

ALMA MATER STUDIORUM-UNIVERSITA' DI BOLOGNA

CAMPUS DI CESENA

SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

Tecniche di ingegneria tessutale per la realizzazione di protesi valvolari cardiache

ELABORATO IN BIOCHIMICA

Relatore: Emanuele Domenico Giordano

Presentata da: Alessandra Di Vincenzo

Sessione seconda

Anno Accademico 2012-2013

Indice

SOMMARIO.....	4
CAPITOLO 1. IL CUORE E LE VALVOLE CARDIACHE.....	7
1.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA DEL CUORE.....	7
1.1.1 La parete cardiaca, atri e ventricoli.....	8
1.1.2 Il ciclo cardiaco.....	9
1.2 LE VALVOLE CARDIACHE.....	12
1.2.1 Anatomia e funzione delle valvole cardiache.....	12
1.2.2 Struttura	15
1.2.3 Stress meccanici della valvola aortica.....	17
1.2.4 Malattie delle valvole cardiache.....	19
CAPITOLO 2. LE PROTESI VALVOLARI CARDIACHE.....	25
2.1 LE PROTESI VALVOLARI MECCANICHE.....	25
2.1.1 protesi attualmente in uso.....	29
2.2 LE PROTESI VALVOLARI BIOLOGICHE.....	36
2.2.1 Deterioramento delle protesi valvolari cardiache.....	38
CAPITOLO 3. VALVOLE CARDIACHE INGEGNERIZZATE.....	42
3.1 TIPOLOGIE DI MATRICI PER VALVOLE CARDIACHE INGEGNERIZZATE.....	44
3.1.1 Matrice valvolare sintetica vs matrice valvolare biologica	46
3.2 UTILIZZO DEL PERICARDIO COME BIOMATERIALE.....	48
3.3 ADESIONE E PROLIFERAZIONE CELLULARE.....	49
3.4 PROCEDIMENTO.....	50
3.5 APPROCCIO.....	51
3.6 BIOREATTORI.....	53
3.7 ESPERIENZE E PROSPETTIVE.....	56

CAPITOLO 4. TERAPIE CHIRURGICHE PER VALVULOPATIE.....	59
4.1 STENOSI MITRALICA.....	59
4.2 STENOSI AORTICA.....	60
4.3 IMPIANTO TRANSCATETERE DELLA VALVOLA AORTICA (TAVI).....	60
4.3.1 Descrizione della tecnologia.....	63
 CAPITOLO 5. CENNI DI CARATTERE ECONOMICO.....	67
 CONCLUSIONI.....	71
 BIBLIOGRAFIA/SITOGRAFIA.....	73
 RINGRAZIAMENTI.....	77

Sommario

Da circa 50 anni le protesi valvolari cardiache vengono utilizzate per la sostituzione di quelle native per le quali un trattamento farmacologico o di chirurgia ricostruttiva non è sufficiente.

Nel mondo, ogni anno, vengono impiantate circa 250000 protesi valvolari cardiache, con un incremento di circa il 5-7% annuo: di queste circa il 55% sono protesi meccaniche, mentre il 45% sono biologiche.

Le protesi valvolari differiscono tra di loro per diverse caratteristiche, tra le quali la durevolezza, la trombogenicità e il profilo emodinamico.

Le valvole meccaniche hanno il vantaggio di non deteriorarsi nel tempo ma presentano lo svantaggio di richiedere una terapia anticoagulante a lungo termine; d'altra parte le valvole biologiche durano meno ma non necessitano di ulteriori terapie. Le valvole biologiche possono essere ottenute da cadaveri o da animali.

Si sceglie una protesi biologica quando non è possibile per il paziente affrontare una terapia anticoagulante. La protesi meccanica infatti ha un rischio tromboembolico stimato intorno allo 0,4% annuo. È appropriato optare per una protesi biologica durante l'adolescenza, dato che la terapia anticoagulante comprometterebbe la vita attiva del paziente, in anziani con età maggiore di 70 anni, perché la sua durata è maggiore della vita attesa del paziente, e in donne in età da gravidanza. Con rare eccezioni, le valvole meccaniche sono durevoli, il più delle volte 20 o 30 anni; per contro, dal 10-20% delle protesi omologhe al 30% delle protesi eterologhe falliscono tra i 10 e i 15 anni dall'impianto e devono essere perciò sostituite. Il rischio di fallimento della protesi è in genere associato a due eventi caratteristici, al di là delle possibili endocarditi: la formazione di un panno fibrotico anomalo sulla superficie della protesi e/o la formazione di coaguli e di trombi. Entrambe le eventualità creano una situazione di estrema criticità per la salute del paziente poiché la formazione di coaguli di sangue è la prima causa di blocco del meccanismo valvolare e, il possibile distacco di emboli può mettere severamente a rischio la vita del paziente. È facile immaginare, quindi, come possa diventare cruciale la diagnosi precoce di queste situazioni di rischio.

Negli ultimi anni si stanno sviluppando studi mirati ad ovviare alle problematiche di trombogenicità, biocompatibilità e rigetto nel caso di organi, mediante lo studio di tecniche di ingegneria tissutale. Questa presuppone di coltivare in vitro un componente autologo da trapiantare: se le conoscenze attuali consentono la coltivazione di cellule umane, l'ingegneria tissutale deve spingersi oltre e arrivare a riprodurre la struttura e la funzione.

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

Le malattie delle valvole del cuore destro (tricuspide e polmonare), ove vige una pressione più bassa, sono in genere dovute a problemi congeniti e/o meno frequenti.

Le malattie delle valvole del cuore sinistro (mitrale e aorta) sono di carattere prevalentemente acquisito, e più frequenti; tuttavia, poiché la valvola mitralica comprende un apparato sottovalvolare e un movimento di grande complessità, l'ingegneria tissutale si è, almeno attualmente, rivolta sostanzialmente alla realizzazione di valvole aortiche, sulle quali questo lavoro di tesi porrà principalmente l'accento.

Capitolo 1

Il cuore e le valvole cardiache

Per comprendere a fondo il funzionamento delle valvole cardiache è necessario conoscere gli aspetti anatomici e fisiologici del cuore e il suo ruolo all'interno della circolazione sistemica. In questo capitolo verrà dedicata particolare attenzione alla struttura anatomica, al funzionamento delle valvole cardiache e alle patologie che più frequentemente le colpiscono.

1.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA DEL CUORE

Il cuore (Figura 1.1) è situato nella cavità toracica, fra i polmoni, in uno spazio detto mediastino anteriore; è adagiato sul diaframma che lo separa dai visceri addominali ed è protetto anteriormente dallo sterno e dalle cartilagini costali che gli fanno da scudo. Ha la forma di un cono capovolto alto circa 12 cm e il suo peso, in un individuo adulto, è di circa 200-300 grammi.

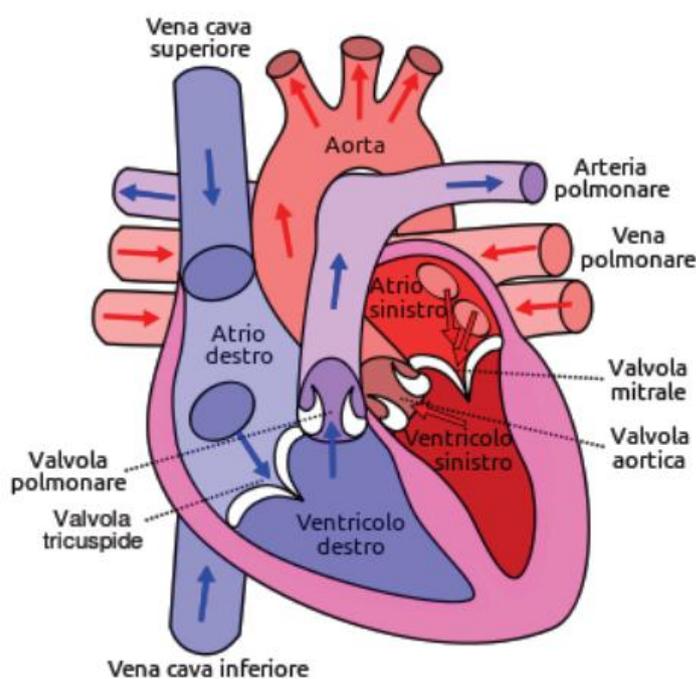


Figura 1.1: : *Struttura anatomica del cuore*

1.1.1 La parete cardiaca, atri e ventricoli.

La superficie del cuore appare liscia e lucente perché un sottile involucri, il pericardio, che ha uno spessore pari a venti millesimi di millimetro, aderisce esternamente a tutte le sue parti piane e a tutte le sue insenature. Asportando questa delicata membrana appare la sottostante tonaca, il miocardio, che è la più spessa fra le tre che compongono la parete cardiaca poiché misura, secondo le zone, da 5 a 15 millimetri. Composto da sistemi di fibre muscolari aventi direzioni diverse, il miocardio ha uno spessore molto maggiore nel ventricolo rispetto agli atri.

La terza tonaca, che riveste interamente la cavità del cuore aderendo in ogni suo punto alla superficie interna del miocardio, è l'endocardio, il quale ha la funzione di favorire lo scorrimento della corrente sanguigna, impedendo ogni eventuale attrito che potrebbe essere causa di formazione di un coagulo sanguigno.

Il potenziale a riposo delle fibre miocardiche è di circa -90 mV (Figura 1.2): le singole fibre sono separate le une dalle altre da membrane, ma la depolarizzazione si propaga attraverso di esse come se formassero un sincizio, per la presenza di giunzioni comunicanti. Il potenziale d'azione delle singole cellule muscolari del cuore, derivato mediante un elettrodo intracellulare, è caratterizzato da una rapida depolarizzazione, da un plateau e da un processo di ripolarizzazione lento. La depolarizzazione iniziale è dovuta ad un flusso verso l'interno di Na^+ attraverso canali per il Na^+ a rapida apertura. L'entrata di Ca^{2+} attraverso canali per il Ca^{2+} a più lenta apertura produce la fase di plateau; la ripolarizzazione è dovuta all'efflusso di K^+ attraverso differenti tipi di canale per il K^+ .

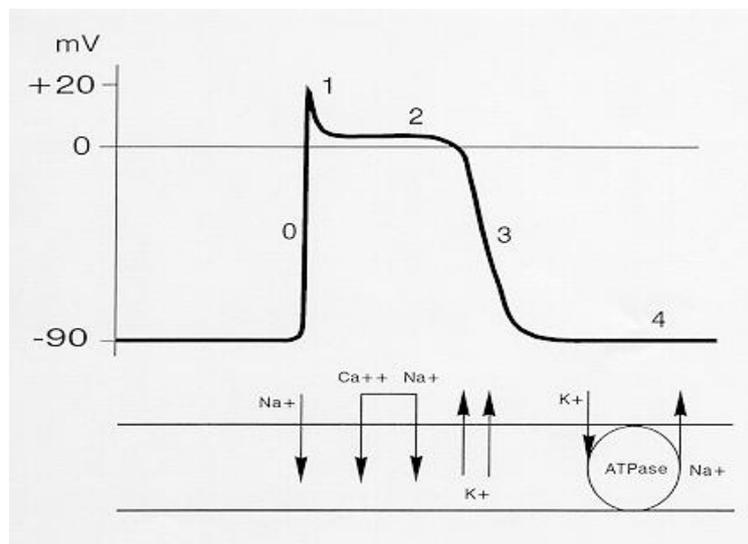


Figura 1.2: Grafico di depolarizzazione, plateau e ripolarizzazione della cellula cardiaca

Considerando la conformazione interna dell'organo, è quasi possibile parlare di due “cuori”: il muscolo è infatti costituito da due parti speculari, entrambe dotate di un atrio e un ventricolo. Le due cavità destre comunicano tra loro e formano il cosiddetto cuore destro, così come le due sinistre che formano il cuore sinistro. Non esiste, a meno di una patologia, comunicazione fra cavità destre e cavità sinistre.

1.1.2 Il ciclo cardiaco

Il cuore funziona come una pompa aspirante e premente, nella quale l'energia necessaria viene fornita dalla contrazione del muscolo cardiaco stesso. In effetti si tratta di una pompa di eccezionale efficienza, se si tiene conto del suo volume. Basti pensare che durante il sonno il cuore di un uomo pompa circa 5 litri di sangue in un minuto e che questa quantità sia prontamente raddoppiata quando subentra un'attività fisica, sia pur moderata.

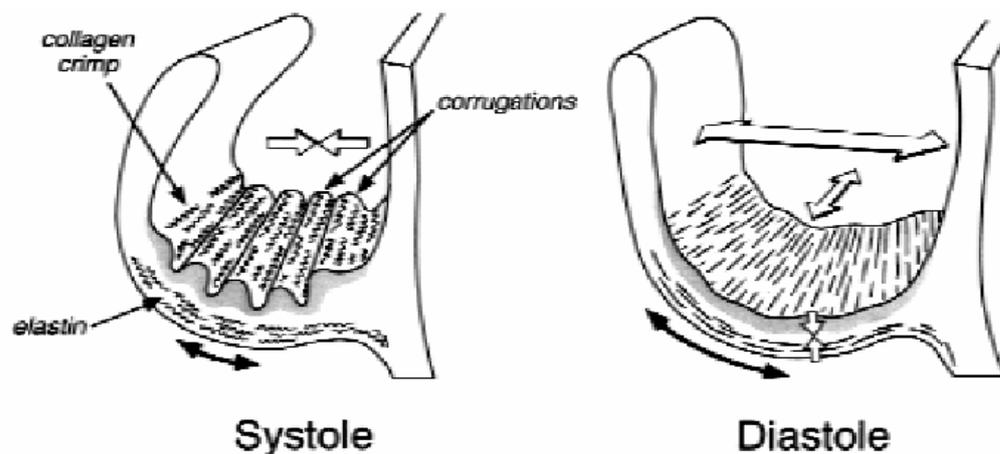


Figura 1.3: *Sistole(contrazione) e diastole(rilassamento) del cuore*

Un ciclo cardiaco è costituito da tutti quei fenomeni che vanno dall'inizio di un battito all'inizio del battito successivo e può essere suddiviso in due fasi: diastole e sistole (Figura 1.3). Le varie parti del cuore battono normalmente in ordinata sequenza: prima si contraggono gli atri (sistole atriale) e poi i ventricoli (sistole ventricolare); durante la diastole tutte e quattro le camere cardiache sono rilasciate. Il battito cardiaco origina in un sistema di conduzione cardiaco specializzato, attraverso il quale diffonde in tutte le parti del miocardio. Le strutture che costituiscono il sistema di conduzione cardiaco sono: il nodo seno atriale (nodo SA), le vie atriali internodali, il nodo atrioventricolare (nodo AV), il fascio di His e le sue branche ed il sistema di Purkinje. Le varie parti del sistema di

conduzione (come anche, in condizioni anormali, le altre regioni del miocardio) sono capaci di scarica spontanea. Tuttavia, il nodo SA scarica normalmente a frequenza più alta, e la sua depolarizzazione si propaga alle altre regioni prima che queste lo facciano a loro volta.. Pertanto, il nodo SA è il normale avviatore, detto anche pacemaker cardiaco, e la sua frequenza di scarica determina la frequenza alla quale il cuore pulsa. La depolarizzazione, iniziata nel nodo SA, si propaga rapidamente attraverso gli atri, convergendo quindi sul nodo AV. La depolarizzazione atriale si completa in 0.1 secondi. Poiché la conduzione del nodo AV è lenta, vi è un ritardo di circa 0.1 sec (ritardo nodale AV) prima che l'eccitamento si propaghi ai ventricoli. Questo ritardo è abbreviato dalla stimolazione del simpatico cardiaco e allungato dalla stimolazione vagale. Dalla sommità del setto interventricolare, l'onda di depolarizzazione si propaga rapidamente lungo le fibre di Purkinje in tutte le regioni dei ventricoli, in 0.08-0.1 sec. Nell'uomo, la depolarizzazione del miocardio ventricolare inizia nel lato sinistro del setto interventricolare, e procede dapprima verso destra, attraverso la parte centrale del setto; procede quindi lungo il setto fino all'apice del cuore, e risale lungo le pareti ventricolari fino al solco AV, propagandosi dalla superficie endocardica a quella epicardica. Le ultime parti ad essere invase sono la regione postero basale del ventricolo sinistro, il cono polmonare e la parte più alta del setto (Figura 1.4).



Figura 1.4: *Sistema di conduzione cardiaco*

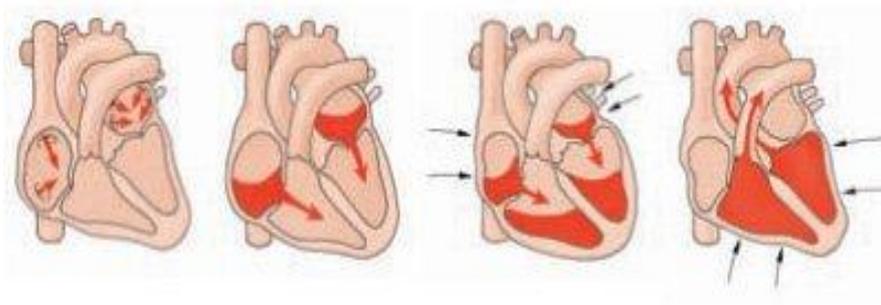
L'attività elettrica di tutte le fibre muscolari cardiache costituisce l'ECG, nel quale l'onda P è prodotta dalla depolarizzazione atriale, il complesso QRS dalla depolarizzazione ventricolare, il segmento ST e l'onda T dalla ripolarizzazione ventricolare. L'onda U è un reperto incostante, attribuita a una lenta ripolarizzazione dei muscoli papillari.

L'ordinato processo di depolarizzazione appena descritto provoca un'onda di contrazione che si propaga per il miocardio. Nelle singole fibre miocardiche la contrazione comincia subito dopo la

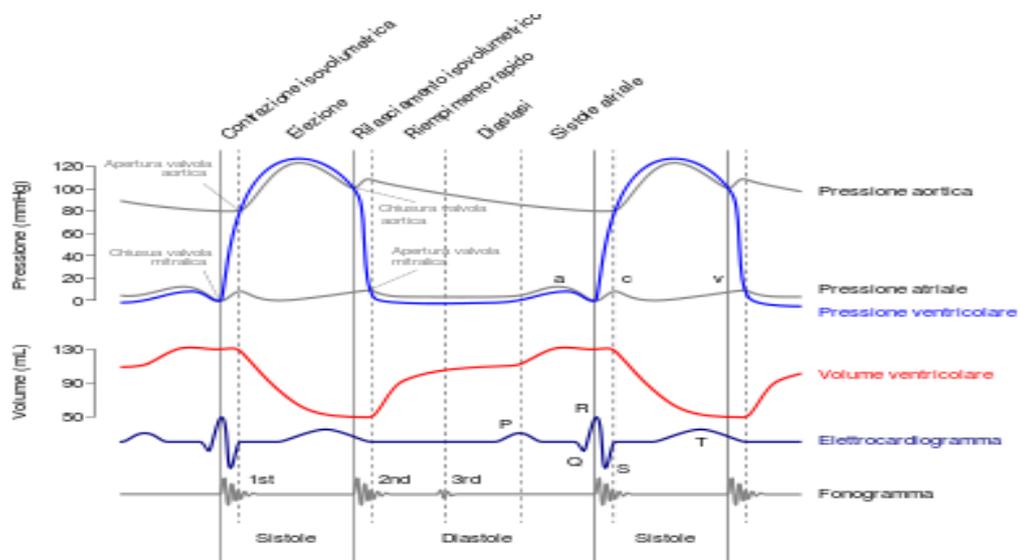
depolarizzazione e dura fino a circa 50 ms dopo il completamento della ripolarizzazione. La sistole atriale comincia dopo l'onda P dell'ECG e la sistole ventricolare verso la fine dell'onda R, terminando subito dopo l'onda T. La contrazione produce una sequenza di variazioni della pressione e del flusso nelle cavità cardiache e nei vasi sanguigni.

Durante la diastole, i ventricoli si trovano nello stato di riposo dopo essersi contratti. Le valvole semilunari, che dividono il ventricolo destro dall'arteria polmonare e il ventricolo sinistro dall'aorta, si sono appena richiuse e le valvole atrio-ventricolari non hanno ancora cominciato ad aprirsi. Sia i ventricoli sia gli atri si trovano in uno stato di rilassamento. In questo momento il sangue, che arriva al cuore, entra negli atri. Man mano che gli atri si riempiono si crea una differenza di pressione tra questi e i ventricoli ancora vuoti. Le valvole atrio-ventricolari allora, cedendo alla pressione della massa sanguigna contenuta negli atri, si aprono e il sangue passa nei ventricoli che in poco tempo si riempiono quasi completamente. A questo punto gli atri si contraggono (sistole atriale) e spingono il sangue nei ventricoli. La contrazione della muscolatura atriale che circonda le vene cave e le vene polmonari al loro sbocco negli atri, ne restringe gli orifizi e, d'altra parte, l'inerzia del sangue in movimento tende a mantenere il sangue stesso nel cuore; tuttavia, durante la sistole atriale vi è un certo rigurgito di sangue nelle vene. Immediatamente anche i ventricoli entrano nella loro fase di contrazione. All'inizio della sistole ventricolare la pressione esistente nei ventricoli supera quella esistente negli atri, le valvole atrio-ventricolari si chiudono perché le loro cuspidi sono spinte verso l'alto dalla pressione della massa sanguigna contenuta nei ventricoli. La muscolatura ventricolare inizialmente si accorcia relativamente poco, ma la pressione intraventricolare aumenta bruscamente mentre il miocardio comprime il sangue contenuto nei ventricoli. Questo periodo di contrazione ventricolare isovolumetrica dura circa 0.05 sec, fino a quando la pressione nei ventricoli sinistro e destro supera la pressione nell'aorta (80 mmHg) e nell'arteria polmonare (10 mmHg) e le valvole aortica e polmonare si aprono. Durante la contrazione isovolumetrica le valvole AV fanno venire negli atri provocando un piccolo ma netto aumento di pressione. Quando le valvole aortica e polmonare si aprono, inizia la fase di eiezione ventricolare. L'eiezione è dapprima rapida, ma rallenta poi col progredire della sistole. La pressione intraventricolare sale al massimo e comincia a discendere prima della fine della sistole. La pressione massima è di circa 120 mmHg, nel ventricolo sinistro e di 25 mmHg, o meno, nel ventricolo destro. Nella fase tardiva della sistole la pressione aortica in realtà supera quella ventricolare, ma per un breve periodo la quantità di moto acquisita dal sangue fa sì che questo continui ad effluire. Le valvole AV vengono tirate verso il basso dalla contrazione del miocardio ventricolare e la pressione atriale scende. Ciascuno dei due ventricoli espelle nella sistole 70-90 ml

in condizioni di riposo. Il volume di sangue ventricolare telediastolico è di circa 130 ml. Il volume di sangue pompato dai ventricoli in una singola contrazione è chiamato *stroke volume*: la sua diminuzione è uno dei primi segnali di allarme per l'insufficienza cardiaca. Lo *stroke volume* moltiplicato per la frequenza cardiaca, misurabile in battiti per minuto (bpm), dà l'output cardiaco, il volume di sangue pompato dal cuore in un minuto. In Figura 1.5 si riportano le fasi principali del ciclo cardiaco, tracciate unitamente all'ECG, all'andamento delle pressioni nell'atrio sinistro, nel ventricolo sinistro e in aorta.



a)



b)

Figura 1.5a e 1.5b : Le fasi principali del ciclo cardiaco, il tracciato ECG e l'andamento delle pressioni e volumi nel ciclo.

1.2 LE VALVOLE CARDIACHE

1.2.1 Anatomia e funzione delle valvole cardiache

Le valvole cardiache sono costituite da lamine sottili (lembi), flessibili e resistenti, di tessuto fibroso rivestito da endotelio, saldamente ancorate agli anelli valvolari. I movimenti dei lembi sono passivi: è l'orientamento delle valvole ad assicurare l'unidirezionalità del flusso sanguigno attraverso il cuore.

Nel cuore sono presenti due tipi diversi di valvole: le valvole atrioventricolari e le valvole semilunari

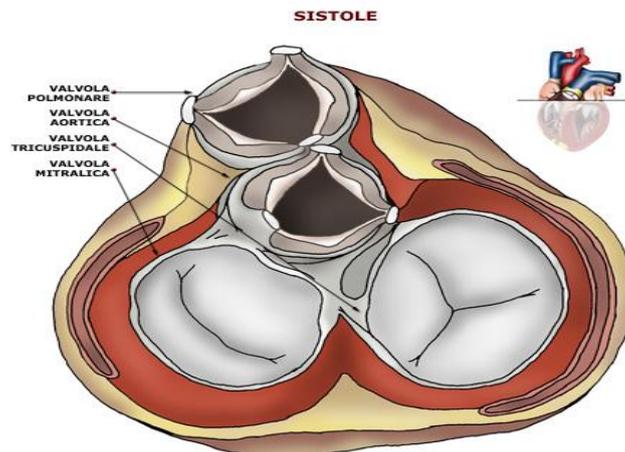


Figura 1.6: Valvole atrioventricolari –AV- (valvola tricuspide e mitralica), valvole semilunari –SL- (valvola aortica e polmonare).

Sono valvole atrio-ventricolari la valvola tricuspide e la valvola mitrale; sono, invece, valvole semilunari la valvola aortica e la valvola polmonare.

La valvola tricuspide è posta fra l'atrio destro e il ventricolo destro, mentre la valvola mitrale è posta fra l'atrio sinistro e il ventricolo sinistro; sono rispettivamente formate da tre e due cuspidi (il nome mitrale deriva dalla somiglianza con la mitra vescovile). Esse si aprono e si chiudono ciclicamente: quando la pressione atriale è maggiore rispetto alla pressione ventricolare sono aperte, e viceversa si chiudono. Ai bordi si inseriscono le corde tendinee che hanno origine dai muscoli papillari dei ventricoli; essi impediscono la protrusione delle valvole negli atri durante la sistole ventricolare (Figura 1.7).

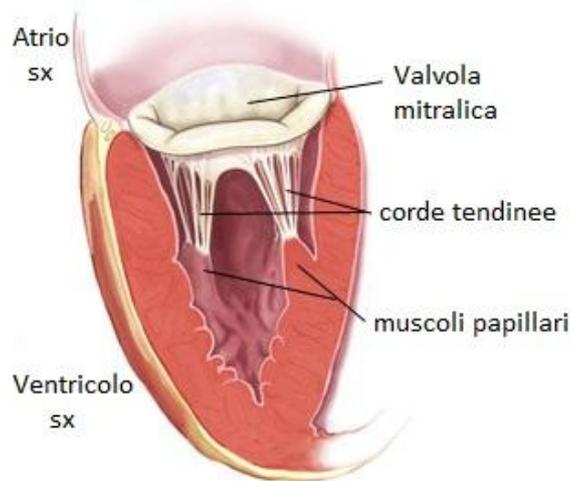


Figura 1.7: *Valvola mitralica*

La valvola tra il ventricolo destro e l'arteria polmonare e quella fra il ventricolo sinistro e l'aorta (valvole semilunari) sono costituite da tre cuspidi a forma di coppa attaccate all'anello valvolare fibroso. Alla fine della fase di eiezione della sistole ventricolare, il flusso del sangue si inverte momentaneamente verso i ventricoli: questa inversione di flusso provoca l'accollamento rapido delle cuspidi impedendo il reflusso del sangue. Durante la sistole ventricolare, le cuspidi non aderiscono alle pareti dell'aorta o dell'arteria polmonare, ma si librano nel sangue rimanendo circa a metà strada tra la parete del vaso e la loro posizione di chiusura. Dietro le valvole semilunari dell'arteria polmonare e dell'aorta sono infatti presenti piccole tasche (seni di Valsalva), in cui si formano i vortici che impediscono alle cuspidi di aderire alle pareti del vaso (Figura 1.8).

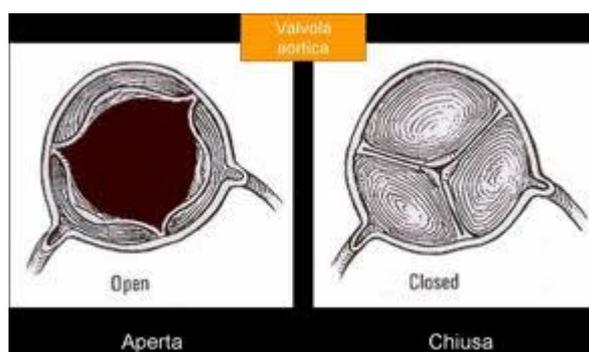


Figura 1.8: *Valvola aortica*

Per ragioni strutturali anatomiche, i sottili lembi delle valvole atrioventricolari (AV) praticamente non necessitano di un flusso retrogrado per la chiusura, mentre le più spesse valvole semilunari (SL) hanno bisogno di un flusso piuttosto forte e che duri qualche millisecondo.

Come descritto precedentemente, ai lembi delle valvole AV sono collegati anche i muscoli papillari per mezzo delle corde tendinee. Essi si contraggono simultaneamente alle pareti ventricolari, ma al contrario di quanto ci si potrebbe aspettare, non aiutano le valvole a chiudersi. La loro funzione, infatti, è quella di tirare i lembi delle stesse internamente verso i ventricoli al fine di prevenire un rigonfiamento troppo consistente verso gli atri. Se una corda tendinea si rompe o se uno dei muscoli papillari si paralizza, le valvole possono spingersi indietro in modo tale da diventare anche gravemente incontinenti: una tale situazione può avere conseguenze anche letali.

Le valvole SL aortica e polmonare, invece, funzionano in maniera completamente diversa. Innanzitutto, gli alti valori pressori presenti nelle arterie al termine della sistole ventricolare fanno sì che tali valvole si chiudano di scatto e non in maniera dolce come la mitrale e la tricuspide; 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; la rapida chiusura ed eiezione fanno sì che i margini delle valvole SL siano sottoposti ad una maggiore abrasione meccanica rispetto a quelli delle valvole AV. Infine, le valvole SL non sono sostenute da corde tendinee e presentano anatomicamente una struttura atta a resistere a sollecitazioni meccaniche anche di una certa entità.

1.2.2 Struttura

Le valvole cardiache sono formazioni fibrose rivestite da endocardio e inserite sul contorno degli anelli che limitano i rispettivi orifizi atrioventricolari, aortico e polmonare. Le cuspidi delle valvole atrioventricolari sono costituite dalla giustapposizione di due lamine fibrose, una *lamina assiale* e una lamina parietale. La lamina assiale è formata da uno strato superficiale, ricco di fibre elastiche, e da uno strato profondo con fasci di collagene e tessuto mucoso. Mentre lo strato superficiale si riconosce già a livello dell'impianto della cuspidi sull'anello fibroso, quello profondo compare solo ad una certa distanza dall'anello.

La lamina parietale presenta una struttura analoga.

Le valvole semilunari risultano formate da tre lamine sovrapposte: una lamina fibrosa rivolta verso il vaso del vaso, una lamina spongiosa e una lamina ventricolare rivolta verso la camera ventricolare (Figura 1.9). Le lamine fibrosa e ventricolare sono composte da tessuto connettivo fibroso con ricca componente elastica. La lamina media ha anch'essa una struttura fibrosa, ma contiene una discreta quantità di tessuto mucoso.

I movimenti dei lembi valvolari sono passivi e l'orientamento delle valvole cardiache assicura l'unidirezionalità del flusso sanguigno attraverso il cuore. Infatti si ritiene che la chiusura delle valvole cardiache durante la diastole sia provocato principalmente dalle correnti vorticosi del sangue che si formano dietro i lembi e, nelle valvole atrioventricolari, dalle corde tendinee e dai muscoli papillari che, stirati durante il riempimento ventricolare, esercitano tensione sui bordi liberi delle valvole.

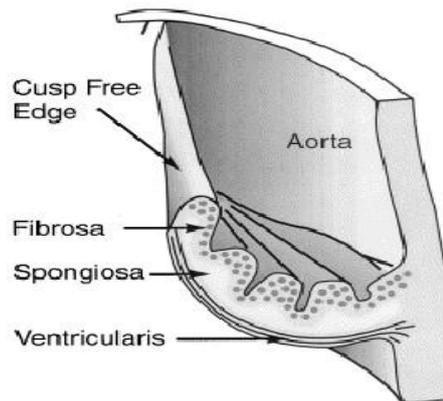


Figura 1.9: Sezione della valvola aortica

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

Si ritiene che le VICs siano responsabili del mantenimento della struttura valvolare. Sono stati identificati tre distinti fenotipi di VICs:

- fibroblasti,
- miofibroblasti,
- cellule muscolari lisce (SMC) di tipo fetale.

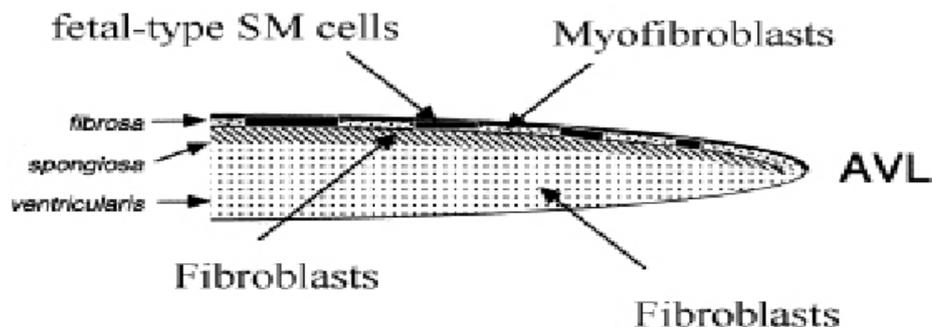


Figura 1.9: Tipi cellulari all'interno di una cuspidale valvolare cardiaca

Le SMC e i miofibroblasti sono essenzialmente localizzati nella fibrosa, mentre i fibroblasti sono segregati nella ventricolare. La spongiosa è in generale lo strato più povero di cellule. I miofibroblasti sono caratterizzati da importanti fibre di stress associate con l'espressione di alfa actina del muscolo liscio.

I fibroblasti sono caratterizzati da importanti organuli sintetici e secretori e si pensa che siano importanti nella regolazione della matrice. Sintetizzano collagene, elastina, proteoglicani, fibronectina, fattori di crescita, citochine così come metalloproteinasi della matrice (MMPS) e i loro inibitori tissutali. Le SMC sono in grado di contrarsi per mantenere una limitata forza valvolare intrinseca e sostenere le pressioni emodinamiche.

Le VECs formano un rivestimento funzionale attorno a ogni lembo di valvola cardiaca. Presumibilmente le VECs agiscono per mantenere una superficie valvolare non trombogena in analogia all'endotelio vascolare. Si ritiene le VECs regolino le sottostanti VICs.

I protocolli di ingegneria tissutale utilizzati finora per realizzare sostituti valvolari ha fatto uso di un gran numero di tipi cellulari. Nella maggior parte degli studi miofibroblasti sono stati seminati su scaffold biocompatibili per fornire un iniziale ancoraggio di cellule e la produzione di matrice extracellulare. Quindi, le cellule endoteliali sono state seminate sul risultato costruito per fornire un rivestimento non trombogenico.

1.2.3 Stress meccanici della valvola aortica

Gli stress meccanici nella valvola aortica possono condizionarne la longevità. Il loro eccesso può infatti danneggiarla e causare alcuni tipi di patologia valvolare. La valvola aortica infatti, è sottoposta a una complessa deformazione durante il ciclo cardiaco. I lembi valvolari sostengono il carico pressorio in diastole ma non in sistole, quando il gradiente di pressione decresce quasi fino allo zero. I lembi subiscono un'inversione della loro curvatura dalla sistole alla diastole e sono soggetti a un grande carico di flessioni, tra le quali l'apparente rotazione ogni qualvolta la valvola si apre. Tutti questi processi sono presenti in ogni ciclo cardiaco e possono produrre un grande carico di stress.

Gli stress meccanici ai quali sono sottoposti i lembi aortici (e i biomateriali utilizzati per la loro costruzione nelle protesi valvolari cardiache) possono essere studiati sperimentalmente attraverso la misurazione delle proprietà di stress-strain. Quando una forza esterna è applicata a un lembo, questo sviluppa una forza interna uguale a quella esterna. Lo stress è definito come la forza interna lungo la

sezione trasversa del lembo. Lo strain rappresenta l'allungamento del lembo ed è sovente espresso come cambio percentuale della sua lunghezza.

E' dimostrato che quasi tutti i tessuti contenenti collagene ed elastina abbiamo un comportamento anisotropo e non lineare. Ne risulta che le proprietà di stress-strain siano differenti nelle diverse direzioni (anisotropia) e lo stress vari in maniera non lineare rispetto alla tensione (strain). Poiché i lembi della valvola aortica e il pericardio sono composti principalmente da fibre collagene ed elastiche orientate preferenzialmente nella direzione della torsione prevalente, il loro comportamento stress-strain sarà prevedibilmente anisotropo e non lineare.

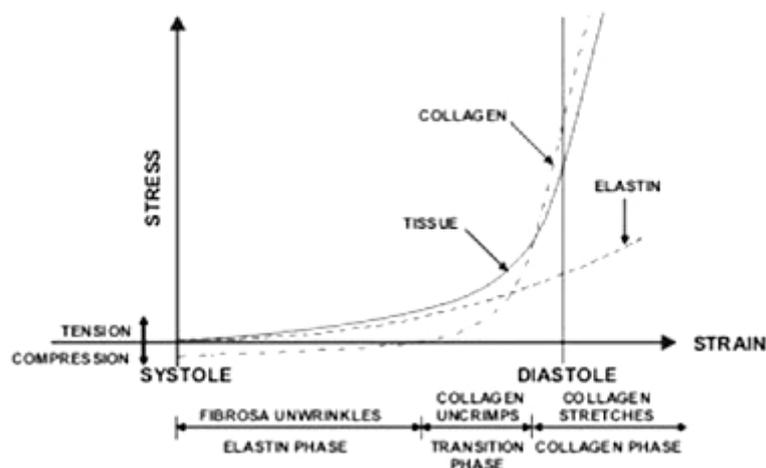


Figura 1.10: Grafico stress-strain

Il tessuto connettivo valvolare deve la sua funzione alla complessa morfologia strutturale, altamente adattabile e dinamica. Durante la sua funzione, la MEC (matrice extracellulare) dei lembi aortici è in grado di resistere a cicli di stress molto ampi così come a deformazioni dovute alle sollecitazioni del flusso sanguigno. Durante queste deformazioni esibisce un comportamento non-lineare nel quale lo stress cresce molto più rapidamente di quello previsto dalla legge di Hooke ($F=kx$). Il comportamento tipico di stress-strain del tessuto dei lembi aortici si ritrova all'interno di un range fisiologico in condizioni di tensione uniassiale (Figura 1.11). A questo comportamento contribuiscono il collagene e l'elastina del tessuto. Questo tipo di comportamento di stress-strain ha tre fasi distinte. Nella prima fase (fase dell'elastina) il lembo pone una piccola resistenza all'allungamento poichè la trasmissione della forza e la sopportazione del carico sono sostenute principalmente dalle fibre elastiche. Durante questa fase lo strato di fibre collagene presente nella fibrosa si svolge e il collagene dà un contributo minimo alla trasmissione della forza. In questa fase il tessuto si comporta quasi come un solido elastico di Hooke con lo stress che cresce linearmente

con lo strain. Nella fase di transizione, avviene il dispiegamento del collagene e più fibre collagene diventano gradualmente allineate e srotolate. Questo incrementa il contributo alla trasmissione della forza. Nella fase del collagene tutte le fibre sono srotolate e sopportano interamente il carico. La salita della curva di stress-strain in questa fase è ripida e quasi costante, riflettendo le proprietà del materiale e delle fibre collagene, che consentono un allungamento limitato evitando la frattura. La fase del collagene normalmente continua bene oltre il range fisiologico, grazie alla riserva di resistenza. Alla fine della fase del collagene, la pendenza della curva comincia a decrescere e un ulteriore incremento del carico porta il tessuto a rompersi.

Come già accennato, il comportamento di stress-strain del tessuto valvolare è un comportamento visco-elastico non lineare. Sottoposto al carico ciclico va incontro a isteresi tra la fase di carico e quella successiva di perdita del carico. Questo periodo iniziale di aggiustamento dopo una grande perturbazione è chiamato preconditionamento ed avviene a causa dell'adattamento della struttura interna durante il ciclo. Con i cicli successivi l'isteresi decresce ed, eventualmente, è raggiunto uno stato stabile nel quale non avvengono ulteriori cambiamenti fino a che la routine del ciclo è modificata.

1.2.4 Malattie delle valvole cardiache

Le valvole cardiache possono essere classificate come valvole del cuore destro e del cuore sinistro; in ognuno dei “cuori” sono presenti una valvola atrioventricolare (AV) e una valvola semilunare (SL). Le malattie delle valvole del cuore destro (tricuspide e polmonare), ove vige una pressione più bassa, sono in genere dovute a problemi congeniti, meno frequenti rispetto a quelle delle valvole del cuore sinistro (mitrale e aorta), di carattere prevalentemente acquisito.

Le malattie che colpiscono le valvole cardiache si definiscono valvulopatie e sono sostanzialmente di due tipi: la stenosi e l'insufficienza. Una valvola si definisce stenotica quando al suo massimo grado di apertura presenta un orifizio di dimensioni minori di quelle fisiologiche. In presenza di una stenosi valvolare, il cuore deve produrre maggior lavoro perché possa circolare una portata fisiologica di sangue. Per questa ragione, le pareti cardiache subiscono modifiche strutturali tali da aumentare opportunamente la pressione sistolica ventricolare. In particolare si verificano un ispessimento delle pareti cardiache (ipertrofia) e una sfericizzazione del ventricolo. Superato un certo limite, la capacità del cuore di produrre maggior lavoro viene meno e subentra lo scompenso cardiaco.

Una valvola cardiaca si definisce insufficiente quando i suoi lembi non si chiudono completamente; si verifica quindi la presenza di un orifizio residuo, che provoca un reflusso ematico dalle arterie nei

ventricoli (insufficienza delle valvole SL), ovvero dai ventricoli negli atri (insufficienza delle valvole AV). La Figura 1.12 illustra il caso della valvola aortica.

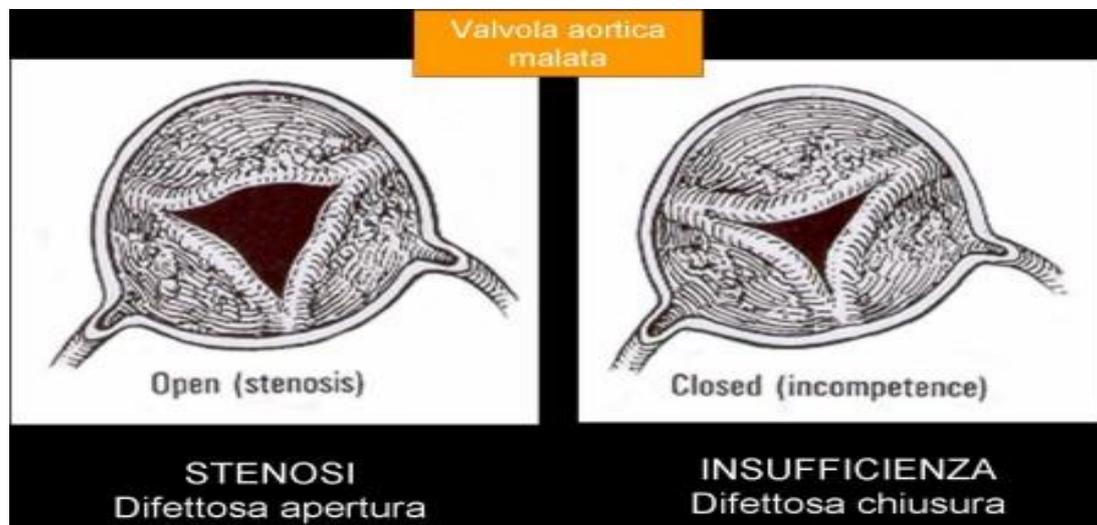


Figura 1.11: *Patologie della valvola aortica*

La patologia viene denominata indifferentemente insufficienza valvolare, incompetenza valvolare, prolasso valvolare.

L'incompleta chiusura è dovuta ad anomalie dei lembi o delle strutture collegate ai lembi stessi; per esempio nel caso della valvola aortica, la dilatazione della radice aortica può causare un allontanamento dei lembi valvolari ai quali, di conseguenza, è impedita una perfetta adesione. Nel caso delle valvole atrio-ventricolari, un malfunzionamento nelle capacità di tensione delle *chordae tendinae* può trattenere i lembi causandone l'insufficienza. Nell'insufficienza aortica il sangue ritorna al ventricolo dopo che questo si è svuotato; tale rigurgito determina un sovraccarico del ventricolo dovuto allo sforzo eccessivo compiuto dal cuore per resistervi; l'insufficienza aortica causa un aumento della pressione telediastolica, che raggiunge i valori di quella atriale sinistra causando la chiusura prematura della valvola mitrale. Nei casi di insufficienza aortica si può intervenire con una terapia farmacologica atta a diminuire il postcarico, ma la terapia definitiva è la sostituzione chirurgica della valvola con una protesi meccanica o biologica.

Molto spesso stenosi e insufficienza coesistono nella stessa valvola causando la cosiddetta stenoinufficienza.

Le valvulopatie possono essere congenite, presenti cioè dalla nascita, o acquisite, comparse cioè nel corso della vita. Le valvulopatie acquisite possono essere di origine degenerativa (più frequenti nei soggetti anziani, spesso ipertesi, dovute all'usura delle strutture valvolari), infettiva (endocarditi),

ischemica (in corso di infarto acuto del miocardio), traumatica (molto rare) o secondaria a un'ingente dilatazione del ventricolo e/o dei grandi vasi.

La causa più frequente, soprattutto in passato, delle lesioni valvolari è la febbre reumatica, conseguenza di un'infezione di origine streptococcica non prontamente curata (infiammazione alla gola, scarlattina, otite e altre). Il danno non è causato direttamente dall'infezione batterica ma dalla risposta immunitaria da parte dell'organismo che, nel rispondere all'attacco della tossina streptococcica, danneggia anche i propri tessuti. Gli anticorpi attaccano le valvole, che in periodi anche molto lunghi (mesi - anni) vengono gradualmente erose e sostituite da tessuto fibroso. Un'altra causa di degenerazione valvolare è l'endocardite batterica, un'infezione batterica (spesso da streptococco o stafilococco) che colpisce l'endocardio (Figura 1.12). Spesso è conseguenza di infezioni non trattate in altre parti dell'organismo; di solito colpisce valvole con anomalie congenite o già danneggiate, e i portatori di valvole artificiali. Le colonie di microrganismi che crescono sull'endocardio causano fori e distorcono la forma naturale delle valvole, compromettendone la funzionalità. Inoltre possono stimolare la formazione di trombi ed emboli.



Figura 1.13: *In caso di endocardite batterica, i germi responsabili vanno ad annidarsi nelle diverse strutture della valvola provocando la formazione di agglomerati di batteri ed elementi del sangue (vegetazioni), o perforando con i loro enzimi i lembi valvolari*

Nei soggetti anziani le valvole possono essere colpite da degenerazione mixomatosa e da degenerazione calcifica. La prima è un processo dovuto a una serie di cambiamenti metabolici e porta a una progressiva perdita di elasticità della valvola mitrale, che può causare la rottura dei legamenti che ne controllano l'apertura e la chiusura. La seconda, invece, riferita al deposito di calcio sui lembi della valvola aortica, provoca la stenosi (Figura 1.14).



Figura 1.14: *Valvola aortica affetta da stenosi non reumatica calcificata*

L'anomalia congenita più diffusa come causa di stenosi aortica è la bicuspidia, nella quale, sono presenti soltanto due cuspidi invece di tre (Figura 1.15).

La terapia risolutiva nei casi stenosi valvolare aortica è la sostituzione della valvola; in realtà, in alcuni casi, prima di ricorrere alla sostituzione, si possono tentare trattamenti palliativi come la valvuloplastica con palloncino o una valvulotomia chirurgica (correzione della stenosi di una valvola cardiaca, consistente nella rottura di concrescenze cicatriziali delle commessure effettuata con un dilatatore introdotto nelle cavità cardiache mediante una piccola incisione o dopo una più ampia apertura del cuore); tali pratiche vengono prese, generalmente, in considerazione nel caso di pazienti giovani poiché consentono di ritardare la sostituzione della valvola.



Figura 1.15: *Bicuspidia valvolare aortica*

Il prollasso della valvola mitrale è una patologia, spesso associata alla degenerazione mixomatosa, che colpisce il 2-6 % della popolazione; può riguardare solo le cuspidi o l'intera struttura valvolare, provocando vari gradi di reflusso del sangue dal ventricolo all'atrio (Figura 1.16). L'operazione più frequente, in questo caso, è la ricostruzione valvolare, ma quando non è possibile si ricorre alla sostituzione della valvola con una protesi meccanica o biologica.

L'intervento di sostituzione valvolare avviene a cuore aperto e prevede l'utilizzo della macchina cuore-polmone, che si prende carico di pompare il sangue quando il cuore viene fermato. L'operazione è poco più rischiosa del bypass coronarico, in parte per il rischio di infarto causato dal calcio che viene liberato, in parte per la possibile entrata di bolle d'aria nel circolo sanguigno, che riguarda tutte le operazioni a cuore aperto.

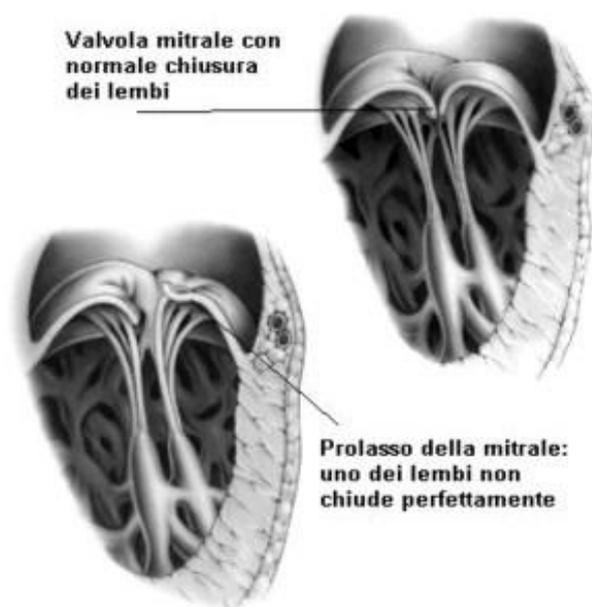


Figura 1.16: *Prolasso della valvola mitrale*

Capitolo 2

Le protesi valvolari cardiache

L'evoluzione attuale delle tecniche chirurgiche permette che spesso, in caso di valvulopatie, risulti possibile riparare la valvola senza doverla sostituire. Quando questa scelta non sia possibile, si procede con l'impianto di una protesi che può essere meccanica o biologica.

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

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

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

Le valvole meccaniche hanno il vantaggio di non deteriorarsi nel tempo (generalmente hanno una durata di 20 - 30 anni), ma presentano lo svantaggio di richiedere una terapia anticoagulante a lungo termine. Tuttavia, sono preferite nei pazienti giovani, o con un'aspettativa di vita superiore a 10/15 anni, oppure che richiedono una terapia anticoagulante per altre ragioni rispetto alle valvole biologiche, che in genere non superano i 15 anni di funzionamento. Queste ultime sono da preferirsi nei soggetti anziani o con un'aspettativa di vita più breve, o che non possano assumere la terapia anticoagulante.

2.1 LE PROTESI VALVOLARI MECCANICHE

Prima di descrivere in dettaglio i cinque modelli di valvola analizzati, è opportuno ricordare lo sviluppo che ha portato alle protesi attualmente in uso.

Tutte le valvole progettate sono costituite da tre componenti principali: occlusore, alloggiamento (*housing*) e anello di sutura (*sewing ring*). L'occlusore costituisce la parte mobile della protesi, deve essere in grado di aprire e chiudere senza interferenze e di adattarsi alle differenze di pressione del flusso ematico. Il movimento dell'occlusore sull'alloggiamento influenza notevolmente il flusso ematico. La protesi deve essere progettata in modo da minimizzare le turbolenze del flusso e di conseguenza minimizzare il lavoro compiuto dal cuore e la probabilità di formazione di trombi e di

comparsa di fenomeni emolitici. L'anello di sutura è il punto di congiunzione della protesi con i tessuti del ricevente.

Negli ultimi cinquant'anni si è registrato lo sviluppo di protesi sempre più avanzate per quanto concerne il profilo emodinamico e la biocompatibilità. La prima valvola cardiaca meccanica impiantata risale al 1952, quando il dottor Charles Hufnagel impiantò nel tratto discendente dell'aorta una protesi costituita da una gabbia di plexiglas con all'interno una palla di polietilene che fungeva da occlusore (Figura 2.1).



Figura 2.1: Valvola di Hufnagel

Nel 1960, grazie all'avvento della macchina cuore-polmone, fu possibile l'impianto della prima valvola mitrale nella corretta posizione anatomica. La protesi, commercializzata dalla Starr-Edwards, era costituita da una gabbia inizialmente in acciaio inossidabile, poi sostituito con una lega di cobalto (61-63 %), cromo (25.5-29 %), molibdeno (5-6 %) e nichel (1.75-3.75 %), chiamata Stellite. L'occlusore era una palla di silicone, arricchita in un secondo momento con solfato di bario per renderla radio-opaca. L'anello di sutura era in Teflon, nome commerciale del politetrafluoroetilene (PTFE), materiale polimerico molto resistente (Figura 2.2).

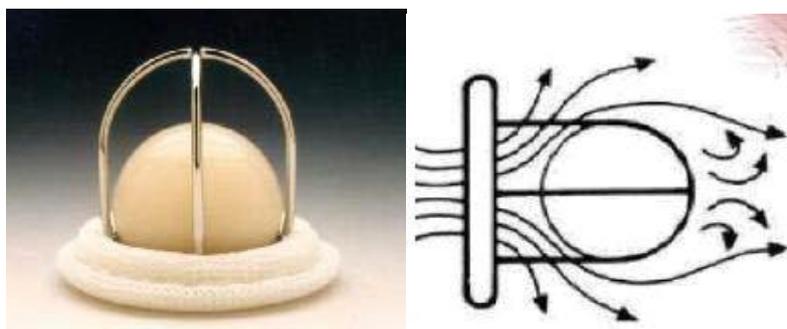


Figura 2.2: *a sinistra, valvola Starr-Edwards con palla in gomma siliconica; a destra, flusso ematico attraverso la valvola*

Questa protesi provocava turbolenza del flusso sanguigno, incremento del salto di pressione transvalvolare e le sue dimensioni causavano importanti interferenze con le strutture anatomiche circostanti. Dopo l'impianto, inoltre, la palla di silicone andava incontro a rottura a causa delle infiltrazioni lipidiche.

Nel 1967 fece la comparsa sul mercato la prima valvola a singolo disco oscillante, ideata da Bjork-Shiley (Figura 2.3).

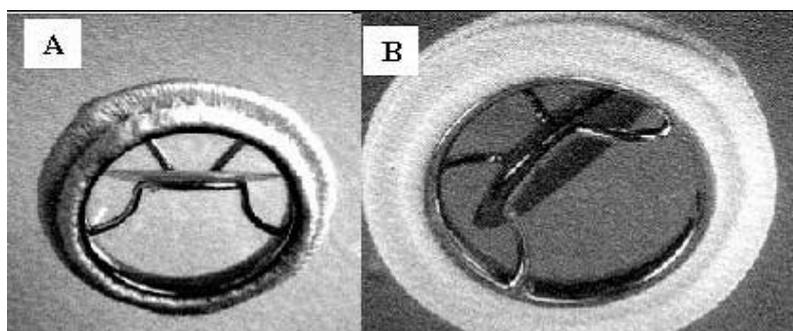


Figura 2.3: *valvola Bjork-Shiley con leaflet in Dacron (A) e con leaflet in LTI (B).*

La presenza dell'occlusore a disco permise una riduzione della distorsione del flusso ematico: il disco ruotava grazie alla pressione sanguigna, garantendo un angolo di apertura di 60° e consentendo al sangue di fluire centralmente (Figura 2.4). I materiali usati erano la lega Stellite 21 per l'alloggiamento, il Teflon per l'anello di sutura e il Delrin per il disco. Il Delrin, nome commerciale del poliossimetilene, è un polimero cristallino molto resistente che assicura biocompatibilità e basso rischio trombotico. A causa di alcuni cedimenti degli occlusori, il Delrin venne sostituito da carbonio pirolitico (LTI), materiale ceramico con basso coefficiente d'attrito, che garantisce un basso rischio emolitico e alta resistenza all'usura.

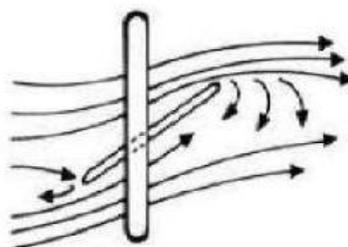


Figura 2.4: *flusso centrale prodotto da singolo disco oscillante*

Il ulteriore e significativo passo avanti nella protesica valvolare venne realizzato nel 1977, quando la Medtronic-Hall commercializzò una valvola con alloggiamento in titanio ricoperto di carbonio pirolitico (Figura 2.5); l'occlusore permetteva un'apertura di 70° per le valvole mitraliche e di 75° per quelle aortiche.



Figura 2.5: *valvola Medtronic-Hall*

Nel 1978 venne introdotta la valvola Lillehei-Kaster, con disco in carbonio pirolitico, che si muoveva su una guida rappresentata da un perno uscente dall'alloggiamento (Figura 2.6). L'angolo di apertura garantito dal disco oscillante era di 80° e il volume di rigurgito a valvola chiusa veniva ridotto rispetto ai modelli precedenti.



Figura 2.6: *valvola Lillehei-Kaster*

L'avvento delle prime valvole *bileaflet* risale al 1977, grazie alla St. Jude Medical Inc., ancora oggi produttrice delle valvole più impiantate al mondo (Figura 2.7). L'occlusore è formato da due emidischi di carbonio pirolitico che, nella posizione di apertura, assicurano interferenza minima con il flusso sanguigno e di conseguenza caratteristiche vicine alle fisiologiche. A valvola chiusa si ha un leggero rigurgito che garantisce la pulizia dei cardini della valvola, limitando così la possibilità di formazioni trombotiche. Anche l'alloggiamento di questa protesi è costruito in carbonio pirolitico. Le caratteristiche emodinamiche sono significativamente migliorate, così come le dimensioni della valvola.

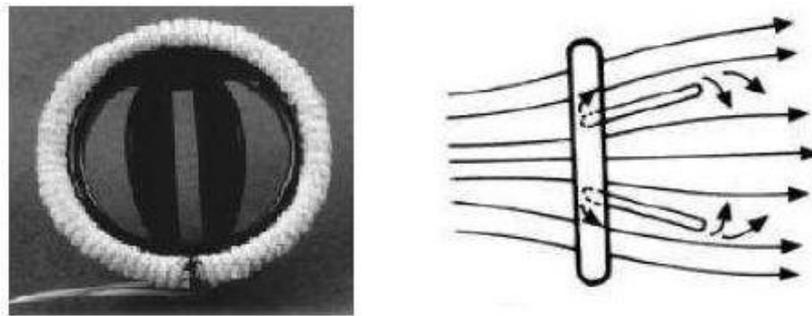


Figura 2.7: *St. Jude, a sinistra; linee di flusso per una valvola bileaflet, a destra*

Per le sue caratteristiche ideali sia in termini di biocompatibilità sia di resistenza alla fatica e al deterioramento, il carbonio pirolitico si è dimostrato il materiale con le prestazioni migliori, soprattutto quando usato sia per l'alloggiamento che per i *leaflet*, come nelle valvole St. Jude.

L'utilizzo del carbonio LTI richiede particolare attenzione nella fase di assemblaggio della protesi, poiché è un materiale ceramico e molto fragile se sottoposto a stress elevati. Un altro fattore da considerare nella scelta del materiale dell'occlusore è il fenomeno della cavitazione, cioè la formazione di bolle a causa dei repentini cambiamenti di pressione del sangue nei pressi della valvola. L'energia rilasciata al momento del collasso delle bolle, a lungo termine può danneggiare, la valvola, può creare emolisi o attivare piastrine. Si ritiene che materiali come l'UHMWPE (polietilene ad altissimo peso molecolare) possano in parte assorbire l'energia di impatto dell'occlusore contro l'alloggiamento, al contrario del carbonio pirolitico, riducendo gli sbalzi pressori ematici e la cavitazione. Infine l'anello di sutura può essere realizzato in Dacron, Teflon, polipropilene, materiali altamente biocompatibili, per evitare il distacco parziale della protesi dal tessuto circostante.

2.2.1 LE PROTESI VALVOLARI ATTUALMENTE IN USO

Nei prossimi paragrafi verranno illustrate le principali caratteristiche di cinque diversi modelli di protesi *bileaflet*.

i) St. Jude Regent

La valvola aortica St. Jude Regent è stata introdotta nella pratica clinica nel 1999, nel 2002 negli Stati Uniti. La St. Jude Medical (St. Paul, Minnesota) è stata la prima produttrice di valvole *bileaflet*. Le valvole St. Jude sono le più impiantate nel mondo e rappresentano il “gold standard” al quale vengono paragonate le prestazioni delle altre protesi. Alloggiamento e *leaflets* sono in grafite rivestita in carbonio pirolitico, con l’aggiunta di tungsteno per la radio-opacità. Nel modello Regent (Figura 2.8) restano invariate le proprietà di emocompatibilità e resistenza strutturale che negli anni hanno reso affidabili i modelli precedenti, ma vengono anche migliorate le prestazioni emodinamiche: l’angolo di apertura è 85° e i cardini sono interamente collocati su un bordo in carbonio che sporge in direzione sotto-anulare rispetto all’anello. Il flusso sanguigno attraverso di essa è simmetrico, di ridotta turbolenza, quasi laminare; inoltre si ha un profilo emodinamico migliore rispetto alle valvole St. Jude precedenti. L’anello di sutura è in PET o PTFE, è completamente sopra-anulare: in questo modo a parità di anello valvolare nativo si può impiantare una valvola di diametro maggiore. Il rapporto tra orifizio e anello è di oltre 84 %. Sono disponibili due diversi tipi di anelli di sutura: Standard o Flex cuff, a seconda della flessibilità che si desidera.



Figura 2.8: Valvola St. Jude Regent

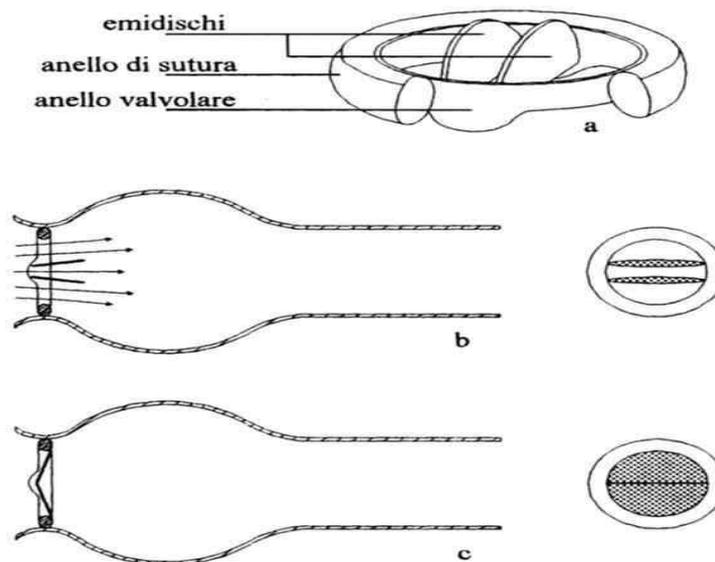


Figura 2.9: a) componenti strutturali della protesi; b) c) profilo emodinamico

Tali protesi sono costituite da quattro principali elementi: un anello di sutura, un anello valvolare di supporto e due emidischi, costruiti in carbonio pirolitico, il cui movimento consente ampi angoli di apertura, recando così disturbi fluidodinamici clinicamente non significativi, come visibile nell'immagine (Figura 2.10) seguente relativa ad analisi CFD (*Computational Fluid Dynamics*: tecnica che permette l'analisi fluidodinamica).

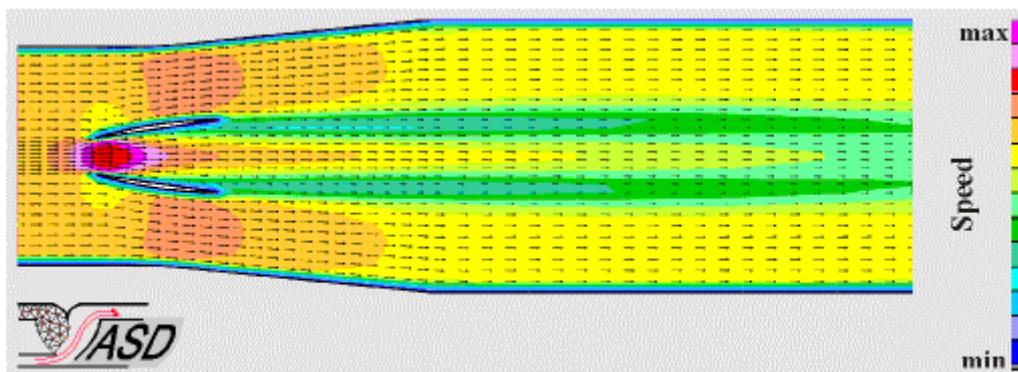


Figura 2.10: Da analisi numeriche CFD si possono notare (in rosso) zone nelle quali vi è presenza di danni (emolisi) a carico delle cellule ematiche, mentre altre (in blu) in cui vi è un elevato rischio di coagulazione.

Le complicanze più comuni sono le formazioni trombotiche o di un panno sui *leaflet*, generalmente dovute a una terapia anticoagulante non adeguata, e l'endocardite. Sono stati riportati casi isolati di blocco intraoperatorio dei *leaflet* a causa del posizionamento sottoanulare del meccanismo di

rotazione, che al contrario dei design precedenti è più esposto al rischio di bloccarsi a causa dell'interferenza dei tessuti sottovalvolari circostanti.

ii) Sorin Bicarbon Overline

Le protesi valvolari prodotte dalla Sorin Biomedica Cardia (Saluggia, Italia) sono sul mercato dal 1990, hanno il marchio CE ma non sono ancora state approvate dalla FDA. I *leaflet* sono concavo-convessi, costruiti in grafite e tungsteno ricoperti da un sottile rivestimento di carbonio pirolitico (Carbofilm) per assicurarne bassa trombogenicità.

L'escursione dei *leaflet* è basata solo su un movimento rotatorio e non avviene alcuno scivolamento: questo riduce l'attrito e di conseguenza l'usura della valvola. Inoltre i *leaflet* permettono un flusso laminare attraverso la valvola riducendo le turbolenze, dividendolo in tre parti idrodinamicamente equivalenti. La cerniera è stata progettata con canali di lavaggio in modo da ridurre il ristagno di sangue e la probabilità di formazione di coaguli.

La totale sopra-anularità della protesi permette l'impianto di valvole con orifizio più ampio. L'alloggiamento è costituito da una lega di titanio (Ti6Al4V), molto resistente, dotata di elevata rigidità al fine di ridurre la possibilità di deformazioni dopo l'impianto, e rivestito in Carbofilm, un film sottile in carbonio con struttura sostanzialmente equivalente a quella del carbonio pirolitico. Questo consente di massimizzare l'area effettiva dell'orifizio (EOA, Effective Orifice Area); per queste valvole si ottiene un rapporto tra orifizio della protesi e anello valvolare pari al 100%. Il rivestimento garantisce all'alloggiamento buona biocompatibilità senza modificarne le proprietà fisiche e strutturali.

L'anello di sutura è costituito da uno strato in PET e uno in PTFE con rivestimento di Carbofilm per migliorare l'emocompatibilità ed evitare crescita di tessuto verso l'interno della valvola (Figura 2.11).

Il grado di emolisi e di trombogenicità si è rivelato basso. Non sono riportati casi di cedimento meccanico, si è verificato, invece, un certo deterioramento, ma senza conseguenze, del rivestimento di Carbofilm in corrispondenza dei cardini.

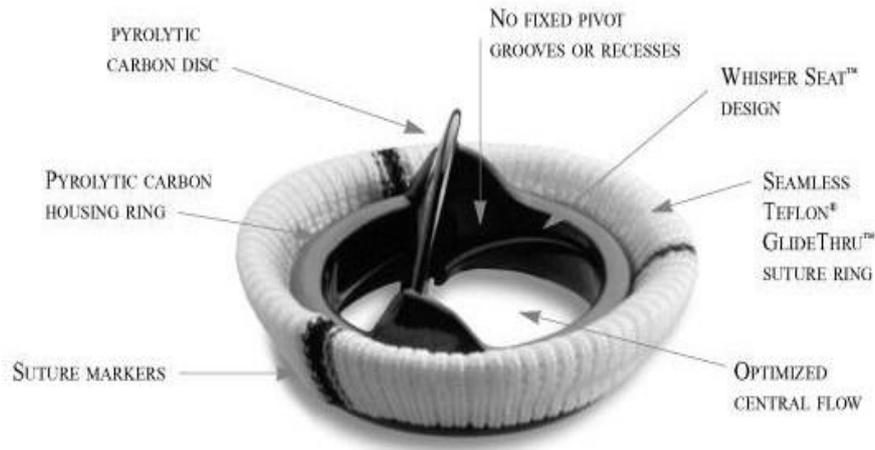


Figura 2.11: Valvola Sorin Bicarbon Overline

iii) On-X

Le On-X, che hanno avuto l'approvazione dalla FDA nel 2001, sono prodotte dalla On-X Life Technologies Inc., prima chiamata MCRI (Medical Carbon Research Institute) ad Austin, Texas, USA. Ne esistono sia modelli per il posizionamento intra-anulare sia sopra-anulare (Figura 2.12).

L'anello di sutura è in PTFE ed è attaccato alla valvola tramite un anello di titanio, che ne consente la giusta orientazione. I *leaflet* sono di grafite e tungsteno ricoperti da una lega di carbonio pirolitico e si collegano all'alloggiamento tramite cerniere a farfalla. La lega di carbonio pirolitico utilizzata per l'alloggiamento e per il rivestimento dei *leaflet* non contiene silicio, a differenza degli altri modelli di valvola: questo materiale dall'elevata purezza, chiamato On-X Carbon, risulta avere migliori caratteristiche per resistenza, durata, emodinamica e non trombogenicità. L'alloggiamento più allungato rispetto agli altri modelli di valvola descritti nei precedenti paragrafi, riduce l'angolo effettivo di rotazione dei *leaflet* attorno alle cerniere.

Con questo design il flusso del sangue risulta meno turbolento e il reflusso è ridotto; oltre a garantire migliori caratteristiche emodinamiche, il prolungamento dell'alloggiamento protegge gli occlusori e impedisce la crescita di tessuto nell'orifizio. Un sistema brevettato attutisce l'impatto dei *leaflet* in chiusura: l'energia viene distribuita sui due punti vicini ai perni, in modo che la velocità dell'impatto sia ridotta del 40%; si evitano così fenomeni di cavitazione ed emolisi.

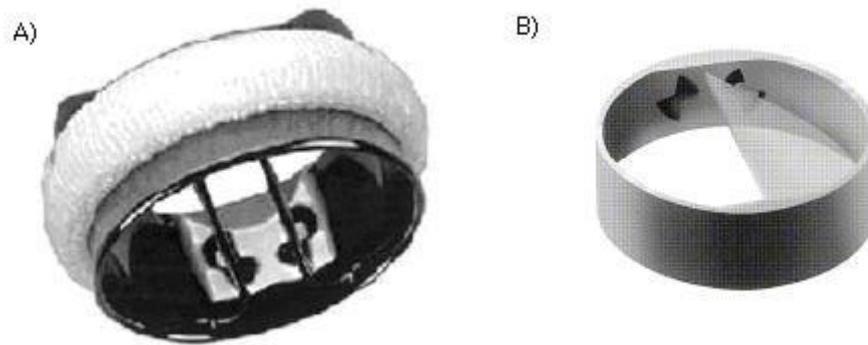


Figura 2.12: A) valvola On-X aortica, B) cerniera a farfalla

Gli studi a breve termine e i trial clinici hanno dimostrato che l'innovativo design della On-X migliora notevolmente le prestazioni emodinamiche rispetto agli altri modelli di valvola.

Dal 2006 è in atto negli Stati Uniti un trial clinico, PROACT (Prospective Randomized On-X Valve Reduced Anticoagulation Clinical Trial) per verificare se le particolari caratteristiche di questa protesi possano consentire la riduzione della terapia anticoagulante senza rischio di episodi tromboembolici.

iv) Carbomedics Top Hat

La valvola Carbomedics Top Hat è prodotta dalla Sulzer Carbomedics ad Austin, Texas, USA. È stata introdotta nel 1986, e nel 1993 ha ricevuto l'approvazione dell'FDA (Figura 2.13). Le protesi aortiche, dette Top Hat, sono le prime valvole destinate all'impianto totalmente sopraannulare.

I *leaflet* sono costruiti in grafite, con una componente di tungsteno per renderli radio-opachi, e rivestiti in carbonio pirolitico; l'alloggiamento è completamente in carbonio pirolitico e inoltre è circondato da un anello di titanio che ne garantisce l'indefornabilità e consente di ruotare e orientare la valvola come è più opportuno durante l'impianto. L'anello di sutura è in Dacron rivestito di carbonio Biolite. La valvola è disegnata senza perni che sporgono nel flusso sanguigno in modo da ridurre la turbolenza, facilitare l'impianto e proteggere il meccanismo di rotazione dei due *leaflet*. L'apertura raggiunta dai *leaflet* è pari a 78°.



Figura 2.13: Valvola Carbomedics Top Hat

Come detto, le Carbomedics Top Hat sono le prime valvole dall'impianto totalmente sopra-anulare; questa caratteristica rende possibile l'utilizzo di protesi dal diametro maggiore, e di conseguenza si ha un aumento dell'area orificiale. Questo implica l'aumento della portata e la riduzione dei gradienti pressori in corrispondenza della valvola. Il vantaggio è notevole in casi di anello aortico particolarmente stretto o calcifico.

v) Medtronic Advantage

La valvola aortica *bileaflet* Medtronic Advantage è un prodotto della Medtronic Inc. (Minneapolis, Minnesota, USA). La valvola è commercialmente disponibile nei paesi dell'Unione Europea e in Canada (Figura 2.14).

L'housing è in carbonio pirolitico; anche i *leaflet* sono in carbonio pirolitico e si aprono fino a un angolo di 86° , mentre l'angolo di chiusura è di 22° . L'anello di sutura in PET, ruotabile, è fissato all'alloggiamento tramite un anello di titanio. Il flusso attraverso la valvola è facilitato dal trattamento delle superfici a contatto con il sangue con il metodo brevettato "Surface Engineering" che le rende lisce. Inoltre il sistema di cerniere a farfalla "Sure-Flow" è innovativo e di proprietà della Medtronic: si tratta di un meccanismo multilivello e asimmetrico che assicura il flusso continuo del sangue nelle zone di incernieratura, normalmente sensibili alla formazioni di trombi.

Le valvole *bileaflet* sono caratterizzate in generale da un trascurabile flusso di ritorno in corrispondenza dei *leaflet*, che ne assicura la pulizia. Numerosi studi hanno però rilevato in vivo un

eccessivo reflusso nelle valvole Medtronic Advantage a causa dell'incompleta chiusura dei *leaflet*, che è risultata asintomatica e non dovuta a formazioni trombotiche.

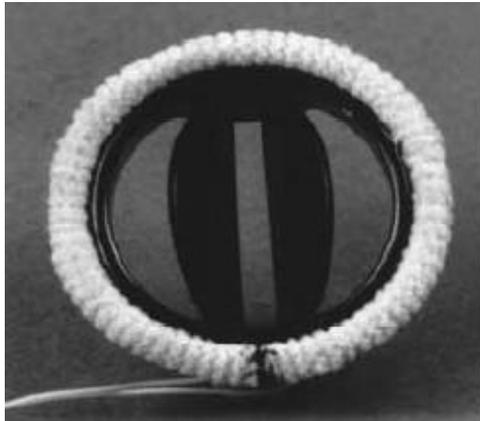


Figura 2.14: *Valvola Medtronic Advantage*

2.2 LE PROTESI VALVOLARI BIOLOGICHE

Le valvole biologiche possono essere eterologhe (*xenograft*), se composte di tessuto non umano (valvolare o pericardico), oppure omologhe, ossia valvole umane prelevate da cadavere (Figura 2.15). Il primo prodotto commerciale risale al 1963.

Entrambi i tipi di valvole *xenograft* prima di essere impiantati devono necessariamente subire un processo di pre-trattamento con glutaraldeide. Questo pre-trattamento serve a preservare e aumentare la resistenza del tessuto alla degradazione chimica ed enzimatica, e a ridurre l'immunogenicità.

Le protesi biologiche sono tipicamente ottenute applicando il tessuto biologico a un supporto (*stent*) che funge da sostegno al tessuto prelevato dal donatore, dopo essere stato opportunamente trattato al fine di inibire la risposta immunogenica nel ricevente, e allo stesso tempo consente la successiva applicazione al cuore. Questo costrutto è un grado di mimare le caratteristiche di struttura, morfologia e flusso sanguigno tipiche delle valvole native umane.

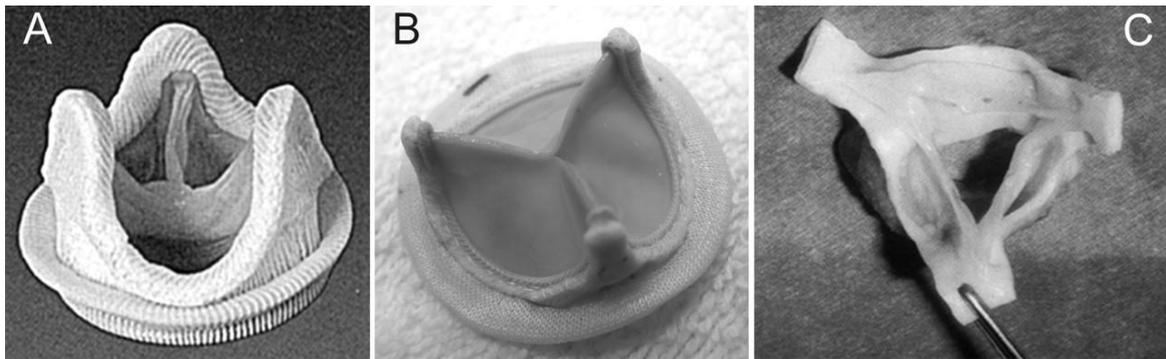


Figura 2.15: *Protesi biologica porcina (A), bovina (B), omologa (C).*

La presenza dello *stent* comporta alcune conseguenze indesiderate: la possibile ostruzione del flusso ematico può causare maggiore frizione e turbolenza all'interno della valvola, compromettendone la durevolezza e provocando stenosi residue, calcificazione e degenerazione. Per far fronte a questi problemi, sono state progettate valvole biologiche *stentless* (prive di *stent*) che esibiscono migliori proprietà emodinamiche (Figura 2.16).



Figura 2.16: *Protesi porcina stentless*

Nonostante i progressi nella costruzione delle bioprotesi, la presenza dello *stent* può determinare comunque un'ostruzione al flusso. Protesi meccaniche e biologiche *stented* possono essere ostruttive perché possono determinare un gradiente transvalvolare. Inoltre l'area effettiva delle protesi *stentless* è maggiore di un terzo rispetto alle *stented*. In aggiunta, non essendoci una struttura rigida all'interno dell'aorta, la natura dinamica della radice aortica viene preservata. Da ciò deriva una migliore performance emodinamica e una progressiva riduzione, nei mesi dopo l'intervento,

dell'ipertrofia ventricolare sinistra, ovvero dell'aumento di spessore del muscolo cardiaco, che si verifica negli anni a causa della presenza della valvola aortica stenotica. La maggiore durata nel tempo delle protesi *stentless* rispetto alle bioprotesi tradizionali e la ridotta incidenza di complicanze emboliche sono ancora oggetto di studio. Alcuni esempi di valvole biologiche sono: Toronto SPV, S. Jude Medical, Edwards *stentless*, Medtronic *freestyle*.

Il principale vantaggio delle protesi biologiche è il basso potenziale trombogenico: con questo tipo di valvole non è richiesta la terapia anticoagulante a vita. Il limite principale delle valvole biologiche è legato però al possibile rigetto per effetto della risposta immunitaria del ricevente; devono essere perciò “decellularizzate” per eliminare dalla matrice tutte le cellule del donatore; il trattamento di decellularizzazione può però modificare in maniera considerevole le caratteristiche funzionali della matrice extra-cellulare, alterandone drasticamente le proprietà biochimiche e biomeccaniche. Le valvole biologiche non sono vitali, dal momento che i trattamenti applicati sul tessuto del donatore ne compromettono la funzionalità biologica.

La durata media delle valvole biologiche, si aggira attorno ai 10 - 15 anni: processi degenerativi possono infatti insorgere a causa delle reticolazioni chimiche che si rendono necessarie per dare stabilità alle fibre di collagene dopo la decellularizzazione. La reticolazione è spesso ottenuta utilizzando glutaraldeide: reagente chimico non costoso, solubile in acqua, in grado di produrre reticolazioni stabili. Il lento rilascio di glutaraldeide non reagita, presente nella matrice dopo il trattamento, può causare severi problemi: citotossicità, risposta infiammatoria, calcificazione. Inoltre impedisce la riendotelizzazione, ostacolando l'integrazione del dispositivo. Da questo punto di vista, sono promettenti le proprietà delle valvole costruite mediante le nuove tecniche di ingegneria tessutale.

2.2.1 Deterioramento delle protesi valvolari cardiache

Due sono i principali meccanismi, potenzialmente sinergici, che causano il deterioramento strutturale delle bioprotesi: la calcificazione e la degradazione non calcifica della MEC.

- Calcificazione delle bioprotesi

La calcificazione delle cuspidi inizia a livello dei fosfolipidi delle membrane cellulari delle cellule devitalizzate in seguito al trattamento con glutaraldeide (Figura 2.17). Questi iniziali depositi calcifici possono aumentare di dimensioni, formando dei noduli mineralizzati macroscopicamente evidenti. Si assiste così alla progressione della cristallizzazione. L'accrescimento dei nuclei di

fosfato di calcio procede più o meno velocemente a seconda delle concentrazioni di calcio e di fosfato e in funzione del bilancio tra acceleratori e inibitori della mineralizzazione. Infatti, la calcificazione è più rapida nei pazienti giovani, in cui il metabolismo di calcio e fosfato è accelerato. I depositi di calcio seguono la direzione delle fibre collagene e si concentrano nei siti di più intenso stress meccanico. Questo causa un irrigidimento delle cuspidi con successivo malfunzionamento della protesi. La fissazione in glutaraldeide sembra accelerare il processo. Per questo motivo sono state introdotte sul mercato nuove bioprotesi pre-trattate con agenti anticalcificanti (soprattutto quelli che rimuovono o alterano il substrato di fosfolipidi di origine cellulare).

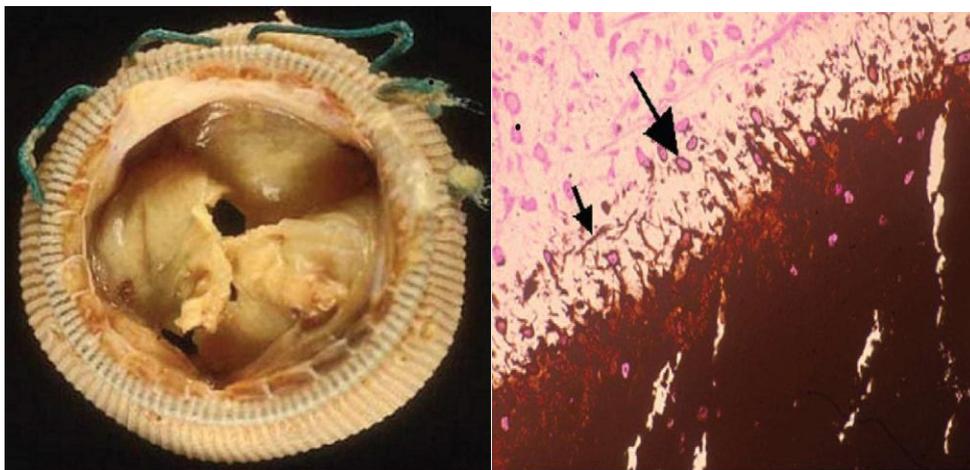


Figura 2.17: Sinistra - *Bioprotesi porcina espantata dopo fallimento per calcificazione e rottura delle cuspidi*; destra - *Micrografia delle creste di un deposito calcifico in una bioprotesi porcina: si vedono densità calcifiche sia nelle cellule grandi(frecce grandi) sia nel collagene (frecce piccole)*

- Degradazione non calcifica delle bioprotesi

La degradazione non calcifica della MEC sembra dovuta alla fissazione chimica con glutaraldeide: la morte delle cellule rende impossibile rimodellare e riparare i danni causati dagli stress meccanici valvolari. La fissazione delle fibre collagene in una singola configurazione, impedisce i naturali riarrangiamenti della MEC delle cuspidi, che accompagnano il normale funzionamento valvolare. Di conseguenza, durante la chiusura e apertura della bioprotesi fissata, lo stress meccanico determina la rottura delle fibre collagene e la deformazione delle cuspidi.

Il fissaggio della valvola in glutaraldeide è una delle prime cause di calcificazione del tessuto biologico; ma al momento non esistono altri metodi di fissaggio efficaci. Quindi dopo il fissaggio, per prevenire conseguenti calcificazioni, viene effettuata l'estrazione della glutaraldeide residua,

seguita poi da un processo di detossicazione. In seguito, per una migliore protezione del materiale biologico, vengono applicati diversi trattamenti anticalcificanti.

Diversi sono i requisiti affinché un trattamento anticalcificante risulti efficace, tra questi: un'inibizione effettiva e prolungata della calcificazione, un'adeguata performance della valvola in termini di emodinamica e di curabilità, l'assenza di infiammazione a livello locale e sistemico, l'assenza di interazioni sangue-superficie (emolisi, adesione delle piastrine), l'assenza di tossicità e di potenziale infezione. Il processo di degenerazione degli *xenograft* inizia sulle membrane delle cellule morte, che sono in maggioranza composte da fosfolipidi e colesterolo. Poi si diffonde formando cristalli di calcio in collagene ed elastina.

Oggi esistono diverse tecniche per ridurre la calcificazione tissutale. Una di esse prevede di applicare etanolo al 95%, per la rimozione del 94% dei fosfolipidi del 99% del colesterolo dalle membrane cellulari e la prevenzione del riassorbimento dei lipidi in vivo; inoltre si verifica un cambio permanente della struttura a tripla elica del collagene, dal quale deriva in seguito il blocco dei siti per il calcio e infine la rimozione dei gruppi inattivi della glutraldeide.

Altro metodo per migliorare la curabilità e la performance della valvola biologica attualmente in uso è l'utilizzo di un trattamento a base di etanolo e alluminio, in modo che l'alluminio si leghi permanentemente all'elastina, prevenendo così l'attacco del calcio, e ai gruppi esterici fosforici, siti di iniziazione della calcificazione, e inibisca l'attività della fosfatasi alcalina, enzima di sintesi ossea.

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

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

Capitolo 3

Protesi valvolari ingegnerizzate

L'ingegneria tessutale è stata definita nel 1998 in California come “ *una tecnica interdisciplinare che applica i principi e i metodi dell'ingegneria e delle scienze biologiche con l'obiettivo di comprendere le relazioni fondamentali tra struttura e funzione nei tessuti sani e malati dei mammiferi e di sviluppare sostituti biologici in grado di ripristinare, mantenere o migliorarne le funzioni* ” .

Questo recente campo di ricerca è nato in risposta: al crescente fabbisogno di tessuti e organi che le donazioni non sono in grado di soddisfare, all'insufficienza della quantità di tessuto disponibile nel caso di autotrapianti, allo scopo di evitare tutti i problemi di rigetto sempre presenti nel caso di trapianti di tessuti (sia che si tratti di allotrapianti che di xenotrapianti) e per evitare problemi relativi a gravi infezioni virali cui i materiali di provenienza umana o animale utilizzati per l'innesto nei trapianti possono essere trasportatori

Questa tecnica ricopre un ruolo fondamentale nella medicina rigenerativa, definita dai National Institutes of Health (NIH) come il processo per creare tessuti viventi adatti alla riparazione o alla sostituzione di organi o tessuti le cui funzioni sono venute meno a causa dell'invecchiamento, delle malattie e dei danni o dei difetti congeniti. L'obiettivo della rigenerazione dei tessuti è quindi quello di favorire o innescare una reazione di rigenerazione che non può avvenire spontaneamente in un organo o tessuto irreversibilmente danneggiato.

Tale settore è caratterizzato da una grande interdisciplinarietà: in esso convergono significativi contributi delle scienze di base, della scienza dei biomateriali, della bioingegneria, delle biotecnologie, della biologia cellulare, della medicina rigenerativa. Forse è proprio questa collaborazione di menti specializzate in campi diversi che ci ha portato e porterà a validi risultati.

L'ingegneria tessutale mira a coltivare a livello di laboratorio e, in molti casi, anche a livello industriale, linee cellulari e tessuti con le caratteristiche del ricevente. Le cellule ed i tessuti ottenuti in vitro sono poi innestati nel paziente stesso, ripristinando le funzionalità compromesse senza dover ricorrere al trapianto di materiali biologici prelevati da donatori estranei. Rispetto alle tradizionali tecniche di trapianto quindi, i tessuti ingegnerizzati, in caso di successo, si integrano

con quelli del paziente, apportando in tal modo un contributo specifico e duraturo alla cura dello stato patologico, senza richiedere debilitanti e costosi trattamenti farmacologici.

Un'importanza rilevante assume la conoscenza e lo studio per comprendere nei dettagli i meccanismi che regolano la crescita, la proliferazione e la differenziazione delle cellule e le modalità attraverso le quali, i componenti della matrice extracellulare (ECM), interagiscono con le funzioni cellulari. Studi su valvole cardiache sane, patologiche o sostituite hanno dimostrato che il principale fattore che determina la durata della valvola è l'ECM, la cui quantità e qualità dipendono dalla vitalità e funzionalità delle cellule interstiziali valvolari (VIC).

La progettazione di questi tessuti avviene attraverso l'utilizzo combinato di materiali, cellule e segnali biochimici attraverso due tipologie di approccio.

- in vitro seeding: il tessuto viene seminato con le cellule del paziente e nutrienti e posto in un bioreattore che simula l'ambiente biologico, creando le condizioni migliori per la crescita cellulare. Una volta ultimato il tessuto verrà poi impiantato nel paziente;
- tissue guided regeneration (in vivo): in questo approccio non viene realizzata la semina cellulare in vitro poiché il tessuto viene direttamente impiantato nel paziente.

Per la realizzazione di nuovi costrutti biologici questa disciplina si avvale di tre elementi principali:

- le cellule: la scelta della corretta fonte cellulare è un punto cruciale per l'ingegnerizzazione di un tessuto;
- lo scaffold: fornisce un supporto tridimensionale alle cellule. Forma, struttura e materiali sono scelti a seconda della specifica applicazione;
- il bioreattore: costituisce il sistema di condizionamento della coltura, fornendo opportuni stimoli e mantenendo il costrutto in un ambiente sterile.

Il procedimento per ottenere un tessuto ingegnerizzato è suddiviso in sei fasi:

- fabbricazione dei supporti tridimensionali;
- prelievo ed espansione delle cellule del donatore;
- semina su scaffold;
- proliferazione e differenziazione cellulare in condizioni dinamiche all'interno di un bioreattore;
- impianto nel paziente;
- integrazione e adattamento dell'impianto da parte del sistema biologico.

3.1 TIPOLOGIE DI MATRICI PER VALVOLE CARDIACHE INGEGNERIZZATE

Gli scaffold utilizzati dall'ingegneria tissutale sono di tre tipi:

- sintetici;
- biologici;
- ibridi;

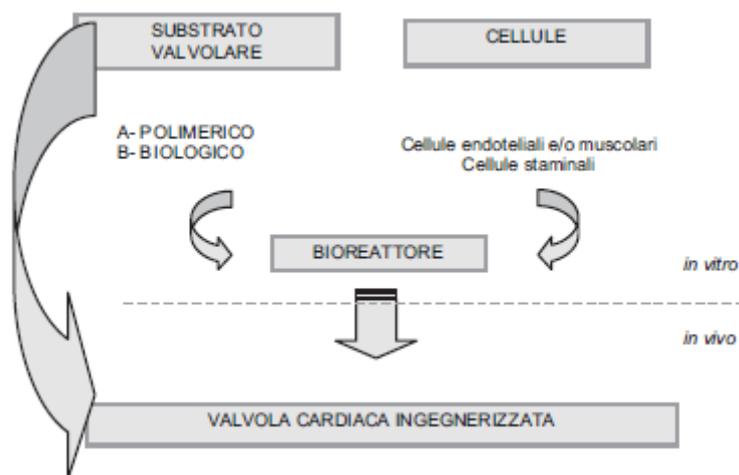


Figura 3.1: *Flow-chart del processo di creazione di valvole cardiache ingegnerizzate*

Gli scaffold di tipo sintetico sono costituiti di polimeri biodegradabili e biorisorbibili che, terminata la fase di crescita tissutale in vitro e/o in vivo, continuano il loro processo di degradazione, permettendo la crescita di una matrice extracellulare indistinguibile da quella nativa. Partendo da una matrice completamente sintetica, a fine degradazione, avremo un organo o tessuto completamente biologico.

I primi materiali utilizzati per la costruzione di supporti sintetici sono stati l'acido poliglicolico (PGA), l'acido polilattico (PLA) e i loro copolimeri, ma vi è una continua ricerca di nuovi materiali e combinazioni di materiali per migliorare le caratteristiche biologiche e di processing. Infatti, oggi il PGA e il PLA sono stati abbandonati perché troppo rigidi e non adatti alla crescita cellulare in vitro, e sono stati sostituiti con materiali come il poliidrossialcanoato (PHA) e il poli-4-idrossibutirato (P4HB). La combinazione di PGA, non intrecciato, e di P4HB, di rivestimento, conferisce allo scaffold termo-plasticità e consente di modellarlo in complesse forme tridimensionali, come una valvola cardiaca a tre lembi. Il PHA, infine, è un polimero termoplastico che deriva da un batterio. È un materiale flessibile ma richiede uno speciale processo di lisciviazione salina per ottenere una porosità accettabile per la semina cellulare. Il vantaggio dei supporti sintetici è rappresentato dalla possibilità di variare non solo le loro caratteristiche di

biodegradabilità, biorisorbibilità ma anche le caratteristiche biomeccaniche, agendo sulla composizione chimica e sulla lavorazione. Inoltre possono essere funzionalizzati con specifici segnali molecolari in grado di migliorare e incrementare adesione e proliferazione cellulare, e presentano minore tendenza a evocare risposte immunogene. Gli svantaggi principali consistono nella difficoltà della costruzione del supporto nella forma tridimensionale corretta che sia stabile, resistente e flessibile; inoltre i polimeri presentano spesso un'elevata trombogenicità e una scarsa adesione e proliferazione cellulare, e nella loro degradazione possono generare sostanze tossiche per l'organismo.

Gli scaffold di tipo biologico possono essere di origine umana (allogenica) o animale (eterogenica). Questa matrice tridimensionale può essere utilizzata direttamente come patch chirurgico o per la costruzione di valvole ingegnerizzate o per la semina in vitro con cellule autologhe per produrre un costrutto tessutale vitale. Tra le matrici più promettenti c'è il pericardio: ideale è quello di origine umana, poiché l'organismo ricevente lo riconosce come "self" e non attiva la risposta immunitaria, ma la disponibilità di pericardio umano è molto limitata, per cui attualmente, il pericardio maggiormente utilizzato per la costruzione di valvole ingegnerizzate biologiche è il pericardio bovino.

La matrice extracellulare che li compone presenta naturali siti di adesione cellulare, e contiene fattori per la crescita e le informazioni ottimali per lo sviluppo cellulare. Anche se decellularizzati, gli scaffold biologici, presentano un certo rischio di scatenare una risposta immunogenica da parte del paziente.

Le loro proprietà meccaniche non sono eccellenti data la decellularizzazione e studi recenti hanno messo in luce una certa difficoltà alla penetrazione cellulare della matrice, con conseguente crescita tessutale incompleta.

L'approccio all'utilizzo di scaffold decellularizzati è da preferirsi a quello di scaffold artificiali, viste le migliori prestazioni dei primi rispetto ai secondi. La strada più promettente, attualmente, risulta essere quella dell'impianto di matrici seminate e preconditionate in vitro, in quanto è stata constatata una forte risposta immunogenica dopo l'impianto di valvole decellularizzate e non ripopolate che ha portato alla completa degenerazione dei tessuti con conseguente morte dei pazienti.

Gli scaffold ibridi si basano sull'idea di rivestire con un sottile strato di polimero biodegradabile una valvola porcina decellularizzata per migliorarne le caratteristiche meccaniche e biologiche. È stato dimostrato che il tessuto ibrido è rapidamente assimilato dall'organismo una volta impiantato. Inoltre, il rivestimento polimerico attenua l'attività pro-coagulativa delle componenti della matrice

extracellulare. E' ancora materia di dibattito se queste protesi debbano, o meno essere seminate in vitro prima dell'impianto. Per passare all'applicazione clinica sull'uomo, sono necessari studi più approfonditi a lungo termine.

Una nuova frontiera dell'ingegneria tessutale propone l'utilizzo di peptidi auto-assemblanti come scaffold per la crescita cellulare. In diversi campi si sta sfruttando la loro capacità di organizzarsi in strutture ordinate mediante la creazione di legami idrogeno, ionici, interazioni idrofobiche e forze di Van der Waals. I peptidi sono infatti in grado di assemblarsi in strutture bi- o tri- dimensionali promuovendo le interazioni cellula-scaffold e cellula-cellula.

3.1.1 MATRICE VALVOLARE SINTETICA VS MATRICE VALVOLARE BIOLOGICA

I supporti valvolari polimerici devono essere degradabili, biocompatibili, riassorbibili, con macrostrutture a elevate porosità (almeno del 90%). Tali caratteristiche sono indispensabili per la crescita cellulare che deve avvenire su una superficie che promuova l'adesione delle cellule, la loro migrazione, proliferazione, differenziazione con la formazione dei componenti della nuova matrice extracellulare e il suo rimodellamento. Attualmente i polimeri maggiormente impiegati sono l'acido poliglicolico e polilattico. L'unione del primo, idrofilico, rapidamente assorbito con il secondo, idrofobico, permette di avere una matrice che limita il riassorbimento d'acqua riducendo l'idrolisi. Tali materiali sono ampiamente usati in numerosi apparati medicali e vengono considerati non tossici e biocompatibili. Tuttavia, questi biomateriali, se impiegati per costituire una matrice tridimensionale sintetica che possa essere ripopolata tra le sue maglie da cellule, inducono una reazione infiammatoria locale associata, quindi, ad una rallentata o incompleta degradazione dei biopolimeri stessi. Le valvole ingegnerizzate devono riprodurre le caratteristiche meccaniche delle valvole native ed essere capaci, quindi, di rimodellare il tessuto stesso con riassorbimento del substrato sintetico.

Durante la fase di degradazione e riassorbimento dei biopolimeri – fase cruciale – occorre, dunque, che gli spazi creati dal riassorbimento dei polimeri vengano occupati dalle cellule che costituiranno la matrice extracellulare; diversamente, si può creare tessuto fibroso con un'alterazione dell'architettura e della specializzazione cellulare che può venire alterata fino ad arrivare alla necrosi del tessuto per scarso apporto in ossigeno e dei nutrienti e per la mancata rimozione delle scorie. Nei primi lavori sperimentali, Shinoka (et al.) avevano ottenuto una valvola partendo da un biopolimero di acido poliglicolico seminato con cellule endoteliali. Tale struttura era stata impiantata in posizione della valvola polmonare e aveva evidenziato come i lembi valvolari risultassero molto più sottili, meno elastici e con ridotte capacità di flettersi, se paragonati

con i lembi nativi. Proseguendo in tale direzione, nel 2000, Hoerstrup (et al.) hanno impiantato in animale (pecora), per 5 mesi, una valvola partendo da un substrato sintetico di acido poliglicolico associato a polidrossibutirrato così da formare una struttura geometricamente simile ai tre lembi naturali. Su tale matrice sintetica erano stati dapprima seminati *in vitro* miofibroblasti e cellule endoteliali con l'ausilio di un bioreattore, uno strumento capace di riprodurre le condizioni dinamiche naturali di pulsatilità del flusso. In tale ambiente, la valvola ha mostrato la capacità di crescere *in vitro* con la formazione di proteine della matrice extracellulare con una struttura istologica ben organizzata. Innestata chirurgicamente in posizione della valvola polmonare e sottoposta a controllo ecocardiografico *in vivo*, presentava lembi mobili, funzionanti, con assenza di trombi o aneurismi e con caratteristiche meccaniche e di matrice extracellulare simili ad una valvola normale. In particolare, il biopolimero era stato degradato ottenendo un'endotelizzazione uniforme e una struttura trilaminare molto simile a quella presente su una valvola polmonare nativa di pecora. L'uso di una matrice cellulare di origine umana o animale decellularizzata, invece, rappresenta attualmente il supporto che più si avvicina al modello naturale. Tuttavia, sono diversi i quesiti ancora da chiarire. Per esempio è necessario chiarire meglio quale sia la capacità di questi tipi di valvole e dei costituenti di indurre una risposta infiammatoria e immunologica, definendo, inoltre, la migliore metodica per effettuare la decellularizzazione. In tale senso non è ancora chiaro se questo processo renda la valvola immunologicamente inerte, se le cellule seminate possano penetrare la matrice e differenziarsi essendo quindi biologicamente attive. Se è stato, infatti, dimostrato che le valvole decellularizzate si comportano meglio rispetto a quelle non decellularizzate in relazione al fatto che la risposta immunologica, infiammatoria e la calcificazione sembrano essere correlabili con le cellule originariamente presenti nella matrice, è vero anche che valvole decellularizzate ed impiantate in animale senza essere ricellularizzate presentano risultati peggiori in relazione alla possibilità di ricostituire tessuto interstiziale con collagene e glicani. Per valutare quindi gli effetti dei diversi trattamenti enzimatici, il gruppo di Simon ha considerato l'efficacia di differenti metodi di decellularizzazione (Synergraft, Triton X-100, desossicolato di sodio, Igepal CA-630 e ribonucleasi) su valvole porcine, nei confronti della risposta immunitaria e della trombogenicità, e sulla capacità di totale rimozione delle cellule native. Gli autori hanno dimostrato che la completa eliminazione delle cellule native non rende la matrice biologicamente inerte. La matrice di una valvola porcina decellularizzata esprime, infatti, la capacità potenziale di attrarre le cellule infiammatorie e di indurre attivazione delle piastrine suggerendo che è fondamentale controllare i differenti fattori che stimolano l'infiammazione per poter usare i tessuti porcini come tessuti ingegnerizzati.

Tuttavia, ancora oggi, non è chiaro quanto debba essere estesa la decellularizzazione affinché non vengano deteriorati anche i componenti della matrice extracellulare quali i glicosaminoglicani che rivestono un ruolo fondamentale nell'elasticità dei tessuti e nella prevenzione della calcificazione.

Dal punto di vista clinico se Dohmen (et al.) hanno riportato esperienze positive utilizzando una valvola porcina decellularizzata con una metodica industriale brevettata, risultati scadenti, invece, sono stati ottenuti con l'impianto di tali valvole su bambini da Simon et al., mostrando che le valvole espiantate presentano una reazione infiammatoria – neutrofili, macrofagi e linfociti – a livello della matrice extracellulare molto elevata, con una scarsa ripopolazione della matrice stessa da parte dei fibroblasti che appaiono incapaci di penetrare nella matrice extracellulare formando degli aggregati isolati.

Utilizzando omoinnesti valvolari umani decellularizzati con la stessa metodica, è stato invece rilevato che la risposta antigenica è minima ad 1 anno; inoltre è stato evidenziato che le proprietà biomeccaniche, il modulo di elasticità, la resistenza agli stress di tali valvole cardiache sono sovrapponibili alle caratteristiche di valvole criopreservate e non sottoposte ad alcun trattamento.

Tali valvole, oltre a mantenere le proprietà meccaniche, riescono anche a rimodellarsi *in vivo* grazie alla presenza di cellule seminate *in vitro*.

Teoricamente, quindi, l'omoinnesto valvolare decellularizzato e ricellularizzato con cellule autologhe rappresenta la matrice ideale. Tuttavia, ulteriori studi devono chiarire meglio se e in quale misura tale tessuto venga ripopolato dalle cellule seminate.

3.2 UTILIZZO DEL PEROCARDIO COME BIOMATERIALE

Il pericardio è una membrana sierosa (tonaca) dalla forma complessa che avvolge il cuore e la parte più prossimale della maggior parte dei grandi vasi a lui adiacenti.

Il tessuto pericardico è utilizzato ampiamente sia in ambiente chirurgico sia in ambiente sperimentale; può essere di origine umana (scarsa disponibilità) o animale (bovino, porcino, ovino, equino).

Gli ambiti dove è maggiormente richiesto sono: la neurochirurgia, la tracheoplastica, la chirurgia maxillo-facciale, la chirurgia oftalmica, ecc. anche se il campo dove è massimo il suo impiego è quello cardiocirurgico.

Il pericardio bovino è il materiale di eccellenza per la costruzione dei lembi di bioprotesi valvolari cardiache (tradizionali e percutanee). Tali valvole biologiche sono costruite *ex-novo* utilizzando alcune porzioni di pericardio scelte e selezionate da zone specifiche del tessuto intero. Queste zone

devono presentare un alto grado di uniformità di orientamento e distribuzione delle fibre di collagene e uno spessore tissutale costante.

Il pericardio è stato considerato a lungo un materiale di qualità inferiore rispetto ai lembi valvolari porcini per la costruzione delle bioprotesi, tuttavia, le protesi in pericardio bovino hanno dimostrato una maggiore apertura dei lembi, più completa e simmetrica, con conseguenti vantaggi emodinamici. Inoltre, la maggiore percentuale di collagene presente nel tessuto pericardico, favorirebbe una maggiore durata della valvola stessa.

In base alla zona di appartenenza variano, infatti le caratteristiche fisiche del tessuto. Dopo decellularizzazione, infatti, la zona del pericardio bovino del ventricolo anteriore sinistro (VAS) presenta un orientamento più definito delle fibre collagene, mentre il ventricolo posteriore destro (VPD) quella con andamento più eterogeneo delle fibre collagene. Infine, il ventricolo anteriore destro e il ventricolo posteriore sinistro conservano, dopo la decellularizzazione, un andamento delle fibre di collagene intermedio a quello delle due aree precedenti.

3.3 ADESIONE E PROLIFERAZIONE CELULARE

Passo fondamentale per la realizzazione di tessuti ingegnerizzati è l'attivazione di tutti i processi di adesione e proliferazione cellulare sullo scaffold.

Quest'aspetto cruciale permette la piena realizzazione della struttura e del suo mantenimento allo scopo di ottenere il corretto funzionamento del tessuto che andrà a svilupparsi sull'impianto.

Di rilevante importanza è l'adesione cellulare poiché essa è strettamente legata alla crescita, alla migrazione e alla differenziazione delle cellule. Molte di queste sono ancoraggio-dipendenti, cioè non interagiscono e non esprimono le loro funzioni fino a quando non abbiano aderito al supporto.

Diverse sono le proteine che favoriscono l'adesione svolgendo la funzione di mediatori, ognuna specifica della zona in cui agisce. Per la matrice extracellulare abbiamo fibronectina, collagene, laminina, vitronectina.

Queste proteine sono in grado di legarsi e quindi comunicare solo con specifici ricettori, in grado di generare i segnali caratteristici per l'adesione e la proliferazione cellulare.

Entrambi i processi sono fondamentali per la genesi di tessuto sano e per l'attivazione dei meccanismi d'interazione e riconoscimento cellula-cellula e cellula-matrice.

La proliferazione cellulare è strettamente dipendente dal processo di adesione, ed è altrettanto fondamentale alla fine della crescita di nuovi tessuti.

3.4 PROCEDIMENTO

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

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

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

- ricostruzione di valvole completamente artificiali a partire da biomateriali biocompatibili e biodegradabili;
- decellularizzazione di valvole cardiache native da donatori della stessa specie (allotrapianto) o di specie diverse (xenotrapianto).

I principali svantaggi dell'approccio puramente basato sull'utilizzo di biomateriali di sintesi sono principalmente le difficoltà nella costruzione di una struttura tridimensionale stabile, resistente alla trazione e contemporaneamente flessibile e provvista di cuspidi funzionali, oltre alla pronunciata trombogenicità dei polimeri utilizzati per la costruzione dello scaffold; scarsa adesione cellulare e conseguente scarsa rigenerazione cellulare.

L'utilizzo di scaffold biologici può essere un'alternativa per il superamento di questi inconvenienti in quanto da un punto di vista morfologico è sicuramente una struttura che più si avvicina a quella reale ma, per poter essere utilizzato in ambito clinico, lo scaffold deve essere sottoposto ad una particolare procedura di “lavaggio” detta decellularizzazione.

La decellularizzazione è una tecnica mediante la quale tutti i fattori immunogenici, proteine, carboidrati e acidi nucleici delle cellule vengono eliminati senza causare alterazioni rilevanti alle proprietà strutturali ed emodinamiche del tessuto. Dopo la decellularizzazione, la valvola si riduce a matrice extracellulare. Nell'ambito della *Tissue Engineering*, il tessuto acellulare ottenuto viene ripopolato dalle cellule dell'organismo ricevente, con una maturazione direttamente *in vivo* mediante le cellule autologhe circolanti e residenti, oppure con la semina di cellule accresciute *in vitro*, l'incubazione in un bioreattore e la successiva maturazione definitiva *in vivo*; la matrice totalmente ripopolata risulterebbe così “invisibile” al sistema immunitario dell'ospite, poiché sarebbe circondata da cellule endoteliali riconosciute come *self* ed, eventualmente, rimodellata.

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

Questo tipo di matrice contiene la struttura ed i componenti ottimali per ospitare le cellule dell'organismo ricevente, fornendo un ambiente ideale per i recettori cellulari di superficie e una riserva per i fattori di crescita che modulano i processi biologici quali: angiogenesi, vascologenesi, migrazione e proliferazione cellulare.

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

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

3.5 APPROCCIO

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

- Cellule staminali adulte ASC: sono cellule non specializzate, reperibili tra cellule specializzate di un tessuto specifico e sono prevalentemente multipotenti. Queste sono tuttora già utilizzate in cure per oltre cento malattie e patologie. Esse derivano dal midollo osseo, dal fegato, dal cordone ombelicale o da alcuni tessuti adulti e pertanto hanno limitata capacità di trasformarsi in altri tipi di tessuto.

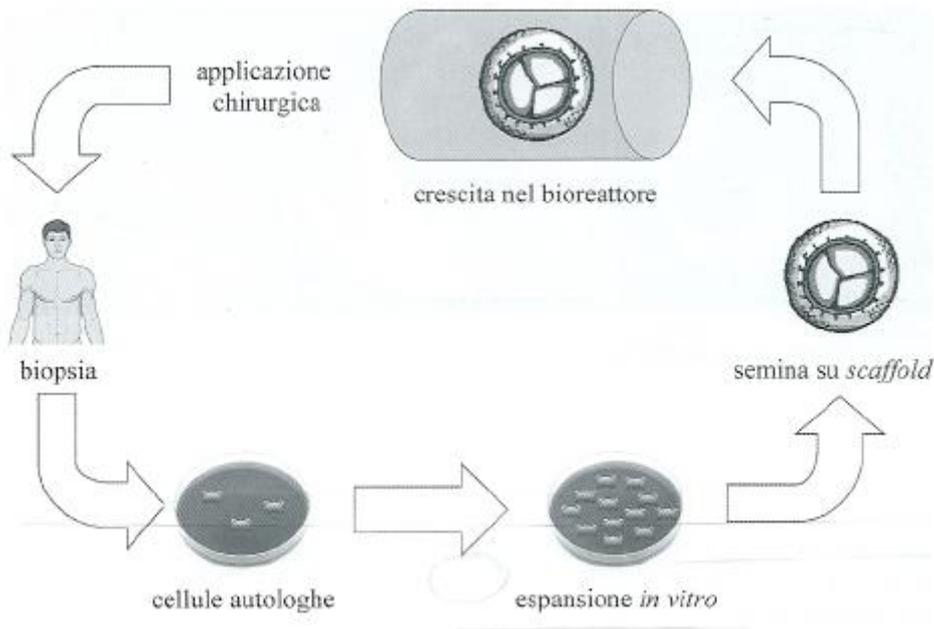


Figura 3.2: *Processo attraverso il quale reperire cellule ASC*

- Cellule staminali embrionali ESC, cioè cellule totipotenti.

Ovviamente le cellule staminali dell'adulto non hanno le stesse capacità di differenziarsi: nella maggior parte dei casi sono in grado di formare soltanto i tipi cellulari delle linee di origine.

In realtà anche le cellule staminali dell'adulto sono una risorsa da non sottovalutare. Infatti cellule staminali di alcuni compartimenti, come ad esempio le cellule staminali ematopoietiche del midollo osseo (HSC, haematopoietic stem cells) o quelle da cui deriva la componente stromale, dette cellule staminali mesenchimali (MSC, mesenchymal stem cells), hanno dimostrato una notevole plasticità nella colonizzazione di una varietà di tessuti in alcune situazioni sperimentali e in risposta a danno tissutale o infiammazione. In particolare le MSC rappresentano un raro tipo di cellula derivata dal midollo osseo, denominata anche "cellula progenitrice adulta multipotente", capace di differenziarsi in numerose linee cellulari. Una simile cellula è stata anche isolata nel sangue da cordone ombelicale e nel liquido amniotico. Tutte le MSC sono caratterizzate da un immunofenotipo e, soprattutto, hanno mostrato la plasticità di formare da cellule neurali a cellule muscolari oltre a diverse linee cellulari, quali tessuto adiposo, cartilagine e osso.

Le cellule staminali adulte normalmente vengono derivate da siti facilmente reperibili quali per esempio: arterie periferiche (arteria radiale), vene (grande vena safena), cellule del sangue o

cellule del midollo osseo (MSC) queste ultime mostrano maggiore capacità di proliferazione e differenziazione.

Le cellule staminali embrionali vengono invece reperite o dagli embrioni o dal cordone ombelicale. Una volta reperito il tessuto è necessario differenziare la linea cellulare desiderata e successivamente espanderla utilizzando tecniche di coltura standard.

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

3.6 BIOREATTORI

I bioreattori sono quindi dispositivi nei quali le cellule vengono fatte crescere favorendo la proliferazione e funzionalizzazione cellulare; una continua perfusione con mezzo di coltura nelle strutture porose dello scaffold, permette un nutrimento ciclico di ogni parte del costruito, facilitando il trasporto di massa ed in particolare consentendo all'ossigeno di essere disponibile a tutte le cellule, anche a quelle più nascoste. Questo continuo rimescolamento del nutrimento, che avviene in diversi modi a seconda del bioreattore, guida lo sviluppo della composizione biochimica dei tessuti ed è considerato fattore determinante nella differenziazione e crescita delle cellule in vitro.

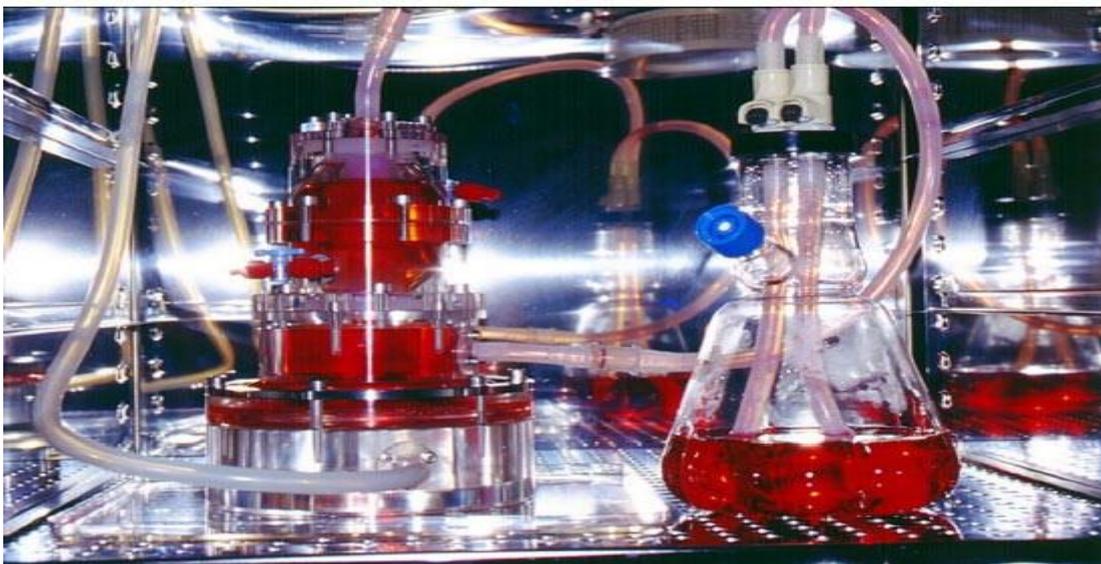


Figura 3.3: *Particolare porzione del bioreattore in cui sono presenti se valvole cardiache*

Nello sviluppo di neo-tessuto valvolare cardiaco è necessario quindi sottoporre a particolari condizioni di stress meccanico, dato che questa stimolazione fisica promuove l'allineamento delle

cellule e le stimola nella formazione dell'ECM, e a sollecitazioni elettriche, utilizzate per cercare di promuovere la formazione di una contrazione sincrona del costrutto e per migliorare quindi la funzionalizzazione del neo-tessuto durante la sua nascita in vitro.

Dai nuovi bioreattori per l'ingegneria valvolare cardiaca vengono fornite informazioni sia con i sistemi di monitoraggio visivo diretto sia con macchina fotografica, che consente l'analisi di imaging dal vivo che può essere confrontata con quella delle valvole naturali.

La coltura cellulare viene eseguita in modo pulsatile a 1 Hz per garantire un'adeguata flessione ed elevata sollecitazione di taglio per incoraggiare la semina cellulare, crescita, e produzione ECM attraverso un adattamento che simula le prestazioni di una valvola cardiaca naturale; il bioreattore è stato inizialmente testato su bioprotesi porcine. Portata, pressione e sollecitazione di taglio possono essere modificati per ottenere risultati ottimali. L'elaborazione computazionale di immagini 3D dei lembi della valvola permette l'analisi e la previsione di ossigenazione dei tessuti, che è un punto cruciale per la durabilità della valvola. Proprietà del polimero che viene utilizzato per una nuova valvola cardiaca può essere analizzato attraverso un'analisi strutturale e delle proprietà meccaniche utilizzando la simulazione con metodi computazionale, la quale rappresenta un promettente e produttivo tipo di analisi della meccanica e l'elasticità dei biomateriali rispetto alle valvole native.

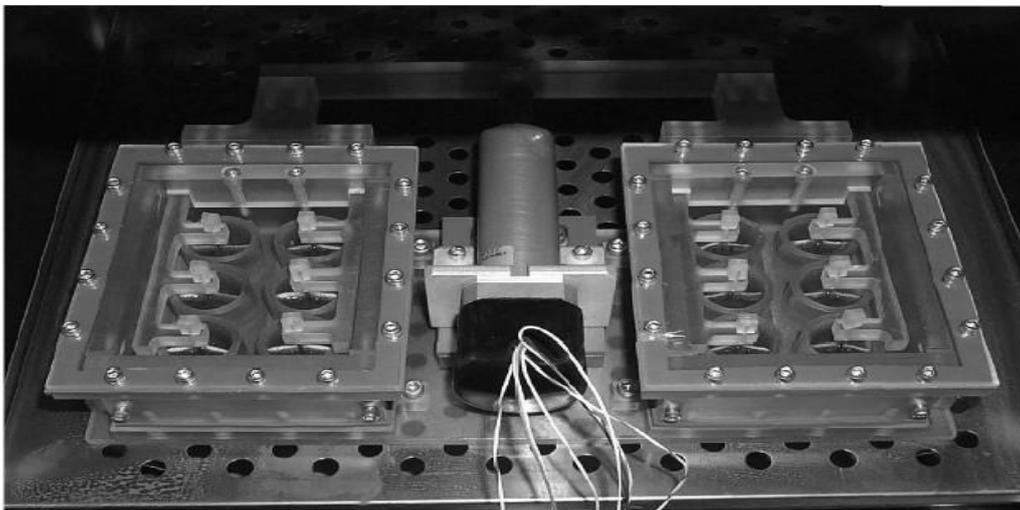


Figura 3.4: *Bioreattore appositamente dedicato alla ricostruzione di valvole cardiache perché in grado di sottoporre la valvola in fase di crescita a stress meccanico*

Per la realizzazione delle valvole cardiache con tecniche di ingegneria tissutale non vengono utilizzati i bioreattori statici ma i bioreattori dinamici che oltre a fornire un ambiente biologico attivo, creano da subito le condizioni di normale utilizzo proprie di una valvola cardiaca, ossia un sistema di pompaggio che mette la valvola nelle condizioni di stress tipiche del flusso sanguigno in

pressione. I moderni bioreattori permettono di variare con continuità il flusso e la pressione d'esercizio.

L'ultima fase consiste nell'impianto della valvola "vivente" formata da tessuto autologo ricostruito con tecniche d'ingegneria tissutale.

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

La chiave di svolta nell'ingegneria tissutale sta nella costruzione di TEHV (Tissue Engineered Heart Valves) completamente funzionale: questo non sarebbe possibile con l'utilizzo di scaffold biologici perché recano un danno significativo alla MEC il che porta a risultati imprevedibili del prodotto ottenuto. Il futuro degli scaffold sta nell'uso di nanomateriali sintetici: significativa la ricerca su una varietà di polimeri con proprietà diverse. Comprendere il rimodellamento dello scaffold con le cellule seminate è un altro passo in avanti necessario per lo sviluppo. Inoltre la selezione di uno scaffold di livello superiore aprirà la porta per un ulteriore sviluppo. Una volta selezionato lo scaffold, un'altra sfida per i ricercatori è quella di progettare un bioreattore per la fabbricazione su larga scala del scaffold in 3D. La scelta di validi metodi di semina cellulare è il secondo passo necessario per produrre una valvola cardiaca impiantabile. La ricerca attuale sulle cellule staminali in vitro si è rivelato altamente inefficace data l'inesistenza di metodi validi per controllare la differenziazione cellulare e la semina.

Un'altra sfida è rappresentata dal tempo di attesa per le cellule di cultura per scaffold: i pazienti potrebbero non essere in grado di attendere settimane per la crescita della valvola in laboratorio. Una grande promessa è vista nell'uso di CEPC (cellule progenitrici endoteliali): la ricerca in vitro ha dimostrato che le cellule EPC risultano organizzate in architetture cellulari capaci di produrre MEC. Inoltre, CEPC contengono sia funzioni di cellule interstiziale che endoteliali e, pertanto, possono essere utilizzati come una unica fonte cellulare per la produzione di valvole cardiache. Se dimostrato efficace nella semina di cellule impiantate su scaffold, garantirebbero lo sviluppo di valvole cardiache semi-tissutali disponibili istantaneamente quando è richiesta l'impianto. Bisogna però prestare cautela nell'analisi degli effetti degli scaffold sul maggiore rischio di endocardite, che potrebbe essere potenzialmente aumentato a causa di corpi estranei porosi direttamente esposti alla circolazione. Un'attenta analisi dei pro e contro è essenziale prima dell'applicazione clinica.

Una volta dimostrato di essere sicuro, il successo dello sviluppo di questa tecnologia potrebbe eliminare la necessità di sviluppare bioreattori e di fornire protesi disponibili immediatamente.

Ulteriori studi devono anche concentrarsi sulla sicurezza ex vivo e valutazione delle prestazioni, l'ottimizzazione della produzione, così come l'analisi approfondita delle proprietà in vivo di nuovi prodotti.

3.7 ESPERIENZE E PROSPETTIVE

Lo scopo principale dell'ingegneria tissutale valvolare è quello di generare una struttura funzionale che contenga cellule endoteliali e interstiziali, queste ultime capaci di consentire il continuo rinnovamento della matrice extracellulare e quindi mantenendo la vitalità valvolare. Un'ampia varietà di cellule è stata impiegata per ripopolare la matrice valvolare anche se a tutt'oggi non è ben chiaro quale di esse rappresenti la fonte ideale da utilizzare per le valvole ingegnerizzate.

Fondamentalmente gli studi sono indirizzati verso cellule differenziate tessuto-specifiche quali cellule endoteliali e/o muscolari o cellule staminali autologhe o allogeniche.

-Recentemente Schmidt (et al) hanno creato dei *patches* di tessuto ingegnerizzato ottenendo fibroblasti e progenitori di cellule endoteliali partendo da cellule provenienti da cordone ombelicale. Tali cellule hanno mostrato la capacità di differenziarsi in cellule endoteliali mature e mostrano un'eccellente capacità di crescita e di organizzazione. Cellule endoteliali e miofibroblasti sono stati ottenuti inoltre da arterie e vene periferiche e si sono dimostrati in grado di crescere in appropriati supporti. La limitazione principale è che permangono le differenze morfofunzionali tra cellule vascolari e valvolari e la necessità di sacrificare comunque tessuto sano per il prelievo.

-Similarmente, Yang (et al.) hanno usato cellule prelevate da aorta di bambini che, innestate su un *patch* sintetico, si sono dimostrate capaci di crescere e costituire il collagene e cellule muscolari.

-Allo stesso modo Hoffman-Kim (et al.) hanno valutato la possibilità di ottenere fibroblasti da lembi di valvola tricuspide, di arteria carotide e vena giugulare di ovino. Il maggior numero di cellule e la maggiore concentrazione di collagene per cellula sono stati ottenuti dalla vena giugulare.

-Affonso da Costa (et al.) hanno riportato l'esperienza clinica di impianto di allograft decellularizzato posto in cultura con cellule endoteliali vascolari autologhe. Ad 1 anno di follow-up, tali valvole hanno sviluppato una degenerazione strutturale progressiva con perdita della cellularità alla verifica seguente l'espanto, probabilmente immunomediata similmente a quello che accade nei trapianti evidenziando, però, il mantenimento dell'architettura cellulare normale, qualora venga utilizzata un'appropriata terapia immunosoppressiva.

-Cebotari (et al.) hanno recentemente riportato l'esperienza clinica a 3.5 anni relativa all'impianto

su bambini di valvole polmonari prelevate da cadavere, decellularizzate enzimaticamente e quindi sottoposte a ripopolazione per 22 giorni in bioreattore con cellule provenienti dal sangue periferico di volontari. In base a rilievi solo ecocardiografici, gli autori ritengono di poter affermare che queste valvole hanno capacità di crescita nel tempo.

Attualmente grande interesse è riposto nelle cellule progenitrici derivati dal midollo osseo. Tali cellule hanno, infatti, la capacità di differenziarsi in multiple linee cellulari, il loro prelievo risulta relativamente agevole tramite puntura ossea, vengono principalmente isolate come sospensione cellulare e quindi sono più agevoli da processare e meno inclini alla contaminazione rispetto al tessuto solido. Le cellule staminali allogeniche derivate da tessuto embrionale possono essere utilizzate per ottenere cloni cellulari con un enorme potenziale differenziativo compreso di strutture cardiovascolari.

Recentemente cellule di derivazione stromale da midollo osseo sono state utilizzate creando una valvola cardiaca a tre lembi.

Quale sia il tipo cellulare più adatto per poter essere impiegato nell'ambito delle valvole cardiache ingegnerizzate non è quindi ancora chiaro. Gli studi concernenti l'impiego di cellule staminali e varie altre cellule progenitrici sono ancora agli inizi e le conoscenze sugli aspetti biochimici e immunologici, e sulle proprietà meccaniche e funzionali dei tessuti ingegnerizzati *in vitro* risultano non ancora complete, così come le applicazioni cliniche, che sono ancora limitate.

La sfida in tal senso è multidisciplinare e coinvolge molteplici aspetti, dalla ricerca di base all'applicazione clinica. Quest'ultima appare, nei primi, seppur limitati, numeri di casi presentati, di grande e stimolante interesse scientifico.

Capitolo 4

Terapie chirurgiche per valvulopatie

4.1 STENOSI MITRALICA

Quando la stenosi mitralica è serrata e la terapia medica non è più efficace, bisogna ricorrere al trattamento interventistico, che comprende la valvuloplastica percutanea o la terapia chirurgica. La valvuloplastica percutanea è una tecnica di cardiologia interventistica e viene pertanto eseguita in laboratorio di emodinamica per via percutanea, senza quindi approccio chirurgico. Si esegue mediante un catetere munito in punta di un palloncino (il catetere di Inoue); questi cateteri possono essere introdotti sia a livello delle vene che a livello delle arterie utilizzando come punto di introduzione la radice della coscia destra o sinistra (inguine). L'introduzione di questi cateteri avviene senza tagli, somministrando sotto la pelle un anestetico locale. Uno speciale catetere (detto di Brockenbrough o di Mullins) viene introdotto nella vena femorale destra (situata a livello inguinale) al fine di bucare il tessuto (setto interatriale) che divide gli atri (ossia due delle quattro camere in cui è diviso il cuore) e consentire così a chi esegue la metodica di accedere alla valvola mitralica.

Creata l'accesso si introduce il vero e proprio catetere dilatatore (solitamente il catetere di Inoue) attraverso la valvola mitralica. Il catetere di Inoue ha al suo apice un palloncino ad alta resistenza che, gonfiandosi, è capace di produrre uno strappo controllato della valvola, aprendola tanto da ricreare soddisfacenti condizioni di flusso del sangue, migliorando sensibilmente le condizioni cliniche del paziente.



Figura 4.1: *Catetere di Inoue*

Per potere eseguire la valvuloplastica è necessario che la valvola non sia molto calcificata e che l'apparato sottovalvolare (corde tendinee e muscoli papillari) sia ben conservato. Se non sono presenti queste condizioni e la valvola è un unico blocco di calcio, con la valvuloplastica se ne può determinare la rottura, con conseguente insufficienza mitralica massiva. In questi casi si deve pertanto ricorrere alla sostituzione valvolare chirurgica.

4.2 STENOSI AORTICA

Malattia congenita o acquisita delle semilunari aortiche, caratterizzata da ostruzione al flusso di sangue dal ventricolo sinistro all'aorta, con sviluppo di gradiente pressorio transvalvolare ed ipertrofia del ventricolo sinistro. E' possibile intervenire attraverso:

Valvuloplastica percutanea: è da riservare solo a casi particolari, a rischio di vita e quando la chirurgia è assolutamente controindicata, poiché i risultati a lungo termine non sono buoni, in quanto la stenosi si riforma; rappresenta pertanto solo un trattamento palliativo in casi estremi;

Sostituzione aortica percutanea;

Sostituzione chirurgica.

4.3 IMPIANTO TRANSCATETERE DELLA VALVOLA AORTICA (TAVI)

La stenosi valvolare aortica degenerativa, nella sua forma più grave, è una condizione cronicamente invalidante, da un corredo di sintomi che variano da quelli dispnoici, a transitorie alterazioni dello stato di coscienza, a dolori precordiali suggestivi di angina pectoris, o a sintomi indicativi di fibrillazione atriale o a insufficienza cardiaca.

La sostituzione di valvola aortica attraverso protesi biologica o meccanica ne è il trattamento di elezione. L' intervento chirurgico, che nella proprie casistiche è secondo per frequenza solo al by-pass aortocoronarico viene effettuato in anestesia generale e circolazione extracorporea, per sternotomia mediana. L' intervento aumenta la qualità di vita e la sopravvivenza. La mortalità è nei casi elettivi al 2-3%, ma anche negli ultraottantenni si ottengono apprezzabili risultati con statistiche di mortalità attorno al 10% e di morbosità fra il 5-10%. Di fatto un terzo dei pazienti in età avanzata non viene sottoposto a intervento chirurgico per l' elevato rischio operatorio. L' impianto di valvola aortica transcaterere (TAVI) è stato sviluppato come alternativa per quei pazienti, e consiste in una valvuloplastica aortica convenzionale seguita dall' impianto di una protesi valvolare biologica cucita ad uno stent metallico a sua volta su un catetere. L' impianto viene eseguito all'interno della valvola nativa con il vantaggio di non richiedere la chirurgia a cuore aperto.

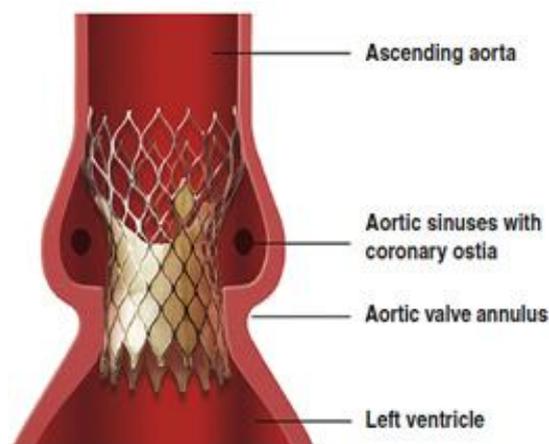


Figura 4.2: *Protesi impiantata attraverso cateterismo a livello dell'aorta attraverso TAVI*

La TAVI può essere realizzata attraverso differenti approcci, dei quali i più comuni sono il trans-femorale e trans-apicale.

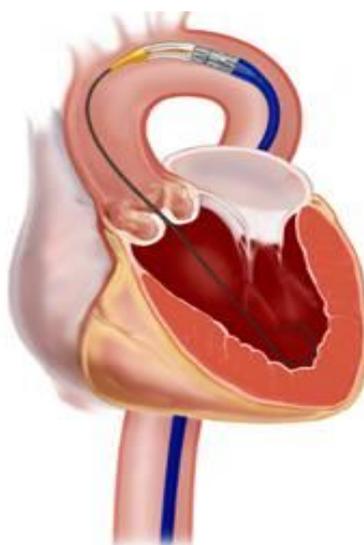


Figura 4.3: *TAVI con approccio trans-femorale*

L'approccio trans-femorale è il più frequentemente utilizzato. In origine richiedeva la preparazione chirurgica dell'arteria femorale e l'anestesia generale; attualmente è realizzato in modo del tutto percutaneo e senza anestesia generale. Ottenuto l'accesso arterioso, la protesi – compressa all'interno di un delivery system, cioè contenuta in uno stent al nitinol (Ni-Ti), lega progettata per trasformarsi completamente a temperatura corporea – viene avanzata in via retrograda nell'aorta,

quindi posizionata e liberata a livello della valvola aortica degenerata. Il sistema di rilascio viene quindi ritirato e la breccia dell'arteria femorale suturata con un sistema interamente percutaneo.

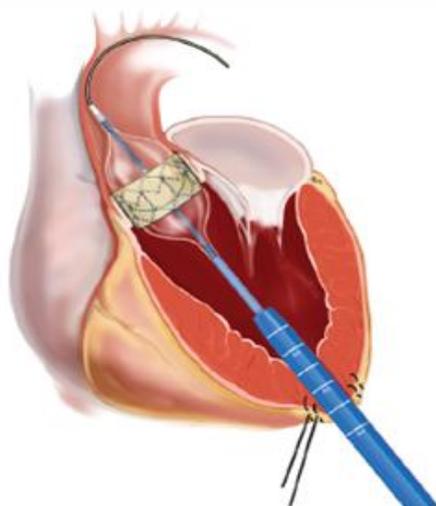


Figura 4.4: TAVI con approccio trans-apicale

La via trans-apicale è indicata quando la situazione anatomica non consente l'avanzamento della protesi biologica dall'arteria femorale. Viene eseguita mediante minitoracotomia sinistra, divaricando uno spazio intercostale per esporre l'apice cardiaco, si pratica un foro chirurgico a livello dell'apice cardiaco e si posiziona un introduttore in modo da consentire il passaggio della protesi. Questa viene quindi avanzata attraverso il ventricolo sinistro fino alla valvola aortica degenerata e qui liberata mediante l'insufflazione di un palloncino. Infine il sistema di introduzione viene ritirato assieme alla guida e il foro all'apice del ventricolo sinistro richiuso con fili di sutura. Le due modalità differiscono anche per il tipo di posizionamento della protesi, le quali vengono montate al contrario a causa del tipo di approccio.

Dopo il "first in man" effettuato nel 2002, la TAVI è stata introdotta in clinica nel 2007 e ha in breve tempo guadagnato grandi consensi (a oggi sono stati effettuati circa 50.000 impianti in 40 nazioni ed è attualmente lo standard di cura nei pazienti con stenosi valvolare aortica severa inoperabili. L'Italia è terza in Europa in termini di numero di procedure TAVI effettuate (10% del totale), preceduta solo da Germania (43%) e Francia (13%) e seguita da Regno Unito e Irlanda (7%). Ciononostante la tecnica è ancora in fase di sviluppo e la sua applicazione pone inediti problemi perché richiede strutture dedicate e gruppi interdisciplinari che operino in concerto per la definizione delle indicazioni, delle modalità di intervento e per il controllo dei risultati.

Secondo lo studio portato avanti da “ Annals of cardiothoracic surgery “ i dati disponibili sulla TAVI rispetto AVR per i pazienti a rischio chirurgico elevato hanno mostrato che esiti avversi importanti quali la mortalità e ictus sono apparsi simili tra i due trattamenti. Evidenze scientifiche di TAVI rispetto AVR nella letteratura corrente sono limitate da inconsistenti criteri di selezione dei pazienti, definizioni eterogenee di endpoint clinici e relativamente brevi *follow-up*. Le indicazioni per la TAVI dovrebbero pertanto essere limitate ai candidati chirurgici inoperabili finché non saranno disponibili dati a lungo termine. Infine è necessario stabilire più lunghi *follow-up* dei dati prima di trarre conclusioni definitive per questa tecnica potenzialmente rivoluzionaria .

4.3.1 Descrizione della tecnologia

Vari dispositivi protesici sono in fase di sviluppo e sperimentazione, ma solo due dispositivi sono dotati di marchio CE:

- CoreValve Revalving System (MEDTRONIC), detta self-expandable, è costituito da tre lembi valvolari di tessuto pericardico suino, montati su un cestello autoespandibile in nitinol. Il sistema è impiantabile per via retrograda trans-femorale, trans-ascellare e trans-aortica; è disponibile nelle dimensioni di 23 - 26 - 29 - 31 mm. È possibile il riposizionamento in corso d'opera,, non necessita di valutazioni complesse dell'annulus aortico e contiene maglie con fori molto larghi per non ostacolare l'irrorazione delle coronarie.

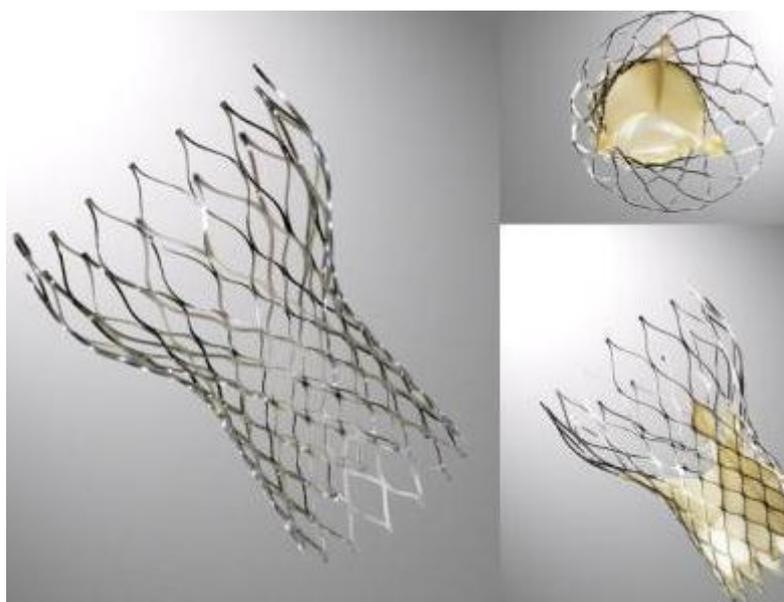


Figura 4.5: CoreValve Revalving System (MEDTRONIC)

- la valvola di Edwards Sapien XT (Edwards Lifesciences Inc, CA, USA) detta balloon-expandable, è costituita da tre lembi di pericardio bovino, montati su uno stent in cromo cobalto espandibile con palloncino. È impiantabile per via retrograda (trans-femorale) o per via anterograda (trans-apicale); è disponibile nelle dimensioni di 23 - 26 - 29 mm e necessita di introduttori di 18, 19 e 20F o di un 16F “espandibile” per l’approccio trans-femorale e 26F per l’approccio trans-apicale.

Una volta espansa non è possibile il riposizionamento e necessita di particolare attenzione nell’occlusione delle coronarie.

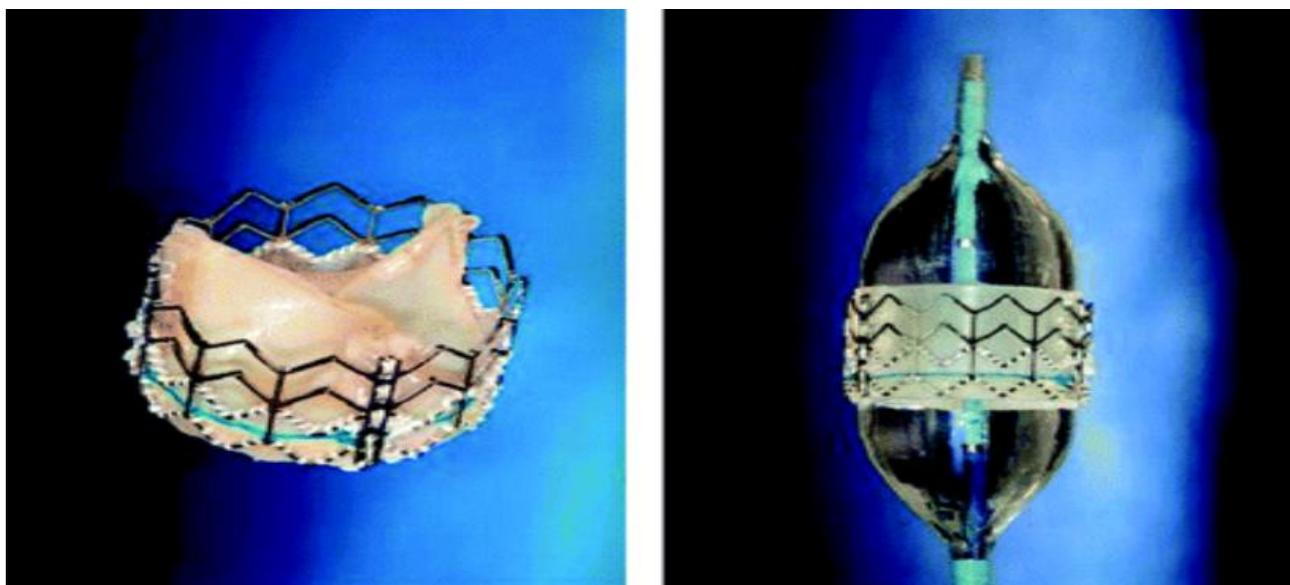


Figura 4.6: *Valvola di Edwards Sapien XT*

Indipendentemente dai tipi di bioprotesi e dalle modalità di accesso, viene sempre eseguita una valvuloplastica aortica preliminare con pallone per facilitare il passaggio della protesi attraverso la valvola aortica nativa stenotica. La protesi balloon-expandable (Sapien) richiede il pacing ventricolare rapido per ridurre il flusso trans-valvolare ed evitare così la migrazione della protesi verso l'aorta durante le fasi di rilascio. Dopo la procedura, il paziente deve essere monitorizzato in terapia intensiva o sub-intensiva cardiologica per almeno 24 ore, per uno stretto controllo dei parametri emodinamici, degli accessi vascolari, del ritmo cardiaco e della funzione renale.

Relativamente ai due più diffusi tipi di dispositivo, non vi sono studi di confronto. Sono tuttavia evidenti alcune significative differenze. La Sapien è più simile alle protesi tradizionalmente impiantate in cardiocirurgia.

Il sistema di rilascio della CoreValve è meno impegnativo, non richiede il pacing ventricolare rapido e, almeno fino a un certo punto, la protesi può essere riposizionata. Con la CoreValve sono meno frequenti le complicanze coronariche, ma nel 25-40%³⁷⁻³⁸ dei casi si producono disturbi della conduzione atrio-ventricolare che necessitano dell'impianto di pace-maker definitivo, evenienza meno frequente con la Sapien (4%).

Dalla Società Europea di Cardiologia (2008) è emerso che: i risultati oggi disponibili suggeriscono che le tecniche percutanee e transapicali di sostituzione valvolare sono fattibili e forniscono un miglioramento clinico ed emodinamico fino a 2 anni nei pazienti con stenosi aortica severa ad alto rischio o controindicati all'intervento chirurgico. Ancora incertezze relativamente a sicurezza e risultati a lungo termine. Cardiochirurghi e cardiologi devono lavorare in team per selezionare i candidati, realizzare le procedure, e valutare i risultati. Attualmente queste tecniche sono destinate a pazienti ad alto rischio ma potrebbero essere estese in futuro a pazienti a basso rischio, nel caso le potenzialità terapeutiche vengano dimostrate. Al momento, l'uso è in fase di valutazione ed un processo di commercializzazione cauto che includa un training ed una sorveglianza post-marketing è cruciale per evitarne una diffusione incontrollata, che allo stato attuale delle conoscenze non è auspicabile.

Capitolo 5

Cenni di carattere economico

Le Aziende Ospedaliere procedono all'acquisto delle forniture, in questo caso delle protesi cardiache, attraverso un sistema di gare d'appalto le cui norme si armonizzano al regolamento di semplificazione dei procedimenti di spesa in economia di cui al D.P.R. 20 agosto 2001 n. 384, nei limiti di compatibilità con le disposizioni dell'art. 125 del D.Lgs. 12 aprile 2006, n. 163 "Codice dei contratti pubblici, relativi a lavori, servizi e forniture in attuazione delle direttive 2004/17/CE e 2004/18/CE".

Annualmente attraverso un atto del direttore generale vengono programmati gli acquisti di beni e servizi ed inoltre adotta uno o più provvedimenti per gli investimenti; l'acquisto avverrà nel rispetto dei limiti di spesa, della normativa vigente e solo dopo la pubblicazione del documento relativo alla gara d'appalto.

In ambito ospedaliero l'acquisto di protesi è limitato alle meccaniche e biologiche in quanto l'attuazione dell'ingegneria tissutale attualmente è ancora in fase considerata sperimentale. Nei documenti ufficiali di gara per la fornitura di protesi è possibile inserire tutte le specifiche relative al prodotto atteso, come per esempio:

PROTESI MECCANICA AORTICA.

Protesi meccanica aortica parzialmente sopranulare a due emidischi piatti, in carbonio pirolitico, a basso profilo, con cuffie sopranulari con diversa conformazione della cuffia per permettere un miglior adattamento su anulus irregolari. Disegno della valvola che permetta la minima sporgenza degli emidischi nel tratto di efflusso, in fase di apertura. Valvola rotabile. Misure da 17-29 mm. Completa di misuratori (n. 3 set). Follow-up di almeno 20 anni.

come testimoniato nel documento del policlinico di Palermo nella gara del maggio 2011.

Il costo di una protesi valvolare cardiaca è di circa 2500 euro, comprensivo di iva al 4%.

Prima del 1995 gli ospedali pubblici erano finanziati su previsioni di spesa e di successivi rimborsi a piè di lista delle spese sostenute, mentre gli ospedali privati convenzionati erano remunerati in proporzione alle giornate di degenza e sulla base di una diaria che non faceva distinzioni tra le

prestazioni erogate. A partire dal 1995 tanto gli ospedali pubblici (siano essi aziende ospedaliere o presidi di aziende sanitarie locali) quanto gli ospedali privati accreditati hanno cominciato a essere remunerati in maniera prospettica sulla base di determinate tariffe, in proporzione e a seconda delle prestazioni erogate. L'impianto di tale meccanismo di remunerazione è stabilito nel cosiddetto sistema DGR (Diagnosis Related Group), il quale nasce da una ricerca dell'Università di Yale nel 1977. Esso si basa sull'individuazione di percorsi assistenziali standard, determinati in base alla diagnosi principale di dimissione, al consumo di risorse, alla durata della degenza, all'età, al sesso dei pazienti e ad altri fattori.

Attualmente il sistema sanitario italiano rimborsa l'intervento di sostituzione aortica per 16000 euro per paziente, che si tratti di AVR o di TAVI: quest'ultima, da sola, ha un costo di 25000 euro, non è quindi interamente coperta dal rimborso pubblico. Inoltre ai costi debbono sommarsi le spese per terapia intensiva, degenza e sala di emodinamica, necessari per la sua attuazione. Sono quindi anche economiche le cause per questo approccio è ancora poco utilizzato nel nostro Paese.

Il "The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery" ha condotto uno studio sul rapporto costo-efficacia nella sostituzione della valvola cardiaca, dal quale è emerso che questo intervento è conveniente per tutte le età, ma soprattutto per gli anziani.

Il rapporto costo-efficacia CER è stato calcolato come $(A-B)/(C-D)$, definiti in seguito, e i risultati sono stati presentati a intervalli di 5 anni di età:

- A. I costi di vita dopo la sostituzione della valvola cardiaca;
- B. I costi di vita di pazienti non operati;
- C. Gli anni di vita ottenuti per la qualità (QALY) dopo la sostituzione della valvola cardiaca;
- D. I QALY dei pazienti non operati.

Gli economisti hanno progettato una struttura di lavoro per calcolare il ritorno economico dal miglioramento della salute e della longevità. L'intervento di sostituzione valvolare ha davvero modificato e ampliato la qualità e l'aspettativa di vita: questo è il primo studio che cerca di definire un'analisi puntuale del valore economico legato a una tipologia di intervento. Dal 1961 al 2003, per un totale di 4617 pazienti adulti sottoposti a sostituzione della valvola aortica da un team di chirurghi cardiaci. Questi pazienti sono stati forniti di una vita prospettica di follow-up. A partire dal 2005, il follow-up ha osservato 31.671 pazienti/anno, con un massimo di 41 anni ed è stato utilizzato un modello statistico per generare il futuro di anni di vita dei pazienti. Il valore di anni di

vita proposto dagli economisti è stato applicato per determinare il valore economico della vita di questi pazienti dopo la sostituzione della valvola aortica. Il valore degli anni di vita dopo la sostituzione della valvola aortica sono stati 53.323, con un valore lordo di 14,6 miliardi di dollari. I complessivi anni di vita attesi senza intervento chirurgico erano 10.157, per un valore di 3,0 miliardi di dollari, stimando così un guadagno di anni di vita dopo AVR pari a 43.166, del valore di 11,6 miliardi dollari. Sottraendo il costo totale a vita di \$ 451.000.000, dopo un intervento chirurgico, il valore netto degli anni di vita guadagnati grazie ad AVR è stato 11,2 miliardi dollari. Il valore netto diminuisce a seconda dell'età in cui ci si sottopone all' intervento chirurgico, ma ha ancora un valore di \$ 600.000 per ottuagenari e \$ 200.000 per novantenni.

L'importanza di un'analisi del rapporto costo/efficacia è fondamentale anche per la proliferazione e lo sviluppo delle tecniche di ingegneria tissutale nelle imprese: il mercato dell'ingegneria tissutale e la gamma delle applicazioni commerciali sono ancora in fase embrionale, e molti prodotti dell'ingegneria tissutale sono ancora nei primi stadi di sviluppo. Le piccole imprese biotecnologiche che realizzano tali prodotti non dispongono delle risorse necessarie per effettuare sperimentazioni cliniche su vasta scala e a lungo termine al fine di ottenere informazioni sul rapporto costi/efficacia del trattamento rispetto ai trattamenti convenzionali. La mancanza di dati sul rapporto costi/efficacia è il principale motivo per cui le compagnie assicurative sono restie a rimborsare i trattamenti effettuati con i prodotti dell'ingegneria tissutale.

Conclusioni

La tecnologia ha raggiunto un elevato livello tecnologico e prestazioni ottimali nell'ambito delle protesi valvolari meccaniche. Le prospettive future riguardano la ricerca di materiali e architetture protesiche che riducano il rischio tromboembolico ed emorragico.

Per le protesi biologiche la ricerca è mirata al raggiungimento di protocolli di decellularizzazione che salvaguardino la MEC e soprattutto le proprietà fisiche e meccaniche del tessuto. Inoltre sono necessarie linee guida per le tecniche di impianto mini-invasive, come la TAVI - che rappresenta la frontiera di diverse tipologie di intervento cardiocirurgico.

Per quanto riguarda invece le tecniche di ingegneria tissutale, punti cruciali da chiarire sono rappresentati dalla scelta degli scaffold, della sorgente cellulare e del metodo di condizionamento in vitro.

Di fondamentale importanza è il perfezionamento di bioreattori, dispositivi in grado di fornire un ambiente adeguato alla crescita del tessuto affinché, una volta trapiantato, sia in grado di assolvere la propria funzione.

Le scienze biomediche e l'ingegneria hanno compiuto grandi passi, rivoluzionando tecniche e metodi di azione nella sperimentazione e nella clinica: in prospettiva futura non si potrà che avere un sempre più positivo riscontro.

Bibliografia/Sitografia

- 1) ANZIL F., “Approccio al monitoraggio fonocardiografico di valvole cardiache meccaniche”, Relazione di progetto, Università di Padova, a.a.2006-2007.
- 2) AKHTAR R., ADIB A., ZAFAR H., KHAN J., Anticoagulation in patients following prosthetic heart valve replacement, Ann Thorac Cardiovasc Surg, Vol 15, No. I 2009, 11-17.
- 3) BADAQ M. I., OZKISACIK E. A., BOGA M., GURCUN U., DISCIGIL B., Replacement of a Bjork-Shiley Delrin Aortic valve still functioning after 25 years (case report), Tex Heart Inst, 2004: 31; 303-5.
- 4) BLOME-EBERWEIN S.A., MROWINSKY D., HOFMEISTER J., HETZER R., “Impact of mechanical heart valve prosthesis sound on patients’ quality of life”, Ann Thorac Surg. 1996; 61(2):594-602.
- 5) BUDILLON A., “Ingegneria tissutale come nuovo approccio al trattamento delle patologie valvolari cardiache”, tesi di dottorato, Università di Parma.
http://www.researchgate.net/publication/33436549_Ingegneria_tissutale_come_nuovo_approccio_al_trattamento_delle_patologie_valvolari_cardiache
- 6) CABIN H. S., BENDER J. R., BALDWIN J. C., ELEFTERIADES J. A., KNOPF G., Heart book, Yale University School of Medicine (1992), 3-10, 167-176, 313-330.
- 7) CAMBI A., “Classificazione di formazioni trombotiche su valvole cardiache meccaniche bileaflet con reti neurali artificiali”, tesi di laurea specialistica, Università di Padova, a.a. 2009-2010.
http://tesi.cab.unipd.it/23494/1/Cambi_Tesi.pdf
- 8) CANOSSA S., ”Ingegneria dei tessuti cardiaci”, tesi di laurea, Università di Parma
http://tesi.cab.unipd.it/39643/1/CanossaSofia_593829.pdf
- 9) Cao C., Ang S., Indraratna P., Manganas C., Bannon P., Black D., Tian D., Yan T., Systematic review and meta-analysis of transcatheter aortic valve implantation versus surgical aortic valve replacement for severe aortic stenosis, Ann Cardiothorac Surg 2013;2(1):10-23
- 10) FRITZSCHE D., EITZ T., LACZKOVICS A., LIEBOLD A., KNAUT M., MATSCHKE K., SAGIE A., MEHLHORN U., HORSTKOTTE D., KÖRFER R., “Early detection of mechanical heart valve dysfunction using a new home monitoring device”, The Annals of Thoracic Surgery 2007; 11:29-37.

- 11) GANONG W. F. , Fisiologia medica, Piccin, nona edizione italiana, 2001, capitoli 28,29 : 523-550.
- 12) GASTALDELLO A., “Ingegneria Tissutale delle Valvole Cardiache: valutazione di metodi di decellularizzazione e semine cellulari su Pericardio Bovino e Porcino”, tesi di dottorato, Università di Padova.
http://paduaresearch.cab.unipd.it/4830/1/AGastaldello_PHDthesis.pdf
- 13) Généreux P, Head SJ, Wood DA, Kodali SK, Williams MR, Paradis JM, et al. Transcatheter aortic valve implantation 10-year anniversary: review of current evidence and clinical implications. *Eur Heart J*. 2012 Oct;33(19):2388-98.
- 14) GUYTON A. C., HALL J.E., Fisiologia Medica, EdiSES, Seconda edizione, anno 2002, capitoli 9,22,23.
- 15) IUNG B, CACHIER A, BARON G, MESSIKA-ZEITOUN D, DELAHVE F, TORNOS P, et al. Decision-making in elderly patients with severe aortic stenosis: why are so many denied surgery? *European Heart Journal*, 2005 Dec;26(24):2714-20.
- 16) Koene B., Hamad M., Bouma W., Mariani M., Peels K., Van Dantzig K., Van Straten A., Impact of prosthesis-patient mismatch on early and late mortality after aortic valve replacement, Koene et al. *Journal of Cardiothoracic Surgery* 2013, 8:96, 2-8.
- 17) Laynez A, Ben-Dor I, Barbash IM, Hauville C, Sardi G, Maluenda G, et al. Frequency of Conduction Disturbances After Edwards SAPIEN Percutaneous Valve Implantation. *Am J Cardiol*, 2012 Jul 5.
- 18) Latsios G, Gerckens U, Grube E. Transaortic transcatheter aortic valve implantation: a novel approach for the truly "no-access option" patients. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2010 Jun 1;75(7):1129-36.
- 19) Lichtenstein SV, Cheung A, Ye J, Thompson CR, Carere RG, Pasupati S, Webb JG. Transapical transcatheter aortic valve implantation in humans: initial clinical experience. *Circulation*, 2006 Aug 8;114(6):591-6.
- 20) Pablo Salinas, Raul Moreno e Jose L Lopez-Sendon, “ Transcatheter aortic valve implantation: Current status and future perspectives”, [World J Cardiol 2011 June 26; 3\(6\): 177-185.](#)
- 21) PALMA F, “Classificazione funzionale di valvole cardiache meccaniche attraverso fonografia ad ultrasuoni”, tesi di laurea magistrale in bioingegneria, Università di Padova
http://tesi.cab.unipd.it/35048/1/Palma_Francesca.pdf
- 22) Petronio AS, De Carlo M, Bedogni F, Marzocchi A, Klugmann S, Maisano F, et al. Safety and efficacy of the subclavian approach for transcatheter aortic valve implantation with the CoreValve revalving system. *Circ Cardiovasc Interv*, 2010 Aug;3(4):359-66.

- 23) Radoslaw A. Rippel, Hossein Ghanbari, Alexander M. Seifalian, “Tissue-Engineered Heart Valve: Future of Cardiac Surgery”, *World J Surg* (2012) 36:1581–1591.
- 24) ROMATA C., “Valutazione e classificazione funzionale di valvole cardiache meccaniche”, tesi di laurea magistrale in Bioingegneria, Università di Padova, a.a. 2009-2010.
http://tesi.cab.unipd.it/26011/1/romata_clemens.pdf
- 25) Schroeter T, Linke A, Haensig M, Merk DR, Borger MA, Mohr FW, et al. Predictors of permanent pacemaker implantation after Medtronic CoreValve bioprosthesis implantation. *Europace*, 2012 Jun 24.
- 26) Walther T, Simon P, Dewey T, Wimmer-Greinecker G, Falk V, Kasimir MT, et al. Transapical minimally invasive aortic valve implantation: multicenter experience. *Circulation*, 2007 Sep 11;116 (11 Suppl):1240-5.
- 27) WU C., HERMAN B. A., RETTA S. M., GROSSMAN L. W., LIU J., HWANG N. H. C., *On the closing sounds of a mechanical heart valve*, *Annals of Biomedical Engineering*, 2005; 33:743-750.
- 28) WU Y, JIN R, GAO G, GRUNKEMEIER GL, STARR A., “Cost-effectiveness of aortic valve replacement in the elderly: an introductory study”, *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2007 Mar;133(3):608-13.
- 29) <http://www.medicina.unict.it/Public/Uploads/links/VAVULOPATIE.pdf>
- 30) https://www.omceo.bari.it/pdf/notiziari/luglio_2009/24-25.pdf cellule staminali
- 31) <http://www.uvef.it/extfiles/10429/attachment/FILE1311340891948-1380.pdf> report di HTA
- 32) <http://www.ausl.ra.it/files/per%20le%20imprese/Gare%20d'appalto/REGOLAMENTO%20-%20VERSIONE%20%20GIUGNO%202013.pdf> regolamento acquisizione di beni e servizi emilia romagna

Ringraziamenti

Alla fine di questo lavoro vorrei ringraziare il Professor Giordano per la sua disponibilità, pazienza e gentilezza.

Inoltre vorrei ringraziare chi ha condiviso con me questa lunga esperienza, chi mi è stato vicino e chi ha creduto in me, chi mi ha spinto ad andare avanti, chi ha avuto fiducia nelle mie capacità anche quando io l'avevo persa. Per questo un enorme grazie ai miei genitori per avermi sostenuto in questi anni e per avermi permesso di studiare, per avermi incoraggiato ad andare sempre avanti nonostante le difficoltà sia con le parole che con il loro esempio, ad avermi insegnato che non il lavoro si ottengono grandi cose, a credere nei sogni anche se delle volte sembrano più grandi noi. Un grazie di cuore a Onofrio, la persona più comprensiva del mondo e il mio più grande sostenitore, sempre in grado di regalarmi un sorriso; mi è sempre stato accanto e ha condiviso con me ogni momento di questa esperienza senza mai tirarsi indietro: le risate, le soddisfazioni, i pianti, i malumori, i dubbi.

Grazie a mia sorella, la migliore amica che ho, per il suo aiuto, sempre, la comprensione, i buoni consigli, gli sfoghi.

Grazie ai nuovi amici che ho incontrato qui a Cesena, compagni e compagne di percorso: grazie per le giornate di studio insieme, battendo qualsiasi aula studio, biblioteca (o parco!!), senza le quali non sarei mai arrivata fin qui, il sostegno, l'aiuto, le serate, grazie a tutti voi!

Il mio sguardo adesso è volto al nuovo percorso intrapreso con molta fatica e altrettanta determinazione: questa tesi mi ha regalato un nuovo slancio, permettendo che si riaccendesse in me la passione per ciò che sto studiando e generando infinita curiosità verso ambiti che vorrei diventassero la mia professione.

