

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

TESI DI LAUREA IN

INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

(Laurea Triennale DM 270/04)

**PROGETTAZIONE DI SOSTITUTI VALVOLARI
DECELLULARIZZATI: DETERMINAZIONE DI
DETERGENTI RESIDUI**

Relatore: Prof.ssa Monica Dettin

Laureando: Enea Ceolini

ANNO ACCADEMICO 2012-2013

INDICE

COMPENDIO.....	5
CAPITOLO 1	8
1.1 LE VALVOLE CARDIACHE	8
1.2 SOSTITUTI VALVOLARI.....	10
1.2.1 Valvole meccaniche	11
1.2.2 Valvole Biologiche.....	12
1.2.3 Sostituti percutanei.....	14
1.3 VANTAGGI E SVANTAGGI DEI DIVERSI SOSTITUTIVI VALVOLARI.....	16
CAPITOLO 2	18
2.1 LA DECELLULARIZZAZIONE.....	18
2.2 LA FISSAZIONE CON GLUTARALDEIDE	19
2.3 LA CALCIFICAZIONE	20
2.3.1 Prevenzione.....	21
2.4 I DETERGENTI UTILIZZATI NELLA DECELLULARIZZAZIONE	21
2.5 I METODI DI DECELLULARIZZAZIONE PRESI IN CONSIDERAZIONE.....	24
2.6 DETERMINAZIONE DEI DETERGENTI RESIDUI	25
CAPITOLO 3	28
3.1 MATERIALI.....	28
3.1.1 Reagenti.....	28
3.1.2 Detergenti.....	28
3.2 METODI	28
3.2.1 Protocolli di decellularizzazione	28
3.2.1.1 Metodo TRITDOC (TRItton X-100 e TauroDeOssiColato di sodio) e TRICOL (TRItton X-100 e COLato di sodio)	29
3.2.1.2 Metodo Haverich: SDS-DOC (Sodio Dodecil Solfato e DeOssiColato di sodio)	30
3.2.1.3 Metodo Dohmen: DOC (Deossicolato di sodio).....	30
3.2.2 Preparazione dei digeriti	31
3.2.3 Protocolli di delipidizzazione.....	31
3.2.4 Cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC).....	32
3.2.5 Il Detector PDA e la spettroscopia di assorbimento UV/Vis.....	34
3.2.6 Il Detector ELS: rivelatore evaporativo a luce diffusa	35
3.2.7 Analisi di massa.....	36

CAPITOLO 4	38
4.1 CROMATOGRAMMI.....	38
4.2 RETTE DI TARATURA.....	43
4.2.1 Colato di Sodio	43
4.2.2 Taurodeossicolato.....	44
4.2.3 Deossicolato di Sodio	46
4.2.4 Sodio Docecilsolfato	46
4.3 DETERMINAZIONE DELLE QUANTITÀ.....	47
4.4 DISCUSSIONE	50
CONCLUSIONE	52
BIBLIOGRAFIA	53

Abbreviazioni

DOC: Deossicolato di sodio

SDS: Sodio Dodecil Solfato

TDOC: Taurodessociolato di sodio

COL: Colato di sodio

GAGs: Glicosamminoglicani

Dohmen: Metodo decellularizzante che utilizza DOC

Haverich: Metodo decellularizzante che utilizza SDS e DOC

TRICOL: Metodo decellularizzante che utilizza Triton X-100 e COL

TRITDOC: Metodo decellularizzante che utilizza Triton X-100 e TDOC

HPLC: High Performance Liquid Chromatography (cromatografia liquida ad alte prestazioni)

ECM: Matrice extracellulare

PBS: soluzione isotonica di tampone fosfato

TFA: Acido trifluoroacetico

RT: Room Temperature (temperatura ambiente)

EDTA: Acido etilendiamminotetraacetico

L-Cys: Cisteina

AU: Unità di assorbanza

COMPENDIO

Presupposti per lo studio: le valvulopatie sono patologie molto diffuse a livello mondiale. Per tale motivo la ricerca scientifica si sta impegnando molto per mettere a punto nuove valvole protesiche che siano più efficienti possibili dal punto di vista emodinamico, più durature e in grado di essere ripopolate dalle cellule del ricevente. Nell'ambito delle proposte di sostituti valvolari è in aumento l'utilizzo di valvole biologiche provenienti o da esseri umani deceduti oppure da animali di differenti specie quali di origine equina, bovina e in particolar modo suina. Le protesi biologiche presentano alcuni vantaggi rispetto alle valvole meccaniche, dovuti a una miglior emodinamica e all'assenza di una terapia anticoagulante a vita per il paziente. Per rendere sempre più efficienti i sostituti protesici sono allo studio differenti metodi di decellularizzazione atti ad eliminare i residui xenogenici, come l'antigene alpha-Gal, in grado di innescare fenomeni di rigetto o infiammatori responsabili del fallimento degenerativo della protesi. Pur essendo questi metodi di decellularizzazione efficaci allo scopo, essi rischiano di lasciare nella matrice extracellulare dei residui di detergenti che potrebbero innescare reazioni di infiammazione, citotossicità e calcificazione con conseguente necessità di sostituzione della valvola.

Scopo della tesi: fino ad oggi sono stati messi a punto differenti metodi per la quantificazione dei residui di detergenti in valvole sottoposte a processi decellularizzanti. Tuttavia nessuno di questi metodi prevede una determinazione diretta dei detergenti residui nella matrice della valvola: tutti quanti valutano la quantità di detergente residuo in maniera indiretta analizzando le soluzioni dei lavaggi della valvola stessa. Questo studio si prefigge l'obiettivo di determinare più accuratamente e con un metodo diretto i detergenti residui nelle valvole, al fine di mettere a confronto l'efficacia di quattro metodi che utilizzano i seguenti detergenti anionici: DOC, SDS, COL, TDOC.

Materiali e metodi: sono stati analizzati lembi provenienti da valvole aortiche porcine precedentemente trattate con uno dei 4 metodi di decellularizzazione denominati Haverich, Dohmen, TRITDOC, TRICOL. Il metodo di quantificazione dei detergenti residui prevede la digestione del lembo valvolare decellularizzato mediante papaina e l'analisi del digerito ottenuto mediante HPLC. Mentre per la quantificazione di DOC, COL e TDOC è stato usato un detector UV con rivelatore a fotodiodi, per la quantificazione di SDS è stato utilizzato un rivelatore evaporativo a luce diffusa.

Risultati: i risultati ottenuti mostrano come i metodi che utilizzano i detergenti TDOC e COL siano nettamente migliori dei metodi Haverich e Dohmen. Il metodo TRITDOC

raggiunge quantità residue di detergente di quasi 2 ordini di grandezza inferiori al metodo peggiore, ovvero Dohmen. Haverich invece mostra come la presenza di due detergenti (DOC e SDC) porti a concentrazioni di detergente residue inferiori rispetto a Dohmen. Le quantità residue ottenute risultano superiori ai dati della medesima quantificazione eseguita in tessuti diversi, in particolare, in lembo polmonare porcino.

Conclusioni: Come si può evincere dai risultati, i metodi di decellularizzazione sviluppati dai ricercatori dell'Università di Padova (TRICOL e TRITDOC) risultano migliori rispetto agli altri 2 metodi di decellularizzazione analizzati (Haverich e Dohmen) per quanto riguarda la quantità di detergenti residui nella matrice valvolare. Ciò è la conseguenza dell'utilizzo simultaneo di un detergente ionico (COL o TDOC) e di uno non ionico (Triton X-100) che, d'altro lato, permette anche di ottenere risultati di decellularizzazione migliori. Haverich, con il suo studio, ha mostrato come l'utilizzo di due detergenti decrementi il contenuto residuale di agenti tossici nelle protesi, tuttavia i detergenti utilizzati in quello studio risultano molto reattivi e tendono a creare complessi più stabili nei tessuti delle valvole rendendo più alto il rischio di calcificazione. Dal punto di vista citotossico un detergente ionico mette maggiormente a rischio una valvola rispetto ad uno non ionico, è per questo che l'utilizzo di Triton X-100 diminuisce le quantità di detergenti ionici utilizzati. Lo studio appena effettuato conferma i dati dello studio precedentemente condotto in lembo polmonare. Anche se le differenze nel quantitativo di detergenti, sono analoghe a quelle registrate nello studio precedente, quantitativamente i risultati sono differenti e attestano una maggiore quantità di detergenti residui nei lembi aortici rispetto ai lembi polmonari; questo è dovuto probabilmente al fatto che il lembo aortico è un tessuto più spesso e fitto del lembo polmonare e ciò implica che le molecole di detergente vi si "annidano" in quantità maggiore.

CAPITOLO 1

Le protesi valvolari cardiache

1.1 Le Valvole Cardiache

Il cuore è l'organo centrale dell'apparato circolatorio. Situato nello spazio tra i due polmoni detto mediastino, è avvolto nel pericardio, un sacco fibrosiero che lo fissa e lo isola. È prevalentemente costituito da tessuto muscolare detto miocardio che grazie alle sue contrazioni assicura la circolazione del sangue in tutto il corpo. Da esso si originano 4 vasi principali: la vena cava superiore, la vena cava inferiore, l'aorta e il tronco polmonare. È suddiviso internamente in 4 zone: due dette atri e 2 dette ventricoli. L'atrio destro accoglie sia la vena cava superiore che la vena cava inferiore dalle quali proviene il sangue povero di ossigeno. L'atrio sinistro comunica invece con l'aorta l'arteria che trasporta il sangue ricco di ossigeno. Il ventricolo destro e quello sinistro sono separati dal setto intraventricolare e presentano una struttura simile. Sono costituiti da una porzione detta di afflusso situata in corrispondenza dell'orifizio atrioventricolare, essa riceve il sangue proveniente dall'atrio. La zona adiacente alla vena o all'arteria è invece denominata porzione di efflusso in quanto sospinge il sangue in circolo.

Sia gli orifizi atrioventricolari che quelli arteriosi presentano delle valvole il cui compito è regolare il flusso ematico.

Le valvole atrioventricolari sono denominate a lembi o a cuspidi; sono due e sono: la valvola tricuspide, situata nell'orifizio atrioventricolare destro e la valvola bicuspidale, situata nell'orifizio atrioventricolare sinistro. Sono costituite da due (valvola mitrale) o tre (valvola tricuspide) lamine triangolari che si proiettano verso l'interno dell'orifizio. Ogni cuspidale è caratterizzata da una lamina fibrosa triangolare centrale e da un anello fibroso ed è rivestita di endocardio. La particolarità delle cuspidi è che non sono vascolarizzate e si nutrono quindi per diffusione dal sangue in cui sono immerse. Quando soggiunge la contrazione del miocardio e la pressione ventricolare aumenta le cuspidi si avvicinano determinando la chiusura dell'orifizio. Un ulteriore sollevamento è impedito dai muscoli papillari i quali impediscono uno spostamento libero delle cuspidi. Il successivo rilassamento del miocardio induce l'apertura delle cuspidi.

Le valvole arteriose sono situate in corrispondenza della porzione di efflusso del ventricolo corrispondente, zona nella quale è presente un anello fibroso che circonda

l'orifizio e dove si origina l'arteria. Le valvole arteriose sono dette semilunari o a nido di rondine perché costituite da tre pieghe membranose a tasca dette appunto semilune. Ogni semiluna è costituita da una parte concava rivolta verso l'arteria e una convessa rivolta verso la zona ventricolare. Come le cuspidi le semilune non sono vascolarizzate e sono costituite da una lamina fibrosa rivestita da endocardio la quale presenta un ispessimento nodoso nella parte terminale centrale. Questi noduli sono essenziali a garantire una chiusura efficace dell'orifizio. Sono costituite da 3 principali membrane: ventricolare costituito da collagene ed elastina, spongiosa costituita principalmente da GAGs e fibrosa caratterizzata da fibre dense di collagene. Le valvole semilunari permettono il passaggio del sangue in quanto in corrispondenza della sistole ventricolare le semilune si allontanano per poi riavvicinarsi al momento dell'inversione del gradiente pressorio ovvero della diastole; in quel momento le semilune si riuniscono impedendo il reflusso del sangue dall'arteria. Essendo robuste non necessitano, al contrario delle cuspidi, di un sistema di ancoraggio[1].

Processi infiammatori e degenerativi possono causare restringimenti delle aperture valvolari che ostacolano il deflusso del sangue in entrambe le direzioni. Per le medesime cause possono verificarsi delle insufficienze valvolari che portano ad una debole aderenza tra le semilune o le cuspidi che portano conseguentemente ad una chiusura fallace dell'orifizio. Entrambe queste patologie sono responsabili dei rumori patologici detti soffi cardiaci[1,2].

La stenosi aortica è una delle cause principali di fallimento della valvola semilunare aortica. Con fallimento indichiamo la condizione di malfunzionamento della valvola che colpisce al giorno d'oggi migliaia di persone: circa il 2/3% della popolazione mondiale ultra sessantenne presenta questa condizione e necessita quindi una sostituzione valvolare. Questo problema tuttavia non colpisce solo soggetti di età avanzata, ma può presentarsi anche in età pediatrica. Le cause istopatologiche infatti sono molteplici: dall'addensamento della valvola all'accumulo di masse fibrocalcificate, dalla rottura o alla malformazione, e dal disordine delle fibre di collagene all'infiammazione[2,3].

Inizialmente si pensava che la stenosi fosse dovuta principalmente allo stress meccanico a cui è sottoposta la valvola: essa si apre e si chiude circa 100000 volte al giorno e questo continuo movimento può indebolirne la struttura. Successivamente più studi hanno dimostrato che la calcificazione della valvola e la conseguente stenosi può essere dovuta a differenti fattori[2,3,4].

Il trattamento delle valvulopatie è prevalentemente chirurgico, infatti interventi farmacologici servono solo a rallentare i processi degenerativi non a curarli. L'intervento necessario a chi soffre di queste patologie è la sostituzione della valvola nativa con una di natura meccanica o biologica che in seguito saranno descritte.

Ad oggi il numero di interventi di questo tipo è di circa 250000 l'anno ed è in aumento del 5%-7% ogni anno. Essendo sempre più vasta la richiesta di valvole sostitutive ed essendo altrettanto vasta la tipologia di soggetti al quale viene fatto questo intervento è necessario lo studio e la messa appunto di valvole sempre migliori sia dal punto di vista funzionale che economico[5].

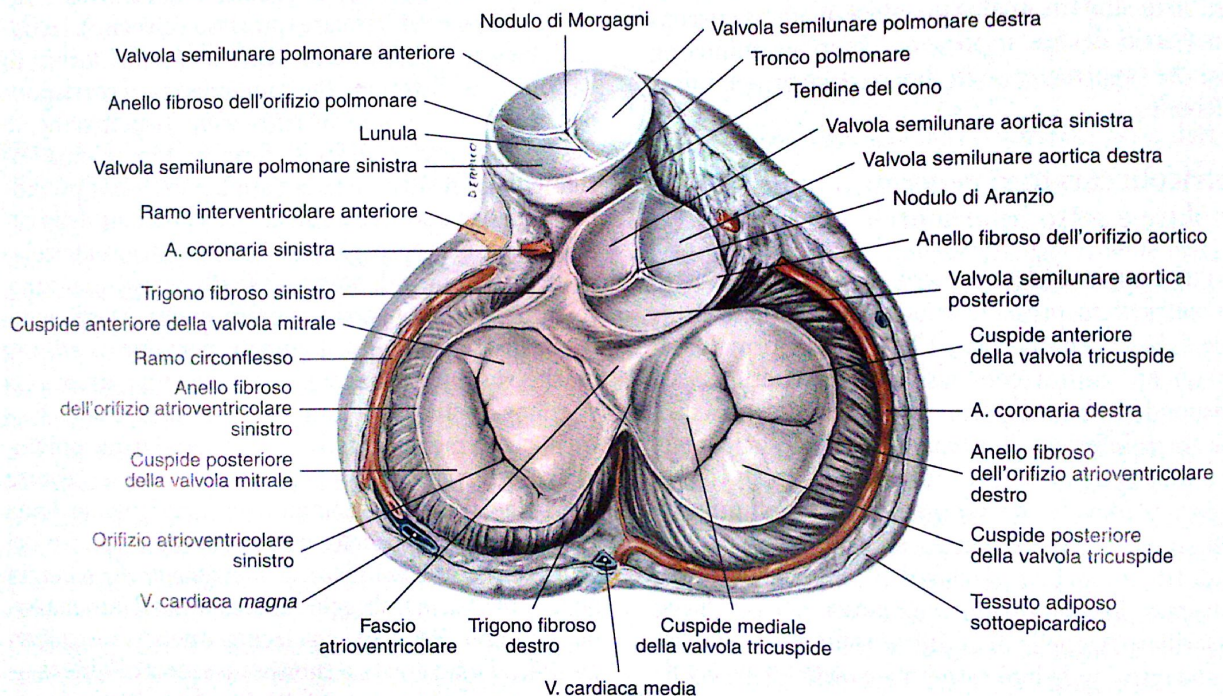


Figura 1.1: Sezione vista dall'alto delle valvole cardiache

1.2 Sostituti valvolari

I problemi di stenosi descritti in precedenza sono trattati, da 40 anni a questa parte con la sostituzione della valvola nativa, con una meccanica oppure biologica.

Il panorama delle valvole sostitutive è sempre stato abbastanza vasto questo a causa del fatto che ogni paziente ha diverse caratteristiche fisiche nonché diverse necessità e può reagire in maniera più diversa ad interventi chirurgici più o meno pervasivi. Oltre alla scelta della valvola oggi si può scegliere anche il metodo di innesto.

Il primo grande dilemma alla base della scelta della valvola è appunto, come descritto sopra, decidere se un sostitutivo meccanico o biologico.

Il primo di questi costringe ad un trattamento anticoagulante a vita per evitare trombi, tuttavia la durata delle valvole moderne meccaniche è praticamente illimitata e in paziente non avrebbe bisogno di ulteriori operazioni. Le valvole biologiche invece sono molto più adatte a garantire un'emodinamicità fisiologica della valvola, tuttavia hanno bisogno di trattamenti più complessi e si deteriorano abbastanza velocemente con la necessità di successivi reinterventi, in media ogni 10 o 15 anni. Anche le valvole biologiche necessitano inizialmente di trattamenti anticoagulanti per un primo periodo, successivamente non è più necessario.

1.2.1 Valvole meccaniche

Esistono vari tipi di sostituti meccanici per valvole aortiche: Caged-Ball, Tiltig-Disc, e Bileaflet. Negli ultimi anni si sono trattate e sviluppate soprattutto le ultime due tuttavia tutte e tre non mostrano elevati tassi di mortalità sul lungo periodo[6,12,13].

Caged-ball: detta più precisamente Starr-Edwards caged ball fu la prima valvola meccanica messa a punto nel anni '60, non presenta problemi di deterioramento o rottura quindi è molto affidabile sul lungo periodo, tuttavia non riproduce fedelmente il flusso ematico e le caratteristiche tipiche meccaniche di una valvola nativa. Consta in una sfera intrappolata all'interno di una gabbia che a seconda del flusso ematico ostruisce o libera l'orifizio valvolare. Viene utilizzata per trattare casi di stenosi nei paesi del terzo mondo grazie al suo costo limitato.

Tilting-Disc: detta Bjork-Shiley è costituita da un disco che ruota attorno ad un unico asse con un'apertura tra i 75 e gli 80 gradi. Il disco inizialmente dritto è stato modificato e ha oggi preso una forma sferica. Riduce di molto le superficie potenzialmente di accumulazione causa principale dei trombi. Questa valvola risulta emodinamicamente migliore della caged ball.

Bileaflet: costituita di grafite impregnata di tungsteno è montata poi su un sostegno metallico. È formata da due dischetti che ruotano attorno a due pivot anch'essi con un'apertura tra 75 e 80 gradi. Miglioramenti che oggi vengono

apportati contano sia la modifica morfologica dei dischetti resi convessi sia il grado di apertura degli stessi.

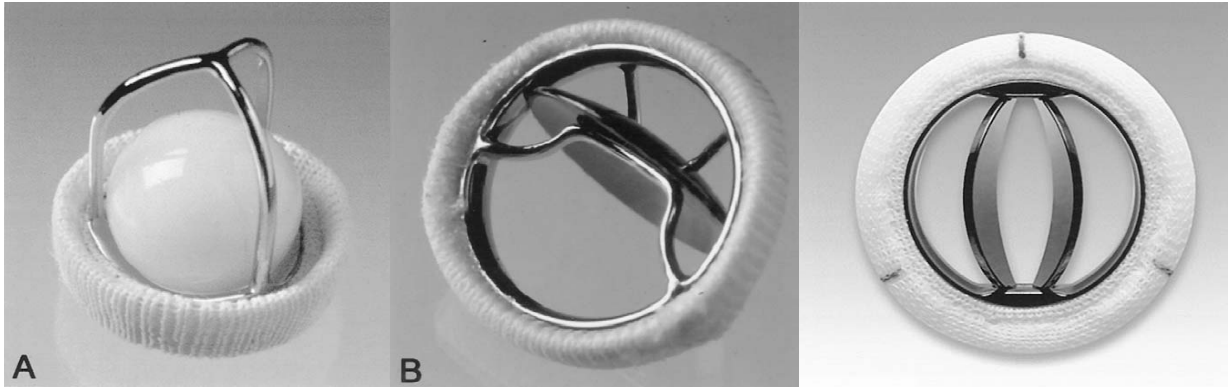


Figura 1.2: Da sinistra a destra: Star-Edwards Caged Ball, Bjork-Shiley Tilting-Disc, Edwards Mira Bileaflet

1.2.2 Valvole Biologiche

Le valvole biologiche si dividono in tre principali tipologie: *autograft*, *homograft* (detto anche *allograft*) ed *heterograft* (detto anche *xenograft*). La classificazione è fatta secondo il tessuto di provenienza della valvola sostitutiva.

Gli *autografts* sono innesti in posizione aortica della valvola polmonare del paziente stesso la quale a suo volta viene sostituita da un'ulteriore valvola *homograft* o *xenograft*. La metodologia che definisce l'innesto di queste valvole è detta "Procedura di Ross" ed è stata sviluppata dal dottor Donald Ross alla fine degli anni '60. Questo metodo che implica l'impiego di due valvole è stato molto criticato, tuttavia i dati statistici raccolti su questa operazione mostrano come molto raramente la valvola polmonare propria innestata in posizione aortica fallisca, risultando quindi la miglior soluzione. La valvola nativa cresce con il paziente e non viene rigettata, inoltre è possibile evitare il trattamento anticoagulante a vita.

Gli *homografts* sono invece innesti di valvole polmonari o aortiche provenienti da donatori deceduti le quali vengono crioconservate. L'utilizzo di queste valvole, limitato dalla difficile reperibilità dei tessuti, mostra risultati molto soddisfacenti per quanto riguarda l'emodinamica. Il sostituto valvolare viene difficilmente rigettato e si adatta molto bene all'orifizio aortico.



Figura 1.3: Homograft

Gli *heterografts* o *xenografts* sono invece tutte quelle valvole ricavate da tessuti di specie animali non umane. Al giorno d'oggi i tessuti maggiormente utilizzati sono di origine porcina o bovina. Il motivo per il quale non si utilizzano tessuti di specie geneticamente più vicine all'essere umano è semplice: questi sarebbero maggiormente soggetti a patologie che potrebbero colpire anche gli esseri umani. Le valvole porcine sono di norma cuspidi coronariche destre mentre il tessuto di origine bovina è di solito il pericardio. Questi ultimi sono studiati da poco, ma sembrano preferibili alle valvole porcine avendo un'emodinamica migliore.

Un'ulteriore classificazione delle valvole biologiche è definita dalla metodologia con la quale il tessuto sostitutivo viene fissato in posizione. Due sono questi tipi di innesti: *stented* o *stentless*.

I primi interventi per rimpiazzare la valvola aortica nativa con innesti di valvole aortiche porcine o pericardi bovini o equini, vennero fatti trattando lo *xenograft* con glutaraldeide e poi montandoli su *stent*. Questi sono strutture metalliche cilindriche a maglia o telai di plastica coperti di un tessuto sintetico e fissati alla valvola sostituiva con una sutura. Il loro ruolo è quello di mantenere la struttura della valvola e facilitare il fissaggio della stessa nell'orifizio aortico. Il lato positivo di queste strutture è la relativa facilità di operazione, il lato negativo sta invece nella presenza della sutura tra anello e valvola, questa provoca un variazioni nel gradiente pressorio che intacca l'emodinamica della valvola.

Grazie allo sviluppo delle tecniche di chirurgia, recentemente si stanno sviluppando nuovi tipi di sostituti valvolare *stentless* ovvero privi dell'anello metallico o plastico utilizzato per facilitarne l'innesto. La mancanza dello *stent* offre maggiore area orifiziale, diminuendo il gradiente pressorio transvalvolare, rispecchia meglio l'anatomia e l'emodinamica della valvola nativa ed inoltre degenera meno rapidamente, non modifica gli effetti della radice aortica e dei seni nativi. L'innesto viene fatto operando due suture

una vicina all'orifizio valvolare e l'altra all'interno dell'aorta, quest'ultima deve essere molto precisa per evitare modifiche al gradiente pressorio.

A differenza dei sostituti *xenograft* sopra descritti, *homograft* ed *autograft* sono *stentless* e possono essere innestati senza anelli aggiuntivi[5,7,8,9,10,11].



Figura 1.4: A sinistra Carpentier-Edwards stented, a destra Edwards Prima Plus stentless

1.2.3 Sostituti percutanei

La sperimentazione e lo studio odierno di sostituti valvolari sempre più efficienti, sono frenati da un fattore determinante nella cura delle valvulopatie, ovvero dalla natura pesantemente invasiva degli interventi chirurgici di innesto valvolare. I soggetti troppo anziani o troppo giovani non sono in grado di sopportare operazioni così pesanti. Per i soggetti di oltre 75 anni il rischio di decesso post operatorio è del 33%.

Per queste motivazioni, da 20 anni a questa parte, si stanno studiando metodi di impianto meno invasivi dell'intervento chirurgico a cuore aperto. Nel 1992 il Dottor Andersen operò un impianto intravascolare di una protesi *stented* montata su un catetere in un animale ottenendo ottimi risultati; il primo risultato positivo sull'essere umano arrivò tuttavia solamente 10 anni dopo: nel 2002 venne operato il primo innesto di valvola percutanea.

I metodi di sostituzione percutanea di valvola aortica utilizzano principalmente 3 tecniche tutte accomunate dall'utilizzo di valvole espandibili grazie ad un palloncino e di un catetere per raggiungere la zona di inserimento. Queste tecniche sono:

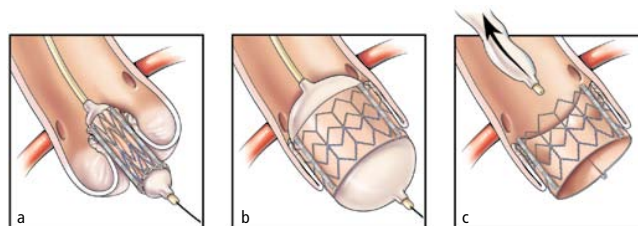
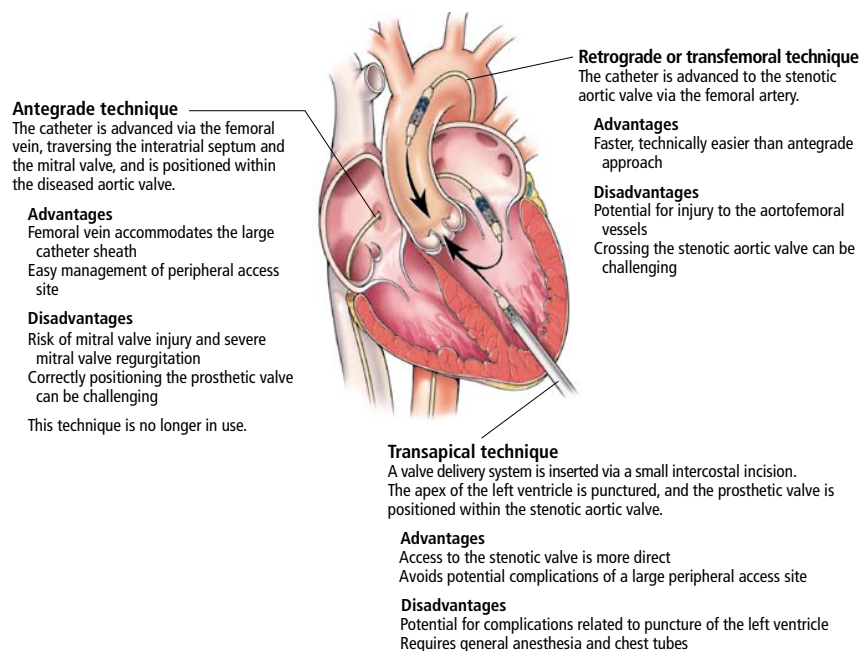
- Metodo Anterogrado: si entra nella vena femorale e con il catetere si risale fino alla valvola mitrale per posizionare la protesi nel corretto orifizio

valvolare; è una tecnica che oggi non viene più utilizzata a causa del rischio di rigurgito mitralico.

- Metodo Retrogrado: si entra direttamente nell'arteria femorale e si raggiunge l'orifizio aortico per posizionare la valvola, è un metodo più facile e veloce di quello antigrado, ma può causare severi danni all'arteria femorale. È ad oggi il metodo percutaneo maggiormente utilizzato.
- Metodo Transapicale: si opera un piccolo taglio tra le costole e l'inserimento viene effettuato pungendo l'apice ventricolare sinistro per poi risalire nell'orifizio aortico; è un metodo efficace e veloce, non danneggia le arterie ma può portare a complicanze di differente natura come pneumotoraci, aritmie e aneurismi.

Le valvole utilizzate per questo tipo di intervento sono principalmente 3:

- Baloon-expandable Edwards SAPIEN: utilizzata nel metodo transapicale e retrogrado.
- Cribier-Edwards Valve: l'unica valvola utilizzata in tutte e tre le metodologie.
- CoreValve: utilizzata solo con la tecnica retrograda.



The aortic valve prosthesis is placed at mid-position in the patient's aortic valve so as not to impinge on the coronary ostia or to impede the motion of the anterior mitral leaflet (a). The prosthesis is deployed by inflating (b), rapidly deflating, and quickly withdrawing the delivery balloon (c).

CCF
Medical Illustrator: Joseph Pangrace ©2008

Figura 1.: Tecniche di sostituzione valvolare percutanea

Tutte e tre le metodologie d'intervento sono monitorate mediante la registrazione di immagini fluoroscopiche, angiografie ed ecocardiografie esofagee al fine di evitare traumi indesiderati.

Oltre a questo tipo di intervento sostitutivo esiste un palliativo denominato valvuloplastia con pallone espandibile che consiste nel posizionare un palloncino sgonfio, con l'aiuto di un catetere, nella zona della valvola aortica stenotica e gonfiarlo al fine di allargare l'orifizio. Questo intervento non è efficace a lungo termine, ma viene utilizzato come primo *step* nell'inserimento successivo della valvola. Infatti in questo tipo di intervento la valvola nativa non viene rimossa bensì utilizzata come appoggio per il sostitutivo[14,15,16].

1.3 Vantaggi e svantaggi dei diversi sostitutivi valvolari

La quasi totalità dei casi odierni di stenosi aortica è trattata mediante la sostituzione della valvola nativa con una protesi, sia essa biologica o meccanica, che dovrebbe riprodurre fedelmente l'emodinamica corretta di una valvola sana. La presenza di una così ampia gamma di valvole sostitutive è dovuta all'enorme soggettività nella scelta della corretta protesi sostitutiva. La determinazione di quale sostitutivo sia migliore per uno specifico paziente passa dalla valutazione di molteplici fattori. Il primo di tutti è l'età della persona. La maggior parte dei casi di stenosi è da attribuire ad una fascia di età superiore ai 65 anni, questo comporta rischi maggiori ad operazioni a cuore aperto e inoltre, essendo la vita media delle valvole sostitutive biologiche di 15-17 anni, comporterebbe una probabile seconda operazione ad un'età ancora più critica per un intervento massiccio. Anche se le valvole meccaniche sono praticamente indistruttibili esse costringono ad un trattamento anticoagulante a vita il quale non azzerava comunque le possibilità del verificarsi di tromboembolia. È per questi motivi che per una persona anziana è comunque più indicato l'impianto di una bioprotesi.

Per quanto riguarda invece il problema sotto il punto di vista pediatrico la questione da tenere in debito conto è la necessità che la valvola cresca con il bambino al fine di evitare continue operazioni. Anche in questi casi è meglio procedere con l'impianto di bioprotesi.

I sostituti biologici sembrano essere migliori per parecchi motivi, oltre a quelli già citati le bioprotesi non diminuiscono l'area dell'orifizio, non vanno incontro a *missmatch*, ovvero differenze di dimensioni tra valvola e orifizio, almeno per quanto riguarda le

valvole *stentless*; tuttavia le bioprotesi hanno parecchi punti di debolezza sul lungo periodo:

- vanno incontro a processi di deterioramento
- possono provocare rigetto a causa del tessuto estraneo
- possono innescare la calcificazione che porta a rigidità e perdita delle caratteristiche meccaniche necessarie alla corretta riproduzione del flusso ematico
- possono essere sede d'infezione

CAPITOLO 2

La Decellularizzazione

2.1 La decellularizzazione

Le valvole sostitutive biologiche di origine animale sono una scelta vincente per il trattamento di stenosi e in generale di valvulopatie. In primo luogo sono facile da reperire e non necessitano di una lunga conservazione in previdenza di essere utilizzate. Sono facili da impiantare grazie alla loro forma che ricalca abbastanza fedelmente quella di valvole di cuore umano e, sempre per questo motivo, hanno un comportamento dal punto di vista emodinamico molto simile alle valvole native. La particolarità delle valvole è che sono caratterizzate da una struttura rigida di elementi costitutivi della matrice extracellulare e questa rimane invariata tra le varie specie. Tutto questo le rende ottime candidate ad un trapianto. Ciò che tuttavia resta importante da tenere in considerazione sono le cellule dell'individuo donatore e gli antigeni xenogenici che caratterizzano lo *scaffold*. È importante per diminuire la risposta immunitaria ed un eventuale rigetto trattare questi tessuti al fine di eliminare ogni traccia genetica del donatore lasciando però intatta la struttura e le funzionalità della valvola. I trattamenti di decellularizzazione permettono di eliminare la maggior parte del materiale che potrebbe provocare una risposta immunitaria nel ricevente. Questi trattamenti possono essere diversi:

- I metodi fisici costituiscono solitamente la prima fase della decellularizzazione. Tra questi ci sono il congelamento, che provoca la lisi delle cellule ma rischia anche di intaccare la struttura dell'ECM; la pressione meccanica che viene utilizzata però solo in tessuti non troppo complessi, l'agitazione meccanica ed infine la sonicazione.
- I metodi chimici prevedono invece l'utilizzo di acidi al fine di solubilizzare gli organelli citoplasmatici e rimuovere gli acidi nucleici, oppure di detergenti, che, essendo fulcro di questo studio, verranno approfonditi nella prossima sezione. Queste sostanze sono in genere molto efficienti tuttavia alterano e distruggono la struttura dei GAGs, elemento fondamentale. Tra gli acidi più utilizzati ci sono l'acido acetico, l'acido cloridrico, l'acido solforico, l'idrossido di ammonio e l'acido paracetico. Quest'ultimo è stato studiato per il

trattamento di *scaffold* di origine porcina con ottimi risultati: esso non altera la struttura e la meccanica del sostituto valvolare e lascia intatti i fattori di crescita.

- I metodi enzimatici infine prevedono di utilizzare enzimi come tripsina o endonucleasi al fine di catalizzare la separazione tra componenti cellulare e matrice extracellulare e di eliminare tracce di acidi nucleici.

Una caratteristica fondamentale per un trattamento decellularizzante è la necessità che esso non sia citotossico, al fine di permettere alle cellule dell'ospite di ripopolare la valvola. Questo rischio si presenta soprattutto nell'utilizzo di mezzi chimici ed enzimatici; la presenza di residui di agenti chimici e di detergenti nella matrice extracellulare può portare non solo a velocizzare il processo di calcificazione, ma anche ad una non completa accettazione dello scaffold da parte dell'ospite. Per questo motivo è necessario che un trattamento decellularizzante preveda una serie di lavaggi al fine di rimuovere le specie chimiche citotossiche[17,18,19].

2.2 La fissazione con glutaraldeide

Le cause principali di *failure* delle protesi valvolari sono il rigetto, dovuto a *missmatch*, patogeni xenogeniche e altri fattori, e la durata limitata dell'integrità della valvola. Per ovviare a questi problemi sono stati studiati differenti metodi di trattamento e fissaggio della valvola. Il metodo fino ad ora utilizzato e che ottiene risultati migliori è il trattamento della protesi con glutaraldeide. Questa aldeide viene utilizzata assieme alla formaldeide perché sterilizza e riduce di molto l'antigenicità del tessuto trattato, diminuendo così la risposta immunitaria dell'ospite. Oltre a ciò il fissaggio mediante glutaraldeide fa resistere maggiormente la valvola allo stress di tipo meccanico a cui è sottoposta in vivo. L'efficacia della glutaraldeide come fissativo risiede nella sua capacità di creare cross-linking con legami covalenti in due modi:

- creando basi di Schiff legando gruppi aldeidici con i gruppi amminici della lisina e dell'idrossilisina del collagene;
- mediante polimerizzazione in particolare grazie alla condensazione di due gruppi aldeidici.

Uno dei lati negativi dell'utilizzo della glutaraldeide è che il trattamento con essa indurisce la valvola alterandone leggermente le proprietà meccaniche; tuttavia il contro più rivelante nel trattamento fissativo con glutaraldeide rimane il decadimento delle

aldeidi che non hanno reagito le quali concorrono all'insorgere del fenomeno di calcificazione[22,24].

Per quanti riguarda i metodi di fissaggio fino a qualche tempo fa veniva utilizzato solo il metodo ad alta pressione, solo recentemente sono stati messi a punto metodi di fissaggio a bassa pressione di tipo dinamico (ovvero con una pressione di 4mmHg). Questi metodi garantiscono migliori risultati in quanto preservano meglio le caratteristiche strutturali in particolar modo del collagene ed inoltre utilizzano una minor quantità di glutaraldeide, diminuendo il rischio di calcificazione[23,25,26].

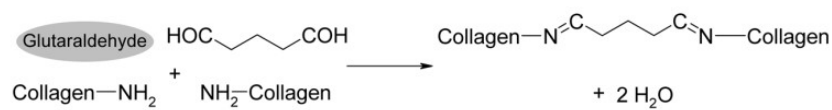


Figura 2.0.1: Cross-linking tra glutaraldeide e collagene

2.3 La Calcificazione

Uno dei fattori che determinano la degradazione delle valvole biologiche, è la calcificazione. Questo fenomeno è definito come la massiccia deposizione di sali di calcio nei tessuti impiantati che provoca irrigidimento dei lembi valvolari. La perdita di flessibilità è un fattore determinante nell'insorgenza del malfunzionamento della valvola. Questo processo si verifica, di consueto, in valvole biologiche fissate con glutaraldeide dopo 10 anni dall'impianto: i gruppi aldeidici che rimangono liberi, ovvero che non formano *cross-linking* per migliorare l'adesione della valvola all'orifizio, non solo sono tossici, ma risultano anche facilmente attaccabili da ioni calcio liberi. Questa reazione porta alla formazione di aggregati cristallini di fosfato di calcio che possono incorporare sodio, magnesio e carbonato. Molti altri fissativi sono stati testati per ovviare al problema, tuttavia nessun di questi ottiene risultati migliori della glutaraldeide. Oltre alla presenza di fissativi la calcificazione può essere causata anche da altri fattori. La criopreservazione, lo stress meccanico del fissaggio e del funzionamento costante e la risposta immunitaria danneggiano le fibre di collagene e in l'ECM della protesi biologica favorendo la formazione di punti deboli facilmente attaccabili[20,21].

2.3.1 Prevenzione

Le diverse cause sopra descritte, deteriorano il tessuto della valvola biologica, costringendo il ricevente ad una ulteriore sostituzione. Da qui quindi la necessità di trovare metodi per prevenire la calcificazione.

Le tecniche attualmente in uso sono tre: la terapia sistemica con agenti anticalcificanti, la terapia locale con dispositivi impiantabili di somministrazione di farmaci e la modificazione dei biomateriale usati come la rimozione di un componente calcificabile, l'aggiunta di un agente esogeno, o l'alterazione chimica[21].

Il metodo di somministrazione di anticalcificanti è efficace tuttavia allo stesso tempo provoca effetti collaterali di importanza rilevante: il trattamento inibisce la formazione fisiologica delle ossa. Per questo motivo sono stati studiati ad esempio i metodi di impianto di somministratori di farmaci nella zona della protesi, così da limitarne l'effetto. Il metodo migliore sarebbe chiaramente il trattamento del tessuto direttamente, attraverso l'eliminazione dell'elemento calcificante o l'inserzione di agenti inibitori.

Recentemente la Food An Drug Administration (FDA) ha approvato l'utilizzo di inibitori della formazione di idrossiapatite, sostanze che impediscono la formazione di cristalli di calcio[20,21].

2.4 I Detergenti utilizzati nella decellularizzazione

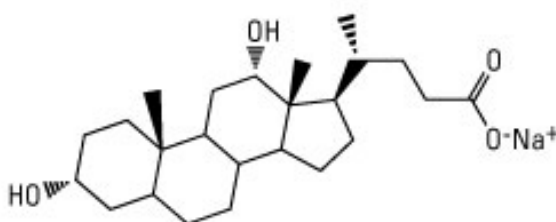
I detergenti sono molecole anfipatiche appartenenti alla classe dei composti surfattanti. Questi sono agenti tensioattivi in grado di ridurre la tensione superficiale all'interfaccia tra due o più miscele facilitando la miscibilità tra diversi liquidi, la bagnabilità di alcune superfici e la solubilizzazione di sostanze altrimenti apolari. I detergenti sono caratterizzati da una porzione polare (la testa) e una lunga catena idrofobica. Grazie alla natura idrofobica delle loro code, le molecole di detergente, se poste in sostanze acquose, creano degli aggregati dette micelle mettendo a contatto la loro parte idrofobica e lasciando all'esterno la parte polare che interagisce con l'ambiente circostante. I detergenti vengono utilizzati sia nello studio delle membrane cellulari sia come metodi chimici di decellularizzazione. Essi sono in gradi di solubilizzare le membrane cellulari limitando il compattamento del doppio strato fosfolipidico e agendo su diverse interazioni tra lipidi e proteine.

I detergenti si dividono in due grandi classi:

- I detergenti non ionici non presentano cariche sulla testa polare, agiscono rompendo i legami lipide-lipide e lipide-proteina, ma non proteina-proteina e questo risulta avere un meno aggressivo nei confronti della matrice extracellulare. Uno dei detergenti non ionici più utilizzato è il Triton X-100 che, anche se richiede trattamenti molto lunghi, permette di rimuovere materiale cellulare in maniera molto efficace alterando solo GAGs, laminina e fibronectina. Lo studio dell'azione di questo detergente ha evidenziato che agisce efficacemente tuttavia non rimuove completamente il materiale cellulare in parete aortica e miocardica[17].
- I detergenti ionici sono caratterizzate da una testa polare carica. Questa può essere negativa (anionici), positiva (cationici), o di entrambe le nature (zwitterionici). Questi detergenti agiscono molto bene nel "digerire" materiale cellulare e nucleare, tuttavia rompendo legami proteina-proteina denaturano la struttura dello *scaffold*. Tra i detergenti ionici più comuni ci sono SDS, DOC, TDOC e COL.

Un parametro molto importante per la scelta di un detergente da impiegare nel metodo di decellularizzazione è la Concentrazione Micellare Critica (CMC). Si tratta della concentrazione di surfattante alla quale ogni monomero di composto inizia il processo verso lo sviluppo delle micelle. Queste strutture sono sottoposte a cicli continui di assemblaggio e disassemblaggio, presentano un diametro di pochi nanometri e un peso molecolare inferiore ai 100kDa. Il CMC è un parametro essenziale in quanto definisce la concentrazione minima di detergente necessaria per la solubilizzazione delle membrane cellulari. Questo parametro varia al variare della lunghezza delle code idrofobiche e della loro composizione, in particolare la CMC diminuisce all'aumentare dell'idrofobicità delle code[27,28,29,36].

I detergenti ionici principalmente usati in questo studio sono:



Formula: $C_{24}H_{39}NaO_4$

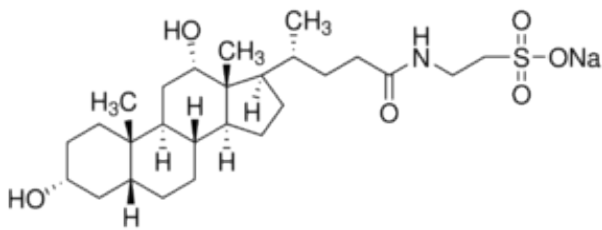
Nome: **Deossicolato di Sodio**

Peso: 414.55

Tipo Detergente: Ionico
(Anionico)

CMC (20-25°C): 2-6 mM

Solubilità in H_2O : 20 μM



Formula: $C_{26}H_{44}NO_6SNa$

Nome: **Taurodeossicolato di sodio**

Peso: 521.69

Tipo Detergente: Ionico
(Anionico)

CMC (20-25°C): 1-4 mM

Solubilità in H_2O : 500 μM

Formula: $C_{24}H_{39}NaO_5$

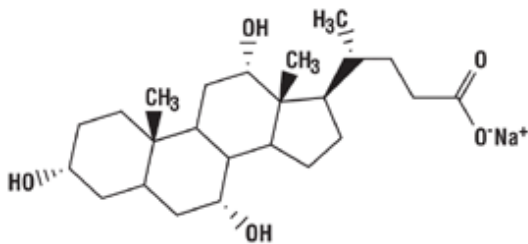
Nome: **Colato di sodio**

Peso: 430.55

Tipo Detergente: Ionico
(Anionico)

CMC (20-25°C): 9-15 mM

Solubilità in H_2O : 273 μM



Formula: $CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$

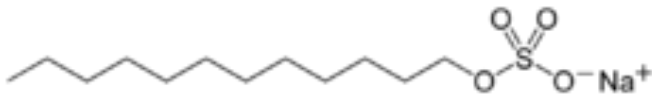
Nome: **Sodio Dodecil Solfato**

Peso: 288.38

Tipo Detergente: Ionico
(Anionico)

CMC (20-25°C): 7-10 mM

Solubilità in H_2O : 100 μM



Formula: $t\text{-Oct-C}_6\text{H}_4\text{-}$

$(OCH_2CH_2)_xOH$, $x=9-10$

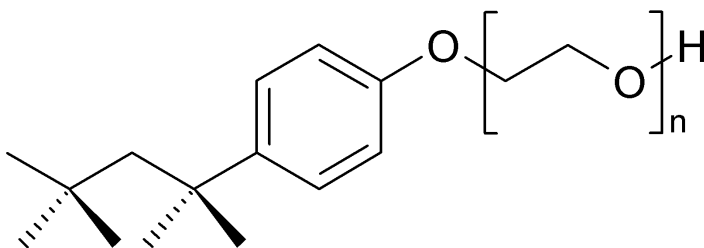
Nome: **Triton X-100**

Peso: 625

Tipo Detergente: Non Ionico

CMC (20-25°C): 0.2-0.9 mM (20-25°C)

Solubilità in H_2O : solubile



2.5 I metodi di decellularizzazione presi in considerazione

In questo studio sono stati messi a confronto differenti metodi di decellularizzazione, riguardo alla quantità di detergenti residui nelle valvole trattate. Altre discriminanti per l'individuazione del metodo più vantaggioso sono ad esempio l'effetto dei vari detergenti sulla matrice extracellulare quindi sulla struttura intrinseca della valvola.

Le tecniche di decellularizzazione analizzate sono: "Dohmen" sviluppata dallo stesso Pascal M. Dohmen *et al* [30,31], "Haverich" ideata da Axel Haverich *et al* [32], TRICOL e TRITDOC sviluppate entrambe nel laboratorio per la Medicina Rigenerativa sulle Valvole Cardiache diretto di Prof. Gino Gerosa[33].

Sia la metodica di Dohmen che quella di Haverich utilizzano come detergente il DOC ovvero il sodio deossicolato, un detergente ionico; Haverich completa il trattamento utilizzando anche un ulteriore detergente ionico: l'SDS (sodio dodecil solfato), la mutua azione dei due detergenti è molto efficace sia nel decellularizzare le protesi biologiche. Le quantità residue di questi due detergenti tuttavia restano abbastanza elevate e dannose.

I metodi di decellularizzazione, messi a punto dall'università di Padova, TRICOL E TRITDOC prevedono la lisi cellulare del tessuto in ambiente ipotonico, seguita da trattamenti con mezzi chimici quali la combinazione di un detergente non ionico: il Triton X-100 un detergente ionico. Il detergente ionico è il colato di sodio per il metodo TRICOL e il Taurodeossicolato di sodio per il metodo TRITDOC. I due metodi prevedono inoltre alternanze di soluzioni ipo- e iper-toniche in atmosfera controllata e in presenza di inibitori di proteasi.

Il COL e il TDOC sono detergenti ionici che agiscono solubilizzando le membrane citoplasmatiche delle cellule concentrandosi sui complessi fosfolipidici e solubilizzando le proteine di membrana. Tali trattamenti rimuovono i residui che non sono stati rimossi dal detergente non ionico.

I detergenti ionici sono inoltre utilizzati per solubilizzare dei complessi sfingolipidi-colesterolo che determinano l'insolubilità della fosfatasi alcalina, enzima ritenuto responsabile dell'innescò del meccanismo di calcificazione.

Essendo i detergenti ionici maggiormente dannosi per la salute del ricevente questo studio si concentra sulla determinazione di questi ultimi utilizzati nei metodi sopra elencati, in particolare si vogliono determinare:

- quantitativi residui di DOC nella matrice pericardica decellularizzata con protocollo di Haverich;

- quantitativi residui di DOC nella matrice pericardica decellularizzata con protocollo di Dohmen;
- quantitativi residui di COL nella matrice pericardica decellularizzata con protocollo TRICOL;
- quantitativi residui di TDOC nella matrice pericardica decellularizzata con protocollo TRITDOC;

2.6 Determinazione dei detergenti residui

I residui chimici ad alte concentrazioni (quantità nell'ordine dei 50 mg/L) possono risultare tossici per le cellule dell'ospite. Vi è quindi la necessità di sviluppare delle metodiche per monitorare il livello dei residui potenzialmente dannosi nei materiali trattati che verranno utilizzati come protesi biologiche. Tra gli agenti chimici più dannosi utilizzati nella decellularizzazione troviamo il DOC. Questo detergente anionico altera il tessuto biologico diminuendo la vitalità cellulare. Inoltre esso provoca infiammazione locale, favorisce la fibrosi e attiva il sistema immunitario non-specifico inducendo l'infiltrazione di macrofagi e generando così una risposta immunitaria locale.

In letteratura si trovano diverse metodologie sviluppate per stimare le quantità di residui di detergenti anionici utilizzati nella decellularizzazione. Methapati *et al* [34] hanno cercato di determinare, per via colorimetrica mediante tecniche spettrofotometriche, se e quanto acido deossicolico rimanesse in una vena safena umana: utilizzando una retta di taratura con coefficiente di determinazione $R^2 = 0,882$, è stata stimata una quantità di acido deossicolico pari a $16,1 \pm 0,37$ mg in 20 g di tessuto. Per queste analisi è stato utilizzato il saggio con blu di metilene, un metodo facile da applicare ma decisamente poco selettivo e specifico per l'analita in questione.

Un diverso studio, operato da Caamano *et al* [35] si è invece concentrato sulla lisciviazione del SDS dai tessuti trattati. L'obiettivo è quantificare la quantità di SDS presente nel tessuto in maniera indiretta ovvero andando ad analizzarne la quantità presente nelle soluzioni di lavaggio e determinando quali concentrazioni sortiscono un effetto tossico misurabile. Lo studio è stato fatto su cellule vascolari ovine. Grazie ad uno spettroscopio ATR-FTIR si è riusciti a dimostrare che il SDS viene rilasciato dal tessuto e diffuso nell'ambiente circostante causando effetti citotossici. L'idea di fondo è che un numero sufficiente di lavaggi dovrebbe essere abbastanza per limitare la concentrazione di detergente deassorbito dal tessuto impiantato. A questo proposito Cebotari *et al* [32]

utilizzando metodologie basate su cromatografia liquida HPLC e preconcentrando i campioni in cartucce C-18, hanno determinato le quantità di SDS nei diversi lavaggi e hanno stabilito quale serie di lavaggi siano in grado di assicurare nelle soluzioni finali quantità di detergenti non citotossiche. Un ulteriore studio fatto da Gratzner *et al* [37] ha cercato di sviluppare metodologie di lavaggi per minimizzare le quantità di detergenti residui negli scaffold determinandone la concentrazione nelle soluzioni di lavaggio.

La letteratura evidenzia come nessun gruppo abbia messo a punto un metodo diretto per la determinazione delle quantità residue di detergenti. Non esistono studi di quantificazione di agenti citotossici che operino in maniera diretta sul tessuto che potrebbe essere impiantato.

CAPITOLO 3

Materiali e Metodi

3.1 Materiali

In questo capitolo verranno elencati e descritti i materiali principalmente utilizzati durante lo studio, i metodi sfruttati per il conseguimento dei risultati.

3.1.1 Reagenti

-Acetonitrile	Sigma-Aldrich (Steinheim, Germania)
-Acido Trifluoroacetico (TFA)	Biosolve (Valkenswaard, Olanda)

3.1.2 Detergenti

Forniti da Sigma-Aldrich (Steinheim, Germania)

-DOC

-COL

-Triton X-100

-TDOC

Forniti da Prolabo (Parigi, Francia)

-SDS

3.2 Metodi

In questa sezione verrà data una descrizione sia dei protocolli di decellularizzazione utilizzati per trattare le valvole biologiche, sia della metodologia di analisi che è stata utilizzata per ottenere i risultati.

3.2.1 Protocolli di decellularizzazione

Verranno in seguito descritti i protocolli di decellularizzazione utilizzati in questo studio denominati metodo TRITDOC, metodo TRICOL, metodo Dohmen e metodo Haverich. Tutti i campioni sono stati preparati laboratorio per la Medicina Rigenerativa sulle Valvole Cardiache diretto dal Prof. Gino Gerosa.

3.2.1.1 Metodo TRITDOC (TRItton X-100 e TauroDeOssiColato di sodio) e TRICOL (TRItton X-100 e COLato di sodio)

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

- trattamento con inibitori di proteasi;
- estrazione dei campioni con Triton X-100;
- estrazione dei campioni con detergente ionico (TDOC oppure COL);
- eliminazione dei residui di detergente nel tessuto;
- eliminazione dei residui di acidi nucleici dal tessuto;
- conservazione.

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

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

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

La sterilità dei campioni è garantita dalla manipolazione delle diverse soluzioni effettuata sotto cappa biologica a flusso laminare e dal preventivo filtraggio delle stesse con tramogge di *cut-off* 0,22 µm. Come agente batteriostatico viene ad essere nuovamente utilizzato il composto sodio azide (NaN₃).

Durante tutto il processo decellularizzante le radici valvolari con le valvole *in situ* vengono poste sotto costante e moderata rotazione all'interno di tubi di pyrex. Tale sistema permette alle soluzioni utilizzate di effettuare un lavaggio interno del lume valvolare, nei due sensi di flusso. I campioni così ottenuti vengono conservati in una soluzione di PBS e 0,04% NaN₃ a +4°C.

3.2.1.2 Metodo Haverich: SDS-DOC (Sodio Dodecil Solfato e DeOssiColato di sodio)

Tale trattamento, descritto da Haverich A. *et al.* [32], prevede la decellularizzazione dei tessuti utilizzando una soluzione composta dallo 0,5% w/v di sodio dodecil solfato (SDS) e 0,5% w/v di sodio deossicolato (DOC). I tessuti vengono sospesi in tale soluzione per 24 ore ciascuno, a RT e sotto continua agitazione. Infine i campioni sono conservati in fisiologica sterile (0,9% NaCl o PBS isotonic) e 0,04% NaN₃ a +4°C.

3.2.1.3 Metodo Dohmen: DOC (Deossicolato di sodio)

Questo protocollo di decellularizzazione è stato desunto dai lavori di Dohmen PM *et al.* [30,31]. Tale trattamento prevede la sospensione di radici valvolari in soluzione fisiologica sterile, pH 7.4, contenente 1% w/v di deossicolato di sodio (DOC) in costante agitazione per 12 ore a +37°C ed in presenza di antibiotici (1% v/v penicillina/streptomicina). Tale passaggio viene ripetuto 2 volte.

I tessuti sono poi sottoposti a lavaggi estensivi con soluzione 0,9% w/v NaCl sterile: 2 lavaggi al giorno (12 ore ciascuno) per 5 giorni RT.

I campioni vengono quindi conservati in soluzione fisiologica sterile a 0,04% w/v NaN₃ a +4°C.

3.2.2 Preparazione dei digeriti

In questo studio sono stati utilizzati tessuti provenienti da valvole cardiache aortiche porcine, più precisamente i lembi delle valvole aortiche. Il materiale biologico è stato prelevato dagli animali direttamente dopo il loro sacrificio e trasportato presso il laboratorio all'interno di sacche da organo sterili, in soluzione isotonica di tampone fosfato (PBS) e 0,04% NaN_3 (sodio azide ad effetto batteriostatico, in grado di bloccare la catena respiratoria mitocondriale dei batteri aerobici) a $+4^\circ\text{C}$. Le dovute dissezioni volte all'isolamento delle radici valvolari, sono state effettuate sotto cappa biologica a flusso laminare, con strumenti chirurgici a contenitori sterili.

I tessuti ottenuti sono poi posti in soluzione fisiologica e lasciati equilibrare sotto leggera agitazione per 1 ora a $+4^\circ\text{C}$, al fine di rimuovere le tracce ematiche. I campioni sono quindi stati sottoposti a trattamenti decellularizzanti secondo diversi protocolli precedentemente riportati e destinati alla valutazione dei residui detergenti.

I tessuti da analizzare sono stati sottoposti a digestione con papaina, un enzima proteolitico appartenente alla classe delle idrolasi, che catalizza l'idrolisi di proteine, per degradare l'impalcatura proteica e liberare gli eventuali residui di detergente rimasti all'interno della matrice extracellulare.

Al fine di denaturare parzialmente il collagene e rendere più aggredibile il tessuto da parte dell'enzima, i campioni vengono pesati e successivamente bolliti per 2 minuti in un volume di acqua MilliQ. Si procede quindi aggiungendo il *buffer* di digestione composto da 0,125M CH_3COONa , 6,25mM EDTA e 6,25mM L-Cys. Vengono effettuate quattro aggiunte di papaina distanziate tra loro di 12 ore. La quantità di enzima da impiegare è tale per cui vige il rapporto enzima/tessuto 1/100. L'ultima aliquota di enzima viene associata a 5% v/v di *buffer* identico a quello di digestione, ma con L-Cys 100mM. La digestione avviene a $+60^\circ\text{C}$ sotto agitazione continua[43].

3.2.3 Protocolli di delipidizzazione

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

La metodica di delipidizzazione prevede un primo *step* in cui il tessuto biologico viene immerso in soluzioni a concentrazioni crescenti di etanolo (EtOH), seguite da soluzioni di cloroformio/metanolo in diversi rapporti. L'EtOH richiama l'acqua dalla cellula disidratandola e i solventi organici ne solubilizzano i lipidi di membrana. Un secondo *step* assicura la reidratazione del tessuto, attraverso il passaggio in soluzioni a concentrazioni decrescenti di EtOH ed infine in acqua *overnight*[43].

3.2.4 Cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC)

Il metodo principale di analisi utilizzato per questo studio è l'HPLC ovvero High-Performance Liquid Chromatography. È un metodo cromatografico sfruttato per le sue potenzialità nell'analisi quantitativa. Si tratta di cromatografia liquida a fase inversa e ad alta pressione. Vengono utilizzati differenti eluenti in fase liquida per implementare un metodo basato su un gradiente; viene utilizzata una colonna con elementi di caratteristiche principali apolari ovvero lunghe catene polimeriche di carbonio. L'effetto principale della fase stazionaria è quello di trattenere gli elementi apolari della miscela facendo eluire prima gli elementi polari poi quelli più. La colonna cromatografica è l'elemento principale del sistema HPLC che di solito è costituita da un tubo di acciaio al cui interno è presente un materiale poroso costituito di particelle di grandezza tra 0,2 e 0,5 μm . Gli altri elementi del sistema sono la pompa, o le pompe, che gestiscono il flusso dei possibili diversi eluenti verso la colonna, questo sistema ha bisogno di flusso costante e controllato, essendo la colonna molto sensibile è necessario evitare sbalzi di flusso importanti. Per evitare il blocco delle pompe a causa di aria presente negli eluenti questi vengono degassati. Gli ultimi due elementi del sistema sono un iniettore o autocampionatore che è in grado di iniettare piccole quantità di composto all'interno della colonna, che nel nostro caso non è utilizzato in quanto le quantità di composto che noi facciamo eluire è troppo elevata, e il detector, strumento essenziale per la rilevazione dei dati.

Essendo le interazioni principali sfruttate da questo sistema quelle più deboli tra le molecole (forze di Van der Waals e interazioni idrofobiche), esso è più robusto e preciso di altri sistemi separativi nei confronti di analiti dalle caratteristiche molto simili. L'ottimizzazione della cromatografia liquida avviene grazie alla dinamica variazione della composizione della fase liquida utilizzata per far eluire l'analita. Questo tipo di eluizione è denominata a gradiente e si differenzia da quella isocratica dove invece si usa

lo stesso eluente per tutta la corsa. Il gradiente si ottiene modificando nel tempo la percentuale dei diversi eluenti nella fase mobile. L'eluizione a gradiente risulta fondamentale per ottenere una migliore separazione dei differenti analiti e una conseguente migliore separazione dei picchi risultanti sul cromatogramma.

Un ulteriore accorgimento per i nostri studi è stato fatto studiando le peculiarità degli analiti da quantificare. I detergenti eluiscono meglio in ambiente acido ed è per questo motivo che le nostre fasi mobili contengono una bassa concentrazione di TFA (nello specifico per questo studio lo 0.05%). Il TFA agisce come coppia ionica, aumentando la ritenzione, favorendo la solubilità dei detergenti e riducendo le interazioni elettrostatiche di questi con gli eventuali residui silanolici presenti sulla fase stazionaria.

In questo studio la fase stazionaria consiste in una colonna con gel di silice funzionalizzata con catene idrocarburiche lineari di 18 atomi di carbonio (**Colonna Vydac 218TPC 18 250mmx4.6mm**). La fase mobile è una diversa concentrazione di due eluenti: A (**0.05% TFA in H₂O MilliQ**) e B (**0.05% TFA in acetonitrile**) opportunamente degassati con elio. Un campione di volume pari a 6 ml nell'analisi di DOC, TDOC e COL e di 9 ml nell'analisi del SDS precedentemente filtrato (filtri da 0.45 µm) e sonicato è stato introdotto, tramite aspirazione utilizzando una delle quattro vie solvente del cromatografo, in testa alla colonna con due lavaggi di volume pari al volume del campione introdotto ciascuno con eluente A. L'analisi prevede una prima fase di eluizione in modalità isocratica (100% eluente A per 50 minuti) che permette di allontanare la parte polare del digerito fino ad ottenere il ripristino della linea base ad un valore di assorbanza basso costante. La seconda fase consiste nell'applicazione di un gradiente di eluizione differente a seconda del detergente da analizzare:

- **DEOSSICOLATO DI SODIO**: dallo 0 all'80% di B in 40 minuti;
- **COLATO DI SODIO**: dallo 0 al 36% di B in 18 minuti e poi dal 36 al 66% di B in 30 minuti;
- **TAURODEOSSICOLATO DI SODIO**: dallo 0 al 36% di B in 18 minuti e poi dal 36 al 66% di B in 30 minuti;
- **SODIO DODECILSOLFATO**: dallo 0 al 40 % di B in 20 minuti e poi dal 40 al 70% di B in 30 minuti.

Ciascun gradiente è stato messo a punto utilizzando arricchimenti di digerito delipidizzato con ciascuno dei detergenti in esame in modo da ottenere l'eluizione dell'analita in una parte del cromatogramma "sgombra" dal contributo di altre componenti del digerito.

Sono stati utilizzati 2 differenti rilevatori:

- Waters 996 PDA Detector Optics impostato sulla lettura della lunghezza d'onda 200 nm dove assorbono i detergenti. Il cromatogramma ottenuto è analizzato dal software Empower fornito da Waters[38,39].
- Waters 2424 Evaporative Light Scattering Detector

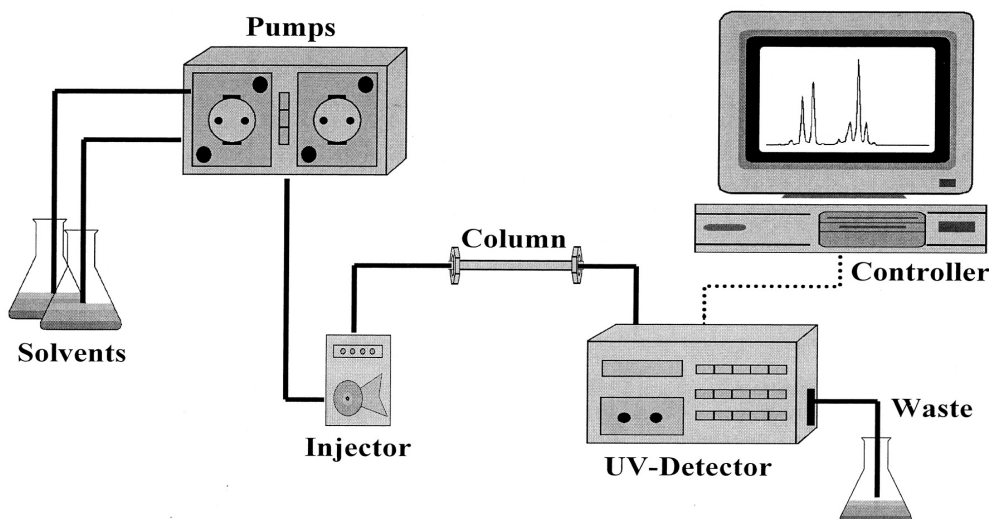


Figura 3.0.1: Schema di un tipico sistema HPLC

L'area sottesa dal picco corrispondente ad un determinato detergente nel cromatogramma è proporzionale alla quantità dello stesso. Sono state quindi ottenute le rette di taratura per i differenti detergenti analizzando diverse concentrazioni note di detergente all'interno di soluzioni di digerito delipidizzato non trattato. Una volta ottenuta la retta di taratura questa è stata utilizzata per quantificare il detergente residuo nei campioni trattati con i differenti metodi decellularizzanti.

3.2.5 Il Detector PDA e la spettroscopia di assorbimento UV/Vis

Il detector utilizzato nell'analisi di DOC, COL e TDOC è il Waters 996 PDA Detector Optics. Questo strumento determina l'assorbimento ad una certa lunghezza d'onda dell'eluato. La legge che regola questo fenomeno è detta legge di Lambert-Beer: il rapporto tra le intensità di luce incidente (I_0) ed assorbita (I_1) dal mezzo di spessore l è espresso da:

$$\frac{I_1}{I_0} = e^{-k_\lambda l} = T = e^{-A}$$

dove k_λ è detto coefficiente di assorbimento ed dipende dal mezzo su cui incide la luce e dalla lunghezza d'onda della luce stessa. T è la Trasmittanza mentre l'Assorbanza (A) è definita come l'opposto del logaritmo naturale della Trasmittanza.

È possibile rendere più precisa la notazione dell'assorbanza inserendo ϵ_{λ} detta estinzione molare e M concentrazione molare della soluzione:

$$A = \epsilon_{\lambda} l M$$

Il detector è costituito da vari elementi:

- una lampada al deuterio che fornisce una luce di lunghezza d'onda tra i 190 nm e gli 800 nm a spettro continuo, parte del flusso di questa luce viene riflessa con un *beam splitter* verso un diodo di riferimento che rivela variazioni di intensità; questo allo scopo di mantenere costante l'intensità emessa. La lampada al deuterio causa una deriva della linea base a causa dell'intensità emessa di circa $1-2 \cdot 10^{-3}$ ed un rumore di fondo di $2 \cdot 10^{-5}$ AU ($\pm 1 \cdot 10^{-5}$ AU) a 254 nm.
- La Flow Cell che contiene l'eluente da analizzare.
- Spettrografo e specchio che indirizzano la luce uscente dalla Flow Cell attraverso un'apertura che controlla la lunghezza d'onda passante e l'intensità.
- Il reticolo di diffrazione che separa la luce nelle diverse lunghezze d'onda ed la indirizza verso i fotodiodi.
- Un filtro di secondo ordine utilizzato per ridurre il contributo di riflessione degli UV.
- Un array di 512 fotodiodi a giunzione PIN, grazie al reticolo di diffrazione su ogni fotodiodo incide una certa lunghezza d'onda riuscendo così a garantire una precisione di 1,2 nm. La luce incidente provoca, grazie all'effetto fotoelettrico la generazione di una fotocorrente che viene rivelata e calcolata dal detector tenendo conto anche della dark current[42].

3.2.6 Il Detector ELS: rivelatore evaporativo a luce diffusa

Per l'analisi e la quantificazione di SDS nei campioni di lembo aortico decellularizzato con il protocollo denominato Haverich è stato utilizzato il 2424 Evaporative Light Scattering Detector. Il suo funzionamento si basa su un concetto differente rispetto al detector PDA.

Le particelle dell'analita entrano nella regione di rivelazione e su di esse incide una sorgente di luce. Questa viene quindi dispersa e focalizzata in un tubo fotomoltiplicatore (PMT) dove ne viene misurata l'intensità.

La dimensione (nello specifico il diametro) delle particelle di analita determina come la luce viene diffusa. Il rivelatore misura l'intensità della luce diffusa a 60° rispetto al fascio

di emissione per minimizzare gli effetti di polarizzazioni. Particelle di diverse dimensioni mostrano diverse distribuzioni angolari della luce diffusa. In generale, le particelle più grandi disperdono maggiormente la luce, producendo segnali più intensi. Il tubo fotomoltiplicatore (PMT) converte il segnale della luce diffusa a una tensione che può essere registrata ed analizzata. Più forte è la dispersione, più intenso è il segnale finale sul rilevamento cromatogramma ELS.

Per un nebulizzatore che produce goccioline di diametro medio D_0 , il corrispondente diametro medio di una particella d'analita secco è:

$$D = D_0 \sqrt[3]{c/p}$$

dove c è la concentrazione dell'analita e p è la densità della sostanza da analizzare.

Ogni picco di risposta del rivelatore ELS può essere causato da tre differenti fenomeni di diffusione della luce, dipendenti dalla dimensione delle particelle. In particolare il discriminante è il fattore D/λ :

- lo *scattering* di Rayleigh si verifica per le particelle più piccole ovvero dove $D/\lambda < 0.1$, la luce diffusa dalla suddetta particella è proporzionale a D^6 , e di conseguenza il segnale emesso è proporzionale a c^2 .
- lo *scattering* di Mie si verifica per le particelle in cui $0.1 < D/\lambda < 1.0$ la luce diffusa è proporzionale a D^4 , e il segnale emesso è proporzionale a $c^{4/3}$.
- lo *scattering* del tipo rifrazione-riflessione si verifica per le particelle in cui $D/\lambda > 1.0$ la luce diffusa è proporzionale a D^2 e il segnale è proporzionale a $c^{2/3}$.

Vista la forte dipendenza di questo rivelatore dalla grandezza delle particelle, la sua risposta non è da considerarsi lineare a concentrazioni proporzionali di analita. Il limite imposto dalla natura del *detector* costringe uno studio su concentrazioni molto vicine di analita o in alternativa la possibilità di cambiare il tipo di *fitting* dei dati[41].

3.2.7 Analisi di massa

Tutti i gradienti utilizzati nelle corse cromatografiche sono stati implementati grazie a studi precedenti [39,40]. Gli studi utilizzavano il supporto delle analisi di massa. Alcune corse di prova del detergente sono state fatte in acqua per valutarne il tempo di ritenzione. Successivamente sono state fatte corse del detergente in delipidizzato raccogliendo ogni picco rilevato dal detector in provette separate. Il contenuto delle provette è poi stato liofilizzato ed analizzato allo spettrometro di massa per identificare

in quale dei picchi osservati fosse presente il detergente. In questo modo è stato possibile osservare gli eventuali complessi che il detergente poteva formare al fine di essere sicuri di integrare i picchi corretti ed ottenere rette di taratura precise.

CAPITOLO 4

Risultati e Conclusioni

4.1 Cromatogrammi

Di seguito è riportato il grafico ottenuto dalla prima parte del metodo. Questa prevede un condizionamento della colonna cromatografia al 100% di eluente A a flusso 1 ml/min per almeno 10 minuti. Successivamente si esegue l'aspirazione dei 6 ml di campione manualmente e si può vedere come il cromatogramma presenti una forte perturbazione causata dal materiale aspirato. Finita l'aspirazione si compie un'isocratica di 50 minuti al 100% A con flusso 1 ml/min al fine di eluire tutta la parte idrofilica del campione non di interesse ai fini dell'analisi e riportare la linea base al valore precedente. Il secondo grafico mostra la sola discesa della linea base in quanto è il grafico della sola isocratica di 50 minuti.

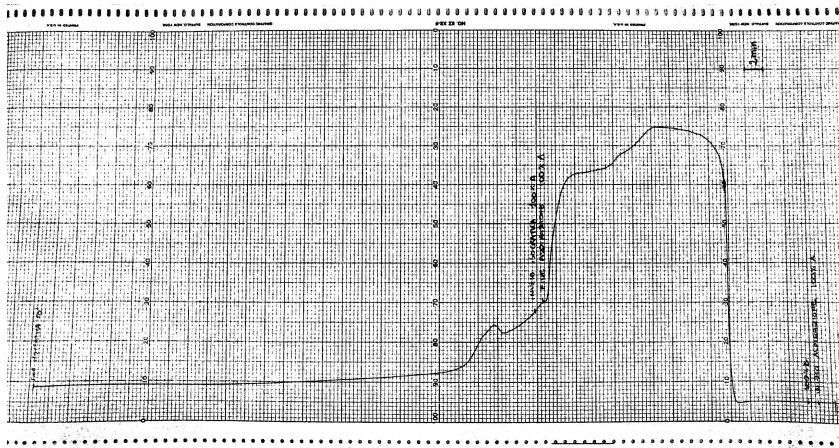


Figura 4.1: Analisi cromatografica RP-HPLC aspirazione del campione ed isocratica con condizioni: colonna: Vydac C18 218TP 5 μ Polymeric; flusso 1 ml/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; isocratica 100% eluente A per 50 minuti; lettura dell'assorbanza a 200nm; velocità della carta: 0.5 cm/min.

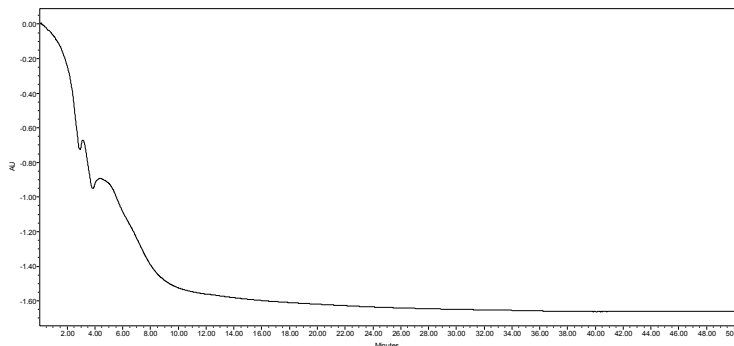


Figura 4.2: Analisi cromatografica RP-HPLC isocratica con condizioni: colonna: Vydac C18 218TP 5 μ Polymeric; flusso 1 ml/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; isocratica 100% eluente A per 50 minuti; lettura dell'assorbanza a 200nm.

Di seguito saranno invece riportati i cromatogrammi delle corse utilizzate per le varie rette di taratura. Come sarà possibile vedere dalle figure i picchi saranno per ogni corsa via via più piccoli, garantendo la presenza a quel tempo di ritenzione del detergente e assicurando l'andamento lineare della concentrazione nel campione delipidizzato.

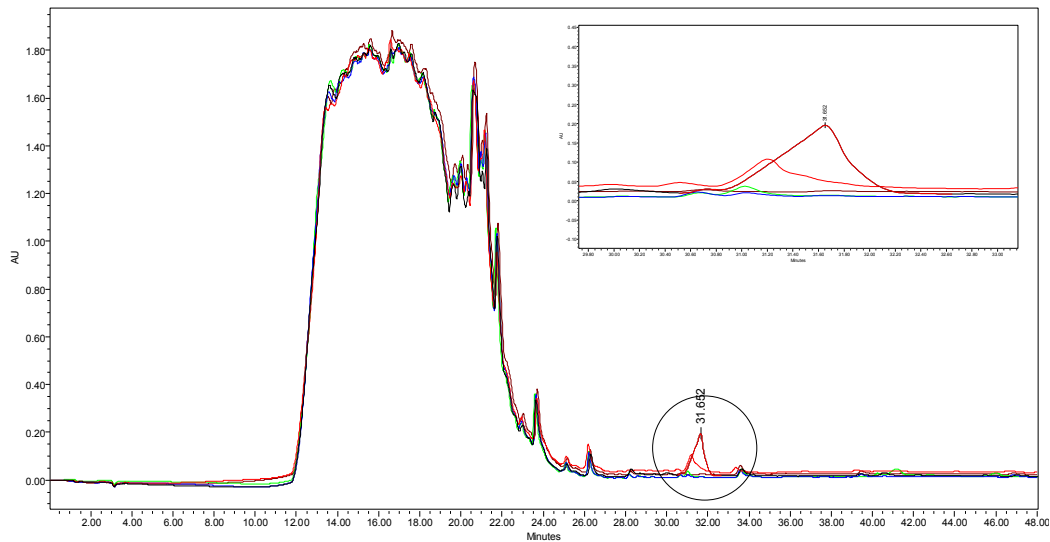


Figura 4.3: 5 Analisi cromatografiche RP-HPLC di delipidizzato di lembo aortico digerito con aggiunta di diverse concentrazioni di COL con le condizioni : colonna: Vydac C18 218TP 5 μ Polymeric; flusso 1 ml/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente: prima da 0% di eluente B a 36% di eluente B in 36 minuti poi da 36% di eluente B a 66% di eluente B in 30 minuti; lettura dell'assorbanza a 200nm.

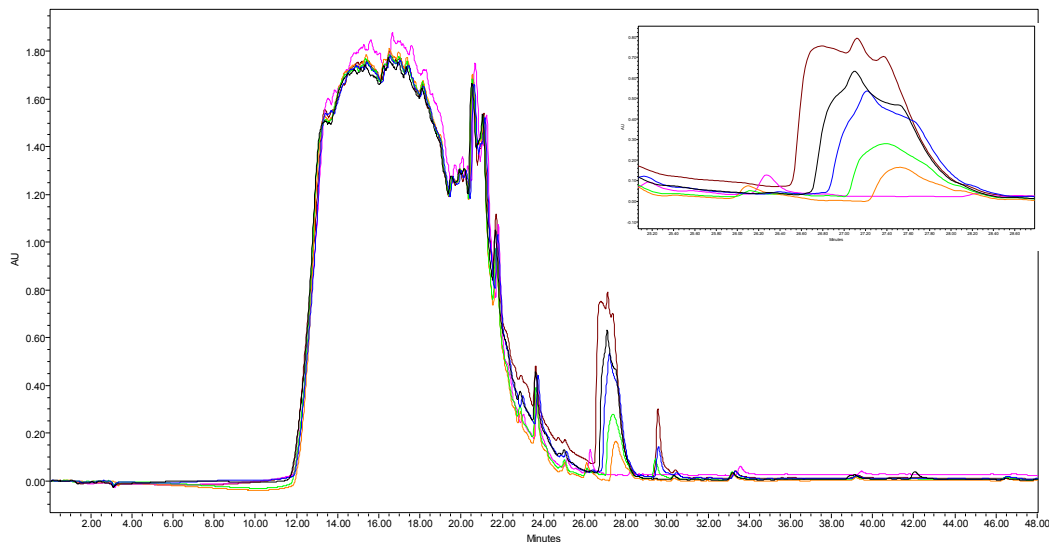


Figura 4.4: 5 Analisi cromatografiche RP-HPLC di delipidizzato di lembo aortico digerito con aggiunta di diverse concentrazioni di TDOC con le condizioni : colonna: Vydac C18 218TP 5 μ Polymeric; flusso 1 ml/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente: prima da 0% di eluente B a 36% di eluente B in 36 minuti poi da 36% di eluente B a 66% di eluente B in 30 minuti; lettura dell'assorbanza a 200nm.

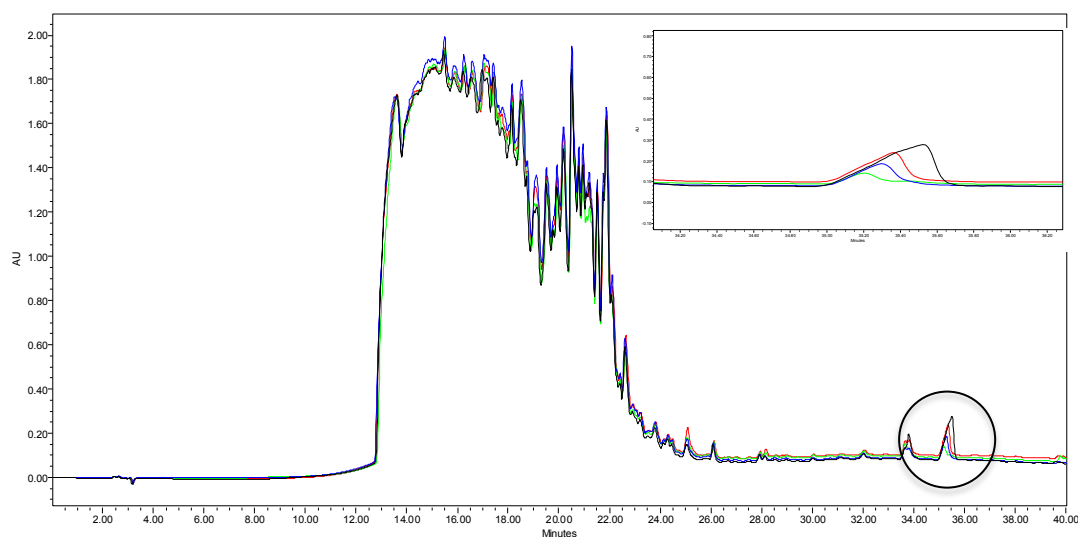


Figura 4.5: 4 Analisi cromatografiche RP-HPLC di delipidizzato di lembo aortico digerito con aggiunta di diverse concentrazioni di DOC con le condizioni : colonna: Vydac C18 218TP 5 μ Polymeric; flusso 1 ml/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente: da 0% di eluente B a 80% di eluente B in 40 minuti; lettura dell'assorbanza a 200nm.

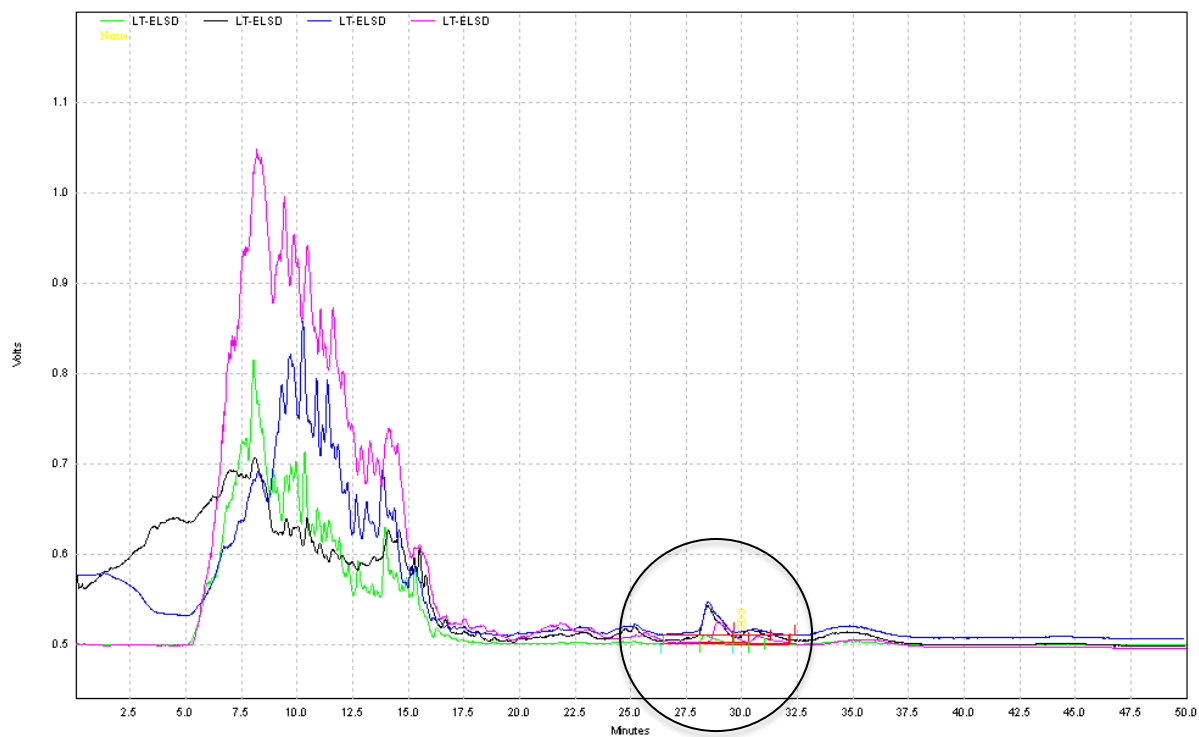


Figura 4.6: 4 Analisi cromatografiche RP-HPLC di delipidizzato di lembo aortico digerito con aggiunta di diverse concentrazioni di SDS con le condizioni : colonna: Vydac C18 218TP 5 μ Polymeric; flusso 1 ml/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente: prima da 0% di eluente B a 40% di eluente B in 20 minuti poi dl 40% di eluente B a 70% di eluente B in 30 minuti; lettura mediante detector ELS. A destra in alto ingrandimento del particolare del cromatogramma cerchiato

Di seguito invece i cromatogrammi delle corse dei campioni.

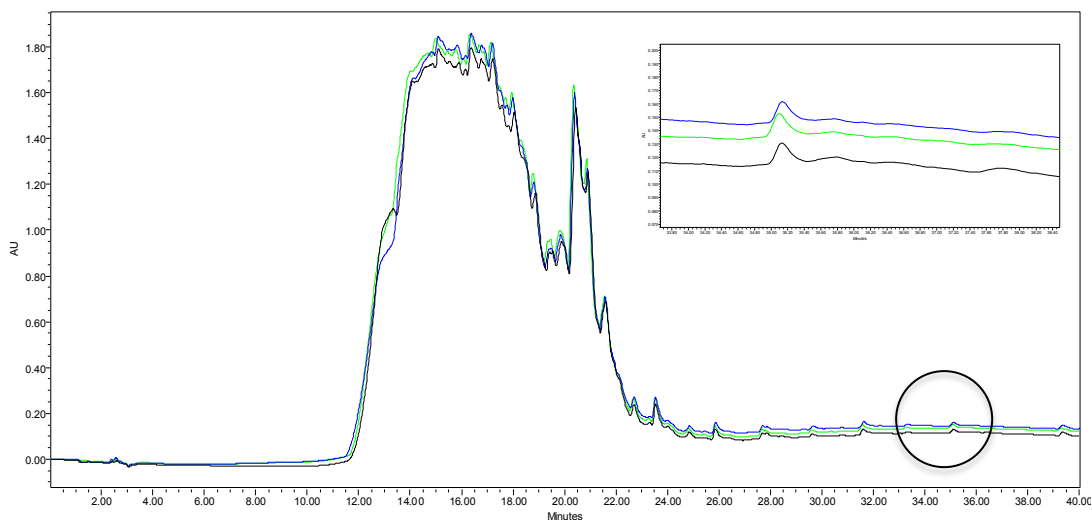


Figura 4.7: 3 Analisi cromatografiche RP-HPLC di campioni trattati con metodo Dohmen filtrati e sonicati con le condizioni : colonna: Vydac C18 218TP 5 μ Polymeric; flusso 1 ml/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente: prima da 0% di eluente B a 80% di eluente B in 40 minuti; lettura dell'assorbanza a 200nm. In alto a destra ingrandimento del particolare cerchiato: picco corrispondente al detergente.

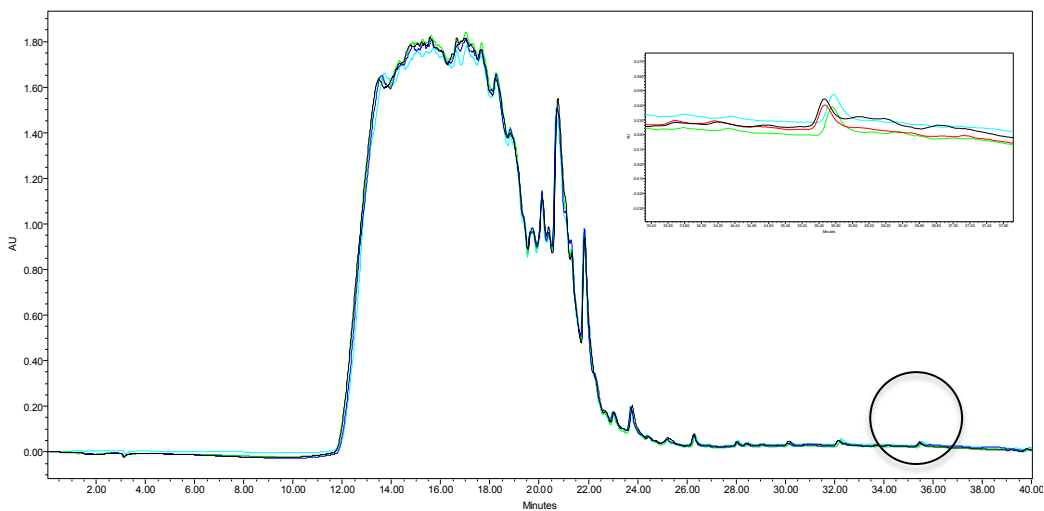


Figura 4.8: 3 Analisi cromatografiche RP-HPLC di campioni trattati con metodo Haverich filtrati e sonicati con le condizioni: colonna: Vydac C18 218TP 5 μ Polymeric; flusso 1 ml/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente: prima da 0% di eluente B a 80% di eluente B in 40 minuti; lettura dell'assorbanza a 200nm. In alto a destra ingrandimento del particolare cerchiato: picco corrispondente al detergente.

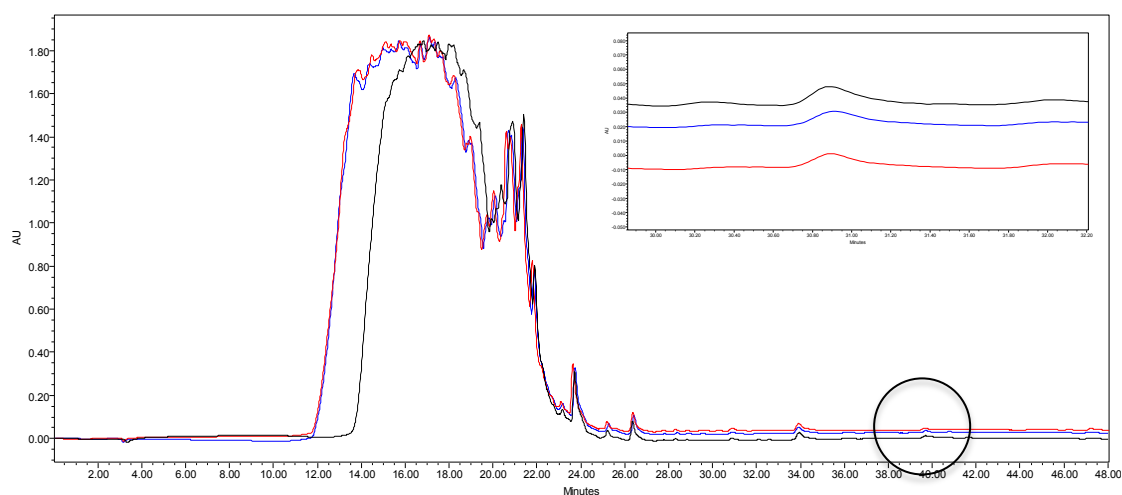


Figura 4.9: 3 Analisi cromatografiche RP-HPLC di campioni trattati con metodo TRICOL filtrati e sonicati con le condizioni: colonna: Vydac C18 218TP 5 μ Polymeric; flusso 1 ml/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente: prima da 0% di eluente B a 36% di eluente B in 36 minuti poi da 36% di eluente B a 66% di eluente B in 30 minuti; lettura dell'assorbanza a 200nm. In alto a destra ingrandimento del particolare cerchiato: picco corrispondente al detergente.

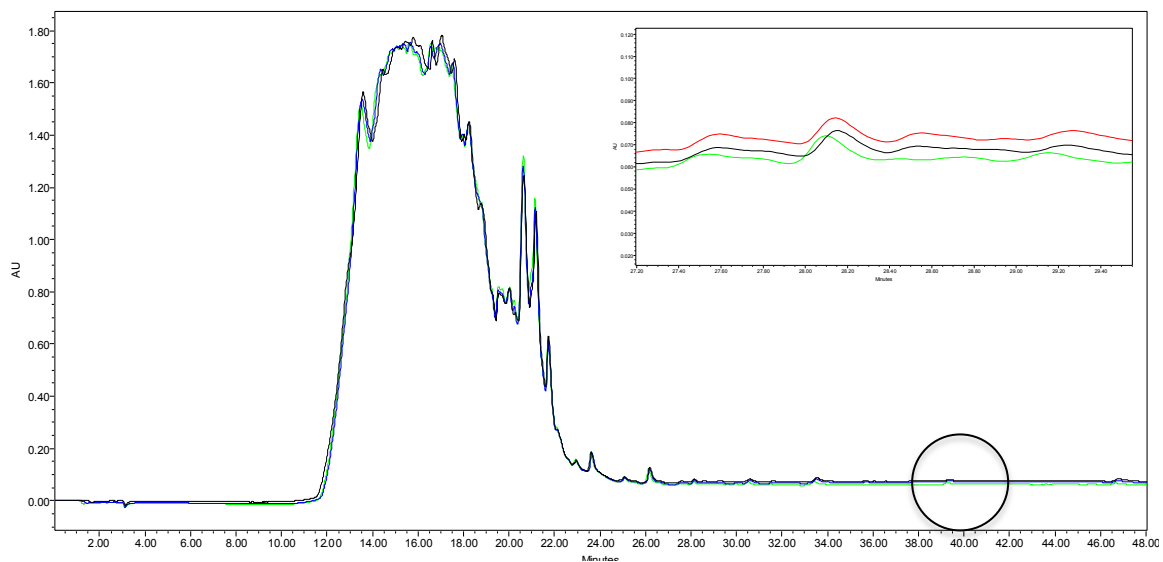


Figura 4.10: 3 Analisi cromatografiche RP-HPLC di campioni trattati con metodo TRITDOC filtrati e sonicati con le condizioni: colonna: Vydac C18 218TP 5 μ Polymeric; flusso 1 ml/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente: prima da 0% di eluente B a 36% di eluente B in 36 minuti poi da 36% di eluente B a 66% di eluente B in 30 minuti; lettura dell'assorbanza a 200nm. In alto a destra ingrandimento del particolare cerchiato: picco corrispondente al detergente.



Figura 4.11: 3 Analisi cromatografiche RP-HPLC di campioni trattati con metodo Haverich filtrati e sonicati con le condizioni: colonna: Vydac C18 218TP 5 μ Polymeric; flusso 1 ml/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente: prima da 0% di eluente B a 40% di eluente B in 20 minuti poi da 40% di eluente B a 70% di eluente B in 30 minuti; lettura con detector ELS. In alto a destra ingrandimento del particolare cerchiato: picco corrispondente al detergente.

4.2 Rette di taratura

Da ciascuna serie di cromatogrammi riportati rispettivamente alle figure 4.3, 4.3, 4.5, 4.6 sono state ottenute le aree dei picchi corrispondenti ai detergenti.

Queste aree graficate contro la quantità (in mg o in μ g nel solo caso del SDS) di detergente con la quale si erano arricchiti il campione digerito delipidizzato hanno fornito, mediante il metodo dei minimi quadrati le rette di taratura di seguito riportate.

Viene inoltre riportata l'equazione della retta ed il coefficiente di determinazione R^2 che denota la precisione nell'interpolazione dei dati.

4.2.1 Colato di Sodio

In seguito è invece riportato il grafico della retta di taratura ottenuta interpolando i dati delle aree dei picchi calcolate mediante il software Empowers collegato al sistema cromatografico per il detergente: colato di sodio.

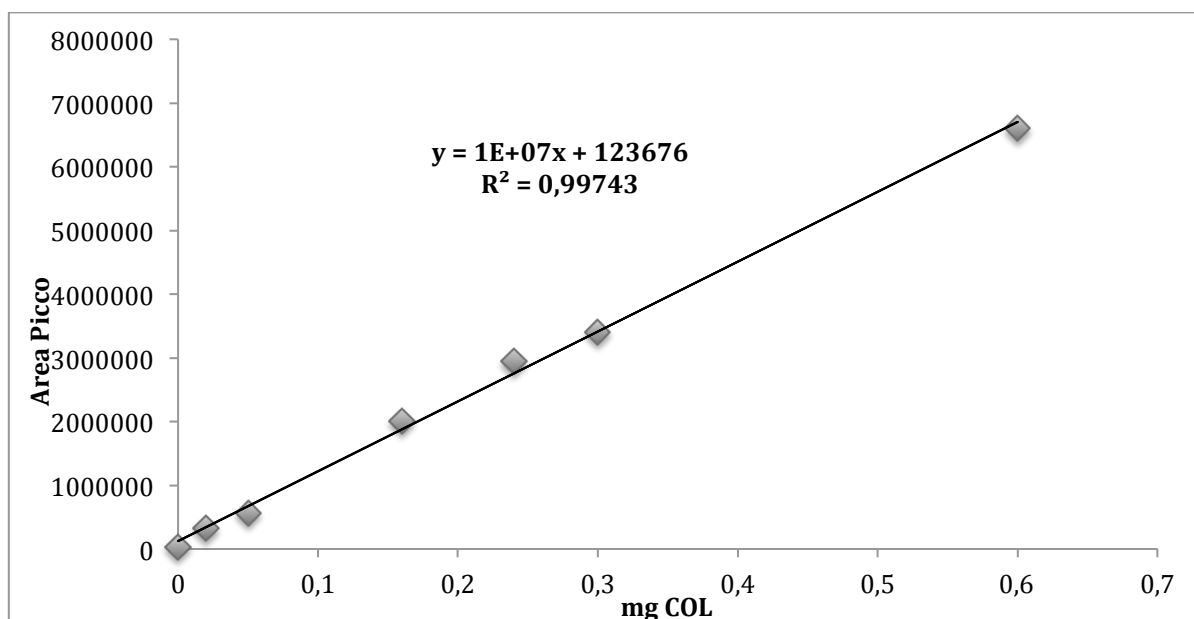


Figura 4.12: Grafico della retta di taratura del COL

Tabella 4.1: Area dei picchi COL

COL mg in 6 ml	Area picco
0	35557
0,02	318038
0,05	566416
0,16	2008163
0,24	2946444
0,3	3411636
0,6	6602636

Si è ottenuta la retta $y=10^7x + 13676$ con un $R^2=0,99743$ utilizzando un campione di peso 235,91 mg e con il gradiente indicato in materiali e metodi. Come si può notare dai punti sul grafico essendo la retta inizialmente tarata con punti a concentrazione elevata essa dava risultati poco soddisfacenti per concentrazioni basse. Sono quindi stati aggiunti 2 punti a concentrazione bassa per migliorare l'interpolazione.

4.2.2 Taurodeossicolato

Nella figura 4.4 si possono vedere le corse cromatografiche fatte per ottenere i punti della retta di taratura del TDOC. A differenza degli altri detergenti il TDOC presenta picchi di assorbanza molto elevati anche a concentrazioni ridotte (ricordando che tutte le corse sono fatte selezionando come lunghezza d'onda predefinita 200nm), questo ha permesso di fare punti a concentrazioni basse ovviando al problema che si era presentato nella retta del COL.

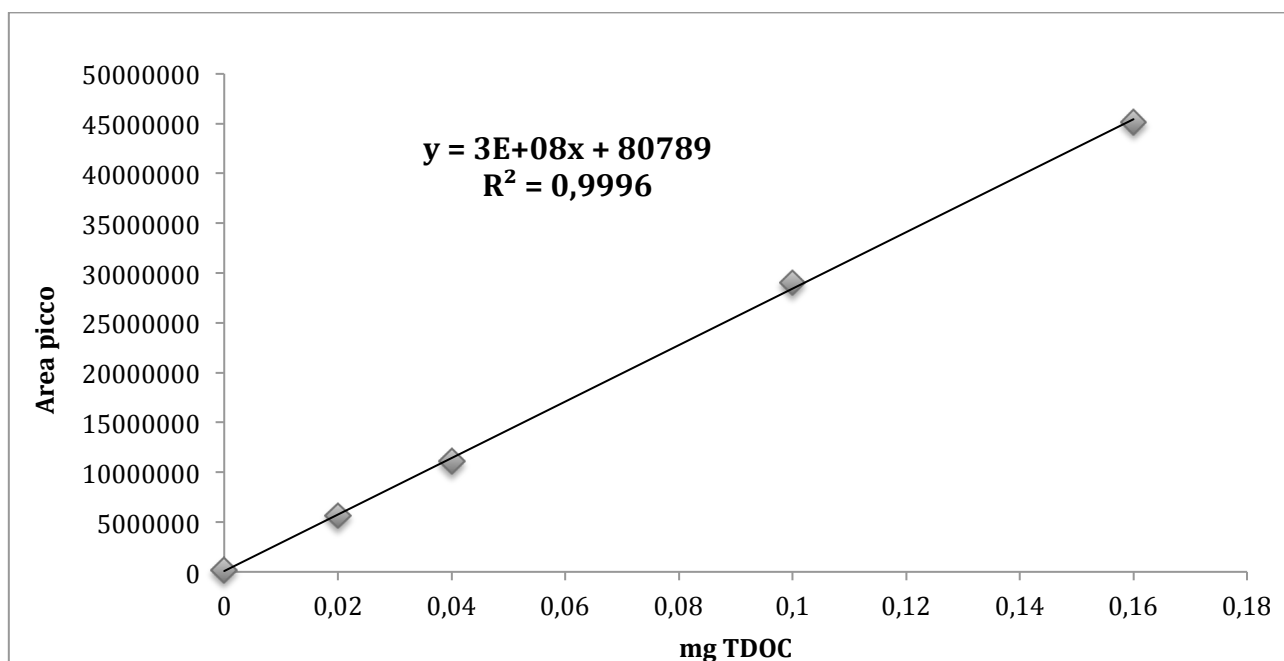


Figura 4.13: Grafico della retta di taratura del TDOC

Tabella 4.2: Area dei picchi TDOC

TDOC mg in 6ml	Area picco
0	187978
0,02	5647484
0,04	11096691
0,1	29018398
0,16	45151098

I picchi d'interesse sono quelli riportati nell'ingrandimento di figura 4.4 che corrispondono ai picchi rilevati a 28 minuti subito dopo l'uscita della banda iniziale. I picchi a destra di questi sembravano essere proporzionali e quindi contenuti TDOC, tuttavia non essendo presente nel primo punto della retta e nemmeno nelle rette fatte in altri tessuti (usando sempre il medesimo gradiente) ho concluso si trattasse di un'impurezza che ha contaminato la soluzione contenente TDOC. Non interferendo nell'analisi del picco principale si è proceduto comunque alla formulazione della retta. È stato sopra riportato il grafico ottenuto dall'interpolazione dei punti corrispondenti alle aree dei picchi di assorbanza del detergente nella varie concentrazioni. Si è ottenuta la retta $y = 3 \cdot 10^8 x + 80789$ con un $R^2=0,9996$. Si sono utilizzati campioni di peso 235,91 mg. Anche in questo caso il valore prossimo ad 1 di R^2 conferma che esiste un'ottima proporzionalità tra l'area del picco e la concentrazione di analita.

4.2.3 Deossicolato di Sodio

La seguente retta di taratura riguarda invece le concentrazioni di sodio deossicolato in lembo aortico. Per formularla sono stati utilizzati i dati dell'area del picco dell'analita riportati in tabella 4.3 e ricavati dai cromatogrammi in fig. 4.5.

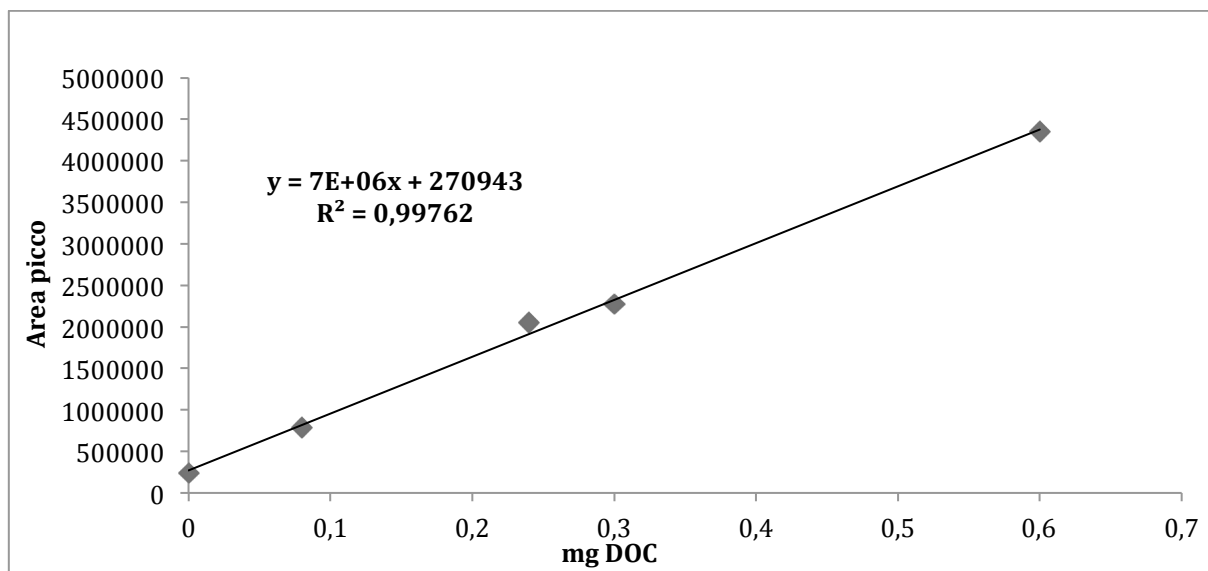


Figura 4.14: Grafico della retta di taratura di DOC

Tabella 4.3: Area picchi DOC

DOC mg in 6ml	Area picco
0	239113
0,08	786791
0,24	2051604
0,3	2276271
0,6	4349425

Si è ottenuta la retta $y = 7 \cdot 10^6 x + 270943$ con un $R^2 = 0,99762$ utilizzando un campione di peso 187,00 mg e con il gradiente indicato in materiali e metodi.

4.2.4 Sodio Docecilsolfato

La procedura con la quale si è analizzato il SDS si scosta leggermente da quelle utilizzate per gli altri detergenti. Ad ogni modo il principio d'interpolazione della retta di taratura è il medesimo.

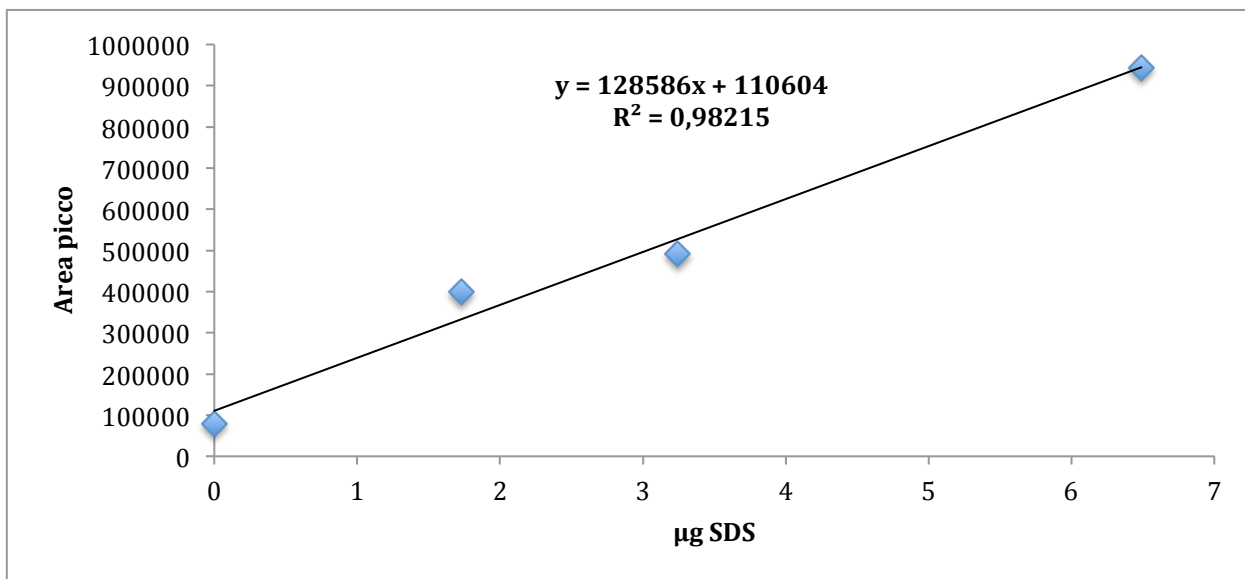


Figura 4.15: Grafico della retta di taratura di SDS

Tabella 4.4: Area picchi SDS

SDS µg in 9 ml	Area picco
0	79116
1,73028	400574
3,244275	491780
6,48855	944944

Si è ottenuta la retta $y = 128586x + 110604$ con un $R^2 = 0,98215$ utilizzando un campione di peso 195,00 mg e con il gradiente indicato in Materiali e Metodi.

4.3 Determinazione delle quantità

Le quantità di detergente all'interno dei campioni analizzati è stato ricavato inserendo al posto della variabile y il dato relativo all'area dell'analita e ricavando l'incognita x . Essendo stati usati lembi di pesi differenti per la retta di taratura e per i campioni è stato necessario in primo luogo modificare la retta. L'intercetta delle nostre rette corrisponde al valore di picco del cromatogramma bianco ovvero senza detergente. Essendo i valori dei picchi proporzionali alla quantità analizzata, da pesi diversi del medesimo campione risulterebbero cromatogrammi differenti. Per questo motivo con una proporzione otteniamo il nuovo valore dell'intercetta pesando così la retta sulla massa dei campioni analizzati. Ciò che rimane immutato è chiaramente la derivata della retta che resta costante. In tabella 4.5 sono mostrati i valori di peso dei campioni e delle nuove intercette.

Tabella 4.5: Nuove intercette delle rette di taratura

Metodo (Detergente)	Peso delipidizzato retta (mg)	Intercetta originale	Peso Campione (mg)	Intercetta nuova
Dohmen (DOC)	187,00	270943,00	193,00	279636,40
Haverich (DOC)	187,00	270943,00	173,85	251890,00
Haverich (SDS)	195,00	110604,00	173,85	98607,72
TRICOL (COL)	235,91	123376,00	213,22	111509,60
TRITDOC (TDOC)	235,91	80789,00	177,46	60772,39

Saranno ora invece riportati i risultati ottenuti dall'estrapolazione, dapprima il valore di peso di detergente in mg per 6ml di soluzione, poi per 100ml di soluzione e infine verrà riportato il valore di detergente normalizzato al valore del peso del campione.

Area Picco	mg in 6mL	mg in 100mL	mg det/mg campione
164645	0,00531354	0,088559	4,15341e-04
161732	0,00502224	0,083704	3,92571e-04
157251	0,00457414	0,076235	3,57545e-04

Tabella 4.6: Risultati dell'analisi quantitative di residui di COL nei campioni delipidizzati con metodo TRICOL

Area Picco	mg in 6mL	mg in 100mL	mg det/mg campione
354585	0,000979375	0,016322922	9,19809e-05
361767	0,001003315	0,016721922	9,42292e-05
366693	0,001019735	0,016995589	9,57714e-05

Tabella 4.7: Risultati dell'analisi quantitative di residui di TDOC nei campioni delipidizzati con metodo TRITDOC

Area Picco	mg in 6mL	mg in 100mL	mg det/mg campione
368216	0,012654229	0,21090381	1,092766e-03
376160	0,013789086	0,22981809	1,190767e-03
369205	0,012795514	0,21325857	1,104967e-03

Tabella 4.8: Risultati dell'analisi quantitative di residui di DOC nei campioni delipidizzati con metodo Dohmen

Area Picco	mg in 6mL	mg in 100mL	mg det/mg campione
314417	0,008932429	0,14887381	8,56335e-04
329557	0,011095286	0,18492142	10,6368e-04
312398	0,008644765	0,14406667	8,28684e-04

Tabella 4.9: Risultati dell'analisi quantitative di residui di DOC nei campioni delipidizzati con metodo Haverich

Area Picco	µg in 9mL	µg in 100mL	µg det/µg campione
203910	0,818924922	9,099165798	5,23392e-05
180822	0,639371938	7,104132643	4,08636e-05
164221	0,510267681	5,669640897	3,26123e-05

Tabella 4.10: Risultati dell'analisi quantitative di residui di SDS nei campioni delipidizzati con metodo Haverich

Il calcolo delle medie e delle deviazioni standard fornisce i seguenti risultati

Tabella 4.11: Risultati forniti dal metodo della regressione lineare con rispettive deviazioni standard

Metodo (Detergente)	Media (μg detergente/mg campione umido)	Media (μmol detergente/mg campione umido)	Deviazione standard (μg detergente/mg campione umido)
Dohmen (DOC)	1,1295437	0,002737909	0,053408
Haverich (DOC)	0,9162348	0,002209625	0,128441
Haverich (SDS)	0,0419383	0,000145641	0,009907
TRICOL (COL)	0,3884865	0,000901173	0,029114
TRITDOC (TDOC)	0,0939938	0,000180184	0,001906

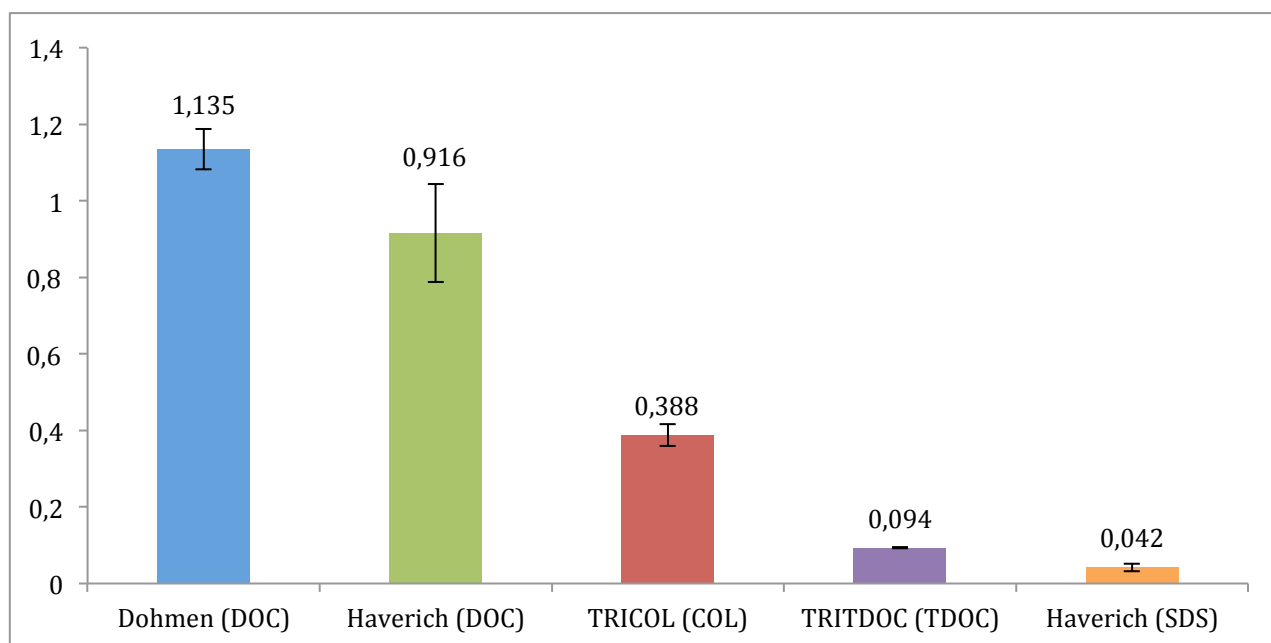


Figura 4.16: Valori di μg detergente/mg campione umido

Esprimendo i risultati nel rapporto (mg detergente/mg campione secco)% si ottiene

Tabella 4.12: Risultati dei quantitativi di detersivi residui espressi in % del rapporto mg detergente/mg campione secco

Metodo (Detergente)	% detergente rispetto al campione secco	Deviazione standard sul valore percentuale
Dohmen (DOC)	1,13	0,053
Haverich (DOC)	0,916	0,12
Haverich (SDS)	0,0419	0,009
TRICOL (COL)	0,388	0,029
TRITDOC (TDOC)	0,0939	0,0019

4.4 Discussione

I dati riportati in fig. 4.16 dimostrano che le quantità di detergente residuo per quantità di campione umido sono diverse al variare del metodo di decellularizzazione.

Essendo i campioni di lembi aortici molto differenti è stato necessario esprimere le quantità di detergenti in rapporto al peso del campione, ottenendo così dei valori confrontabili.

La possibilità di analizzare in maniera diretta le quantità di detergenti residue mostra come i detergenti non vengano completamente rimossi dalle matrici come ipotizzato da studi precedentemente pubblicati[32,34,35]. La quantificazione dei detergenti nei lavaggi inseriti nei metodi di decellularizzazione non sono uno strumento preciso per verificare la presenza o meno di quantità di detergenti che possono essere dannose. Lo sviluppo del metodo ci ha permesso, di verificare la presenza potenzialmente dannosa, di sostanze citotossiche nelle strutture della matrice extracellulare. Anche se le quantità rilevate dal nostro metodo sono una minima parte del detergente utilizzato nei metodi di decellularizzazione la loro presenza è dimostrata dal metodo cromatografico e dalle analisi di massa.

Per quanto riguarda i detergenti residui il metodo Dohmen risultata il peggiore tra i quattro metodi analizzati, la quantità di DOC che esso lascia nei tessuti risulta di circa una parte su mille del campione totale. La presenza di un così elevato quantitativo del detergente ionico è dannoso sia per il rischio di calcificazione sia per quanto riguarda l'inibizione del processo di ripopolazione della valvola[18,21].

Il metodo Haverich risulta leggermente migliore per quanto concerne i residui di DOC, ma elimina con i lavaggi gran parte dell'altro detergente ionico utilizzato ovvero il SDS; la presenza simultanea dei due garantisce un effetto di mutua eliminazione che tuttavia, in generale, non raggiunge livelli soddisfacenti di quantità residue rispetto al campione totale.

Il metodo TRICOL raggiunge risultati migliori rispetto ai precedenti due metodi. Ciò può essere dovuto a diversi fattori. La presenza di due detergenti (Triton X-100 e COL) garantisce gli stessi effetti ottenuti da Haverich, anche se la quantità di detergente utilizzata in proporzione è maggiore. La presenza di un detergente non ionico, più facilmente lavabile, implica non solo l'utilizzo di minori quantità di COL con conseguente diminuzione di quantità residue, ma anche una maggior preservazione della matrice extracellulare, maggiormente intaccata da detergenti ionici.

Il metodo TRITDOC possiede le stesse caratteristiche positive del metodo precedentemente descritto tuttavia raggiunge quantità residue assolute rispetto al campione più basse tra i quattro metodi analizzati, risultanti maggiori solo rispetto ai residui di SDS. Rispetto Dohmen questo metodo raggiunge più di un ordine di grandezza di margine di miglioramento.

Il valore di residuo di SDS non è da considerarsi del tutto affidabile, in quanto durante le analisi un problema al detector ci ha costretto ad utilizzarne un altro, dello stesso modello e della stessa marca. I dati attendono quindi di essere confermati.

È necessario verificare che i risultati siano coerenti verificando un campione con il secondo detector.

È necessario inoltre puntualizzare che lo studio riportato analizza, come quelli precedenti, solo i detergenti liberi in soluzione e non quelli eventualmente legati a frammenti proteici.

In conclusione possiamo notare che le quantità residue di DOC all'interno dei lembi aortici decellularizzati mediante protocolli Dohmen e Haverich sono intorno all'1%, quantità che è stata dimostrata essere tossica. Questi due metodi di decellularizzazione molto diffusi quindi non sono affidabili dal punto di vista dell'eliminazione dei detergenti utilizzati nei protocolli. Al contrario le quantità residue di COL e TDOC all'interno delle valvole decellularizzate con metodi TRICOL e TRITDOC risultano essere in quantità non tossiche.

Tabella4.12: Riassunto dei metodi di decellularizzazione

CAMPIONE	Concentrazione detergente	Tempo	N° Lavaggi	Tempo lavaggi
Dohmen	1% DOC w/v	24 ore	10	12 ore ciascuno
Haverich	0.5% DOC w/v 0.5% SDS w/v	24 ore	10	12 ore ciascuno
TRICOL	1% Triton X-100 w/v 0.43% COL w/v	33.5 ore 16 ore	2	11.5 ore 24 ore ciascuno
TRITDOC	1% Triton X-100 w/v 0.21% TDOC w/v	33.5 16 ore	2	11.5 ore 24 ore ciascuno

CONCLUSIONE

I recenti studi mostrano la necessità di migliorare i sostituti valvolari biologici i quali, anche se migliori di ogni altro possibile sostituto, mostrano ancora parecchi punti deboli. Le cause di *failure* delle bioprotesi sono molteplici: la calcificazione, la degenerazione e il mancato ripopolamento. È necessario approfondire tutti questi aspetti al fine di creare una valvola che sia sempre più simile a quella ideale.

Questo studio si inserisce all'interno di uno più ampio che è volto a determinare e sviluppare metodi di decellularizzazione sempre più efficienti. Lo scopo di questi è di allungare la durata della valvola così come evitare rigetti, infiammazioni o altre complicazioni. La quantificazione di detergenti residui nella matrice delle valvole sostitutive non deve limitarsi semplicemente a determinare il protocollo di decellularizzazione migliore, bensì deve portare allo sviluppo di strumenti che permettano, dopo il trattamento e l'impianto della valvola, di verificare la stabilità della stessa, l'efficacia e la longevità.

Lo studio qui proposto inoltre non è che una piccola parte nello studio dei detergenti residui all'interno della matrice di valvole biologiche decellularizzate, altri progetti sono volti a determinare quantità residue di detergenti non ionici come il Triton X-100, altri hanno lo scopo di mettere a confronto l'efficacia dei metodi qui analizzati su tessuti differenti quali lembi polmonari, pareti polmonari e aortiche porcine e bovine.

BIBLIOGRAFIA

- [1] *Trattato di anatomia umana*. 281-306. Milano: Edi. Ermes s.r.l., 1975.
- [2] C. M. Otto: *Valvular Aortic Stenosis, Disease Severity and Timing of Intervention*. JACC 2006; 47:2141-51.
- [3] E. Yetkin, J. Waltenberger: *Molecular and cellular mechanisms of aortic stenosis*. International Journal of Cardiology. 2009; 135:4-13.
- [4] M. Mirzaie, T. Meyer, B. Schorn, P. Schwartz, M. Baryalei, A. Rastan, S. Lotfi, H. Dalichau: *Calcification tendency of various biological aortic valves in an experimental animal model*. Cardiovascular Surgery. 1999; 7:735-41.
- [5] J. Butany, C. Fayet, M. S. Ahluwalia, P. Blit, C. Ahn, C. Munroe, N. Israel, R. J. Custimano, R. L. Leask. *Biological replacement heart valve Identification and evaluation*. Cardiovascular Pathology. 2003; 12:119-39.
- [6] T. David, C. H. Hsu: *The integrated design of mechanical bi-leaflet prosthetic heart valves*. Med. Eng. Phys. 1996; 18:152-462.
- [7] Y. A. Chandana, P. Ratnatunga: *Prosthetic heart valves*. Surgery 26:12. Published by Elsevier. 2008.
- [8] J. Butanya, M. S. Ahluwaliaa, C. Munroea, C. Fayeta, C. Ahna, P. Blita, C. Keprona, R. J. Cusimanob, R. L. Leask: *Mechanical heart valve prostheses: identification and evaluation*. Cardiovascular Pathology. 2003; 12:322-44.
- [9] S. H. Rahimtoola: *Choice of Prosthetic Heart Valve in Adults*. Journal of the American College of Cardiology. 2010; 2413-26.
- [10] P. Stassano, L. Di Tommaso, M. Monaco, F. Iorio, P. Pepino, N. Spampinato, C. Vosa: *Aortic Valve Replacement*. Journal of the American College of Cardiology. 2009; 1862-8.
- [11] P. Stelzer: *The Ross Procedure: State of Art 2011*. Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery. 2011; 23:115-23.
- [12] R. A. DeWall, N. Qasim, L. Carr: *Evolution of mechanical heart valves*. Ann Thorac Surg. 2000; 69:1612-21.
- [13] R. P. Akhtar, A. R. Abid, H. Zafar, J. S. Khan: *Aniticoagulation in Patients Following Prosthetic Heart Valve Replacement*. Ann Thorac Cardiovasc Surg. 2009; 15:10-17.
- [14] I. Singh, M. Tuzcu, M. Shishehbor, S. Kapadia: *Percutaneous treatment of aortic valve stenosis*. Cleveland Clinical Journal of Medicine. 2008; 75:805-12.
- [15] J. G. Webb: *Percutaneous Aortic Valve Replacement Will Become a Common Treatment for Aortic Valve Disease*. JACC: Cardiovascular Inteventions. 2008; 1:122- 6.
- [16] M. Clavel, J. G. Webb, P. Pibarot, L. Altwegg, E. Dumont, C. Thompson, R. De

- Larochellière, D. Doyle, J. Masson, S. Bergeron, O. F. Bertrand, J. Rodés-Cabau: *Comparison of the Hemodynamic Performance of Percutaneous and Surgical Bioprostheses for the Treatment of Severe Aortic Stenosis*. Journal of the American College of Cardiology. 2009; 53:1883–91.
- [17] T. W. Gilberta, T. L. Sellaroa, S. F. Badylak: *Decellularization of tissues and organs*. Biomaterials. 2006; 27:3675–83.
- [18] B. Mendoza-Novelo, E. E. Avila, J. V. Cauich-Rodríguez, E. Jorge-Herrero, F. J. Rojo, G. V. Guinea, J. L. Mata-Mata: *Decellularization of pericardial tissue and its impact on tensile viscoelasticity and glycosaminoglycan content*. Acta Biomaterialia. 2011; 7:1241–48.
- [19] P. M. Dohmen, A. Lembcke, H. Hotz, D. Kivelitz, W. F. Konertz: *Ross Operation With a Tissue-Engineered Heart Valve*. Ann Thorac Surg. 2002; 74:1438–42.
- [20] H. Suh, J. Park: *Evaluation of calcification in porcine valves treated by ultraviolet ray and glutaraldehyde*. Material Science and Engineering. 2000; 13:65-73.
- [21] F. J. Schoen, R. J. Levy,: *Calcification of Tissue Heart Valve Substitutes: Progress Toward Understanding and Prevention*. Ann Thorac Surgery. 2005; 79: 1072-80.
- [22] E. A. Talman, D. R. Boughner: *Glutaraldehyde Fixation Alters the Internal Shear Properties of Porcine Aortic Heart Valve Tissue*. Ann Thorac Surg. 1995; 60:5369-73.
- [23] A. C. Duncan, D. Boughner, I. Vesely: *Dynamic glutaraldehyde fixation of a porcine aortic valve xenograft*. Biomaterials. 1996; 17:1849-56.
- [24] A. Jayakrishnan, S. R. Jameela: *Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices*. Biomaterids. 1996; 17:471-84.
- [25] J. Chanda, R. Kuribayashi, T. Abe: *Prevention of Calcification in Glutaraldehyde-Treated Porcine Aortic and Pulmonary Valves*. Ann Thorac Surg. 1997; 64:1063–6.
- [26] A. C. Duncan, D. Boughner, I. Vesely: *Viscoelasticity of dinamically fixed bioprosthetic valves. Effects of Glutaraldehyde concentration*. The Journal of Thoracic and Cardiovascul Surgeryx. 1997; 113:302-10.
- [27] W. B. Smith: *The Analysis of Synthetic Detergents*. Jorunal of The Society Of Cosmetics Chemists. 1963; 513-27.
- [28] *Environmental and Human Safety of Major Surfactants Volume I. Anionic Surfactants*. Arthur D. Little. Inc. Cambridge. Massachusetts. 1991.
- [29] M. Posa, A. Pilipovic', M. Lalic: *The influence of NaCl on hydrophobicity of selected, pharmacologically active bile acids expressed with chromatographic retention index and critical micellar concentration*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2010; 81:336–43.
- [30] P. M. Dohmen, D. Gabbieri, J. Linneweber, A. Lembcke, J. P. Braun, W. Konertz: *Ross procedure with a tissue-engineered heart valve in complex congenital aortic valve disease*. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. 2007; 133:1088:89.

- [31] P. M. Dohmen, A. Lembcke, S. Holinski, D. Kivelitz, J. P. Braun, A. Pruss, W. Konertz: *Mid-Term Clinical Results Using a Tissue- Engineered Pulmonary Valve to Reconstruct the Right Ventricular Outflow Tract During the Ross Procedure*. The Society of Thoracic Surgeons. 2007; 84:729–36.
- [32] S. Cebotari, I. Tudorache, A. Haverich, T. Jaekel, A. Hilfiker, S. Dorfman, W. Ternes, A. Lichtenberg: *Detergent Decellularization of Heart Valves for Tissue Engineering: Toxicological Effects of Residual Detergents on Human Endothelial Cells*. Artificial Organs. 2010; 34:206–10.
- [33] F. Naso, A. Gandaglia, M. Formato, A. Cigliano, A. J. Lepedda, G. Gerosa, M. Spina: *Differential distribution of structural components and hydration in aortic and pulmonary heart valve conduits: Impact of detergent-based cell removal*. Acta Biomaterialia 6. 2010; 4675–88.
- [34] Mathapati, Santosh, S. Galla, K. Sankaranaryanan, R. S. Verma, K. M. Cherian, S. Guhathakurta. *Qualitative and quantitative detection of sodium deoxycholic acid in decellularized tissue*. Indian J Thorac Cardiovasc Surg. 2010; 27:129-31.
- [35] S. Caamaño, A. Shiori, S. Strauss, E. Orton: *Does sodium dodecyl sulfate wash out of detergent-treated bovine pericardium at cytotoxic concentrations?*. J Heart Valve Dis. 2009; 135:101-5.
- [36] S. M. Bhairi, C. Mohan: *Detergents A guide to the properties and uses of detergents in biology and biochemistry*. EMD Biosciences, San Diego, CA; 2007.
- [37] P. Gratzer, R. Harrison, T. Woods : *Matrix alteration and not residual sodium dodecyl sulfate cytotoxicity affects the cellular repopulation of a decellularized matrix*. Tissue Eng. 2006; 2975-83.
- [38] Y. Kazakevich, R. LoBrutto. *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. Hoboken: John Wiley, 2007.
- [39] I. Zancan, Tesi di laurea in Biotecnologie Mediche, “*Decellularizzazioni di tessuti xenogenici per la produzione di bioprotesi valvolari cardiache biocompatibili: determinazione quantitativa di residui di detergente e di epitopi xenogenici poer la prevenzione delle degenerazioni post impianto*”. 2012
- [40] S. Faccioli, Tesi di laurea in Ingegneria Biomedica “*Determinazione di detergenti residui in valvole biologiche decellularizzate*”. 2013.
- [41] *2424 Evaporating Light Scattering Detector. Operator’s Guide*. Waters Corporation. 2006.
- [42] *996 PhotoDiode Array Detector. Operator’s Guide*. Waters Corporation. 1997.

RINGRAZIAMENTI

In conclusione desidero ringraziare non solo chi ha permesso lo sviluppo di questo progetto di ricerca, ma anche chi ha condiviso con me questo percorso formativo.

Ringrazio la Prof.ssa Dettin per la sua disponibilità e il suo aiuto nello sviluppo di questo progetto di ricerca.

Ringrazio Annj, Margherita, Pietro e i Gianluca per il bellissimo tempo passato assieme in questi quattro mesi di laboratorio.

Ringrazio David, Alessio, Tommaso, Marco, Carlotta e Fabio per tutto quello che mi hanno insegnato e per tutto quello che abbiamo condiviso.

Ringrazio mamma, papà e Anna che hanno sempre creduto in me e che mi hanno permesso di dimostrare loro che sono “un buon investimento”.

Ringrazio Sveva per tutto quello che è per me.