

ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITÀ DI
BOLOGNA CAMPUS DI CESENA
DIPARTIMENTO DI
INGEGNERIA DELL'ENERGIA ELETTRICA E
DELL'INFORMAZIONE
“GUGLIELMO MARCONI”

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

TITOLO DELLA TESI

Dispositivi impiantabili per il pacing cardiaco: dai dispositivi elettronici al Biopacemaker

Tesi di Laurea in

Computational Cardiology

Relatore

Prof. Ing. Stefano Severi

Presentata da

Alberto Bascucci

Sessione II

Anno Accademico 2021/2022

Indice

Abstract	3
Introduzione	4
1 Nozioni introduttive sul cuore	6
1.1 La macrostruttura cardiaca.....	6
1.2 Il flusso sanguigno.....	7
1.3 Il sistema di conduzione cardiaco.....	9
1.4 Il potenziale d'azione (PA).....	11
1.5 Il nodo senoatriale.....	12
1.5.1 Cellule contrattili.....	12
1.5.2 Cellule autoritmiche miocardiche.....	14
1.6 Ruolo del sistema nervoso autonomo sulla frequenza cardiaca.....	16
1.7 Disfunzione del nodo del seno.....	20
2 Il Pacemaker Elettronico	22
2.1 L'esigenza di un dispositivo "artificiale".....	22
2.2.1 Cenni storici.....	22
2.2 L'architettura del pacemaker.....	24
2.3 Componenti di un pacemaker.....	25
2.3.1 Generatore di impulsi (IPG).....	28
2.3.2 Batteria.....	29
2.3.3 Cavi ed elettrocateri.....	30
2.4 Chirurgia.....	31
2.4.1 Esposizione Chirurgica della vena.....	32
2.4.2 Posizionamento intracardiaco dell'elettrodo di Pacemaker...32	
2.4.3 Applicazione e impianto del generatore di Pacemaker.....	32
2.5 Conseguenze cliniche.....	33
3 Il Pacemaker Biologico	35
3.1 Approccio Autologo, Allogeneico, Xenogeneico.....	35
3.2 Approcci basati su cellule Senoatriali.....	36

3.2.1 Cellule Staminali.....	37
3.3 Approcci cellulari che utilizzano cardiomiociti pluripotenti.....	38
3.4 Genoma Umano.....	39
3.4.1 Approccio Genomico.....	40
3.4.2 Approcci combinati di cellule e geni.....	41
3.4.3 Approcci basati su trascrizione.....	42
3.5 Ingegneria Tissutale e modelli bioibridi.....	43
3.6 Applicazioni cliniche e sfide future.....	45
Conclusioni	48
Sitografia e bibliografia	50

Abstract

Nel seguente elaborato viene trattata la tematica del pacemaker, vista in prima battuta come funzione di autogenerazione elettrica da parte del cuore, con la descrizione dei fenomeni fisiologici alla base di questo fenomeno. Poi successivamente viene data una panoramica sugli studi che hanno portato alla realizzazione dei primi prototipi o dispositivi elettronici utili a sopperire a mancanze o a disturbi legati al sistema di conduzione. In particolare, si evidenzia come la sede dello stimolo, ovvero il nodo senoatriale, sia stata in modo efficiente sostituito da apparecchi biocompatibili e facilmente impiantabili, poiché di piccole dimensioni. Tuttavia, a causa, ad esempio, di alcuni limiti imposti dal consumo di potenza o dal degradarsi della batteria, ci si è chiesti se si potessero trovare delle alternative, altresì utili, per il ripristino dell'attività cardiaca. Per queste ragioni, come suggerito dal titolo, la trattazione di questo elaborato va ad incentrarsi su un ambito diverso ma complementare, quello biologico; in particolare, vengono messi in luce i principali approcci che si sono susseguiti nel corso dei decenni nello studio e nella ricerca per il ripristino dell'autostimolazione del battito, come alternative o partecipazione, all'impianto di dispositivi elettronici. Viene messo il focus sul concetto di Biopacemaker, il quale riassume la commistione che c'è stata e che tuttora si cerca di fortificare tra l'ambito elettronico e quello legato alla biologia, alla genetica ed all'ingegneria tissutale.

Introduzione

Il *pacemaker* è la fonte *autoritmica* naturale del cuore.

Con il presente elaborato si vuole dare un'inquadratura sulle metodologie e gli approcci, che si sono susseguiti nel corso dell'ultimo secolo, per lo studio del pacemaker nelle sue varie sfaccettature, in particolare di come ci sia stata l'esigenza da parte dei ricercatori di una commistione fra diverse branche della scienza e dell'ingegneria.

Nel primo capitolo viene fatta una panoramica sul muscolo cardiaco, sulla sua struttura anatomica, sia a livello macro, che più nel particolare. Si dà rilevanza al sistema di conduzione elettrica auto innescata dal muscolo, con la definizione delle varie branche deputate; in particolare il focus è sull'*origine* di questo meccanismo, ovvero il nodo senoatriale.

Qualora questo sito cardiaco dovesse presentare delle disfunzioni, è necessario ricorrere a dei dispositivi impiantabili che possano farne le veci senza compromettere la normale attività dell'organo.

Pertanto, nel secondo capitolo, viene posta l'attenzione sulle prime invenzioni, che, sfruttando i concetti dell'elettronica conosciuta e già sperimentata, sono riuscite a dare risposta ad una mancanza. Dopo una panoramica storica, si incentra il discorso su come è realizzato un pacemaker elettronico (dandone una classificazione), sui componenti che lo caratterizzano e sulle normative o generalità che vengono applicate ogni qualvolta si voglia impiantare un simil dispositivo.

Nel terzo ed ultimo capitolo, invece si mette in luce il fatto di come ci si sia interrogati nel ricercare e sperimentare approcci differenti ma altresì efficienti, per far fronte a problematiche del sistema di conduzione cardiaco. Queste metodologie hanno come comun denominatore la biologia e la definizione di "*biopacemaker*".

Si è deciso di suddividere questa sezione, in base ai diversi approcci utilizzati, che hanno trovato una dimostrazione pratica, o in laboratorio o a livello clinico. In particolare, si parla della terapia cellulare, con un focus sulle cellule staminali.

Successivamente si considerano i metodi genici e quelli legati al fenomeno della trascrizione; fatto importante da evidenziare perché, attraverso ricombinazioni di questo tipo, ci sono stati studi che hanno dimostrato l'efficacia nel ripristino della stimolazione del battito. Infine, si descrivono i passi in avanti che l'ingegneria dei tessuti ha fatto negli ultimi anni, con il compito di cercare una commistione fra il vasto campo dell'elettronica e il campo della biologia: viene riportato l'esempio del pesce "*bioibrido*".

CAPITOLO 1

Nozioni introduttive sul cuore

1.1. La macrostruttura cardiaca

Il cuore è un organo muscolare, collocato all'interno della cavità toracica, più precisamente sul lato ventrale, situato tra i due polmoni, con l'“apice” a contatto con il diaframma.

Il cuore può essere suddiviso, a livello macroscopico, nelle seguenti componenti:

- *Pericardio*: sacca membranosa ad alta resistività che lo avvolge → Uno strato sottile di liquido pericardico trasparente all'interno del pericardio lubrifica la superficie esterna del cuore, mentre questo batte all'interno della sacca.
- *Miocardio*: è l'essenza stessa del muscolo. Esso è ricoperto da strati esterni e interni di epitelio e tessuto connettivo. Vista dall'esterno, la maggior parte del cuore è costituita dalle spesse pareti muscolari dei ventricoli.
- *Endocardio*: Sottile lamina endoteliale che riveste internamente le cavità cardiache ; liscia, di aspetto bianco splendente, si appoggia ad ogni asperità della parete, modellandosi su colonne muscolari, tendini e lembi valvolari. Ha uno spessore variabile da 50 a 500 mm, maggiore negli atri rispetto ai ventricoli, e nelle zone ove il flusso di sangue è più intenso. È formato da uno strato di cellule endoteliali appiattite e da una lamina sottile di tessuto connettivo ricco di fibre elastiche che lo separa dal miocardio.

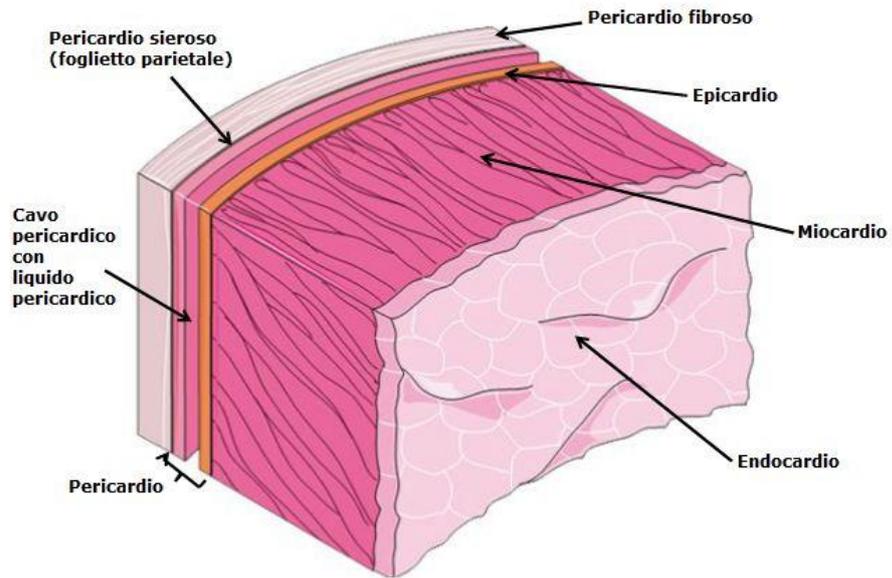


Figura 1: Rappresentazione macroscopica del muscolo cardiaco (<https://www.appuntioss.it/anatomia-corpo-apparato-circolatorio-il-cuore/>)

1.2 Il flusso sanguigno

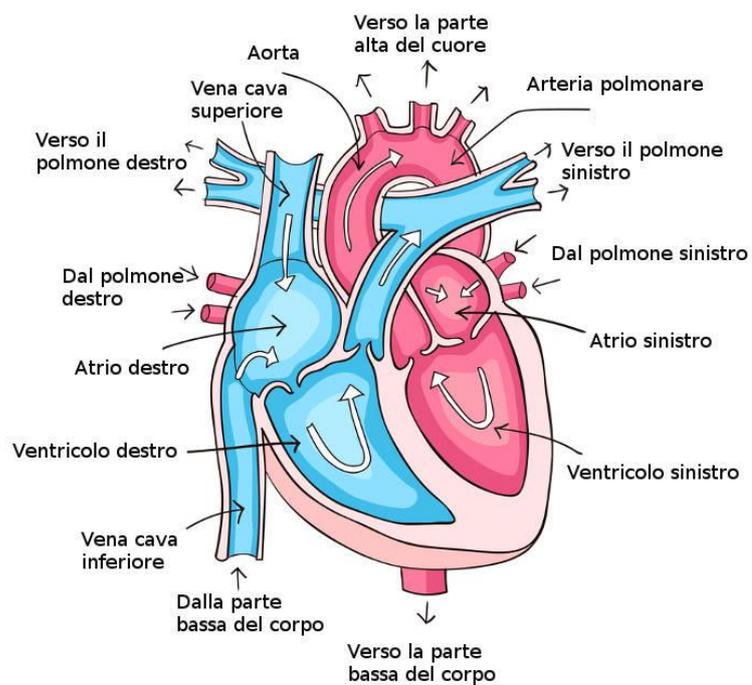


Figura 2: Circolazione sanguigna (<https://healthy.thewom.it/salute/dia-div/>)

Il cuore è il perno della circolazione sanguigna, propulsore del corretto scambio di ossigeno e di anidride carbonica fra i polmoni e le cellule dei tessuti e degli altri organi. È un organo cavo, che si può schematizzare in quattro camere: due atri e due ventricoli, separati tra loro da pareti chiamate setti. Si può dare una migliore visione d'insieme, raggruppando le quattro camere in due semipiani, che consentono di definire due tipi di circolazione sanguigna, quella sistemica e quella polmonare. È importante fare questa distinzione perché il sangue che scorre attraverso i vari distretti del sistema, presenta una determinata quantità di ossigeno o meno. Nello specifico, si osserva, che il sangue povero di O₂, entra nell'atrio destro, il quale, attraverso una valvola detta tricuspide, lo pompa nella camera sottostante, ovvero il ventricolo destro. La pressione esercitata sul fluido, fa sì che esso attraverso la valvola polmonare entri nelle arterie polmonari, le quali lo conducono alle due camere ricche di ossigeno, ovvero i polmoni. A questo punto, il sangue giunge nel semipiano sinistro, in particolare nell'atrio, dal quale, successivamente passerà nel ventricolo attraverso la valvola mitrale (o bicuspidale). Dal ventricolo, il fluido si immergerà nell'arteria più grande del sistema cardiocircolatorio, che è l'aorta. L'aorta si ramifica in una serie di arterie sempre più piccole che, formano la cosiddetta rete di capillari, i quali permetteranno che avvenga il corretto scambio metabolico fra ossigeno ed anidride carbonica. L'unidirezionalità del circolo sanguigno è assicurata dalla presenza delle sopraccitate valvole atrioventricolari (bicuspidale e tricuspide) e dalle valvole semilunari, le quali sono poste fra i ventricoli e le arterie. Ogni ciclo cardiaco ha due fasi: la diastole, il periodo di tempo durante il quale il muscolo cardiaco si rilassa, e la sistole, il periodo durante il quale il muscolo si contrae. Il sangue scorre da aree a pressione più elevata ad aree a pressione più bassa; la contrazione aumenta la pressione nell'interno delle camere cardiache mentre il rilasciamento lo diminuisce. Si possono discutere cinque fasi:

- Diastole tardiva: sia gli atri che i ventricoli sono rilasciati e i ventricoli si riempiono passivamente.
- Sistole atriale: la contrazione dell'atrio spinge una piccola quantità di sangue nei ventricoli.
- Contrazione ventricolare isovolumica: la prima fase della contrazione ventricolare determina la chiusura delle valvole AV (primo tono cardiaco S₁), ma non genera una pressione sufficiente ad aprire le valvole semilunari.

- Eiezione ventricolare: quando la pressione ventricolare aumenta e supera la pressione delle arterie, le valvole semilunari si aprono e il sangue viene eiettato.
- Rilasciamento ventricolare isovolumico: quando i ventricoli si rilasciano, la pressione nei ventricoli diminuisce, il sangue refluisce verso i lembi delle valvole semilunari e ne provoca la chiusura (secondo tono cardiaco S2).

1.3 Il sistema di conduzione cardiaco

Il sistema di conduzione cardiaco è costituito da:

- Nodo seno-atriale (pacemaker fisiologico)
- Tratti internodali (conduzione atriale)
- Nodo atrio-ventricolare
- Sistema di conduzione intraventricolare (fascio di His, tronco comune e branche destra e sinistra)
- Fibre di Purkinje

Il cuore deve contrarsi regolarmente per svolgere la propria attività di pompa e ciò è possibile grazie ad un processo di natura elettrica. Esso, oltre ai collegamenti con il sistema nervoso centrale ed autonomo è dotato di una sua struttura intrinseca di conduzione.

Diversamente dalla maggior parte degli altri muscoli del corpo, la cui attività dipende dal cervello e dal midollo spinale, il cuore è autosufficiente in quanto possiede un proprio stimolatore che genera l'impulso elettrico che determina la contrazione cardiaca (battito).

Lo stimolo che genera la contrazione si origina involontariamente dai centri di controllo posti nel sistema nervoso centrale, nell'encefalo e nel midollo spinale. Esso viene trasportato dal sistema nervoso centrale al cuore attraverso le vie efferenti parasimpatiche e simpatiche.

Questo stimolatore, che si chiama nodo senoatriale, produce l'impulso nervoso che genera la contrazione del cuore. È situato nell'atrio destro, vicino allo sbocco della vena cava superiore. Il nodo senoatriale emette ritmicamente un impulso che depolarizza il muscolo cardiaco adiacente, le onde che ne derivano si propagano

attraverso gli atri fino a raggiungere la seconda struttura di conduzione specifica chiamata nodo atrioventricolare, che si trova nel pavimento dell'atrio destro a sinistra dell'orifizio del seno coronario; la sua estremità è in continuità con il miocardio atriale e con fibre dei tratti internodali.

Lo stimolo giunto nel nodo atrio ventricolare rallenta in modo che la depolarizzazione dei due atri possa essere completata, successivamente, riacquista velocità diffondendosi attraverso il tessuto specializzato nella conduzione, il fascio di His che è la continuazione del nodo atrioventricolare ed è situato nella porzione membranosa e prossimale del setto interventricolare.

Esso si suddivide nelle branche destra e sinistra che decorrono sotto l'endocardio (il pavimento delle cavità ventricolari) lungo le due superfici del setto del cuore:

- la branca sinistra si divide rapidamente formando una larga stria di fascicoli che si dispongono sulla superficie settale del ventricolo sinistro,
- la branca destra si prolunga per un tratto maggiore solitamente fino a ad attraversare la porzione distale del ventricolo destro con un fascio moderatore, mentre le altre parti si estendono sulla superficie endocardica del ventricolo destro.

Perifericamente entrambe le branche del fascio comune si suddividono e formano la rete sub endocardiaca delle fibre di Purkinje, che si estendono nelle pareti ventricolari in rapporto diretto con le fibre della muscolatura ventricolare.

Pertanto, non appena l'impulso elettrico partito dal nodo senoatriale arriva ai ventricoli, il cuore batte ed il sangue scorre per raggiungere tutte le parti del corpo.

Il sistema di conduzione del cuore è composto da cellule miocardiche strutturate in maniera sinciziale (ovvero sono collegate in continuità tra di loro in modo da formare una maglia). Questa struttura consente il rapido trasferimento degli impulsi da una fibra all'altra in modo da armonizzare e accelerare le capacità contrattili miocardiche. Ogni punto del sistema di conduzione elettrico del miocardio può diventare, in caso di bisogno, un pacemaker per garantire la contrattilità del muscolo. La frequenza degli impulsi, allontanandosi dal nodo del seno atriale in direzione dell'apice cardiaco, diventa sempre più bassa. Lo stimolo che parte dal nodo del seno prende il nome di *ritmo sinusale* e propagandosi spegne gli altri centri sussidiari di regolazione del ritmo cardiaco che si trovano lungo il sistema di conduzione che sta a valle del nodo seno atriale. Esiste, inoltre, un ulteriore gruppo di fibre atriali costituito dal fascio di Bachmann e dalle vie internodali di conduzione dell'atrio destro.

Nelle eventualità in cui ci sia un cattivo funzionamento del nodo del seno, il nodo atrioventricolare ne vicaria la funzione e lo stimolo cardiaco da questo punto ha una frequenza più bassa del ritmo sinusale e prenderà il nome di *ritmo giunzionale*. Al cuore arrivano continui segnali dal sistema nervoso che gli permettono di adattare la sua potenza e il suo lavoro alle richieste variabili dell'organismo che per esempio deve avere a disposizione maggior ossigeno per far fronte ad uno sforzo.

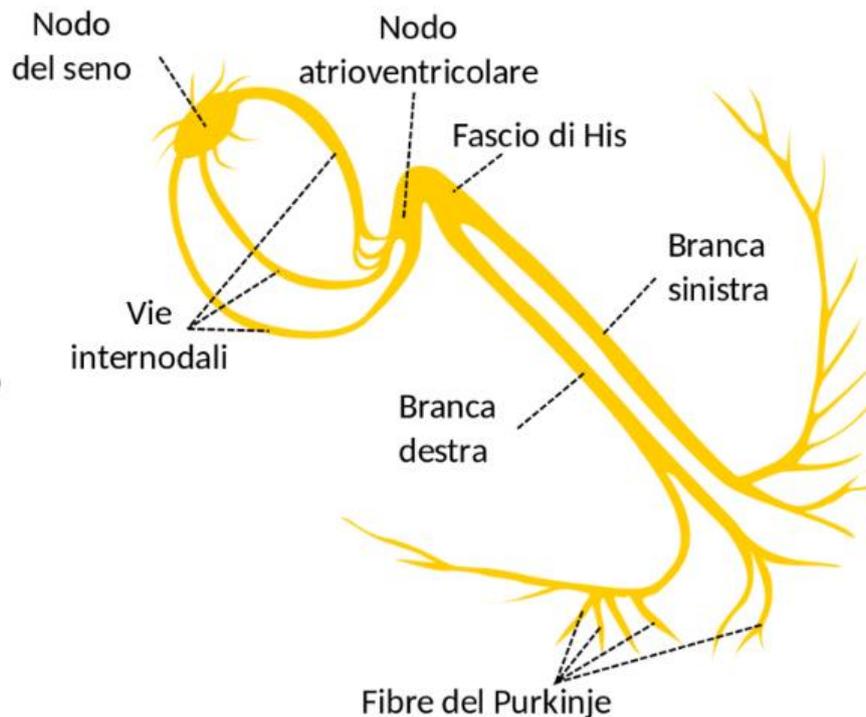


Figura 3: Schema del sistema di conduzione (<https://www.fibrillazioneatriale.it/fibrillazione-aritmie/15-ecg/52-anatomia-del-sistema-di-conduzione.html>)

1.4. Il potenziale d'azione (PA)

La cellula miocardica, per la sua complessa organizzazione, mantiene differenze di concentrazione ionica tra l'interno e l'esterno, determinando una differenza di potenziale elettrico di membrana. Nelle cellule eccitabili, la variazione della permeabilità delle diverse specie ioniche causa un cambiamento al potenziale elettrico della membrana plasmatica. Dunque, il PA consiste nella variazione del potenziale di membrana determinata dal trasporto di diversi ioni. Il PA è un fenomeno che si innesca

se e solo se lo stimolo ha un'intensità sufficiente a superare la soglia di depolarizzazione della cellula. Fra le varie regioni del cuore, che generano differenti PA, si distinguono le cellule contrattili da quelle autoritmiche.

1.5 Il nodo senoatriale

Il nodo seno-atriale (NSA) o nodo di Keith-Flack descritto per la prima volta in un articolo nel 1907 (*Flack et al. 1907*), è un piccolo componente del complesso sistema neuro-elettrico cardiaco, il quale regola autonomamente il battito. Esso è situato nella parte posteriore della giunzione dell'atrio destro; con la vena cava superiore, presenta una forma di mezzaluna, lunga 15 mm e larga meno di 5 mm. Si distingue una parte più voluminosa, detta testa, situata nella parte superiore dell'atrio destro, e una parte più sottile, detta coda, localizzata a destra, inferiormente. È vascolarizzato dall'arteria che origina dalla coronaria destra nel 60% dei casi o dall'arteria circonflessa nel restante 40%. Il nodo risulta costituito da abbondante tessuto connettivo che circonda piccole cellule miocardiche, con scarse miofibrille.

1.5.1.1 Cellule contrattili

Nelle cellule contrattili, la fase di depolarizzazione rapida del potenziale d'azione è il risultato dell'ingresso di Na^+ e la successiva fase di ripolarizzazione è causata dallo ione K^+ , che esce dalla cellula. A differenza dagli altri tipi di PA, nelle cellule miocardiche esso è prolungato dall'ingresso di Ca^{2+} . Si può studiare il processo ciclico attraverso le seguenti fasi.

Fase 4: Potenziale di membrana a riposo

Le cellule contrattili miocardiche hanno un potenziale di riposo stabile, pari a -90 millivolt.

Fase 0: depolarizzazione

Quando un'onda di depolarizzazione diffonde in una cellula contrattile, attraverso le giunzioni comunicanti, il potenziale di membrana diventa più positivo. I canali del Na^+ voltaggio-dipendenti si aprono, permettendo al sodio di entrare nella cellula e di depolarizzarla rapidamente. Si arriva ad un voltaggio pari a +20 millivolt, prima che i canali si chiudano.

Fase 1: ripolarizzazione iniziale

Quando i canali del Na^+ si chiudono, la cellula comincia a ripolarizzarsi mentre il K^+ esce attraverso i canali del K^+ aperti.

Fase 2: il plateau

La ripolarizzazione iniziale è molto breve. Il potenziale d'azione raggiunge, dopo circa 100 millisecondi, un plateau, risultato di due eventi: la diminuzione della permeabilità al K^+ e l'aumento della permeabilità al Ca^{2+} . I canali del Ca^{2+} voltaggio-dipendenti attivati dalla depolarizzazione si sono aperti lentamente durante le fasi 0 e 1. Quando, alla fine, si aprono completamente, il Ca^{2+} entra nella cellula. Nello stesso tempo, alcuni canali rapidi del K^+ si chiudono. La combinazione dell'ingresso di Ca^{2+} e della ridotta uscita di K^+ fanno sì che il potenziale d'azione raggiunga il cosiddetto plateau.

Fase 3: ripolarizzazione rapida

Il plateau termina quando i canali del Ca^{2+} si chiudono e la permeabilità al K^+ aumenta ancora una volta. I canali lenti del K^+ , responsabili, di questa fase sono simili a quelli nei neuroni: essi sono attivati da una depolarizzazione, ma hanno una cinetica di apertura lenta. Quando questi canali lenti si aprono, il K^+ esce velocemente, riportando la cellula al suo potenziale di riposo (Fase 4).

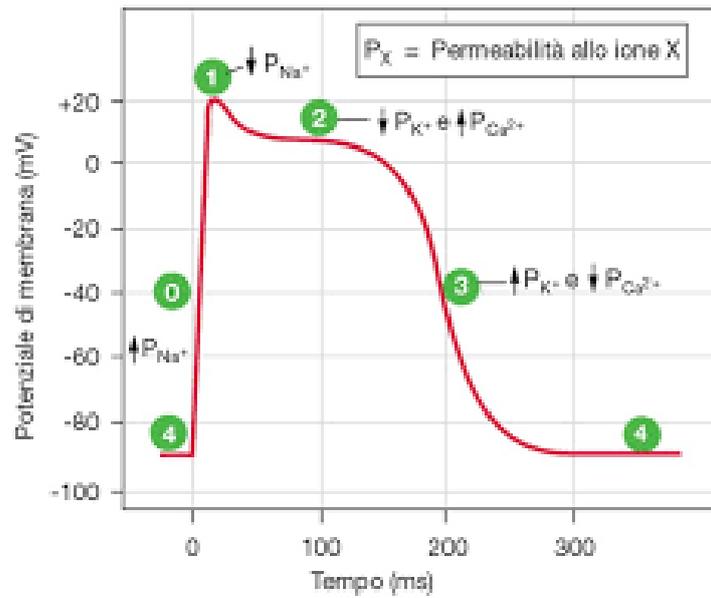


Figura 4: Curva del potenziale di membrana per le cellule contrattili
<https://www.medicinadiprecisione.unicampania.it/attachments/category/71/cuore.pdf>

1.5.1.2. Cellule autoritmiche miocardiche

Questo tipo di cellule hanno la capacità di generare spontaneamente PA, in assenza di stimoli provenienti dal sistema nervoso, perché il loro potenziale di membrana è instabile: parte da -60 millivolt ed arriva al valore soglia di -40 millivolt. Questo potenziale di membrana è detto potenziale pacemaker. Ogni qualvolta un potenziale pacemaker depolarizza la cellula portandola a tale valore di soglia, la cellula autoritmica è in grado di innescare un PA. Attualmente, si ritiene che le cellule autoritmiche contengano canali diversi da quelli degli altri tessuti eccitabili. Si può riassumere il comportamento instabile di questo tipo di cellule, in questo modo:

Fase 1

Quando il potenziale della membrana cellulare raggiunge il valore più negativo, al valore di inizio ciclo (-60 millivolt), si aprono i canali I_f (“canali della corrente *funny*”), i quali sono permeabili sia al K^+ , che al Na^+ . I canali I_f appartengono alla famiglia dei canali *HCN*, o canali attivati da iperpolarizzazione e regolati da nucleotidi ciclici. Quando questi si aprono, a potenziali di membrana negativi, il Na^+ che entra, supera quantitativamente, il K^+ che sta uscendo. L’ingresso netto di cariche positive

depolarizza lentamente la cellula autoritmica. Nel momento in cui il potenziale di membrana diventa più positivo, i canali I_f si chiudono gradualmente, con simultanea apertura di alcuni canali del calcio. Il conseguente ingresso di Ca^{2+} continua la depolarizzazione e il potenziale di membrana si sposta progressivamente verso il valore soglia (-40 millivolt), raggiunto il quale, si innesca un'ulteriore apertura dei canali Ca^{2+} .

Fase2

Il Ca^{2+} entra velocemente nella cellula, cosicché possa aver inizio la fase di depolarizzazione rapida del potenziale d'azione. Questo avviene perché si verifica l'apertura di molti canali del calcio.

Fase3

Una volta raggiunto il plateau della curva, che si attesta all'incirca sui 18/19 millivolt, i canali del Ca^{2+} si chiudono, mentre si aprono i canali lenti del K^+ . Ne consegue l'efflusso di K^+ che risulta, quindi, responsabile della fase di ripolarizzazione del potenziale d'azione autoritmico.

La velocità alla quale le cellule pacemaker si depolarizzano determina la frequenza alla quale il cuore si contrae. L'intervallo di tempo tra i potenziali d'azione può essere modificato, alterando la permeabilità delle cellule autoritmiche ai diversi ioni, il che a sua volta induce una variazione nella durata del potenziale pacemaker.

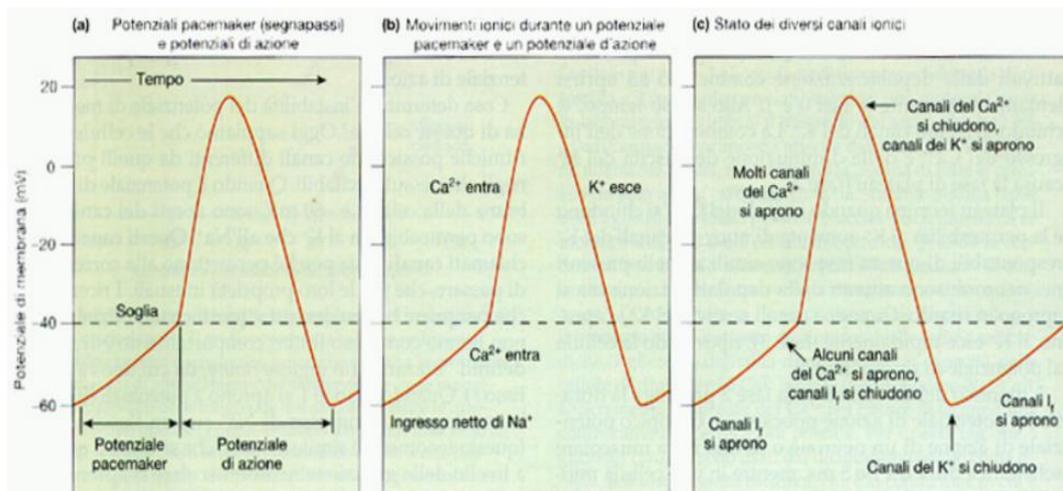


Figura 5: Curva del potenziale di membrana per le cellule

autoritmiche (<https://www.unisalento.it/documents/20152/873373/19+attivita%20elettrica+del+cuore.pdf/0f01fd9d-50a0-27d4-7065-23cea91d63af?version=1.0>)

1.6 Ruolo del sistema nervoso autonomo sulla frequenza cardiaca

Benché la frequenza sia generata autonomamente dalle cellule autoritmiche nel nodo SA, essa è modulata da segnali nervosi ed ormonali.

Controllo Parasimpatico

Il neurotrasmettitore parasimpatico acetilcolina (ACh) è deputato al rallentamento della frequenza cardiaca, attivando i cosiddetti recettori colinergici muscarinici che influenzano i canali del potassio e del calcio nella cellula pacemaker. La permeabilità allo ione potassio aumenta, iperpolarizzando la cellula, in modo che il potenziale pacemaker inizi ad un valore più negativo. Nello stesso tempo, la permeabilità allo ione calcio della cellula pacemaker diminuisce, il che causa, pertanto una diminuzione nella velocità di depolarizzazione del potenziale pacemaker. La combinazione dei due effetti fa sì che la cellula impieghi più tempo a raggiungere la soglia, ritardando l'inizio del potenziale d'azione nella cellula pacemaker e rallentando la frequenza cardiaca (Silverthorn, 2017).

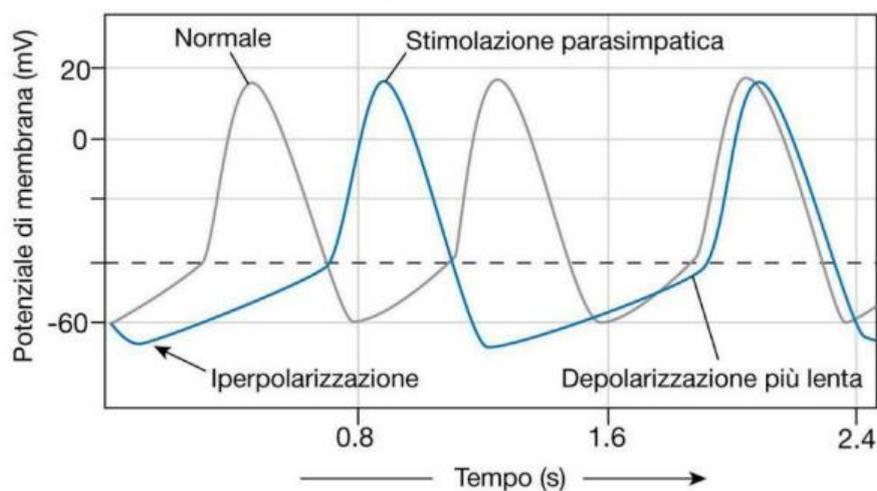


Figura 6: Interazioni sul potenziale di membrana da parte del sistema parasimpatico(<http://www.publichealth.it/wp-content/uploads/2020/12/DISPOSITIVI-TERAPEUTICI-E-PROTESICI-MEDICINA-1.pdf>)

Controllo simpatico

In questa situazione si ha l'effetto contrario rispetto al sistema parasimpatico, ovvero una stimolazione delle cellule pacemaker, tende a far accelerare il ritmo cardiaco. Le catecolamine noradrenalina e adrenalina aumentano il flusso ionico sia attraverso i canali I_f sia attraverso i canali del calcio. L'ingresso più rapido di cationi accelera la frequenza di depolarizzazione delle cellule pacemaker, facendo sì che la cellula raggiunga la soglia più velocemente e aumentando la frequenza di innesco del potenziale d'azione. Quando la cellula pacemaker innesca i potenziali d'azione più rapidamente, la frequenza cardiaca aumenta. Le catecolamine esercitano la loro azione legandosi e attivando i recettori adrenergici β_1 localizzati sulle cellule autoritmiche. I recettori β_1 utilizzano il sistema del secondo messaggero AMPc per alterare la proprietà di trasporto dei canali ionici. Nel caso dei canali I_f , che sono canali nucleotidi ciclici-dipendenti, l'AMPc stesso è il messaggero. Quando l'AMPc si lega per aprire i canali I_f , essi rimangono aperti più a lungo. L'aumento della permeabilità agli ioni Na^+ e Ca^{2+} durante la fase di potenziale pacemaker, accelera la depolarizzazione e la frequenza cardiaca (Silverthorn, 2017).

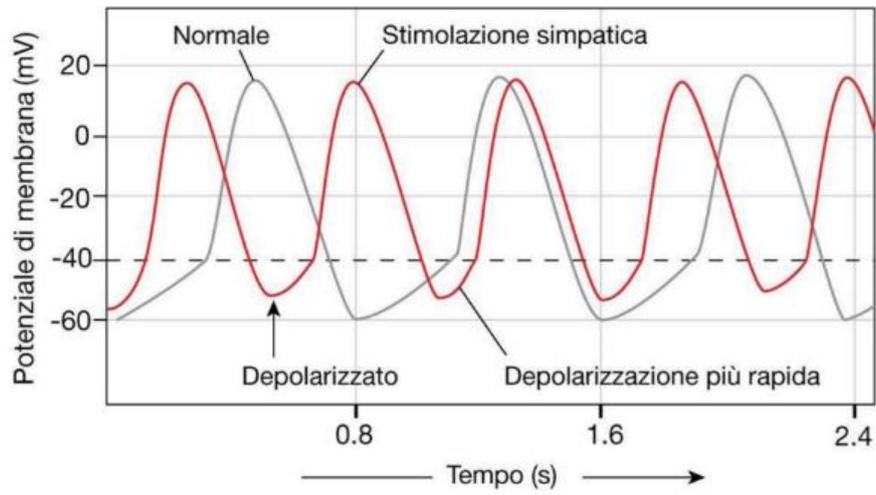


Figura 7: Interazioni sul potenziale di membrana da parte del sistema simpatico (<http://www.pubblichealth.it/wp-content/uploads/2020/12/DISPOSITIVI-TERAPEUTICI-E-PROTESICI-MEDICINA-1.pdf>)

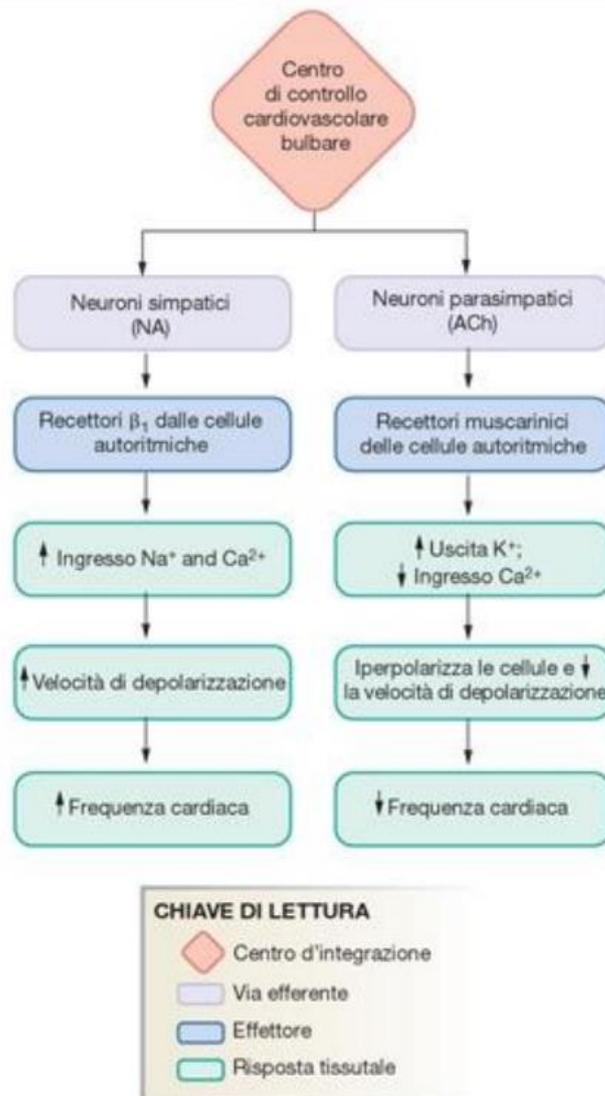


Figura 8: Mappa concettuale riassuntiva sull'influenza dei due sistemi (<http://omero.farm.unipi.it/matdidFarm/126/Genovesi%20Malattie%20del%20Cuore%20basi%20di%20Anatomia%20e%20Fisiologia.pdf>)

1.7 Disfunzione del nodo del seno

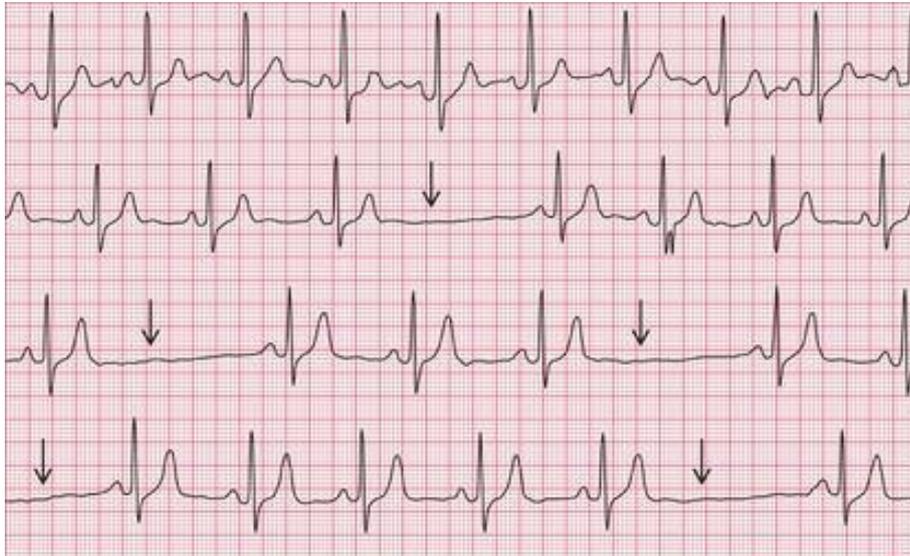


Figura 9: tracciato ECG caratterizzante questa patologia

(<https://www.informazionimediche.com/medicina-interna/sindrome-del-nodo-del-seno-sintomi-cause-e-cure.html>)

Quando si parla di *disfunzione o sindrome del nodo del seno*, si fa riferimento ad una patologia del nodo del seno atriale che crea scompensi al ritmo cardiaco (aritmie) perché influisce sul pacemaker naturale del cuore, impedendo il suo corretto funzionamento. Una persona con sindrome del seno malato può avere ritmi cardiaci troppo veloci, troppo lenti, o alternati da lunghe pause, e in alcuni casi, una combinazione alternata di tutti questi problemi del ritmo cardiaco. La sindrome è relativamente rara, ma il rischio di sviluppare questa condizione aumenta con l'età. Molte persone con sindrome del seno malato hanno bisogno di un pacemaker per permettere al cuore di pulsare con un ritmo regolare. Si può fare la seguente schematizzazione:

- Bradicardia sinusale inappropriata: corrisponde all'abbassamento della frequenza cardiaca molto di sotto dei 60 battiti al minuto.
- Alternanza di bradicardia e tachiaritmie atriali: battito che passa da ritmo lento a ritmo veloce con irregolarità.

- Pausa o arresto sinusale: temporaneo arresto dell'attività del nodo del seno.
- Blocco seno-atriale in uscita: il nodo seno-atriale si depolarizza, ma la conduzione degli impulsi al tessuto atriale è alterata.

L'elettrostimolazione cardiaca ha dimostrato nei pazienti con malattia del nodo del seno sintomatica effetti benefici su endpoint clinici maggiori, quali il miglioramento della qualità di vita, la prevenzione della fibrillazione atriale e dell'ictus, la riduzione delle ospedalizzazioni e verosimilmente la sopravvivenza. L'utilizzo di pacemaker "rate-responsive" ha dimostrato benefici clinici ripristinando un corretto incremento di frequenza durante esercizio (cit. https://aiac.it/wp-content/uploads/2018/05/02_linee-guida.pdf).

Capitolo 2

Il Pacemaker Elettronico

2.1 L'esigenza di un dispositivo "artificiale"

Il cuore è un muscolo dotato di un complesso sistema elettrico che produce e conduce gli stimoli necessari a contrarre le sue camere, nella sequenza appropriata, per pompare il sangue in tutto il corpo. In condizioni di riposo, la frequenza di contrazione si avvicina ai 60/80 battiti al minuto. L'impianto elettrico del cuore può avere dei problemi sia nella genesi dell'impulso elettrico (bradicardia patologica) che nella conduzione dello stesso attraverso le camere cardiache. Il che ha reso necessario lo studio e la progettazione di dispositivi che potessero regolare e ripristinare il corretto funzionamento del muscolo.

2.1.1. Cenni storici

I primi studi sul *pacemaker artificiale* risalgono agli anni '20 del '900, quando due medici, Mark C. Lidwill (anestesista) e Albert S. Hyman (cardiologo) sono stati in grado di stimolare il cuore tramite un ago inserito direttamente nel muscolo cardiaco.

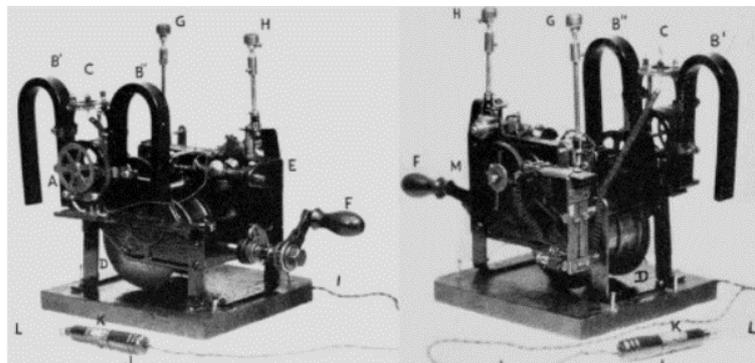


Figura 10: Primi prototipi (https://www.researchgate.net/figure/Albert-Hymans-artificial-pacemaker-the-two-photos_fig14_221864919)

Nel 1950, l'ingegnere canadese John Hopps, insieme ai ricercatori Wilfred Bigelow e John Callaghan, realizzò quello che è considerato il primo pacemaker elettronico esterno, partendo da uno studio sulla tartaruga, proseguito poi sul cane. Nel 1952, a Boston, il cardiologo Paul Maurice Zoll inventò il primo pacemaker *esterno a stimolazione fissa*, per il trattamento del blocco cardiaco nell'uomo. Il suo metodo consisteva nell'applicazione di elettrodi fissati con una cinghia, sul petto, sopra il cuore. I suoi primi esperimenti furono fatti sui cani. Zoll decise di provare l'approccio *esofageo*, poiché intercorre una precisa relazione anatomica tra l'esofago ed il cuore. Sebbene non del tutto esterna, la tecnica era promettente perché impediva la toracotomia (apertura chirurgica del torace). Furono condotti ulteriori esperimenti per raffinare e semplificare la procedura, identificare ed eliminare le complicazioni più rischiose, e definire le sue indicazioni e limitazioni cliniche. Il metodo fu provato per la prima volta in un uomo poco prima della pubblicazione del suo articolo. Il paziente aveva un blocco cardiaco completo. Egli applicò stimoli di due millisecondi a 75-150 volt attraverso due piastre metalliche applicate sulla parete toracica anteriore.

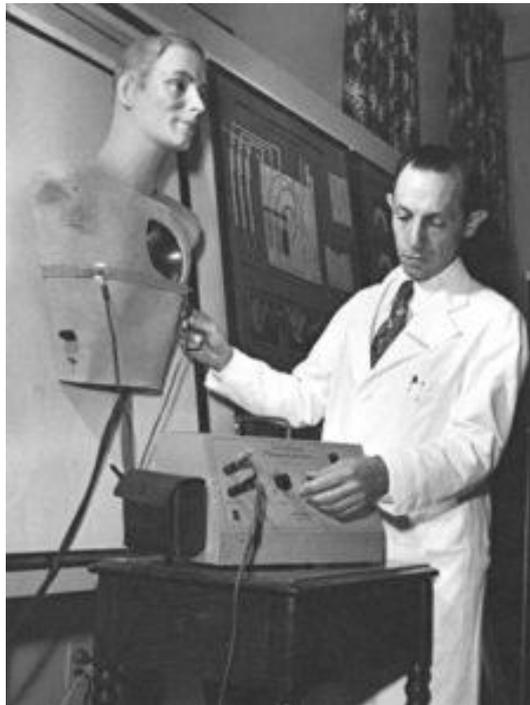


Figura 11: Il Pacemaker di Zoll (<http://www.storiadellamedicina.net/breve-storia-del-pacemaker/>)

Con il progredire della miniaturizzazione tecnologica, gli svedesi Ake Senning e Rune Elmqvist, ne beneficiarono in ambito clinico. Il loro *generatore di impulsi* dalle

dimensioni ridotte fu impiantato nel 1958. Era necessaria una toracotomia per suturare i due elettrodi nel miocardio del ventricolo sinistro.

Il passo successivo fu quello di sostituire gli elettro-stimolatori, con alcuni modelli, ancor più piccoli. Il chirurgo C. Walton Lillehei si rivolse ad Earl E. Bakken (fondatore della compagnia medica “Medtronic”), per commissionargli un nuovo elettro-stimolatore. Qualche giorno dopo, Bakken portò a Lillehei un generatore di impulsi a batterie, semplice e di dimensioni ridotte. Lillehei collegò i fili degli elettrodi al cuore del paziente, e regolò durata e frequenza delle scariche elettriche.

Nel 1960, dopo due anni di sperimentazione su animali da laboratorio, William M. Chardack e Andrew A Gage, presso il VA Hospital di Buffalo (USA), introdussero l’era del *pacemaker impiantabile*, congegnato dall’ingegnere Wilson Greatbatch, caricato a batteria e funzionante con l’ausilio di un transistor. Grazie a lui nasce così il pacemaker moderno, piccolo, impiantabile con una semplice procedura, duraturo e sicuro. Un grande merito, attribuibile a Greatbatch fu quello di riuscire a far comprendere alla nascente comunità di medici specializzati in elettrostimolazione cardiaca i pregi delle pile al litio-iodio rispetto a quelle al mercurio.

2.2 L’architettura del pacemaker

I sistemi pacemaker moderni consistono in una scatola che include il generatore di impulsi e i sensori per il monitoraggio associati ai circuiti logici e alla batteria; questa scatola è collegata agli elettrodi attraverso dei cavi di connessione che hanno il compito di prelevare i segnali dal cuore e condurli all’elettronica e portare gli stimoli elettrici dall’elettronica al cuore. Tali fili conduttori, realizzati perlopiù in acciaio inossidabile ed avvolti a formare dei coil, la cui struttura consente di convertire i movimenti del corpo e del cuore in movimenti torsionali del cavo, che il metallo può facilmente tollerare, sono rivestiti di un materiale isolante, il più delle volte gomma siliconica e poliuretano. Gli elettrodi sono realizzati solitamente in leghe. La preparazione della superficie è molto importante poiché microfratture potrebbero diventare siti di correnti locali che innescano la corrosione. Una capacità in serie è

inserita per eliminare ogni componente continua della corrente che fluisce. L'uso di materiali porosi per la fabbricazione degli elettrodi è opportuno per migliorare i problemi legati all'incapsulamento degli elettrodi dovuto alla crescita di tessuto sulla loro superficie.

2.3 Componenti di un pacemaker

I pacemaker moderni sono costituiti da un generatore di impulsi impiantabile (sigla IPG), che è il fulcro dell'elettronica del dispositivo, da una batteria e da uno o due elettrocateri. Il generatore di impulsi dà luogo ad una corrente elettrica, determinabile mediante la legge di Ohm: $I=V/R$, dove con V si indica la differenza di potenziale generata dal pacemaker e con R, la resistenza intrinseca degli elettrocateri. Questa corrente, mediante i filamenti (gli elettrocateri), viene erogata al miocardio, in particolare all'atrio e al ventricolo destro, tramite una vena. Il tessuto miocardico non è eccitabile solo dai potenziali d'azione originati nel nodo del seno, ma anche da stimoli elettrici provenienti dall'esterno che consentono alla cellula di raggiungere il valore di soglia; pertanto, il principio alla base del pacemaker è quello di sfruttare la suddetta corrente per andare a depolarizzare le cellule a contatto con la punta dell'elettrocateri e generare così un potenziale d'azione, in grado di diffondersi all'interno del miocardio.



Figura 12: dimensioni e componenti di un moderno pacemaker(<https://it.wikipedia.org/wiki/Pacemaker>)

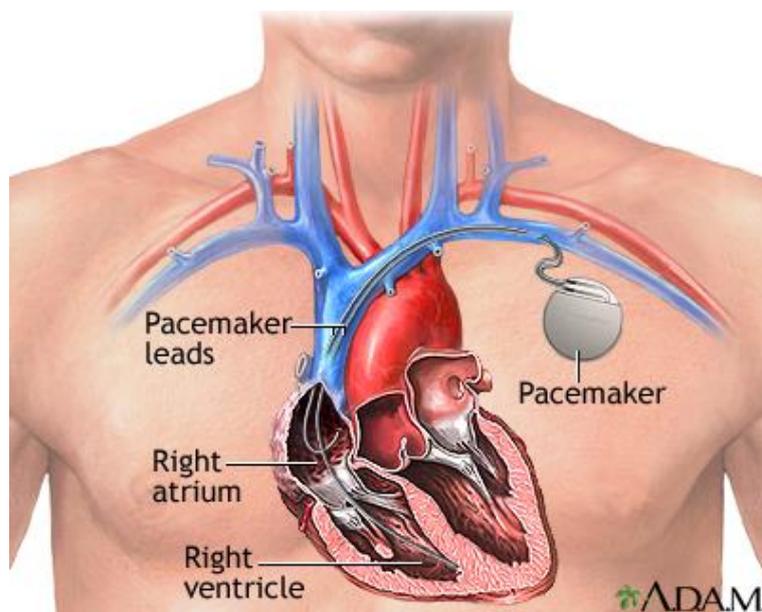


Figura 13: Visione d'insieme dopo l'impianto di pacemaker (<https://medlineplus.gov/ency/article/007369.htm>)

Le principali caratteristiche cui deve dare risposta un pacemaker moderno sono le seguenti:

- Rilevare il segnale spontaneo del cuore: sensing
- Stimolare efficacemente il cuore: pacing
- Rispondere ad una richiesta dell'organismo accrescendo la frequenza di stimolazione (rate modulation)

Si è soliti utilizzare un codice universale per definire il tipo e le modalità di funzionamento: esso viene chiamato NBG, la cui sigla comprende l'acronimo di due società internazionali che sono la *North American Society of Pacing and Electrophysiology* (NAPSE) e la *British Pacing and Electrophysiology Group* (BPEG). N corrisponde a North, B corrisponde a British e G corrisponde a Group (NBG).

Position I	Position II	Position III	Position IV	Position V
Chamber(s)Paced	Chamber(s)Sensed	Response to Sensing	Programmability	Antitachydysrhythmia Functions
O = None	O = None	O = None	O = None	O = None
A = Atrium	A = Atrium	T = Triggered	P = Simple	P = Pacing
V = ventricle	V = ventricle	I = Inhibited	M = Multiprogrammable	S = Shock
D = Dual (A+V)	D = Dual (A+V)	D = Dual (T+I)	C = Communicating	D = Dual (P+S)

Tabella 1: Codice NBG con i vari indici e funzionalità(<https://litfl.com/pacemaker-rhythms-normal-patterns/>)

Grazie a questa tabella composta da cinque campi, si possono classificare univocamente i dispositivi e andare a descriverne la funzionalità. Ad esempio DADRO sta per:

- D: il pacemaker è in grado di stimolare sia gli atri che i ventricoli.

- A: il pacemaker è in grado di rilevare l'attività cardiaca intrinseca solo negli atri.
- D: il pacemaker è in grado di attivare la stimolazione e di inibirsi in risposta agli eventi rilevati.
- R: il pacemaker è in grado di modulare la frequenza.
- O: Non è un pacemaker multi-sito.

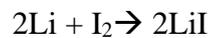
Nella pratica clinica si è soliti utilizzare soltanto i primi tre campi.

2.3.1 Generatore di impulsi (IPG)

Tutti i moderni generatori di impulsi impiantabili hanno un indicatore di sostituzione elettiva (ERI) che avvisa il medico dell'imminente esaurimento della batteria e consente un tempo adeguato alla sostituzione del dispositivo. In genere, questo indicatore è progettato per essere visualizzato almeno tre mesi prima che la tensione della batteria scenda a un livello tale da provocare una stimolazione irregolare, una perdita di acquisizione o la perdita di altre funzioni critiche. Molti dispositivi più recenti sono conformi alle norme CENELEC (Comitato europeo per la standardizzazione elettrotecnica). Per i pacemaker, lo standard richiede un tempo di sostituzione consigliato (RRT) tale che almeno il 95% dei dispositivi abbia un periodo di servizio prolungato (PSP) di almeno 180 giorni (Auricchio et al. 2016). Al generatore di impulsi, si aggiunge un circuito di telemetria che svolge la funzione di scambio di informazioni con il *programmer*. Lo scambio di informazioni avviene grazie ad un'antenna RF e ad un decoder RF che lavorano a circa 300Hz. Con la telemetria real-time il pacemaker dà informazioni, in funzione del tempo, su ampiezza dell'impulso, durata dell'impulso, impedenza degli elettrocateri, impedenza e livello di carica della batteria. Il programmer è in grado di testare il dispositivo e modificare i parametri programmati inviando e ricevendo sequenze codificate, anche grazie all'utilizzo di uno specifico software.

2.3.2 Batteria

Ai tempi dello sviluppo dei primi pacemaker le batterie con più lunga durata prodotte erano le batterie zinco/mercurio. Esse furono adottate nei pacemaker, ma ancora alla fine degli anni Settanta la loro durata media era di soli due anni. Inoltre, connesso ad esse vi era un secondo problema legato alla liberazione di idrogeno gassoso ad alta pressione, con l'impossibilità di creare una cella per la batteria sigillata ermeticamente. Con l'avvento delle batterie al litio, nel 1985, che non producono alcun gas, si è riusciti a costruire celle sigillate ermeticamente. La reazione chimica che regge queste batterie, coinvolge il litio e lo iodio ed è data da:



Le batterie al litio possiedono inoltre un tempo di decadimento caratteristico molto lento che consente il monitoraggio del loro stato in un normale check-up o la pianificazione di una loro eventuale sostituzione.



Figura 14: Batteria al Litio

(http://www.soc.chim.it/sites/default/files/chimind/pdf/2006_3_110_ca.pdf)

2.3.3 Cavi ed Elettrocateri

I cavi del pacemaker sono conduttori racchiusi all'interno di materiale isolante. La maggior parte dei dispositivi utilizza la stimolazione bipolare, ovvero la punta dell'elettrocateri è dotata di due elettrodi: anodo e catodo. Il generatore di impulsi applica una differenza di tensione tra l'anodo e il catodo, che si traduce in elettroni che fluiscono dal primo al secondo. Questi elettroni depolarizzano il miocardio e innescano un potenziale d'azione che si diffonderà attraverso il miocardio. Gli elettrocateri vengono utilizzati anche per registrare l'attività elettrica. Questa funzione è denominata sensing.

I Pacemaker possono essere suddivisi in più categorie, in base alle regioni cardiache a cui sono connessi tramite gli elettrocateri (cit. <https://www.sismedit.com/pacemaker/#:~:text=Pacemaker%20monocamerale%3A%20trasporta%2C%20tramite%20un,dalla%20maggior%20parte%20dei%20pazienti.>):

- Pacemaker monocamerale: trasporta tramite un elettrocateri, impulsi elettrici al ventricolo destro del cuore.
- Pacemaker bicamerale: trasporta impulsi elettrici ad entrambe le porzioni di muscolo cardiaco destro, per regolarne il ritmo delle contrazioni in contemporanea. Le contrazioni consentono al sangue di fluire correttamente dall'atrio al ventricolo.
- Pacemaker biventricolare: ha tre derivazioni collegate all'atrio destro e a entrambi i ventricoli. La stimolazione biventricolare, chiamata anche terapia di risincronizzazione cardiaca, è per chi soffre di insufficienza cardiaca.



Figura 15: Elettrocatteteri (<https://curarsi.palermoviva.it/il-pacemaker-cardiaco-come-fatto-e-come-funziona/elettrocatteteri-pacemaker/>)

2.4 Chirurgia

L'impianto di pacemaker consiste in una piccola incisione nella parte alta del petto per permetterne l'inserimento, una sorta di tasca. Gli elettrocatteteri vengono direzionati verso il cuore attraverso le vene identificate nella zona di incisione. Una volta inseriti, questi ultimi vengono guidati mediante fluoroscopia (raggi x) verso le camere cardiache e posizionati nel punto in cui si ottengono i migliori parametri di funzionalità elettrica. Successivamente vengono fissati al cuore e collegati al pacemaker, di cui si imposta la corretta programmazione. L'intervento può durare un tempo compreso tra i 45 e i 90 minuti, al termine dei quali l'incisione toracica viene richiusa utilizzando dei fili di sutura riassorbibili (salvo diversa necessità).

Nella tecnica endocardica transvenosa, la procedura viene eseguita in tre fasi chirurgiche:

- Esposizione chirurgica della vena
- Introduzione dell'elettrodo
- Applicazione e impianto del generatore del pacemaker.

2.4.1 Esposizione chirurgica della vena

La procedura viene generalmente eseguita in anestesia locale, il paziente si trova in posizione supina su una speciale tabella operativa trasparente ai raggi X. Dopo la disinfezione di un'area adeguatamente ampia di pelle, il paziente viene coperto nel modo consueto con tende sterili, mantenendo il campo di funzionamento più piccolo possibile.

L'estremità di ciascun conduttore è impiantata in una delle camere cardiache, e l'altra estremità è collegata al dispositivo pacemaker permanente. Questo dispositivo viene quindi analizzato dal cardiologo per assicurarsi che funzioni correttamente. Il pacemaker è nascosto nella tasca fatta nel petto, e alla fine di tutto viene ricucita. In generale, questa procedura non dura più di un'ora o due (*Brattoli Luca, "Elettrofisiologia del cuore", Alma Mater Studiorum-Università di Bologna, 2016/2017*).

2.4.2 Posizionamento intracardiaco dell'elettrodo del pacemaker

Una volta incisa la vena, questa viene legata e occlusa distalmente rispetto all'incisione. L'incisione è piuttosto allungata e ingrandita con l'aiuto di una pinza o di un morsetto a punta liscia. Poi, sotto controllo fluoroscopico, l'elettrodo del catetere viene fatto avanzare lungo la vena delicatamente e senza applicare alcuna forza.

Al fine di migliorare il controllo del catetere, viene inserito un filo guida (stylet) prima della sua introduzione nella vena. Questo filo "guida" è leggermente angolato fino a circa 25 gradi nella punta. Di norma, il catetere può essere manovrato facilmente nell'atrio destro tramite la vena cava superiore sotto il controllo fluoroscopico (*Brattoli Luca, "Elettrofisiologia del cuore", Alma Mater Studiorum-Università di Bologna, 2016/2017*).

2.4.3 Applicazione e impianto del generatore del pacemaker

Il posizionamento del pacemaker dipende dalla vena utilizzata per l'elettrodo. Se è stata selezionata la vena giugulare interna o esterna, o la foratura succlavia, è necessario eseguire un'incisione separata per il posizionamento del pacemaker. Se è stata scelta la vena cefalica o sovrascapolare, il generatore di impulsi può essere posizionato sotto il pettorale muscolare o sotto la fascia del maggiore pettorale. In generale, è necessario

raccomandare un posizionamento profondo in quanto il generatore di impulsi è un corpo estraneo che può risultare soggetto ad infezione (Brattoli Luca, “Elettrofisiologia del cuore”, Alma Mater Studiorum-Università di Bologna, 2016/2017).

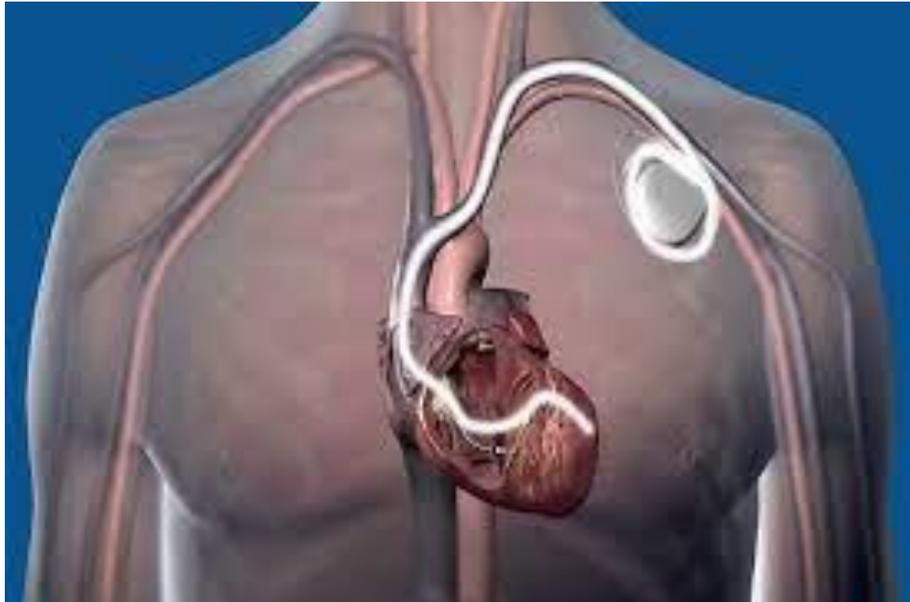


Figura16: Impianto dispositivo(<https://www.cardiologiaoggi.com/impianto-di-pacemaker-o-defibrillatore-rischi-e-complicanze/>)

2.5 Conseguenze Cliniche

In seguito all'intervento il paziente deve restare a letto per sei ore, al termine delle quali viene eseguita una radiografia del torace di controllo (cit. <https://privato.policlinicogemelli.it/approfondimenti/pacemaker/#:~:text=L'impianto%20di%20pacemaker%20si,inserimento%2C%20una%20sorta%20di%20tasca.>).

Le dimissioni normalmente avvengono il giorno successivo all'operazione. Il chirurgo, a seguito dell'impianto, indica le successive visite di controllo in base alla condizione clinica del paziente. Normalmente il primo controllo viene effettuato a distanza di circa un mese dall'impianto. La frequenza dei controlli, normalmente 1/2

volte l'anno, è dettata dalle caratteristiche cliniche del paziente. La data di ogni controllo viene programmata al termine della visita precedente. Al termine della durata della batteria, viene programmata la sostituzione del pacemaker. I moderni pacemaker consentono, previa programmazione apposita dello stesso, anche l'esecuzione di esami radiologici prima ritenuti controindicati nei suoi portatori, ad esempio la risonanza magnetica.

Il controllo del pacemaker viene eseguito ad intervalli prestabiliti, in genere ogni sei mesi; solitamente si esegue presso il centro in cui è stato impiantato, ed è finalizzato ad ottenere informazioni sul funzionamento dello stimolatore, variazione dei parametri di stimolazione in base alle esigenze cliniche, controllo della carica della batteria, la cui scarica è prevedibile con molti mesi di anticipo. Usualmente un generatore di impulsi ha una durata compresa tra i cinque ed i dieci anni, quando risulterà che la pila è entrata nella fase di scarica, si programmerà la sostituzione dello stimolatore che potrà essere effettuata nelle settimane successive con un intervento molto più semplice e rapido del primo impianto.

Il medico comunica con il pacemaker attraverso un programmatore che è costituito da un computer dotato di una sonda che ha la funzione di inviare segnali radio al pacemaker. La procedura è indolore, e durante il controllo si possono raccogliere informazioni utili circa il comportamento dello stimolatore e su eventuali aritmie presentate dal paziente.

Capitolo 3

Il Pacemaker Biologico

Una delle sfide della bioingegneria riguarda la questione del ripristino a livello biologico del tessuto di conduzione del miocardio e delle sue cellule, in particolare del nodo senoatriale (SAN). In questo capitolo si vuole mettere in luce il processo di ricerca e tecnologico che ha portato gli scienziati a sperimentare un concetto nuovo di pacemaker. A livello clinico, su larga scala, si è notato che l'impianto di dispositivi esclusivamente elettronici mostra diverse carenze legate ad un possibile malfunzionamento del generatore (IPG), alla mancanza di reattività autonoma, ad una breve durata della batteria, ad interazioni indesiderate con forti campi magnetici, ad infezioni correlate al dispositivo e ad altre cause di varia natura. Al fine di far fronte a queste problematiche sono state progettate varie strategie, in parallelo ai metodi prettamente elettronici.

3.1 Approccio Autologo, Allogenic, Xenogenico

Il primo tentativo di ripristinare biologicamente il ritmo fisiologico è stato realizzato in diverse specie di mammiferi alla fine degli anni '20 trapiantando nel miocardio ventricolare tessuto del sistema di conduzione (ovvero un peduncolo dell'atrio destro contenente il SAN) *autologo, allogenic o xenogenico*.

- Autologo: Appartenente allo stesso organismo del soggetto.
- Allogenic: Proveniente da un altro organismo, cioè da un donatore.
- Xenogenico: Derivante da un donatore che appartiene ad una specie diversa da quella del ricevente.

Sebbene questi interventi allogenic e xenogenici fossero efficaci per un lasso di tempo di qualche giorno, si scoprì che diventavano progressivamente disfunzionali e che andavano incontro a fibrosi (*Demook et al. 1927*). Circa quarant'anni dopo furono proposti diversi studi preclinici per ristabilire la conduzione elettrica tra il padiglione

auricolare e il ventricolo destro in un modello canino. Applicando la stessa tecnica del peduncolo, i tessuti SAN autologhi hanno dimostrato di essere in grado di stimolare solo dopo due mesi dall'impianto nel cuore normale. Anche se non del tutto chiaro agli occhi degli scienziati che lo hanno provato per primi, questo approccio iniziale non ha potuto avere successo per molte ragioni, a partire da una possibile risposta immunitaria al tessuto allogenico/xenogenico (reazione da corpo estraneo) fino alle difficoltà di realizzare integrazione e accoppiamento con il miocardio ricevente.

3.2 Approcci basati su cellule Senoatriali

Dopo i primi tentativi di trapianto autologo, allogenico e xenogenico del tessuto SAN, sono stati realizzati tentativi *cell-based*, ovvero improntati sulle cellule del tessuto SAN (eventualmente mescolate con cardiomiociti atriali). Queste metodologie sono state focalizzate sulla capacità intrinsecamente elettrogenica delle cellule iniettate, che avrebbero dovuto agire come un pacemaker ectopico (organico) dopo l'accoppiamento elettrico funzionale con i cardiomiociti attivi dell'ospite. In laboratorio si è rivelato di successo questo accoppiamento elettro-meccanico tra i cardiomiociti dell'ospite e del donatore. Successivamente, nel 2005, sono stati riportati risultati simili con una preparazione cellulare di cardiomiociti atriali umani contenenti SAN PC (Pacemaker Senoatriale) (Cloherty et al., 2005). In un libro del 2011, è citato come l'iniezione di cellule atriali umane nei ventricoli sinistri di porcellini d'India abbia definito queste ultime come giunzioni funzionali, come una stimolazione efficace e come una risposta autonoma ottimale tra cellule donatrici e cardiomiociti ospiti (Den Haan et al. 2011). In un altro studio preclinico, cellule SAN autologhe sono state iniettate nella parete miocardica del ventricolo destro in un modello di cane dopo un blocco cardiaco completo e l'impianto di un pacemaker elettronico (Mattioli, 2008). Questi esperimenti, sebbene mostrassero un'attività elettrica preservata, presentavano sorgenti di stimolazione diverse rispetto al sistema di conduzione originario; perciò, non hanno raggiunto alcuna applicazione clinica, ma sono tuttavia servite come *proof-of-concept* (*dimostrazione della fondatezza di una tesi*) per terapie basate sulle *cellule staminali* più avanzate.

3.2.1 Cellule Staminali

Tutte le cellule del corpo sono derivate da quell'unica cellula formatasi durante il concepimento. Quella cellula e le altre che seguono si riproducono attraverso il processo mitotico. Le cellule primordiali nella vita di un essere umano vengono dette *totipotenti* perché hanno la capacità di svilupparsi in qualsiasi tipo di cellula specializzata. Ogni cellula *totipotente* ha il potenziale per dare origine a un organismo completo e funzionante. Dopo circa quattro giorni di sviluppo, le cellule *totipotenti* dell'embrione iniziano a specializzarsi, ovvero a differenziarsi. Contemporaneamente, esse restringono i loro possibili obiettivi e, pertanto, vengono definite *pluripotenti*. Le cellule *pluripotenti* possono dare origine a molti tipi diversi di cellula, ma non a tutti. Una cellula *pluripotente* isolata non può dar luogo a un intero organismo. Con il procedere del differenziamento, danno origine ai vari tessuti del corpo. Nello specializzarsi e maturare, molte cellule perdono la capacità di effettuare la mitosi e di riprodursi, tuttavia, possono essere sostituite da altre, le cosiddette *cellule staminali* (*der.del lat. Stamen-mīnis, <<stame, filo>>*) adulte, cellule meno specializzate che mantengono la capacità di dividersi. Vengono, poi, dette *multipotenti* alcune cellule non differenziate che si trovano in un tessuto, che mantengono la capacità di dividersi e di svilupparsi in cellule specializzate. Un obiettivo della ricerca nell'ambito delle cellule staminali è quello di trovare una fonte di cellule pluripotenti o multipotenti che possano essere mantenute in coltura in laboratorio. La facoltà che si cerca in questo tipo di cellule è la plasticità, ovvero la possibilità di specializzarsi in un tipo cellulare diverso da quello al quale erano destinate.

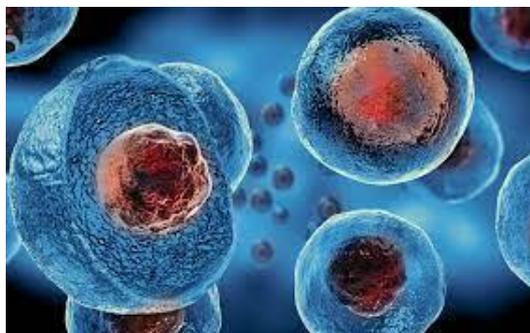


Figura 17: Simulazione Cellule Staminali(<https://www.prouman.com/le-cellule-staminali-che-cosa-sono-queste-cellule-madri/>)

3.3 Approcci cellulari che utilizzano cardiomiociti pluripotenti

Le cellule staminali pluripotenti (PSC), ovvero le cellule staminali embrionali (ESC) e le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC), sono considerate i tipi di cellule staminali più promettenti per quanto riguarda la loro capacità di differenziarsi in un numero virtualmente molto grande di tipi di cellule del corpo, compresi quelli derivati dal lignaggio cardiaco (*Cid et al. 2011*). Una metodologia accurata per la differenziazione dei cardiomiociti si basa sulle caratteristiche e sui modelli dello sviluppo embrionale; tuttavia, essa si traduce essenzialmente in una miscela di cellule atriali, ventricolari e nodali; pertanto, l'identificazione di un sottotipo desiderato e la creazione del pacemaker biologico, con questo tipo di metodo, richiede un'accurata elaborazione. Le ESC umane (humanESC) sono ampiamente utilizzate nelle metodologie basate sulle cellule staminali grazie alla loro capacità di differenziarsi in cardiomiociti a battito spontaneo. Ad esempio, l'integrazione funzionale e la generazione dell'attività del pacemaker sono state ottenute negli esperimenti di trapianto di cardiomiociti derivati da humanESC elettricamente attivi nei cuori di cavia. La mappatura ottica completa della superficie epicardica di questi cuori di cavia integrati con cardiomiociti derivati da humanESC ha dimostrato che l'entità della depolarizzazione della membrana è efficace dal sito di iniezione a un miocardio adiacente come segno della formazione di sincizio. Tuttavia, questo approccio dovrebbe essere ulteriormente ottimizzato per aumentare la resa nel numero di pacemaker derivati da iPSC e raggiungere una massa critica per una stimolazione efficace e sostenuta.

Solo pochi studi hanno tentato di superare questo problema concentrandosi sulla derivazione di cellule simili a SAN dalla differenziazione cardiaca e dalla specificazione del pacemaker degli human-iPSC (*Iop et al., 2021*). Tuttavia, la dipendenza di questo sistema di generazione di PC da un transgene (MYC) si allontana dal percorso clinico e potrebbe richiedere strategie alternative per un'applicazione di medicina rigenerativa nell'uomo. L'identificazione di un protocollo per arricchire cellule simili a pacemaker dopo la differenziazione del PSC potrebbe anticipare l'applicazione clinica.

Gli studi, in questo ambito si sono focalizzati oltre che sul concetto di proliferazione e differenziazione cellulare, anche sulle metodologie genetiche.

3.4 Genoma Umano

Il genoma umano è la sequenza completa di nucleotidi che compone il patrimonio genetico dell'uomo, comprendente il DNA nucleare e il DNA mitocondriale. Ha un corredo di approssimativamente 3,2 miliardi di paia di basi di DNA. È stata ipotizzata l'esistenza di circa 20.000 geni per proteine. Il numero stimato di geni umani è stato ripetutamente abbassato dalle iniziali predizioni di 100.000, man mano che la qualità del sequenziamento genomico e dei metodi di predizione sono migliorati, e potrebbe scendere ulteriormente. Secondo una stima di Craig Venter (nel 2007) i geni sarebbero 23.224, mentre secondo Jim Kent (2007) sarebbero 20.433 codificanti e 5.871 non codificanti. Sorprendentemente, il numero di geni umani sembra essere solo poco più del doppio rispetto a quello di organismi molto più semplici. I geni umani sono distribuiti in maniera non uniforme lungo i cromosomi. Ogni cromosoma contiene varie regioni ricche di geni e poveri di geni, che sembrano correlate con le bande cromosomiche. Il significato di questa alternanza non casuale di densità genica non è ben compreso allo stato attuale della conoscenza scientifica. In aggiunta ai geni codificanti proteine, il genoma umano contiene diverse migliaia di geni codificanti RNA, tRNA, RNA ribosomico.

Canali HCN (Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels)

Sono proteine di membrana integrale, che formano canali ionici, attraverso i quali una corrente elettrica può fluire dentro la (o fuori dalla) cellula. I canali HCN sono indicati come canali pacemaker perché aiutano a generare attività ritmica all'interno di gruppi di cellule cardiache e cerebrali. I canali HCN sono codificati da quattro geni (HCN1, 2,3,4).

Canali ionici di potassio

I potassio-canali ionici svolgono un ruolo importante nella formazione di potenziali d'azione (PA) e nella regolazione delle frequenze in tessuti come

cervello e cuore. La corrente ionica responsabile della formazione della ripolarizzazione finale del PA è la corrente I_{k1} . I canali che generano questa corrente di potassio sono chiamati Kir. Esistono sette sottofamiglie, inclusa la Kir2.x (Kir2.1-Kir2.4), alla base della I_{k1} nel cuore.

Sovraespressione Genica

In laboratorio, la proteina codificata da un gene è, in alcuni casi, espressa in quantità aumentata. Ciò può dipendere dall'aumento del numero di copie del gene, oppure da una maggiore forza di legame della regione del promotore.

3.4.1 Approccio Genomico

Il primo approccio basato sui geni per la generazione di un pacemaker biologico è stato applicato da Miake (*Marbàn et al. 2002*), utilizzando il trasferimento genico virale per trasformare cellule muscolo-cardiache quiescenti. Essenzialmente questo studio si è basato sull'inibizione della corrente di potassio, per prevenire la soppressione dell'automaticità nei miociti ventricolari di cavia. È stata adottata la riduzione del numero di canali ionici nel miocardio inibendo un costrutto negativo dominante *KIR2.1*. La soppressione di I_{k1} induce i cardiomiociti ventricolari a depolarizzarsi spontaneamente, producendo così attività pacemaker, ma con alcune limitazioni in termini di instabilità elettrica. Un'attività cronotropa (ovvero una variazione nel ritmo cardiaco) localmente potenziata potrebbe essere ottenuta attraverso l'aumento di canali HCN (canale responsabile della mediazione della corrente funny) nel tessuto del pacemaker atriale sussidiario, che è fisiologicamente bradicardico ma condivide diverse caratteristiche con il SAN. È stato dimostrato, infatti, che il pacing potrebbe essere accelerato dalla sovraespressione localizzata di HCN2, quindi, trattabile come proof-of-concept per il biopacemaking nel trattamento della sindrome del seno malato (*Bader et al. 2013*). A causa dell'estrema rilevanza della corrente I_f sul pacemaker, ulteriori approcci basati sui geni per la bioingegneria dei pacemaker biologici si sono concentrati sul trasferimento locale di un gene HCN. La sovraespressione del gene HCN2 può stimolare la frequenza cardiaca e generare attività biologica di pacemaker, come dimostrato per la prima volta, nel 2003, (*Cohen et al. 2003*) in un modello canino;

i ricercatori hanno sostenuto che la ricerca genica nello sviluppo di pacemaker biologici si dovesse basare sulle seguenti strategie:

- Sovraespressione dei recettori β 2-adrenergici, attraverso l'introduzione di materiale genetico esogeno in cellule riceventi, in particolare recettori clonati che aumentano le risposte della frequenza cardiaca all'input adrenergico.
- Inibizione negativa dominante della corrente di potassio, in modo tale che l'equilibrio delle correnti interne sia sufficiente a depolarizzare le cellule del miocardio ventricolare.

È fornita la prova del concetto che la sovraespressione di HCN2 localmente nell'atrio sinistro induca la corrente pacemaker (Cohen *et al.* 2003). In un modello suino di sindrome del seno malato (ablazione con radiofrequenza del SAN) supportato da impianto di pacemaker elettronico, si è osservato (Tse *et al.*, 2006) che la sovraespressione di un costrutto HCN1 ingegnerizzato, attraverso un trasferimento genico somatico, potrebbe ripristinare una frequenza cardiaca fisiologica e una stimolazione affidabile del miocardio riducendo la necessità di stimolazione elettronica (Akar *et al.* 2006).

3.4.2 Approcci combinati di cellule e geni

Le combinazioni gene-cellule esplorano il trasferimento di cellule insieme ai geni del pacemaker nel cuore per generare il biopacemaking. Studi pionieristici su questo approccio sono stati pubblicati nel 2007 (Cho *et al.* 2007): il loro concetto sperimentale si è basato sulla fusione indotta chimicamente di cardiomiociti e fibroblasti singenici (di identica costituzione genica), che erano stati manipolati per esprimere i canali del pacemaker HCN1.

Fusione Cellulare: Unione di due cellule geneticamente diverse che dà origine ad una cellula che possiede un DNA ibrido.

Oltre alla fusione cellulare, un altro sistema per fornire i geni del pacemaker nel cuore ha rivelato il suo potenziale: è stato dimostrato che le cellule staminali mesenchimali umane geneticamente modificate (humanMSC) esprimono i canali funzionali HCN2 del pacemaker cardiaco e inducono l'attività spontanea del pacemaker, innescando la

contrazione dei cardiomiociti del ventricolo *in vitro*, ma anche *in vivo* quando iniettato nella parete ventricolare sinistra subepicardica. Con questa somministrazione cellulo-mediata sono state ottenute conduzione normale e assenza di aritmie.

3.4.3 Approcci basati su trascrizione

In biologia molecolare, la trascrizione è il processo mediante il quale le informazioni contenute nel DNA vengono *trascritte*, enzimaticamente, in una molecola complementare di RNA.

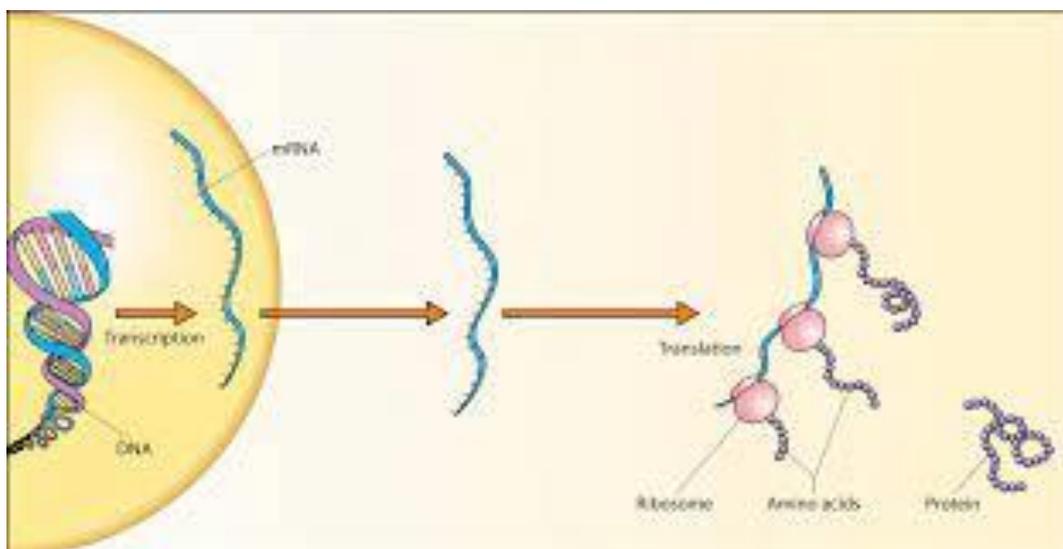


Figura 18: raffigurazione del processo di trascrizione(<https://testdimedicina.altervista.org/blog/trascrizione-dna/>)

Negli studi riguardanti il pacemaker biologico è risultato importante identificare il fattore di trascrizione T-box TBX3, il quale è una proteina che nell'uomo è codificata dal gene TBX3. Il gene TBX3 umano mappa sul cromosoma 12.

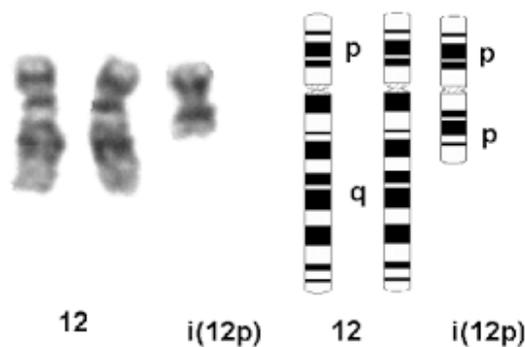


Figura 19: cromosoma 12(<https://www.docenti.unina.it/webdocenti-be/allegati/materiale-didattico/34200116>)

Nel 2007 è stato condotto uno studio fondamentale sul ruolo del repressore trascrizionale TBX3 nello sviluppo del sistema di conduzione cardiaca (*Belmonte et al. 2007*). L'espressione di TBX3 definisce la regione SAN, che avvia un programma di espressione genica distinto rispetto alle cellule atriali adiacenti. Dopo l'inizio del programma genico atriale è stata osservata la segregazione del lignaggio delle cellule precursori atriali TBX3-negative e SAN TBX3-positive, nonché la regolazione del programma di espressione genica del pacemaker.

3.5 Ingegneria Tissutale e modelli bioibridi

L'ingegneria tissutale (in inglese *Tissue Engineering*) è l'applicazione pratica della medicina rigenerativa. Si tratta di una scienza multidisciplinare che, attraverso la semina di cellule staminali su appositi supporti e in presenza di specifici fattori di crescita (proteine segnale), ha lo scopo di costruire protesi biologiche o organi biologici per il trapianto nel paziente.

Il termine "Ingegneria tissutale" nasce intorno agli anni Settanta per indicare la manipolazione di organi e tessuti; in seguito, il termine viene utilizzato per indicare quel campo interdisciplinare che applica i principi e i metodi dell'ingegneria e delle scienze della vita per sviluppare dei sostituti biologici di tessuti biologici o organi. Ha rivelato le sue potenzialità in molte applicazioni cardiovascolari, come la generazione di protesi valvolari cardiache e costrutti di tessuto cardiaco. A causa della complessità architettonica e funzionale dei tessuti nodali, una tale strategia potrebbe rigenerare completamente la conduzione cardiaca combinando opportunamente *scaffold* e cellule in costrutti tissutali biomimetici e bioequivalenti. Materiali utilizzati per questo tipo di

strutture sono singole proteine o peptidi, come il collagene, la fibrina e peptidi sintetici autoassemblanti oppure alginato e chitosano.

Negli ultimi anni, nell'ambito del biopacemaking, sono state proposte tecniche *bioibride* che mescolino polimeri intelligenti e dispositivi elettronici. Tale strategia potrebbe prevenire le reazioni fibrotiche associate al dispositivo impiantabile, ma potrebbe non superare altri limiti correlati, come la mancanza di reattività neuroautonomica (Iop et al. 2021). Il che, potrebbe rispondere alla necessità immediata di rendere un pacemaker artificiale più naturale per il corpo, con tuttavia delle limitazioni che si potrebbero verificare, quali necrosi del tessuto (Axtell et al. 1963).

Nel 2012, un gruppo di alcuni ricercatori di Harvard (Dabiri et al. 2012) hanno ingegnerizzato un pesce *bioibrido*, derivando le cellule del muscolo cardiaco da cellule staminali embrionali umane e le hanno incorporate in una struttura sintetica ispirata alla forma del pesce zebra. I ricercatori hanno inizialmente controllato dall'esterno il movimento del robot-pesce con un meccanismo chiamato stimolazione optogenetica, cioè hanno innescato la contrazione del muscolo grazie all'emissione di segnali luminosi. Hanno poi creato una versione che non necessita di alcuna stimolazione esterna, poiché sfrutta la seconda proprietà del tessuto muscolare cardiaco: l'automaticità. Con un piccolo numero di cardiomiociti, hanno ricreato un analogo del nodo senoatriale. Grazie a questo particolare meccanismo a feedback, la performance del pesce bioibrido ha superato quella di altri sistemi testati in precedenza ed è risultata completamente paragonabile a uno *zebrafish* vero. La sua velocità di nuoto è stata pari a 15.0 mm/s, 27 volte maggiore di quella di un altro biorobot ispirato a un animale acquatico, una *razza artificiale* ingegnerizzata attraverso cellule di muscolo cardiaco di ratto. L'altra caratteristica fondamentale è stata la sua longevità: il pesce bioibrido ha mantenuto la sua attività spontanea per 108 giorni, contro i soli 6 giorni della razza. Come un qualsiasi essere vivente, i cui muscoli si rafforzano con l'allenamento, anche il pesce artificiale ha gradualmente migliorato la sua performance nel corso del primo mese di attività, aumentando la velocità e la coordinazione.

Questo esempio mette in luce come le macchine bioibride siano il mezzo per un fine molto più importante, ovvero quello di studiare i meccanismi alla base di malattie cardiache, come le aritmie, e di iniziare a costruire le basi per la realizzazione di un cuore artificiale per i trapianti.

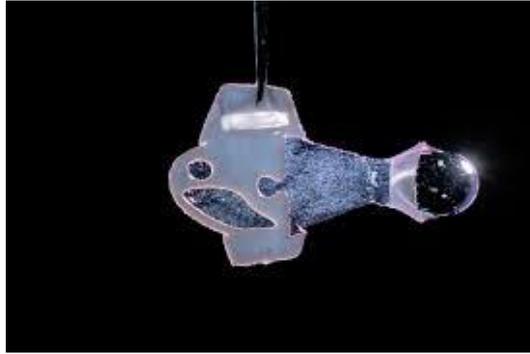


Figura 20: Biohybrid Fish(<https://scitechdaily.com/autonomous-biohybrid-fish-made-from-human-cardiac-cells-swims-like-the-heart-beats/>)

3.6 Applicazioni cliniche e sfide future

Nonostante la varietà di approcci che sono stati testati in diversi modelli, sono ancora necessari studi aggiuntivi ampi e completi per l'ulteriore sviluppo e la potenziale applicazione clinica dei pacemaker biologici. Per tutti gli approcci attuali, l'indagine sull'ottimizzazione e la valutazione della sicurezza, della potenziale tossicità, della stabilità a lungo termine e di una varietà di parametri cruciali è decisamente obbligatoria. Per quanto riguarda gli studi recenti e i risultati ottenuti, la terapia di stimolazione biologica è prossima all'applicazione clinica; tuttavia, esistono ancora numerose sfide in questo campo.

Gli studi in vitro sono fondamentali per valutare la prova di principio di nuovi concetti di biostimolazione, ma il test di efficacia definitivo, prima dei test sui pazienti, è sul modello animale. Sono stati condotti studi sugli animali con l'obiettivo principale di valutare l'efficacia, la sicurezza, la stabilità e altri parametri dei diversi approcci di pacemaker biologici. Il pacemaker biologico è stato ottenuto nella maggior parte di questi modelli, che variano a seconda dell'animale, della durata dell'osservazione, del metodo di consegna e della stabilità temporale. Problemi significativi potrebbero impedire l'adozione di successo delle tecnologie di biostimolazione nella pratica clinica: somministrazione difficile di geni e cellule, integrazione e accoppiamento inefficienti, rischi di effetti pro-aritmici dei pacemaker biologici, possibili effetti teratogeni (*teratogenesi: processo responsabile dello sviluppo anomalo di uno o più organi del feto, dovuto a cause di varia natura*) delle cellule staminali e/o fattori di trascrizione e, non da ultimo, le questioni etiche. Una delle principali preoccupazioni e potenziali limiti dell'automaticità guidata dal modello biologico è la possibilità di

aritmie ventricolari e relative conseguenze pericolose per la vita. Limitazioni specifiche potrebbero dipendere in primo luogo dai metodi di somministrazione utilizzati per distribuire geni, cellule o costrutti di ingegneria tissutale nel sito selezionato. Per tutti gli approcci perseguiti per il biopacemaking, è fondamentale trovare modalità di somministrazione adeguate che siano facili da eseguire, minimamente invasive, associate a bassi rischi pre-intervento e in grado di garantire l'effetto sostenuto *in vivo*. La maggior parte dei metodi di somministrazione di geni o cellule sono ancora invasivi (torace aperto o toracotomia); lo sviluppo di metodi di somministrazione minimamente invasivi, più sicuri e ben controllati è una priorità di ricerca attuale dei pacemaker biologici nel campo della medicina rigenerativa. Ad esempio, si è constatato che un'iniezione basata su catetere, specialmente se combinata con la guida fluoroscopica, offre un'opzione sicura ed efficace per fornire geni e cellule con un'invasività minima nella stimolazione biologica preclinica. In particolare, si è notata una perdita ematica e un dolore minimi e un rischio significativamente inferiore di ictus a causa dell'inserimento del catetere nella circolazione del lato destro. È senza dubbio un approccio di routine per molte applicazioni cliniche e potrebbe essere facilmente tradotto nell'uomo anche per strategie di biopacemaking basate su geni e cellule.

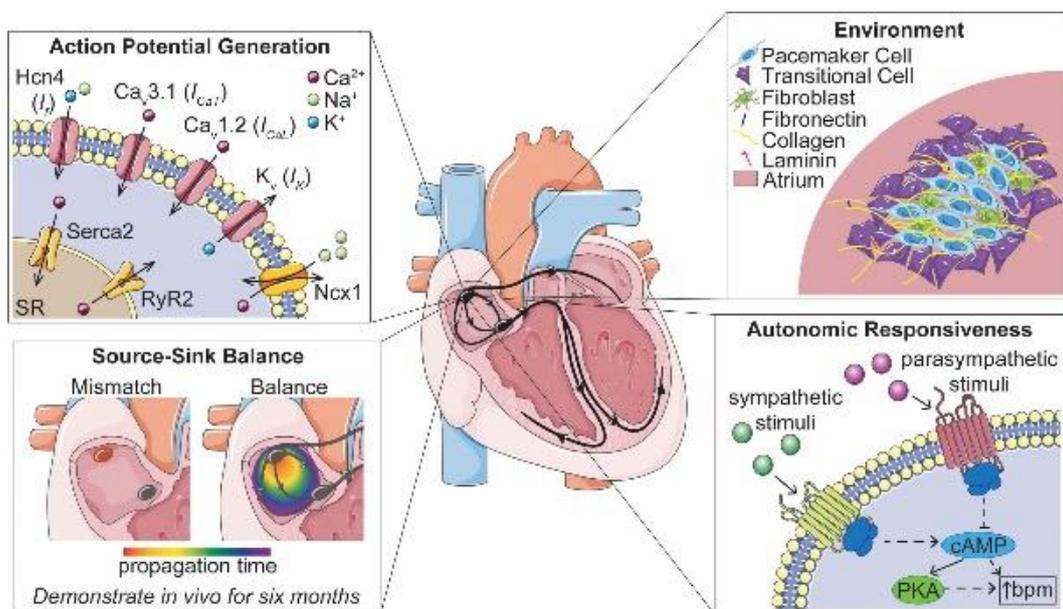


Figura 21: Attività bio-pacemaker dopo

impianto(<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCEP.121.009957>)

Un'altra questione in sospeso nell'applicazione clinica di una terapia di biopacemaking è relativa all'etica e ai costi. La maggior parte degli approcci finora esplorati si basano su componenti, la cui applicazione nell'uomo potrebbe essere considerata controversa a causa della derivazione o dei rischi per la salute associati. Con un notevole livello di tecnologia implementata in questi approcci, i costi di produzione sono particolarmente elevati, rappresentando una barriera critica per la distribuzione sia nei paesi industrializzati sia in quelli che non lo sono ancora. Come per altre ipotesi medicinali terapeutiche avanzate, il bilanciamento tra benefici e rischi associati a qualsiasi approccio di biopacemaking deve essere valutato in modo critico nei programmi di gestione sanitaria per prevenire qualsiasi esposizione dannosa dei pazienti colpiti dai disturbi del sistema di conduzione. Infatti, la possibilità di testare clinicamente queste ipotesi dipende dalla legislazione sanitaria locale, oltre che dai finanziamenti governativi/federali stanziati e, infine, dal consenso del paziente (*Iop et al.2021*).

Con l'attuale livello di conoscenza e tecnologia, non è stato ancora raggiunto un completo recupero della frequenza cardiaca fisiologica utilizzando approcci basati sulle cellule staminali e sulla riprogrammazione, ma è confermato almeno temporaneamente utilizzando altre metodologie come il trasferimento genico. Anche gli approcci basati sulle cellule e le strategie di ingegneria tissutale sono fortemente progrediti, tuttavia richiederanno ulteriori indagini prima di raggiungere l'applicazione clinica: il livello accettabile di riproducibilità e funzionamento a lungo termine non è ancora raggiunto. Le sfide future sono diverse e quindi la commistione delle conoscenze elettro-meccaniche con quelle della genetica e della biologia sarà fondamentale (*Iop et al. 2021*).

Conclusioni

La tecnologia e l'elettronica sono un grande strumento per far fronte a disfunzioni del nodo senoatriale e del sistema di conduzione cardiaco nella sua interezza e le sfide raggiunte in questo ambito sono state certamente un'avanguardia in ambito clinico ed uno spunto per il progresso.

Tuttavia, a causa di limitazioni legati, in particolare, al consumo della batteria del dispositivo (di potenza), nel corso degli ultimi decenni è stato fondamentale lo studio portato avanti, dalla biologia, dalla chimica e dalla genetica; tutto ciò è risultato cruciale perché ha consentito delle dimostrazioni, sia *in vitro* che *in vivo*, del ripristino del ritmo cardiaco.

Ciononostante, bisogna ammettere che ci sono numerose problematiche irrisolte dal momento che si è ancora lontani da un'efficacia, stabilità e sicurezza (legata a proaritmicità e teratogenicità), tali da poter portare applicazione nell'uomo; occorre sottolineare l'invasività in ambito chirurgico, le questioni legate ai costi e quelle morali ed etiche.

Negli ultimi anni l'ingegneria dei tessuti sta assumendo sempre più rilevanza in ambito clinico e gli ultimi studi da parte dei ricercatori, come il citato caso del pesce biobrido dell'università di Harvard hanno dimostrato come ci possa essere una stretta collaborazione tra il campo elettronico ed il campo biologico. C'è la possibilità di

creare protesi cardiache o specifici scaffold che possano essere utilizzati, ad esempio, come sede di un nuovo nodo senoatriale.

Come evidenziato, in un articolo recente del 2019 di Valentinuzzi (*Valentinuzzi, 2019*), sono stati introdotti anche modelli matematici, destinati ad essere utilizzati in parallelo con gli esperimenti e sono stati sviluppati modelli, destinati a simulare esperimenti con l'induzione dell'oscillazione in una coppia di cellule, in colture cellulari e nel tessuto cardiaco. Ciò ha fortemente richiamato l'attenzione degli studiosi perché, in linea di principio e a prima vista, il ritmo biologico appare non trattabile da modelli teorici; tuttavia, gli studi in questa direzione sono fortemente in via di sviluppo.

Va evidenziato come sia necessario trovare una complementarità e uno scambio di informazioni fra medicina, scienza ed ingegneria, per far sì che gli approcci per l'impianto di un dispositivo "biologico", in luogo di pacemaker, possano essere sicuri e realizzabili.

Sitografia e Bibliografia (in ordine alfabetico)

1. <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCEP.121.009957>
2. https://aiac.it/wp-content/uploads/2018/05/02_linee-guida.pdf
3. <https://www.appuntioss.it/anatomia-corpo-apparato-circolatorio-il-cuore/>
4. <https://scitechdaily.com/autonomous-biohybrid-fish-made-from-human-cardiac-cells-swims-like-the-heart-beats/>
5. <https://www.cardiologiaoggi.com/impianto-di-pacemaker-o-defibrillatore-rischi-e-complicanze/>
6. <https://curarsi.palermoviva.it/il-pacemaker-cardiaco-come-fatto-e-come-funziona/elettrocateri-pacemaker/>
7. <https://www.docenti.unina.it/webdocenti-be/allegati/materiale-didattico/34200116>
8. <https://www.fibrillazioneatriale.it/fibrillazione-aritmie/15-ecg/52-anatomia-del-sistema-di-conduzione.html>
9. <https://healthy.thewom.it/salute/dia-div/>
10. <https://www.informazionimediche.com/medicina-interna/sindrome-del-nodo-del-seno-sintomi-cause-e-cure.html>
11. <https://litfl.com/pacemaker-rhythms-normal-patterns/>

12. <https://www.medicinadiprecisione.unicampania.it/attachments/category/71/cuore.pdf>
13. <https://medlineplus.gov/ency/article/007369.htm>
14. <http://omero.farm.unipi.it/matdidFarm/126/Genovesi%20Malattie%20del%20Cuore%20basi%20di%20Anatomia%20e%20Fisiologia.pdf>
15. <https://privato.policlinicogemelli.it/appfondimenti/pacemaker/#:~:text=L'impianto%20di%20pacemaker%20si,inserimento%2C%20una%20sorta%20di%20tasca.>
16. <https://www.prouman.com/le-cellule-staminali-che-cosa-sono-queste-cellule-madri/>
17. <http://www.publichealth.it/wp-content/uploads/2020/12/DISPOSITIVI-TERAPEUTICI-E-PROTESICI-MEDICINA-1.pdf>
18. https://www.researchgate.net/figure/Albert-Hymans-artificial-pacemaker-the-two-photos_fig14_221864919
19. http://www.soc.chim.it/sites/default/files/chimind/pdf/2006_3_110_ca.pdf
20. <https://www.sismed-it.com/pacemaker/#:~:text=Pacemaker%20monocamerale%3A%20trasporta%2C%20tramite%20un,dalla%20maggior%20parte%20dei%20pazienti>
21. <http://www.storiadellamedicina.net/breve-storia-del-pacemaker/>
22. <https://testdimecicina.altervista.org/blog/trascrizione-dna/>
23. <https://www.unisalento.it/documents/20152/873373/19+attivita%3A%20elettrica+del+cuore.pdf/0f01fd9d-50a0-27d4-7065-23cea91d63af?version=1.0>
24. <https://it.wikipedia.org/wiki/Pacemaker>

25. Akar Fadi G, Lau Chu-Pak, Li Ronald A., Li Ronald A., Siu Chung-Wah, Tomaselli Gordon F., Tse Hung Fat, Wang Kai, Xue Tian, *Bioartificial Sinus Node Constructed via In Vivo Gene Transfer of an Engineered Pacemaker HCN Channel Reduces the Dependence on Electronic Pacemaker in a Sick-Sinus Syndrome Model*, *Circulation/ AHA/ASA Journal*, 2006
26. Axtell H. K., Hermann G., Marchioro T.L., Starzl T.E., Waddell W.R., *Failure of sino-atrial nodal transplantation for the treatment of experimental complete heart block in dogs*, *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 1963
27. Auricchio Angelo, Lau Chu Pak, Ellenbogen Kenneth A., Kay G. Neal, Wilkoff Bruce L. *Clinical Cardiac PACING, Defibrillation and Resynchronization Therapy 5th edition*, Elsevier Health Europe, 2016
28. Bader Gary D., Franz Max, Lopes Christian Tannus, Morris Quaid, Montojo Jason, Rodriguez Harold, Zuberi Khalid, *GeneMANIA Prediction Server 2013 Update*, *Journals-Oxford Academic*, 2013
29. Belmonte Juan Carlos Izpisúa, Büscher Dirk, Kawakami Yasuhiko, Morita Masanobu, Raya Ángel, Ribeiro Inês, *Tbx2 and Tbx3 Regulate the Dynamics of Cell Proliferation during Heart Remodeling*, *PLOS ONE*, 2007
30. Brattoli Luca, *tesi in ingegneria clinica, "Elettrofisiologia del cuore"*, *Alma Mater Studiorum-Università di Bologna(2016/2017)*
31. Cho Hee Cheol, Marbàn Eduardo, *Creation of a Biological Pacemaker by Gene- or Cell-Based Approaches* Springer Link Journal, 2007
32. Cid Alicia G., Rajal Veronica B., *New Teaching Strategies to Improve Student Performance in Fundamentals of Biotechnology*, *ASM Journals*, 2011
33. Cohen Ira S., Danilo Peter Jr., Plotnikov Alexei N., Robinson Richard B., Qu Jihong, Rosen Michael R., Shlapakova Iryna, *Expression and Function of a Biological Pacemaker in Canine Heart*, *Circulation/ AHA/ASA Journal*, 2003
34. Dabiri John O., Feinberg Adam W., Grosberg Anna, Lee Hyungsuk, McCain Megan L., Nawroth Janna C., Ripplinger Crystal M., Parker Kevin Kit, *A tissue-engineered jellyfish with biomimetic propulsion*, *Nature Biotechnology*, 2012

35. Demook Jean, Rylant Pierre, *Contributions a la Physiologie Générale Du Cœur. - X. - Le Réglage Humoral Du Travail Cardiaque Effets Directs Et Réciproques Des Substances Actives Et Des A Substances Vagales*, Taylor & Francis Online : Peer-reviewed Journals, 1927

36. Den Haan A. Dènise, Verkerk Arie, Tan Hanno L., *Creation of a Biopacemaker: Lessons from the Sinoatrial Node*, Researchgate Journals, 2011

37. Flack Martin, Keith Arthur, *The Form and Nature of the Muscular Connections between the Primary Divisions of the Vertebrate Heart*, Journal of anatomy and physiology, 1907

38. Iop Laura, Naumova Nataliia, *Bioengineering the Cardiac Conduction System: Advances in Cellular, Gene, and Tissue Engineering for Heart Rhythm Regeneration*, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2021

39. Mattioli Vittoria, *Cell therapy and arrhythmias: state of the art*, Giornale italiano di cardiologia, 2008

40. Marbàn Eduardo, Miake Junichiro, Nuss H. Bradley, *Functional role of inward rectifier current in heart probed by Kir2.1 overexpression and dominant-negative suppression*, The Journal of Clinical Investigation, 2003

41. Silverthorn Dee Unglaub, *Fisiologia Umana, un approccio integrato, cap.3, cap.14*, 2017

42. Valentinuzzi M.E., *Biological Pacemakers: Still a Dream?*, IEEE XPLORE, 2019