.);
- specie di origine (porcina, bovina);
- metodi di decellularizzazione;
- metodi di sterilizzazione.

Ciascuna di queste variabili influenza la composizione e la struttura della ECM e, di conseguenza, la risposta del ricevente.

Gli antigeni cellulari xenogenici e allogenici sono, per definizione, riconosciuti come estranei dall'ospite e quindi inducono una risposta infiammatoria o un rigetto immuno-mediato del tessuto impiantato. Tuttavia, i componenti della ECM sono generalmente conservati tra specie e sono, nel caso di allotrapianto, ben tollerati dal ricevente.

L'obiettivo di ogni protocollo di decellularizzazione è di rimuovere efficacemente tutto il materiale cellulare, in particolare nucleare, minimizzando qualsiasi effetto negativo sulla composizione, attività biologica, e integrità meccanica della ECM rimanente.

I metodi più efficaci per la decellularizzazione dei tessuti più robusti includono una combinazione di approcci fisici, chimici, ed enzimatici. I trattamenti fisici possono includere agitazione o sonicazione, massaggio meccanico, pressione, congelamento e scongelamento. Questi metodi distruggono la membrana cellulare, rilasciando il contenuto delle cellule, e facilitando la successiva rimozione, tramite lavaggi, dei residui cellulari. Questi trattamenti fisici sono generalmente insufficienti per raggiungere una completa decellularizzazione, e devono quindi essere combinati con un trattamento chimico. I trattamenti enzimatici, come l'uso di tripsina, e i trattamenti chimici, con l'uso di soluzioni ioniche e di detergenti, distruggono le membrane cellulari ed i legami intercellulari ed extracellulari. L'ECM deve essere adeguatamente modificata durante il processo di decellularizzazione per consentire una adeguata esposizione delle cellule agli agenti caotropici e per permettere la rimozione del materiale cellulare. L'obiettivo dei processi di decellularizzazione è minimizzare il danno alla ECM mantenendo le proprietà meccaniche e biologiche native. Il protocollo di decellularizzazione inizia generalmente con la lisi della membrana cellulare mediante trattamenti fisici o soluzioni ioniche, seguita (i) dalla separazione dei detriti cellulari dalla ECM mediante trattamenti enzimatici, e (ii) dalla solubilizzazione dei componenti cellulari citoplasmatici e nucleari mediante detergenti. Nell'ultimo passaggio si ha la rimozione dei detriti dal tessuto. Queste fasi possono essere accompagnate da un'agitazione meccanica per aumentare la loro efficacia. Al termine della decellularizzazione, sarebbe auspicabile che tutti i reagenti chimici residui fossero stati rimossi al fine di evitare fenomeni citotossici o calcificazione.

I reagenti chimici utilizzati nella decellularizzazione comprendono^[24]:

- soluzioni alcaline o acide,
- agenti chelanti,
- detergenti non-ionici,
- detergenti ionici.

2.1.1 I detergenti ionici

I detergenti ionici sono efficaci per solubilizzare le membrane cellulari, sia citoplasmatiche sia nucleari, ma tendono a denaturare le proteine alterando le interazioni proteina-proteina. I detergenti ionici più comunemente utilizzati sono il sodio dodecil solfato (SDS) e il sodio desossicolato (SDC). Il SDS è molto efficace per la rimozione di componenti cellulari dal tessuto. Rispetto ad altri detergenti, il SDS produce una più completa rimozione dei residui nucleari e delle proteine citoplasmatiche, come la vimentina. Il SDS tende a

disgregare la struttura nativa del tessuto, e provoca una diminuzione della concentrazione di GAGs e una perdita di integrità nel collagene; tuttavia, non sembra che il SDS rimuova il collagene dal tessuto^[24]. Il SDS è anche utilizzato da molti anni come agente denaturante delle proteine, per esempio nell'elettroforesi su gel. Anche il SDC è molto efficace per la rimozione di residui cellulari, ma tende a causare una maggiore perturbazione dell'architettura del tessuto nativo rispetto al SDS. Oltre al suo utilizzo da solo, esso è stato combinato con diversi detergenti zwitterionici per la decellularizzazione del tessuto nervoso^[24].

2.1.2 I detergenti non-ionici

I detergenti non-ionici sono stati ampiamente utilizzati in vari protocolli di decellularizzazione a causa degli effetti relativamente lievi sulla struttura del tessuto. Questi detergenti alterano le interazioni lipide-lipide e lipide-proteina, ma lasciano intatte quelle proteina-proteina, in modo che queste possano essere lasciate in una conformazione funzionale.

Il detergente più studiato è il Triton X-100, mostrando risultati contrastanti nella decellularizzazione dei tessuti con esso. Quando utilizzato per decellularizzare una valvola cardiaca, è stata osservata una rimozione completa del materiale nucleare con mantenimento della struttura valvolare. Tuttavia, è stato trovato materiale cellulare nelle pareti adiacenti del miocardio e dell'aorta^[24]. Per quanto riguarda le componenti della ECM, il Triton X-100 ha portato a una quasi completa perdita dei GAGs e a una diminuzione del contenuto di laminina e fibronectina nel tessuto della valvola^[24]. Altri studi hanno mostrato che il Triton X-100 non era completamente efficace nel rimuovere il materiale cellulare da un vaso sanguigno, da tendini o da legamenti. Mediante colorazione istologica è stato trovato del materiale nucleare in tutti i tessuti e la colorazione immuno-istochimica ha mostrato la presenza della proteina del citoscheletro, la vimentina, nel legamento crociato anteriore. Si è constatato che il trattamento con Triton X-100 altera gravemente la resistenza a trazione del tendine rispetto alle fibre di collagene isolate dal tendine. Viceversa, il trattamento con il Triton non ha mostrato alcun effetto sul contenuto di collagene nel legamento. Si sono riscontrati risultati contrastanti anche per quanto riguarda il contenuto di GAGs: completa è la rimozione da una valvola cardiaca, mentre non vi era alcuna differenza nel contenuto di GAGs nel trattamento del legamento crociato^[24]. Sebbene il Triton X-100 possa essere un metodo efficace di decellularizzazione, la sua efficacia dipende dal tessuto decellularizzato e dagli altri agenti con cui è combinato in un certo protocollo di decellularizzazione^[24].

2.2 I “nostri” metodi di decellularizzazione

Nel presente studio sono stati indagati in particolare quattro protocolli di decellularizzazione: Dohmen *et al*^[25, 26], Haverich *et al*^[27], TRICOL e TRITDOC^[28].

Il metodo Dohmen si basa sull'utilizzo di SDC come detergente, mentre il metodo Haverich usa una composizione di SDC e di SDS.

Le metodiche TRICOL (Triton X-100 e COL) e TRITDOC (Triton X-100 e TDOC), prevedono la lisi cellulare del tessuto in ambiente ipotonico, seguita da trattamento con mezzi chimici quali la combinazione di detergenti non ionici (Triton X100) e ionici (colato o taurodesossicolato di sodio), alternanze di soluzioni ipo- e iper-toniche in atmosfera controllata (flusso di azoto) e in presenza di inibitori di proteasi.

Il COL e il TDOC appartengono alla classe dei detergenti ionici che agiscono solubilizzando le membrane nucleari e citoplasmatiche, agendo in particolare sui complessi fosfolipidici e solubilizzando le proteine di membrana. Rimuovono in tal modo i detriti cellulari ancora presenti nel tessuto che hanno resistito all'azione del detergente non ionico. Vengono oltre modo utilizzati in quanto permettono la solubilizzazione dei complessi sfingolipidi-colesterolo determinanti l'insolubilità della fosfatasi alcalina, enzima ritenuto responsabile dell'innescò del processo di calcificazione valvolare.

Considerando la maggiore pericolosità dei detergenti ionici rispetto a quelli non-ionici (dovuta alla denaturazione delle proteine), si è cercato di determinare la quantità di detergente ionico nei campioni considerati, in particolare:

- SDC nel campione Dohmen,
- SDC nel campione Haverich,
- COL nel campione Tricol,
- TDOC nel campione Tritdoc.

2.3 Detergenti residui

I residui chimici ad alte concentrazioni (dell'ordine di 50 mg/L) possono risultare tossici per le cellule dell'ospite. Vi è quindi la necessità di sviluppare saggi per rilevare i livelli di residui dannosi nei materiali utilizzati come bioprotesi. In particolare è stato dimostrato che il SDC può indurre alterazioni istologiche nel tessuto biologico e determinare una diminuzione della vitalità cellulare. È stato inoltre riportato che esso induce una infiammazione locale, aumenta la fibrosi e attiva il sistema immunitario non-specifico favorendo l'infiltrazione di macrofagi, e generando così una risposta immunitaria locale. È

quindi auspicabile una determinazione dei livelli di detergenti anionici nei campioni di tessuto decellularizzati prima dell'applicazione clinica per prevenire possibili danni nei pazienti.

In letteratura si trovano alcuni saggi che cercano di individuare e stimare le quantità di detergenti anionici residui in tessuti che sono stati sottoposti a decellularizzazione. Ad esempio Mathapati *et al*^[29] hanno cercato di determinare, per via colorimetrica attraverso tecniche spettrofotometriche, se e quanto SDC rimane in una vena safena umana: utilizzando una retta di taratura con coefficiente di determinazione $R^2 = 0.882$, è stata stimata una quantità di SDC pari a 16.1 ± 0.37 mg in 20 g di tessuto. Il saggio con blu di metilene utilizzato dagli autori è un metodo molto semplice da eseguire, ma essendo utilizzato sia per quantificare i detergenti anionici quanto per quantificare i GAGs, appare scarsamente selettivo e poco specifico per l'analita in esame.

Lo studio di Caamaño *et al*^[30] ha affrontato la questione della lisciviazione del SDS dai tessuti trattati, mirando a sviluppare un test sensibile per il SDS libero in soluzioni fisiologiche, a stabilire se, e in quali concentrazioni, il SDS libero passa nella soluzione di lavaggio, e a determinare le concentrazioni che esercitano un effetto tossico misurabile sulle colture di cellule vascolari ovine. In tale studio mediante uno spettroscopio ATR-FTIR, è stato dimostrato che il SDS viene deassorbito dal tessuto trattato generando concentrazioni potenzialmente citotossiche, e diffondendosi nell'area circostante l'impianto. È possibile che, se i tessuti trattati vengono lavati più volte e con quantità sufficienti di tampone, la concentrazione di detergente possa diminuire abbastanza per non essere dannosa per il paziente. A tal proposito Cebotari *et al*^[27] hanno misurato le concentrazioni residue di detergenti attraverso la concentrazione del campione con cartucce C-18 e di tecniche cromatografiche (HPLC), e hanno determinato dei protocolli ottimali di lavaggio per i vari detergenti utilizzati. I loro dati hanno mostrato che dopo un certo numero di lavaggi la quantità di detergente nei lavaggi era inferiore alla soglia di tossicità.

Altri studi ancora, come quello di Gratzner *et al*^[31], hanno cercato di sviluppare differenti protocolli di lavaggio per minimizzare la quantità di residui dei detergenti negli *scaffold*, determinando le concentrazioni sulle soluzioni di lavaggio.

Mai nessuno, però, ha cercato o è riuscito a determinare i residui direttamente dai tessuti decellularizzati, verificando l'effettiva non-tossicità e la quantità di detergente che verrebbe impiantata con la protesi.

Scopo della tesi

La decellularizzazione offre la possibilità di abbattere l'antigenicità dello *scaffold* biologico rallentando la calcificazione e allungando così il tempo di vita delle bioprotesi.

I metodi di decellularizzazione proposti differiscono per tipo e numero di detergenti, tempi di trattamento, modalità di lavaggio. Risulta in ogni caso importante, per ogni protocollo, definire l'efficienza nella rimozione dei detergenti antigenici ma anche valutare quale sia la modifica strutturale indotta dalla decellularizzazione che si rifletterà sulle proprietà biologiche e meccaniche della protesi.

È necessario, poi, conoscere la concentrazione dei detergenti che restano intrappolati all'interno dello *scaffold*. Le concentrazioni residue dei detergenti possono infatti risultare citotossiche o indurre infiammazione e quindi calcificazione o, ancora, produrre denaturazione proteica del collagene e impedimento alla ri-colonizzazione cellulare.

Quanto riportato fino ad oggi in letteratura si riferisce a:

- quantificazione del detergente nella matrice con metodi poco selettivi (vedi articolo di Mathapati *et al*^[29]);
- quantificazione del detergente nei lavaggi.

Questa tesi, per la prima volta, propone di determinare la concentrazione residua dei detergenti direttamente nel tessuto previa digestione completa dello stesso con papaina.

La difficoltà nella determinazione deriva dalla grande complessità della miscela del digerito e dall'esiguità del contenuto di analita.

Nel presente lavoro di tesi sono stati messi a confronto quattro metodi di decellularizzazione differenti (Dohmen, Haverich, Tricol e Tritdoc) cercando di determinare, per via cromatografica, la quantità di detergente ionico presente nei campioni decellularizzati con tali protocolli.

Parte sperimentale

Capitolo 3

Materiali e metodi

In questo capitolo, in primo luogo verranno elencati i principali reagenti e gli strumenti utilizzati; quindi, verranno brevemente descritte le diverse metodologie adoperate e, infine, verrà riportata la parte sperimentale.

3.1 Materiali

3.1.1 I reagenti

- Acetonitrile, fornito da Sigma-Aldrich (Steinheim, Germania)
- Acido trifluoroacetico (TFA), fornito da Biosolve (Valkenswaard, Olanda)
- Blu di Metilene, fornito da Carlo Erba (Milano, Italia)
- Cloroformio, fornito da Lab-scan (Dublino, Irlanda)

3.1.1.1 I detergenti

Forniti da Sigma-Aldrich (Steinheim, Germania):

- SDC
 - COL
 - TDOC
 - Triton X-100
 - Igepal
- SDS, fornito da Prolabo (Parigi, Francia)

3.1.2 *Strumentazione di laboratorio*

Per lo sviluppo della parte sperimentale di questo lavoro di tesi si sono utilizzate diverse apparecchiature di laboratorio chimico.

3.1.2.1 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Per la separazione, purificazione ed analisi dei detergenti si è utilizzato il sistema Cromatografico HPLC Waters 600E System Controller, munito di autocampionatore modello 717 e di rivelatore UV/Vis multicanale a lunghezza d'onda programmabile modello 2487. L'acquisizione e l'integrazione dei dati sono state eseguite dal programma Empower (Waters, Milford, MA, U.S.A.).

Nell'analisi cromatografica si è utilizzata una colonna costituita da gel di silice funzionalizzata con catene idrocarburiche lineari di atomi di carbonio (fase stazionaria apolare):

- Colonna Vydac C18 218TP54 Protein&Peptide analitica (5 μm , 300 Å, 4,6 \times 250 mm) fornita da Grace (Columbia, MD, U.S.A.).

Nelle analisi cromatografiche si sono utilizzati due eluenti:

- Eluente A: 0,05% di TFA in acqua MilliQ;
- Eluente B: 0,05% di TFA in acetonitrile.

L'acqua MilliQ utilizzata per le analisi è stata bi-distillata con il distillatore della ditta Cecchinato (Mestre, Italia), de-salificata, e privata dei componenti organici grazie al sistema MilliQ della ditta Waters.

3.1.2.2 Spettrometro di massa

Per l'identificazione dei detergenti utilizzati si sono effettuate diverse analisi di massa.

Le analisi di massa sono state eseguite presso il Dipartimento di Scienze del Farmaco dell'Università di Padova dal Prof. D. Dalzoppo. Lo strumento utilizzato è un ESI-TOF, modello Mariner System 5220 fornito dalla ditta Applied Biosystem (Perkin-Elmer, Massachusetts, USA).

3.1.2.2 Spettrofotometro

Per il saggio con il Blu di Metilene si è utilizzato lo spettrofotometro UV/Vis Lambda 2 fornito da Perkin-Elmer (Massachusetts, USA).

3.2 Metodi

3.2.1 Preparazione digeriti

Nell'esecuzione dello studio sono stati utilizzati tessuti derivati da valvole cardiache polmonari porcine. Il materiale biologico è stato prelevato dagli animali immediatamente dopo il loro sacrificio e trasportato presso il laboratorio all'interno di sacche da organo sterili, in soluzione isotonica di tampone fosfato (PBS) e 0,04% NaN₃ (sodio azide ad effetto batteriostatico, in grado di bloccare la catena respiratoria mitocondriale dei batteri aerobici) a 4°C. Le dovute dissezioni volte all'isolamento delle radici valvolari, sono state effettuate sotto cappa biologica a flusso laminare, con strumenti chirurgici e contenitori sterili.

I tessuti così ottenuti sono posti in soluzione fisiologica e lasciati equilibrare sotto leggera agitazione per 1 ora a 4°C, al fine di rimuovere le tracce ematiche. I campioni sono quindi stati sottoposti a trattamenti decellularizzanti secondo i diversi protocolli a seguito descritti, e destinati alla valutazione dei residui di detergenti.

I condotti valvolari nativi utilizzati come controlli sono stati delipidizzati in preparazione all'analisi HPLC. Questo procedimento mira a rimuovere la componente lipidica delle membrane cellulari, al fine di eliminare il più possibile la produzione di segnali classificati come "rumore di fondo" in grado di sfalsare le indagini strumentali.

La metodica di delipidizzazione prevede un primo *step* in cui il tessuto biologico viene immerso in soluzioni crescenti di etanolo (EtOH), seguite da soluzioni di cloroformio/metanolo in diversi rapporti. L'EtOH richiama l'acqua dalla cellula disidratandola e i solventi organici ne solubilizzano i lipidi di membrana. Un secondo *step* assicura la reidratazione del tessuto, attraverso il passaggio in soluzioni a concentrazioni decrescenti di etanolo ed infine in acqua *overnight*.

I tessuti da analizzare vengono sottoposti a digestione con papaina per degradare l'impalcatura proteica e liberare gli eventuali residui di detergente rimasti all'interno della matrice extracellulare.

Al fine di denaturare parzialmente il collagene e rendere più aggredibile il tessuto da parte dell'enzima, i campioni vengono pesati e successivamente bolliti per 2 minuti in un volume di acqua MilliQ. Si procede quindi aggiungendo il buffer di digestione composto da 0,125M CH₃COONa, 6,25mM EDTA e 6,25mM L-Cys. Vengono effettuate quattro aggiunte di papaina distanziate tra loro di 12 ore. La quantità di enzima da impiegare è tale per cui vige il rapporto enzima/tessuto 1/100. L'ultima aliquota di enzima viene associata a 5% v/v di buffer identico a quello di digestione, ma con L-Cys 100 mM. La digestione avviene a 60°C sotto agitazione continua.

3.2.2 Protocolli di decellularizzazione

3.2.2.1 Metodi Tricol e Tritdoc

Il processo di decellularizzazione dura circa una settimana ed è composto da 6 passaggi fondamentali:

- trattamento con inibitori di proteasi;
- estrazione dei campioni con Triton X-100;
- estrazione dei campioni con detergente ionico;
- eliminazione dei residui di detersivi dal tessuto;
- eliminazione dei residui di acidi nucleici dal tessuto;
- conservazione.

In particolare le valvole vengono sospese per 8 ore a +4°C in una soluzione contenente 10% Tampone A, inibitori di proteasi e 1% Triton X-100. Successivamente la soluzione viene cambiata utilizzando 10% Tampone A, 0,04% NaN₃ e 0,1% di Triton X-100 per ulteriori 8 ore. Le valvole vengono quindi immerse per le successive 16 ore (eseguendo 2 lavaggi di 8 ore ciascuno) in una soluzione ipertonica allo scopo di rimuovere proteine muscolari (actina e miosina) contenente: 10% Tampone A, 0,5M NaCl, 0,04% NaN₃ e 0,1% Triton X-100.

Il passaggio con Triton X-100 termina con un lavaggio di 90 minuti a +4°C in una soluzione contenente 10% Tampone A, 0,1% di Triton X-100 e 0,04% sodio azide, seguito dallo stesso lavaggio a temperatura ambiente (RT). Successivamente le valvole sono sospese e poste in agitazione adeguata in una soluzione contenente 10% Tampone A, 0,04% NaN₃ e, alternativamente, 10mM di colato di sodio a pH 8.0 o 4mM di taurodesossicolato di sodio a pH 7.4. Tali sospensioni vengono mantenute a temperatura ambiente per 16 ore (2 lavaggi da 8 ore ciascuno). Per la rimozione dei detersivi si utilizza una soluzione fisiologica contenente 0,9% NaCl, 0,02% NaN₃ e 10% isopropanolo, per 2 ore a +4°C. Un ulteriore lavaggio, necessario ad eliminare il residuo alcolico di isopropanolo, viene eseguito con una soluzione 0,9% NaCl e 0,04% NaN₃ per 3 ore a RT, seguito da successive 6 ore a 4°C. Un altro lavaggio, di 30 minuti, si effettua nuovamente con 0,9% NaCl e 0,04% NaN₃. Infine i campioni valvolari sono lavati in soluzione sterile di PBS a +4°C, sotto costante agitazione per due cicli da 24 ore ciascuno, garantendo la rimozione dell'enzima residuo.

Tutti gli *step* vengono eseguiti a pH e temperature controllati. Segue infine la rimozione enzimatica dei residui di acidi nucleici mediante endonucleasi aspecifiche ricombinanti come Benzonase™ (Novagen) prive di attività proteasica.

La sterilità dei campioni è garantita dalla manipolazione delle diverse soluzioni effettuata sotto cappa biologica a flusso laminare e dal preventivo filtraggio delle stesse con tramogge di

cut-off 0,22 μm . Come agente batteriostatico viene ad essere nuovamente utilizzato il composto sodio azide (NaN_3).

Durante tutto il processo decellularizzante le radici valvolari con le valvole *in situ* vengono poste sotto costante e moderata rotazione all'interno di tubi in pyrex. Tale sistema permette alle soluzioni utilizzate di effettuare un lavaggio interno del lume valvolare, nei due sensi di flusso. I campioni così ottenuti vengono conservati in una soluzione di PBS e 0,04 % NaN_3 a $+4^\circ\text{C}$.

3.2.2.2 Metodo Dohmen

Il trattamento prevede la sospensione di radici valvolari in soluzione fisiologica sterile, pH 7.4, contenente 1% p/v di desossicolato di sodio (SDC) in costante agitazione per 12 ore a 37°C ed in presenza di antibiotici (1% v/v penicillina/streptomicina). Tale passaggio viene ripetuto 2 volte. I tessuti sono sottoposti a lavaggi estensivi con soluzione 0,9% p/v NaCl sterile: 2 lavaggi al giorno (12 ore ciascuno) per 5 giorni a RT. I campioni vengono quindi conservati in soluzione fisiologica sterile e 0,04% p/v NaN_3 a $+4^\circ\text{C}$.

3.2.2.3 Metodo Haverich

Tale trattamento prevede la decellularizzazione dei tessuti utilizzando una soluzione composta da 0,5% p/v di sodio dodecil-solfato (SDS) e 0,5% p/v di sodio desossicolato (SDC). I tessuti vengono sospesi in tale soluzione per 24 ore sotto continua agitazione a RT. Successivamente vengono eseguiti 10 lavaggi con PBS sterile di 12 ore ciascuno, a RT e sotto continua agitazione. Infine i campioni sono conservati in fisiologica sterile (0,9% NaCl o PBS isotonic) e 0,04% NaN_3 a $+4^\circ\text{C}$.

3.2.3 Spettroscopia di assorbimento UV/Vis

La radiazione UV/Vis copre un'ampia parte dello spettro elettromagnetico tra i 700 e i 10 nm; ma, generalmente le parti più utilizzate a scopi analitici sono il visibile (700-400 nm) e l'UV vicino (400-200 nm).

Il principio su cui si basa la spettroscopia UV/Vis è quello di eccitare attraverso una radiazione gli elettroni che si trovano nei livelli energetici di una certa molecola, promuovendoli in orbitali ad energia maggiore. Affinché tale transizione abbia luogo, l'energia assorbita deve corrispondere esattamente alla differenza di energia tra i due orbitali. In un classico spettrofotometro a doppio raggio UV/Vis, la radiazione policromatica generata da una sorgente (lampada a idrogeno o a deuterio per UV, lampada a tungsteno per Vis) viene

inviata ad un monocromatore; questo dispositivo seleziona la lunghezza d'onda d'interesse e la invia contemporaneamente ad una cella (con pareti in quarzo, trasparente alla radiazione) contenente la soluzione con il campione e ad un'altra cella contenente il solvente. In questo modo, con l'acquisizione dei dati tramite un rivelatore ed un registratore computerizzato, si possono facilmente eliminare le bande di assorbimento del solvente, e registrare lo spettro della sostanza in esame. La legge di Lambert-Beer descrive i rapporti tra assorbanza misurata, concentrazione del campione e lunghezza del cammino ottico: $A = \epsilon_{\lambda} \times b \times c$, dove A è la differenza tra il valore di assorbanza del campione e il valore di assorbanza della soluzione di riferimento, c è la concentrazione molare, b è il cammino ottico espresso in cm ed ϵ_{λ} [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$] è il coefficiente di estinzione molare della sostanza a quella particolare lunghezza d'onda. A basse concentrazioni e per valori di assorbanza comprese tra 0,1 e 0,8, esiste una correlazione lineare tra A e c , e l'equazione può quindi essere descritta da una retta passante per l'origine in cui, per un percorso ottico di 1 cm, il coefficiente angolare corrisponde ad ϵ_{λ} . La scelta della lunghezza d'onda appropriata, viene effettuata osservando lo spettro di assorbimento della sostanza in esame. Per avere il massimo di sensibilità ci si deve posizionare a λ_{max} di assorbimento; tuttavia spesso si deve tener conto anche di altri aspetti:

- la lunghezza d'onda scelta deve essere in un intervallo in cui l'assorbanza non vari eccessivamente in funzione di λ ;
- se sono presenti altre sostanze o altri gruppi in grado di assorbire a λ_{max} è preferibile scegliere una banda di assorbimento che sia riconducibile al solo composto in esame.

3.2.4 Analisi cromatografica

La tecnica cromatografica nota come *Reverse Phase – High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC) è nata come tecnica preparativa ma si è affermata poi anche come tecnica analitica. L'HPLC a fase inversa è una cromatografia di ripartizione in cui la fase stazionaria ha caratteristiche apolari, mentre come fase mobile si possono utilizzare miscele a vario titolo, composte da soluzioni acquose e solventi organici (in questo lavoro di tesi si è usato esclusivamente acetonitrile come solvente organico). L'interazione che permette la ritenzione dei detergenti nella fase stazionaria è di tipo idrofobico. La cromatografia può essere eseguita in modalità isocratica o in gradiente. In quest'ultimo caso, un aumento graduale della concentrazione di solvente organico rispetto all'acqua incrementa l'idrofobicità della fase mobile e determina la competizione tra questa e la fase stazionaria, con conseguente deadsorbimento dell'analita ad una data percentuale di solvente organico e

successiva eluizione. Generalmente, i detergenti si separano meglio in ambiente acido, conseguentemente la maggior parte delle fasi mobili contiene basse concentrazioni di acido TFA (0,05% nel caso degli eluenti usati durante il lavoro di tesi) il quale agisce come coppia ionica, aumentando la ritenzione, favorendo la solubilità dei detergenti e riducendo le interazioni elettrostatiche di questi con gli eventuali residui silanolici presenti sulla fase stazionaria. In questo lavoro di tesi le analisi si sono effettuate utilizzando come eluenti 0,05% di TFA in H₂O MilliQ (Eluente A) e 0,05% di TFA in acetonitrile (Eluente B) opportunamente degasati con elio. La soluzione contenente il campione viene introdotta in testa alla colonna cromatografica tramite aspirazione. In Figura 3.1 viene riportato lo schema di funzionamento dell'analisi cromatografica.

L'obiettivo della cromatografia analitica è caratterizzare il campione in esame, ovvero giungere alla sua identificazione, e alla quantificazione del suo grado di purezza. Note le condizioni cromatografiche (colonna, fase mobile, temperatura e gradiente), il tempo di ritenzione in colonna costituisce un dato strettamente correlabile all'identità dell'analita. Inoltre, poiché l'area sottesa dal picco dell'analita è direttamente proporzionale alla quantità di campione contenuto nella miscela totale, tramite l'integrazione del tracciato cromatografico è possibile determinare la quantità di analita presente nel campione.

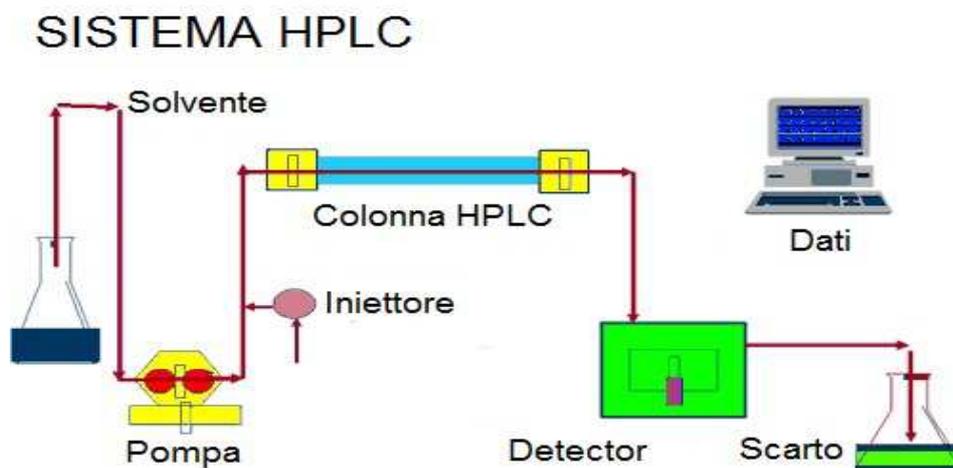


Figura 3.1 Schema di un sistema HPLC

3.2.5 Analisi di massa

La spettrometria di massa è un metodo di analisi distruttivo, che consiste in un insieme di tecniche analitiche, particolarmente usate in chimica organica, che consentono di misurare le masse molecolari e/o di determinare la formula di struttura di composti incogniti, anche avendone a disposizione quantità estremamente esigue.

Una molecola, per poter essere misurata dallo spettrometro di massa, deve essere prima ionizzata. Una volta creati gli ioni in fase gassosa questi possono essere separati, o nello spazio o nel tempo, in base al loro rapporto m/z (massa/carica). Il campione viene ionizzato in un'apposita camera di ionizzazione per impatto con un fascio di elettroni, atomi, ioni o fotoni, secondo la tecnica di ionizzazione utilizzata. L'analizzatore è quel settore dello spettrometro di massa in cui avviene la selezione degli ioni, formati nella camera di ionizzazione, sulla base del rapporto massa/carica (m/z). Gli analizzatori possono essere classificati in base al modo in cui effettuano la selezione ionica.

Nel presente lavoro di tesi è stato utilizzato uno strumento ESI-TOF. La tecnica di ionizzazione ESI (*ElectroSpray Ionization*) utilizza un gas inerte (di solito azoto) per favorire un processo di nebulizzazione provocato da una forte differenza di potenziale applicata all'ago metallico dell'iniettore che genera goccioline cariche di soluzione (analita e solvente). Le due caratteristiche essenziali dell'ESI sono che la ionizzazione si verifica a pressione atmosferica e sulla specie molecolare si può depositare una carica multipla. Questo processo avviene in soluzione (acquosa e organica) che viene poi nebulizzata in una camera termostata, ad 80°C in genere, in cui è applicato un campo elettrico.

La nebulizzazione, comporta la formazione di piccole goccioline di solvente che contengono delle specie ionizzate (analita carico). Nella sorgente, il gas fluisce a bassa velocità per facilitare l'evaporazione del solvente, questo permette di trattare anche composti termolabili. Man mano che il solvente contenuto nelle goccioline evapora, queste si rimpiccioliscono fino a che la repulsione elettrica, aumentata a causa della crescente densità di carica, supera la tensione superficiale della goccia; a questo punto la gocciolina "scoppia" creando una corrente di ioni nudi che vengono poi indirizzati da un gradiente di campo verso l'analizzatore. Una caratteristica peculiare di questa tecnica di ionizzazione è di essere capace di provocare la formazione di specie multicarica.

L'analizzatore utilizzato è di tipo TOF (*time of flight* = a tempo di volo). Il principio sul quale si basa è che ioni di differente valore m/z hanno uguale energia cinetica ma differente velocità dopo l'accelerazione subita all'uscita della camera di ionizzazione: ne consegue che il tempo che ciascuno ione impiega ad attraversare l'analizzatore è differente. In pratica, gli ioni provenienti dalla sorgente vengono accelerati da un forte campo elettrico e percorrono l'analizzatore, che ha la forma di un tubo in cui è fatto un alto vuoto ed in cui sono assenti sia campi elettrici che magnetici, in base alla velocità dovuta alla loro energia cinetica. Questo analizzatore riesce a misurare valori di massa anche estremamente elevati ed ha un'alta sensibilità.

La rielaborazione di tali segnali fornisce uno spettro di massa: una serie di picchi di intensità variabile la cui posizione corrisponde ad un determinato valore di m/z mentre sull'asse delle ordinate sono riportati i valori di abbondanza relativa degli ioni analizzati. Le intensità dei picchi sono espresse in percentuali del picco più intenso, il cosiddetto *picco base*, cui si assegna arbitrariamente il valore di 100. Il potere risolutivo ($PR = m/\Delta m$), o risoluzione, dà una misura di quanto sensibile a differenze di massa è lo strumento utilizzato e dipende direttamente dalla massa del campione analizzato. La maggior parte degli elementi che compongono i composti organici possiede diversi isotopi naturali di cui di solito il più leggero è anche il più abbondante: lo studio del *pattern* isotopico relativo ad un particolare ione, nel caso la risoluzione dello strumento sia sufficientemente elevata da mostrarlo e conoscendo le percentuali di abbondanza naturale degli isotopi di ogni elemento presente, è un altro strumento possibile per risalire alla formula molecolare di un composto incognito.

3.3 Parte sperimentale

3.3.1 Scelta del metodo

Inizialmente si era pensato di sfruttare il fatto che i detergenti anionici formano un composto con il blu di metilene che può essere estratto in cloroformio e quantificato per via spettroscopica. Tale metodo è ampiamente utilizzato con successo nella determinazione di concentrazioni esigue di detergenti in soluzioni acquose^[29, 32, 33]. Il metodo, proposto da Alison *et al*^[34] e leggermente modificato da noi (in quanto 100 μ l di blu di metilene non erano sufficienti a fare reagire tutto l'SDS presente nei campioni), permette di costruire delle rette di taratura da cui poter poi ricavare la concentrazione del detergente residuo nei campioni di interesse.

Nell'ottica di riuscire a sottrarre alla misura il contributo di componenti del digerito diversi dei detergenti si è costruita la retta di taratura del detergente utilizzando come solvente il digerito delipidizzato. In questo modo le assorbanze dei campioni vengono registrate in un ambiente il più possibile simile a quello in cui verranno letti i campioni di interesse. La presenza di altre molecole che possono reagire con il blu di metilene nella miscela complessa del digerito (per es. i GAGs^[35]) ha vanificato questo primo tentativo.

Il secondo metodo sperimentato consiste nella determinazione diretta dell'analita (detergente) nella miscela complessa per via cromatografica. La messa a punto del processo cromatografico ha riguardato:

- stabilire il quantitativo di digerito contenente una quantità rilevabile di analita;
- individuare tecnicamente il modo per iniettare un volume notevole di digerito;

- mettere a punto un lavaggio iniziale che permetta alla colonna cromatografica di eluire tutte le componenti idrofiliche della miscela che non interagiscono con la fase stazionaria;
- mettere a punto un gradiente che separi il più possibile le componenti idrofobiche della miscela e che possibilmente faccia eluire l'analita in una zona del cromatogramma "libera" da interferenze per permettere una buona integrazione del picco cromatografico.

Per determinare la quantità di detergente contenuta nei vari campioni, si è inizialmente costruito delle rette di taratura, mettendo in relazione l'area sottesa dal cromatogramma al tempo di ritenzione dell'analita con concentrazioni note di detergente, utilizzando come solvente il digerito delipidizzato non trattato. Si è poi fatto una lettura in triplicato dei vari campioni, determinando la concentrazione dei detergenti ivi presenti per regressione lineare.

3.3.2 Saggio con blu di metilene

Si prepara di fresco la soluzione di blu di metilene 250 ppm: si versano 0,25 ml di una soluzione 1% di blu di metilene in 10 ml di acqua (in cilindro), si mescola, e si versa in una provetta contenente 1 ml di cloroformio.

Si preparano le soluzioni campione utilizzando una quantità nota di detergente, e portandola a 1 ml di volume con acqua (o digerito non trattato), agitandole con vortex.

PROTOCOLLO:

- si aggiunge 1 ml di blu ad 1 ml di campione, e si agita con vortex 3 secondi per 5 volte;
- si aggiungono 2 ml di cloroformio per provette, e si agita con vortex 3 secondi per 5 volte;
- si parafilma, e si mette in frigo per 5 minuti;
- si centrifuga a 2000 rpm per 6 minuti;
- si lascia per 10 min a RT;
- si separano le fasi con pipetta pasteur;
- si legge l'assorbanza a 655 nm.

3.3.3 Processo cromatografico

Per ogni punto di una retta, una quantità nota di analita è stata portata a 6 ml di volume con digerito non trattato: la soluzione così ottenuta è stata filtrata, sonicata e aspirata utilizzando una via solvente del cromatografo. I 6 ml di campione, invece, sono stati

direttamente filtrati, sonicati e aspirati. Per permettere una completa aspirazione la via solvente è stata lavata, per due volte, con 6 ml di eluente A sonicato.

Solitamente l'aspirazione di un campione viene effettuata dall'autocampionatore, ma nel nostro caso non era utilizzabile visto che il volume massimo iniettabile è di 200 μ l. Per permettere l'eluizione delle componenti idrofiliche e portare così la linea base del cromatogramma ad assorbanza zero, si è inizialmente eseguita una cromatografia isocratica al 100% di eluente A per 50 minuti. Successivamente è stato eseguito un gradiente, la cui integrazione ha fornito la quantità di detergente presente.

Per la retta e per i campioni nei quali volevamo determinare la quantità di SDC è stato utilizzato il gradiente:

- da 0 a 80% di eluente B in 40 minuti;

per le rette ed i campioni di TDOC e di COL è stato utilizzato invece il gradiente:

- da 0 a 36% di eluente B in 18 minuti,
- da 36 a 66% di eluente B in 30 minuti.

Tale diversità è dovuta al diverso tempo di ritenzione dei detergenti.

La lettura dello spettrofotometro a UV è stata impostata a 200 nm, dove si può registrare il picco di assorbanza dei detergenti.

I cromatogrammi così ottenuti sono stati integrati con l'utilizzo del programma Empower.

In alcuni casi sono stati raccolti in provette i volumi eluiti dalla colonna corrispondenti ai picchi cromatografici dei diversi detergenti per confermare la loro identità tramite spettrometro di massa.

Capitolo 4

Risultati e discussioni

4.1 Cromatogrammi

Di seguito, Figura 4.1, viene riportato un cromatogramma come esempio di una corsa isocratica di lavaggio al 100% di eluente acquoso, la quale ha permesso alla colonna l'eluizione di tutte le componenti idrofiliche contenute nella miscela.

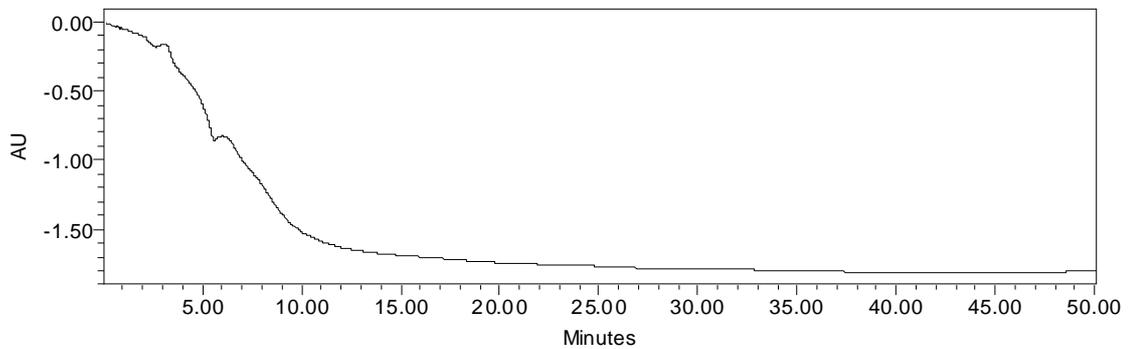


Figura 4.1 Cromatogramma corsa isocratica di lavaggio

Vengono riportati, in seguito (Figura 4.2, 4.3, 4.4), i cromatogrammi che hanno permesso la formulazione delle rette di taratura: una sovrapposizione dei cinque punti della retta mostra l'andamento crescente delle aree rispetto all'ordine crescente di concentrazione (nero, blu, verde, azzurro, viola).

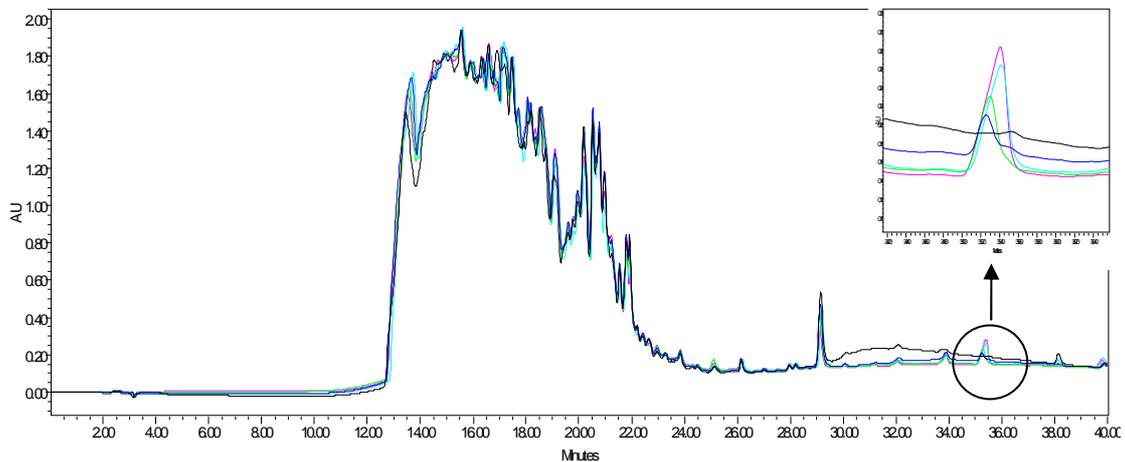


Figura 4.2 Cromatogrammi retta di taratura SDC

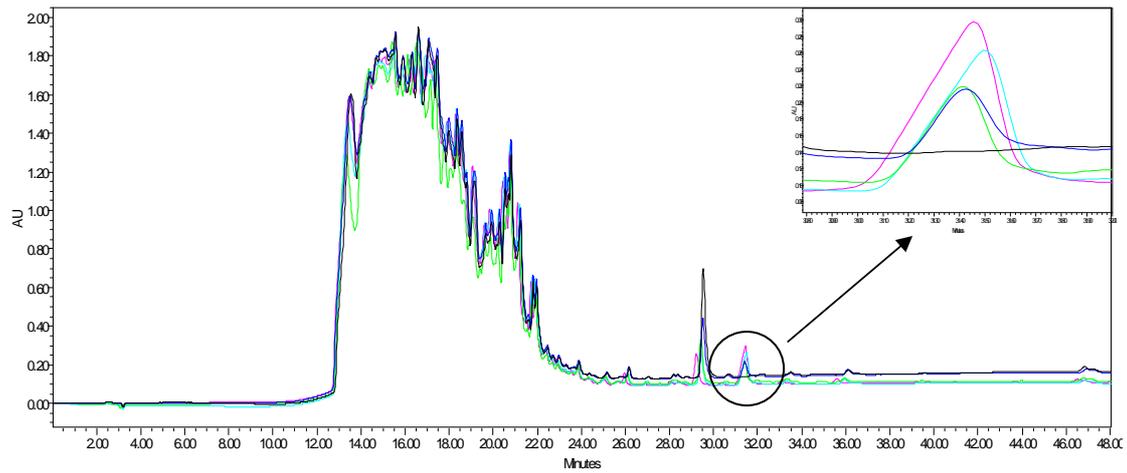


Figura 4.3 Cromatogrammi retta di taratura COL

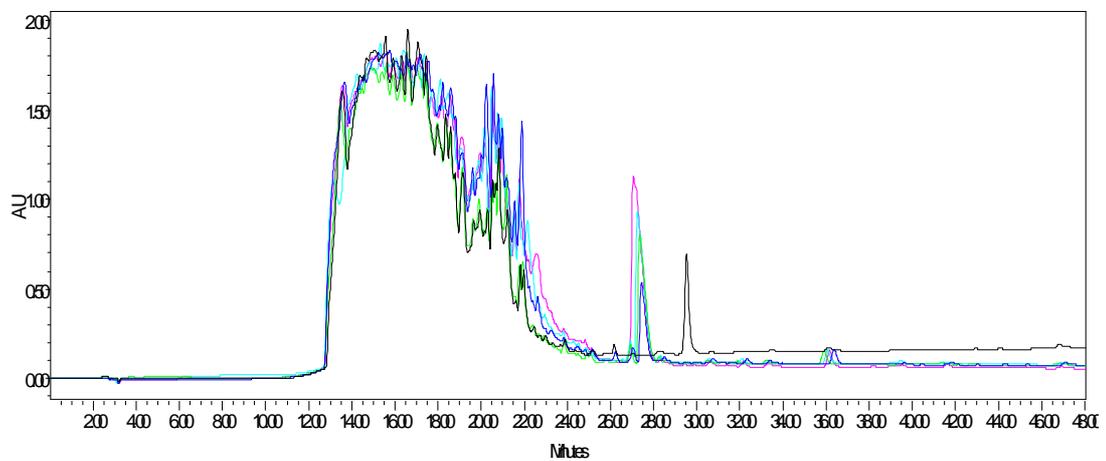


Figura 4.4 Cromatogrammi della retta di taratura del TDOC

Vengono riportati, ora, in sovrapposizione, i triplicati dei campioni in esame (Figura 4.5, 4.6, 4.7, 4.8), dai quali si può vedere una buona riproducibilità del metodo.

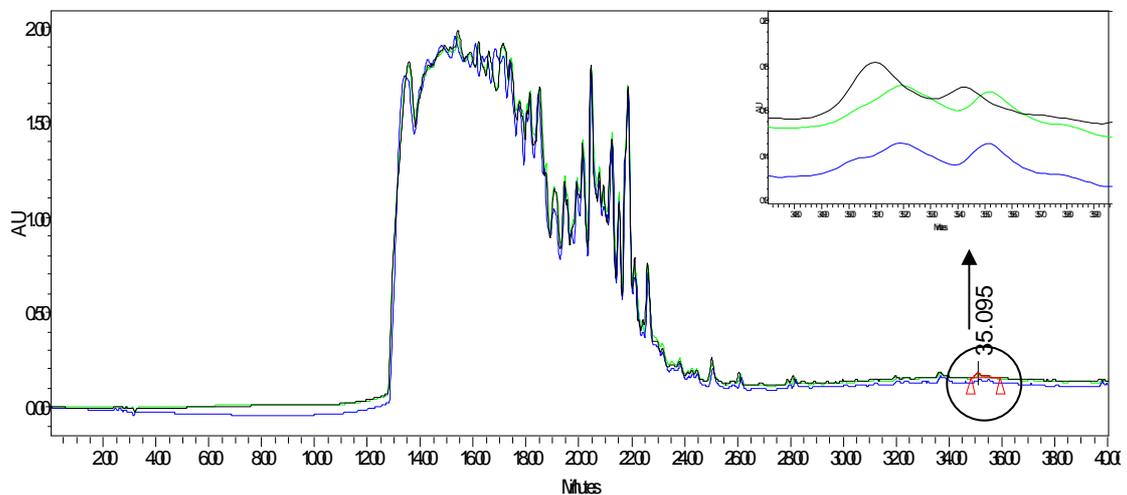


Figura 4.5 Cromatogrammi dei campioni Dohmen

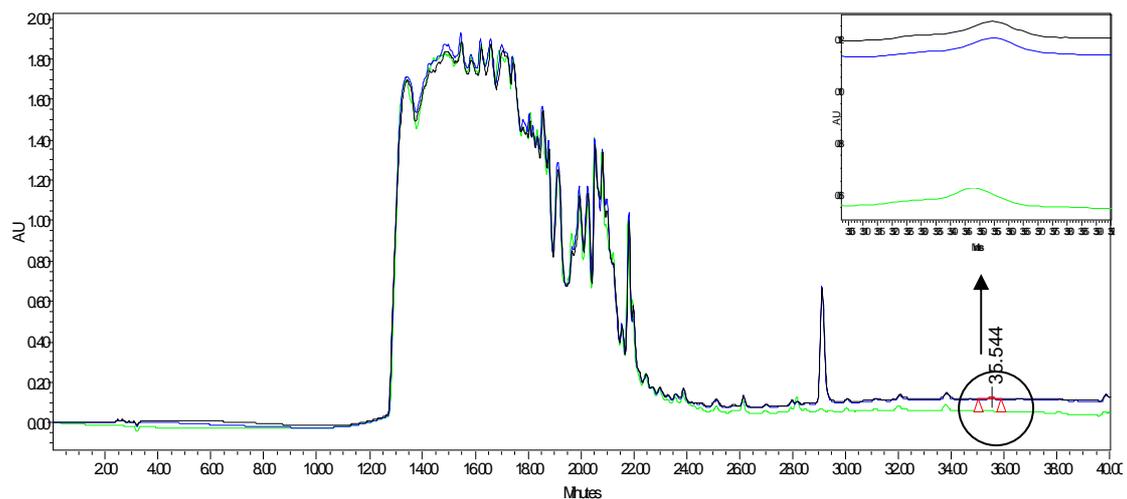


Figura 4.6 Cromatogrammi dei campioni Haverich

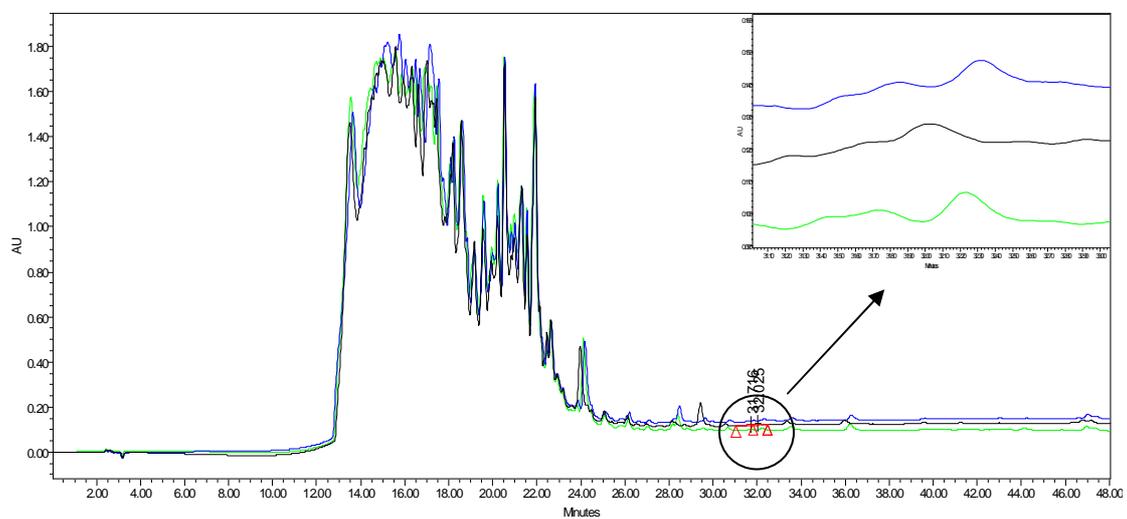


Figura 4.7 Cromatogrammi dei campioni Tricol

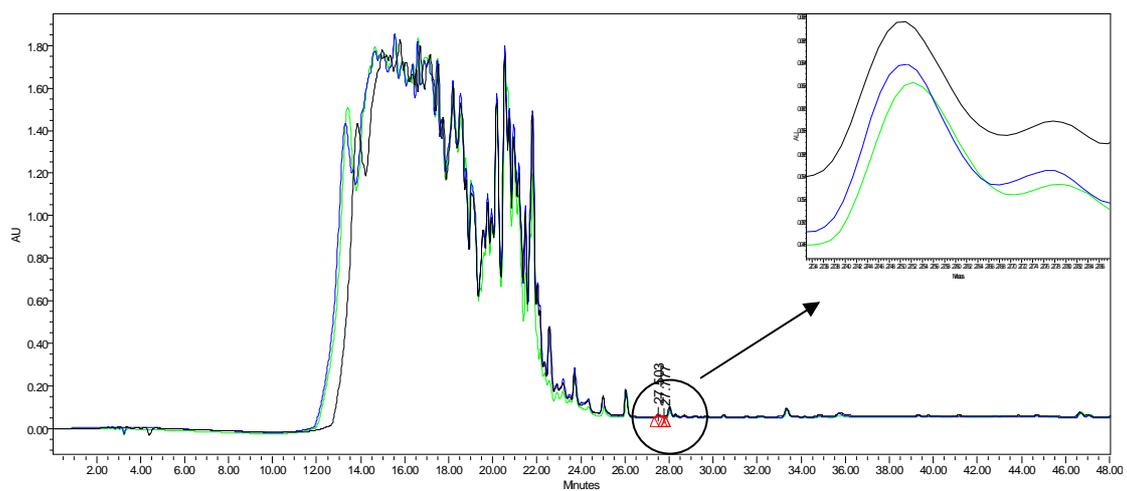


Figura 4.8 Cromatogrammi dei campioni Tritdoc

Per provare che la presenza di un secondo detergente non influenza il tempo di ritenzione e l'area del picco del primo analita, si sono eseguite due analisi cromatografiche nelle quali sono stati iniettati dei campioni contenenti più detergenti. In particolare, la prima analisi vede la compresenza di due detergenti ionici (SDC e SDS), mentre la seconda vede la compresenza di detergenti ionici e non-ionici (SDC, Triton X-100 e Igepal). Dalle Figure 4.9 e 4.10 si può osservare che la compresenza di diversi detergenti non influenza l'individuazione e la quantificazione dell'analita (in questi casi SDC), in quanto il tempo di ritenzione è rimasto invariato, come anche l'area del picco che risulta quella attesa.

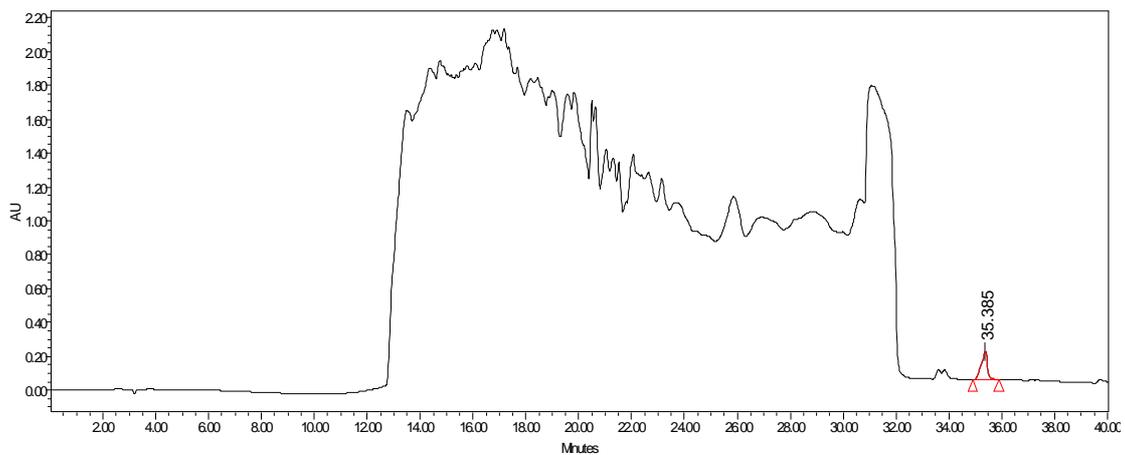


Figura 4.9 Cromatogramma di prova SDC-SDS

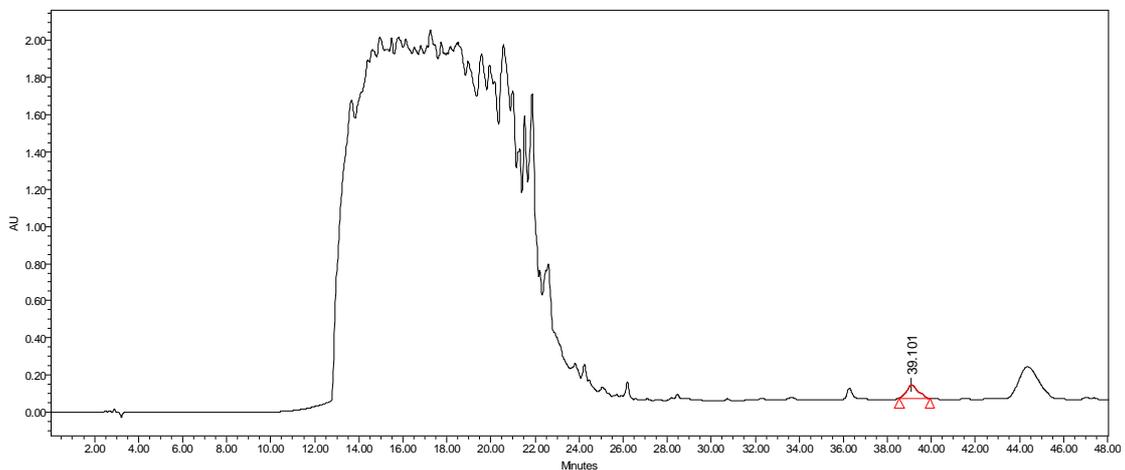


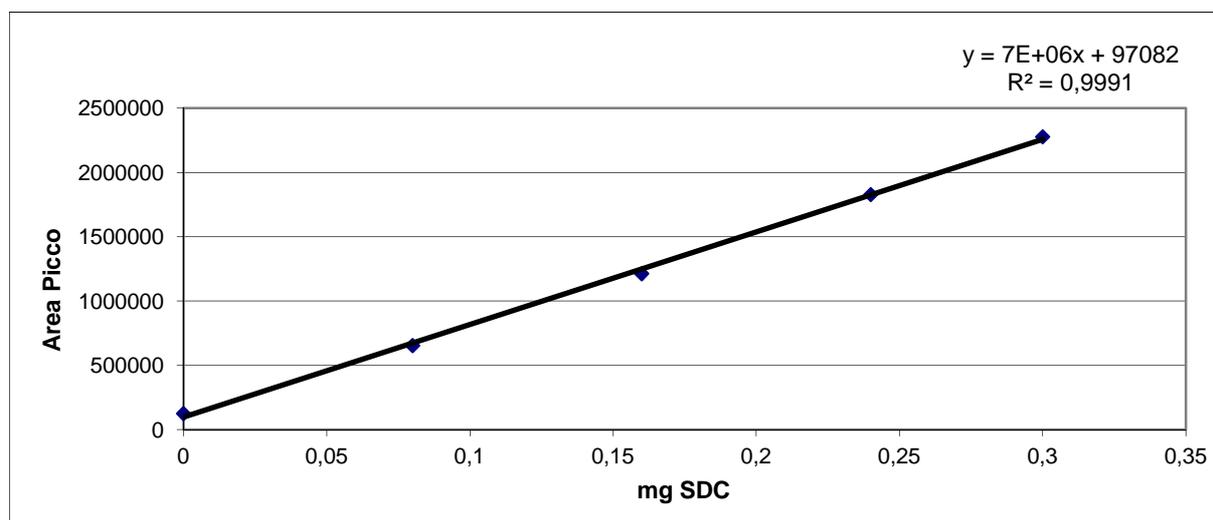
Figura 4.10 Cromatogramma di prova SDC-Triton X-100-Igepal

4.2 Rette di taratura

Si riportano, di seguito, le rette di taratura dei detergenti SDC, COL e TDOC (Figura 4.11, 4.12, 4.13), con i rispettivi punti (Tabelle 4.1, 4.2, 4.3).

Tabella 4.1 *Punti retta di taratura SDC*

mg SDC	Area picco
0	125989
0,08	655297
0,16	1214442
0,24	1829381
0,3	2278704

**Figura 4.11** *Retta di taratura SDC in lembo polmonare, con equazione di interpolazione lineare e coefficiente di determinazione***Tabella 4.2** *Punti retta di taratura COL*

mg COL	Area picco
0	184589
0,1	1490140
0,16	2299604
0,24	3405115
0,3	4212965

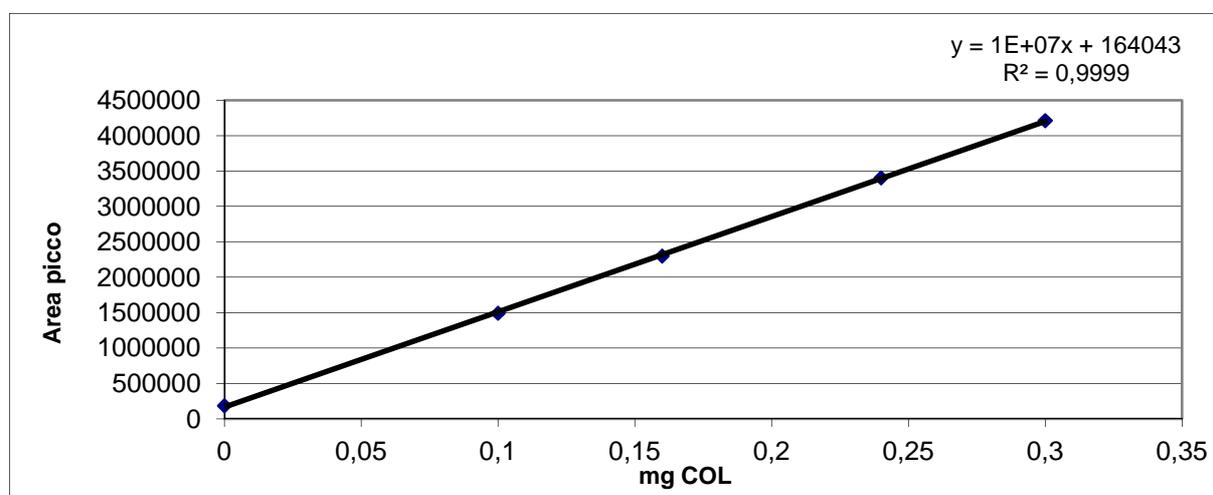
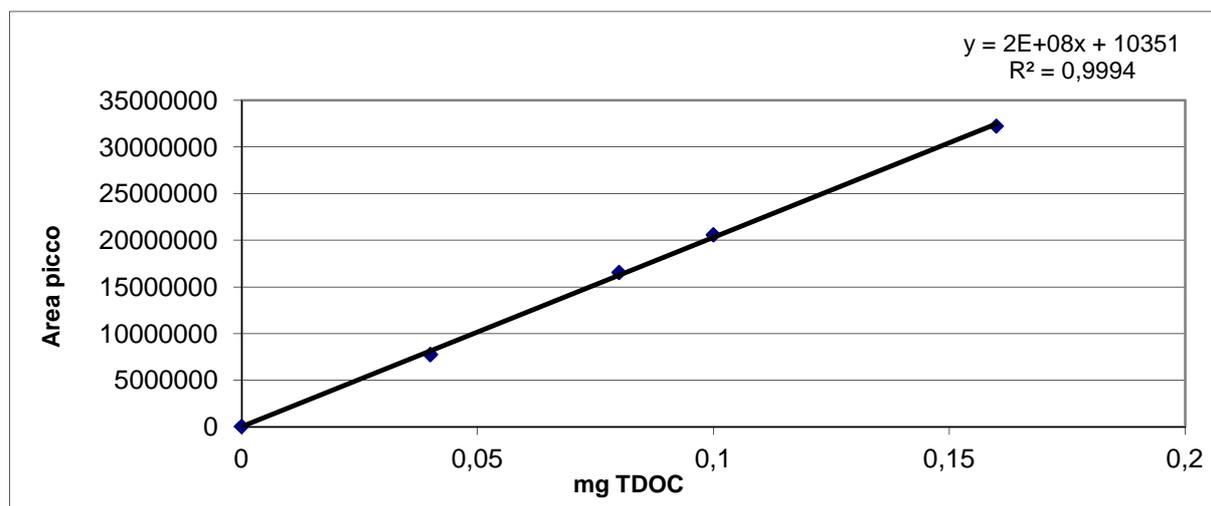
**Figura 4.12** *Retta di taratura COL in lembo polmonare, con equazione di interpolazione lineare e coefficiente di determinazione*

Tabella 4.3 Punti retta di taratura TDOC

mg TDOC	Area picco
0	38957
0,04	7744748
0,08	16545446
0,1	20586314
0,16	32242489

**Figura 4.13** Retta di taratura TDOC in lembo polmonare, con equazione di interpolazione lineare e coefficiente di determinazione

4.3 Campioni

L'equazione generale corrispondente ad una retta, $y = mx + q$ (dove, nel nostro caso, l'asse delle ordinate y rappresenta l'area del picco del cromatogramma, mentre l'asse delle ascisse x rappresenta la concentrazione di detergente) può essere rivista per poter determinare la concentrazione di un campione incognito: $x = \frac{y-q}{m}$.

Si è tuttavia elaborato l'intercetta q per ogni campione, considerando il diverso peso del campione delipidizzato (utilizzato per costruire le rette) e dei campioni incogniti, utilizzando la proporzione: $q : \text{peso campione retta} = \bar{q} : \text{peso campione decellularizzato}$, dove \bar{q} rappresenta la nuova intercetta che si è utilizzata per determinare i campioni, $x = \frac{y-\bar{q}}{m}$.

Nella Tabella 4.4 sono riportati i pesi dei campioni, e le nuove intercette utilizzate.

Tabella 4.4 Pesi campioni e nuove intercette

CAMPIONE	PESO (mg)	NUOVA INTERCETTA
DELIPIDIZZATO	171,89	
DOHMEN	151,57	85605
HAVERICH	154,32	87159
TRICOL	152,98	145996
TRITDOC	179,64	10818

Si riportano, di seguito, i valori dei detergenti residui nei campioni, contenuti nei 6 ml aspirati, e nei 100 ml di digerito (Tabelle 4.5, 4.6, 4.7, 4.8).

Tabella 4.5 *Campioni Dohmen per SDC*

Area picco	mg in 6 ml	mg in 100 ml
605495	0,074270000	1,237833333
560108	0,067786143	1,129769048
658187	0,081797429	1,363290476
MEDIA	0,074617857	1,243630952
SD	0,005725370	0,095422826

Tabella 4.6 *Campioni Haverich per SDC*

Area picco	mg in 6 ml	mg in 100 ml
109249	0,003155714	0,052595238
105779	0,002660000	0,044333333
107488	0,002904143	0,048402381
MEDIA	0,002906619	0,048443651
SD	0,000202382	0,003373035

Tabella 4.7 *Campioni TRICOL per COL*

Area picco	mg in 6 ml	mg in 100 ml
159256	0,001326000	0,022100000
151613	0,000561700	0,009361667
165142	0,001914600	0,031910000
MEDIA	0,001267433	0,021123889
SD	0,000553870	0,009231158

Tabella 4.8 *Campioni TRITDOC per TDOC*

Area picco	mg in 6 ml	mg in 100 ml
140609	0,000648955	0,010815917
158650	0,000739160	0,012319333
159970	0,000745760	0,012429333
MEDIA	0,000711292	0,011854861
SD	0,000044161	0,000736016

Si riportano di seguito, nella Tabella 4.9, i valori di detergenti residui, espressi come mg di analita ogni mg umido di campione.

Tabella 4.9 Detergenti residui nei campioni

CAMPIONE	mg detergente ogni mg di campione umido
DOHMEN (SDC)	0,0082 ± 0,0006
HAVERICH (SDC)	0,00031 ± 0,00002
TRICOL (COL)	0,00014 ± 0,00006
TRITDOC (TDOC)	0,000066 ± 0,000004

4.4 Analisi di massa

Si riportano, ora, gli spettri di massa eseguiti per verificare che il picco di integrazione considerato nei campioni corrisponda proprio al detergente in esame (Figure 4.14, 4.15, 4.16). In particolare:

- SDC : massa teorica = 414,6 Da;
 massa sperimentale Dohmen = 391,2806 Da;
 massa sperimentale Haverich = 391,2980 Da;
- COL : massa teorica = 430,6 Da;
 massa sperimentale Tricol = 391,2806 Da

Per quanto riguarda il TDOC non si sono effettuate analisi di massa, in quanto concentrazioni anche piccolissime di questo detergente provocavano un picco di assorbanza molto vistoso (vedi § 4.1), rendendo evidente il fatto che questo picco corrispondesse proprio al detergente in analisi.

L'analisi di massa viene eseguita su contro-ioni, quindi la differenza tra massa sperimentale e teorica è dovuta alla dissociazione ionica del sale, per cui si troveranno pesi molecolari corrispondenti ad anioni privi del metallo (nel nostro caso sodio).

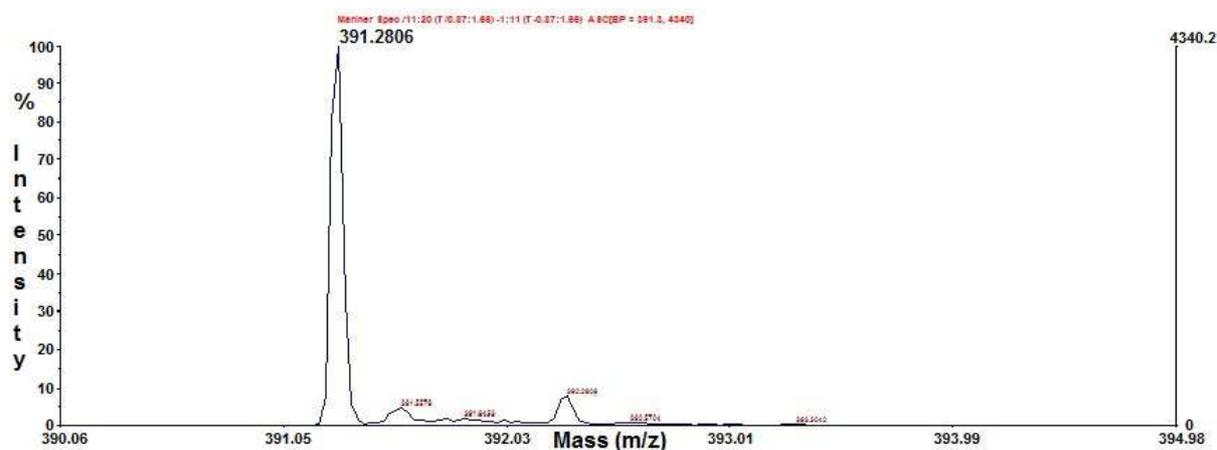


Figura 4.14 Spettro di massa del picco a $t_R=35,095$ del cromatogramma di un campione Dohmen (vedi figura 4.5)

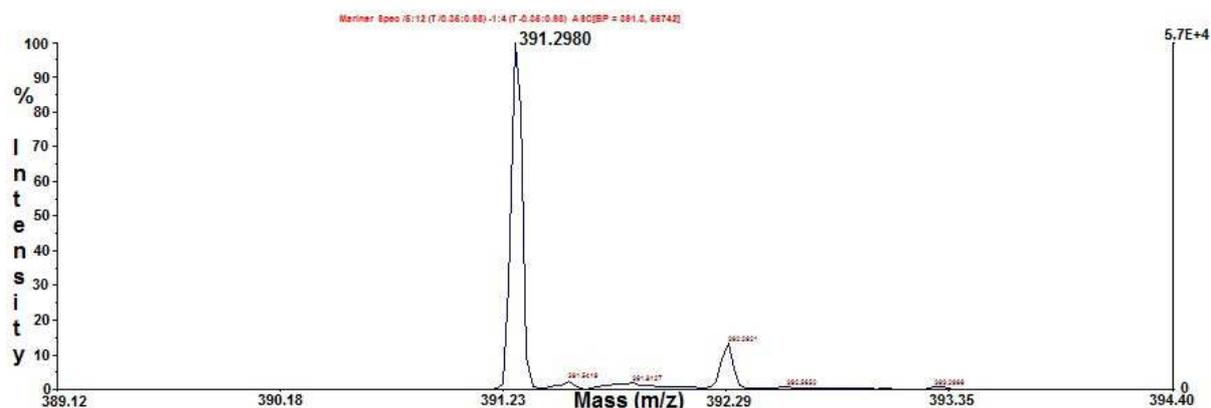


Figura 4.15 Spettro di massa del picco a $t_R=35,544$ del cromatogramma di un campione Haverich (vedi figura 4.6)

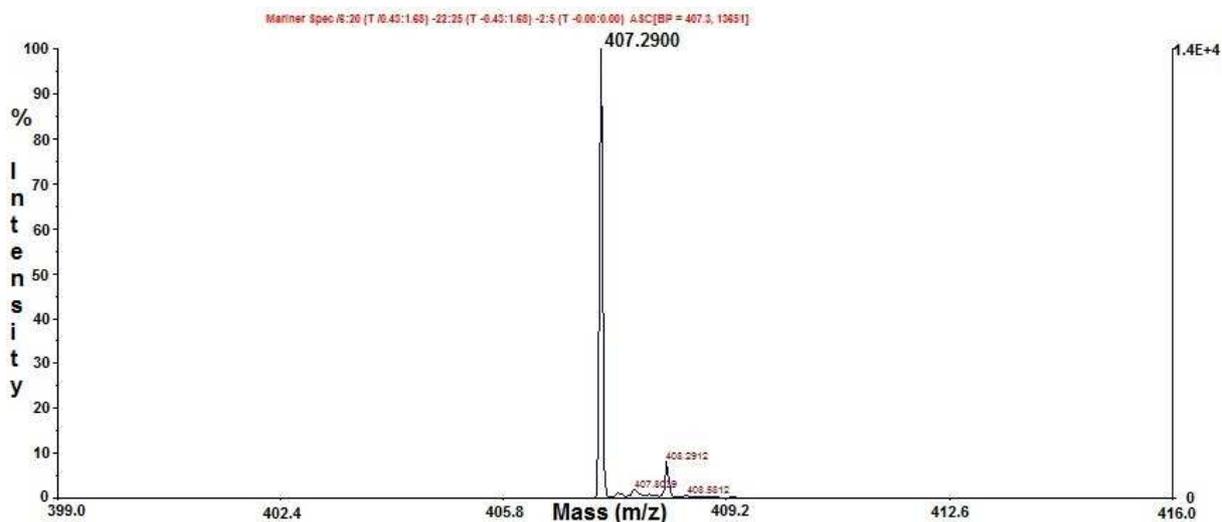


Figura 4.16 Spettro di massa del picco a $t_R=32,025$ del cromatogramma di un campione Dohmen (vedi figura 4.7)

4.5 Discussione

La decellularizzazione dei tessuti biologici da utilizzare come bioprotesi è un trattamento che permette la rimozione dei determinanti antigenici ed evita le fasi di rigetto attenuando i processi infiammatori. Stabilire il destino dei detergenti utilizzati in tale trattamento è particolarmente importante visto che il loro deassorbimento dallo *scaffold* può risultare citotossico o indurre infiammazione e conseguente calcificazione della bioprotesi. Inoltre, la determinazione delle concentrazioni residue dei detergenti nello *scaffold* è un dato importante per studiare effetti denaturativi sull'ECM che si potrebbero riflettere in una difficile ripopolazione cellulare dello *scaffold* post-impianto. Ad oggi, in letteratura, molti studi riportano solo la determinazione delle concentrazioni di detergenti nelle soluzioni di lavaggio della bioprotesi sottoposta a decellularizzazione: studi sulla citotossicità dei

detergenti vengono fatti seminando le cellule direttamente in tali soluzioni. Le rare pubblicazioni che riportano una determinazione dei detergenti nello *scaffold* utilizzano metodi in cui il detergente forma una coppia ionica con il blu di metilene e il sale ottenuto viene estratto con cloroformio e quantificato per via spettrofotometrica.

Inizialmente abbiamo cercato di applicare il saggio con blu di metilene ai nostri tessuti digeriti con papaina. I nostri esperimenti testimoniano come nelle miscele complesse dei digeriti non si ottenga linearità tra l'assorbanza registrata nella fase organica e la quantità di analita addizionato al nostro riferimento (digerito delipidizzato non decellularizzato con detergenti).

L'insuccesso del metodo è attribuibile alla compresenza di altri analiti (ad es. GAGs) in grado di reagire con il blu di metilene.

L'analisi cromatografica diretta dei detergenti nel digerito senza alcuna manipolazione del campione (concentrazione, eluizione in cartucce, estrazione in fase organica) ha permesso di ridurre notevolmente le fonti di errore.

La praticabilità di tale metodo è confermata dalla linearità delle misure (fornisce risultati proporzionali alla concentrazione di analita in un determinato intervallo) e dall'elevato coefficiente di determinazione (ad es. per il SDC il nostro metodo fornisce $R > 0.999$ mentre quello proposto da Mathapati *et al*^[29] fornisce $R = 0.882$).

Nel presente lavoro di tesi sono stati presi in considerazione quattro metodi di decellularizzazione che utilizzano nel complesso quattro detergenti differenti.

Le curve di taratura ottenute permettono di stimare, e in un caso confrontare, le quantità residue di SDC, COL e TDOC.

Sono tutt'ora in corso le analisi che permetteranno di stimare anche le concentrazioni degli altri detergenti presenti (SDS e Triton X-100). Inoltre, le indagini fatte verranno estese ai lembi polmonari bovini, ai lembi aortici porcini e bovini, e alle pareti polmonari e aortiche porcine e bovine, per ottenere un quadro complessivo che valuti le differenze di specie e di struttura dei tessuti.

In Tabella 4.11 si riporta un schema riassuntivo dei protocolli di decellularizzazione analizzati.

Visto che l'efficienza dei lavaggi è inversamente proporzionale alla concentrazione residua, nel campione Haverich la concentrazione di SDS dovrebbe essere paragonabile a quella di SDC: $0,31 \mu g \times 2 = 0,62 \mu g$, comunque inferiore alla concentrazione di Dohmen. Il metodo Haverich permette quindi di allontanare più detergente rispetto al metodo Dohmen.

Questa differenza è probabilmente attribuibile al fatto che Haverich opera i lavaggi in presenza di costante agitazione.

Tabella 4.11 *Schema riassuntivo protocolli di decellularizzazione*

CAMPIONE	concentrazione detergente	tempo	n° lavaggi	tempo lavaggi
DOHMEN	1% SDC p/v	24 ore	10	12 ore ciascuno
HAVERICH	0.5 % SDC p/v 0.5 % SDS p/v	24 ore	10	12 ore ciascuno
TRICOL	1% Triton X-100 p/v 0.43 % COL p/v	33.5 ore 16 ore	2	11.5 ore 24 ore ciascuno
TRITDOC	1% Triton X-100 p/v 0.21 % TDOC p/v	33.5 ore 16 ore	2	11.5 ore 24 ore ciascuno

I metodi Tricol e Tritdoc, pur utilizzando una percentuale più alta di detergente, ottengono un migliore allontanamento dell'analita dalla matrice. Questo potrebbe essere attribuibile alla diversa natura dei detergenti, e/o ad un migliore processo di detersione.

Conclusioni

I diversi trattamenti analizzati, volti alla rimozione della componente cellulare, mostrano livelli di efficacia differenti per quanto riguarda l'eliminazione dei residui di detergente dal tessuto. La metodica Dohmen lascia il SDC in elevate quantità all'interno dello *scaffold*. Diversamente, lo stesso detergente utilizzato in combinazione con il SDS (protocollo Haverich) esibisce un residuo notevolmente minore. Tale comportamento potrebbe essere associato ad un effetto del SDS, oppure al diverso procedimento di decellularizzazione. I risultati più promettenti sono stati ottenuti dalle metodiche Tricol e Tritdoc, possibilmente dovuti alla diversa natura dei detergenti, e al diverso protocollo.

Superando varie difficoltà e con molte sperimentazioni atte alla ricerca di un metodo, si è riusciti a trovarne uno che finalmente determina, con buona linearità e riproducibilità, la quantità di detergente direttamente nella matrice: un piccolo passo che apre una grande porta alla ricerca.

Lo sviluppo futuro di tale studio sarà diretto all'esame dei residui dei detergenti qui non analizzati (SDS, Triton X-100, Igepal) nel lembo polmonare bovino e all'analisi di tutti i detergenti nel lembo aortico porcino e bovino, oltre che nelle pareti.

Concludendo, la bio-compatibilità è un requisito assolutamente necessario per il successo della protesi dopo l'impianto: la sua verifica andrebbe confermata di routine attraverso l'allestimento di *tools* veloci e specifici, per evitare di ripetere i fallimenti clinici del passato e permettere la costruzione di un sostituto valvolare sempre più vicino a quello ideale.

Abbreviazioni

AV : valvole atrio-ventricolari

COL : colato di sodio

DOHMEN : trattamento decellularizzante con desossicolato di sodio

ECM : matrice extracellulare

GAGs : glicosamminoglicani

HAVERICH : trattamento decellularizzante con desossicolato di sodio e sodio dodecil solfato

PBS : soluzione isotonica di tampone fosfato

RT : temperatura ambiente

SDC : desossicolato di sodio

SDS : sodio dodecil solfato

SL : valvole semilunari

TDOC: taurodesossicolato di sodio

TFA : acido trifluoroacetico

TRICOL : trattamento decellularizzante con Triton X-100 e colato di sodio

TRITDOC : trattamento decellularizzante con Triton X-100 e taurodesossicolato di sodio

UV/Vis : ultravioletto/visibile

Riferimenti bibliografici

1. Rizzoli, Larousse: *Enciclopedia universale*. Volume XV. Rizzoli editore. 1968
2. Arthur C. Guyton, John E. Hall: *Fisiologia medica*. II Edizione. EdiSES. 2002
3. Sylvia S. Mader: *Human Anatomy & Physiology*. V Edizione. McGraw-Hill. 2004
4. Claudio Rugarli: *Medicina interna sistematica*. V Edizione. MASSON
5. Carlo di Bello: *Biomateriali*. Pàtron Editore. 2004
6. Butany J., Ahluwalia M.S., Munroe C., Fayet C., Ahn C., Blit P., Kepron C., Cusimano R.J., Leask R.L.: *Mechanical heart valve prostheses: identification and evaluation*. Cardiovascular Pathology. 2003; 12: 322-44
7. Richard A. DeWall, Naureen Qasim, Liz Carr: *Evolution of mechanical heart valves*. The Annals of thoracic surgery. 2000; 69: 1612-21
8. Kouchoukos N.T.: *Aortic allografts and pulmonary autografts for replacement of the aortic valve and aortic root*. Ann Thorac Surg. 1999; 67: 1846-8
9. Dossche K.M., de la Rivie A.B., Morshuis w.j., Schepens M.A., Defauw J.J., Ernst S.M.: *Cryopreserved Aortic Allografts for Aortic Root Reconstruction: A Single Institution's Experience*. Ann Thorac Surg. 1999; 67: 1617-22
10. Palka P., Harrocks S., Lange A., Burstow D.J., O'Brien M.F.: *Primary aortic valve replacement with cryopreserved aortic allograft. An echocardiographic follow-up study of 570 patients*. Circulation. 2002; 105(1): 61-6
11. Kerchove L., Glineur D., El Khoury G., Noirhomme P.: *Stentless valves for aortic valve replacement: where do we stand?*. Current Opinion in Cardiology. 2007; 22: 96-103
12. Thamilarasan M., Griffin B.: *Choosing the most appropriate valve operation and prosthesis*. Cleve. clin. med. 2002; 69(9): 688-90, 693-4, 696-8
13. Butany J., Fayet C., Ahluwalia M. S., Blit P., Ahn C., Munroe C., Israel N., Cusimano R. J., Leask R. L.: *Biological replacement heart valves: identification and evaluation*. Cardiovascular Pathology. 2003; 12: 119-39
14. Zegdi R., Khabbaz Z., Borenstein N., Fabiani N.J.: *A repositionable valved stent for endovascular treatment of deteriorated bioprotheses*. J. Am. Coll. Cardiol. 2006; 48: 1365-8
15. Feldman T., Leon M.B.: *Prospects for Percutaneous Valve Therapies*. Circulation. 2007; 116: 2866-77
16. Godino C., Colombo A.: *Il trattamento percutaneo della stenosi aortica. Indicazione e limiti*. Unità di emodinamica – Ospedale San Raffaele di Milano

17. Singh I.M., Shishehbor M.H., Christofferson R.D., Tzucu E.M., Kapadia S.R.: *Percutaneous treatment of aortic valve stenosis*. Cleve. Clin. Med. 2008; 75(11): 805-12
18. Sarah Brody, Abhay Pandit: *Approaches to Heart Valve Tissue Engineering Scaffold Design*. Wiley Periodicals, Inc. J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater. 2007; 83B: 16–43
19. Duc Trung Nguyen, François Delahaye, Jean-François Obadia, Xavier Duval, Christine Selton-Suty, Jean-Pierre Carteaux, Bruno Hoen, François Alla: *Aortic valve replacement for active infective endocarditis: 5-year survival comparison of bioprostheses, homografts and mechanical prostheses*. European Journal of Cardio-thoracic Surgery. 2010; 37: 1025-32
20. John E. Mayer Jr: *In search of the ideal valve replacement device*. J Thorac Cardiovasc Surg. 2003; 125: 14-5
21. Rizwan A. Manji, Lin F. Zhu, Nimrit K. Nijjar, David C. Rayner, Greg S. Korbitt, Thomas A. Churchill, Ray V. Rajotte, Arvind Koshal and David B. Ross: *Glutaraldehyde-Fixed Bioprosthetic Heart Valve Conduits Calcify and Fail From Xenograft Rejection*. Circulation. 2006; 114:318-27
22. Frederick J. Schoen, Robert J. Levy: *Calcification of Tissue Heart Valve Substitutes: Progress Toward Understanding and Prevention*. Ann Thorac Surg. 2005; 79: 1072-80
23. Claudinei Collatusso, João Gabriel Roderjan, Eduardo Discher Vieira, Nelson Itiro Myague, Lúcia de Noronha, Francisco Diniz Affonso da Costa: *Decellularization as an anticalcification method in stentless bovine pericardium valve prosthesis: a study in sheep*. Rev Bras Cir Cardiovasc. 2011; 26(3): 419-26
24. Thomas W. Gilbert, Tiffany L. Sellaro, Stephen F. Badylak: *Decellularization of tissues and organs*. Biomaterials. 2006; 27: 3675-83
25. Dohmen PM, Lembcke A, Holinski S, Kivelitz D, Braun JP, Pruss A, Konertz W: *Mid-term clinical results using a tissue-engineered pulmonary valve to reconstruct the right ventricular outflow tract during the Ross procedure*. Ann Thorac Surg. 2007; 84:729-736
26. Dohmen PM, Lembcke A, Hotz H, Kivelitz D, Konertz WF: *Ross operation with a tissue-engineered heart valve*. Ann Thorac Surg. 2002; 74:1438-1442
27. Serghei Cebotari, Igor Tudorache, Thomas Jaekel, Andres Hilfiker, Suzanne Dorfman, Waldemar Ternes, Axel Haverich, Artur Lichtenberg: *Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells*. Artif Organs. 2010; 34(3): 206-10
28. B. Bertipaglia, F. Ortolani, L. Petrelli, G. Gerosa, M. Spina, P. Pauletto, D. Casarotto, M. Marchini, S. Sartore: *Cell characterization of porcine aortic valve and decellularized leaflets repopulated with aortic valve interstitial cells: the VESALIO project*. Ann Thorac Surg. 2003; 75: 1274-82

29. Santosh Mathapati, Satish Galla, Kavitha Sankaranarayanan, Rama Shanker Verma, Kotturathu Mammen Cherian, Soma Guhathakurta: *Qualitative and quantitative detection of sodium deoxycholic acid in decellularized tissue*. Indian J Thorac Cardiovasc Surg. 2010; 26: 129-31
30. Samira Caamaño, Shiori Arai, Steven H. Strauss, E. Christopher Orton: *Does Sodium Dodecyl Sulfate Wash Out of Detergent-Treated Bovine Pericardium at Cytotoxic Concentrations?* The Journal of Heart Valve Disease. 2009; 18: 101-5
31. Paul F. Gratzner, Robert D. Harrison, Terence Woods: *Matrix alteration and not residual sodium dodecyl sulfate cytotoxicity affects the cellular repopulation of a decellularized matrix*. Tissue engineering. 2006; 12(10): 2975-83
32. M. G. Demidova, A. I. Bulavchenko: *Spectrophotometric Determination of Sodium Dodecyl Sulfate with Preconcentration by Reversed Micelles of Triton N-42*. Journal of Analytical Chemistry. 2007; 62(1): 31-36
33. Patel, R., K.S. Patel: *Flow Injection Determination of Anionic Surfactants with Cationic Dyes in Water Bodies of Central India*. Analyst. 1998; 123: 1691
34. Alison L. George, Graham F. White: *Optimization of the methylene blue assay for anionic surfactants added to estuarine and marine water*. Environmental Toxicology and Chemistry. 1999; 18: 2232-36
35. Stone JE, Akhtar N, Botchway S, Pennock CA.: *Interaction of 1,9-dimethylmethylene blue with glycosaminoglycans*. Ann Clin Biochem. 1994; 31(2): 147-52