



ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Primo progetto di ricerca
Sostituzioni funzionali,
organi artificiali e trapianti di organo
Secondo anno**

Sintesi dell'attività svolta

A cura del Responsabile scientifico
A. Sargentini

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

00/5

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Primo progetto di ricerca
Sostituzioni funzionali,
organi artificiali e trapianti di organo
Secondo anno**

Sintesi dell'attività svolta

A cura del Responsabile scientifico
Aurelia Sargentini
Laboratorio di Ingegneria Biomedica

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

00/5

Istituto Superiore di Sanità

Primo progetto di ricerca Sostituzioni funzionali, organi artificiali e trapianti di organo. Secondo anno. Sintesi dell'attività svolta.

A cura di Aurelia Sargentini

2000, iii, 293 p. Rapporti ISTISAN 00/5

Seguendo l'approccio tipico della bioingegneria, in questo progetto si vogliono affrontare alcune problematiche relative al ripristino di funzioni di organi e tessuti attraverso la loro sostituzione completa oppure attraverso ausili artificiali che affiancano l'organo naturale coadiuvandolo o sostituendolo nello svolgimento delle proprie funzioni. Posto come requisito base l'impatto dei risultati del progetto sul Servizio Sanitario Nazionale, sono state individuate le seguenti aree di ricerca: 1) Ingegneria dei tessuti, 2) Endoprotesi cardiovascolari, 3) Protesi e dispositivi esterni per la riabilitazione motoria, 4) Trapianti di organo. Il presente rapporto raccoglie la sintesi delle attività svolta nel corso del secondo anno del progetto.

Parole chiave: Ingegneria dei tessuti, Protesi valvolari cardiache, Riabilitazione motoria, Trapianti di organo

Istituto Superiore di Sanità

First research project Function replacement, artificial organs and organ transplantation. Second year. Summary of the activities.

Edited by Aurelia Sargentini

2000, iii, 293 p. Rapporti ISTISAN 00/5 (in Italian)

Following the typical approach of bioengineering, the project focuses on the development of methods and techniques to restore the function of organs and tissues by fully replacing them, or through the use of artificial devices that substitute for the organ or help it perform its function. The basic requirement being a short-term impact of results on the National Health Service, the project has been organised in the following sub-projects: 1) Tissue engineering, 2) Cardiovascular endoprotheses, 3) External prostheses and devices for motor rehabilitation, 4) Organ transplantation. The current report summarises the main results obtained during the second year of the project.

Key words: Motor rehabilitation, Organ transplantation, Prosthetic heart valves, Tissue engineering

Si ringraziano Monica Brocco e Elisabetta Martinez per la preparazione di questo rapporto e per il supporto tecnico-organizzativo al progetto.

INDICE

Presentazione	iii
Linee di ricerca svolte dalle unità operative interne all'Istituto Superiore di Sanità	1
Linee di ricerca svolte dalle unità operative esterne all'Istituto Superiore di Sanità	35
Sottoprogetto 1 Ingegneria dei tessuti	37
Sottoprogetto 2 Endoprotesi cardiovascolari	77
Sottoprogetto 3 Protesi e dispositivi esterni per la riabilitazione motoria	139
Sottoprogetto 4 Trapianti di organo	217
Indice dei Responsabili scientifici dei progetti delle unità esterne	293

PRESENTAZIONE

Siamo alla conclusione del secondo anno di attività del progetto di ricerca "Sostituzioni funzionali, organi artificiali e trapianti d'organo", finanziato con quota parte del 1% del Fondo Sanitario Nazionale assegnata all'Istituto Superiore di Sanità.

In questo secondo anno, sono state finanziate 7 unità operative interne all'Istituto e 66 esterne, articolate, come nell'anno precedente, in 4 sottoprogetti:

1. Ingegneria dei tessuti
2. Endoprotesi cardiovascolari
3. Protesi e dispositivi esterni per la riabilitazione motoria
4. Trapianti di organo

L'esiguità dei fondi assegnati al progetto nel 1999 non permette un ulteriore bando di ricerca e quindi non consente un terzo anno di attività di ampio respiro, ma solo poche azioni concertate, strettamente correlate alle attività delle unità operative interne nell'ambito dei primi tre sottoprogetti. Le attività di ricerca inerenti ai trapianti di organo costituiranno argomento di azione concertata presentata per un finanziamento ad hoc alla Commissione per la Ricerca Biomedica.

I risultati ottenuti nei due anni di attività del progetto, ampiamente discussi in workshop ed esaminati dal Comitato Scientifico del Progetto, sono stati argomento di numerose pubblicazioni su riviste nazionali ed internazionali e costituiscono elementi di sicura utilità per il Servizio Sanitario Nazionale

Il Responsabile scientifico
Aurelia Sargentini

**LINEE DI RICERCA SVOLTE
DALLE UNITA' OPERATIVE INTERNE
ALL'ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'**

Sottoprogetto 1 – Ingegneria dei Tessuti

1.1 Caratterizzazione e valutazione delle prestazioni meccaniche di tessuti biologici ricostruiti *in vitro*

Pietro CHISTOLINI, Giorgio DE ANGELIS, Marina TORRE, Rossella BEDINI,
Irene RUSPANTINI
Laboratorio di Ingegneria Biomedica

Sintesi dell'attività svolta nel corso del secondo anno

Lo sviluppo delle tecniche di coltura cellulare ha reso possibile l'ideazione e, in molti casi l'implementazione di tecniche di sostituzione di tessuti compromessi con tessuti coltivati *in vitro*. Ad esempio oggi è possibile ricostruire *in vitro* l'epidermide e il tessuto osseo. L'epidermide coltivata *in vitro* a partire da cheratinociti autologhi trova applicazione nei trapianti per il trattamento di lesioni gravi della pelle, come le ustioni profonde ed estese, e di disordini della pigmentazione, come la vitiligine. È in fase di studio su modelli animali la possibilità di riparare lesioni di rilevanti dimensioni tramite un approccio biotecnologico in cui supporti porosi di idrossiapatite vengono caricati con cellule stromali di midollo osseo (acronimo anglosassone BMSC) autologhe. Attualmente ancora non esiste una nomenclatura, né una normativa consolidata dei prodotti dell'ingegneria dei tessuti, quindi prima che il trapianto dei tessuti coltivati diventi routine occorre individuare dei criteri di valutazione delle proprietà sia biologiche che meccaniche di tali tessuti.

Scopo della presente linea di ricerca è quello di sviluppare la strumentazione e i protocolli di misura dedicati all'analisi delle proprietà meccaniche dei prodotti dell'ingegneria dei tessuti per individuarne validi criteri di valutazione. I tessuti coltivati analizzati sono stati i) epidermide umana, ii) tessuto osseo ovino.

EPIDERMIDE

Nel corso del primo anno di attività sono state eseguite prove meccaniche di trazione uniassiale su lembi di epidermide umana ricostruita *in vitro*. È stata valutata la resistenza meccanica dell'epitelio in termini di modulo di Young. Durante il secondo anno obiettivo del lavoro è stato quello di definire nuovi test per valutare le proprietà viscoelastiche dell'epidermide in condizioni controllate di CO₂ e temperatura. E' stato perciò necessario progettare una nuova macchina di trazione con cella di carico stagna per condurre i test sui lembi immersi nel terreno di coltura, adatta inoltre a operare all'interno di un incubatore. La macchina è attualmente in fase di assemblaggio. Ci si propone infine di sviluppare modelli di tensegrità per la descrizione del comportamento meccanico dell'epidermide.

TESSUTO OSSEO

Obiettivo del nostro studio è stato quello di analizzare le proprietà meccaniche di impianti di ceramica porosi caricati con cellule stromali di midollo osseo al fine di valutare se l'utilizzo di BMSC, oltre ad accelerare la neoformazione di osso e a favorire l'integrazione osso-ceramica, possa anche migliorarne le prestazioni meccaniche. Gli impianti sono stati realizzati dal gruppo di ricerca del Prof. Cancedda presso il Centro di Biotecnologie Avanzate e dal Prof. Marcacci degli Istituti Ortopedici Rizzoli. Per la valutazione meccanica di impianti dedicati alla ricostruzione ossea sono stati trovati in letteratura alcuni lavori basati su test meccanici di tipo tradizionale come compressione, flessione o torsione applicati all'intero impianto. Questi test tuttavia possono fornire solo informazioni globali sull'impianto e inevitabilmente non tengono conto dell'eterogeneità del composito osso-ceramica. Per condurre un'indagine puntuale degli impianti è stata utilizzata la tecnica dell'indentazione che consiste nel premere il materiale con un palpatore di acciaio (indentatore) in maniera non distruttiva. Su una stessa sezione del materiale è possibile testare più areole ottenendo così una mappa delle tensioni locali. L'indentazione, tradizionalmente applicata su metalli, negli ultimi anni è stata utilizzata con successo anche su tessuto osseo compatto e spugnoso su diversi modelli animali.

Nella prima fase dell'attività sono state condotte delle prove preliminari al fine di scegliere l'indentatore ottimale.

In base alla formula di Timoshenko e Goodier $E = s(1-\nu^2)/d$ (dove s è la pendenza di una curva di indentazione $\sigma-\epsilon$ nel tratto lineare, ν è il coefficiente di Poisson, d è il diametro dell'indentatore) è possibile stabilire una relazione fra il modulo di Young e la stiffness definita dall'indentazione. Il diametro dell'indentatore deve essere piccolo abbastanza da testare delle regioni ristrette e quindi omogenee e tale da soddisfare la succitata equazione. Abbiamo provato cinque indentatori a punta piatta di diverso diametro (1; 1,5; 2; 2,5; 3 mm) ognuno su una sezione trasversale di diafisi tibiale bovina. Ogni sezione è stata suddivisa in settori di cui alcuni sono stati sottoposti a indentazione e altri sono stati tagliati per ottenere cubetti (spigolo = 3mm) a loro volta sottoposti a compressione. I valori del modulo di Young calcolati dalla formula e quelli ottenuti dai test di compressione sono stati confrontati per i cinque valori di d e la correlazione più forte è stata riscontrata nel caso di $d = 2,5$ mm. I risultati ottenuti da questo primo set di prove hanno confermato l'ipotesi di validità della tecnica di indentazione per la valutazione delle proprietà meccaniche del tessuto osseo.

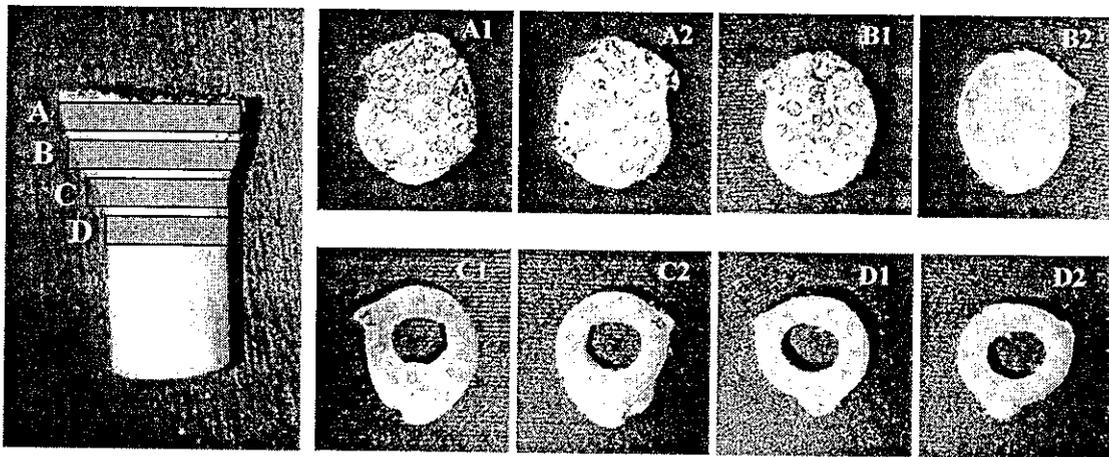


Figura 1.- A sinistra si possono osservare le 4 sezioni effettuate sul campione espantato. A destra sono mostrati i lati di ogni sezione, sono visibili anche i siti dell'indentazione.

Successivamente sono state eseguite prove di indentazione su un impianto di ceramica in diafisi tibiale di pecora. La ceramica era composta da sola idrossiapatite, presentava una porosità del 70-80% e la distribuzione della dimensione dei pori era $< 10 \mu\text{m} \sim 3\% \text{ vol.}$; $10-150 \mu\text{m} \sim 11\% \text{ vol.}$; $> 150 \mu\text{m} \sim 86\% \text{ vol.}$ Il cilindro di ceramica impiantato nella tibia ovina era alto 35 mm con 20 mm di diametro e con un canale centrale di diametro pari a 10 mm.

Una porzione di tibia di circa 60 mm è stata espantata dopo quattro mesi dall'intervento chirurgico. In una estremità era visibile il composito formato da ceramica e osso, l'altra estremità era composta da solo tessuto osseo non trattato. Sono state effettuate quattro sezioni spesse 3 mm e distanziate di 1 mm, ortogonali rispetto all'asse della tibia per ovviare ai problemi legati all'anisotropia del materiale (Fig 1). Su ogni lato di ciascuna fetta sono stati indentati mediamente 15 siti alla distanza uno dall'altro di almeno 3 mm per evitare che il test su un sito alterasse le proprietà meccaniche delle zone limitrofe. Le prove sono state condotte a una velocità di 0,5 mm/s fino a raggiungere una profondità massima di indentazione di 0,35 mm. Le curve tipiche ottenute tramite i test di indentazione sono riportate nella Fig. 2. Si può notare come nella sezione A in cui è prevalente la presenza di ceramica le pendenze sono mediamente basse e molto differenziate il che si riflette nel valore di stiffness pari a $524 \pm 330 \text{ N/mm}$. La sezione B è composta da solo osso ovino non trattato, le curve mostrano pendenze maggiori rispetto al caso precedente e sono poco disperse, ne consegue una stiffness mediamente più elevata con una deviazione standard minore ($1702 \pm 151 \text{ N/mm}$). Per ogni sezione è stata valutata anche la densità apparente (massa/volume).

Nella Fig. 3 sono riportati i valori di stiffness e di densità ottenuti per le 4 sezioni. Si può notare come lungo l'asse dell'impianto la stiffness aumenti dalla porzione dove è prevalente la ceramica verso

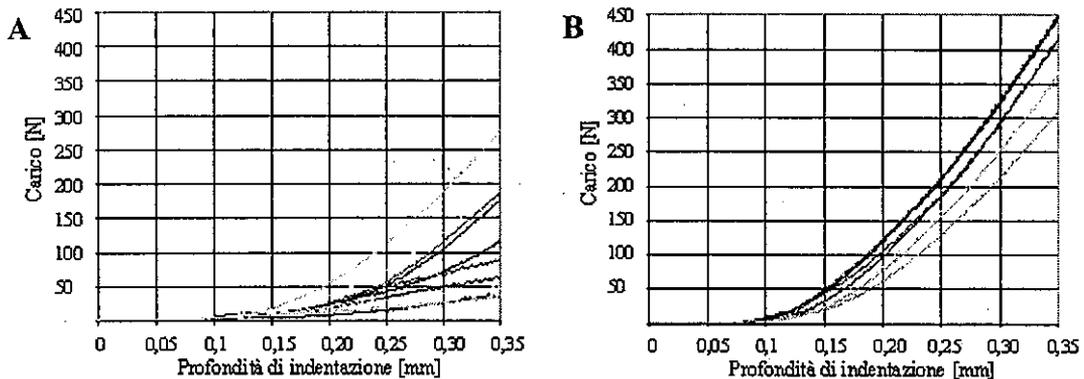


Figura 2.- Le curve tipiche che si ottengono da un test di indentazione. A) la sezione è composta principalmente da ceramica. B) la sezione è costituita da osso ovino.

l'estremità di solo osso. Nella stessa direzione la deviazione standard diminuisce via via che il materiale diventa più omogeneo. Si può inoltre osservare come l'andamento della stiffness segua quello della densità, similitudine che mette in luce il forte legame esistente fra le due grandezze.

Con il protocollo adottato sono state ottenute misure accurate e ripetibili.

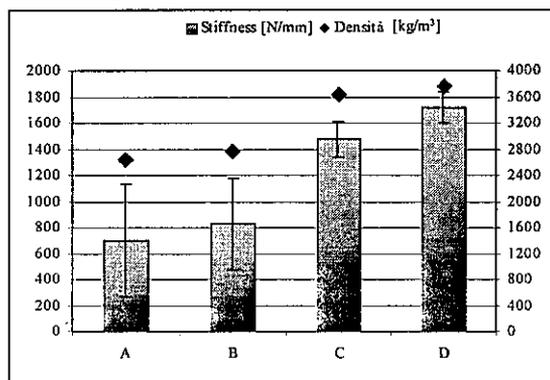


Figura 3.- Valori della stiffness media \pm deviazione standard e densità di sezioni consecutive di un impianto di HA senza cellule dopo quattro mesi.

Ai fini del nostro studio quattro campioni, espuntati dopo 2 mesi, sono stati sottoposti a indentazione: due erano costituiti da impianti di ceramica con BMSC espanse in vitro e due da impianti di ceramica senza cellule. Da ogni campione è stata tagliata ortogonalmente all'asse della tibia una sezione cilindrica spessa 3 mm. Su uno degli impianti con BMSC sono state ottenute sei sezioni consecutive (spesse 3 mm e distanziate di 1 mm) per studiare la variazione delle proprietà meccaniche dell'impianto lungo il suo asse. Le sezioni sono state sottoposte a indentazione in base al protocollo stabilito nei test preliminari. Prove meccaniche analoghe sono state eseguite anche sugli scaffold porosi di idrossiapatite non impiantati e su osso tibiale ovino non trattato.

I risultati ottenuti hanno mostrato che gli impianti possiedono una stiffness intermedia fra quella della struttura di ceramica e quella dell'osso non trattato. In particolare, gli impianti caricati con BMSC presentano una stiffness maggiore rispetto agli impianti di sola ceramica (Fig. 4B). Nell'impianto BMSC-HA è stato rilevato che la stiffness aumenta dall'estremità con ceramica a quella con solo osso e che questo incremento è legato a quello della densità del materiale (Fig. 4A). Confrontando i nostri risultati con quelli ottenuti da osservazioni microradiografiche si può ipotizzare che la maggiore stiffness degli impianti con BMSC sia legata alla maggiore neoformazione ossea presente anche nei pori e nelle fessure più piccole dell'impianto. Il tessuto osseo neoformato frammenta e sostituisce la ceramica, tale processo rende il composito finale compatto e quindi più resistente. La minore deviazione standard dei valori di stiffness rilevata negli impianti con BMSC mette in luce la maggiore omogeneità del composito dovuta alla notevole integrazione fra osso neoformato e ceramica.

La compattezza strutturale del composito e la sua buona omogeneità riducono l'insorgere di concentrazioni locali di tensione che sono la causa principale di fratture. Dal punto di vista delle proprietà meccaniche si può affermare che gli impianti di HA caricati con BMSC possiedono caratteristiche tali da candidarli come impianti adeguati alla riparazione di lesioni delle ossa lunghe.

L'attività verrà portata avanti con esperimenti su topo nudo al fine di quantificare l'influenza sulle proprietà degli impianti delle caratteristiche strutturali, come la porosità e la dimensione dei pori, e della composizione del materiale.

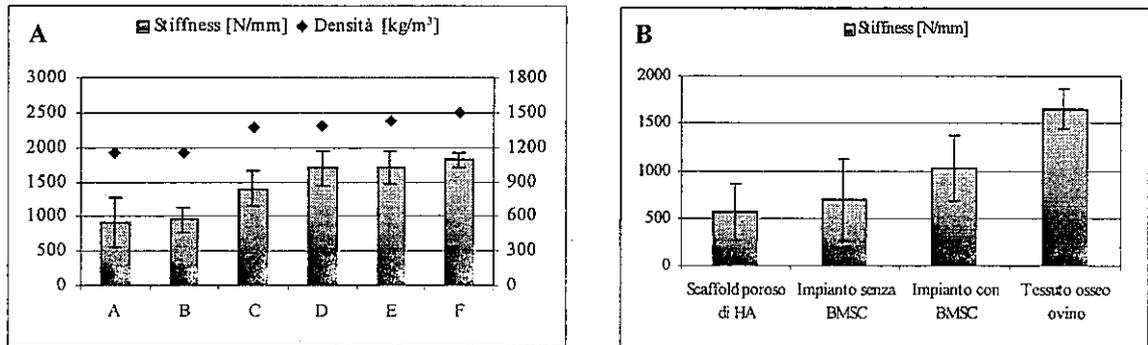


Figura 4.- A) Valori di stiffness media \pm dev. st. in sei sezioni consecutive di un impianto con BMSC dopo due mesi. B) Valori di stiffness media \pm dev. st. della ceramica porosa non impiantata, degli impianti con e senza BMSC e dell'osso tibiale ovino non trattato.

Publicazioni

1. P. Chistolini, I. Ruspantini, P. Bianco, R. Cancedda, R. Quarto. **Biomechanical Evaluation of Cell-Loaded and Cell-Free Hydroxyapatite Implants for the Reconstruction of Segmental Bone Defects**, Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 10 (12):739-742, December 1999
2. E. Kon, A. Muraglia, A. Corsi, P. Bianco, M. Marcacci, A. Boyde, I. Ruspantini, P. Chistolini, M. Rocca, R. Giardino, R. Cancedda, R. Quarto. **Autologous Bone Marrow Stromal Cells loaded onto Porous Hydroxyapatite Ceramic Accelerate Bone Repair in Critical Size Defects of Sheep Long Bones**. Journal of Biomedical Materials Research (in stampa).
3. P. Chistolini, G. De Angelis, M. De Luca, G. Pellegrini, I. Ruspantini. **Analysis of the Mechanical Properties of *in-vitro* Reconstructed Epidermis: Preliminary Results**, Med. Biol. Eng. Comput., 1999, 37, 670-672
4. P. Chistolini, I. Ruspantini, P. Bianco, R. Cancedda, R. Quarto. **Biomechanical Evaluation of Cell-Loaded and Cell-Free Hydroxyapatite Implants for the Reconstruction of Segmental Bone Defects**, invited lecture nel Workshop 'Cellular and Tissue Engineering' all'interno della 15° Conferenza della Società Europea di Biomateriali ESB'99. Bordeaux, 8-12 Sett. 1999
5. P. Chistolini, G. De Angelis, M. De Luca, G. Pellegrini, I. Ruspantini. **Mechanical Evaluation of *in-vitro* Cultured Human Epidermis**, in "Materials in Clinical Application" Proceedings of Topical Symposium XI of CIMTEC'98 - World Ceramics Congress & Forum on New Materials. Firenze, giugno 1998 (lavoro esteso).
6. P. Chistolini, G. De Angelis, M. De Luca, G. Pellegrini, I. Ruspantini. **Influence of Culture and Storing Conditions on the Mechanical Properties of *in vitro* Reconstructed Human Epidermis**, The International Journal of Artificial Organs, 21 (10), 1998; p. 659 (Abstract per il 25° congresso ESAO. Bologna, novembre 1998).
7. P. Bianco, R. Cancedda, P. Chistolini, G. De Angelis, I. Ruspantini. **Comparison between the Mechanical Properties of Reconstructed Large Bone Segments and Natural Bone**, The International Journal of Artificial Organs, 21 (10), 1998; p. 667 (Abstract per il 25° congresso ESAO. Bologna, novembre 1998).
8. P. Chistolini, G. De Angelis, M. De Luca, G. Pellegrini, I. Ruspantini. **Stress-Strain Relationship on *in vitro* Cultured Epidermis**, Journal of Biomechanics, 31 (Suppl.1), p. 34, 1998 (Abstract per la 11° conferenza della European Society of Biomechanics. Tolosa, luglio 1998)
9. P. Chistolini, G. De Angelis, M. De Luca, G. Pellegrini, I. Ruspantini. **Tensile Properties of *in vitro* Cultured Epidermis**, Atti della conferenza internazionale "Advances in Biomaterials and Tissue Engineering". Capri, giugno 1998, p. 142 (Abstract)

Sottoprogetto 2 - Endoprotesi Cardiovascolari

2.1 Trattamento elettrico delle Tachiaritmie

Pietro BARTOLINI, Romano BERNARDUCCI, Vincenzo BARBARO
Laboratorio di Ingegneria Biomedica - I.S.S.

Collaboratori: Angelo Angeloni, Giovanni Calcagnini, Federica Censi¹, Antonello Delogu, Sandra Morelli
Laboratorio di Ingegneria Biomedica, ISS

¹Dip. di Informatica e Sistemistica, Università "La Sapienza", Roma

Sintesi dell'attività svolta nel corso del secondo anno

Obiettivo del lavoro del secondo anno è stato lo sviluppo di software e hardware dedicato per il riconoscimento, la classificazione e lo sblocco della Fibrillazione Atriale (FA). In particolare è stato perfezionato l'algoritmo già realizzato durante il primo anno, sono state avviate nuove applicazioni software ed è stato realizzato un prototipo da laboratorio di defibrillatore atriale.

Rilevatore di picchi. Il rilevatore di picchi delle depolarizzazioni atriali è ora basato sull'attraversamento di una soglia adattiva, dipendente dalla dinamica del segnale, in maniera da adattare repentinamente l'attraversamento della soglia anche a bruschi abbassamenti di dinamica (figura 1).

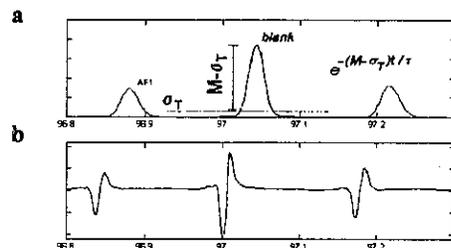


Figura 1.- (a) Andamento della soglia sovrapposta al segnale pre-elaborato; (b) elettrogramma originale.

Tabella 1. Prestazioni del rilevatore di picchi.

τ	Parametri							Sens.	Spec.	Acc.
	bl	K _{RMS}	N	FP	FN	FP+FN	FP = falsi positivi, FN = falsi negativi			
80	65	0.2	2630	22	58	80	97.79	99.16	96.96	
60	65	0.2	2630	71	21	92	99.20	97.30	96.50	
100	65	0.2	2630	17	93	110	96.46	99.35	95.82	
80	50	0.2	2630	44	33	77	98.75	98.33	97.07	
80	80	0.2	2630	17	84	101	96.81	99.35	96.16	
80	65	0.1	2630	56	49	105	98.14	97.87	96.01	
80	65	0.3	2630	15	63	78	97.60	99.43	97.03	

Sensibilità, specificità and accuratezza sono espresse in percentuali.

Per determinare l'andamento ottimo della soglia sono stati usati dati provenienti da registrazioni intra-atriali (2630 depolarizzazioni) sia di pazienti cronici che indotti elettricamente. La configurazione migliore (riga in grassetto nella tabella 1) fornisce una accuratezza complessiva del 97.07%.

La classificazione automatica degli elettrogrammi. Le procedure di calcolo del periodo atriale medio (AP), del suo coefficiente di variazione (CV) e del numero di occorrenze (NO) sono stati migliorati in termini di robustezza ed efficienza computazionale. E' stato ampliato il numero dei parametri utilizzati per quantificare il grado di organizzazione della FA. In particolare è stata introdotta una misura di durata della depolarizzazione (F-WIDTH), suggerita in base a considerazioni di tipo fisiologico sulla velocità di conduzione locale del miocardio. Si è inoltre aggiunta una misura di correlazione con un template (CWA) ed una stima del contenuto in frequenza degli elettrogrammi (BW). La quantità di informazione trasportata dagli elettrogrammi è stata inoltre quantificata mediante l'entropia di Shannon (EN). Tutti i parametri sono stati calcolati su un intervallo temporale corrispondente alle ultime 10 depolarizzazioni e, per aumentare la consistenza statistica della classificazione, i parametri sono stati mediati su 4 secondi.

Stima di NO e di EN. - Variante significativa rispetto all'algoritmo sviluppato è ora la presenza di un algoritmo adattativo per la stima dell'intervallo di quantizzazione dell'istogramma ampiezze (APDF). Il numero complessivo di bin è stato fissato a 33, da letteratura. L'estrema variabilità in ampiezza tipica dei tracciati endocavitari bipolari rende infatti necessario normalizzare l'intervallo di quantizzazione, quest'ultima è stata ottenuta stimando la dinamica del segnale come differenza media fra i picchi positivi e negativi delle ultime 10 depolarizzazioni. NO è stato calcolato come percentuale di punti nel bin centrale rispetto al totale (figura 2). EN è stata stimata mediante la relazione: $EN = - \sum_i p_i \ln p_i$.

Durata della depolarizzazione (F-WIDTH). - In questo caso l'approccio è di tipo statistico: si è considerata una finestra complessiva di 50 msec, centrata sul massimo del segnale e si è poi definita la

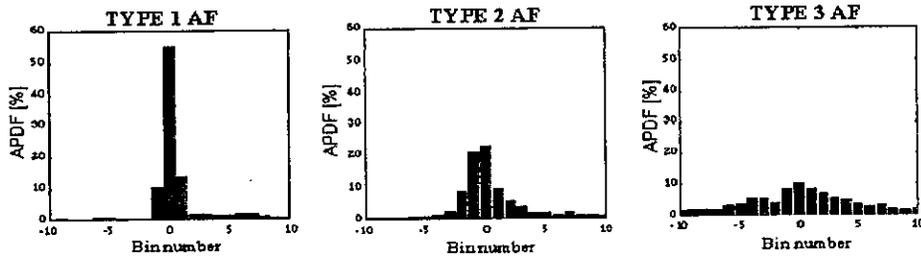


Figura 2.- In figura è riportato un esempio di distribuzione delle ampiezze per i tre tipi di AF.

durata come l'ampiezza della finestra temporale comprendente il 90% della potenza complessiva della depolarizzazione (figura 3).

BW. - Lo spettro di densità di potenza è stato calcolato mediante periodogramma, con finestra di Hanning (figura 4); come parametro descrittivo si è utilizzato la frequenza di taglio, definita come quella frequenza entro la quale è contenuto il 90% della potenza del segnale.

CWA. - Nella prima fase si costruisce un template rappresentativo della morfologia media della depolarizzazioni, per le ultime 10 depolarizzazioni identificate, mediante media sincronizzata. Ogni complesso è poi successivamente cross-correlato con il template così ottenuto. Il massimo della cross-correlazione è stato considerato come indice descrittivo della morfologia del complesso.

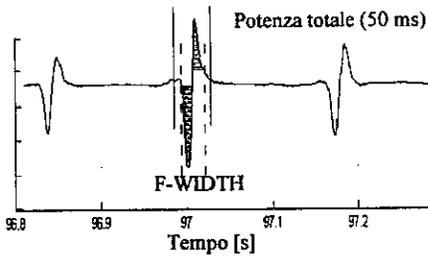


Figura 3.- Calcolo della durata.

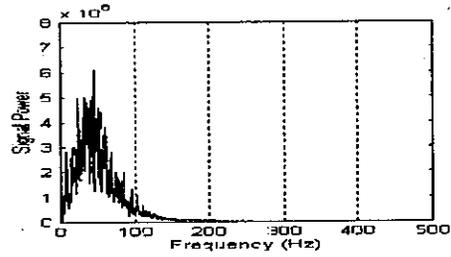


Figura 4.- Spettro di densità di potenza.

Algoritmo di Classificazione. - L'algoritmo è ora basato su un approccio a minima distanza. I parametri introdotti sono le componenti di un vettore in uno spazio n-dimensionale, che rappresenta il pattern descrittivo del segmento di elettrogramma da classificare. Si calcola la distanza del vettore da tre centroidi rappresentativi delle tre classi di Wells usando la metrica di Mahalanobis, in cui le distanze sono pesate per tenere conto della dispersione dei vari pattern nelle rispettive classi (figura 5). I risultati relativi alla classificazione con un solo parametro sono riportati in tabella 2. Si osservi come la miglior classificazione si ottiene con NO. Secondo miglior parametro risulta essere F-WIDTH. Prendendo in esame la classificazione con 2 parametri, i risultati migliori si ottengono con la coppia NO-CV, riportati in dettaglio in tabella 3. Inoltre NO è sempre presente nelle coppie che forniscono i risultati più soddisfacenti. Per 3 parametri, la migliore classificazione si ottiene da NO-CV-BW; questo risultato è però solo di poco migliore del precedente. Un ulteriore incremento del numero di parametri non solo non porta a miglioramenti, ma degrada le prestazioni dell'algoritmo.

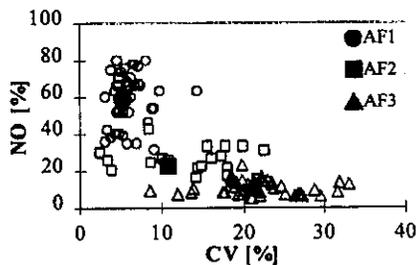


Figura 5.- I tre tipi di AF nello spazio NO-CV

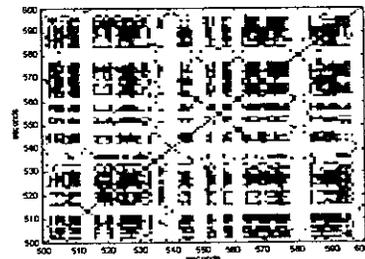


Figura 6.- Mappa di ricorrenza su due siti diversi

Tabella 2. (AT = Accuratezza Totale)

Parametro	Sensibilità (%)			Specificità (%)			AT(%)
	AF1	AF2	AF3	AF1	AF2	AF3	
AP	55	55	85	90	85	75	67
CV	70	50	90	95	80	83.33	74
NO	90	85	92.5	98.33	91.25	96.67	90
EN	57.5	45	85	86.67	85	76.6	66
CWA	80	65	42.5	96.67	63.75	88.33	62
F-WIDTH	87.5	75	90	95	88.75	96.67	86
BW	47.5	60	77.5	85	70	91.67	62

Tabella 3. Risultati classificazione con CV-NO

	AF1	AF2	AF3	Sens.	Spec.
CARDIOLOGO	36	4	0	90%	98.33%
	1	18	1	90%	92.5%
	0	2	38	95%	98.33%

Accuratezza totale = 92%

Analisi non lineare. Mappe di ricorrenza. L'organizzazione spazio-temporale degli elettrogrammi, prelevati simultaneamente in 3 siti, è stata studiata mediante metodiche lineari (funzione di cross-correlazione) e mediante tecniche non lineari (mappe di ricorrenza). Le mappe di ricorrenza permettono di quantificare l'eventuale presenza di pattern ricorrenti in coppie di segnali (figura 6). In questo studio sono state applicate alle serie temporali degli intervalli di depolarizzazione atriale in FA di tipo I. I risultati ottenuti evidenziano la presenza di dinamiche deterministiche verosimilmente espressione dei complessi pattern di attivazione della parete atriale tipici della FA. Inoltre tale metodica si è dimostrata più sensibile rispetto alla funzione di cross-correlazione, che invece non ha evidenziato legami significativi fra le attività elettriche delle coppie di siti considerati. L'analisi mediante dati surrogati ha inoltre fornito la prova formale di un contenuto deterministico nelle interazioni osservate.

Il progetto 'BASKET'. La disponibilità di registrazioni mediante catetere basket ha inoltre permesso l'estensione degli algoritmi implementati all'analisi di 56 elettrogrammi bipolari contemporanei, per la realizzazione di mappe di organizzazione. Le mappe sono state ottenute mediante interpolazione sferica dei dati dei bipoli disponibili. Il progetto è in una fase iniziale e prevede come obiettivi intermedi: (1) la realizzazione di un sistema di rappresentazione grafica della propagazione del fronte di depolarizzazione intra-atriale; (2) la mappatura del livello di organizzazione dell'intero atrio; (3) la ricostruzione degli elettrogrammi in ogni punto mediante soluzione del problema elettrico inverso; l'obiettivo finale è arrivare ad identificare, mediante le mappe, i siti candidati all'ablazione a radiofrequenza. Un esempio di analisi effettuata mediante il software realizzato è riportata in figura 7.

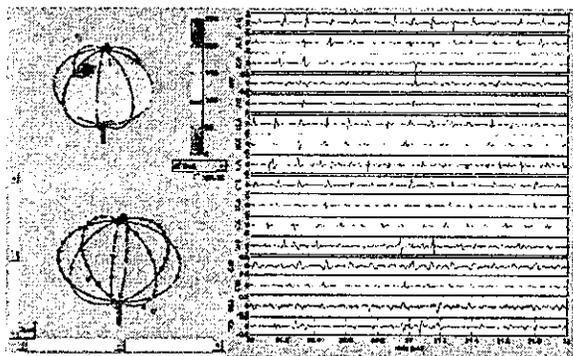


Figura 7. - Software di mappaggio del basket.

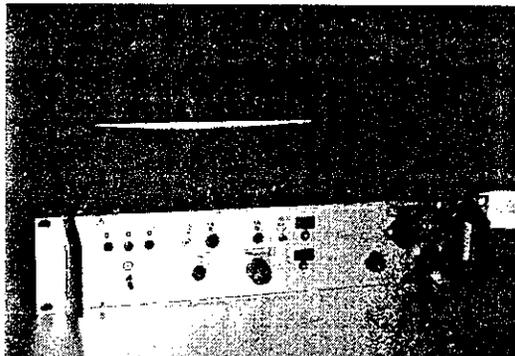


Figura 8. - Prototipo realizzato.

Hardware. E' stato progettato e realizzato un prototipo da laboratorio di un sistema di erogazione dello shock per lo sblocco della fibrillazione atriale (figura 8). Il sistema è stato pensato per uno sviluppo di tipo modulare che prenda in considerazione tutti quegli accorgimenti tecnici (forme d'onda dell'impulso, timing, multipath, multisito, erogazione a corrente costante etc.) ritenuti essenziali alla riduzione dell'energia di shock fornita al paziente con lo scopo finale di scendere al disotto della soglia del dolore dello stesso (che risulta essere di tipo soggettivo). Attualmente il sistema consente la ricerca di innovative forme d'onda dello shock di defibrillazione e relative temporizzazioni nonché la possibilità di erogare su più siti contemporaneamente. Il sistema è stato collaudato presso la sperimentale dell'ospedale Careggi di Firenze; il relativo protocollo di sperimentazione è in fase di completamento.

Publicazioni

- 1) Barbaro V., Bartolini P., Calcagnini G., Morelli S., Michelucci A., Gensini GF. (1999). **Automated classification of human atrial fibrillation from intra-atrial electrograms.** (Accettato su PACE).
- 2) Barbaro V., Bartolini P., Calcagnini G., Martelli F., Morelli S. (1998). **A comparison of methods for the classification of atrial fibrillation from intra-atrial electrograms.** 20th Int. Conf. IEEE-EMBS, Hong Kong, su CD-Rom p 94-97.
- 3) Barbaro V., Bartolini P., Bernarducci R., Calcagnini G., Martelli F., Morelli S. (1998). **An algorithm for the detection and classification of atrial fibrillation from intra-atrial electrograms.** Proceedings of the VIII Mediterranean Conference on Medical and Biological Engineering and Computing (MEDICON'98) Lemesos, Cyprus, su CD-Rom p 1-6.
- 4) Michelucci A., Bartolini P., Sabini A., Colella A., Padeletti L., Calcagnini G., Zipoli R., Vena S., Porciani M.C., Martelli F., Morelli S., Barbaro V., Gensini G. (1999). **Contemporary and Dynamic Evaluation of Refractoriness and Conduction Velocity During Human Atrial Fibrillation.** HeartWeb, Volume 4, No 3 January 1999, p 1-8.
- 5) Censi F., Barbaro V., Bartolini P., Calcagnini G., Cerutti S. (1998). **Non-Linear dynamics of atrial rate during atrial fibrillation assessed by recurrence plot analysis.** Computers in Cardiology, Vol 25, p 197-200.
- 6) V. Barbaro, P. Bartolini, G. Calcagnini, F. Censi, S. Morelli, A. Michelucci, GF. Gensini (1999). **A minimum-distance classifier for intra-atrial electrograms during atrial fibrillation.** Proceedings of V conference of the European Society for Engineering and Medicine, Barcelona, Spain, p 369-370.
- 7) Censi F., Barbaro V., Bartolini P., Calcagnini G., Michelucci A., Gensini GF., Cerutti S. (1999). **Spatio-temporal recurrent patterns of atrial depolarizations during atrial fibrillation assessed by recurrent plot analysis.** (Accettato su Annals of Biomedical Engineering).
- 8) Barbaro V., Bartolini P., Calcagnini G., Censi F., Michelucci A., Morelli S. (1999) **Mapping the Organization of Humans Atrial Fibrillation Using a Basket Catheter.** Computers in Cardiology, vol 26, p 475-478.
- 9) F. Censi, V. Barbaro, P. Bartolini, G. Calcagnini, S. Morelli, A. Michelucci, S. Cerutti (1999). **Independence of complexity and of predictability detect non-linear coupling of atrial activation processes during atrial fibrillation in humans.** Computers in Cardiology, vol 26, p 25-28.
- 10) Censi F., Barbaro V., Bartolini P., Calcagnini G., Morelli S., Michelucci A., Gensini GF., Cerutti S. (1999) **Detecting Non-Linear Coupling in Intra-Atrial Electrograms during Atrial Fibrillation Using Surrogate Data Analysis.** 3rd International Workshop on Biosignal Interpretation, Chicago, USA, p 218-221.
- 11) Boriani G., Pergolini F., Biffi M., Frabetti L., Zannoli R., Bartolini P., Barbaro V., Branzi A., Magnani B. (1998). **The follow-up of the implanted patient: How to utilize the diagnostic systems for the correct follow-up.** Proceedings of the VI Southern Symposium on Cardiac Pacing. 9-12 september, Giardini Naxos-Taormina, Italy Vol I, p 452-458.
- 12) Zecchi P., Montenero A.S., Bellocchi F., Barbaro V., Bartolini P., Pelargonio G., De Luca L., (1998). **Influence of ventricular shock on intracardial EGM and MAP detection.** Proceedings of the VI Southern Symposium on Cardiac Pacing. 9-12 September, Giardini Naxos- Taormina, Italy Vol II, p 157-161.
- 13) Barbaro V., Bartolini P., Bernarducci R., Martelli F., Morelli S. (1998). **Algoritmo di Riconoscimento e classificazione della Fibrillazione Atriale.** Atti del Convegno Nazionale Sanità e Sistemi medicali: Automazione ed Informazione. Milano 2-4 aprile 1998, p 119-123.
- 14) Barbaro V., Bartolini P., Bernarducci R., Delogu A., Martelli F. (1998). **Approccio tecnologico non convenzionale alla terapia della fibrillazione atriale.** Atti del convegno " Il paziente cardiopatico tra pratica clinica e sviluppo tecnologico". Ferrara, Italia, p 55-62.
- 15) Boriani G., Biffi M., Pergolini F., Manetti R., Gallina M., Bronzetti G., Magagnoli G., Bargossi A., Bartolini P., Barbaro V., Zannoli R., Branzi A., Magnani B. (1998). **Evaluation of shock-induced adrenergic activation during low energy internal atrial cardioversion.** Progress in clinical pacing, VIII International Symposium, Roma, 1-4 dicembre 1998, (abstract), p 44.
- 16) Michelucci A., Bartolini P., Padeletti L., Colella A., Porciani M.C., Sabini A., Morelli S., Zipoli R., Calcagnini G., Pieragnoli P., Costoli A., Barbaro V., Gensini G. (1999). **Computerized multisite Analysis of atrial electrophysiologic properties during human induced atrial fibrillation focus on spontaneous termination.** Cardiosim transmediterranean, vol 4, (abstract), p 71.
- 17) Michelucci A., Bartolini P., Padeletti L., Colella A., Porciani M.C., Sabini A., Morelli S., Zipoli R., Calcagnini G., Pieragnoli P., Costoli A., Barbaro V., Gensini GF. (1999). **Computerized multisite Analysis of atrial electrophysiologic properties during human induced atrial fibrillation focus on initial changes.** Cardiosim transmediterranean, vol 4, (abstract), p 71.
- 18) Michelucci A., Bartolini P., Padeletti L., Colella A., Porciani M.C., Sabini A., Morelli S., Zipoli R., Calcagnini G., Pieragnoli P., Costoli A., Vena S., Barbaro V., Gensini GF. (1999). **Monitoring of initial changes of atrial fibrillation at multiple sites helps to define therapeutic options.** XIth World Symposium on cardiac pacing and electrophysiology, Berlino, PACE Part II, vol 22 (abstract), p 209.

2.2 Indici di caratterizzazione delle protesi valvolari cardiache

Mauro GRIGIONI, Carla DANIELE, Vincenzo BARBARO
Laboratorio di Ingegneria Biomedica

Collaboratori: Giuseppe D'Avenio, Giulio Calcagnini, Piero Savini, Claudio Radiciotti, Giorgio de Angelis, Giuseppe Di Cintio, Alessandro Fasano

Sintesi dell'attività svolta nel corso del secondo anno

Introduzione

Nell'ambito del Sottoprogetto 2 "Endoprotesi cardiovascolari" è stata approfondita la caratterizzazione di protesi valvolari cardiache a doppia flangia, comunemente usate nella pratica clinica, tramite opportuni indici legati alla turbolenza associata all'emodinamica di tali dispositivi. In particolare, è risultato significativo il valore massimo del Reynolds shear stress (TSS_{MAX}), calcolato tramite semplici trasformazioni geometriche operate sul sistema di coordinate usato durante l'effettuazione delle misure di anemometria laser Doppler (LDA). Il TSS_{MAX} è, per definizione, una quantità indipendente dalla scelta del sistema di coordinate nel piano di misura, e permette di valutare il massimo sforzo di taglio che viene generato dai fenomeni turbolenti all'interno del fluido. In tal modo, una volta replicate le condizioni fisiologiche di flusso, si può quantificare il danno prodotto localmente dal campo di flusso generato a valle di una protesi valvolare sui costituenti ematici.

Materiali e metodi

Le misure di velocità sono state effettuate in condizioni di similitudine sia geometrica, mediante una replica in vetro soffiato di un'aorta di un soggetto sano, che cinematica, usando un fluido di appropriata viscosità cinematica (3.7 cSt), con il flusso aortico in vivo. Avendo effettuato misure di velocità in tali condizioni di similitudine, è ammissibile considerare le misure rappresentative dei reali campi di velocità e di sforzi di Reynolds presenti in vivo. Le misure in posizione mitralica sono state effettuate mediante una sezione cilindrica (diametro 75 mm) in perspex, con una minore influenza delle condizioni al contorno rispetto al caso aortico. Valvole di taglia pediatrica, come quelle qui considerate (19 mm di diametro nominale), non sono impiantate frequentemente in posizione mitralica, ma il loro studio in tali condizioni è comunque interessante, poiché valvole funzionalmente stenotiche tendono a produrre alti gradienti di velocità (e quindi alta produzione di turbolenza), rappresentando quindi un caso limite per tali protesi cardiache. Il regime imposto ($CO=6$ l/min) è stato scelto in base alle raccomandazioni della FDA, riguardanti l'opportunità di testare valvole protesiche al massimo regime riscontrabile in vivo.

Le misure anemometriche sono state sottoposte a diverse tecniche di analisi: il gate-time weighting (peso dato dal tempo di permanenza di ogni singola particella nel volume di misura), permette di rimuovere la sovrastima della velocità, conseguenza della maggiore frequenza di particelle veloci. Inoltre, la tecnica del filtraggio ellittico ha permesso di scartare dati troppo distanti dal centro della distribuzione.

Le dimensioni del volume di misura (intersezione dei fasci laser) hanno un effetto sui valori rms delle fluttuazioni di velocità (ovvero sui Reynolds normal stress), in quanto un volume di misura grande implica un'alta dispersione di valori di velocità, specialmente nelle zone dove la velocità media è rapidamente variabile (gradiente spaziale). Conseguentemente, anche il TSS_{MAX} , sarà tendenzialmente sovrastimato rispetto al suo vero valore. Le misure effettuate con un volume di misura di 1.4 mm (asse maggiore dell'ellissoide) hanno, in effetti, condotto a valori di TSS_{MAX} anche superiori al doppio, rispetto alle stesse misure effettuate con un volume di misura di 0.22 mm (cfr. Rapporto ISTISAN 97/19).

Risultati

In posizione aortica (cfr. i grafici riportati nel Rapporto ISTISAN 98/32), i profili di velocità e TSS_{MAX} relativi alle due valvole della St Jude sono caratterizzati da una sostanziale costanza nella forma dei profili per tutte le distanze a valle del piano valvola studiate (7, 14, 21 e 28 mm). La Sorin Bicarbon è caratterizzata da un getto centrale che si va indebolendo con la distanza; ciò è confermato dalle misure LDA in posizione mitralica, come vedremo più avanti.

Tre valvole (Sorin Bicarbon e St Jude, HP e Std.) sono state studiate in dettaglio a quattro distanze dal piano valvola. Questa scelta ha permesso di evidenziare come non sempre condizioni sfavorevoli, relativamente allo sforzo da turbolenza sulla parte corpuscolata del sangue, siano rilevate nelle immediate vicinanze della valvola; infatti, per tutte e tre le valvole studiate il massimo valore di TSS_{MAX} (turbulence shear stress massimo) è stato misurato oltre la prima stazione (a 7 mm a valle del piano valvola). In particolare, il TSS_{MAX} è generalmente caratterizzato da due alti picchi laterali, in corrispondenza del confine fra getto laterale e fluido circostante: tale zona è sede naturale di scambi d'energia cinetica fra masse di fluido a differente velocità, con produzione di turbolenza.

Al contrario, la valvola Sorin Bicarbon mostra una particolare evoluzione del profilo di TSS_{MAX} con la distanza, tale da avere un massimo nella zona centrale del flusso, dove si ha un basso valore di gradiente di velocità media: questo risultato, finora mai riportato, è inatteso, e rappresenta un effetto della curvatura dei leaflet.

In posizione mitralica sono state misurate, a due distanze dal piano valvola, tre valvole: SB, St Jude modello Standard e CarboMedics (Figg. 1 e 2). Data la simmetria della sezione mitralica, un semiprofilo è stato sufficiente a caratterizzare il campo di flusso lungo un diametro orizzontale, passante per l'asse della valvola.

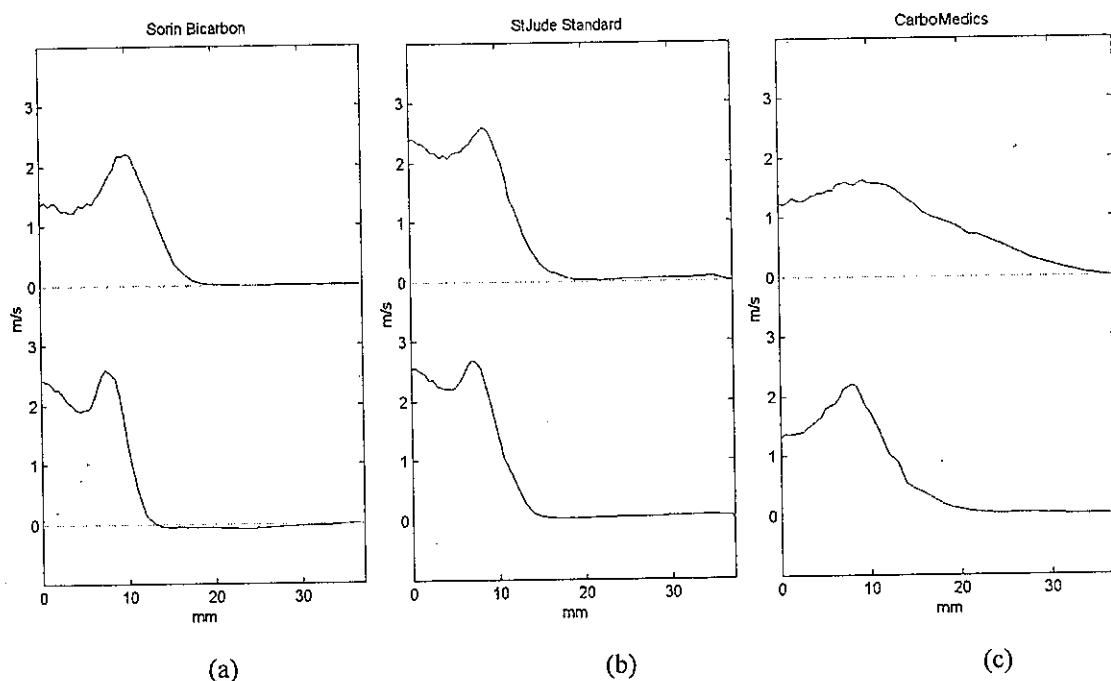


Figura 1. -Profili di velocità assiale media in posizione mitralica.
(a) Sorin Bicarbon, (b) St Jude Standard, (c) CarboMedics

St Jude Std. (al centro) presenta la maggiore uniformità del campo di velocità, come evidenziato anche dalle prove in posizione aortica. A sinistra, la SB ha un profilo a tre getti tipico di una bileaflet, a 13 mm di distanza (in basso); a maggiore distanza (26 mm, in alto), il getto centrale presenta una depressione rispetto al getto laterale. Questo effetto è correlato con un innalzamento dei valori del RNS al centro.

CM produce un campo molto esteso lateralmente, a 26 mm (Fig. 1c), dovuto probabilmente al fluttering dei leaflet che induce un allargamento del getto per effetto della turbolenza. Un altro effetto evidente di tale instabilità dei leaflet è dato dalla mancanza di un distinto getto al centro già alla minima distanza considerata, come d'altronde succede anche quando la stessa valvola è montata in posizione aortica.

A sinistra, la SB presenta inaspettatamente un picco di TSS_{MAX} maggiore alla distanza di 26 mm rispetto a 13 mm. Questo è chiaramente correlato con l'innalzamento dei RNS al centro, indotto dalla curvatura dei leaflet. A 13 mm di distanza, CM presenta due picchi di TSS_{MAX} , correlabili con le due zone di interfaccia fra il getto laterale e il fluido circostante. A 26 mm, tale correlazione fra gradiente di velocità e TSS_{MAX} è meno evidente, a causa dei fenomeni di rimescolamento turbolento nel fluido.

La valutazione dei dati di TSS_{MAX} misurati è legata al valore della soglia per il danneggiamento. Uno studio fra i più citati a riguardo è quello di Sallam e Hwang (*Biorheology* 21, 783-797, 1984), che riportano un valore critico di 400 N/m^2 per l'inizio dell'emolisi. L'importanza di questo lavoro consiste in uno studio diretto degli effetti della turbolenza sugli eritrociti, diversamente da altri lavori che hanno considerato regimi laminari, poco rappresentativi della situazione fisica creata da protesi valvolari ad alti regimi di portata. Mediante un'analisi dei dati presentati in tale studio, si può calcolare che il valore di massimo sforzo di taglio nelle condizioni del predetto esperimento era sostanzialmente superiore, per cui la soglia per l'emolisi è da considerarsi non inferiore a 600 N/m^2 , per brevi tempi di esposizione.

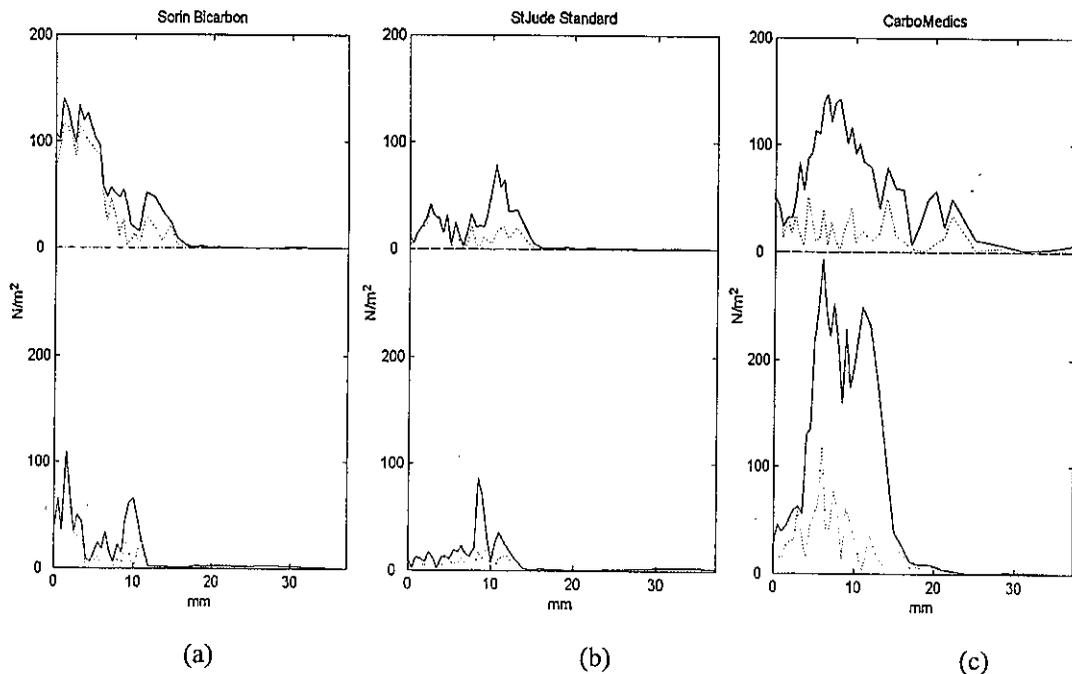


Figura 2. - Profili di TSS_{MAX} (linea continua) e TSS misurato (linea tratteggiata) in posizione mitralica. (a) Sorin Bicarbon, (b) St. Jude Standard, (c) CarboMedics)

Un altro importante aspetto fluidodinamico delle valvole cardiache è costituito dalla relazione che lega la caduta di pressione transvalvolare al flusso che le attraversa. Generalmente, considerando flussi stazionari, si fa riferimento alla formula $\Delta p = kQ^2$, dove si assume che k sia inversamente proporzionale al quadrato di A (area dell'orifizio interno della valvola). Un esame più dettagliato del problema idraulico, invece, dimostra che ogni valvola ha una sua dipendenza da A , esprimibile con un esponente generalmente minore di $n = -2$.

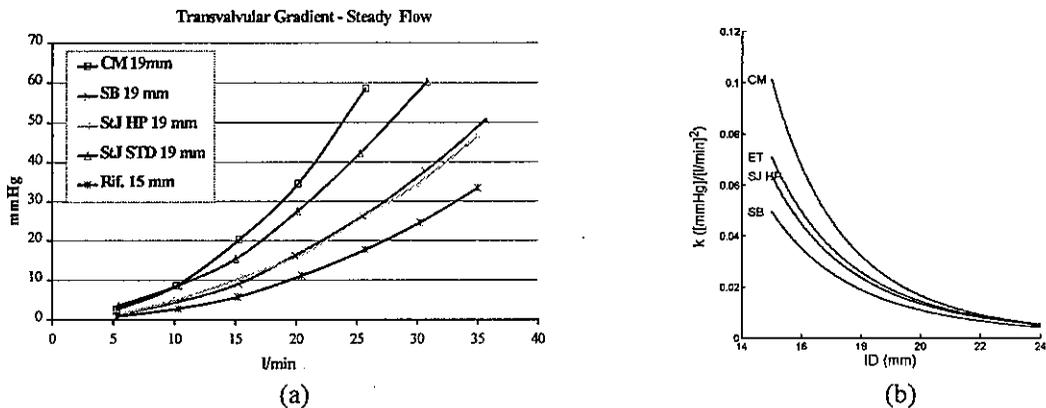


Figura 3 - Prove a flusso continuo: (a) caduta di pressione; (b) dipendenza del coefficiente k dal diametro interno

Conclusioni

La serie di misure effettuate con la tecnica LDA costituisce una delle caratterizzazioni, non frequenti anche a livello internazionale, di valvole meccaniche a doppia flangia, con alto grado di definizione del campo fluidodinamico ad esse associato. Inoltre, l'oggetto di tale serie di misure, vale a dire valvole di taglia pediatrica (19 mm), la rende unica fra gli studi sperimentali disponibili in letteratura. I risultati delle prove anemometriche hanno consentito di correlare le caratteristiche progettuali (area dell'orifizio interno, angolo e forma delle flange) e il campo di flusso a valle di ciascuna valvola. Tenuto conto delle condizioni sperimentali, piuttosto onerose, a cui sono state sottoposte, le valvole testate hanno generalmente mostrato valori di TSS_{\max} ai limiti del valore di soglia per l'emolisi, essendo quindi auspicabili ulteriori miglioramenti.

Pubblicazioni

- Barbaro V, Grigioni M, Daniele C, D'Avenio G, Boccanera G. 19 mm sized bileaflet valve prostheses' flow field investigated by bidimensional laser Doppler anemometry (part I: velocity profiles). *Int J Artif Organs* 1997 Nov;20(11):622-8
- Barbaro V, Grigioni M, Daniele C, D'Avenio G, Boccanera G. 19 mm sized bileaflet valve prostheses' flow field investigated by bidimensional laser Doppler anemometry (part II: maximum turbulent shear stresses). *Int J Artif Organs* 1997 Nov;20(11):629-36
- Grigioni M., Daniele C., D'Avenio G., Barbaro V. LDA two-dimensional measurements of the flow field across three small sized bileaflet cardiac valves. XXVth ESAO Congress - Bologna, 11-13 Nov. 1998. Abstract pubblicato sulla rivista *Int J Artif Organs* 21 (10):647, 1998.
- Barbaro V., Grigioni M., Daniele C., D'Avenio G. Principal Stress analysis in LDA measurements of the flow field downstream of 19 mm Sorin Bicarbon prosthetic heart valve. *Technol Health Care* 1998 Nov;6(4):259-70
- Grigioni M., Daniele C., D'Avenio G., Barbaro V. Hemodynamic performance of small-size bileaflet valves: pressure drop and LDA study comparison. XXVIth ESAO Congress - Edinburgh, 3-6 Aug. 1999. Abstract in corso di pubblicazione sulla rivista *Int J Artif Organs*.
- Grigioni M., Daniele C., D'Avenio G., Barbaro V. A discussion on the threshold limit for hemolysis related to Reynolds shear stress. *Journal of Biomechanics* 1999, Vol. 32:10, pp. 1107-1112

2.3 Caratterizzazione delle proprietà elastiche delle protesi vascolari

Carla DANIELE, Mauro GRIGIONI, Vincenzo BARBARO
Laboratorio di Ingegneria Biomedica

Collaboratori: R. Gensabella, G. Evangelisti, G. De Angelis, G. Di Cintio, A. Fasano

Sintesi dell'attività svolta nel corso del secondo anno

L'attività di ricerca svolta durante il secondo anno ha riguardato principalmente l'applicazione di modelli matematici per lo studio delle non linearità relative alle proprietà viscoelastiche di protesi vascolari sintetiche e di vasi biologici (porcini) a partire dai dati di compliance.

Sono state inoltre realizzate misure di compliance statica e dinamica in vitro su protesi vascolari in Dacron di diverso tipo (a maglia e tessute) e di differenti diametri (6, 8, 12 mm), presenti attualmente sul mercato, al fine di valutarne le proprietà meccaniche. Le stesse misure sono state effettuate anche su protesi in tessuto Goretex estensibili e inestensibili di diverso diametro e su protesi in Dacron gelificate, al fine di studiare aspetti e metodologie delle misure.

Infine su alcuni tipi di protesi (6 e 8 mm, tessute e a maglia) è stato misurato e determinato l'andamento della compliance in funzione del peso di tensionamento applicato alle protesi stesse. Con un semplice modello di simulazione sono stati calcolati i coefficienti di riflessione locale e globale in funzione del peso di tensionamento (legato alla definizione di lunghezza utilizzabile) tra protesi ed arterie di diametro simile (iliaca 6 mm e succlavia 8 mm). Lo scopo è quello di studiare il ruolo della lunghezza utilizzabile nel garantire le giuste prestazioni emodinamiche (in termini di disadattamento di impedenza) necessarie all'impianto di sostituzione vascolare.

Modelli non lineari

Sviluppo generalizzato. - A partire dalla relazione pressione-raggio $p=p(r)$ si è considerato il seguente sviluppo:

$$p(r) = a_1 + a_2 r + a_3 \frac{dr}{dt} + a_4 \frac{d^2 r}{dt^2} + a_5 r^2 + a_6 r \frac{dr}{dt} + a_7 \left(\frac{dr}{dt} \right)^2 + a_8 \left(\frac{d^2 r}{dt^2} \right)^2 + a_9 \left(\frac{d^2 r}{dt^2} \right)^2 r + a_{10} \frac{d^2 r}{dt^2} \frac{dr}{dt} + a_{11} r^3 + \dots$$

che comprende tutti i termini proporzionali a r , \dot{r} e \ddot{r} ed alle loro potenze, inclusi i termini misti. Considerando lo sviluppo fino ai termini del 4° ordine si ottiene un totale di 35 coefficienti a_i da stimare.

Approssimando nel senso dei minimi quadrati la relazione precedente con la curva sperimentale $p(r)$ è possibile ricavare il valore dei coefficienti a_i per i quali si riesce ad ottenere la migliore ricostruzione del segnale $p(r)$ stesso. Essendo la formula dello sviluppo lineare rispetto ai coefficienti a_i incogniti, la soluzione del problema ai minimi quadrati è esprimibile in forma chiusa. Questo comporta un doppio vantaggio sia per l'implementazione del programma di elaborazione, sviluppato in ambiente MATLAB, sia per la notevole riduzione dei tempi di calcolo ed elaborazione.

Per valutare i termini che danno maggior contributo nello sviluppo precedentemente descritto è stato assegnato a ciascun coefficiente a_i un opportuno peso e sono stati considerati tutti i termini di peso rilevante (rispetto ad una soglia prefissata). Ovviamente la presenza di coefficienti a_i con $i > 4$ è indicativa dell'esistenza di componenti non lineari (viscose o elastiche) nel diagramma $p(r)$ relativo alla protesi considerata.

Metodo di eliminazione del loop di isteresi. - Il modello considera sempre la curva sperimentale $p=p(r)$. Tale curva presenta un classico fenomeno di isteresi legato alla componente viscosa. Il modello determina separatamente il comportamento elastico e viscoso (Armentano et al.) delle protesi ricercando anche un termine (non lineare) proporzionale alla n -esima potenza di dr/dt (nuovo termine introdotto) in modo da minimizzare l'area del loop di isteresi. La relazione che viene considerata in questo caso è:

$$p(r) = f(r) + A dr/dt + B (dr/dt)^n$$

dove $f(r)$ rappresenta il contributo elastico. A e B vengono determinati in modo da minimizzare nel senso dei minimi quadrati l'area del ciclo di isteresi della curva $p(r)$.

Disadattamento di impedenza

A partire dal valore di compliance misurato per ciascuna protesi è stata calcolata con la classica equazione di Moens-Korteweg la velocità di propagazione e successivamente i coefficienti di riflessione locale (considerando l'impedenza caratteristica dell'arteria) e globale (con impedenza di ingresso dell'arteria) all'anastomosi protesi-arteria in funzione del peso di tensionamento applicato. Il coefficiente di riflessione locale (Noordergraaf) fornisce una caratterizzazione della riflessione di energia di tipo locale all'anastomosi tra arteria e protesi, mentre quello globale fornisce più direttamente informazione sulla quantità di energia globalmente riflessa dal sistema arterioso su cui è stato effettuato l'impianto. I dati relativi alle arterie iliaca e succlavia (dimensioni e velocità di propagazione) sono stati ricavati dalla letteratura.

Materiali e metodi

Tutte le misure di compliance sono state realizzate mediante il Dynatek Delta Compliance Tester DCT2A. Questo strumento è dotato di un motore in DC che azionando un meccanismo calibrato di trasmissione del moto (da circolare a lineare) permette di iniettare attraverso un opportuno soffiato un certo volume di fluido nella protesi e misurare dinamicamente (ad una frequenza fissata) e in condizioni isotoniche, le variazioni di volume e di lunghezza e la pressione interna del tubo protesico. Tali misure vengono compiute tramite due trasduttori LVTD ed un trasduttore piezoelettrico di pressione.

La compliance radiale può essere quindi determinata, in base alla sua definizione, calcolando il valore r_p assunto dal raggio in corrispondenza di una data variazione di pressione con le seguenti formule:

$$r_p = \sqrt{\frac{\frac{\Delta V}{\pi} + r_i^2 l_i}{l_p}} \quad C\% = \frac{r_p - r_i}{r_i} \times 100$$

La compliance è stata valutata sia in condizioni statiche che dinamiche ad una frequenza di 60 bpm (battiti al minuto) e negli intervalli pressori 50-90, 80-120 e 110-150 mmHg (sia per piccole che per grandi deformazioni). Sono state effettuate misure di compliance su protesi in DACRON del diametro di 6, 8 e 12 mm a maglia (knitted) e tessute (woven) delle ditte Sorin Biomedica e Bard, su protesi in tessuto Goretex di diverso diametro e su protesi in Dacron gelificate.

Risultati

Nelle tabelle 1 e 2 sono mostrati i risultati ottenuti per le misure di compliance statica e dinamica. Le misure di compliance realizzate in condizioni dinamiche per piccole deformazioni presentano valori notevolmente inferiori rispetto ai valori statici e per grandi deformazioni. Le protesi tessute sono più rigide di quelle a maglia e hanno quindi compliance più ridotte.

Tabella 1 – Compliance statica

Modello	Diam. (mm)	Tipo	Compliance Statica (80-120mmHg)
Bard bioinit	6	Knitted v.	5.797
Bard bioinit	8	Knitted v.	5.434
Sorin Carbograft	6	Knitted d.v.	6.151
Sorin Carbograft	8	Knitted d.v.	7.009
Bard Soft Woven	8	Woven	3.304
Sorin Carbograft	8	Woven	4.230
Bard Soft Woven	12	Woven	2.000
Sorin Carbograft	12	Woven	3.441
Gore 1	6	Estensibile	1.540
Gore 2	6	Inestensibile	1.266

Tabella 2 – Compliance dinamica

Modello	Diam. (mm)	Tipo	Compliance grandi deform. (0-150mmHg)			Compliance piccole deform.		
			C _{50-80mmHg} %	C _{80-120mmHg} %	C _{110-150mmHg} %	C _{50-80mmHg} %	C _{80-120mmHg} %	C _{110-150mmHg} %
Sorin Carbograft	6	Knitted d. v.	5.423	5.316	5.221	2.933	2.459	2.164
Sorin Carbograft	8	Knitted d. v.	7.347	7.269	6.764	4.261	3.268	2.581
Bard Bioinit	6	Knitted v.	7.645	6.029	5.554	4.485	3.457	3.194
Bard Bioinit	8	Knitted v.	5.054	4.262	3.963	3.214	2.518	2.384
Bard Soft Woven	6	Woven	5.482	5.128	5.107	2.851	2.314	2.121
Bard Soft Woven	8	Woven	5.025	4.841	4.625	1.716	1.685	1.452
Sorin Carbograft	12	Woven	-	-	-	2.350	1.974	1.680
Bard Soft Woven	12	Woven	-	-	-	1.617	1.430	1.299
Bard gel.	6	Knitted	-	-	-	-	0.836	-
Bard gel. (no gel)	6	Knitted	-	-	-	-	2.051	-
Bard gel	14	Knitted	-	-	-	-	1.755	-
Gore 1	6	Estensibile	2.403	2.128	1.887	1.748	1.058	0.664
Gore 2	9.5-11	Inest. Tapered	2.607	2.433	2.128	0.702	0.616	0.583
Gore 3	6	Inestensib.	2.524	2.416	2.231	0.693	0.579	0.516

Per quanto riguarda le variazioni di compliance con il diametro della protesi si osserva che nel caso delle Bard i valori diminuiscono all'aumentare del diametro nominale della protesi, mentre nell'altro caso si è ottenuto un comportamento opposto.

Le protesi in tessuto Goretex sono risultate poco complianti rispetto alle protesi in Dacron dello stesso diametro. Confrontando poi i valori di compliance sia statica che dinamica per le due protesi in Goretex da 6 mm si può osservare che la protesi di tipo inestensibile è risultata la più rigida.

Nelle protesi gelificate si osserva che la presenza del gel produce un indurimento della protesi (compliance più bassa). Una volta rimosso il gel, infatti, il valore di compliance aumenta.

Per lo studio del comportamento non lineare delle protesi vascolari e dei vasi biologici su cui sono state realizzate le misure è stato considerato innanzitutto lo sviluppo generalizzato precedentemente descritto. Nella tabella 3 sono riportati tutti i coefficienti significativi ottenuti.

Tabella 3 – Coefficienti dello sviluppo

Protesi	Diametro (mm)	Coefficienti significativi
Sorin	6	a ₁ , a ₂ , a ₃ , a ₄
Bard gel.	14	a ₁ , a ₂ , a ₃ , a ₄
Vaso porcino	7.5	a ₁ , a ₂ , a ₃ , a ₄ , a ₂₃
Vaso porcino	7.95	a ₁ , a ₂ , a ₃ , a ₄ , a ₂₃
Sorin gel.	6	a ₁ , a ₂ , a ₃ , a ₄
Gore 1 (estensibile)	6	a ₁ , a ₂ , a ₃ , a ₄ , a ₂₃
Gore 3 tapered (inestensibile)	9.5-11	a ₁ , a ₂ , a ₃ , a ₄
Gore 4 (inestensibile)	6	a ₁ , a ₂ , a ₃ , a ₄

Nella tabella 3, a₁, a₂, a₃ e a₄ sono i coefficienti relativi ai termini 1, r, dr/dt e d²r/dt², mentre a₂₃ rappresenta un termine misto non lineare. Dai risultati ottenuti quindi si evidenzia la presenza di non linearità nel caso dei vasi biologici e per la protesi in Goretex estensibile.

Applicando il modello per l'eliminazione del loop di isteresi alle misure effettuate sui campioni di vasi biologici si è visto che sottraendo alla curva p(r) il contributo viscoso (proporzionale a dr/dt) l'area del ciclo si è ridotta al 20.71% del suo valore iniziale. Sottraendo anche il termine proporzionale a (dr/dt)ⁿ

(con $n=2,3,4,5$) non si è avuta un'ulteriore significativa riduzione. Questo sembra confermare che possono esistere altri contributi non lineari che permetterebbero l'annullamento definitivo dell'area del ciclo di isteresi.

Nella figura 1 sono infine riportati gli andamenti del modulo dei coefficienti di riflessione locale e globale tra una protesi in Dacron 6 mm (a maglia) e le due arterie iliaca (6 mm) e succlavia (8 mm).

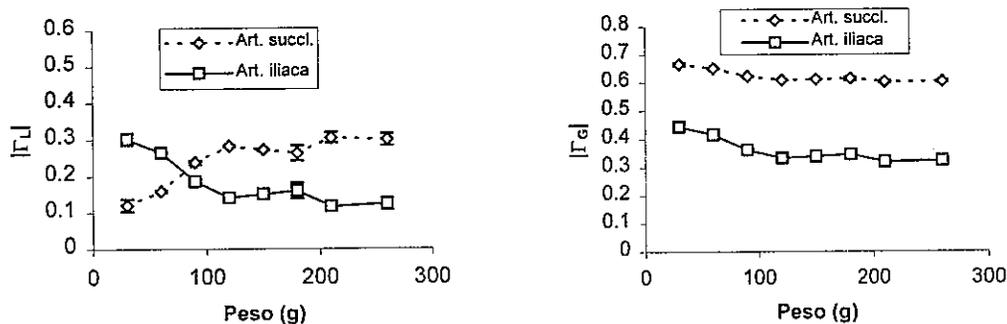


Figura 1.- Andamento di $|\Gamma_L|$ e $|\Gamma_G|$ per la protesi da 6 mm

Risulta evidente innanzitutto la necessità della scelta corretta del diametro della protesi all'atto dell'impianto. Inoltre il tensionamento indicato dalla casa costruttrice (corrispondente ad un peso di 125 g) è quello per cui si ottiene una condizione di adattamento stabile.

Conclusioni

I dati ottenuti per le misure di compliance statica e dinamica hanno consentito di valutare e confrontare la risposta meccanica di protesi di diverso tessuto e marca sottoposte o meno a processo di gelificazione.

Dai risultati si evince che le protesi woven sono più rigide rispetto alle protesi a maglia dello stesso diametro. La presenza del gel ha come effetto quello di ridurre i valori di compliance della protesi, mentre le protesi in tessuto Goretex hanno ottenuto i valori di compliance più bassi.

L'analisi non lineare ha messo in evidenza la presenza di contributi di non linearità per quanto riguarda i vasi biologici (porcini) mentre nelle protesi vascolari il gel non sembra introdurre elementi di non linearità. Per le protesi in Goretex un comportamento non lineare è stato osservato solo per quella di tipo estensibile.

Lo studio dei coefficienti di riflessione locale e globale all'anastomosi tra protesi e arterie di diametro simile ha messo in luce l'importanza del ruolo della lunghezza utilizzabile e del corretto tensionamento della protesi all'atto dell'impianto una volta scelto il diametro corretto.

Pubblicazioni

1. Grigioni M., Daniele C., Gensabella R., D'Avenio G., Barbaro V. **The role of usable length in the measurement of the compliance of vascular prostheses.** Poster presentation al Congresso E.S.A.O., Edimburgo, Scozia, 3-6 Agosto 1999.

Sottoprogetto 3 – Protesi e dispositivi esterni per la riabilitazione motoria

3.1 Studio e sviluppo di nuovi dispositivi atti al recupero dell'autonomia del disabile ed al suo reinserimento sociale

Velio MACELLARI, Marina TORRE, Antonello FADDA
Laboratorio di Ingegneria Biomedica, ISS

Collaboratori: Gianni Maccioni, Giorgio De Angelis, Alessandro Fasano, Federico Miroballo,
Marco Marchetti¹, Andrea Macaluso¹, Daniela Coratella¹,
Francesco Lacquaniti², Renato Grasso², Vincenzo Castellano²
Laboratorio di Ingegneria Biomedica, ISS

¹ Istituto di Fisiologia Umana, Università "La Sapienza", Roma

² Istituto di ricovero e cura a carattere scientifico "S. Lucia", Roma

Sintesi dell'attività del secondo anno

Nel corso del secondo anno di attività si è proceduto alla validazione del sistema di allevio del peso corporeo denominato WARD, già realizzato in forma prototipale nel corso del primo anno. A tal fine sono state eseguite prove sistematiche su soggetti sani che hanno contribuito a formulare indicazioni

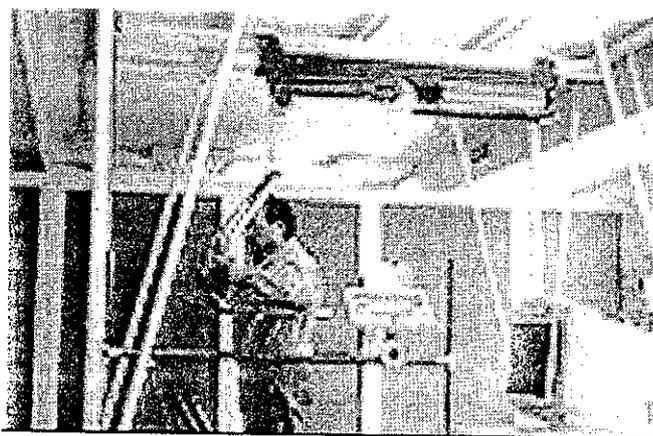


Figura 1. Vista dell'attuatore pneumatico della forza di sgravio

d'uso del sistema e migliorie tecniche dell'apparato, particolarmente mirate a favorire l'uso clinico nella salvaguardia della sicurezza del paziente.

L'analisi dei dati relativi alla deambulazione di soggetti sani su treadmill abbinato con il WARD ha permesso di trarre alcune importanti considerazioni riguardo al modificarsi del pattern motorio in funzione della velocità di progressione e della percentuale di allevio del peso. Ai soggetti era stato richiesto di camminare nella maniera più naturale possibile seguendo un protocollo che prevedeva varie combinazioni velocità/sgravio; con velocità variabili da 1 a 6 km/h e con sgravi da 10 a 80%.

Contemporaneamente veniva loro richiesto di esprimere il grado di disagio provato nell'effettuare il task motorio, attribuendo un punteggio da 0 a 2 (0 = nessun disagio, 1 = lieve disagio, 2 = marcata difficoltà). Le figure 2e 3 riportano, in funzione della velocità e dello sgravio, il coefficiente di variazione del periodo del passo ed il disagio medio dichiarato per ogni condizione di prova. Si può notare che nelle zone individuate da bassi sgravi e basse velocità o da alti sgravi ed alte velocità si verifica un incremento notevole del coefficiente di variazione. Questo dato può essere interpretato come l'effetto di una oggettiva difficoltà nel camminare in determinate condizioni, difficoltà che, perturbando lo svolgimento dell'atto motorio, ne determina una maggiore variabilità temporale. Questa interpretazione viene confermata dalle valutazioni soggettive contemporaneamente registrate, che in quelle stesse zone di alta variabilità indicano un proporzionale maggior punteggio nella scala di disagio adottata.

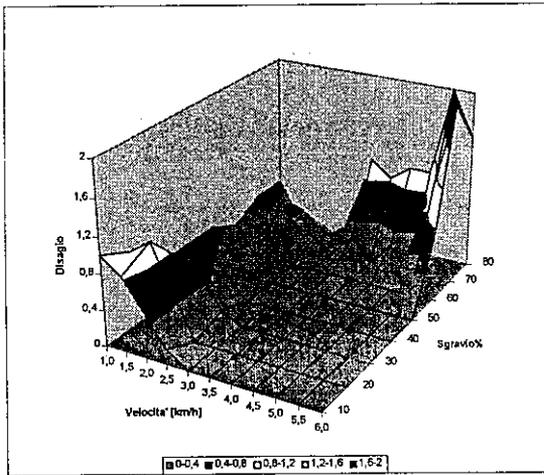


Figura 1.- Grado di disagio dichiarato dai soggetti per le combinazioni velocità/sgravio imposte

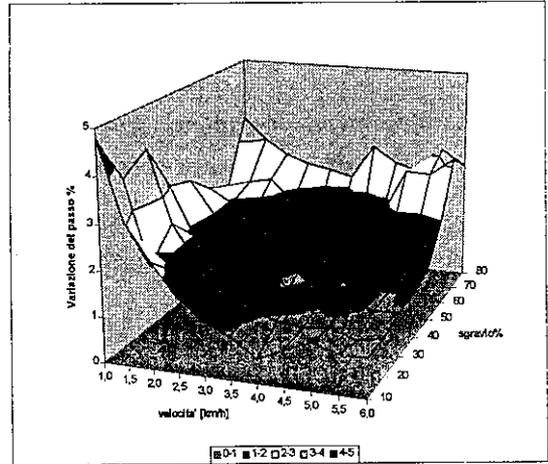


Figura 2.- Coefficiente di variazione del periodo del passo per le varie combinazioni velocità/sgravio imposte

Partendo da queste considerazioni e tenendo conto dei risultati conseguiti nell'utilizzo del WARD su soggetti patologici, si può concludere che nella fase iniziale della terapia riabilitativa, quando gli sgravi assumono i valori massimi, l'uso di basse velocità sia dettato non solo dalle ridotte capacità motorie del paziente ma anche da condizioni legate alle precedenti considerazioni generali. Con il progredire della terapia invece, quando il soggetto riacquista una discreta capacità di deambulazione e lo sgravio viene progressivamente ridotto, non si deve esitare ad aumentare corrispondentemente la velocità di avanzamento del nastro, al fine di non cadere nelle zone di disagio evidenziate dalla sperimentazione. Considerazioni sull'andatura ottima in termini energetici danno un supporto scientifico a questa conclusione. Ad una tale andatura si può infatti assumere, con buona approssimazione, che in un ciclo del passo la variazione di energia potenziale del centro di massa uguagli la variazione di energia cinetica; tale assunto insieme al desiderio di mantenere la stessa geometria del movimento alle diverse condizioni di sgravio, porta alla stima della velocità da imporre V_i , in funzione della velocità iniziale V_0 , mediante la seguente equazione: $V_i = V_0 \sqrt{1 - S}$

L'analisi dei dati ha evidenziato che sussiste una dipendenza lineare della cadenza, data dall'inverso del periodo del passo, dalla velocità di progressione del soggetto normalizzata rispetto alla statura. La regressione lineare sui dati ha fornito infatti buoni valori del coefficiente di correlazione ($r^2_{\text{medio } 10\%-80\%} = 0,983 \pm 0,007$) più prossimi a 1 per sgravi compresi tra 10% e 40%. Questo tipo di correlazione è in accordo con quanto proposto da Grieve & Gear [1].

I dati di funzionamento della macchina precedentemente acquisiti sono stati utilizzati per la costruzione di un semplice modello meccanico linearizzato, che ha consentito di individuare e caratterizzare i fattori principali che determinano le prestazioni di questa classe di dispositivi, traendo infine indicazioni per una progettazione che ne favorisca la diffusione in ambito clinico.

Se ci si limita a considerare le sole forze verticali si ottiene uno schema come in fig. 5, dove viene definito un asse x orientato verso l'alto e dove la reazione al suolo R_s viene scomposta nelle sue componenti statiche e dinamiche. Se la forza di sollevamento F_0 viene espressa come frazione del peso corporeo Mg mediante un coefficiente S di sgravio, si ha che $F_0 = MgS$; se inoltre si esplicita un termine di errore R_e si ha l'espressione:

$$(1) R_s = M \cdot g \cdot (1 - S) + M \cdot \frac{\partial^2 x}{\partial t^2} + R_e$$

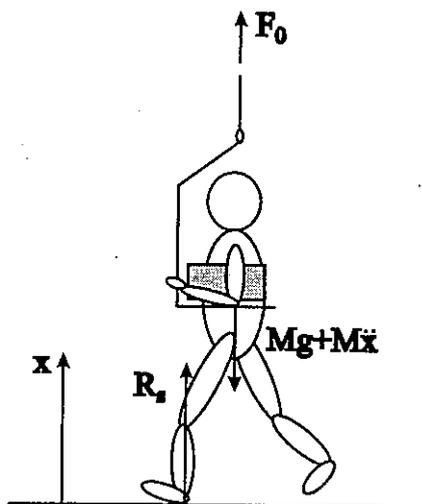


Figura 5.- Equilibrio delle forze che agiscono sul paziente

pratico e, dopo aver sviluppato i prodotti incrociati e raggruppato i termini risultanti, si giunge alla seguente equazione:

$$(3) E = \frac{S}{1-S} \cdot f_1(V) + \frac{1}{1-S} \cdot \frac{f_2(V)}{M \cdot g}$$

che rappresenta il rapporto tra reazione d'errore e reazione media al suolo (con sgravio), ovvero indica in termini percentuali lo scostamento dalla situazione ideale dovuto alle imperfezioni dell'apparato. Si nota che le variabili S e V sono separate e la forma fattorizzata si presta a facili ed utili interpretazioni, tenuto conto che $f_1(V)$ è una funzione lineare che dipende da rendimento meccanico, attrito viscoso ed elasticità mentre $f_2(V)$ dipende da attrito statico e masse mobili. In pratica il contributo del secondo addendo risulta preponderante per sgravi medio-bassi e di conseguenza risulta decisiva, per una buona riuscita del progetto, la riduzione degli attriti statici nel cilindro pneumatico e la leggerezza di tutte le parti mobili. La (3) consente anche di prevedere che dispositivi di diversa concezione, basati sull'uso di elementi elastici, possono mostrare una più marcata degradazione delle prestazioni quando siano richieste le velocità e gli sgravi più alti. Sono stati quindi migliorati alcuni aspetti tecnici legati alla sicurezza e facilità d'uso dell'apparato in ambito clinico.

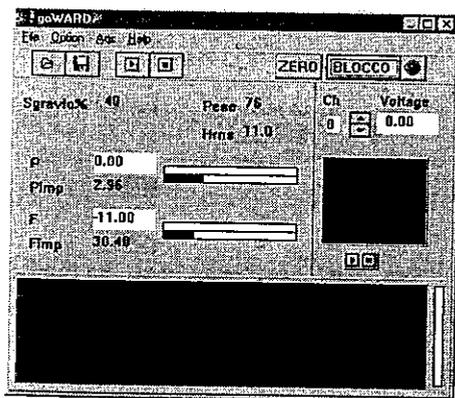


Figura 6. - Interfaccia utente di tipo grafico per la gestione del sistema

Nel limite delle semplificazioni fatte si vede che la presenza di una forza di sollevamento costante produce lo stesso effetto di una gravità ridotta per un fattore 1-S. Questa situazione viene ritenuta ottimale per l'espressione di un armonico pattern motorio. Il termine di errore R_e , che ci allontana da questa situazione ideale, nasce dai limiti tecnici dell'apparato di sollevamento e può essere posto nella forma generale:

$$(2) R_e = \pm F_f + K \cdot x + B \cdot \frac{\dot{x}}{\dot{a}} + M_i \cdot \frac{\partial^2 x}{\partial t^2}$$

Si riconosce nell'ordine un termine di attrito statico, una forza elastica, un attrito viscoso e la forza d'inerzia delle masse mobili. Mediante misure sulle parti componenti e prove meccaniche sul dispositivo completo sono stati determinati i singoli coefficienti risalendo alla loro origine e determinando una espressione della loro dipendenza dalle condizioni operative. In particolare è risultato che, a parte le costanti, tutti i termini presenti nell'espressione di R_e dipendono con legge crescente sia dalla velocità di avanzamento che dallo sgravio. Questa dipendenza può essere ben rappresentata da espressioni lineari nell'intervallo di valori velocità-sgravio di interesse

Il controllo della pressione avviene ora con un diverso sistema, grazie al quale gli interventi delle valvole di regolazione sono ridotti al minimo. In pratica, dopo il raggiungimento della pressione a cui corrisponde lo sgravio prescelto, gli interventi divengono sporadici, dovendo semplicemente provvedere a compensare le piccole perdite del circuito pneumatico. Ne risulta un funzionamento silenzioso e totalmente privo di irregolarità, che comunica al paziente una sensazione di tranquillità e sicurezza che favorisce il proficuo svolgimento della terapia. Il software di controllo è ora dotato di una interfaccia utente di tipo grafico che ne semplifica l'uso da parte degli operatori sanitari nella routine riabilitativa. Per le applicazioni di ricerca viene usata una versione (fig. 6) simile alla precedente nelle funzioni di base, ma dotata di finestre e controlli dedicati all'acquisizione di segnali.

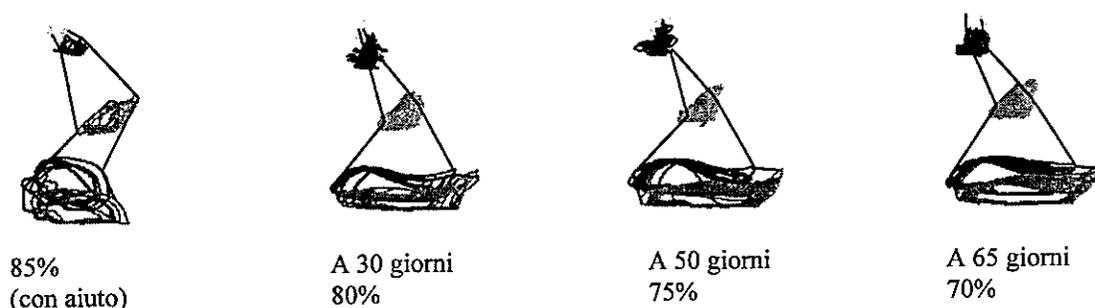


Figura 7.- Follow-up di un paziente paraplegico mediante analisi cinematica. Lo sgravio è stato progressivamente ridotto dall'85% al 70%.

Questi possono provenire dai trasduttori di grandezze meccaniche inclusi nell'apparato stesso o da altri canali dedicati all'analisi del movimento o allo studio di altri parametri fisiologici. Il convertitore analogico-digitale e tutta l'elettronica di controllo sono alloggiati nell'apparato ed il collegamento con il PC si riduce ad un cavo parallelo standard, rendendo possibile l'uso di unità portatili. Tutte le versioni del software comprendono dei controlli di sicurezza che, riconoscendo delle condizioni di pericolo in base ai valori dei parametri attuali ed impostati, bloccano il sistema ed attivano un allarme. Il blocco può essere azionato manualmente dall'operatore ma la sua rimozione è comunque condizionata dal ripristino delle condizioni di sicurezza. L'eventuale interruzione dell'energia elettrica non produce effetti imprevisti o pericolosi per il paziente. Il sistema, in uso presso l'Istituto di ricovero e cura a carattere scientifico "S. Lucia", si è rivelato efficace per la riabilitazione di pazienti neurolesi di varia gravità e si vanno stabilendo protocolli applicativi per le diverse tipologie di pazienti. Per informazioni più dettagliate sul sistema e sulle applicazioni si può far riferimento ai lavori riportati in bibliografia [2 - 8].

L'efficacia della metodica è stata valutata mediante lo studio del movimento di punti di riferimento anatomici. In figura 7 si riporta, a titolo di esempio, il caso di un paziente paraplegico. Si può vedere come a circa due mesi dall'inizio della terapia le traiettorie descritte da punti di riferimento solidali con la cavaglia, con il ginocchio e con l'anca siano simili a quelle di un cammino normale.

Bibliografia e Pubblicazioni

1. Grieve D.W., Gear R.J. The relationship between length of stride, step frequency, time of swing and speed of walking for children and adults. *Ergonomics*, 9(5), 379-399, 1966
2. Torre M., Riabilitazione della deambulazione mediante dispositivi di allevio del peso corporeo. Atti del IV Seminario ILITEC Tecnologie al Servizio dell'Uomo. Roma, 19-22 Novembre 1997. p. 71-8
3. Gazzani F., Bernardi M., Macaluso A., Coratella D., Ditunno JF Jr., Castellano V., Torre M., Macellari V. and Marchetti M., **Ambulation training of neurological patients on the treadmill with a new Walking Assistance and Rehabilitation Device (WARD)**. *Spinal Cord*, (37), 336-344, 1999
4. Gazzani F., Fadda A., Torre M., Macellari V., **WARD: A Pneumatic System For Body Weight Relief in Gait Rehabilitation**. *IEEE Transaction on Rehabilitation Engineering* (in press)
5. Castellano V., Macaluso A., Bernardi M., Scivoletto G., Vona V.U., Macellari V., Torre M. (1997) La deambulazione con allevio costante del peso corporeo nella rieducazione delle lesioni muscolo-scheletriche degli arti inferiori. *Med Sport*, 50 (Suppl.1 al n.4), 341-346.
6. Castellano V., Bernardi M., Coratella D., Gazzani F., Macaluso A., Macellari V., Marchetti M., Torre M. Walking rehabilitation by means of a weight relief device. 10° Congresso Europeo di Medicina Fisica e Riabilitazione. Rome, Italy, June 1-4. 1997. Abstracts, 116.
7. Grasso R., Zago M., Macellari V., Lacquaniti F. **Gait patterns in paraplegic patients walking on the treadmill with weight unloading : evidence for motor equivalence?** 29th Annual Meeting della Society for Neuroscience, Abstracts, vol.25, part 1. Miami Beach, Fla., October 23-28, 1999.
8. Grasso R., Fadda A., Macellari V., Lacquaniti F. **Applicazione dell'analisi del movimento per la valutazione dell'efficacia di un sistema di sgravio del peso corporeo nella riabilitazione dei pazienti mielolesi**. Abstracts del convegno nazionale Analisi del Movimento in Clinica: presente e futuro. p. 25, Roma 28-29 ottobre 1999.

3.2 Strumentazione per la misura del movimento e valutazione della disabilità motoria

Velio MACELLARI, Antonello FADDA, Claudia GIACOMOZZI

Laboratorio di Ingegneria Biomedica

Collaboratori: G. Maccioni, G. De Angelis, A. Fasano, L. Uccioli¹, A. Cappozzo²

Lab. di Ingegneria Biomedica, ISS; ¹Dipartimento di Medicina interna, Università di Roma Tor Vergata.

²Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Sassari.

Sintesi dell'attività svolta nel corso del secondo anno

Introduzione

Gli obiettivi di questa linea di ricerca erano lo sviluppo di metodi e di strumenti di misura atti a stimare lo stato di abilità motoria al fine di acquisire informazione utile a pianificare l'intervento riabilitativo e a valutarne l'efficacia. Tutto doveva essere progettato in funzione dell'impiego clinico e quindi si doveva perseguire la semplicità d'uso, pur preservando la completezza dell'analisi, oltre alla riduzione dei costi e degli spazi di laboratorio che costituiscono generalmente il maggior impedimento alla diffusione dei sistemi di analisi del movimento più complessi. Particolare attenzione è stata rivolta ai sistemi di misura indossabili perché sono potenzialmente poco costosi e possono essere utilizzati anche fuori dal laboratorio, per la telemetria del movimento in ambienti quotidiani di vita. Queste qualità vanno generalmente a scapito della accuratezza della misura, ma questo specifico problema va affrontato cercando, da un lato, di migliorare i dispositivi e, dall'altro, di valutarne i limiti per identificarne i campi in cui le misure che forniscono possano essere tuttavia ritenute adeguate. Ciò è stato fatto nella realizzazione di due diversi dispositivi: il primo per la misura della evoluzione della risultante della reazione di appoggio di ogni piede durante deambulazione, ed il secondo per la stima della posizione e dell'orientamento nello spazio di un segmento corporeo. Lo studio dell'interazione piede-suolo richiede strumentazione relativamente semplice, poco ingombrante e nessuna bardatura per il paziente, costituisce pertanto un approccio di misura ideale, è quindi opportuno sfruttarne al massimo le potenzialità. Il nostro contributo a questo obiettivo è stato lo sviluppo di una pedana integrata, denominata piezodinamometrica, che consente di misurare contemporaneamente la distribuzione delle pressioni sulla superficie di appoggio e le tre componenti della forza risultante in una sottoarea della stessa superficie di appoggio selezionabile a piacere. In questo anno lo strumento è stato utilizzato per lo studio dell'alterazione dell'appoggio dei diabetici. Infine per migliorare l'accuratezza dei sistemi di misura è necessario provvedere ad una adeguata calibrazione. Relativamente ai sistemi di misura con matrici di trasduttori di pressione è stato realizzato un dispositivo di calibrazione con il quale è possibile caratterizzare simultaneamente più trasduttori.

Sistema per la telemetria del centro di pressione

Schematicamente, il sistema, brevettato, si compone di solette resistive per la rilevazione dell'interazione piede-suolo mediante sensori di pressione, di un sistema telemetrico per la trasmissione, istante per istante, delle informazioni relative alla posizione del centro di pressione e all'intensità della risultante verticale della reazione del terreno, e di un'applicazione windows dedicata a gestione del dispositivo, acquisizione ed elaborazione dei dati in tempo reale, memorizzazione delle informazioni rilevanti.

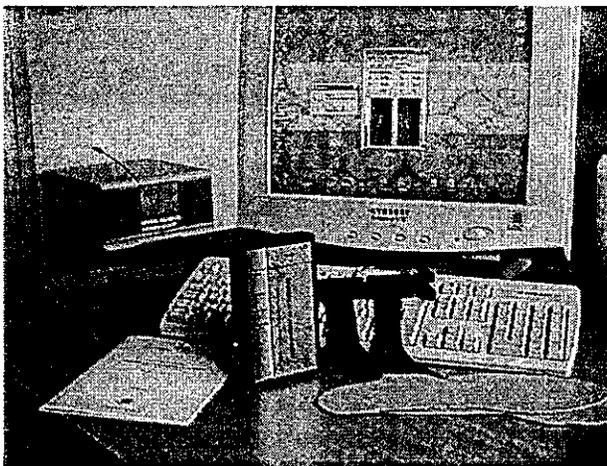


Figura 1.- Vista d'insieme del sistema.

Le solette sono formate da sensori piezo-resistivi interdigitati, ottimizzati relativamente alla linearità, realizzati su circuito stampato flessibile ad alta resistenza; ciascuna soletta contiene 64 sensori; opportuni circuiti di misura consentono l'estrazione della reazione verticale risultante, in termini di modulo e di punto di applicazione, senza dover trattare le risposte dei singoli sensori.

L'unità di controllo indossabile è governata dal microprocessore 8051; prevede la conversione A/D a 8 bit e la gestione di un protocollo di comunicazione seriale; include un trasmettitore a 433MHz; viene alimentata tramite due batterie a stilo (anche ricaricabili), e include tecniche hardware e software per limitare i consumi a 20mA a 5V.

Il protocollo di comunicazione seriale si basa sulla trasmissione di pacchetti di 7 byte di cui uno di sincronismo e 6 di dati, 3 per le coordinate longitudinale e trasversale del punto di applicazione e per il modulo della risultante verticale relativi alla soletta sinistra, e 3 per le corrispondenti informazioni relative alla soletta destra. La frequenza massima di campionamento è pari a 68Hz.

Nel secondo anno sono state promosse le applicazioni del sistema. Allo scopo è stata implementata una nuova versione del sistema nel quale l'informazione relativa alla posizione istantanea del centro di pressione rispetto alla lunghezza del piede viene restituita per via acustica al paziente. Ciò è stato realizzato per restituire a pazienti, che l'hanno perso, un feedback del contatto piede-suolo. L'efficacia di tale tecnica è tuttora in fase di sperimentazione su pazienti paraplegici portatori di ortesi reciprocanti (RGO).

Il sistema è stato utilizzato con successo anche nell'ambito delle seguenti due linee di ricerca afferenti al sottoprogetto 3: "Sensorizzazione di protesi per l'arto inferiore", di cui è responsabile la Dr. Zambarbieri; "Sistema di telemonitoraggio domiciliare multifunzionale per l'anziano", di cui è responsabile il Dr. Bedini.

Dispositivo indossabile per la stima della posizione e dell'orientamento di un segmento corporeo

La proposta progettuale prevede una strumentazione composta da un trasduttore cinematico, una unità per il condizionamento dei segnali, una unità per la conversione analogico/digitale ed un modulo per la trasmissione e la ricezione. Per la realizzazione del trasduttore cinematico sono state considerate essenzialmente due possibilità: l'uso di soli accelerometri e l'uso congiunto di accelerometri e sensori di velocità angolare.

Per verificare la possibilità di realizzare un dispositivo basato solo su accelerometri è stata effettuata l'analisi dei modelli matematici relativi all'uso di sei e di nove accelerometri, riportati in letteratura, con particolare attenzione agli effetti degli errori di costruzione sugli errori di stima di posizione ed orientamento. Data la complessità analitica del problema è stata effettuata un'ulteriore indagine mediante simulazione. I risultati hanno mostrato come anche errori relativamente contenuti nell'allineamento degli assi degli accelerometri ($0,1^\circ$) secondo direzioni prefissate comportano degli errori nella stima dell'orientamento tali da non consentire osservazioni superiori a circa 0,5s se si vuole contenere l'errore di stima entro 1° .

Non si sono riscontrate differenze sostanziali tra i modelli a sei ed a nove accelerometri. Dobbiamo concludere che la consistente divergenza rende gli accelerometri non utilizzabili per atti motori quotidiani, caratterizzati da tempi sicuramente superiori a qualche secondo.

Sulla base di questa esperienza è stato realizzato in forma prototipale un trasduttore composto da tre accelerometri monoassiali e da tre sensori di velocità angolare (gyrostar ENC - 05E - Murata).

I sensori di velocità angolare consentono, tramite integrazione, la stima dell'orientamento del segmento e quindi delle componenti dell'accelerazione di gravità che agiscono sui sensori di accelerazione le cui risposte possono pertanto essere corrette al fine della stima dell'accelerazione lineare del segmento stesso.

La stima dell'orientamento è resa agevole dalla insensibilità dei sensori di velocità angolare all'accelerazione di gravità.

I gyrostar sono affetti da una consistente deriva termica. Prove di laboratorio, effettuate su 5 esemplari, hanno permesso di quantificarla in un valore massimo di circa 8 gradi/s/°C. Allo scopo di ovviare a tale deriva termica è stato realizzato un particolare algoritmo.

La precisione nella stima dell'orientamento è stata valutata mediante un attuatore appositamente progettato, in grado di imporre al trasduttore un moto piano prestabilito. Sono state eseguite osservazioni

protratte per 10 s, imponendo rotazioni massime di 35° con funzioni temporali dell'angolo di tipo sinusoidale con periodi di 0,5; 1; 2 s. Gli errori massimi nella stima dell'orientamento sono di 0,9°, 1,5°, 4,5°, rispettivamente dopo 2 s, 5 s e 10 s dall'inizio dell'osservazione.

La precisione raggiunta può essere ritenuta adeguata tenuto conto che i movimenti transitori (alzata dalla sedia, inizio del cammino ecc.) ed il periodo dei movimenti periodici sono normalmente inferiori a 2s.

L'accuratezza nella stima dell'orientamento si riflette in maniera importante nell'accuratezza della stima dell'accelerazione. L'errore di un grado comporta, nel caso peggiore, rappresentato da una accelerazione normale a g, un errore assoluto di accelerazione di 0,17 m/s². Questo valore è critico e l'accettabilità in alcune specifiche applicazioni dovrà essere discussa.

Applicazione della Pedana piezodinamometrica

I nostri partner medici del Complesso Integrato Columbus di Roma, in accordo con ampia parte della letteratura più recente del settore, hanno ipotizzato che forze di taglio anomale, in particolare sotto i metatarsi, possano giocare un ruolo fondamentale nella formazione delle ulcere nel piede diabetico. Attualmente la pedana piezodinamometrica è l'unico strumento in grado di misurare le forze di taglio agenti in aree limitate della superficie di appoggio piede-suolo. Con questo strumento si è investigata l'evoluzione di tali forze durante il cammino sotto tre zone specifiche del piede: alluce, metatarsi e tallone. In generale, dal confronto con i sani di riferimento, sono emerse interessanti alterazioni delle forze tangenziali, in particolare della componente medio-laterale.

Lo studio preliminare è stato condotto su 8 soggetti sani utilizzati come controllo, 8 diabetici non neuropatici, 8 diabetici con neuropatia, e 4 diabetici con pregressa ulcera. I pazienti sono stati classificati in base ai criteri della Consensus Conference di San Antonio.

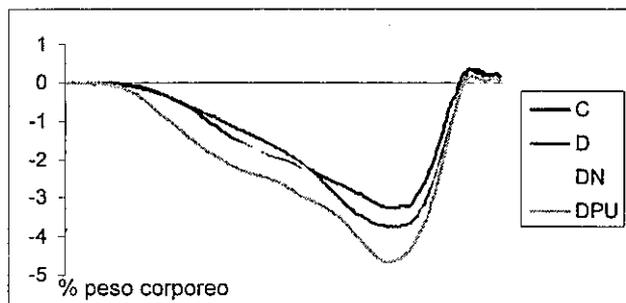


Figura 2.- Forze medio-laterali sotto i metatarsi. C: soggetti di controllo; D: diabetici; DN diabetici neuropatici; DPU: diabetici con pregressa ulcera.

Il protocollo di misura è stato progettato seguendo le linee guida raccomandate dal FIG (Foot Pressure Interest Group). Per ciascun paziente e per ciascun piede sono stati acquisiti 6 appoggi validi, scartando quelli incerti o visibilmente alterati.

Sono state calcolate e stimate le reazioni verticali e tangenziali corrispondenti, espresse percentualmente rispetto al peso corporeo e studiate in termini di andamenti, range e integrali. Gli andamenti temporali sono stati linearmente interpolati e poi mediati, per ciascun paziente, sulle 6 prove, e quindi sono stati calcolati i valori medi all'interno di ciascuna classe.

I risultati più nuovi ed interessanti sono stati i seguenti. L'aumento significativo della forza medio-laterale, negativa verso la parte distale del piede e gradualmente crescente passando dai pazienti non neuropatici ai diabetici neuropatici ed infine ai neuropatici con pregressa ulcera, è quasi del tutto dovuto all'aumento di detta forza sotto i metatarsi. La significativa diminuzione della forza medio-laterale sotto l'alluce, che nel piede diabetico in generale perde quasi completamente la sua funzione propulsiva.

Dispositivo di calibrazione per pedane di pressione

Il dispositivo di calibrazione è di tipo pneumatico e consente di caratterizzare i sensori di pressione sia singolarmente che nelle configurazioni a pedana, di dimensioni diverse. Esso è adatto sia per una calibrazione al termine della costruzione, sia per verifiche periodiche nell'ambiente di utilizzo. Sue caratteristiche principali sono: la precisione della pressione imposta e la sua costanza su tutta la superficie utile; la possibilità di variare rapidamente la pressione stessa, il che consente di quantificare la risposta in frequenza del sensore; la facilità di assemblaggio e la trasportabilità.

In figura 3 è riportata la sezione trasversale della testa del dispositivo. I cuscinetti lineari (2), consentono di muovere la testa lungo una struttura a ponte e quindi trasversalmente alla pedana in esame. La leva di posizionamento che agisce su una opportuna molla (1), preme l'elemento di acciaio inossidabile (5) contro la superficie gommosa protettiva della pedana, creando la camera di pressione (6). La pressione esercitata viene monitorata mediante il trasduttore di pressione miniaturizzato (4), mentre la cella di carico (3) misura la forza esercitata attraverso la molla. La dimensione della camera di pressione è il risultato di un compromesso tra due esigenze contrastanti: testare contemporaneamente il maggior numero di sensori, e contenere le forze in gioco e quindi il peso della struttura. La superficie utile è di $2.6 \times 2.6 \text{ cm}^2$, che per le nostre pedane, con risoluzione spaziale pari a 5 mm in entrambe le direzioni, comporta l'analisi simultanea di una matrice di 16 sensori.

Il piccolo volume della camera di pressione consente variazioni rapide della pressione stessa, quindi permette agevolmente l'analisi della risposta in frequenza dei sensori. La pressione in questa camera può essere alternativamente controllata da una valvola proporzionale o da una valvola on/off. La valvola proporzionale consente sia di mantenere

la pressione ad un valore impostato, il che consente di effettuare misure in condizioni statiche, sia di effettuare cicli sinusoidali fino alla frequenza di 1 Hz. La valvola on/off consente invece di imporre gradini di pressione con tempi di salita contenuti in circa 1 ms.

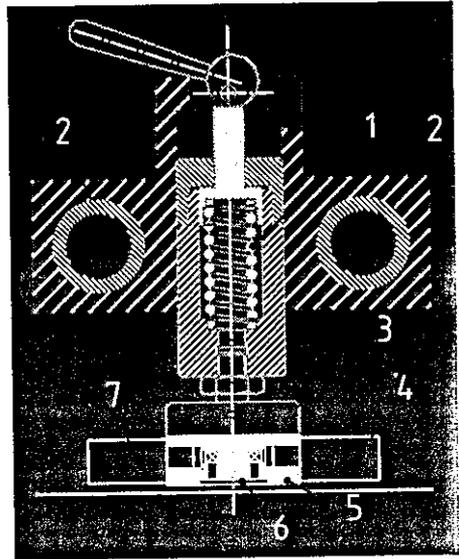


Figura 3.- Sezione trasversale della testa del dispositivo

Pubblicazioni

1. Macellari V., Giacomozzi C., Saggini R. (1999) **Spatial-temporal parameters of gait: reference data and a statistical method for normality assessment.** *Gait & Posture*, 10, 171-181.
2. Macellari V., Ripoli A., Belardinelli A., Palagi C., Franchi D., Deganello P., Tattarini M., Bedini R. (1999) **On the architectural design of a multi-sensor wearable telemetric device.** *Biotelemetry XV* (in stampa)
3. Giacomozzi C., Macellari V., Bernarducci R., Uccioli L., Caselli A., Giurato L., Lardieri L. (1999) **A piezo dynamometric platform to characterise shear forces in the diabetic neuropathic foot.** *Abstracts of the 6th Footpressure Interest Group International Meeting, Leeds, U.K.*
4. Giacomozzi C., Macellari V., Caselli A., Giurato L., Lardieri L., Uccioli L. (1999) **The diabetic neuropathic foot characterised by a force-pressure device.** *Abstracts of the 5th Conference of the European Society for Engineering and Medicine (Barcelona, Spain, May30th - June 2nd 1999) p. 99-100.*
5. De Angelis G., Giacomozzi C., Maccioni G., Macellari V., Mattia F. (1999) **A pneumatic device for the calibration of pressure platforms.** *Abstracts of the 5th Conference of the European Society for Engineering and Medicine (Barcelona, Spain, May30th - June 2nd 1999) p. 133-134.*
6. Uccioli L., Caselli A., Giacomozzi C., Macellari V., Giurato L., Lardieri L., Menzinger G. (1999) **A force-pressure device is able to detect abnormal shear force patterns in the diabetic neuropathic foot.** *Abstracts of the 35th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (Brussels Sept 28th - Oct 2nd 1999) p.A28.*
7. Mioballo F., Papa E., Cappozzo A., Macellari V. (1999) **Reconstruction of body segment 3-D position and orientation using accelerometric data: a feasibility study.** *Book of abstracts - International Society of Biomechanics XVII Congress, Calgary, Canada, 8-13 August, p. 706.*
8. Giacomozzi C., Macellari V., Leardini A., Benedetti M. G., Carson M., O'connor J.J. (1999) **An integrated instrument for the kinetic and kinematic characterisation of foot-ground interaction**

- during gait. Book of abstracts – International Society of Biomechanics XVII Congress, Calgary, Canada, 8-13 August, p. 755.
9. Fadda A., D'Alessio T., Macellari V. (1999) **Analog circuitry and resistive insoles allow simple telemetry of the center of pressure in a walking subject.** Book of abstracts – International Society of Biomechanics XVII Congress, Calgary, Canada, 8-13 August, p. 756.
 10. Macellari V., Giacomozzi C., Fadda A. (1999) **Strumenti per lo studio dell'interazione piede-suolo.** Abstracts del convegno nazionale **Analisi del Movimento in Clinica: presente e futuro.** p. 17, Roma 28-29 ottobre.
 11. Bedini R., Macellari V., Belardinelli A., Ripoli A., Palagi G., Franchi D., Fadda A., Maccioni G. (1999) **Monitoraggio a lungo termine dell'atto locomotorio al fine della valutazione del rischio di caduta.** Abstracts del convegno nazionale **Analisi del Movimento in Clinica: presente e futuro.** p. 97, Roma 28-29 ottobre.
 12. Benedetti M.G., Leardini A., Simoncini L., Montanari E., Giannini A., Giacomozzi C., Macellari V. (1999) **Applicazioni cliniche di un sistema integrato per l'analisi delle pressioni, delle forze di reazione piede-suolo e della cinematica delle principali articolazioni del piede.** Abstracts del convegno nazionale **Analisi del Movimento in Clinica: presente e futuro.** p. 99, Roma 28-29 ottobre.
 13. Giacomozzi C., Macellari V., Caselli A., Uccioli L. (1999) **Uso di una piattaforma piezo-dinamometrica per caratterizzare gli sforzi tangenziali nel piede diabetico.** Abstracts del convegno nazionale **Analisi del Movimento in Clinica: presente e futuro.** p. 106, Roma 28-29 ottobre.
 14. Miroballo F., Macellari V., Della Croce U., Cappozzo A. (1999) **Stima del movimento 3-D del tronco mediante un dispositivo indossabile.** Abstracts del convegno nazionale **Analisi del Movimento in Clinica: presente e futuro.** p. 110, Roma 28-29 ottobre

Sottoprogetto 4 – Trapianti di Organo

4.2 Rete Nazionale Trapianti di Organo

Pietro CHISTOLINI, Gianluca FRUSTAGLI, Velio MACELLARI, Dino A. MATTUCCI, Carlo PINI*,
Orsola PUGLIESE*, Francesca QUINTIERI*, Aurelia SARGENTINI
Laboratorio di Ingegneria Biomedica, ISS
*Laboratorio di Immunologia, ISS

Collaboratori: Monica Brocco, Settimio Ceccarelli°
Laboratorio di Ingegneria Biomedica

° Segreteria Consulta Nazionale per i Trapianti (art.13 D.PR. 16/6/97 n.409)

Sintesi dell'attività svolta nel corso del secondo anno

Sicurezza del sistema informativo.- L'architettura scelta per la sicurezza e la riservatezza del sistema informativo dei trapianti, realizzato dall'Istituto Superiore di Sanità in collaborazione con i Centri regionali e interregionali, prevede l'uso di un firewall per la protezione della rete locale dedicata alla gestione delle banche dati e l'implementazione di una Rete Privata Virtuale o VPN per la trasmissione crittografata dei dati su rete pubblica, quindi Internet. I database di gestione dati sono applicazioni distribuite a livello nazionale e prevedono un meccanismo di riallineamento che comporta la trasmissione delle informazioni fra le diverse stazioni di lavoro presenti sul territorio.

In generale, si può dire che i dati sono soggetti a problemi di protezione in almeno due momenti distinti: 1. quando le informazioni vengono archiviate sui supporti specifici che nel nostro caso si possono identificare con gli hard-disk dei diversi server su cui sono installati i database; 2. quando i dati viaggiano sulla rete telematica, ad esempio quando viene eseguito il meccanismo di aggiornamento.

Un firewall risponde alle esigenze del primo punto mentre una VPN garantisce la riservatezza delle informazioni sensibili che vengano trasmesse per mezzo di un collegamento ad Internet. Le principali caratteristiche di sicurezza che può garantire un firewall sono:

- Protezione dai servizi più a rischio, come ad esempio i messaggi ICMP.
- Controllo dell'accesso da parte di determinati servizi alle macchine della rete locale protetta; è possibile, ad esempio, permettere l'accesso dall'esterno ai computer della rete locale solo da parte di Mail-server.
- Sicurezza concentrata in un gruppo ristretto di macchine e quindi maggiore semplicità di gestione
- Privacy in quanto bloccando servizi come il DNS si impedisce che dall'esterno sia possibile avere informazioni sulle caratteristiche della rete locale.
- Monitoraggio in tempo reale dello stato delle trasmissioni tra la rete locale e l'esterno.

La figura 1 illustra l'architettura del sistema informativo attualmente utilizzato per il Programma di allocazione nazionale del rene pediatrico.

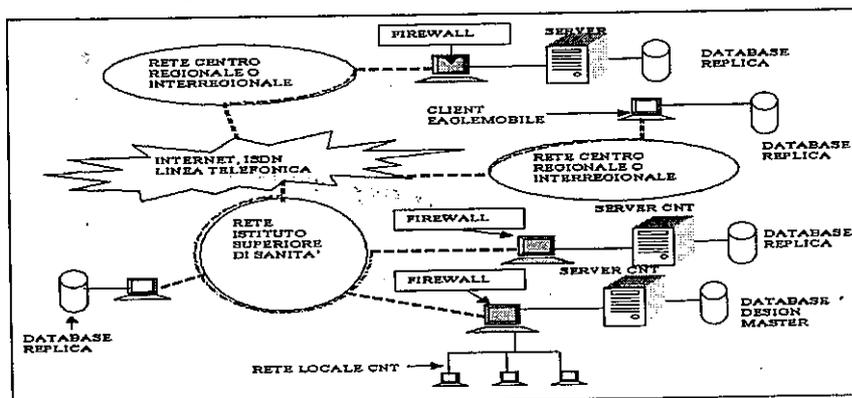


Figura 1.- Architettura del sistema informativo

Per quanto riguarda le esigenze di sicurezza necessarie al sistema informativo dei trapianti, ed in particolare alla applicazione di supporto al database distribuito, si sono fatte alcune considerazioni. Le elevate necessità di garanzie di sicurezza e il fatto che per l'aggiornamento sarà necessario un unico tipo di servizio TCP/UDP fanno sì che la migliore filosofia da perseguire sia quella di impedire ogni servizio esclusi quelli necessari (application gateway). E' importante perseguire una politica che consente la realizzazione di una VPN tra le eterogenee realtà informatiche dei Centri regionali ed interregionali; si sono quindi studiate delle soluzioni con buone caratteristiche di flessibilità. Infine, il basso volume di traffico non rende necessarie soluzioni ad alte prestazioni.

Analisi statistica dell'andamento della lista pediatrica nazionale per il trapianto di rene. - Il programma nazionale di trapianto pediatrico e la costituzione del database nazionale dei pazienti (adulti) in attesa di trapianto avviati dall'Istituto Superiore di Sanità, su impulso della Consulta Tecnica Trapianti, sono i primi risultati degli sforzi per definire ed avviare politiche di coordinamento dell'attività trapiantologica a livello nazionale. Il programma nazionale di trapianto pediatrico in particolare permette, oramai da più di due anni, di far condividere a tutte le organizzazioni di trapianto in Italia un'unica lista di attesa (per ognuna delle tipologie di trapianto: rene, cuore e polmone, fegato) strutturata secondo un formato ben definito ed aggiornata settimanalmente secondo protocolli concordati. Inoltre, nel caso del trapianto di rene, un algoritmo di allocazione, anche questo unico e concordato a livello nazionale, consente di generare automaticamente una graduatoria di assegnazione in occasione di ogni segnalazione di donazione. Ciò consente di dare ai piccoli pazienti in attesa maggiori possibilità rispetto a quelle che avrebbero nelle ordinarie liste di attesa delle organizzazioni di trapianto locali. I dati accumulati in questi due anni di attività consentono ora di ricavare in maniera organica informazioni statistiche sulla composizione e l'evoluzione delle liste di attesa. L'esposizione completa di questi risultati, che sarebbe articolata e complessa, viene qui limitata al caso della lista di attesa per il trapianto di rene (la più consistente dal punto di vista numerico) del programma nazionale pediatrico.

Sono stati utilizzati i dati (record) dei pazienti in lista di attesa contenuti nei file che vengono distribuiti settimanalmente dall'Istituto Superiore di Sanità a tutti i centri interregionali, per l'aggiornamento della lista di attesa stessa: Il periodo coperto va dal 27/6/1997 al 27/6/1999 (comprende quindi la quasi totalità della storia dell'attività della lista di attesa) e corrisponde a 86 aggiornamenti. Tutti i record, di ogni aggiornamento, sono stati riversati in un unico database che rappresenta così lo "storico" della lista di attesa e che è attualmente costituito da 9834 record. Ciò ha consentito di ricostruire la storia di ognuno dei pazienti "transitati" nella lista di attesa e di ottenere quindi in primo luogo le informazioni sugli ingressi e le uscite dalla lista. Queste informazioni sono state quindi combinate con quelle contenute nel database del registro trapianti gestito in collaborazione con il Laboratorio di Immunologia dell'Istituto Superiore di Sanità, in maniera da stabilire il motivo di ognuna delle uscite di lista (cioè se per trapianto, decesso o altro motivo) ed arrivare così ai tempi medi di attesa. Sono state successivamente ricavate delle informazioni riguardanti l'evoluzione nel tempo della composizione della lista relativamente ad età, gruppo sanguigno e presenza di pazienti iperimmunizzati.

I pazienti "transitati" nella lista di attesa, vale a dire sia quelli entrati e già usciti, sia quelli che attualmente vi permangono, sono risultati essere complessivamente 286. La tabella 1 riporta il numero di ingressi in lista divisi per centro interregionale e per anno (i due periodi, di un anno ciascuno vanno dal 27/6/1997 al 26/6/1998 e dal 27/6/1998 al 27/6/1999).

Tabella 1.- Numero di ingressi in lista di attesa per centro interregionale e per anno

CIRT	1997-98	1998-99	Totale
AIRT	8	7	15
NIT	51	54	105
OCST	44	19	63

La tabella 2 riporta il numero di uscite di lista divise per centro interregionale e per motivazione (trapianto, decesso, altro motivo, motivo sconosciuto) rispettivamente per l'anno 1997-98 e per l'anno 1998-99.

Tabella 2.- Numero di uscite da lista di attesa per centro interregionale per motivazione per gli anni 1997-98 e 1998-99.

1997 - 1998						
CIRT	Trapianto	Decesso	Altro motivo	Motivo sconosciuto	Totale	Pz. iperimmuni trapiantati
AIRT	3	0	0	2	5	1
NIT	70	2	4	0	76	3
OCST	22	1	0	6	29	0
Totale	95	3	4	8	110	4
1998 - 1999						
AIRT	5	0	1	0	6	1
NIT	39	0	20	8	67	2
OCST	13	2	1	5	21	0
Totale	57	2	22	13	94	3

Occorre sottolineare che le uscite di lista riportate con "motivo sconosciuto" sono tali perché gli aggiornamenti sui trapianti effettuati non arrivano all'I.S.S. in tempo reale ed inoltre alcuni centri trascurano di comunicare esplicitamente il motivo dell'uscita di lista se questa è dovuta a decesso o altro motivo. Nella colonna Pazienti iperimmuni trapiantati viene riportato quanti fra i trapianti effettuati hanno avuto per ricevente un paziente iperimmune (che nel caso del pediatrico corrisponde a un PRA massimo superiore al 50%).

Per quanto riguarda l'evoluzione nel tempo della lista di attesa, il primo risultato ottenuto riguarda le variazioni delle dimensioni della lista stessa che vengono riportate nella figura 2.

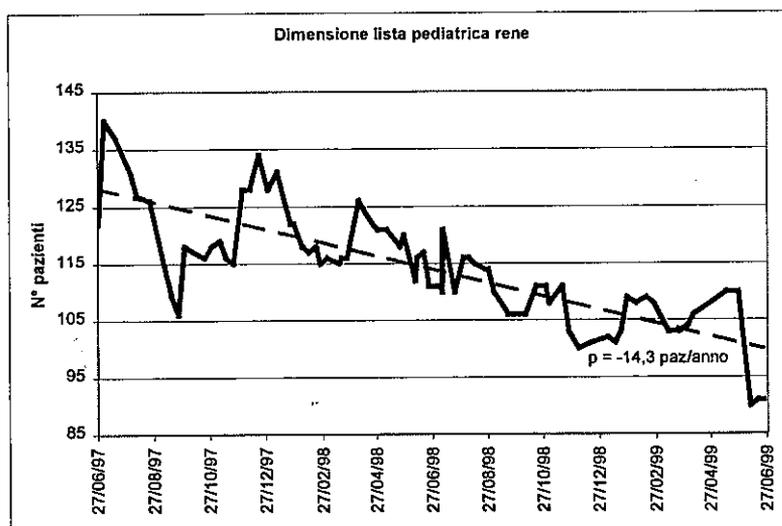


Figura 2.- Evoluzione nel tempo della lista pediatrica di attesa per trapianto di rene

La dimensione della lista mostra un chiaro andamento decrescente al ritmo medio di -14,3 pazienti/anno, che, estrapolando linearmente la porterebbe ad esaurirsi a metà dell'anno 2006.

I valori statistici e di riepilogo contenuti nell'analisi che segue sono stati estratti dai dati inviati dai Centri regionali di riferimento per i trapianti e ricevuti dall'Istituto Superiore di Sanità nel corso della prima raccolta di dati sulle liste di attesa nazionali avvenuta durante il 1° semestre del 1998. I record (iscrizioni in lista di attesa) complessivamente raccolti per tutte le tipologie di trapianto sono 10523;

mancano gran parte dei record relativi ai pazienti extraregionali del centro trapianti del Policlinico Umberto I di Roma (stimati in 400 ÷ 500 record per di più sovrapposti a quelli della lista dell'Ospedale S. Eugenio di Roma e a quelli di altre liste) e tutti quelli della lista gestita dal Policlinico Gemelli di Roma (stimati in circa 120 record, anche questi in gran parte sovrapposti a quelli dell'Umberto I e del S. Eugenio).

Nella tabella 3 vengono riportate le dimensioni complessive delle liste di attesa che risultano dai dati raccolti (la non corrispondenza fra numero di iscrizioni e numero di pazienti è dovuta al fenomeno delle iscrizioni multiple). Va sottolineato che la suddivisione fatta è di tipo non esclusivo: in ognuna delle liste sono presenti anche i pazienti eventualmente in attesa anche di altri organi.

Tabella 3.- Dimensioni complessive delle liste di attesa in base ai dati raccolti nel primo semestre 1998.

Organo	N° pazienti	N° iscrizioni
Rene	6771	8567
Fegato	868	881
Cuore	448	448
Polmone	114	114
Cuore - Polmone	43	43
Pancreas	186	186

Allo stato attuale il database contiene solo i dati anagrafici dei pazienti e l'indicazione del centro dialisi e del centro trapianti di iscrizione. Di conseguenza le informazioni statistiche estratte riguardano la distribuzione dei pazienti sul territorio nazionale, la distribuzione delle loro iscrizioni ai vari centri di trapianto (ovvero le "migrazioni" di pazienti che si iscrivono in centri di trapianto fuori dalla loro regione di residenza) e l'estensione del fenomeno delle iscrizioni multiple (ovvero di quei pazienti che risultano iscritti contemporaneamente nei centri di trapianto di più regioni).

Publicazioni

1. Quintieri F., Chistolini P. **La gestione dei trapianti in Italia; ruolo dell'Istituto Superiore di Sanità.** I Trapianti, 2(1):45-46, 1998.
2. Quintieri F., Chistolini P., Pugliese O. **La gestione dei trapianti di organo in Italia: Ruolo dell'Istituto Superiore di Sanità.** Professione, 5: 6-11, 1998.
3. Quintieri F., Pugliese O., Chistolini P. **Analysis of organ donation in Italy.** Journal of Transplant Coordination, 8 (3):188-90, 1998.
4. Pugliese O., Chistolini P., Quintieri F. **Analisi delle caratteristiche dei donatori e dei riceventi nei trapianti d'organo in Italia.** I Trapianti, 1:21-26, 1999.
5. F. Quintieri, P. Chistolini, O. Pugliese. **Organ donation and transplant activity in Italy.** Eur. J. Epidemiol. in press, 1999.
6. Chistolini P., Frustragli G., Macellari V., Mattuci D.A., Pini C., Pugliese O., Quintieri F., Sargentini A. **Relazione ISTISAN 99/2 "Rete nazionale trapianti di organo: requisiti, caratteristiche generali e specifiche di progetto",** giugno 1999.

4.2 Studio di farmaci modulanti l'effetto soppressorio sulla risposta immunitaria per un possibile impiego nella terapia anti-rigetto nei trapianti d'organo

Francesca QUINTIERI, Antonella D'AMBROSIO
Laboratorio di Immunologia

Collaboratori: Elena Giacomini e Maria Giovanna Quaranta.
Laboratorio di Immunologia

Sintesi dell'attività svolta nel corso del secondo anno

Nel secondo anno di finanziamento sono stati portati a termine gli studi sull'effetto del farmaco calcio-antagonista diltiazem sulla produzione di particolari linfocine in colture miste linfocitarie umane. I precedenti risultati avevano, infatti, messo in evidenza un interessante effetto del farmaco sulla produzione di citochine proinfiammatorie (dette anche monochine perché vengono principalmente prodotte dai monociti), quali l'IL-1 β e l'IL-6. In particolare, tramite i metodi ELISA e ELISPOT, era stata mostrata la capacità del diltiazem di aumentare, in maniera dose dipendente, la produzione di IL-1 β e quella di determinare una tendenza nella diminuzione della produzione di IL-6. Tale effetto è stato confermato con la tecnica di biologia molecolare di dosaggio dell'mRNA per tali linfocine, dove risulta chiaramente aumentata la trascrizione soltanto del gene dell'IL-1 β (figura 1).

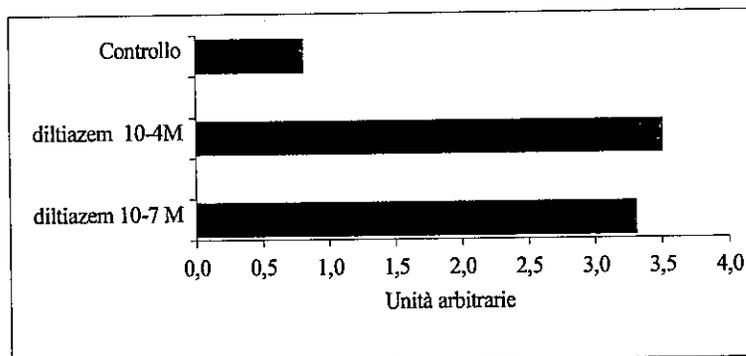


Figura 1.- Effetto del diltiazem a concentrazione di 10^{-4} e 10^{-7} sulla trascrizione dell'mRNA dell'IL-1 β .

I risultati ottenuti sulle colture miste linfocitarie ci hanno spinto a focalizzare il nostro studio sull'effetto del diltiazem sulla produzione di linfocine da parte di cellule isolate dal sangue periferico umano, in modo da identificare le popolazioni che in questo caso funzionano da bersaglio. Il secondo anno di finanziamento di tale progetto di ricerca è stato, di conseguenza, caratterizzato dal proseguimento di tale studio con lo scopo di investigare, tramite tre diversi approcci metodologici, eventuali effetti del diltiazem sulla produzione di IL-1 β e IL-6 o di altre linfocine da parte di cellule che presentano l'antigene (APC). In questo report vengono mostrati i risultati definitivi ottenuti su popolazioni isolate di monociti umani e i risultati preliminari ottenuti su cellule dendritiche umane. La tabella 1 presenta i dati del dosaggio delle linfocine in supernatanti di colture di monociti umani, effettuato con il metodo ELISA. Tali risultati dimostrano come il diltiazem abbia un effetto diretto sui monociti, aumentando, in maniera statisticamente significativa e dose dipendente, la produzione di IL-1 β e diminuendo leggermente ma costantemente la produzione di IL-6.

Risultati paragonabili sono stati ottenuti nell'analisi dello ELISPOT per la determinazione quantitativa delle cellule che producono le monochine. La tabella 2 mostra i risultati ottenuti su monociti umani isolati, trattati con varie concentrazioni di diltiazem.

Tabella 1. Produzione di IL-6, TNF- α e IL-1 β , da parte di monociti umani, in presenza di varie concentrazioni di diltiazem. Determinazione mediante metodo ELISA del quantitativo di monochine presenti nei supernatanti di monociti stimolati con LPS per tre giorni e trattati con il farmaco.

	IL-6 pg/ml	TNF- α pg/ml	IL-1 β pg/ml
Controllo	197 \pm 37	16 \pm 4	101 \pm 49
Diltiazem 10 ⁻⁴ mol/L	115* \pm 20	13 \pm 7	169* \pm 93
Diltiazem 10 ⁻⁵ mol/L	209 \pm 34	14 \pm 6	134 \pm 79
Diltiazem 10 ⁻⁶ mol/L	227 \pm 40	19 \pm 6	129 \pm 76
Diltiazem 10 ⁻⁷ mol/L	231 \pm 45	24 \pm 7	127 \pm 70

I dati vengono espressi come la media \pm deviazione standard di sei esperimenti.
* $P < 0,05$ con il Wilcoxon's rank sum test.

Tabella 2. Determinazione mediante ELISPOT del numero di monociti umani che producono IL-6, TNF- α e IL-1 β , in seguito a stimolazione con LPS per tre giorni e in presenza di diltiazem a varie concentrazioni.

	IL-6 SFC/10 ⁶	TNF- α SFC/10 ⁶	IL-1- β SFC/10 ⁶
Controllo	144 \pm 72	343 \pm 143	303 \pm 154
Diltiazem 10 ⁻⁴ mol/L	75* \pm 38	286 \pm 92	449* \pm 140
Diltiazem 10 ⁻⁵ mol/L	48* \pm 33	286 \pm 136	430* \pm 222
Diltiazem 10 ⁻⁶ mol/L	2 \pm 2	149 \pm 39	158 \pm 93
Diltiazem 10 ⁻⁷ mol/L	4 \pm 3	155 \pm 41	67 \pm 19

SFC: spot-forming-cells (cellule che producono gli spots).

I dati vengono espressi come la media \pm deviazione standard di sei esperimenti.

* $P < 0,05$ con il Wilcoxon's rank sum test.

L'analisi semi-quantitativa di RT-PCR, mostrata in figura 2, ha confermato un incremento della sintesi dell'IL-1 β in presenza del diltiazem con un aumento significativo dell'mRNA della linfocina, maggiore alle dosi più elevate del farmaco. L'mRNA del TNF- α e dell'IL-6, invece, non subiva alcuna variazione rispetto al controllo (dati non mostrati).

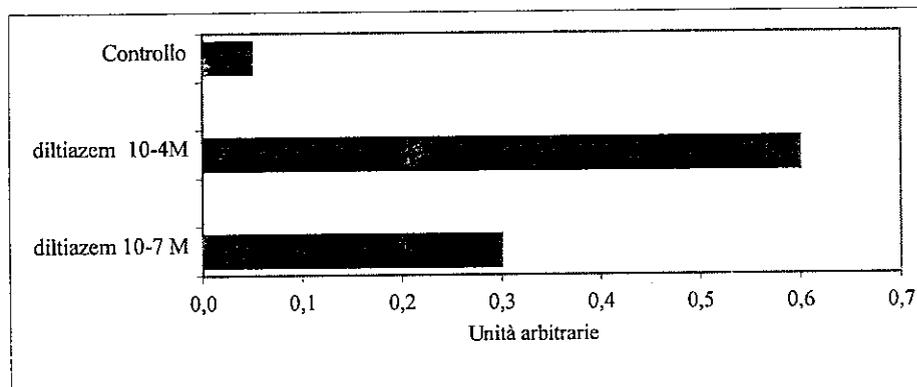


Figura 2.- Effetto del diltiazem a concentrazione di 10^{-4} e 10^{-7} sulla trascrizione dell'mRNA dell'IL-1 β .

Poiché le cellule dendritiche sono le APC maggiormente responsabili nel provocare una reazione di rigetto in caso di trapianto, sia mediante la presentazione diretta che indiretta, abbiamo studiato l'effetto del diltiazem su cellule dendritiche umane. Ma, contrariamente a quello osservato per le colture miste linfocitarie e per i monociti isolati, non è stato riscontrato un effetto chiaro sulla produzione di IL-1 β e IL-6 da parte delle cellule dendritiche.

Studi analoghi sulla produzione dell'IL-12 e l'IL-10 da parte delle cellule dendritiche umane sono comunque in corso in quanto studi preliminari hanno mostrato che gli effetti principali del farmaco su questo tipo di cellule si riscontrano a livello della produzione di IL-12. L'IL-10 e l'IL-12 rivestono una notevole importanza per il loro ruolo regolatorio; infatti, esse inibiscono o promuovono la produzione di citochine come l'IL-2, L'IFN- γ , che sono molto importanti nel concorrere a determinare una reazione di rigetto nei trapianti di organo.

In conclusione, la ricerca finanziata in base all'art.12 del D.L.502/92 ci ha permesso di evidenziare la capacità del diltiazem di influenzare la produzione di linfocine da parte delle APC, cellule ancora non considerate come cellule bersaglio del farmaco. In aggiunta, tale ricerca è di notevole importanza nell'individuare gli effetti del diltiazem (e probabilmente dei farmaci calcio-antagonisti in generale) sui vari tipi cellulari del sistema immunitario che intervengono nel processo di rigetto nei trapianti d'organo.

Publicazioni

1. D'Ambrosio A., Segoloni G., Quintieri F. **The modulatory effect of diltiazem on human in vitro alloreactivity when used alone or in combination with cyclosporin A and/or methylprednisolone.** *Transpl Int* 1997, 10:426-431.
2. D'Ambrosio A., Giacomini E., Camponeschi B., Quintieri F. **Diltiazem modulates monokine production in human mixed lymphocyte culture.** *Transplantation*, 1998, 65(10):1411-1413.
3. Quintieri F. **Studio di farmaci modulanti l'effetto soppressorio sulla risposta immunitaria per un possibile impiego nella terapia anti-rigetto nei trapianti d'organo.** *Rapporti ISTISAN*, 97/19:31-43.
4. D'Ambrosio A., Giacomini E., Quaranta M.G., Quintieri F. **Diltiazem modulates monokine production by isolated human monocytes.** *Transplant.Proc*, 1998, 30:1-3.

**LINEE DI RICERCA SVOLTE
DALLE UNITA' OPERATIVE ESTERNE
ALL'ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'**

SOTTOPROGETTO 1

INGEGNERIA DEI TESSUTI

Riparazione e ricostruzione di cartilagine e osso

Ranieri CANCEDDA

Centro di Biotecnologie Avanzate

Largo R. Benzi, 10

16132Genova

Principali partecipanti: Maurilio Marcacci¹, Paolo Bianco²

¹Istituti Ortopedici Rizzoli, Bologna

²Dipartimento di Medicina sperimentale, Università dell'Aquila

Sintesi dell'attività svolta nel corso del secondo anno

A) Cellule stromali del midollo osseo e ricostruzione di tessuto osseo

Trapianti d'osso vengono usati da più di un secolo per ricostruzioni e riparazioni ossee in diverse situazioni patologiche (resezioni di neoplasie, ricostruzioni in traumatologia, correzioni di malformazioni congenite ecc.). Per interventi di dimensioni significative attualmente si utilizzano osso e cartilagine sia umani sia da altre specie (Lane 1987). Quando è possibile, l'impiego di materiale autologo, prelevato intraoperatoriamente, ha il vantaggio della mancanza di reazioni di rigetto. Con materiali di provenienza diversa invece, oltre al rischio di un mancato attecchimento o di un rigetto del tessuto trapiantato, sussistono sempre possibilità di trasmissione di microrganismi patogeni. Un problema comunque difficilmente superabile per innesti al di sopra di certe dimensioni è l'attecchimento e l'integrazione degli innesti stessi con i tessuti preesistenti; la causa principale è nella maggioranza dei casi una insufficiente, quando non assente, vascolarizzazione dei segmenti impiantati. Questo problema è tanto più importante quanto più è compatto il materiale da utilizzare per il trapianto. Per trapianti di osso compatto infatti i tempi di integrazione e di rivitalizzazione del tessuto ad opera dei vasi sanguigni sono nell'ordine degli anni con conseguenti problemi di carattere funzionale molto significativi.

Uno degli obiettivi del nostro progetto di ricerca è stata la messa a punto di una metodica innovativa per la riparazione e la ricostruzione di tessuto osseo.

La potenzialità di autoriparazione del tessuto osseo dipende da cellule staminali e da cellule progenitrici dei tessuti connettivi, incluso il tessuto osseo. Queste cellule, localizzate nel compartimento stromale del midollo osseo, sono multipotenti, in quanto sono in grado di differenziare dando origine a varie linee di derivazione mesenchimale: osteoblasti, condrociti, adipociti e miociti. Questa modalità di riparazione ha comunque dei limiti che sono soprattutto legati alla quantità di tessuto da ricostruire ed al tempo necessario a farlo. In particolare l'autorigenerazione dell'osso ha bisogno di tempo perché le cellule del compartimento staminale siano in grado di proliferare, migrare, colonizzare, differenziare e depositare matrice ossea, e di una traccia su cui le cellule possano migrare.

Per grandi interventi di chirurgia ricostruttiva il disagio per il paziente sarebbe estremamente prolungato ed i tempi di degenza e di assistenza molto lunghi con elevati costi per la società. Il nostro studio ha avuto come obiettivo l'associazione di cellule del compartimento stromale osseo preventivamente espanse "in vitro" con un supporto tridimensionale che abbia caratteristiche di biocompatibilità e di biodegradabilità. Questo tessuto ingegnerizzato può essere utilizzato per la riparazione di grandi segmenti ossei. Infatti il supporto serve da veicolo e da innesco del processo di osteogenesi, ma in seguito deve essere riassorbito per lasciar posto all'osso in via di sviluppo. Numerosi sono i vantaggi di questa ipotesi terapeutica: a) le cellule che vengono trapiantate sono autologhe, quindi non si presenta il problema della compatibilità tissutale; b) sono espanse "in vitro", quindi viene superato il problema della disponibilità di tessuto da trapiantare; c) sono cellule staminali, quindi con un grado di rigenerazione del tessuto migliore e con un "lifespan" previsto di maggiore durata; d) i materiali utilizzati per veicolare le cellule sono biocompatibili e a riassorbimento modulabile.

Nel corso del primo anno del progetto sono state messe a punto condizioni di coltura tali da permettere la selezione e la successiva espansione delle CMS, mantenendo preservata la loro capacità differenziativa in senso osteogenico. È stato utilizzato come materiale di partenza sia midollo osseo umano sia di altre specie animali relativamente ai sistemi sperimentali scelti. Queste cellule con potenziale condro-osteogenico sono state caratterizzate ed utilizzate in associazione con ceramiche porose, per la ricostruzione di tessuto osseo. Successivamente, dopo una sperimentazione iniziale che ha previsto l'impianto delle cellule associate a bioceramiche in topi nudi, è stata effettuata una sperimentazione preclinica in animali di grossa taglia che ha comportato l'impianto di questo biomateriale composito in pecora al fine di ricostruire grossi segmenti ossei.

Nella sperimentazione iniziale è stata valutata la capacità di una ceramica macroporosa (idrossiapatite, HA) nel sostenere la riparazione di ossa lunghe in animali di grossa taglia. A livello della diafisi tibiale di 5 pecore adulte, una resezione di 3,5 cm è stata sostituita con un cilindro cavo di HA mantenuto in sede dall'apposizione di un fissatore esterno. Lo studio radiografico e l'analisi istologica dell'impianto e del tessuto adiacente alla resezione, hanno dimostrato la buona integrazione della ceramica con l'osso e una neoformazione di osso periostale.

Ulteriori esperimenti, utilizzando lo stesso modello animale, sono consistiti nella sostituzione di un segmento diafisario tibiale di lunghezza di 3,5 cm con un cilindro cavo di ceramica HA macroporosa associato a cellule mesenchimali staminali di midollo osseo prelevate precedentemente dallo stesso animale ed espanse in vitro. Gli animali sono stati suddivisi in due gruppi: gruppo di controllo al quale è stato impiantato solo il cilindro di idrossiapatite e gruppo sperimentale nel quale alla ceramica sono state associate le cellule espanse in vitro. Anche in questo caso, per garantire la stabilità meccanica dell'innesto, è stato posizionato il fissatore esterno sul segmento osseo operato. Gli animali sono stati sacrificati a distanza di 60 gg dall'intervento ed il materiale espantato è stato sottoposto all'analisi macroscopica, istologica e micro-Rx, evidenziando una buona integrazione dell'innesto in tutti e due i gruppi. È stato osservato un notevole accrescimento dell'osso neoformato all'interno dei pori della ceramica nel gruppo dove erano impiantate anche le cellule staminali mesenchimali, rispetto al gruppo controllo, confermando l'ipotesi della spinta osteogenica esercitata dalle cellule stromali espanse in vitro.

Sperimentazione clinica in corso. - Le ricerche attualmente in corso e che proseguiranno nel corso del prossimo anno riguardano invece la ricostruzione di segmenti ossei: i dati ottenuti dal modello di ricostruzione di segmenti ossei in pecora, nonché i dati esistenti in letteratura, hanno reso possibile l'inizio di uno studio clinico per la ricostruzione di segmenti ossei in un certo numero di pazienti da selezionare, utilizzando cellule stromali autologhe espanse in vitro ed associate a bioceramiche come veicolo e come punto d'inizio della neoformazione di tessuto osseo. Questo modello si propone come valida alternativa alle attuali possibilità terapeutiche.

Nell'ambito della collaborazione con il "Ural Scientific Research Institute of Traumatology and Orthopaedics", Ekaterinburg, Russia, una coltura è stata espansa a fini trapianto in paziente. In particolare, da un campione di midollo di 20 ml sono state ottenute in circa 4 settimane di coltura 50 milioni di cellule stromali che sono state trapiantate in combinazione con cilindro di HA porosa (3,5cm) per ricostruire una perdita iatrogena di tessuto osseo della diafisi tibiale. Il trapianto è stato effettuato nel giugno 98. La paziente è attualmente guarita ed ha riacquisito la piena funzionalità dell'arto. È in corso il trattamento di altri pazienti.

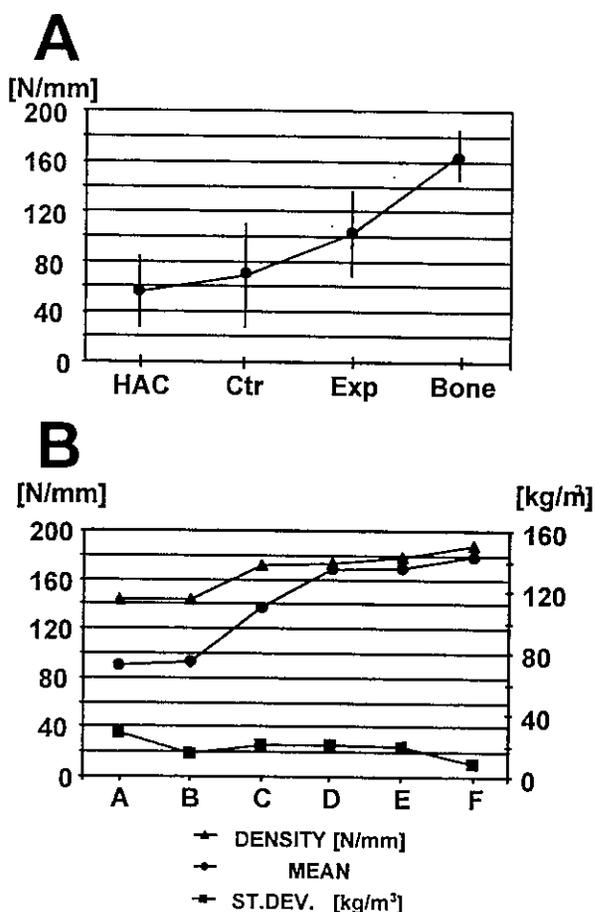


Figura 1.- A) Valore di rigidità media e deviazione standard per il supporto di HA (HAC), impianti privi di cellule (Ctr), impianti caricati con BMSC (Exp) e tessuto osseo (Bone). Le proprietà meccaniche dei complessi ceramica-osso sono intermedie tra la struttura dell'HAC porosa e dell'osso. Impianti caricati con BMSC sono più compatti degli impianti privi di cellule. I 4 gruppi di campioni mostrano maggiore rigidità e una deviazione standard più bassa dal momento in cui la struttura del materiale diventa più compatta e predomina la fase ossea.

B) Valori di rigidità media e deviazione standard e densità di 6 sezioni derivate da un impianto caricato con cellule. Nella direzione assiale - dalla diafisi dove l'HAC e l'osso sono integrati - verso l'epifisi - dove è presente solo tessuto osseo - (A→F) i valori di rigidità media per le sezioni del complesso osso-HAC aumentavano, mentre la deviazione standard diminuiva. Da una prima analisi, la rigidità aumentava in parallelo all'aumento della densità del campione.

B) Espansione "in vitro" e ricostruzione della cartilagine

Usufruento della nostra esperienza nel campo delle colture di condrociti aviari, è stato messo a punto un protocollo per la coltura di condrociti articolari umani. Le condizioni ottimali per l'isolamento enzimatico dei condrociti e la loro moltiplicazione in vitro sono state stabilite. Il mantenimento del potenziale differenziativo dei condrociti coltivati è stato verificato sia in vitro, sia in vivo in topi atimici. Questo protocollo è stato sviluppato allo scopo di amplificare in vitro condrociti utilizzabili come impianto di condrociti autologhi per la riparazione di lesione articolari specifiche e localizzate.

Vale la pena di ricordare a questo punto anche alcune ricerche mirate allo sviluppo delle condizioni di espansione e differenziamento di condrociti in assenza di siero. La cartilagine è un tessuto non vascolarizzato e non innervato. Di conseguenza, il nutrimento e la sopravvivenza delle cellule

cartilaginee avvengono con modalità particolari. Normalmente i condrociti isolati da varie sedi e varie specie sono stati messi in coltura in vitro usando come fonte nutriente il siero fetale bovino, che sicuramente non rappresenta il microambiente reale di questo tipo cellulare. Inoltre l'aggiunta di siero autologo o animale pone seri problemi per quanto riguarda la disponibilità del siero stesso e la sicurezza delle colture. Abbiamo quindi identificato i fattori sistemici che sono indispensabili, ma sufficienti per promuovere la sopravvivenza, la proliferazione ed il differenziamento dei condrociti anche in assenza di siero.

Sperimentazione clinica in corso. - Partendo da questi dati, si è avviato un trial clinico di ricostruzione della cartilagine articolare del condilo femorale in pazienti giovani che presentano lesioni articolari di tipo traumatico. Il trial, tuttora in corso, è basato sul confronto di due tecniche di riparazione, la "mosaic plasty" e l'impianto di condrociti autologhi espansi in vitro. Queste due tecniche sono ritenute le più valide attualmente utilizzabili, ma non sono mai state sottoposte ad un sperimentazione clinica rigorosa e che porti ad un confronto fra le due metodiche statisticamente significativo. Il nostro trial clinico basato sull'uso dell'impianto di condrociti autologhi espansi in vitro è stato inizialmente limitato alla riparazione di lesioni dei condili femorali. Le lesioni della rotula sono più frequenti e la loro riparazione con tecniche "tradizionali" risulta poco soddisfacente. In tempi successivi abbiamo anche avviato un trial clinico per la riparazione delle lesioni della rotula con la stessa metodica di impianto di condrociti autologhi espansi in vitro.

Il trial si articola in due fasi: a) Studio di fase II (non randomizzato). Studio effettuato esclusivamente su lesioni del condilo e con impianto cellulare. Numero di pazienti trattati ad oggi (maggio 1999): 14. b) Studio di fase III (randomizzato). Studio effettuato su lesioni del condilo o della rotula, con impianto cellulare o intervento standard a secondo della randomizzazione (mosaic plasty per il condilo, impianto di lembo di perioste per la rotula). Numero di pazienti trattati ad oggi (maggio 1999): 21 (16 condili e 5 rotule), di cui 11 trattati con impianto cellulare e 10 con procedura standard.

A questa ricerca partecipa anche la Clinica Ortopedica dell'Università di Genova.

Pubblicazioni

1. Cancedda, R., Dozin, B. and Quarto, R. **Tissue engineering: bone and cartilage for transplantation.** In: *Advances in Bio medical Studies. Biology and Physiopathology of the Extracellular Matrix.* C. Balduini, Cherubino P., De Luca G. Eds., Goliardica Pavese. 185-191., 1996.
2. Martin, I., Quarto, R., Dozin, B. and Cancedda, R. **Producing prefabricated tissues and organs via tissue engineering.** *IEEE Eng Med Biol.* 16:73-80, 1997.
3. Martin, I., Dozin, B., Quarto, R., Cancedda, R. and Beltrame, F. **A computer-based technique for cell aggregation analysis: cell-condensation in "in vitro" chondrogenesis.** *Cytometry* 28:141-146, 1997.
4. Martin, I., Muraglia, A., Campanile, G., Cancedda, R. and Quarto, R. **Fibroblast Growth Factor-2 supports ex vivo expansion and maintenance of osteogenic precursors from human bone marrow.** *Endocrinology* 138:4456-4462, 1997.
5. Pellegrini, G., Traverso, C.E., Franzi, A.T., Zingirian, M., Cancedda, R. and De Luca, M. **Long term restoration of human corneal surface with autologous corneal epithelium generated by serial cultivation of limbal epithelial cells.** *Lancet.* 349:990-993, 1997.
6. Quarto, R., Campanile, G., Cancedda, R. and Dozin, B. **Modulation of commitment, proliferation and differentiation of chondrogenic cells in defined culture medium.** *Endocrinology* 138:4966-4976, 1997.
7. Bianco, P., Descalzi Cancedda, F., Riminucci, M. and Cancedda, R. **Bone formation via cartilage models: the 'borderline chondrocyte.** *Matrix Biol* 17:185-192, 1998.
8. Cancedda, R., Descalzi Cancedda, F. and Dozin, B. **Chondrocyte culture.** In: *Marrow Stromal Cell Culture*, Beresford and Owen Editors, Cambridge University Press 111-127, 1998.

9. Casabona, F., Martin, I., Muraglia, A., Berrino, P., Santi, P., Cancedda, R. and Quarto, R. **Prefabricated engineered bone flaps: an experimental model of tissue reconstruction in plastic surgery.** *Plast.Reconstr.Surg.* 101:577-581, 1998.
10. Martin, I., Padera, R.F., Vunjak-Novakovic, G. and Freed, L.E. **In vitro differentiation of chick embryo bone marrow stromal cells into cartilaginous and bone-like tissues.** *J.Orthopaed Res* 16:181-189, 1998.
11. Muraglia, A., Martin, I., Cancedda, R. and Quarto, R. **A nude mouse model for human bone formation in unloaded conditions: dexamethasone and fibroblast growth factor 2 synergistic effect.** *Bone* 22:131S-134S, 1998.
12. Riminucci, M., Gentili, C., Bradbeer, J.N., Descalzi, F., Cancedda, R. and Bianco, P. **Vis a vis cells and the priming of bone formation.** *J.Bone and Min.Res.* 13:1852-1861, 1998.
13. Boyde, A., Corsi, A., Quarto, R., Cancedda, R. and Bianco, P. **Osteoconduction in large microporous hydroxyapatite ceramic implants: evidence for a complementary integration and disintegration mechanism.** *Bone*, in press, 1999.
14. Cancedda, R., Descalzi Cancedda, F., Zerega, B. and Bianco, P. **Chondrocyte differentiation and bone formation on a cartilaginous model.** *Retinoids* 15:26-31, 1999.
15. Marcacci, M., Kon, E., Zaffagnini, S., Giardino, R., Rocca, M., Corsi, A., Benvenuti, A., Bianco, P., Quarto, R., Martin, I. and Cancedda, R. **Reconstruction of extensive long bone defects in sheep using porous hydroxyapatite sponges.** *Calcif Tissue Int* 64:83-90, 1999.
16. Zerega, B., Cermelli, S., Bianco, P., Cancedda, R. and Descalzi Cancedda, F. **Parathyroid Hormone [PTH (1-34)] and Parthyroid Hormone-Related Protein [PTHrP (1-34)] promote reversion of hypertrophic chondrocytes to a prehypertrophic proliferating phenotype and prevent terminal differentiation of osteoblast-like cells.** *J.Bone Miner Res* in press.
17. Chistolini, P., Ruspantini, I., Bianco, P., Corsi, A., Cancedda, R. and Quarto, R. **Biomechanical evaluation of cell-coated and cell-free hydroxyapatite implants for the reconstruction of segmental bone defects.** Submitted.
18. Galotto, M., Berisso, G., Delfino, L., Podestà, M., Ottaggio, L., Dallorso, S., Dufour, C., Ferrara, G.B., Abbondandolo, A., Dini, G., Bacigalupo, A., Cancedda, R. and Quarto, R. **Stromal microenvironment damage as consequence of high dose chemo/radio therapy in bone marrow transplant recipients.** Submitted.
19. Galotto, M., Cancedda, R., Ferrara, G.B., Ottaggio, L., Dini, G., Bacigalupo, A. and Quarto, R. **Marrow derived mesenchymal stem cells and bone marrow transplantation.** Submitted.
20. Kon, E., Muraglia, A., Corsi, A., Bianco, P., Marcacci, M., Martin, I., Boyde, A., Ruspantini, I., Chistolini, P., Rocca, M., Giardino, R., Cancedda, R. and Quarto, R. **Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical size defects of sheep long bones.** Submitted.

Ricostruzione e riparazione di epidermide, mucose ed altri epiteli di rivestimento

Michele DE LUCA

IDI-IRCCS, Istituto Dermatologico dell'Immacolata
Via dei Monti di Creta 104
00167 Roma

Principali partecipanti: G. Pellegrini, S. Bondanza, L. Guerra, F. Melchi, G. Primavera, A. Luci, P. Paterna, E. Perlas, G. Zambruno, O. Golisano, E. Dellambra, S. Prislei, E. Siviero
IDI-IRCCS, Istituto Dermatologico dell'Immacolata, Roma

Sintesi dell'attività svolta nel corso del secondo anno

Trattamento degli ustionati

In collaborazione con i Centri Ustioni dell'Ospedale Cannizzaro di Catania, del Policlinico di Bari e dell'Ospedale Bufalini di Cesena, abbiamo trattato 9 pazienti affetti da ustioni profonde interessanti il 20-75% della superficie corporea totale, utilizzando lembi di epidermide autologa coltivata su fibrina ed applicata su alloderma di donatore.

Tabella 1.- dati clinici e biologici di 9 ustionati trattati con epidermide autologa coltivata *in vitro*

PAZIENTE	K50	K60	K63	K68	K81	K82	K83	K84	K92
Età (anni)/sesso	23/M	30/M	17/M	11/F	7/M	6/M	6/F	4/F	28/F
Percentuale di ustione	75	65	35	40	75	55	20	30	60
Percentuale di ustione di 3° grado	45	45	20	30	75	40	20	30	50
Dimensioni della biopsia/ giorni dopo l'ustione	7.5/9	7.1/13	5.2/6	4.5/4	2/4	6/2	1/8	6.7/3	3.7/3
Resa cellulare della biopsia (x 10 ⁶ /cm ²)	1.0	1.2	3.3	2.7	2.5	5.3	3.6	2.8	0.8
CFE* della biopsia: %colonie totali/%colonie abortive	0.6/0	0.8/0	2.4/0	5.7/0	0.6/0	4.3/0	9.6/0	5/0	1/0
CFE* della coltura primaria: %colonie totali/%colonie abortive	41.5/4	47.5/1.5	40.5/0	53/1.5	77.5/0	25/1	29/0	56/0.5	34.5/1
CFE* della coltura secondaria: %colonie totali/%colonie abortive	18.1/5.3	13.7/3.8	36.2/0.1	35.8/1.1	6.65/0	12.9/1.1	18.3/0.6	45.2/0.5	70.5/13
Tempo tra la biopsia ed il graft (giorni)	19	18	14	15	16	19	17	14	19
Attecchimento ad 8 giorni	>95%	>95%	≅60% >95%	>95%	≅90% ≅90%	>95%	≅80%	≅80%	≅80%
Rigenerazione epidermica ad 1 mese	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	30%**	100%
Ultimo follow-up (mesi)	29	26	25	21	10	9	9	2	2

* Colony Forming Efficiency
** infezione del letto ricevente

Il supporto di fibrina garantisce: 1- maneggevolezza dei lembi sia nella preparazione da parte dei biologi cellulari, sia nell'utilizzazione da parte dei chirurghi; 2- facile trasportabilità a distanza; 3- preservazione dell'integrità dello strato basale (in cui sono presenti le cellule staminali); 4- accorciamento dei tempi delle colture cellulari da 21-28 giorni a 14-16 giorni.

Inoltre, studi preliminari volti a valutare il mantenimento delle cellule staminali nelle condizioni di coltura adottate hanno dimostrato che: 1- il potenziale clonogenico ed il potenziale proliferativo dei cheratinociti coltivati su substrato di fibrina sono assolutamente riproducibili rispetto a quelli delle colture cheratinocitarie effettuate su substrato di plastica, 2- le cellule staminali (oloclioni) sono mantenute nelle colture effettuate su fibrina (Pellegrini et al, In Press).

Una volta applicata su un letto ricevente adeguatamente preparato, la fibrina viene velocemente degradata dai sistemi enzimatici del paziente, permettendo l'attecchimento dello strato basale epiteliale.

Nella Tabella 1 sono mostrati i dati clinici e biologici dei 9 pazienti ustionati trattati con epidermide autologa ricostituita *in vitro* e trapiantata su alloderma. Il periodo medio intercorso tra l'effettuazione della biopsia ed il trapianto autologo è stato pari a 16.7 giorni. L'attecchimento a 8 giorni dal trapianto autologo è stato pari all'80-95% in tutti i pazienti trattati. La rigenerazione epidermica ad 1 mese dall'intervento è risultata essere del 100% in tutti i pazienti, fatta eccezione per la paziente K84 in cui l'infezione del letto ricevente, sopravvenuta nei giorni successivi al trapianto autologo, ha compromesso l'ottimo attecchimento (80%) ottenuto a 8 giorni.

Trattamento della vitiligine «stabile»

In collaborazione con la II Divisione dell'Istituto Dermopatico dell'Immacolata di Roma e con l'Istituto di Chirurgia Plastica dell'Ospedale San Martino di Genova abbiamo trattato 29 pazienti, affetti da forme cliniche differenti di vitiligine «stabile», applicando lembi di epidermide autologa ricostituita *in vitro*, con melanociti e cheratinociti in rapporto fisiologico e controllato, su un letto ricevente adeguatamente preparato mediante disepitelizzazione con diatermochirurgia programmata.

Tabella 2.- Ripigmentazione in 29 pazienti con vitiligine «stabile» trattati con epidermide autologa coltivata *in vitro*, con melanociti e cheratinociti in rapporto controllato.

				
	localizzata focale	localizzata segmentale	generalizzata vulgare + piebaldismo	generalizzata acrofaciale
pazienti trapiantati	8	3	10	8
ripigmentati/non ripigmentati 70-100% 0-69%	6/2	3/0	6/4*	1/7
cm² ripigmentati/cm² trapiantati	348.15/406	558.8/660	2499.3/3086	237/965
rigenerazione epidermica	100%	100%	100%	100%
percentuale di ripigmentazione	85.75%	84.66%	80.98%	24.55%
riattivazione della malattia	-	-	-	-/4

*estremità distali

Nelle nostre condizioni di coltura, il rapporto melanociti-cheratinociti nel lembo di epidermide coltivata è fisiologico e riproduce perfettamente il rapporto melanociti-cheratinociti presente *in vivo* nel sito della biopsia. Il controllo di qualità delle colture è stato effettuato mediante ripetute DOPA-reazioni in tutti i passaggi di amplificazione delle strain cellulari.

La preparazione del letto ricevente è stata realizzata disepitelizzando le aree acromiche mediante apparecchio TIMED TD 100 (Korpo-Genova): il diatermocauterio TIMED utilizza un'emissione di corrente elettrica costante a potenza 1 Watt, attraverso un ago ricurvo per 90-120° e dello spessore di 0.20 mm. Questa procedura chirurgica ha permesso di preparare un letto ricevente non sanguinante, con un derma papillare assolutamente rispettato: il follow-up (minimo di 9 mesi) ha evidenziato in tutti i pazienti l'assenza di qualsivoglia esito cicatriziale.

Nella Tabella 2 sono riassunti i dati clinici di 29 pazienti trattati con epidermide autologa coltivata *in vitro* per la cura della vitiligine.

La ripigmentazione ottenuta nei pazienti affetti da vitiligine localizzata (segmentale e focale), da vitiligine generalizzata volgare e da piebaldismo è risultata pari, rispettivamente, all'85.7%, all'84.6% e all'80.9%. In questi pazienti, con un unico ulteriore trattamento, potremo ottenere valori di ripigmentazione pari al 100%. E' da sottolineare che: 1- questi pazienti hanno alle spalle una storia di lunghe e costose terapie mediche in assenza di risultati positivi, 2- i nostri casi di relativo insuccesso (ripigmentazione inferiore al 70% e quindi esteticamente inaccettabile) riguardano sedi del corpo particolarmente difficili quali le estremità distali e le zone periorifciali del volto.

Nelle forme di vitiligine generalizzata acrofaciale, invece, la ripigmentazione è risultata pari al 24.5%. Il basso livello di ripigmentazione può essere legato, a nostro avviso, alla peculiarità della vitiligine acrofaciale, una forma subdola, a lenta progressione (che può indurre, quindi, in errore circa la «stabilità» della malattia) e con fasi imprevedibili di riacutizzazione: di 8 pazienti trattati, infatti, ben 4 hanno mostrato riattivazione della patologia.

Trattamento di patologie degenerative della superficie oculare

In collaborazione con la Divisione Oculistica dell'Ospedale San Giovanni e Paolo di Venezia e con il Dipartimento di Oftalmologia dell'Università di Tor Vergata di Roma, abbiamo analizzato il potenziale proliferativo e differenziativo dei cheratinociti della superficie oculare umana (Pellegrini et al, 1999).

Lo studio del potenziale proliferativo dei cheratinociti della superficie oculare (Tabella 3) e l'analisi clonale di tali popolazioni cellulari (Tabella 4) hanno evidenziato che le cellule staminali della superficie corneale (olocloni) sono segregate nel limbus, mentre le cellule staminali congiuntivali sono diffuse uniformemente a livello della congiuntiva bulbare e del fornice.

Tutti i cloni contrassegnati nella Tabella 4 (*) sono stati coltivati per amplificazioni seriali sino al raggiungimento della senescenza delle colture e tutti i cloni congiuntivali sono stati analizzati per valutare la presenza di cellule caliciformi (cellule goblet).

Tabella 3.- Potenziale proliferativo

ORIGINE DELLE BIOPSIE	QUADRANTE	NUMERO DEI CAMPIONI	ETA' DEI DONATORI	NUMERO DI DUPLICAZIONI CELLULARI
FORNICE	SUPERIORE INFERIORE	12	6-77	79 ± 10
CONGIUNTIVA BULBARE	SUPERIORE NASALE TEMPORALE INFERIORE	21	5-85	82 ± 21
LIMBUS	SUPERIORE NASALE TEMPORALE INFERIORE	9	5-65	85 ± 9

Tabella 4.- Analisi clonale

NUMERO TOTALE DI CLONI	ORIGINE E NUMERO DI DONATORI	QUADRANTE E NUMERO DI CAMPIONI	TIPO DI CLONI			ETA' DEI DONATORI
			NUMERO DI CLONI			
339 CLONES	Fornice 6	Superiore 3	Olo 6	Mero 41	Para 30	6-77
		Inferiore 3	Olo 4*	Mero 41*	Para 7*	27-76
	Congiuntiva bulbare 7	Temporale 4	Olo 7	Mero 47	Para 37	5-77
		Inferiore 3	Olo 5*	Mero 41*	Para 15*	27-76
	Limbus 2	Superiore 2	Olo 11*	Mero 39	Para 8	5-54

Gli olocloni del limbus e della congiuntiva hanno mostrato di possedere un potenziale proliferativo inferiore (80-100 duplicazioni cellulari) rispetto a quello degli olocloni epidermici (120-160 duplicazioni cellulari) (Pellegrini et al, 1998; Dellambra et al, 1998). Questo dato potrebbe essere spiegato in base al fatto che, mentre l'epidermide si rinnova totalmente una volta al mese, l'epitelio oculare si rinnova completamente una volta all'anno: le cellule staminali, quindi, potrebbero modulare il loro potenziale proliferativo in base alle necessità del tessuto d'origine.

I cheratinociti congiuntivali e le cellule goblet derivano da un comune progenitore bipotente: i cheratinociti congiuntivali con un alto potenziale proliferativo differenziano in cellule goblet almeno due volte nella loro vita, cioè dopo circa 40-50 duplicazioni cellulari e a circa 15 duplicazioni cellulari prima della senescenza.

L'identificazione e la caratterizzazione delle cellule staminali della superficie oculare è di importanza fondamentale per l'applicazione clinica.

Il follow-up a 2 anni di due pazienti trattati con i lembi autologhi limbo-corneali coltivati *in vitro* ha mostrato che, se vengono trapiantate le cellule staminali del limbus, si può ottenere la rigenerazione permanente di una superficie corneale severamente danneggiata (Pellegrini et al, 1997: Lancet, 349, 990-993).

Il trapianto autologo dell'epitelio congiuntivale ricostituito *in vitro*, e con cellule staminali, può essere fondamentale per il trattamento di patologie caratterizzate da una scarsa o assente produzione di mucina dipendente da un difetto delle cellule goblet, come il pemfigoide cicatriziale oculare, la sindrome di Stevens-Johnson, la xeroftalmia, le «sindromi secche» evolventi in cheratocongiuntiviti croniche.

Publicazioni

1. G. Pellegrini, S. Bondanza, L. Guerra, M. De Luca: **Cultivation of human keratinocyte stem cells: current and future clinical applications**, Med Biol Eng Comput, 36, 778-790, 1998.
2. E. Dellambra, J. Vailly, G. Pellegrini, S. Bondanza, O. Golisano, C. Macchia, G. Zambruno, G. Meneguzzi, and M. De Luca: **Corrective transduction of human epidermal stem cells in laminin-5-dependent junctional epidermolysis bullosa**, Hum Gene Ther, 9, 1359-1370, 1998.
3. G. Pellegrini, O. Golisano, P. Paterna, A. Lambiase, S. Bonini, P. Rama, and M. De Luca: **Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface**, J Cell Biol, 145, 1-14, 1999.
4. G. Pellegrini, R. Ranno, G. Stracuzzi, S. Bondanza, L. Guerra, G. Zambruno, G. Micali, and M. De Luca. **The control of epidermal stem cells (holoclon) in the treatment of massive full-thickness burns with autologous keratinocytes cultured on fibrin**, Transplantation, in press

Endotelizzazione di protesi vascolari polimeriche: realizzazione di strutture artificiali e loro caratterizzazione biologica e chimico-fisica

Danilo DE ROSSI

Centro Interdipartimentale di Ricerca "E. Piaggio"

Università di Pisa

Via Diotisalvi, 2

56126 Pisa

Principali partecipanti: A. Ahluwalia^a, G. Basta^b, E. Chiellini^c, F. Chiellini^c, C. Domenici^b, R. Francesconi^b, M. Grattarola^d, G. Lazzerini^b, D. Ricci^d, A. Sapienza^a, R. Solaro^c, G. Vozzi^a

^a Centro Interdipartimentale di Ricerca "E. Piaggio", Università di Pisa

^b Istituto di Fisiologia Clinica del CNR, Pisa

^c Dip. Chimica e Chimica Industriale, Università di Pisa

^d DIBE, Università di Genova

Sintesi dell'attività svolta nel corso del secondo anno

Durante il secondo anno, l'attività di ricerca svolta nell'ambito del progetto "Sostituzioni funzionali, organi artificiali e trapianti d'organo" è stata centrata sullo studio di nuovi materiali da utilizzare nello sviluppo di protesi vascolari con caratteristiche analoghe a quelle dei vasi naturali. In particolare sono stati presi in esame nuovi substrati polimerici bioerodibili costituiti da PAM (un copolimero a base di oligovinililene e anidride maleica), e su tali materiali sono state valutate l'adesione e la proliferazione di cellule endoteliali. In parallelo, è stato sviluppato un sistema di deposizione basato su un microposizionatore bidimensionale in grado di deporre dei "pattern" a geometria controllata, in modo da poter quindi ricostruire strutture tridimensionali costituite da strati di polimero bioerodibile e strati di cellule interconnessi. È stato infine progettato un bioreattore in grado di simulare il sistema biologico vascolare, in modo da poter studiare l'evoluzione dell'adesione e della crescita cellulare in condizioni dinamiche.

Adesione e proliferazione cellulare su superfici polimeriche bioerodibili

La ricerca volta a favorire la proliferazione di cellule endoteliali su substrati polimerici, indirizzata in una prima fase del progetto all'analisi delle caratteristiche di alcuni poliuretani [1], è proseguita con lo studio di una nuova classe di polimeri bioerodibili in grado di formare strutture bi- e tridimensionali per la ricrescita cellulare. In particolare sono stati presi in considerazione dei copolimeri biocompatibili, sintetizzati dal gruppo del Prof. Chiellini (Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale, Università di Pisa), caratterizzati da un livello di tossicità estremamente basso sia in vitro che in vivo [2].

I polimeri esaminati sono stati utilizzati per la formazione di film sottili su superfici solide tramite la tecnica di "spin-coating". Nella preparazione dei film alcuni parametri, come la concentrazione di solvente usato o la velocità di "spinning", sono stati variati al fine di ottenere superfici omogenee. Le superfici polimeriche sono state quindi caratterizzate tramite misure ellissometriche, di angolo di contatto, di potenziale superficiale e con microscopia a forza atomica (AFM) [3]. Sono state quindi valutate le relazioni tra le proprietà di tali superfici e l'adesione di cellule endoteliali [4].

Materiali e metodi.- I materiali utilizzati per la preparazione dei substrati su cui far aderire le cellule sono copolimeri a base di anidride maleica e mono-metossi-oligoetilenglicole (PAM). Per la realizzazione dei film polimerici sono state utilizzate soluzioni di PAM a varie concentrazioni (1%, 5%, e 10%), in etanolo e acqua milli-Q nel rapporto di 1:4.

Sono state inoltre preparate miscele di PAM e albumina, sempre in etanolo e acqua 1:4, con concentrazioni variabili di albumina (da 0.015 a 0.6 %).

Preparazione e caratterizzazione dei substrati.- Le soluzioni polimeriche sono state depositate, tramite "spin-coating", su lastre di vetro delle dimensioni 30 mm x 30 mm opportunamente rese idrofiliche. La velocità ed il tempo di "spinning" sono stati ottimizzati al fine di ottenere strati omogenei e trasparenti. I film depositati sono stati analizzati tramite ellissometria al fine di ottenere una stima dell'indice di rifrazione dello strato polimerico e a valutarne la sua omogeneità, come pure per la misura del suo spessore. Misure di angolo di contatto hanno invece permesso la valutazione del grado di idrofilicità/idrofobicità delle superfici utilizzate. La morfologia delle diverse superfici polimeriche è stata analizzata tramite misure di microscopia a forza atomica. Inoltre, tramite misure di potenziale superficiale, è stato esaminato l'effetto di potenziali o cariche superficiali sull'adesione cellulare.

Seminazione di cellule endoteliali.- Prima della seminazione delle cellule, i substrati polimerici sono stati sterilizzati tramite irraggiamento UV protratto per diverse ore. Le cellule sono state estratte da vena safena umana e messe in coltura usando protocolli standard. I vetrini sono stati seminati con una quantità nota di cellule e posti in un incubatore. Vetrini puliti ricoperti di gelatina sono stati usati come controllo.

Risultati

Ellissometria e angolo di contatto.- I campioni sono stati analizzati prima e dopo la deposizione dello strato polimerico usando un ellissometro automatico della Rudolph Research (USA). L'indice di rifrazione dei vari substrati risulta più o meno lo stesso (circa 1.47). Per quanto riguarda lo spessore, quello misurato sui film di solo PAM esso risulta circa 100 nm, mentre nel caso di aggiunta di albumina è stato riscontrato un andamento variabile a seconda della concentrazione di quest'ultima. Tale variazione risulta particolarmente evidente nel caso dei campioni al 5% di PAM.

Tramite la tecnica a "bolla d'aria" (in cui si valutano le dimensioni di una bolla d'aria inserita sotto una superficie piana immersa in acqua) sono state eseguite misure di angolo di contatto sulle superfici dei vetrini. I test hanno mostrato che PAM è un polimero essenzialmente idrofilico, e che l'aggiunta di albumina aumenta l'angolo di contatto (cioè, rende i film leggermente più idrofobici).

Potenziale superficiale.- Le misure di potenziale superficiale hanno mostrato un diverso comportamento dei campioni con PAM al 5% rispetto agli altri. Infatti, in questo caso, è stato misurato un potenziale negativo, al contrario di quello che avviene alle altre concentrazioni, dove il potenziale risulta positivo. Questo risultato anomalo è ancora in fase di studio. Va comunque detto che è stato verificato, durante le prove di adesione cellulare, che la diversa carica superficiale si ripercuote sull'interazione cellula-substrato.

AFM.- Le misure di microscopia a forza atomica (AFM) sono state eseguite presso il DIBE di Genova. Esse hanno permesso una caratterizzazione morfologica dei film polimerici. Le superfici di PAM all'1% risultano abbastanza uniformi e costituite da piccoli aggregati sferici. Il PAM al 5% mostra una superficie più rugosa, con aggregati più grandi e distribuiti in modo casuale. Nel caso del PAM al 10% la superficie risulta invece molto più liscia, con la presenza di piccoli buchi. Le superfici dei campioni contenenti albumina risultano costituite da piccole particelle sferiche di dimensioni variabili a seconda delle concentrazioni di PAM e albumina.

Le immagini AFM, come mediamente gli altri tipi di analisi, mostrano che il PAM al 5% presenta caratteristiche superficiali che si differenziano dall'andamento generale, e questo si ripercuote sull'interazione con lo strato cellulare.

Tramite la microscopia a forza atomica è anche possibile stabilire le caratteristiche meccaniche dei substrati esaminati, confrontando i dati con quelli ottenuti con materiali di riferimento. A tale proposito sono al momento in corso test di caratterizzazione meccanica su film di PAM.

Adesione Cellulare.- I film polimerici su cui sono state seminate cellule endoteliali sono stati analizzati al microscopio ottico: ogni ora per le prime ore dalla seminazione, e successivamente a scadenze più lunghe per due giorni. È stato osservato che mentre un discreto numero di cellule aderisce al PAM al 10%, una quantità di cellule decisamente inferiore riesce a aderire sul PAM all'1% e al 5%. Scartando la concentrazione 1% (troppo bassa per produrre una struttura polimerica utilizzabile), solo i campioni a 5% e 10% di PAM sono stati miscelati con albumina per cercare di migliorare l'adesione cellulare.

Come atteso, l'aggiunta di albumina aumenta l'adesione, anche se in maniera non direttamente correlabile alla sua concentrazione. La combinazione polimerica con i più elevati valori di adesione e proliferazione cellulare risulta quella composta da 0.3% di albumina e 10% di PAM, in cui è stata misurata una densità superiore a 40 000 cellule/cm² nell'osservazione a 24 ore.

Sistema di deposizione per la realizzazione di strutture bidimensionali

La realizzazione di matrici cellulari complesse, analoghe a quelle naturali, richiede l'uso di tecniche specializzate sia per la deposizione di strutture bi- e tridimensionali in grado di permettere uno sviluppo coerente e funzionale delle matrici bioartificiali, sia per il corretto posizionamento di cellule in tali strutture, così che l'insieme possa avere un idoneo scambio di nutrienti e scarichi.

A tale scopo è stato appositamente sviluppato presso il Centro "E. Piaggio" un sistema di microposizionamento tridimensionale in grado di depositare, tramite l'uso di una nanosiringa, gocce del volume del nanolitro sia di polimero che contenenti singole cellule [5]. Tramite tale tecnica è quindi possibile posizionare le cellule in modo selettivo e preciso. In base a metodi di stereolitografia assistita dal computer, è inoltre possibile ricreare la struttura 3-D di un organo con dettagli di alcune decine di micron.

Il sistema di deposizione al momento realizzato è costituito da una nanosiringa con serbatoio in acciaio e con all'estremità un ago in vetro con punta del diametro di 20-30 µm, dal quale viene espulso il polimero grazie all'applicazione di piccole pressioni. L'apparecchio comprende un microposizionatore (precisione 0.1 µm) con relativo controllore che, interfacciato al computer, permette la definizione di geometrie ben definite. Esso è inoltre dotato di dispositivo per il controllo ed il mantenimento costante del livello della pressione applicata, in modo che il "pattern" venga depositato in condizioni controllate non solo di velocità di scorrimento, ma anche di pressione applicata.

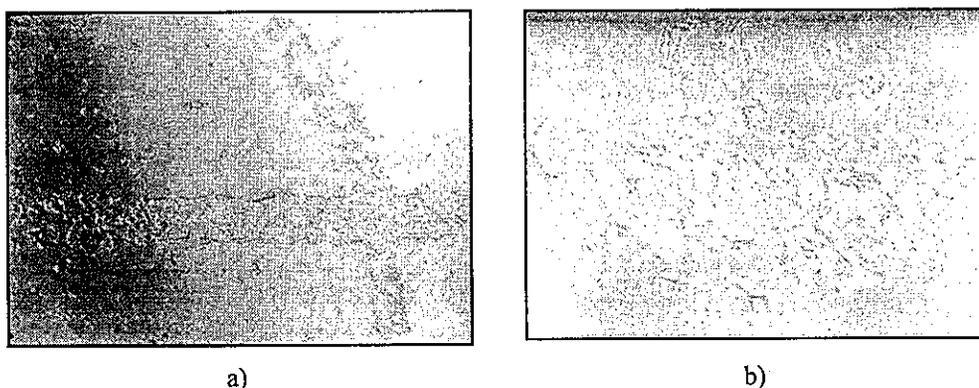


Figura 1.- Immagine al microscopio di cellule endoteliali su "pattern" bidimensionale ottenuto da una soluzione di PAM al 10% (a), e relativo ingrandimento (b).

Nei test preliminari, tuttora in corso, il sistema è stato utilizzato per la realizzazione di "pattern" lineari, costituiti da righe di polimero della larghezza di circa 20-50 µm ed uno spessore di 2-4 µm, depositati su lastrine di vetro. I polimeri utilizzati sono stati PAM ed un poliuretano biocompatibile, preso come riferimento. Le prove di adesione e proliferazione cellulare sui pattern così realizzati (Fig. 1), hanno dimostrato che la disposizione cellulare dipende dalla larghezza delle piste. Questo è stato

verificato anche dai test eseguiti dal gruppo della Prof.ssa De Filippi (Dipartimento di Genetica, Biologia e Biochimica, Università di Torino) su campioni preparati a Pisa.

Bioreattore per test dinamici

La necessità di studiare le alterazioni prodotte in presenza di un ambiente dinamico sulle attività cellulari, quali l'adesione e la proliferazione, ha portato alla progettazione di un bioreattore, che è attualmente in fase di realizzazione presso il Centro "E. Piaggio". Esso è costituito da una cella di coltura in cui vengono immessi i substrati sui quali viene eseguita la semina cellulare, e in cui vengono mantenute le normali condizioni fisiologiche di temperatura, di pH, di flusso di nutrienti e di apporto di O₂ e CO₂. Il controllo e la regolazione di queste variabili viene realizzato tramite un insieme di sensori interfacciati al computer con una scheda I/O, in modo da poter avere anche una visione diretta e globale della loro evoluzione temporale. Il sistema prevede anche la dotazione di una telecamera a CCD per l'ottenimento di immagini dell'andamento temporale della disposizione cellulare. Da tali immagini potranno essere estratte informazioni sulle leggi che regolano la motilità e la proliferazione cellulare.

Conclusioni

Sono state valutate le caratteristiche di adesione e proliferazione cellulare su substrati ottenuti da miscele a base di PAM, polimero bioerodibile che può essere utilizzato per la realizzazione di strutture 3-D, e quindi di intelaiature su cui far sviluppare strutture cellulari complesse. A tale scopo è stato perfezionato un sistema di micro-deposizione 3-D a nanosiringa, con il quale sono stati preparati "pattern" bidimensionali polimerici. In parallelo è stato progettato un bioreattore per lo studio della crescita cellulare su tali substrati in condizioni dinamiche.

Uno dei maggiori limiti riscontrati con l'uso del PAM risiede nelle sue limitate proprietà meccaniche. Per questo motivo sono attualmente in fase di preparazione, presso il Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale di Pisa, nuovi idrogeli con buone proprietà meccaniche e facilmente modellabili, anche in forme complicate, che possano essere utilizzati nel prosieguo del progetto per la realizzazione di strutture portanti (in particolare di forma cilindrica) su cui depositare le miscele PAM-albumina e quindi far crescere le cellule, al fine di ottenere protesi vascolari.

Pubblicazioni

1. Ahluwalia A., Basta G., Ricci D., Francesconi R., Domenici C., Grattarola M., Palchetti L., Preininger C., De Rossi D. **Langmuir-Blodgett films of antibodies as mediator of endothelial cell adhesion on polyurethanes.** *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* 1999, 10, 295.
2. Chiellini E., Solaro R., Leonardi G., Giannasi D., Lisciani R., Mazzanti G. **New polymeric hydrogel formulations for the controlled release of α -interferon.** *J. Contr. Release.* 1992, 22, 273.
3. Ahluwalia A., Basta G., Chiellini F., De Rossi D., Domenici C., Ricci D., Vozzi G. **Surface properties of bioerodable biomaterials for tissue engineering.** (Abstract p. 76) Presentato al 5th Workshop European Science Foundation – Artificial Biosen. Interfaces, Pisa, 22-24 ottobre 1998.
4. Ahluwalia A., Basta G., Chiellini F., Ricci D., Vozzi G. **Endothelial cell adhesion on bioerodable polymers.** *J. Mater. Sci. Mater. Medicine* (inviato).
5. Ahluwalia A., De Rossi D., Vozzi G., Chiellini F., Chiellini E., Solaro R., Domenici C., Basta G., Ricci D. **Patterning of polymeric scaffolds for tissue engineering.** (Abstract) Presentato al XIIth Aachen Colloquium on Biomaterials, Aachen (D), 18-19 febbraio 1999.

Adesione di cellule endoteliali a biomateriali e matrici purificate negli endoteli ricostruiti in vitro: controllo della proliferazione e dell'apoptosi da parte delle integrine

Paola DEFILIPPI

Dipartimento di Genetica, Biologia e Biochimica
Università di Torino
Via Santena, 5 bis
10126 Torino

Principali partecipanti: G. Tarone, L. Silengo, F. Altruda, M. Venturino, C. Olivo, C. Bozzo¹, L. Moro¹
Dipartimento di Genetica, Biologia e Biochimica, Università di Torino
¹Dipartimento di Scienze Mediche, Università del Piemonte Orientale.

Sintesi dell'attività svolta nel corso del secondo anno

Nelle cellule endoteliali la risposta mitogenica ai fattori di crescita richiede stimoli additivi forniti dall'adesione, mentre la sopravvivenza all'apoptosi è controllata dagli stimoli adesivi. La natura di questi stimoli è ancora ampiamente sconosciuta. Nello studiare i fenomeni che regolano la risposta proliferativa e la sopravvivenza dall'apoptosi nelle cellule endoteliali adese a matrici naturali ed a supporti sintetici, nella prima parte del progetto abbiamo studiato l'attivazione del recettore dell'EGF nelle cellule endoteliali nelle diverse condizioni di adesione; l'attivazione delle chinasi nucleari MAP ed il ruolo delle chinasi MAP nell'ingresso nel ciclo cellulare e/o la sopravvivenza dall'apoptosi nelle varie condizioni di adesione (pubblicazione 1) (vedi stato di avanzamento, ISTISAN 98/32).

Nella seconda fase del progetto abbiamo identificato una nuova via di segnalazione indotta dall'adesione, consistente nell'attivazione della via di segnalazione JAK/STAT da parte dell'adesione e nel suo coinvolgimento nell'attivazione trascrizionale dei geni precoci come c-fos (Brizzi et al. sottomesso, pubblicazione 5). Inoltre abbiamo determinato che nelle cellule endoteliali l'integrina α v β 3 è necessaria allo stimolo mitogenico indotto dal fattore di crescita vascolare VEGF (Soldi et al., 1999, pubblicazione 2). In collaborazione con il Dr. De Rossi abbiamo valutato l'adesione delle cellule endoteliali a nuovi biomateriali utilizzabili come supporto protesico.

Nei dettagli, abbiamo identificato che l'adesione di cellule endoteliali alle proteine della matrice extracellulare (fibronectina, vitronectina, laminina) o ad anticorpi rivolti contro la subunità β 1 delle integrine induce la fosforilazione in tirosina del recettore per l'EGF (EGF-R) in assenza dei ligandi solubili quali EGF o TGF α . Abbiamo quindi dimostrato che la fosforilazione del recettore dipende dall'attivazione della chinasi recettoriale. Questo dato originale permette di concludere che l'EGF-R è transattivato dall'adesione alla matrice mediata dalle integrine e suggerisce che la sua attivazione possa avere un ruolo nelle vie di segnalazione indotte dall'adesione. A questo scopo abbiamo valutato nelle varie condizioni di adesione l'attivazione della chinasi MAP Erk-1, che è fondamentale per la progressione nel ciclo cellulare e per la risposta genica. Abbiamo dimostrato che l'adesione alla matrice induce l'attivazione di Erk-1 nelle cellule endoteliali. Abbiamo costruito una forma dominante negativa dell'EGF-R, che è priva del dominio citoplasmatico, e l'abbiamo espressa nelle cellule. L'espressione della forma dominante-negativa dell'EGF-R blocca l'attivazione di Erk-1 da parte dell'adesione, indicando che l'attivazione di Erk-1 in risposta all'adesione passa per la transattivazione del recettore dell'EGF. Abbiamo inoltre verificato che l'adesione delle cellule endoteliali alla matrice extracellulare protegge le cellule dalla morte cellulare per apoptosi indotta da distacco. L'uso della forma dominante negativa dell'EGF-R ci ha permesso di concludere che la sopravvivenza è regolata dalla transattivazione dell'EGF-R da parte dell'adesione. Per evidenziare i meccanismi biochimici di controllo dell'apoptosi abbiamo iniziato a valutare il ruolo delle chinasi MAP. Abbiamo utilizzato un inibitore specifico dell'attivazione di Erk-1, PD98059. Mentre l'attivazione di Erk-1 in risposta all'adesione è bloccata in

presenza dell'inibitore, le cellule non vanno comunque incontro ad apoptosi, indicando che l'attivazione della MAP chinasi Erk-1 non è coinvolta nella risposta di sopravvivenza indotta dall'adesione.

Abbiamo verificato che l'adesione alla fibronectina di cellule endoteliali primarie preparate dal cordone ombelicale (HUVEC) stimola la fosforilazione in tirosina del fattore trascrizionale STAT5A. L'attivazione della STAT5A si ottiene anche piastrando le cellule sulla laminina o su anticorpi rivolti contro la subunità α_5 delle integrine, dimostrando che questo fenomeno è specifico dell'adesione mediata dalle integrine, ma non ristretto nell'ambito di questa classe di recettori. Inoltre questo evento è molto specifico, perché in risposta all'adesione viene fosforilata solo STAT5A e non l'isoforma STAT5B che è espressa in modo equivalente nelle HUVEC. In estratti cellulari citoplasmatici la cinetica di fosforilazione di STAT5A è molto rapida, con il picco raggiunto a 20 min di adesione e la scomparsa del segnale a 40 min. Questi dati indicano che la fosforilazione di STAT5A rappresenta quindi un segnale precoce in risposta all'adesione. La fosforilazione di STAT5A in risposta all'occupazione delle integrine è dovuta all'attivazione di una tirosina chinasi. Tra le possibili chinasi che possono avere questo ruolo, abbiamo studiato la chinasi citoplasmatica JAK2 (Janus kinase 2) ed abbiamo dimostrato che JAK2 è fosforilato in tempi rapidi dall'adesione alla fibronectina o ad anticorpi diretti contro l'integrina β_1 . Quindi l'adesione mediata dalle integrine è in grado di stimolare la via JAK/STAT, sino ad ora identificata come bersaglio di citochine infiammatorie e fattori di crescita.

In seguito alla sua fosforilazione la proteina STAT5A è traslocata dal citoplasma al nucleo dove agisce come fattore trascrizionale. Il promotore di c-fos contiene una sequenza SIE (c-sis inducible element) che può legare le due forme di STAT5. Abbiamo dimostrato che gli estratti nucleari di cellule aderenti alla fibronectina o alla laminina hanno un'attività di legame in vitro sul promotore di c-fos, che è spiazzata dall'anticorpo diretto contro la STAT5A e non la STAT5B. Il gene c-fos è indotto in risposta all'adesione e la sua induzione è correlata con il controllo del ciclo cellulare esercitato dall'adesione. Per stabilire se l'attivazione di STAT5A abbia un ruolo in questo processo, abbiamo costruito delle linee cellulari in fibroblasti murini NIH3T3 che esprimono il dominante negativo di STAT5A. Questo dominante negativo è delecto nella regione carbossiterminale, ha perso la capacità di essere fosforilato e di traslocare al nucleo. Le linee che esprimono stabilmente questo costrutto dimostrano una riduzione del 50-70% dell'RNA messaggero di c-fos indotto in risposta all'adesione alla fibronectina. Abbiamo anche dimostrato che questa via è complementare all'attivazione di MAP chinasi della famiglia di Erk in risposta all'adesione. Questi dati dimostrano quindi che l'attivazione della via JAK/STAT da parte dell'adesione controlla la trascrizione del gene c-fos e può quindi rappresentare un importante meccanismo con cui le integrine controllano la proliferazione cellulare.

Nelle HUVEC abbiamo inoltre stabilito che l'integrina $\alpha_5\beta_3$ è necessaria per l'attivazione del recettore per il fattore di crescita vascolare VEGF, VEGF-R2. Infatti solo in presenza di $\alpha_5\beta_3$ impegnata con il suo ligando, il recettore si fosforila, si ha attivazione di vie a valle, quali la fosfatidil inositolo 3 chinasi e di conseguenza proliferazione cellulare. Questi dati indicano quindi l'esistenza di un meccanismo di cooperazione tra integrine e fattori di crescita a livello del recettore nelle cellule endoteliali. Questi risultati indicano che le integrine sono necessarie al corretto funzionamento dei recettori per i fattori di crescita e per l'innescamento della risposta proliferativa.

In collaborazione con il Prof. De Rossi abbiamo valutato l'adesione delle cellule endoteliali a nuovi biomateriali utilizzabili come supporto protesico. Abbiamo utilizzato un poliuretano termoelastico sintetizzato che cambia proprietà meccaniche a 55 gradi (diventando morbido, ma ancora maneggiabile). Il materiale è stato depositato su vetrini su piste a pressione diverse o utilizzato sotto forma di spugna (vedi nel presente rapporto ISTISAN, Prof. De Rossi). Su questi campioni sono state seminate cellule endoteliali e si verificata l'adesione a tempi brevi, la proliferazione e l'organizzazione del citoscheletro. Le cellule aderiscono sulle spugnette, e crescono all'interno delle porosità, creando delle zone di endotelizzazione più o meno estese. La crescita è stata valutata a 24, 48, 96 ore dalla semina. La morfologia delle cellule è normale. Sul materiale distribuito come piste, si è verificato che le cellule aderiscono alle piste alle crescono su di esse. La larghezza della pista è in grado di accogliere mediamente dalle tre alle cinque cellule. Negli snodi delle piste, in punti di allargamento, le cellule hanno comunque aderito su tutta la superficie disponibile. Abbiamo però verificato che per avere una buona adesione cellulare occorre lasciar intercorrere un periodo lungo dalla deposizione (quindici giorni). Infatti le cellule

aderiscono poco a piste preparate di fresco (48 ore), probabilmente a causa della mancata evaporazione dei solventi organici.

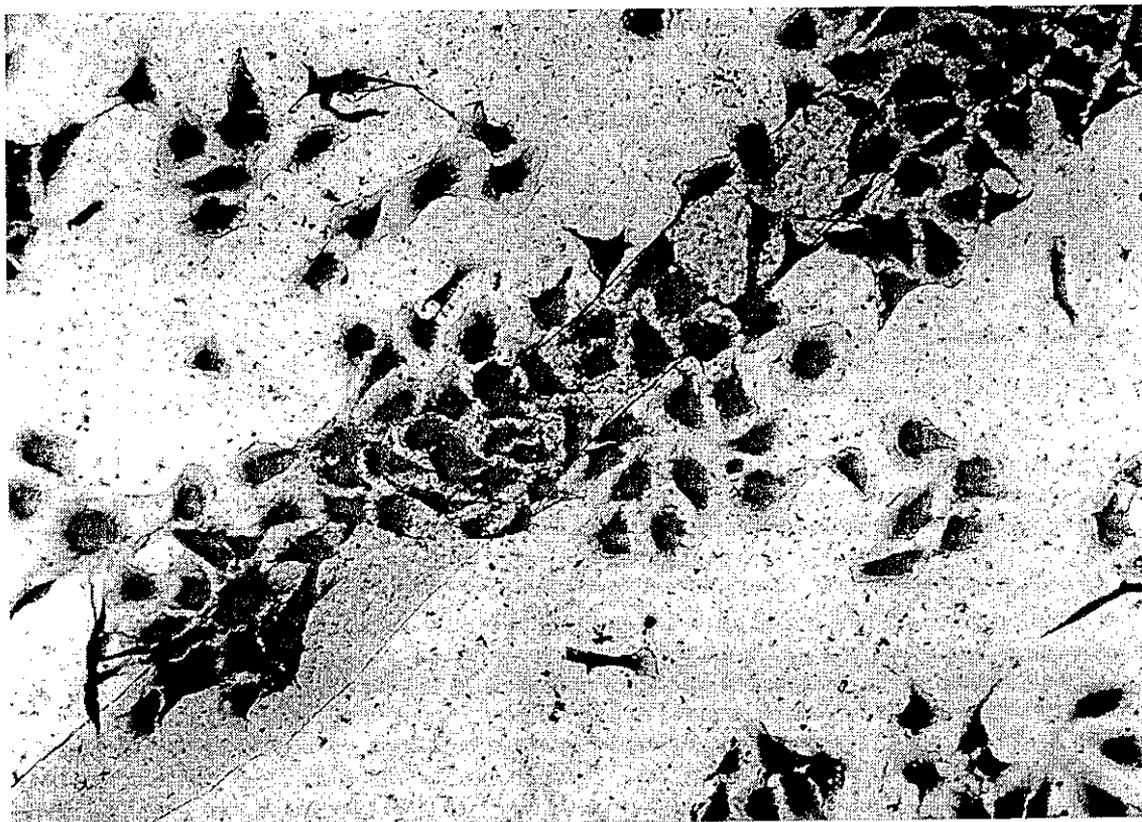


Figura 1.- cellule ECV304 aderenti al poliuretano (traccia centrale).

Da questi dati si può concludere che tali materiali possono essere utilizzabili ai fini della costruzioni di protesi endoteliali. Ci proponiamo ora di analizzare nei dettagli il citoscheletro cellulare e la sopravvivenza all'apoptosi.

Publicazioni

- 1) L. Moro, M. Venturino, C. Bozzo, L. Silengo, F. Altruda, L. Beguinot, G. Tarone, and P. Defilippi. **Integrins induce activation of EGF receptor: role in map kinase induction and adhesion-dependent cell survival.** *EMBO J.*, 17, 22, 6622-6632 (1998).
- 2) R. Soldi, S. Mitola, M. Strasly, P. Defilippi, G. Tarone and F. Bussolino. **Role of ALPHA5/BETA3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor 2.** *EMBO J.*, 18, 4, 882-892 (1999)
- 3) M. Cavaldesi, G. Macchia, S. Barca, P. Defilippi, G. Tarone and T. Petrucci. **Association of dystroglycan-complex isolated from bovine brain synaptosomes with proteins involved in signal transduction.** *Journal of Neurochem.* 72: 1648-55 (1999)
- 4) P. Defilippi, C. Olivo, M. Venturino, L. Silengo and G. Tarone. **Actin cytoskeleton organization in response to integrin-mediated adhesion.** (Submitted to *Microsc. Res. Techniq*)
- 5) M.F. Brizzi, P. Defilippi, A. Rosso, M. Venturino, G. Garbarino, A. Miyajima, L. Silengo, G. Tarone and L. Pegoraro. **Integrin-mediated adhesion of endothelial cells induces JAK2 and STAT5A activation: role in the control of c-fos gene expression.** (Submitted to *Mol Biol Cell*)

Tecnologie di coltura di cellule endoteliali su elastomeri poliuretanicici innovativi per protesi vascolari

Elisabetta DEJANA

Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri
Via Eritrea, 62,
20157 Milano

Principali partecipanti: M.G. Lampugnani, G. Balconi, F. Breviario, M. Corada
Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri.

Sintesi dell'attività svolta nel corso del secondo anno

Una parte del lavoro di ricerca ha riguardato lo sviluppo e la caratterizzazione di linee endoteliali da utilizzare nei test di screening di biocompatibilità di materiali per protesi vascolari. Abbiamo proseguito la caratterizzazione della linea di endotelio umano derivante dal microcircolo sottocutaneo introdotta in precedenza. Queste cellule presentano caratteristiche interessanti, quali una particolare suscettibilità ad agenti tossici (SDS) e ad istamina. Le cellule rispondono contraendosi ed aumentando la permeabilità paracellulare in maniera più accentuata delle cellule della vena del cordone ombelicale. Inoltre, l'organizzazione del citoscheletro e delle giunzioni intercellulari è fortemente modificata dagli agenti irritanti sia da un punto di vista morfologico che funzionale. Per le sue caratteristiche di sensibilità e per la riproducibilità della risposta questa linea sembra quindi essere di elezione per gli studi di biocompatibilità nello screening dei materiali polimerici. Il lavoro di caratterizzazione di queste cellule e della loro risposta all'istamina in termini di modificazioni morfologiche e funzionali ha dato origine ad una pubblicazione riportata in seguito (Andriopoulou et al. *Ather. Thromb. Vasc. Biol.* 1999 in press).

Il secondo tipo di cellule allo studio è quello dei precursori endoteliali circolanti. Queste cellule, qualora si arrivasse ad isolarle in numero elevato e qualora presentassero una differenziazione endoteliale adeguata, sarebbero le cellule di elezione per il trapianto su biopolimeri. Si potrebbero infatti isolare a partire dallo stesso individuo su cui sarebbero impiantate le protesi vascolari. Inoltre queste cellule, essendo staminali, presentano una capacità proliferativa molto elevata. Basterebbe quindi un numero molto limitato di cellule per avere una buona endotelizzazione della superficie protesica.

Idealmente vorremmo arrivare a definire un protocollo che permetta: a) l'isolamento dei progenitori circolanti; b) la loro parziale differenziazione in vitro; c) il reimpianto sulle superfici protesiche al momento della chirurgia. Poiché tutto questo necessita di lavoro sperimentale per verificare la fattibilità, abbiamo lavorato inizialmente su precursori endoteliali di topo.

L'uso del topo permette infatti di verificare l'ipotesi iniziale, reimpiantando le cellule su protesi vascolari inserite a bypass nell'aorta addominale (questo sarà fatto in collaborazione con il Laboratorio di Ricerche Cardiovascolari dell'Istituto Mario Negri, diretto dal Dr Roberto Latini).

Viste le difficoltà legate all'isolamento dei progenitori endoteliali circolanti a partire dal sangue di topo o dal midollo, abbiamo sviluppato altri sistemi che ci permettessero di lavorare su queste cellule. Abbiamo così isolato e caratterizzato i progenitori endoteliali a partire dalle cellule delle isole vascolari del sacco vitellino dell'embrione di topo nei primi giorni di sviluppo. Inoltre, siamo riusciti a mettere a punto una metodologia per indurre la differenziazione delle cellule totipotenti della blastocisti in precursori endoteliali *in vitro*. In altre parole abbiamo riprodotto *in vitro* il processo di differenziazione endoteliale normalmente presente nell'embrione.

In tutti e tre i sistemi, le cellule sono state isolate con biglie magnetiche legate ad anticorpi contro un marcatore endoteliale (PECAM, platelet endothelial cell adhesion molecule). Le biglie sono state messe a contatto con le cellule e quindi i putativi precursori isolati e messi in coltura. Siamo stati in grado di isolare linee endoteliali in grado di espandersi in coltura e di procedere attraverso diverse duplicazioni. Abbiamo osservato come queste cellule sono in grado di esprimere quasi tutti i marcatori endoteliali e, una volta stabilizzate, di crescere quasi illimitatamente. In particolare abbiamo analizzato in immunofluorescenza, Western e Northern blot e "RNase protection" la presenza di marcatori endoteliali come: a) proteine giunzionali (VE-caderina, N-caderina, catenine, PECAM, JAM, occludina, etc.); b) recettori per le molecole della matrice extracellulare; c) recettori per fattori di crescita endotelio specifici; d) citochine e loro recettori; e) molecole del citoscheletro.

Abbiamo anche analizzato la capacità di queste cellule di formare strutture vascolari in un gel tridimensionale. Le conclusioni che si possono trarre da questo tipo di lavoro è che le cellule endoteliali di topo ottenute ai primi stadi di differenziazione possono essere mantenute in coltura senza indurre una perdita di differenziazione. Queste linee cellulari disponibili in coltura possono ora essere reimpiantate su protesi vascolari artificiali che saranno poi inserite nell'aorta addominale di topo. Questo lavoro è

riportato in un lavoro sottoposto per pubblicazione e riportato più sotto (Balconi et al. sottoposto a pubblicazione). Inoltre queste cellule possono essere utilizzate per trasferimento genico.

Il razionale di questo punto è quello di modificare le cellule endoteliali in maniera da renderle meno trombogeniche e quindi più attive nell'inibire la chiusura delle protesi vascolari. Questo dovrebbe essere ottenuto tramite trasferimento di geni in grado di indurre la fibrinolisi come il t-PA (tissue plasminogen activator). Abbiamo caratterizzato a questo proposito un nuovo vettore retrovirale (denominato PINCO) che permette un'efficienza di infezione più alta dei vettori usati in precedenza. Questo aspetto diventa essenziale quando si dovesse partire da un numero limitato di cellule. Il vettore contiene la proteina verde fluorescente (GFP) sotto il controllo di un promotore forte quale quello del citomegalovirus. I primi dati indicano che le cellule endoteliali dal cordone ombelicale, le cellule endoteliali da capillari sottocutanei e i precursori endoteliali di topo (vedi sopra) possono essere infettati con un'efficienza del 70-90 % come misurato in citofluorimetria. Questi risultati sono importanti perché con vettori plasmidici l'endotelio presenta efficienza molto bassa di trasfezione.

Abbiamo anche modificato questo vettore per verificare la possibilità di sostituire GFP con altre proteine allo studio. I risultati sono stati molto soddisfacenti. Siamo infatti riusciti a trasferire sui vettori almeno tre tipi diversi di cDNA, che erano, al momento, disponibili in laboratorio. Il lavoro potrà adesso proseguire secondo linee diverse.

1) L'uso dei precursori endoteliali di topo per l'impianto *in vivo* su protesi vascolari costituite da materiali polimerici standard disponibili commercialmente. Le cellule saranno fatte aderire e crescere sulle protesi in vitro per 24 ore e le protesi saranno poi impiantate nell'aorta toracica di topo. Per facilitare l'evidenziazione delle cellule si useranno cellule infettate con vettori retrovirali che esprimono GFP e che sono quindi fluorescenti. Questo permetterà una facile analisi del numero di cellule che possono restare sulla superficie dopo il reimpianto e che eventualmente sono in grado di crescere e ricoprire la protesi a tempi diversi. Oltre a questo si studierà anche il reimpianto dei precursori *in vivo* in zone di neovascolarizzazione (ad esempio di ischemia degli arti periferici). È stato infatti descritto che questi precursori sarebbero in grado di reinscriversi in vasi in neoformazione. Questo sarebbe un altro parametro di valutazione della capacità proliferativa e della stabilità *in vivo* dei precursori endoteliali.

2) L'isolamento dei precursori endoteliali. Queste cellule sono state messe in coltura seminandole su fibronectina e tenute in coltura per diverse settimane. Sebbene alcune cellule mostrassero effettivamente positività per alcuni marcatori endoteliali, il loro numero era ancora troppo scarso per permettere un'analisi esaustiva. Per aumentare e selezionare in maniera più efficiente i progenitori, cercheremo di ottenere popolazioni di partenza più arricchite. In particolare useremo cellule CD34⁺ ottenute da pazienti trattati con GM-CSF (granulocyte-monocyte colony stimulating factor). Questa condizione è stata descritta infatti aumentare il numero di precursori. Inoltre utilizzando l'esperienza precedente raccolta coltivando progenitori endoteliali di topo, coltiveremo le cellule umane insieme a fibroblasti embrionali o a cellule dello stroma midollare. Queste cellule sono infatti note indurre la differenziazione e la crescita dei progenitori endoteliali. Infine useremo altre tecniche di coltura come l'uso di colture a lungo termine da sangue intero. Se si otterranno quantità soddisfacenti precursori endoteliali si proverà quindi a reimpiantarli su protesi vascolari che saranno poi inserite nell'aorta addominale di topi nudi (vedi sopra).

Infine in un'altra parte del lavoro si è ulteriormente esaminata l'interazione tra le cellule endoteliali e materiali per protesi. Abbiamo continuato lo studio degli effetti della semina di cellule endoteliali su materiali forniti dal Lab. di Biomateriali del Dip. di Bioingegneria del Policlinico di Milano (dott.ssa C. Tanzi). In particolare è stata valutata l'adesione e la crescita delle cellule endoteliali (a 3 e 72 ore rispettivamente) su Hepitan 2000, Hepitan CA coniugati o meno ad eparina. I dati indicano che pochissime cellule sono in grado di aderire e di crescere rispetto all'adesione alla plastica di coltura. Questi risultati suggeriscono che la tossicità sia legata alla presenza di catalizzatori non biocompatibili per le cellule endoteliali.

Pubblicazioni

1. Garlanda C., Dejana E. **Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17: 1193-1202
2. Garlanda C., Berthier R., Garin J., Stoppacciaro A., Ruco L., Vittet D., Gulino D., Matteucci C., Mantovani A., Vecchi A., Dejana E. **Characterization of MEC 14.7, a new monoclonal antibody recognizing mouse CD34: A useful reagent for identifying and characterizing blood vessels and hematopoietic precursors.** *Eur J Cell Biol.* 1997; 73: 368-377
3. Del Maschio A., Martin Padura I., Bernasconi S., Dejana E. **Triggering of beta1- integrin chain induces platelet adhesion to cultured endothelium.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17: 2663-2671

4. Navarro P., Ruco L., Dejana E. **Differential localization of VE- and N-cadherins in human endothelial cells: VE-cadherin competes with N-cadherin for junctional localization.** *J Cell Biol.* 1998; 140: 1475-1484
5. Andriopoulou P., Navarro P., Zanetti A., Lampugnani M. G., Dejana E. **Histamine induces tyrosine phosphorylation of endothelial cell-to-cell adherens junctions.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (in press)
6. Dejana E., Bazzoni G., Lampugnani M. G. **The role of endothelial cell to cell junctions in vascular morphology.** In: 1999 State of Art, Suppl. *Thromb. Haemost.* 1999 (in press)
7. Balconi G., Spagnuolo R., Dejana E. **Development of endothelial cell lines from embryonic stem cells. A useful tool for studying genetically manipulated endothelial cells in vitro.** (submitted)

Ingegneria dei tessuti per la ricostruzione cutanea

Luigi DONATI

Centro per lo Studio dei Biomateriali e dell'Ingegneria Tessutale in Chirurgia Plastica
Istituto di Chirurgia Plastica
Università di Milano
Piazza Ospedale Maggiore, 3
20162 Milano

Principali partecipanti: M. Marazzi, L. Falcone, M.N. Ordanini, M. Ferrone, M. Klinger, U. Altamura
Istituto di Chirurgia Plastica, Università di Milano

Sintesi dell'attività svolta nel corso del secondo anno

INTRODUZIONE

L'ingegneria tessutale, campo di ricerca interdisciplinare tra lo sviluppo della tecnologia cellulare e della tecnologia dei biomateriali, negli ultimi anni ha effettuato significativi passi avanti nel trasferire i risultati di ricerche laboratoristiche all'applicazione clinica.

Obiettivo principale della ricerca, finalizzata all'applicazione in chirurgia plastica, è la realizzazione di una cute artificiale destinata alla copertura permanente di lesioni cutanee dovute ad ustioni o a varie patologie.

I risultati ottenuti con l'applicazione clinica di lamine di cheratinociti coltivati, prima secondo il metodo di Rheinwald e Green e poi su carrier di acido ialuronico esterificato, hanno evidenziato una guarigione più rapida e ed esteticamente migliore rispetto ai metodi tradizionali.

Il problema non è però completamente risolto nei casi di lesioni estese e particolarmente profonde poiché si hanno ancora difficoltà di attecchimento delle sole lamine di cheratinociti, con conseguenti tempi lunghi di guarigione, esiti cicatriziali e necessità di interventi successivi che comportano tempi lunghi di ricovero.

Da qui è nata l'esigenza di continuare la ricerca verso la realizzazione di un sostituto cutaneo ottimale in cui siano presenti sia l'epidermide sia un sostituto dermico.

Perché ciò sia realizzabile è necessario che i biomateriali e le cellule utilizzate interagiscano in maniera ottimale sia in vitro sia in vivo.

Il biomateriale ideale per riprodurre un nuovo derma ingegnerizzato deve permettere l'adesione delle cellule, mantenere il loro stato differenziato e favorirne prima la proliferazione fino alla colonizzazione uniforme, poi la sintesi di nuova matrice che possa sostituire lo scaffold nel momento in cui, impiantato in vivo, viene completamente biodegradato.

Solo biomateriali con tali requisiti possono garantire la giusta integrazione nel tessuto ospite ed essere validamente utilizzati come sostituti per il trattamento di lesioni cutanee più complesse.

E' stato scelto l'acido ialuronico come biomateriale da testare come scaffold per la riproduzione dei fibroblasti del derma poiché, già precedentemente testato e poi adottato come supporto valido per la riproduzione in vitro dei cheratinociti, si è dimostrato estremamente biocompatibile e bioattivo tanto da stimolare la formazione della lamina basale già in vitro. Inoltre l'acido ialuronico, normalmente presente nella matrice extracellulare, non partecipa solo come componente strutturale ma adempie a specifiche funzioni quali la regolazione del bilancio idrico nei tessuti; riconosciuto da recettori di cellule specifiche, quale il CD44, regola l'adesione, la riproduzione, la differenziazione, la motilità e l'attivazione di particolari tipi cellulari, modulando i processi infiammatori, l'angiogenesi e i processi di riparazione tessutale.

Inoltre la possibilità di ottenere molecole con diverso grado di esterificazione permette di realizzare scaffolds con diversi tempi di biodegradabilità. Stabiliti i tempi necessari per ottenere in vitro una buona colonizzazione e in vivo l'attecchimento con una completa vascolarizzazione del neotessuto, si può individuare il grado di esterificazione adatto per avere la degradazione modulata secondo i tempi ottimali.

MATERIALI E METODI

Biomateriali

Scaffold per i fibroblasti. - è stato testato un dermal-like costituito da un derivato dell'acido ialuronico (estere benzilico esterificato al 100%, per gentile concessione della Fidia Advanced Biopolymers) in forma di tessuto non tessuto costituito da fibre, di 10-15 millimicron di diametro, a maglia larga.

Cellule. - fibroblasti umani da prelievo cutaneo al 3° passaggio.

Preparazione del dermal-like

Il derma, ottenuto dopo separazione dermo-epidermica, da prelievo cutaneo, viene frammentato minutamente e poi incubato per 24 h a 37° al 5% di CO₂ in un medium di coltura per fibroblasti costituito da DMEM, siero fetale bovino, penicillina, streptomina, sodio-piruvato ed L-glutamina addizionato di collagenasi (200U/ml). Dopo agitazione meccanica per liberare i fibroblasti, ancora imbrigliati nella matrice, dopo il trattamento con collagenasi, si centrifuga la sospensione ottenuta che può così essere utilizzata per iniziare la riproduzione dei fibroblasti in vitro.

Per ottenere una popolazione cellulare sufficiente per eseguire i test con il tessuto-non tessuto i fibroblasti della coltura primaria vengono amplificati fino al terzo passaggio. Dopo tripsinizzazione i fibroblasti umani vengono seminati alla concentrazione di 30.000 cellule per cm² sui campioni (2X2 cm) di acido ialuronico, in forma di trama tridimensionale, fatti aderire sul fondo di una piastra di petri con olio di vaselina sterile e incubati a 37° C ed al 5% di CO₂. Il medium di coltura è costituito da DMEM, siero fetale bovino, penicillina, streptomina, sodio piruvato ed L-glutamina.

Le colture sono state bloccate con formalina tamponata ad intervalli di tempi stabiliti: dopo 3, 24, 48, 96 ore e dopo 15 giorni per eseguire le sezioni istologiche. I campioni così allestiti sono stati sottoposti a colorazioni con ematossilina eosina, tricromica e a indagini di immunostochimica per la ricerca di vimentina. In questo modo si è cercato di controllare la distribuzione, l'adesione, il mantenimento dello stato differenziato delle cellule all'interno del tessuto ed una eventuale sintesi di matrice intercellulare già in vitro.

RISULTATI

In tutte le sezioni, nei diversi tempi i fibroblasti mostrano sia la morfologia sia il grado differenziativo normale.

Dopo 3 ore dalla semina cellulare i fibroblasti appaiono sulla superficie del tessuto ma solo parzialmente adesi, non ancora distesi e dalla forma globulare.

Dopo 24 ore sono presenti e ben adesi sulle fibre più superficiali e con forma fibroblastoide.

Dopo 48 ore cominciano a vedersi nelle fibre intermedie per poi apparire dopo 96 ore nelle zone più declivi.

Nelle sezioni eseguite dopo 15 giorni di incubazione rari fibroblasti appaiono adesi sul tessuto poiché, proliferando adesi nel fondo della petri, rimangono lì dopo il distacco del campione.

CONCLUSIONI

Dimostrata la biocompatibilità del biomateriale scelto, si rende necessario migliorare le caratteristiche fisiche dello scaffold al fine di rendere omogenea la distribuzione e la proliferazione delle cellule all'interno del tessuto.

I fibroblasti, seminati sul materiale, attraversano gli spazi fra i filamenti fino a sedimentare nelle zone più declivi e poi nel fondo dove proliferano senza colonizzare il materiale in tutto il suo spessore. Tale inconveniente potrebbe essere risolto con una trama più fitta dei filamenti o con una maggiore compressione del tessuto.

Bibliografia

Donati L., Marazzi M., Veronesi A.M., Ordanini M.N., Falcone L., Ferrone M. and Mauri S. "Treatment of cutaneous wounds with cultured human keratinocytes on hyaluronic acid membranes" *Wound Repair and Regeneration*, 3: 363, 1995.

Rheinwald J.G and Green H.: Formation of a Keratinizing Epithelium in culture by a cloned cell line derived from a teratoma. *Cell*, vol 6 317-330, 1975

Rheinwald J.G and Green H.: Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*, vol 6 331-344, 1975

Rheinwald J.G.: Serial cultivation of normal human epidermal keratinocytes. *Methods in cell biology*, vol. 21A cap.15, 1980

Publicazioni

1. Donati L., Farneti A., Tallacchini M. **Aspetti medico-legali e normativi dei prodotti dell'ingegneria dei tessuti**, Dott. A. Giuffrè Editore -1998
2. Marazzi M., Falcone L., Ordanini M. N., Ferrone M., Klinger M., Altamura U. **Ingegneria dei tessuti per la ricostruzione cutanea** (In stampa)

Proprietà biomeccaniche della cornea: studio dei processi di riparazione

Domenico LEPORE, Monica Pagliara
 Scuola di Specializzazione in Oftalmologia
 Università Cattolica del Sacro Cuore
 Largo F. Vito 1 00168 ROMA

Principali partecipanti: F. Molle¹, G. Minicucci¹, L. Scullica¹, L. Ambrosio², R. De Santis², L. Nicolais²

¹ Istituto di Oftalmologia - Università Cattolica del Sacro Cuore Largo F. Vito 1 00168 ROMA

² Centro Ricerca Interdisciplinare Biomateriali - Facoltà di Ingegneria Università "Federico II", Napoli

Sintesi dell'attività svolta nel corso del secondo anno

L'attività svolta nell'ultimo biennio dal gruppo di ricerca interdisciplinare, nato dalla collaborazione fra l'Istituto di Oftalmologia dell'Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma e il Centro Universitario di Ricerca Interdisciplinare sui Biomateriali della Facoltà di Ingegneria dell'Università "Federico II" di Napoli, ha consentito la messa a punto di una metodica per la valutazione del comportamento meccanico del tessuto corneale e la sua applicazione per lo studio dei processi di riparazione del tessuto corneale sottoposto a tagli a tutto spessore ed a tagli stromali.

Introduzione

I processi di riparazione del tessuto corneale sottoposto a tagli stromali ed a tutto spessore hanno una notevole importanza in molte procedure chirurgiche in campo oftalmologico. La cornea, ad esempio, viene incisa a tutto spessore durante l'intervento di estrazione di cataratta: la variazione della sua geometria conseguente al taglio può causare astigmatismo. La cheratotomia radiale (KR), uno degli interventi classici della chirurgia refrattiva, consiste nel praticare alcuni tagli radiali non a tutto spessore (tagli stromali), per appiattare la superficie corneale. Particolare interesse suscitano inoltre quei farmaci che agiscono accelerando o ritardando tale processo di cicatrizzazione: si pensi al largo utilizzo di antinfiammatori steroidei dopo trattamenti di chirurgia refrattiva con laser ad eccimeri. In quest'ambito abbiamo ritenuto opportuno studiare meccanicamente cornee incise e trattate con due sostanze comunemente utilizzate per modulare il processo di cicatrizzazione corneale: gli antinfiammatori steroidei e l'acido ialuronico. La somministrazione di steroidi ritarda a diversi livelli il processo di cicatrizzazione corneale: rallenta la formazione del coagulo di fibrina, la rigenerazione dell'epitelio, inibisce l'attività fibroblastica e la formazione di collagene. L'acido ialuronico è un glicosamminoglicano formato da N acetil-D-glucosammina e acido D glucuronico. E' un importante costituente della matrice extracellulare ed è largamente utilizzato nella chirurgia oftalmica per le sue proprietà viscoelastiche e nelle terapie topiche come protettore dell'epitelio corneale. Recentemente è stato osservato che i suoi effetti sull'epitelio corneale non sono solo attribuibili alle sue proprietà viscoelastiche, ma ad un intervento diretto nei processi di cicatrizzazione corneale e morfogenesi. L'acido ialuronico infatti stimola la proliferazione delle cellule epiteliali e la formazione di emidesmosomi nella membrana basale favorendo l'adesione tra la membrana basale e le cellule epiteliali accelerando così la cicatrizzazione corneale.

Lo studio del comportamento meccanico delle cornee incise e sottoposte a terapia postoperatoria con steroidei ed acido ialuronico è stato condotto, come nei precedenti esperimenti, con un approccio di tipo ingegneristico. Esso consiste nello studiare il comportamento meccanico della cornea trattandola come un qualsiasi sistema materiale. Il tessuto corneale, infatti, può essere considerato come un materiale composito costituito da fibrille di collagene immerse in una matrice di proteoglicani.

L'uso di un tensiometro digitalmente controllato (INSTRON 4202), in grado di effettuare prove statiche di trazione a differenti velocità (in controllo di deformazione) ha consentito di calcolare un diagramma σ - ϵ del tessuto corneale e di individuare il punto di yield, ovvero quel punto in cui la

struttura subisce una deformazione non recuperabile, il punto di rottura ed il modulo elastico E del campione. Queste misurazioni consentono di comprendere meglio il comportamento meccanico della cornea, correlandolo ai dati microstrutturali del tessuto corneale.

Materiali e Metodi

Per la sperimentazione sono stati utilizzati 24 conigli albini adulti (48 cornee) i quali sono stati suddivisi in 4 gruppi formati ciascuno da 6 conigli. I conigli dei gruppi A e C sono stati sottoposti, in anestesia generale, ad un taglio corneale nella zona centrale successivamente suturato con tre punti in nylon 10.0. I conigli dei gruppi B e D sono stati invece sottoposti a tagli corneali stromali (450 nm, 95% dello spessore) Dallo studio sono stati esclusi tutti gli animali che hanno presentato un decorso postoperatorio anomalo, in particolare tutti quelli che hanno manifestato processi infiammatori generalizzati del bulbo oculare. I conigli dei gruppi A e B sono stati sottoposti a terapia postoperatoria con Desametasone sodio fosfato 0.1% 3 instillazioni al giorno per 7 (3 conigli) e 14 giorni (3 conigli); i conigli dei gruppi C e D con soluzione di acido ialuronico 0.1% agli stessi dosaggi e con gli stessi tempi di somministrazione. Al termine del periodo di sperimentazione i conigli sono stati sacrificati mediante overdose di pentobarbital, i bulbi oculari enucleati e le cornee, il cui spessore era stato precedentemente misurato mediante pachimetria, sono state prelevate e tagliate in strisce. I campioni di tessuto corneale sano così ottenuti sono stati sottoposti a prove statiche di trazione in controllo di deformazione che consistono nell'applicazione alle estremità del campione di una forza con direzione parallela a quella del provino registrando poi gli sforzi prodotti nel campione durante la deformazione. Dalle misurazioni così effettuate è possibile ottenere il diagramma stress-strain esso rappresenta la base per il calcolo di alcuni parametri biomeccanici importanti, quali lo sforzo massimo sviluppato all'interno del tessuto durante la prova, la deformazione unitaria corrispondente al max sforzo e allo sforzo al quale si verifica la rottura, nonché il modulo elastico, che esprime la proporzionalità tra sforzo e deformazione.

Risultati

Dagli studi effettuati risulta che la cornea ha un comportamento meccanico di tipo "viscoelastico": all'applicazione dello sforzo iniziale corrisponde una minima deformazione, come dimostra l'aspetto "J-shaped" della fase iniziale della curva σ - ϵ , determinato da questa proprietà smorzante del tessuto. L'incisione stromale altera le proprietà meccaniche della cornea. Dopo 14 giorni lo stress max raggiunto è il 72 % del tessuto corneale intatto.

La tabella seguente illustra i risultati della misurazione dello stress massimo e del Modulo Elastico dei 4 gruppi sperimentali e del gruppo di riferimento delle cornee incise e non trattate farmacologicamente (1,5).

Incisione	Trattamento	Modulo elastico	Max Stress
Stromale 1 settimana	NO	5.7±0.9	2.9±0.4
Stromale 2 settimane	NO	11.0±0.9	5.3±0.4
Tutto spessore 1 settimana	NO	1.58±0.3	0.55±0.15
Tutto spessore 2 settimane	NO	5.2±0.4	1.46±0.16
Stromale 1 settimana	Desametasone	7.2±1.6	2.3±0.4
Stromale 2 settimane	Desametasone	12.3±1.3	5.7±0.4
Tutto spessore 1 settimana	Desametasone	2.77±0.23	1.08±0.24
Tutto spessore 2 settimane	Desametasone	5.72±0.48	1.76±0.34
Stromale 1 settimana	Acido Ialuronico	6.1±0.8	3.1±0.4
Stromale 2 settimane	Acido Ialuronico	13.0±1.3	6.7±0.4
Tutto spessore 1 settimana	Acido Ialuronico	1.77±0.23	0.8±0.24
Tutto spessore 2 settimane	Acido Ialuronico	7.31±0.65	2.33±0.37

Discussione

Effetti positivi dei trattamenti studiati sono osservabili durante la prima settimana successiva all'intervento. Probabilmente l'effetto antiinfiammatorio di questi farmaci facilita il processo di riepitelizzazione che si attua in questo periodo. Essi probabilmente riducono l'infiltrazione da parte di cellule antiinfiammatorie dello stoma e il conseguente rilascio di enzimi proteolitici. Al 14° il processo di rimodellamento da parte delle collagenasi è completato, e la definitiva ricostruzione del tessuto (sintesi del collagene) terminata. Il fatto che gli steroidi inibiscano l'attivazione dei fibroblasti e l'attività delle collagenasi potrebbe spiegare l'inefficacia degli stessi in questa fase della cicatrizzazione. Il trend dei dati parziali indica che, a lungo termine, la terapia antiinfiammatoria, interferisce con i processi di rimodellamento che accompagnano la riparazione del tessuto corneale. In conclusione questo progetto di ricerca sulle proprietà biomeccaniche del tessuto corneale, ha dimostrato che la somministrazione dei farmaci steroidei ed antiinfiammatori non steroidei, in questo caso l'acido ialuronico, nel postoperatorio influenza la cicatrizzazione della cornea in modo diversificato a seconda del tempo trascorso dall'incisione. I dati forniti in questo studio, trasferiti nella pratica clinica, potranno essere utilizzati per modulare i processi di riparazione dei tessuti corneali a seconda delle diverse esigenze che si manifestano nel decorso postoperatorio di tutte le procedure chirurgiche che richiedono un taglio corneale a tutto spessore.

Nuove prospettive

Le fasi successive del lavoro o studio condotto dal gruppo di ricerca interdisciplinare, che sarà coordinato dal dott. Domenico Lepore, prevedono l'estensione dello studio con la valutazione dei comportamenti biomeccanici di cornee sottoposte a trattamento laser ad eccimeri e cheratotomia lamellare mediante microcheratomo (come nella procedura chirurgia di cheramileusi in situ). Verranno inoltre testati nuovi principi attivi sulla cicatrizzazione corneale e nuovi metodi di somministrazione degli stessi con sistemi a lento rilascio sulla superficie oculare, da impiegare nella terapia postoperatoria della chirurgia corneale e refrattiva laser.

Bibliografia

1. Lepore D., Pagliara M.M., Nucci C., Molle F., De Santis R., Ambrosio L.: **Biomechanical properties of rabbit sclera and cornea.** *Vis Res* 47, 118, 1996.
2. Lepore D., Nucci C., Pagliara M.M., Molle F., DeSantis R., Borzacchiello A., Nicolais L., Ambrosio L., Cerulli L.: **Biomechanical properties of rabbit cornea.** *Inv Ophthalmol* 1996, 37, 3, 379.
3. Lepore D., De Santis R., Pagliara M.M., Borzacchiello A., Molle F., Minicucci G., Ambrosio L.: **biomechanical behaviour of human sclera.** *Exp Eye Res. Suppl* 1, 135, 1996.
4. Lepore D., Pagliara M.M.: **Proprietà biomeccaniche della cornea: studio dei processi di riparazione.** Rapporto ISTSAN 32/98.

Pubblicazioni

5. Lepore D., Ambrosio L., De Santis R., Nucci C., Bagolini B., Nicolais L.: **Effect of topical antiinflammatory drugs on mechanical behaviour of corneal wounds.** *Ophthalmol* (in press).

Modello sperimentale di cute equivalente con supporto di matrice di collagene

Franco MOSCA

Divisione di Chirurgia Generale

Dipartimento di Oncologia

Università di Pisa

Via Paradisa, 2

56124 Pisa

Principali partecipanti: A. Stefani^a, E. Boschi^a, B. Longoni^b, M. Romanelli^c

^a Divisione di Chirurgia Generale, Dipartimento di Oncologia, Università di Pisa

^b Dipartimento di Fisiologia e Biochimica, Università di Pisa

^c Clinica Dermatologica, Università di Pisa

Sintesi dell'attività svolta nel corso del secondo anno

Attualmente le colture di cheratinociti sono utilizzate sia come autoinnesti, che come alloinnesti in una varietà di patologie, quali: eventi traumatici; trattamenti chirurgici (siti donatori); ustioni; ulcere degli arti da patologie vascolari, arteriose o venose; ulcere da complicanze cutanee di malattie sistemiche (malattie metaboliche, neoplastiche, immunologiche); lesioni da radiodermiti; ulcere in pazienti in terapia cronica con farmaci che, collateralmente, sfavoriscono la guarigione di una ferita (cortisonici, antimetaboliti).

I successi clinici ottenuti hanno indotto ulteriori ricerche per migliorare la tecnica originale di coltura dell'epidermide. In particolare, un grande interesse è stato rivolto alla ricerca di sostituti del derma, biocompatibili, con o senza la presenza di fibroblasti umani in vitro, per facilitare e migliorare la fase applicativa e i risultati clinici, con lo scopo di ottenere un sostituto cutaneo completo.

I componenti dermici ed epidermici vivi hanno nettamente contribuito al miglioramento dei sostituti cutanei proposti per la riparazione tissutale. Nel nostro laboratorio di ricerca sui trapianti, è stato perfezionato il modello di cute equivalente umana (CEU) usando una matrice composta da biopolimeri collagene-GAG-chitosani nel quale vengono cocoltivati fibroblasti e cheratinociti umani.

Nel corso del secondo anno di ricerca è stato portato un notevole miglioramento alla ricostruzione del derma con l'aggiunta di colture di fibroblasti ed è stato sperimentato l'attecchimento di questa CEU su di un modello animale (suini femmine Large white di 25-30 kg).

Materiali e metodi

La matrice di collagene.- Il substrato dermico utilizzato è costituito da una spugna di collagene elaborato a partire di:

- 72% di collagene di tipo I e III purificati provenienti da cute bovina (con tutte le garanzie di origine controllata e di qualità).
- 20% di chitosani, derivati deacetilati della chitina, estratti dai gusci di gamberi.
- 8% di glicosaminoglicani (GAG: condroitina-4-solfato e condroitina-6-solfato).

Tecnica di coltura dei fibroblasti.- Il derma equivalente è ottenuto coltivando dei fibroblasti umani provenienti da frammenti di cute (2x2 cm), che vengono successivamente insemiati sul substrato dermico. Le subcolture di fibroblasti ($5 \times 10^5/\text{cm}^2$) sono insemiinate direttamente sulla struttura porosa del substrato dermico in Dulbecco's Modified eagle Medium (DMEM) con siero di vitello fetale 10% (FCS) ed incubate a 37°C in 5% di CO² per 10 gg.

Tecnica di coltura dei cheratinociti.- In un primo tempo, dei cheratinociti provenienti da frammenti di cute umana (2x2 cm) vengono coltivati secondo il metodo di Rheinwald e Green. In un secondo tempo, dei cheratinociti a subconfluenza (P2) vengono insemiati direttamente sul derma equivalente ($4 \times 10^5/\text{cm}^2$) nel mezzo di coltura MCDB 153 senza siero contenente insulina (5 µg/ml), idrocortisone (0,4

$\mu\text{g/ml}$), EGF (10 ng/ml). Dopo 2 settimane, si ottiene una soddisfacente pluristratificazione dell'epitelio espanso.

Animali.- Tutti gli esperimenti ed atti chirurgici sono stati realizzati in rispetto dei regolamenti nazionali ed internazionali in vigore sulla sperimentazione animale, dopo l'approvazione dei rispettivi comitati etici.

Sono stati usati dei suini femmine, Large white di 25-30 kg, immunosopresse mediante iniezione I.M. di Ciclosporina A (10 mg/kg al di) per tutta la durata della sperimentazione.

In anestesia generale e in condizioni di asepsi, delle escissioni a tutto spessore fino al piano aponevrotico vengono effettuate sull'emischiena dell'animale in corrispondenza dei margini dei tatuaggi realizzati con inchiostro di china. Delle escissioni di superficie circolari (5 cm di diametro) ed altre quadrangolari fino a 64, 96 e 100 cm² sono state praticate nelle successive sperimentazioni. La perdita di sostanza viene coperta da lamine di CEU suturate alla cute normale dell'animale e tra di loro con nylon monofilamento a punti staccati. La medicazione prevede l'uso di tulle grasso e di pacchetti compressivi realizzati con fili da cute. La zona operata viene successivamente ricoperta di garze sterili e fasciata con una benda adesiva.

Un'agenda di controlli clinici e di biopsie è stato prevista per una durata di 2 mesi dopo di che le dimensioni dell'animale non consentono più una gestione comoda del "paziente" (peso oltre i 90-100 kg).

Tecniche strumentali.- Perfusione tissutale: è stato utilizzato un monitor TCM3 (Radiometer, Copenhagen, DK) per O₂/CO₂ con una temperatura dell'elettrodo di 44°C.

1. Durezza: è stato utilizzato un durometro (REX, GAUGE, Model 1600, Type 00, Glenview, Illinois, USA) per misurazioni ripetute (n°4) ed è stata utilizzata la media \pm deviazione standard.
2. Elasticità: è stato utilizzato uno strumento portatile V.E.S.A. (Visco Elasticity Skin Analyzer™, Israel) che in base alla componente liquida del tessuto in oggetto, consente di ottenere un numero che deriva dalla polarità degli elettrodi dello strumento e che quantifica la visco-elasticità.

Risultati e discussione

Sono stati usati 8 animali (suini femmine) immunosoppressi. Delle escissioni cutanee a tutto spessore di superficie circolari (5 cm di diametro) ed altre quadrangolari fino a 64, 96 e 100 cm² sono state praticate successivamente nelle sperimentazioni e ricoperte con pezzi di CEU (da 1 a 6 per area). L'evoluzione della riparazione tissutale è stata seguita in modo continuo per una durata di 2 mesi dopo di che le dimensioni dell'animale non consentono più una gestione comoda del "paziente" (peso oltre i 90-100 kg).

Al G14, si poteva osservare una superficie cutanea liscia morbida con un aspetto roseo omogeneo tipico della cute sana che si evidenzia dai tessuti circostanti. Le linee di giunzione tra i vari pezzi di CEU sono scomparsi e l'area che si evidenzia risulta completamente uniforme. I risultati preliminari illustrano positivamente l'attecchimento d'innesti di CEU seguendo le procedure chirurgiche comuni.

La retrazione è stata valutata dalla tecnica dei calchi (carta oleata 70 g/m²) dei tatuaggi dopo essere pesati e successivamente è stata valutata la percentuale di retrazione nei confronti della piaga di partenza (Fig. 1).

I risultati dei studi istologici effettuati nel corso del primo anno di ricerca sono stati completati ed hanno ulteriormente confermato l'attecchimento. Le tecniche strumentali non-invasive utilizzate nell'indagine della qualità della riparazione tissutale dopo innesti cutanei hanno consentito una precisa e positiva valutazione delle percentuali di attecchimento e di altri parametri cutanei bio-meccanici (Fig. 2).

Per quanto riguarda la perfusione tissutale, il gruppo CEU ha mostrato un progressivo innalzamento della T_{cp}O₂ durante le tre fasi di misurazione rispetto al gruppo di controllo, con assenza di significatività tra i 2 gruppi al termine dello studio. Il parametro CO₂ ha invece mostrato una significatività statistica con valori maggiori nel gruppo CEU rispetto al gruppo di controllo.

Per quanto riguarda la durezza, non sono emerse differenze significative tra i 2 gruppi di studio durante tutto il periodo di studio.

Infine, per quanto riguarda l'elasticità, i dati preliminari in nostro possesso non ci consentano di formulare risultati definitivi causa il breve periodo di osservazione, che non correla con una definitiva

riorganizzazione della matrice extracellulare. Valutazioni e più lunga scadenza (6 mesi – 12 mesi) saranno oggetto di un ulteriore report.

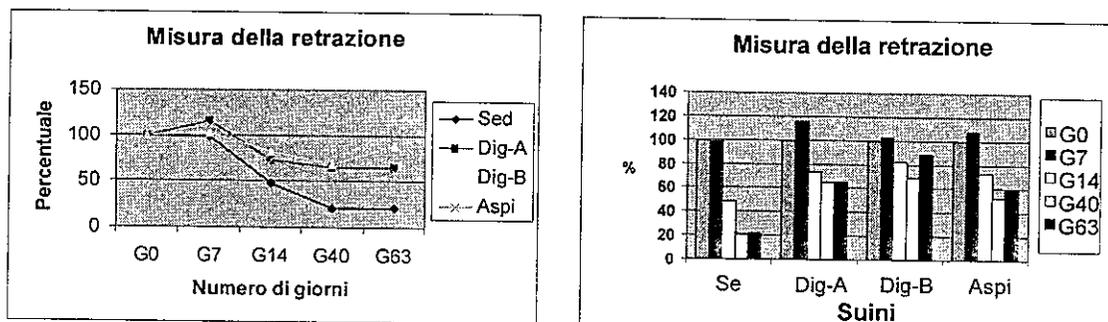


Figura 1.- Misura della retrazione

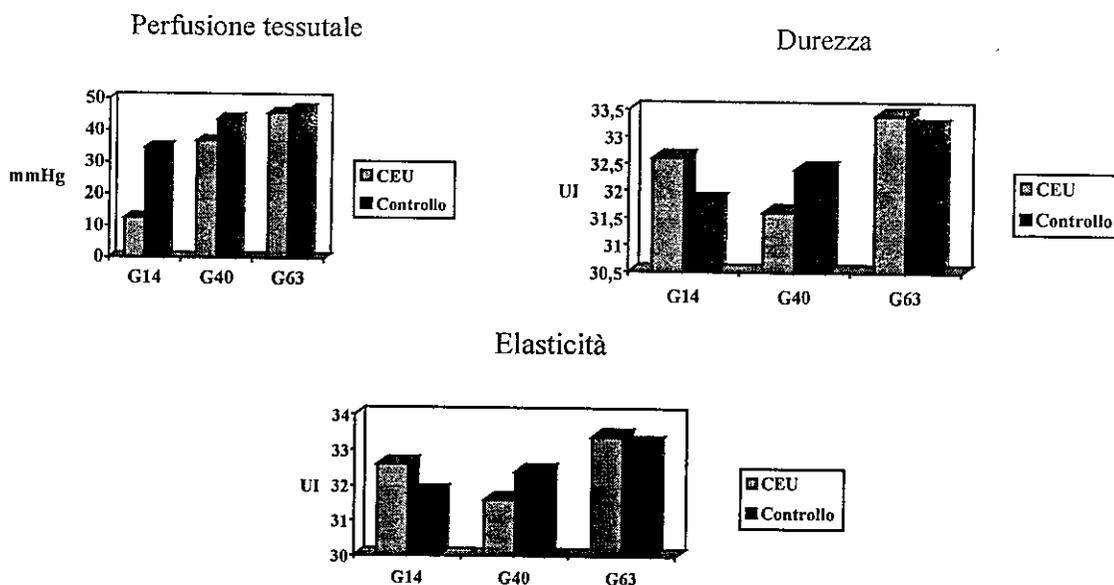


Figura 2.- Parametri cutanei bio-meccanici

Conclusioni

L'applicazione di questo modello sperimentale su suini illustra la capacità della CEU di attecchire sull'aponevrosi seguendo i stessi procedimenti operatori che quelli legati agli innesti a tutto spessore, senza aggiunta di fattori di crescita. L'assenza di cicatrici tra i vari pezzi di CEU risulta sorprendente, perché la giunzione fra i classici innesti a tutto spessore lasciano solitamente dei segni.

L'applicazione di CEU deve offrire le migliori garanzie di biosicurezza per un risultato soddisfacente anche dal punto di vista estetico. Per ciò prima di passare ad una sperimentazione clinica umana, era necessario di dimostrare la fattibilità di innesti di CEU di ampia superficie e di prevedere un risultato estetico e funzionale.

Elastomeri poliuretanicici innovativi per protesi vascolari e modifica superficiale

Maria Cristina TANZI

Dipartimento di Bioingegneria, Politecnico di Milano
P.zza L. da Vinci, 32
20133 Milano

Principali partecipanti: P. Petrini^a, S. Farè^a, L. Visal^b, P. Speziale^b

^aDipartimento di Bioingegneria, Politecnico di Milano

^bDipartimento di Biochimica, Università di Pavia

Sintesi dell'attività svolta nel corso del secondo anno

La ricerca riguarda lo studio di poli-uretano-maleammide (PUMA) contenenti doppi legami insaturi adatti all'innesto in condizioni fisiologiche di biomolecole, per l'ottenimento di substrati idonei alla crescita dell'endotelio. Nel corso del primo anno tali copolimeri erano stati ottenuti con un metodo di sintesi a due stadi in soluzione. Benché i test di citotossicità sugli estratti avessero dato buoni risultati, i test di adesione e crescita a contatto diretto con cellule endoteliali non erano andati a buon fine.

Nel corso del secondo anno l'attività di ricerca si è orientata verso nuove formulazioni e, allo scopo di poter disporre di quantitativi di materiale adeguati a indagini più approfondite, si è scelto di mettere a punto un metodo di sintesi in massa, che consente anche l'uso di quantità molto minori di catalizzatore. Per le prove iniziali di citocompatibilità dei nuovi materiali si è optato per i fibroblasti umani, in collaborazione con il Dipartimento di Biochimica dell'Università di Pavia.

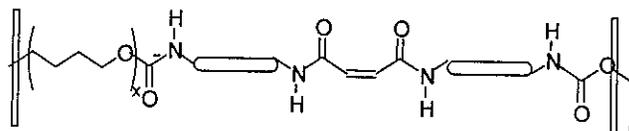


Figura 1.- Struttura schematica dei poliuretano maleammidi (PUMA).

Sintesi e caratterizzazione dei copolimeri PUMA

Sono stati ottenuti in massa, con un metodo a 1 o 2 stadi, diversi poliuretano-maleammide anche variando la composizione iniziale, come mostrato in Tabella 1.

Tabella 1.- Caratteristiche dei poli-uretano-maleammidi sintetizzati

tipo di PUMA	Tipo di sintesi	COMPOSIZIONE	Catal.	[η] (dl/g)	M_w/M_n	T_g (°C)	T_{ms} (°C)	C_{ss} (%)
PEU MAsol	soluzione	PTMO ₂₀₀₀ /HDI/MA	DBTDL	0.42	2.0	-71	23	>80
PEU D1MM	massa (1 stadio)	PTMO ₂₀₀₀ /MDI/MA	DBTDL	0.41	2.4	-64	19	71
PEU D2HM	massa (2 stadi)	PTMO ₂₀₀₀ /HDI/MA	DBTDL	0.43	2.0	-72	18	56
PEU O2HM	massa (2 stadi)	PTMO ₂₀₀₀ /HDI/MA	SnOct	0.38	2.7	-64	17	62
PEU D2HX	massa (2 stadi)	PTMO ₂₀₀₀ /HDI/MA+BD	DBTDL	0.52	2.1	-73	19	42
PEU D2MM	massa (2 stadi)	PTMO ₂₀₀₀ /MDI/MA	DBTDL	0.43	2.0	-63	18	76
PCU D2HM	massa (2 stadi)	PHCD ₂₀₀₀ /HDI/MA	DBTDL	0.49	2.3	-43	34	45
PCU O2HM	massa (2 stadi)	PHCD ₂₀₀₀ /HDI/MA	SnOct	0.44	4.5	-41	41	76
PCU D2HX	massa (2 stadi)	PHCD ₂₀₀₀ /HDI/MA+BD	DBTDL	0.50	1.9	-41	34	54

PTMO = poli-ossitetrametilene-glicol; PHCD = poli-esilcarbonato-diolo; HDI = esametilene-diisocianato; MDI = bisfenilmetano-diisocianato; MA = acido maleico; BD = butandiolo; DBTDL = stagno dibutil-dilaurato; SnOct = stagno ottanoato

Tutti i PUMA sono stati purificati in modo che il contenuto di stagno derivante dal catalizzatore residuo fosse inferiore ai 100ppm e caratterizzati tramite spettroscopia FT-IR, misure di viscosità intrinseca $[\eta]$, analisi dei pesi molecolari per GPC, calorimetria differenziale a scansione (DSC). I valori dei parametri analizzati sono riportati in Tabella 1. Dai tracciati DSC è stata inoltre ricavata la percentuale di cristallinità dei segmenti soft ($\%C_{ss}$, vedi Tab.1). Si può notare come il polimero ottenuto in soluzione presenti maggiore cristallinità, ad indicare un più elevato grado di separazione di fase, come confermato anche dagli spettri IR (vedi Figura 2A). Le proprietà meccaniche in trazione sono state valutate secondo la normativa ASTM D-638, utilizzando provini ottenuti per evaporazione di solvente (dimetilacetammide, DMA). I dati sono riportati in Tabella 2 mentre alcuni tracciati sforzo/deformazione sono visibili in Figura 2B.

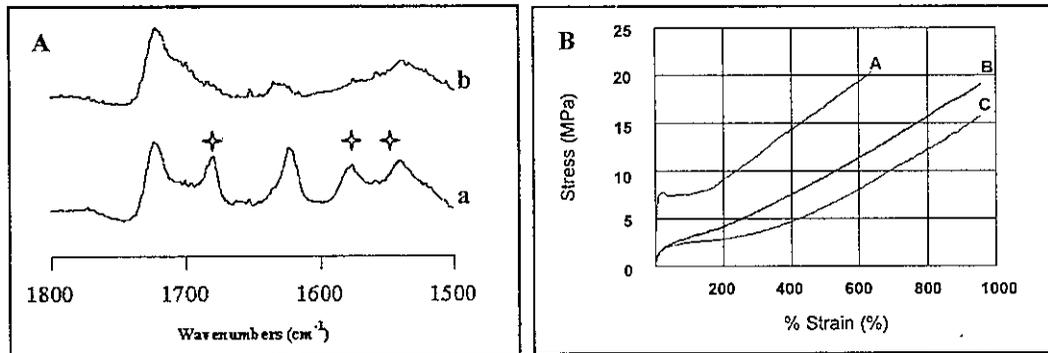


Figura 2.- A: Spettri IR del PUMAsol, ottenuto in soluzione (a) e del PEUD2HM, ottenuto in massa (b). Le bande relative al gruppo maleato sono più nette nel primo materiale.

B: curve sforzo/deformazione del PCUD2HM (A), del PEUMAsol (B) e del PEUD2HX (C)

Tabella 2.- Proprietà meccaniche a trazione dei PUMA

Tipo di PUMA	σ_r (MPa)	ϵ_r (%)	$E_{10\%}$ (MPa)	$E_{50\%}$ (MPa)	$E_{100\%}$ (MPa)	$E_{300\%}$ (MPa)
PEUMAsol	17.9 ± 2.1	935 ± 91	9.4 ± 0.3	4.3 ± 0.4	2.7 ± 0.2	1.7 ± 0.1
PEUD2HM	2.2 ± 0.2	501 ± 70	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.4 ± 0.0
PEUO2HM	4.3 ± 0.2	634 ± 58	1.1 ± 0.1	1.2 ± 0.2	1.1 ± 0.1	0.7 ± 0.1
PEUD2HX	16.1 ± 0.3	983 ± 30	2.4 ± 0.2	2.4 ± 0.3	2.4 ± 0.2	1.2 ± 0.0
PEUD2MM	5.2 ± 0.1	793 ± 103	1.8 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.8 ± 0.1	0.9 ± 0.0
PCUD2HM	18.9 ± 1.8	617 ± 19	3.5 ± 0.5	3.5 ± 0.5	3.5 ± 0.5	3.4 ± 0.4
PCUO2HM	24.1 ± 0.3	527 ± 43	5.7 ± 1.6	6.1 ± 2.2	5.7 ± 1.6	4.8 ± 0.1
PCUD2HX	20.7 ± 0.2	604 ± 34	4.0 ± 0.2	4.0 ± 0.1	4.0 ± 0.1	4.0 ± 0.1

σ_r = sforzo a rottura; ϵ_r = deformazione a rottura; $E_{10-300\%}$ = moduli secanti alle relative %ali di deformazione. N = 5

Prove di citotossicità sugli estratti

Tutti i PUMA sono stati trasformati in lastrine sottili per evaporazione di solvente, quindi estratti a tempi crescenti con soluzione fisiologica tamponata (PBS, pH = 7,4). Gli estratti sono stati analizzati per HPLC (un esempio è riportato in Figura 4) e aggiunti in rapporto 1:3 al mezzo di cultura dei fibroblasti. Le cellule, di derivazione da pelle umana (HSF), erano state coltivate secondo usuali procedure. I risultati delle prove con gli estratti ottenuti dopo 12 ore di incubazione dei materiali sono visibili in Figura 3.

Dall'analisi comparata dei rilasci in PBS e dei risultati di citotossicità si è notato che la presenza di alcuni picchi provocava i peggiori effetti citotossici. Si è quindi deciso di procedere con una ulteriore purificazione dei campioni in etanolo.

Si è constatato però che, mentre i PCU-derivati resistevano bene al trattamento, i PEU-derivati tendevano a disgregarsi. La sperimentazione è perciò proseguita solo sui primi.

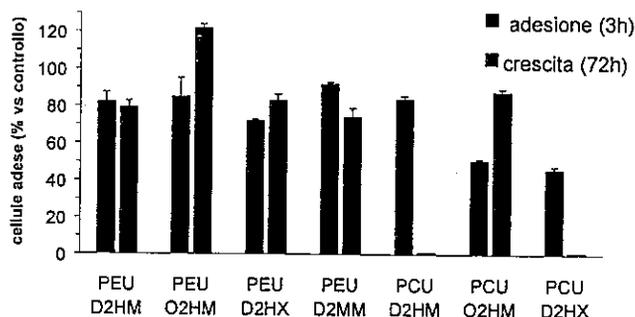


Figura 3.- Effetto degli estratti in PBS sull'adesione e crescita dei fibroblasti (n=3)

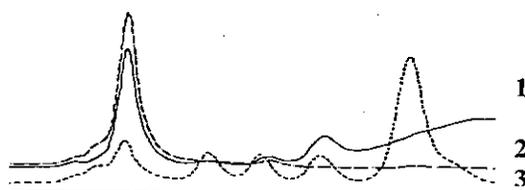


Figura 4.- HPLC degli estratti in PBS dei PCU-PUMA. 1: PCUD2HX, 2: PCUD2HM, 3: PCUO2HM.

Prove di adesione e crescita di fibroblasti sui materiali purificati in etanolo

Le prove di adesione e crescita diretta sui campioni purificati sono consistite nella semina di cellule HSF su dischetti di ogni PUMA e di Bionate (poli-carbonato-uretano biomedico, PTG, Inc., USA) di diametro uguale ai pozzetti di cultura. Come per gli esperimenti con gli estratti, le cellule sono state tripsinizzate, colorate con Tripian blu e contate con camera di Burker. I risultati, mostrati in Tabella 3, mostrano una citocompatibilità paragonabile a quella del poliuretano biomedico per almeno due PCU-PUMA.

Tabella 3.- Prove di adesione e crescita di fibroblasti (% rispetto al controllo; n=3)

Material	Adesione (4h)	Crescita (24h)	Crescita (72h)
Bionate	50.1 ± 3.0	106.0 ± 4.0	91.1 ± 1.0
PCU D2HM	77.5 ± 5.4	88.7 ± 3.3	95.7 ± 1.4
PCU D2HX	58.3 ± 3.4	93.9 ± 9.3	65.3 ± 6.1
PCU O2HM	73.9 ± 0.5	19.3 ± 1.0	16.5 ± 0.3

Immobilizzazione di fibronectina sui PCU-PUMA

Fibronectina umana (HF_n) è stata purificata da plasma umano mediante una colonna Gelatin-Sepharose. Gli anticorpi anti-HF_n sono stati sviluppati in capra e le corrispondenti immunoglobuline sono state isolate su Sepharose Protein-A.

Determinazione della fibronectina assorbita mediante ELISA. - I materiali sono stati incubati per 16h a 37°C con HF_n in tampone carbonato a pH = 9,5. Dopo accurati lavaggi, i siti addizionali di legame sono stati bloccati mediante incubazione con 2% di albumina di siero bovino in PBS. Dopo accurato lavaggio, l'adesione della HF_n sui PUMA è stata determinata mediante incubazione con l'anticorpo antiHF_n e quindi con l'anticorpo HRP-coniugato sviluppato in coniglio e successiva lettura dell'assorbanza a 490 nm (Tabella 4).

Determinazione della fibronectina assorbita mediante marcatura con ^{125}I . -Dischi di ciascun materiale sono stati incubati per 16h a 37°C con ^{125}I -HF_n in soluzione tampone a pH = 9,5 ed accuratamente lavati per eliminare la proteina non legata stabilmente. La radioattività associata è stata determinata mediante un contatore γ . I risultati sono mostrati in Tabella 4.

Tabella 4.- Immobilizzazione di fibronectina sui poliuretani.

Materiale	ELISA	^{125}I -HF _n
	% vs Bionate	Cpm totali
Bionate	0.0	694.8 ± 15.5
PCU D2HM	27.2	1873.3 ± 41.0
PCU O2HM	20.2	822.3 ± 51.0
PCU D2HX	24.5	1015.3 ± 91.0

Prove di adesione di fibroblasti dopo immobilizzazione di fibronectina

I fibroblasti sono stati seminati su dischetti dei diversi materiali con e senza pre-incubazione di HF_n (a pH = 9,5 per 16h), utilizzando medium privo di siero. Dopo 3h di contatto ed accurato lavaggio con PBS, le cellule adese sono state tripsinizzate, colorate e contate. I risultati sono mostrati in Tabella 5.

Tabella 5.- Prove di adesione di fibroblasti dopo immobilizzazione di HF_n

Materiale	Senza HF _n	Con HF _n
Bionate	58.0 ± 2.7	79.8 ± 2.1
PCU D2HM	43.2 ± 1.1	103.6 ± 1.7
PCU O2HM	44.3 ± 5.9	47.9 ± 1.3
PCU D2HX	47.3 ± 4.3	64.8 ± 0.9

Conclusioni

Si è dimostrato che il metodo di sintesi in massa permette di ottenere elevate quantità di materiali con buone caratteristiche chimico-fisiche. Tuttavia la reazione con acido maleico procede con meccanismi diversi da quelli dei dioli (estensori tradizionali), dando pesi molecolari più bassi e richiedendo maggiori attenzioni nella purificazione, in particolare per i PUMA contenenti segmenti polietere (PEU-derivati).

I polimeri contenenti segmenti policarbonato hanno dato buoni risultati di citocompatibilità e capacità di legare fibronectina, promuovendo l'adesione cellulare.

Pubblicazioni

1. M.C.Tanzi, P.Petrini, A.Mojana, G.Balconi, E.Dejana, **Poly-urethane-amides designed to support cell adhesion and growth**, Atti I° Bilateral Meeting: Italy-United Kingdom, Petriolo (Grosseto), 1-4/3/98, p.13
2. M.C.Tanzi, C.Liffredo, S.De Ponti, P.Petrini, L.Visai, P.Speziale, **Cytocompatibility of poly-urethane-maleamides newly developed for cardiovascular prostheses**. Atti International Conference on In vitro cytotoxicity mechanisms, Ist. Sup. Sanità, Roma, 25-26/1/99, p.
3. P. Petrini, L. Visai, C. Liffredo, S. De Ponti, F. Casolini, P.Speziale, M.C. Tanzi, **Protein immobilization onto newly developed polyurethane-maleamides for endothelial cell growth**. Proceedings Third International Symposium on Frontiers in Biomedical Polymers, Shiga, Japan, 23-27/5/99, p.35
4. L. Visai, P. Petrini, C. Liffredo, A. Motta, P. Speziale, M.C. Tanzi, **Cytocompatibility of novel poly-urethane-maleamides**. Accettato per 15th ESB Conference, 8-12/9/99, Arcachon, France
5. P. Petrini, S. De Ponti, S. Farè, M.C. Tanzi, **Poly-urethane-maleamides for cardio-vascular applications: synthesis and properties**. Special ESB issue of the Journal of Materials Science, Materials in Medicine, in stampa, 1999

Ricostruzione in vitro di una bioprotesi aortica auto-xenograft

Carlo VALFRE'

Divisione di Cardiocirurgia

O.R. di Treviso

Borgo Cavalli n. 42

31100 Treviso

Principali partecipanti: P.P. Parnigotto^a, F. Rocco^b, M.T. Conconi^a, M. Grigioni^c, R. Spinazzi^a, R. Busetto^f, C. Zussa^d, C. Di Bello^e, C. Daniele^c, M. Abbate^c, E. Polese^d, M. Dettin^c

^aDipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Padova

^bDivisione di Cardiocirurgia, Treviso

^cLaboratorio di Ingegneria Biomedica, Istituto Superiore di Sanità, Roma

^dDivisione di Cardiocirurgia, Mestre

^eDipartimento di Processi Chimici dell'Ingegneria, Università di Padova.

^fIstituto di Patologia e Igiene Veterinaria, Università di Padova.

Sintesi dell'attività svolta nel corso del secondo anno

Sono stati raggiunti gli obiettivi prefissati con la riendotelizzazione *in vitro* dei condotti valvolari porcini e con la valutazione macroscopica, microscopica ed ultrastrutturale dell'espianto del condotto valvolare acellulare dopo un mese dal suo impianto nella pecora.

La ricerca crea una reale prospettiva per la costruzione della bioprotesi auto-xenograft.

Metodologia

Preparazione del condotto valvolare acellulare.- Il condotto valvolare acellulare è stato preparato utilizzando la metodica precedentemente descritta nella "sintesi dell'attività di ricerca svolta nel corso del primo anno" (Rapporti Istisan 97/19).

Preparazione delle sequenze amminoacidiche di adesione cellulare.- I peptidi, RGD (Arg-Gly-Asp) e GRGDSPK (Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Lys), sono stati ottenuti su fase solida con l'ausilio dello strumento Applied Biosystems Modello 431A e la chimica Fmoc. Come agente condensante è stato utilizzato HBTU. La scala prescelta è stata 0.25 mmolare. I gruppi protettori per le funzioni in catena laterale risultano essere: Arg, Pmc; Asp e Glu, OtBu; Lys, Boc; Ser e Tyr, tBu; Cys, Acm. Le resine utilizzate sono HMP (Applied Biosystems) per il tripeptide; Fmoc Lys (Boc) Wang resin (Novabiochem) per l'eptapeptide. Al termine della sintesi le catene peptidiche sono state sbloccate dal supporto solido e deprotette in catena laterale mediante reazione con la seguente miscela: 0.75 g fenolo, 0.25 ml etanditiolo, 0.5 ml tioanisolo, 0.5 ml H₂O, 10 ml acido trifluoroacetico, per 1.5 ore a temperatura ambiente. I prodotti grezzi sono stati purificati tramite cromatografia su fase inversa (C₁₈). Il grado di purezza raggiunto, maggiore o uguale al 95%, è stato valutato tramite RP-HPLC analitico e elettroforesi capillare. L'identità dei peptidi ottenuti è stata confermata tramite spettrometria di massa (tecnica MALDI).

Adesione in vitro su matrice acellulare di cellule endoteliali.- Le cellule endoteliali sono state isolate utilizzando la metodica precedentemente descritta nella sintesi dell'attività svolta nel corso del primo anno (Rapporti Istisan 97/19). Le cellule endoteliali sono state staccate, centrifugate e risospese in una quantità di terreno tale da ottenere una densità pari a 2×10^5 cells/ml e incubate per un'ora a 37°C in assenza o in presenza di RGD (Arg-Gly-Asp) o di GRGDSPK (Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Lys) alla concentrazione di 350 µg/ml. Dopo centrifugazione, le cellule endoteliali (1.2×10^5 cells/cm²) sono state seminate all'interno di un anello di acciaio inossidabile posto sulla parte intimale della matrice acellulare ottenuta dal vaso aortico. Dopo 12 ore l'anello è stato rimosso e dopo 24 ore le colture sono state prelevate e fissate con glutaraldeide al 3% in tampone cacodilato 0.1M, pH 7.2. Dopo disidratazione con

alcoli, critical point dryer e metallizzazione con oro, i preparati sono stati esaminati al microscopio elettronico a scansione (Cambridge Stereoscan).

Intervento chirurgico.- Le pecore sono stata premedicate con xilazina (1.2 mg i.m.) 25 minuti prima dell'induzione, che è stata effettuata con 1.0 g di tiopentale sodico e.v.. Lo stadio di anestesia chirurgica è stato mantenuto tramite somministrazione di ossigeno-protossido di azoto e fluotano attraverso un tracheotubo. Previa toracotomia postero-laterale sinistra è stata esposta l'aorta toracica discendente. La stessa è stata cerchiata 3-4 centimetri dopo l'origine della arteria succlavia sinistra e, dopo eparinizzazione con 10.000 U.I., clampata a questo livello e 2 centimetri distalmente. È stato asportato il tratto compreso tra i due clamps e sostituito con il condotto aortico acellulare porcino. La porzione muscolare è stata suturata in maniera continua con prolene 5-0 all'estremità prossimale, in maniera tale da rendere possibile l'apertura dei lembi valvolari in sistole e la loro chiusura in diastole. Anche la sutura distale tra il sostituto e la parete aortica della pecora è stata eseguita in maniera continua con prolene 5-0. Dopo declampaggio è stata perfezionata l'emostasi, si è neutralizzata con protamina solfato l'eparina e quindi è stata ricostruita a strati la parete toracica della pecora. Al termine dell'intervento e nei primi giorni p.o. è stato somministrato un analgesico (Fenilbutazone) per via i.m.

Valutazione dell'esito dell'intervento.- Dopo un mese dall'intervento la pecora è stata sacrificata tramite somministrazione di tanax e.v. e sono state prelevate varie porzioni del condotto impiantato per l'osservazione al microscopio ottico (M.O.) ed elettronico a scansione (SEM). Il prelievo della bioprotesi è stato effettuato in modo da comprendere entrambe le estremità della protesi impiantata e una porzione dell'aorta della pecora.

Preparazione dei campioni

Microscopio ottico - I preparati sono stati fissati con formalina neutra (10% formalina in Phosphate Buffer Solution), disidratati ed inclusi in paraffina. Sono state eseguite sezioni di 5 μ m di spessore e colorate con ematossilina-eosina e con colorazione di Weigert per le fibre elastiche.

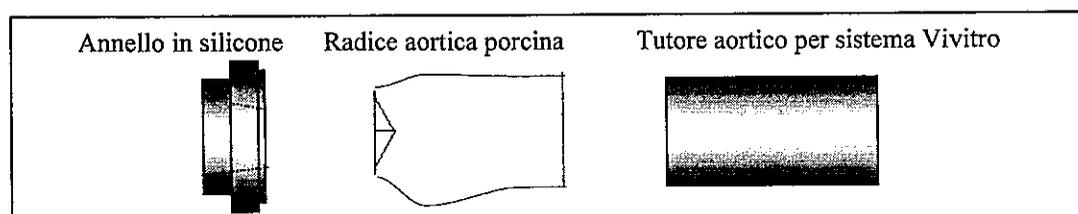
Microscopio a scansione - I campioni sono stati fissati con glutaraldeide al 3% in tampone cacodilato, pH 7.2, disidratati e, dopo critical point drying, metallizzati con oro. Infine sono stati osservati con un microscopio elettronico a scansione (Stereoscan 205S, Cambridge).

Risultati e discussione

Il trattamento detergente-enzimatico, proposto da Meezan e da noi modificato, per ottenere il condotto valvolare aortico porcino acellulare mantiene sostanzialmente inalterate sia le proteine della matrice extracellulare che le prestazioni idrodinamiche (Tab I). Il metodo da noi utilizzato oltre ad essere caratterizzato da una notevole semplicità di esecuzione porta all'acellularizzazione completa della matrice che mantiene inalterata la membrana basale.

In nostre precedenti esperienze, l'applicazione di questo trattamento alla cute di ratto ha permesso l'ottenimento della matrice acellulare, che utilizzata successivamente come sostituto dermico omologo, è stata in grado di migliorare non solo l'esito estetico della ferita, ma anche quello funzionale, indirizzando la rigenerazione tessutale.

Prove in vitro sul duplicatore di impulsi VIVITRO.- L'analisi in vitro svolta presso il Laboratorio di Ingegneria Biomedica dell'Istituto Superiore di Sanità su campioni di valvola porcina espantata sia trattata che non trattata ha riportato i risultati in tabella. Il tipo di montaggio su annulus elastico in silicone ha permesso di standardizzare le proprietà dell'annulus su cui suturare virtualmente l'apparato valvolare mentre il tutore in figura è stato tensionato per simulare il naturale "tethering" dell'arteria.



Questo originale sistema di fissaggio ha permesso di realizzare il mantenimento della compliance naturale della radice aortica, controllato mediante elementi windkessel sul sistema VIVITRO.

La tabella riporta i risultati delle grandezze principali ritenute significative per la valutazione emodinamica *in vitro* delle radici aortiche complete di apparato valvolare porcino. Le valvole di cui si riportano i valori medi e le deviazioni standard massime ottenute per il parametro fanno riferimento a 6 radici aortiche porcine (3 trattate per la acellularizzazione e tre non trattate) con diametro selezionato mediante calibro per fori pari a 21 mm (± 0.5).

Il protocollo dedicato realizzato per queste misure consisteva di 6 valori di Cardiac Output alla frequenza di 72 bpm.

Prove di resistenza a 200 battiti sono state anche condotte positivamente per l'apparato valvolare in condizioni tipicamente da fibrillazione.

I risultati in sintesi mostrano che la funzione valvolare è preservata, non sono state riscontrate differenze significative nelle prestazioni globali, in particolare per quanto riguarda il gradiente transvalvolare tra le due serie mentre le radici aortiche trattate hanno mostrato una area idraulica (effective orifice area (EOA)) dell'ordine del 10 - 15 %, la perfetta competenza degli apparati valvolari (nullo rigurgito statico), volumi di rigurgito legati alla fase di chiusura minori di 9 ml. Entrambe le serie di valvole hanno mostrato buone ed inalterate caratteristiche di apertura e chiusura delle cuspidi studiate mediante cinematografia ad alta velocità (1000 frames per second).

Soltanto la EOA può essere letto come un possibile risultato del trattamento, e cioè una compliance accentuata del tratto di aorta è stata trovata nel caso della serie di valvole porcine trattate per la acellularizzazione. La EOA riveste anche importanza per futuri studi *in vivo* perché è un parametro generalmente usato nel cateterismo o in ecografia, nella clinica.

Tabella I.- Dati emodinamici *in vitro*.

C.O. (l/min)	Perdita di carico (mmHg)	E. O. A. (cm ²)	Rigurgito (ml)						
Valvola porcina	non trattata	trattata	Dev. Std.	non trattata	trattata	Dev. Std.	non trattata	trattata	Dev. Std.
2.0	1.8	2.1	0.4	1.5	1.8	0.1	5.9	7.7	1.3
3.0	3.8	4.3	0.8	1.6	1.9	0.4	6.7	6.6	0.3
4.5	6.2	4.8	0.2	1.8	2.2	0.1	5.9	7.3	1.0
5.6	11.1	8.9	0,6	1.7	2.0	0.1	8.9	7.4	1.1
6.5	13.7	12.5	0,8	1.7	1.9	0.1	7.7	8.4	0.5
8.0	23.2	21.2	2.8	1.7	1.8	0.2	8.2	8.7	0.4

Delle deviazioni standard delle due serie è stato riportato il valore massimo

Adesione in vitro di cellule endoteliali su matrice acellulare.- Dopo l'ottenimento *in vitro* delle colture secondarie delle cellule endoteliali porcine abbiamo verificato se queste erano grado di aderire alla parete del condotto valvolare acellulare. La riendotelizzazione viene ritenuta da alcuni Autori importante in quanto potrebbe prevenire l'insorgenza di infezioni, la formazione di trombi, il deposito di sali di calcio e l'iperplasia dell'intima. Come si può osservare la riendotelizzazione della matrice acellulare è stata possibile grazie a una preincubazione delle cellule endoteliali con due peptidi di origine sintetica, analoghi della fibronectina. (fig. 1a, fig. 1b).

Le sequenze di questi peptidi costituiscono il principale sito di adesione per una famiglia di proteine di membrana, le integrine. Il legame recettore-peptide induce l'adesione delle cellule alla membrana basale. In assenza di tali fattori, dopo 24 ore dalla semina, la superficie presentava solamente alcuni grappoli di cellule adese che però non avevano assunto il caratteristico aspetto pavimentoso dell'endotelio. È in via di definizione progettuale l'apparecchiatura che permetterà la completa riendotelizzazione del condotto valvolare aortico *in vitro*.

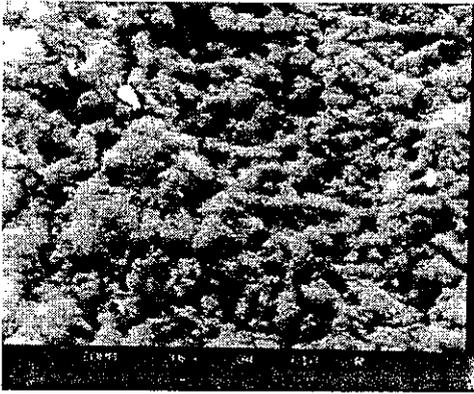


Fig. 1a

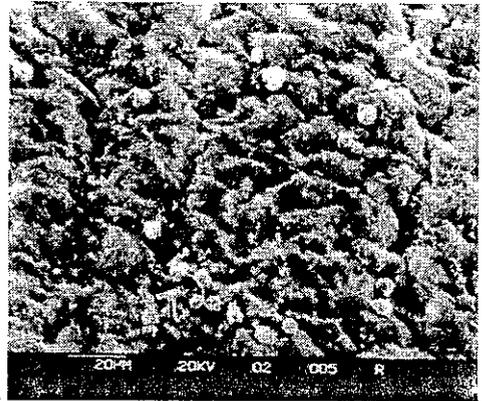


Fig. 1b

Sperimentazione in vivo su animale.- La matrice acellulare di maiale è stata impiantata in posizione eterotopica nell'aorta toracica della pecora, senza il riscontro di inconvenienti durante l'intervento chirurgico (fig. 2a).



Fig. 2a

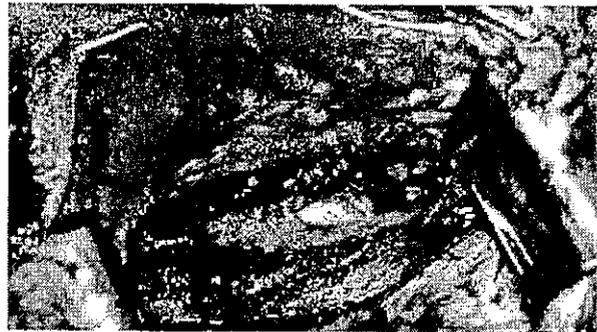


Fig. 2b

La sperimentazione, in questa prima fase della ricerca, è stata effettuata su tre animali. Dopo un mese dall'intervento, nel caso esaminato, il condotto era completamente integrato nella struttura del ricevente (fig. 2b), inoltre non sono stati riscontrati segni di rigetto e danni a livello renale indicatori di progressi episodi trombotici.

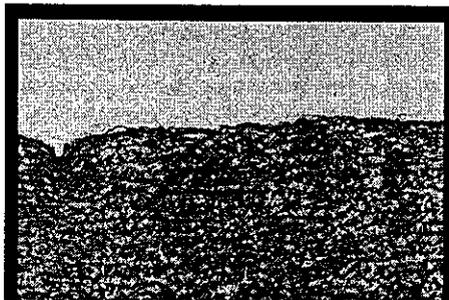


Fig. 3a

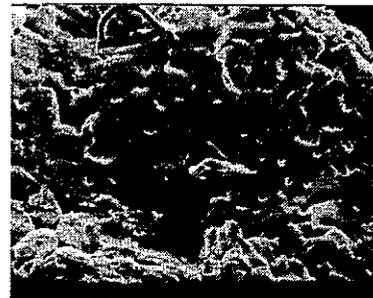


Fig. 3b

La microscopia ottica (Fig. 2a) e il SEM (Fig.2b) hanno evidenziato come tutta la superficie luminale del condotto valvolare impiantato sia stata ricoperta, senza soluzioni di continuità, da uno strato endoteliale del ricevente. Al di sotto dello strato endoteliale si è formato un neostrato intimale che ha rivestito la bioprotesi impiantata. Nella zona di confine (bioprotesi-aorta) è stata evidenziata una flogosi

da corpo estraneo e una lieve fibrosi cicatriziale, che potrebbe regredire nel tempo come abbiamo dimostrato nelle nostre precedenti esperienze.

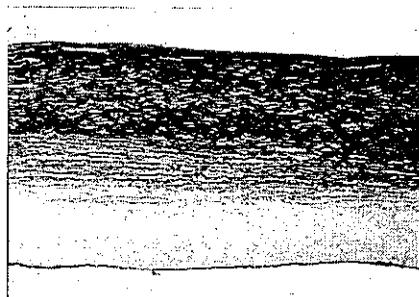


Fig. 4

Le fibre elastiche (fig. 4) e il collagene del condotto sono ben conservati. Non sono stati evidenziati segni indicatori di rigetto. Il neostrato intimale è stato rivestito dalle cellule endoteliali che possono essere migrate dalla parete aortica o derivate da stem cell circolanti di origine midollare.

Conclusioni

Il metodo di Meezan modificato permette di ottenere una completa acellularizzazione del condotto valvolare aortico che può essere riendotelializzato. Il suo impianto in vivo non provoca il rigetto della protesi, i risultati ottenuti vanno ulteriormente implementati al fine di poter apportare le modifiche metodologiche necessarie per il successo nella costruzione della bioprotesi auto-xenograft proposta.

Pubblicazioni

1. Parnigotto PP, Grigioni M, Valfrè C, Rocco F, Daniele C, Conconi MT, Abbate M, Dettin M. **Progress in the in-vitro reconstruction of an aortic auto-xeno porcine valve**", **International Conference on "Advances in Biomaterials and Tissue Engineering**. 14-19 Giugno 1998, Abstract book, pag 143, Capri
2. Rocco F, Parnigotto PP, Conconi MT, Spinazzi R, Zussa C, Polesel E, Grigioni M, Daniele C, Busetto R, Iacopetti I and Valfrè C. **Preliminary study on a new auto-xenograft aortic bioprosthesis**. The First Combined Meeting - European Associations of Tissue Banks (EATB) and Musculo Skeletal Transplantation (EAMST) 10-12 Settembre 1998 Turku, Finland.

SOTTOPROGETTO 2

ENDOPROTESI CARDIOVASCOLARI

Nuovi poliuretani per la realizzazione di ventricoli artificiali: caratterizzazione chimico-fisica e tecnologia di preparazione

Luigi AMBROSIO

Istituto per la Tecnologia dei Materiali Compositi
Consiglio Nazionale delle Ricerche
Piazzale Tecchio, 80
80125 Napoli

Principali partecipanti: Roberto De Santis, Borzacchiello Assunta
Istituto per la Tecnologia dei Materiali Compositi, Consiglio Nazionale delle Ricerche.

Sintesi dell'attività svolta nel corso del secondo anno

Tecnologia di preparazione di ventricoli artificiali con poliuretani a base di policarbonato

Lo studio di caratterizzazione chimico-fisica realizzato, durante il primo anno della ricerca, sui nuovi poliuretani a base di policarbonato (cosiddetti biostabili, sono il Bionate (exCorethane) ed il Chronoflex 80A) con diversa struttura chimica, per la presenza del diverso tipo di isocianato nella sintesi chimica, ha permesso di ottenere delle informazioni molto utili per la definizione del comportamento dei due poliuretani per applicazioni cardiovascolari. Valori di modulo, deformazione e sforzo a rottura, transizioni termiche, morfologia e metodi di preparazione delle membrane sono fondamentali per la definizione dell'applicazione dei materiali.

Di particolare importanza è risultata la prova a fatica, infatti essa ha evidenziato che il Bionate ed il Chronoflex hanno mostrato una buona stabilità. Alla luce di tali risultati la ricerca è stata mirata alla definizione del processo tecnologico in funzione delle proprietà di processabilità dei due polimeri.

In particolare, la tecnologia di preparazione di ventricoli artificiali, consiste in riempimenti/svuotamenti successivi con la soluzione polimerica di uno stampo metallico avente la forma del ventricolo, pertanto diventa fondamentale analizzare le proprietà di solubilità dei due materiali in solventi che sono adatti a tale tipo di tecnologia.

La preparazione delle soluzioni polimeriche è stata realizzata dissolvendo il polimero (10-12% in peso) in una miscela di Tetraidrofurano/Diossano (2/1 in volume) in concentrazione. Nel caso del Bionate la dissoluzione è risultata abbastanza incompleta come era anche previsto dai parametri di solubilità, la soluzione presentava una fase allo stato rigonfiato causando enormi problemi di processabilità. La ricerca, quindi è stata focalizzata su soluzioni a base di Chronoflex. La scelta e il rapporto volumetrico dei solventi sono stati effettuati in funzione del loro contributo alla viscosità della soluzione ed alla velocità di evaporazione. Considerando la geometria cava dello stampo una elevata evaporazione causerebbe una elevata riduzione della temperatura dello stampo con conseguente condensazione di acqua sulla superficie del poliuretano influenzando le proprietà di superficie e chimico-fisiche del ventricolo.

Prove di viscosità mediante Viscosimento Brookfield hanno mostrato valori di viscosità nel range di 750 - 950 CPS, nell'intervallo di concentrazione riportato. Tale intervallo di viscosità rappresenta il limite inferiore e superiore di applicabilità per la suddetta tecnologia. Soluzioni con valori di viscosità inferiori a 750CPS comportano ritiri inaccettabili ed un numero elevato di fasi di riempimento e svuotamento dello stampo, inoltre il solvente può sciogliere il polimero depositato durante le stratificazioni precedenti, causando la formazione di micro-cracks. Soluzioni con valori di viscosità superiore a 950 CPS causano notevoli disuniformità nello spessore della sacca ventricolare.

In base ai parametri chimico-fisici e tecnologici definiti durante il primo anno, nell'attuale fase di ricerca è stato definito il seguente procedimento di preparazione delle sacche ventricolari in camera bianca classe 10.000:

- riempimento/svuotamento dello stampo, è stato fissato un intervallo di 20 minuti tra successive fasi di riempimento/svuotamento per permettere una parziale essiccazione dello strato polimerico;
- essiccazione all'interno dello stampo per circa 24 ore;
- formatura e rimozione del ventricolo artificiale dallo stampo.

Stabilità delle sacche ventricolari di Chronoflex 80 AL

La stabilità a fatica delle sacche ventricolari è stata effettuata sottoponendo a carichi ciclici campioni ricavati dalle sacche ventricolari preparate secondo il processo descritto precedentemente. I campioni sono stati in seguito sottoposti a caratterizzazione meccanica ed analisi termica differenziale.

Prove a fatica.- Le prove a fatica su provini, a forma di «dumbell», ricavati dalle sacche ventricolari di Chronoflex sono state realizzate mediante l'apparecchiatura MTS Bionix imponendo una deformazione sinusoidale di estremi di circa 25% e 75% della lunghezza utile, con una frequenza di 3.5 Hz per 10 milioni di cicli, in soluzione fisiologica alla Temperatura di 37°C. Al termine della prova i campioni sono stati caratterizzati mediante le analisi descritte precedentemente e confrontati con i risultati ottenuti sui provini non invecchiati per studiare le eventuali variazioni di proprietà.

Proprietà meccaniche a trazione.- Le prove meccaniche a trazione sono state effettuate a temperatura ambiente su provini di Chronoflex dopo fatica, mediante Instron Mod. 4204, utilizzando un velocità di deformazione di 10 min^{-1} . Per individuare eventuali variazioni sono stati calcolati i valori dei moduli secanti alle diverse deformazioni e le proprietà ultime come lo sforzo e la deformazione a rottura. I risultati sono riportati in Figura 1 e Tabella 1.

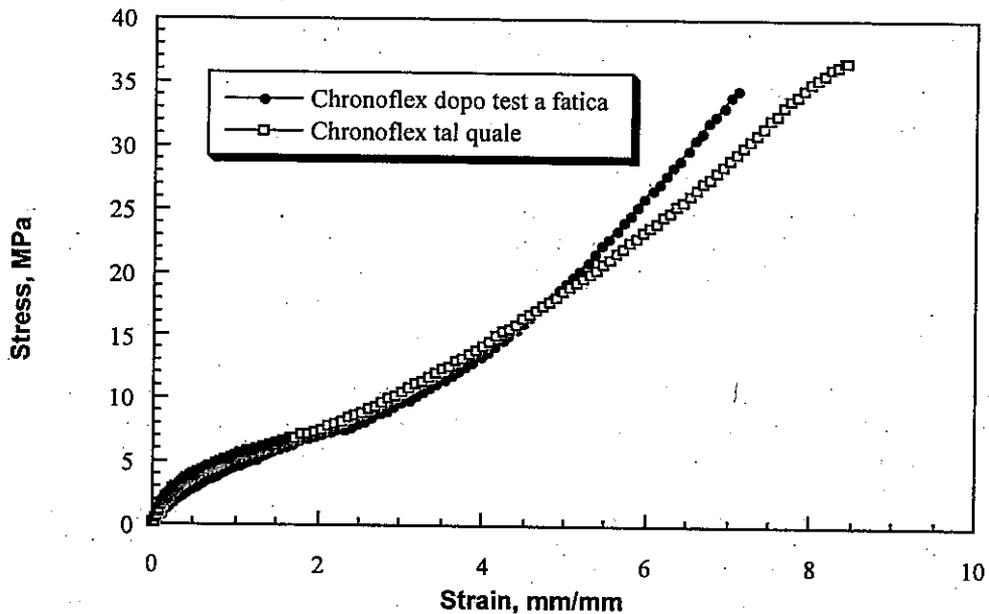


Figura 1. Curve sforzo-deformazione del Chronoflex prima e dopo fatica

Tabella 1. Proprietà meccaniche del Chronoflex prima e dopo fatica

Secant Modulus Sample	$E_{\text{strain}=50\%}$ [MPa]	$E_{\text{strain}=100\%}$ [MPa]	$E_{\text{strain}=300\%}$ [MPa]	$E_{\text{strain}=500\%}$ [MPa]	e_{break} (mm/mm)	S_{break} (MPa)
Chronoflex	7.61 ± 0.63	4.82 ± 0.35	3.27 ± 0.37	3.98 ± 0.45	8.4 ± 0.38	43.9 ± 6.6
Chronoflex dopo fatica	6.70 ± 0.52	4.78 ± 0.21	3.47 ± 0.37	3.72 ± 0.81	7.1 ± 0.4	34.64 ± 3.05

Dai risultati si evince che, in generale, i campioni di Chronoflex ricavati dalle sacche ventricolari presentano differenze non significative nelle proprietà meccaniche a trazione, prima e dopo fatica. In particolare, il Chronoflex invecchiato presenta una leggera diminuzione dei moduli secanti e delle proprietà ultime causata probabilmente dall'acqua assorbita durante la prova a fatica. La riduzione della deformazione a rottura può essere attribuita ad un inizio di degradazione.

Proprietà Termiche.- Lo studio delle proprietà termiche è stato realizzato mediante il calorimetro differenziale a scansione Mettler nell'intervallo di temperatura da -100°C a 250°C alla velocità di $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$. I materiali sono stati ricavati dai campioni sottoposti a fatica e i risultati sono stati confrontati con quelli non invecchiati.

Il Chronoflex presenta un ampio picco endotermico da 60°C a 120°C dovuto alla presenza di acqua assorbita durante la prova a fatica, tale picco scompare nella seconda scansione. La temperatura di transizione vetrosa dei segmenti soffici di circa -26.2°C che è leggermente inferiore al materiale non invecchiato (-25°C).

Analisi Morfologica.- L'analisi morfologica dei campioni prima e dopo fatica, è stata realizzata superficie di frattura dei provini provati a trazione, mediante microscopio a scansione elettronica, i risultati hanno mostrato una variazione minima della struttura, in particolare si evidenziano un leggero aumento di difetti nel campione ricavato dalla sacca ventricolare dopo test a fatica.

Conclusioni

La tecnologia messa a punto per la preparazione di sacche ventricolari ha dimostrato una notevole versatilità sia sulla qualità delle sacche che sulla relativa geometria. Essa permette di ottenere una elevata qualità della superficie che è destinata al contatto con il sangue, in quanto essendo essa a contatto con l'aria e non con lo stampo, durante la fase di lavorazione, le proprietà superficiali dipendono dalle condizioni ambientali e dal sistema polimero/solvente utilizzato.

Lo studio di caratterizzazione chimico-fisica sui nuovi poliuretani a base di policarbonato con diversa struttura chimica, dovuto alla presenza del diverso tipo di isocianato nella sintesi chimica, ha permesso di ottenere delle informazioni molto utili per la definizione del comportamento dei due poliuretani per tali applicazioni.

La ricerca è stata focalizzata su soluzioni a base di Chronoflex in quanto la soluzione di Bionate presentava una fase allo stato rigonfiato causando enormi problemi di processabilità

La prova a fatica sui campioni ricavati da sacche di Chronoflex, dopo 10 milioni di cicli ha evidenziato una leggera variazione di proprietà meccaniche probabilmente dovuta all'effetto plasticizzante dell'acqua e ad un rilascio di bassi pesi molecolari. L'analisi morfologia ha evidenziato un aumento di difetti sul materiale invecchiato rispetto al materiale tal quale.

Strategie di controllo e caratteristiche funzionali meccaniche di un sistema di assistenza ventricolare orientato al recupero del cuore patologico

Maurizio ARABIA
M.M.A. Consulting
Via U. Ojetti 171
00137 Roma

Principali partecipanti: M. Grigioni, C. Daniele
Lab. Ingegneria Biomedica, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Sintesi dell'attività svolta nel corso del secondo anno

Stato attuale

Dispositivi di assistenza meccanica (vad) al cuore patologico, ed in particolare al ventricolo sinistro (VS), hanno oggi il compito di ripristinare una corretta perfusione dell'organismo, pressioni fisiologiche e stabili e quindi assenza di scompenso in condizioni stazionarie, ed il mantenimento della funzionalità del cuore in attesa del trapianto cardiaco. Il vad insieme al ventricolo assistito si dovrebbe quindi comportare come un ventricolo equivalente avente una funzione portata preload afterload (che per brevità si indica con QPA) fisiologica o, meglio, ottimizzata per le caratteristiche del ventricolo destro e del sistema circolatorio del paziente. Poiché la QPA dipende dall'insieme delle caratteristiche del vad e di VS, la possibilità di ottenere una corretta QPA rende necessaria la conoscenza dei parametri del modello matematico che rappresenta VS. Da ciò derivano le caratteristiche funzionali del vad, quindi la natura di alcune soluzioni meccaniche di base (corsa fissa o variabile del pistone, profili di moto del pistone, compliance del ventricolo del vad, diastole passiva o attiva, ecc.) e quindi i valori dei parametri meccanici e del sistema di controllo che determinano il funzionamento del vad. E poiché i parametri di VS possono cambiare nel tempo come conseguenza di un peggioramento o di un miglioramento della funzionalità di VS, occorre che il sistema di controllo modifichi in maniera appropriata i parametri del vad: un modo è quello di stimare periodicamente i parametri del modello di VS attraverso misure e calcolare i nuovi valori dei parametri del vad; l'altro è quello di utilizzare un sistema di controllo adattativo.

Negli attuali vad, collegati a VS mediante cannula apicale, VS eietta verso il vad che si riempie (sincrono in opposizione di fase); in tal caso alla estremità della cannula apicale esiste una pressione relativa pari a circa 0 mmHg, data la diastole passiva (pistone non in contatto con il ventricolo e pressione aria esterna al ventricolo ed interna al vad pari alla atmosferica). In questo tipo di soluzione meccanica il vad può solo esercitare una azione di freno al riempimento, limitandolo, quando vi è contatto ventricolo pistone durante il riempimento. Ma questo risulta essere un caso particolare di come un vad possa interagire con VS: In generale si può dire che il controllo della pressione nel ventricolo del vad durante il suo riempimento permette di controllare l'eiezione di VS verso il vad e quindi le caratteristiche del ciclo di lavoro di VS (da cui dipendono il rendimento energetico, le sollecitazioni nelle pareti di VS e la funzione QPA).

La migliore QPA possibile di VS + vad si ottiene nel funzionamento sincrono in opposizione di fase, che vede un carico pari a quello di una cannula (apicale) con scarico a pressione zero (vad) per un tempo pari a quello della funzione di contrazione di VS. Ma anche in questo caso la QPA ottenibile risulta qualitativamente inferiore a quella fisiologica. Mentre in un ventricolo sinistro fisiologico la QPA può essere approssimata con una retta con pendenza (sensibilità al preload) di circa 1 litro/min/mmHg passante per il punto di coordinate (4 mmHg; 5 litri/min), in un sistema VS + vad la sensibilità al preload può raggiungere il valore 0.5 e ciò è sintomo di pressioni atriali sinistre tendenzialmente più alte del normale.

Altro risultato importante della interazione tra VS e vad è il ciclo di lavoro di VS, da cui dipendono due aspetti importanti del funzionamento meccanico di VS: il rendimento energetico e l'andamento della sollecitazione media nelle pareti di VS durante il ciclo cardiaco. Ma questo aspetto della interazione tra VS e vad non è stato preso in considerazione finora, date le finalità del vad; anche se un corretto

funzionamento di VS nell'ambito delle possibilità ridotte dalla patologia è necessario per una QPA di VS + vad che consenta portate e pressioni corrette nel paziente.

Si può in conclusione dire che gli attuali vad, dal punto di vista del funzionamento meccanico, consentono una QPA di VS + vad accettabile ma poco controllabile e di solito variabile con le variazioni delle caratteristiche di VS che nel tempo possono modificarsi in seguito a peggioramento o a fenomeni di recupero.

Vad orientato al recupero (Tvad)

Un Tvad ha un compito funzionalmente più complesso degli attuali vad. Deve infatti:

1. garantire una QPA fisiologica o meglio sempre appropriata alle caratteristiche del sistema circolatorio e del ventricolo destro, suscettibili di cambiare ed in particolare migliorare insieme al recupero di VS durante il funzionamento con il Tvad;
2. garantire condizioni di lavoro meccanico di VS appropriate per favorire, insieme ad azioni farmacologiche, il recupero di VS.

Come risulta dallo studio svolto dallo scrivente nel corso del primo anno, un vad, per poter creare condizioni favorevoli al recupero, deve funzionare in serie; ne derivano vincoli sul tipo di connessione e di funzionamento.

Poiché finora la connessione apicale risulta la più adoperata, in quanto segue a questa ci si riferirà. L'interazione tra VS e Tvad si verifica durante l'eiezione di VS verso il Tvad che si riempie (funzionamento in serie); occorre quindi utilizzare questa fase per soddisfare l'obiettivo 2, controllando appropriatamente attraverso il riempimento del Tvad il funzionamento di VS. Ma in questo modo si può verificare che la QPA di VS + Tvad sia inadeguata alle esigenze previste in 1; occorre quindi migliorare la QPA attraverso una fase di riempimento ulteriore del Tvad che può essere eseguita solo in quella parte del ciclo durante la quale VS si riempie. Si tratta, quindi, di prevedere una fase di funzionamento in parallelo di VS e Tvad durante il riempimento di entrambi; e questa fase può precedere o seguire la fase di eiezione di VS verso il Tvad e cioè la fase di riempimento del Tvad in funzionamento serie. Ma per poter controllare l'entità del riempimento del Tvad in questa fase, occorre che il Tvad funzioni come pompa volumetrica controllata.

Risulta, allora, che un Tvad deve essere controllato durante l'intero ciclo e quindi anche in diastole. Occorre, cioè, una diastole attiva, controllata in modo da generare nella sezione di ingresso della cannula apicale una opportuna relazione pressione volume eiettato da VS che permetta il raggiungimento dell'obiettivo citato al punto 2.

Il funzionamento del Tvad è il risultato della seguente successione di azioni:

- definire in base allo stato del paziente la funzione QPA di VS + Tvad che si vuole realizzare
- determinare i parametri del modello di VS
- in base ai valori dei parametri del modello di VS determinare una relazione $P_{lv} = \varphi(V_{eiettato})$ tra la pressione P_{lv} in VS ed il valore istantaneo del volume che VS eietta verso il vad, che imponga a VS una famiglia di cicli di lavoro e quindi rendimenti energetici e profili di sollecitazione di parete che rientrino in prefissati limiti; questa relazione deve essere aggiornata in presenza di variazioni del modello di VS, determinate ad esempio dal recupero, e quindi nella fase di svezamento di VS
- generare un moto del pistone del Tvad tale da rispettare la relazione $P_{lv} = \varphi(V_{eiettato})$; nella figura 1 è mostrato lo schema del corrispondente sistema di controllo (limitato alla fase di riempimento del Tvad in funzionamento serie) che illustra il principio di funzionamento.

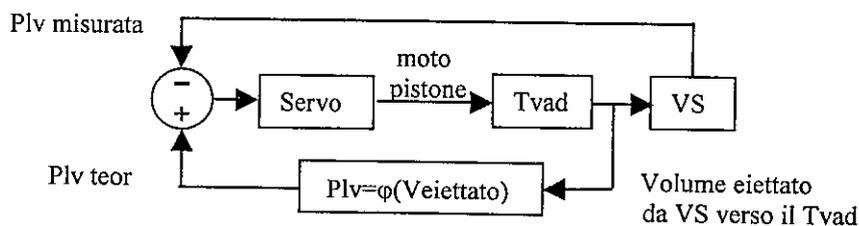


Figura 1.- Schema del sistema di controllo che realizza la funzione φ

- durante il funzionamento, il sistema VS + T_{vad} sarà caratterizzato da un punto di lavoro (non conosciuto dal sistema di controllo) posizionato lungo la relazione portata P_{la} definita dalla QPA di VS + T_{vad}; ma la posizione di questo punto di lavoro può essere determinata utilizzando la conoscenza del riempimento del T_{vad} durante la fase di funzionamento serie e cioè dello stroke volume SV_{vs} che VS eietta verso il T_{vad}; utilizzando il valore SV_{vs} ed il modello di VS in eiezione e quindi in riempimento, si ricavano i volumi telesistolico e telediastolico e la pressione media in atrio sinistro
- dalla pressione in atrio sinistro, nota la QPA che si vuole realizzare, si trova la portata desiderata ed il corrispondente stroke volume di VS + T_{vad} (la frequenza di funzionamento è determinata dal sincronismo del T_{vad} con il cuore naturale); la differenza tra stroke volume necessario calcolato ed SV_{vs} (minore di quello necessario, data la patologia, nonostante la riduzione di afterload dovuta al T_{vad}) può essere ottenuta con un ulteriore riempimento del T_{vad} da realizzare in parallelo al riempimento di VS.

L'analisi del T_{vad} è stata eseguita utilizzando una simulazione al computer in ambiente Matlab Simulink. Il modello matematico utilizzato trae origine da quello sviluppato nell'ambito del precedente contratto con l'ISS, che è stato sensibilmente ampliato e reso più pratico nell'uso. Infatti sono stati costruiti dei moduli, ognuno contenente una funzione, come ad esempio un modulo per il modello ad elastanza variabile e resistenza interna di un ventricolo con relazione pressione volume rappresentata da una retta a pendenza variabile secondo una opportuna funzione di contrazione; un modulo rappresentante un ventricolo analogo al precedente ma utilizzando una più accurata relazione pressione volume ora non lineare nel volume; vari moduli che rappresentano modelli di carico arterioso diversi (windkessel a tre elementi, rete a 4 componenti sviluppata da Gnudi, reti a 5 componenti sviluppate da Noordergraaf), modello di rete venosa, modello di cannula, modello di una pompa pulsatile personalizzabile in modo da rappresentare meccanismi di funzionamento diverso (ad esempio funzionante con diastole passiva o con diastole attiva). Nei modelli di ventricolo e di pompa pulsatile è stata utilizzata per le valvole artificiali la rappresentazione sviluppata dall'ing. Grigioni presso l'ISS. La valvola artificiale viene rappresentata con due relazioni, una per la fase di valvola aperta e l'altra per la fase di valvola chiusa. In entrambe la differenza di pressione ai capi della valvola è una funzione della portata attraverso coefficienti che sono funzione del tipo e del diametro nominale della valvola. Risulta quindi molto facile sperimentare il comportamento di valvole diverse come tipo e/o come diametro.

Questo modello è stato utilizzato per valutare le scelte funzionali e quindi le necessarie caratteristiche meccaniche di un T_{vad}. È stata dedicata molta attenzione al problema della fasatura, della suddivisione del periodo nelle varie fasi (durata del riempimento in funzionamento parallelo, durata del riempimento nel funzionamento in serie e cioè quando VS eietta nel T_{vad}, durata della eiezione del T_{vad}), delle forme d'onda del moto del pistone nelle varie fasi del ciclo. Sono stati sperimentati vari modelli di carico arterioso per VS ed analizzati i conseguenti cicli di lavoro, i rendimenti, gli andamenti delle sollecitazioni di parete.

La sperimentazione eseguita ha permesso di trarre le seguenti conclusioni.

Un T_{vad} deve:

- funzionare in modo sincrono con il cuore naturale;
- funzionare in serie al ventricolo assistito e posto alla sua uscita in modo che l' afterload del ventricolo sia costituito dal preload del T_{vad};
- avere la diastole attiva, controllata dalla relazione $P_{lv} = \varphi(V_{eiettato})$, allo scopo di creare condizioni di lavoro di VS favorevoli al recupero e cioè rendimento energetico meccanico fisiologico (la patologia lo riduce drasticamente), lavoro per ciclo e andamento e valori delle sollecitazioni di parete opportunamente ridotti rispetto ai valori fisiologici per tenere conto della diminuita capacità contrattile di VS;
- funzionare con volume telediastolico variabile e quindi con corsa del pistone variabile data la necessità, determinata dalla diastole attiva, che il ventricolo sia sempre in contatto con il pistone; ciò implica un cinematismo più complesso e delicato di un sistema a corsa fissa (possibile solo in sistemi con diastole passiva) ma anche notevoli altri vantaggi funzionali come la possibilità di generare corrette forme d'onda di portata e di pressione in aorta, assenza di urto tra ventricolo e pistone al

termine del riempimento, conoscenza del valore istantaneo del volume nel T_{vad}, regolarità della forma del ventricolo perché sempre guidato dal pistone e quindi ridotto rischio di formazione di pieghe nelle pareti del ventricolo con vantaggi per la sua durata e per la fluidodinamica del sangue;

- integrare il riempimento ottenuto dallo svuotamento di VS durante la diastole attiva con un contributo volumetrico appropriato da realizzare durante la fase diastolica di VS controllando appropriatamente il moto del pistone;

Occorre, inoltre, considerare come parte integrante del progetto del T_{vad} anche le cannule di entrata e di uscita del vad. La loro influenza sul funzionamento del sistema svolge un ruolo che può essere determinante ad alte frequenze del cuore. Ad esempio la cannula apicale, considerata prevalentemente rigida, determina a pari pressione media in eiezione un picco anticipato di pressione che si verifica, cioè, nella fase iniziale della eiezione. Ne segue un ciclo di lavoro che si inserisce meglio tra le caratteristiche passiva ed attiva di VS con conseguente aumento del rendimento, mentre si osserva un incremento del valore massimo della sollecitazione di parete.

I risultati ottenuti hanno evidenziato l'opportunità di prove in vitro per migliorare i modelli adoperati nelle simulazioni ed i valori dei loro parametri, specie per quanto riguarda il comportamento degli elementi che rappresenta l'albero arterioso. A tal fine insieme con l'ing. M. Grigioni dell'ISS ed il suo gruppo si è avviata un'attività sperimentale in tal senso con il raggiungimento dei primi risultati sperimentali. In particolare si è caratterizzata una compliance utilizzante come elemento elastico la comprimibilità dell'aria, evidenziando l'entità delle componenti resistive ed inerziali presenti ed il modo di renderle trascurabili rispetto al termine capacitivo nella banda di frequenza dei segnali di pressione e di portata. La definizione dei coefficienti di merito ha permesso la valutazione di questo tipo di realizzazioni.

In conclusione lo studio svolto ha avuto il ruolo di individuare problemi e possibili soluzioni, di analizzarne alcune, e di individuare alcune caratteristiche di base che distinguono un T_{vad} da un vad da applicare come ponte al trapianto.

Bibliografia

1. Campbell K.B., Ringo G.A., Netti C., Alexander J.E. Informational analysis of the left ventricle/systemic arterial interaction. *Annals of Biomedical Engineering*. Vol 12, pp. 209-231, 1984.
2. Burattini R., Gnudi G. Computer identification of models for the arterial tree input impedance: comparison between two new simple models and first experimental results. *Med. Biol. Eng. Comput.* Vol. 20, pp.134-144, 1982.
3. Guyton A.C. *Circulatory Physiology: cardiac output and its regulation*. W.B. Saunders 1963.
4. Sagawa K., Maughan L., Suga H., Sunagawa K. *Cardiac contraction and the pressure-volume relationship*. Oxford University Press 1988.
5. Arabia M. Studio di strategie di controllo di un sistema di assistenza ventricolare con collegamento in serie ed in parallelo. Rapporto ISTISAN 97/19.

Fattori fluidodinamici ed umorali nella genesi dell'iperplasia miointimale da impianto di protesi endovascolare

Luigi BALLERINI

Ospedale Bambino Gesù
P.zza S. Onofrio, 4
00165 Roma

Principali partecipanti: M. Grigioni^b, R. Formigari^a, G. Marano^c, G. D'Avenio^b, P. Bernucci^d, C. Daniele^b, S. Palazzesi^c

^aOspedale Bambino Gesù, Dip. Medico-Chirurgico di cardiologia pediatrica; ^bLab. Ing. Biomedica, ISS;

^cLab. Farmacologia Cardiovascolare, ISS; ^dIst. Anatomia Patologica, Università "La Sapienza", Roma

Sintesi dell'attività svolta nel corso del secondo anno

Una delle complicanze più importanti dell'impianto di protesi endovascolari (stents) è costituito dalla stenosi luminale tardiva, che può verificarsi in tempi variabili da 2-3 mesi ad un anno di distanza dall'impianto, e che rappresenta la più frequente causa di fallimento della procedura. La reazione proliferativa miointimale è un elemento primario di questo processo, e si sviluppa in particolare nelle arterie di piccolo e medio calibro (tipicamente nelle coronarie e nelle arterie renali). I meccanismi di stimolo alla proliferazione sono conosciuti solo in parte, e negli ultimi anni sono stati scoperti numerosi fattori bioumorali in grado di influenzare il comportamento biologico del vaso arterioso. In particolare, è stata dimostrata l'importanza dell'endotelio come un elemento centrale nei processi patologici del sistema vascolare, e su cui agiscono molecole come l'endotelina, l'angiotensina e il nitrossido, solo per citarne alcune. Tuttavia, esistono fattori meccanici che influiscono sulla funzione endoteliale, e che sono in grado di stimolare la produzione di principi vasoattivi che regolano la risposta delle varie componenti cellulari di cui è composta la parete arteriosa. Questi acquistano un ruolo primario quando la presenza di una protesi endovascolare altera il comportamento meccanico della parete vascolare, e potrebbero costituire la base iniziale di quella serie di trasformazioni che portano al processo obliterativo, come avviene in caso di sovradistensione del vaso dopo angioplastica. L'ipotesi è pertanto che in caso di impianto di una protesi endovascolare non sia tanto il semplice contatto con la superficie protesica ad innescare o a partecipare alla sequenza proliferativa, quanto la variazione delle caratteristiche meccaniche del vaso

Gli obiettivi di questo studio pertanto sono stati:

1. Eseguire una valutazione in vivo delle caratteristiche emodinamiche di un modello di proliferazione cellulare vascolare
2. Identificare e valutare quantitativamente i fattori meccanici determinanti lo stimolo proliferativo endoteliale
3. Contribuire alla comprensione dei fenomeni che portano al fallimento degli impianti di protesi vascolari (graft arteriosi e venosi) e endovascolari (stents)

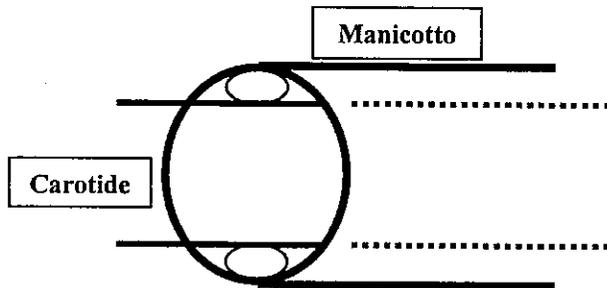
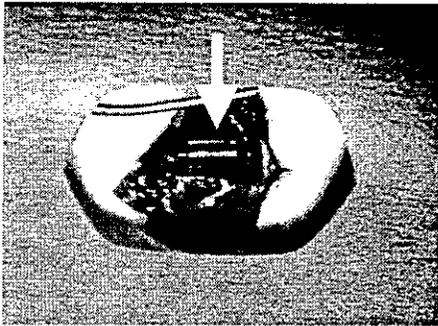
In questo studio pertanto è stato deciso di analizzare le variazioni di WSS in relazione alle caratteristiche reologiche di un modello di iperplasia miointimale caratterizzato dalla assenza di lesioni endoteliali dirette.

Materiali e metodi

Per indurre una alterazione meccanica in grado di provocare reazione miointimale è stato utilizzato il modello di Moncada. Questo modello prevede l'applicazione di manicotti perivascolari non costrittivi del diametro interno di 1,5-2,0 mm intorno alla carotide comune di una serie di conigli New Zealand White. La caratteristica di questo modello risiede nel provocare non una lesione endoteliale diretta (come nel caso della metodica con scarificazione tramite palloncino Fogarty), ma di indurre una forma di iperplasia miointimale mediata solamente dalle variazioni meccaniche della parete vascolare. Il manicotto è stato applicato corredato di due piccoli anelli ai lati, in modo da evitare qualsiasi forma di decubito. La procedura è stata realizzata in anestesia generale con ventilazione meccanica e asepsi.

Un gruppo di animali è stato poi sottoposto ad una valutazione farmacologica sperimentale per verificare l'effetto del Bosentan, un inibitore recettoriale ETa/ETb dell'angiotensina. Sono stati trattati con Bosentan 10 mg/Kg tre gruppi di conigli (B,D,F) a cui rispettivamente era stato impiantato un manicotto perivascolare (n=7), era stata eseguita una scarificazione con catetere a palloncino (n=5) o ambedue le procedure (n=6). Altri tre gruppi (A,C,E) di pari numero sono stati utilizzati come controllo.

L'analisi dei risultati è stata eseguita mediante valutazione del rapporto percentuale intima/media.



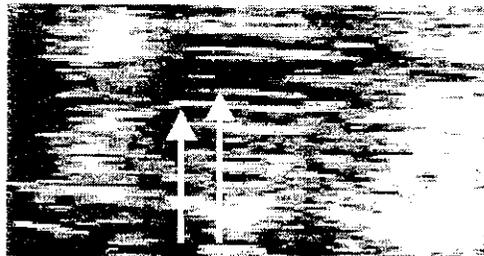
Nelle due figure vengono mostrate una immagine del campo operatorio (la freccia indica il manicotto in posizione), ed uno schema dei rapporti reciproci fra parete arteriosa e manicotto stesso). Sono stati trattati in questo modo 5 gruppi di 6 conigli, eseguendo una preparazione del vaso controlaterale come controllo, allo scopo di verificare che i fenomeni proliferativi eventualmente rilevati non potessero essere ascritti alla semplice manipolazione chirurgica. La valutazione emodinamica è stata eseguita prima dell'impianto, a distanza di 24 ore, dopo 7 e 14 giorni. Al termine di questo periodo l'animale è stato sacrificato e le sezioni di carotide espianate e preparate per analisi istologica ed immunoistochimica. Lo studio emodinamico è stato effettuato tramite ecografia color-oppler con sonda lineare da 10 MHz (misurazione delle velocità di picco) e con flussimetria multi-gated a livello prossimale, centrale e distale rispetto al manicotto (per un totale di 1024 profili velocimetrici per ogni livello). La valutazione istologica prevedeva l'esame con colorazioni ematossilina-eosina e van Gieson Weigert oltre ad un gruppo esaminato dopo congelamento a -80 gradi per MCA641 e A2457. Lo shear rate è stato stimato secondo la formula:

$$V = V_{Max} \left[1 - \left(\frac{r}{R} \right)^n \right] \quad SR = V_{Max} n \frac{r^{n-1}}{R^n} \Bigg|_{r=R} = V_{Max} \frac{n}{R}$$

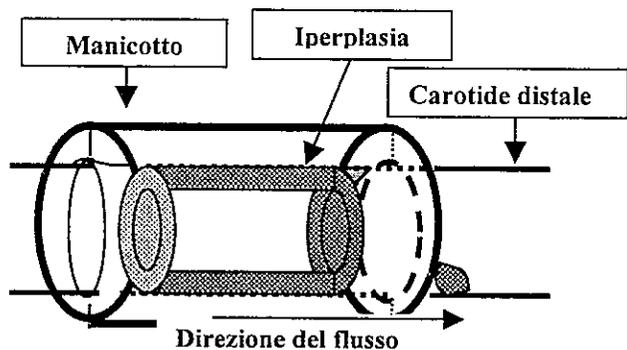
che ha consentito di evitare l'approssimazione che deriva dall'assumere come sempre parabolico il profilo velocimetrico all'interno del vaso. Al contrario, la misurazione dei profili singoli tramite il Doppler multi-gated ha permesso di ottenere una mappa velocimetrica precisa in relazione alla geometria del tratto esaminato.

Risultati

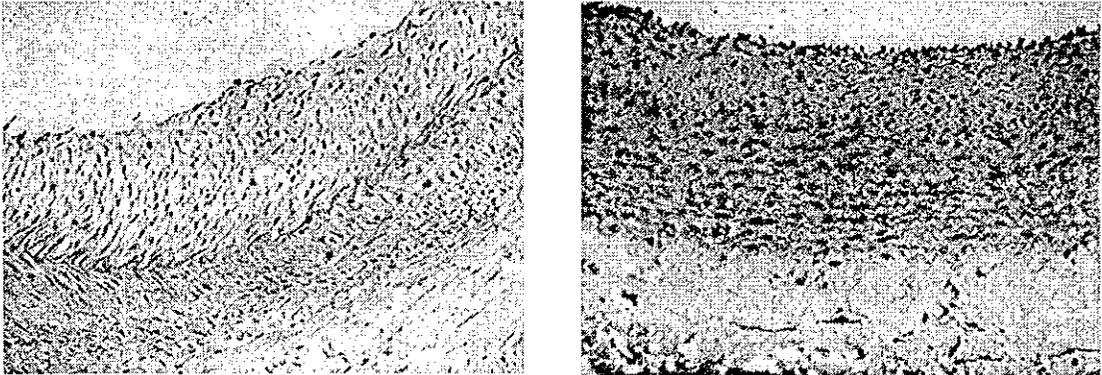
Durante il follow-up postoperatorio l'esame ecografico ha permesso di documentare lo sviluppo di iperplasia miointimale in tutte le carotidi trattate.



A B

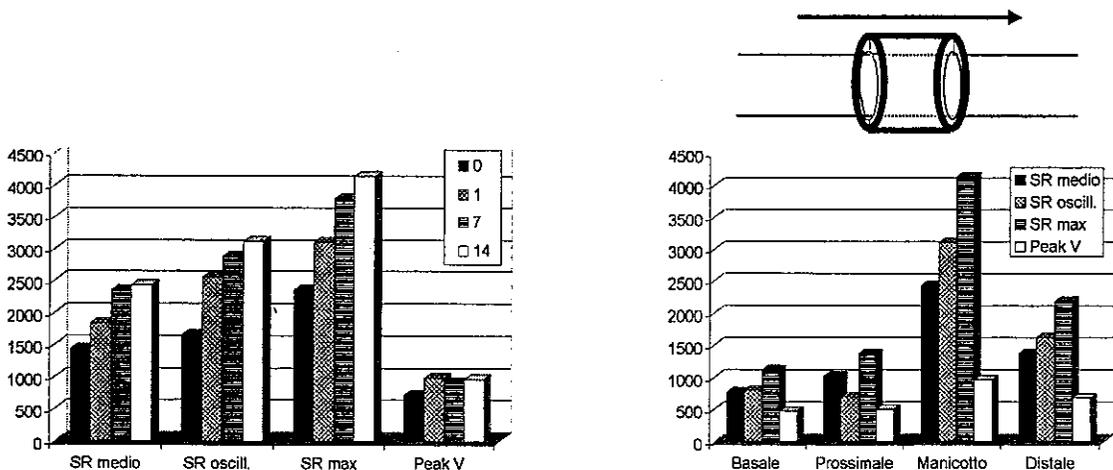


Nella figura a sinistra viene mostrata una vista ecografica di una carotide al 14° giorno dopo l'impianto del manicotto la cui parete interna (A) è ben distinta dalla superficie endoteliale (B) a causa di una importante proliferazione parietale. A destra è stata schematizzata la distribuzione media dell'iperplasia, che mostra uno spessore uniforme al centro, con piccoli fenomeni focali distali causati dalla separazione dei flussi in uscita dal manicotto.



L'iperplasia è stata dimostrata istologicamente, come visibile nelle due sezioni qui sopra riportate. Durante l'evoluzione del quadro morfologico si è provveduto correlare i dati emodinamici allo sviluppo dell'iperplasia. I parametri morfologici e emodinamici che sono stati valutati hanno mostrato una variazione durante il follow-up dei casi in accordo allo sviluppo di iperplasia miointimale. Nei due grafici che seguono viene illustrato l'andamento dei principali parametri biomeccanici rilevati durante lo studio. A destra viene mostrata la progressione dei valori medi di shear rate medio (SRm), oscillatorio (Sro) e massimo (SRmax) e di velocità di picco (Peak V) rispetto al tempo misurato in giorni (0, 1, 7 e 14). Si nota un costante aumento di tutti i parametri, con una stabilizzazione dei valori di velocità di picco. Quest'ultimo effetto è mediato da una iniziale vasocostrizione reattiva a cui segue l'instaurarsi della stenosi morfologica vera e propria. A destra viene indicata la variazione degli stessi parametri ma in relazione alla geometria del vaso ed alla posizione relativa del manicotto (schematizzato in alto). E' ben visibile l'improvviso aumento di SR e Peak V in corrispondenza del manicotto.

Il confronto fra le variazioni regionali delle lesioni all'interno del manicotto ha dimostrato una elevata corrispondenza fra la presenza di valori locali di elevata oscillazione dello SR e sviluppo di iperplasia miointimale ($r=0,95$). Anche la correlazione fra i parametri di velocità di picco rilevati all'ecografia con sonda lineare e quelli ottenuti tramite Doppler multi-gated hanno dimostrato una eccellente correlazione ($r=0,86$).



La fase di sperimentazione dell'inibizione dello sviluppo di iperplasia tramite somministrazione di Bosentan ha fornito alcuni dati di particolare rilievo. In tutti e 3 i gruppi di animali il Bosentan ha significativamente inibito la formazione di iperplasia (in media con un rapporto intima/media pari al 14% rispetto al 24% dei conigli non trattati farmacologicamente), in particolare fra quelli sottoposti solamente all'inserimento del manicotto ($29\pm 4\%$ contro $13\pm 2\%$, $p < 0,05$).

Conclusioni

Nel gruppo di animali sottoposti ad impianto di manicotto perivascolare non costrittivo si è assistito alla formazione di iperplasia miointimale a distanza di circa 14 giorni, senza segni di incorporazione lipidica e in assenza di lesioni endoteliali dirette o di eventi infiammatori di rilievo. La riduzione del lume vasale, inizialmente legata alla vasocostrizione è sostenuta successivamente da una reazione vasale perivascolare nonché dal contenimento meccanico offerto dal manicotto, e il rimodellamento parietale è da collegare alle alterazioni fluidodinamiche indotte attraverso la vasocostrizione. Il cyclic strain della parete vascolare potrebbe agire come trigger di attivazione di sostanze vasoattive da parte dell'endotelio, mentre alti valori di WSR (medi e assoluti) e le sue oscillazioni pronunciate (da negative a positive) potrebbero promuovere la proliferazione miointimale.

La progettazione di endoprotesi vascolari deve includere una analisi delle loro proprietà biomeccaniche, i cui effetti sul vaso costituiscono un importante stimolo proliferativo potenzialmente in grado di vanificare la procedura. La terapia con inibitori dei recettori ETa/ETb è potenzialmente in grado di ridurre significativamente lo sviluppo di iperplasia miointimale. L'ecografia Doppler multi-gated è in grado di fornire valutazioni emodinamiche clinicamente importanti sullo sviluppo e sulle conseguenze emodinamiche sviluppo di stenosi vascolari.

Pubblicazioni

1. Marano G, Formigari R, Grigioni M, Vergari A. **Effects of isoflurane versus halothane on myocardial contractility in rabbits: assessment with transthoracic two-dimensional echocardiography.** *Lab Anim* 1997 Apr;31(2):144-50
2. M. Grigioni, G. Marano, C. Daniele, R. Formigari, L. Ballerini, P. Fazzi, S. Palazzesi (1997): **Hemodynamic assessment of the IH in the atherosclerotic model on rabbit carotid artery, by means of ultrasound real time profilometer.** XXIVnd Congress of ESAO, 16-18 Ottobre, Budapest, The International Journal of Artificial Organs; vol. 20, n. 9 (September 1997) p. 514.
3. R. Formigari, M. Grigioni, G. Marano, C. Daniele, S. Palazzesi, L. Ballerini (1997): **Fattori fluidodinamici nell'ostruzione tardiva di protesi endovascolari.** XXVII Congresso Nazionale della Società Italiana di Cardiologia Pediatrica 2-4 Ottobre, Cagliari. *Giornale Italiano di Cardiologia (The Italian Journal of Cardiology)* Vol. 27, Sup. 3. (Il presente lavoro ha vinto il premio "F. Marsico")
4. M. Grigioni, R. Formigari, G. Marano, C. Daniele, S. Palazzesi, P. Fazzi, L. Ballerini (1997): **Mechanical stress and development of intimal hyperplasia in the common carotid artery investigated by Doppler real-time profilometry.** AHA, American Heart Association, 70th Scientific Sessions 9-12 Novembre 1997, Orlando (Florida). Supplement to *Circulation*, vol. 96, n. 8 (October) 1997, p. 607.
5. M. Grigioni **Haemodynamic assessment of an atherosclerotic model**, 29-30 Aprile 1998, Seminario tenuto presso il CRS4 Centro di ricerca, sviluppo e studi superiori in Sardegna, di Cagliari.
6. M. Grigioni, C. Daniele, G. D'Avenio **Real time ultrasound profilometer to investigate the development of intimal hyperplasia.** IV Congresso nazionale della società di matematica applicata e industriale SIMAI 98, 1-5 Giugno 1998 Giardini Naxos, Sommari vol 2 pag 17-19
7. Marano G, Palazzesi S, Bernucci P, Grigioni M, Formigari R, Ballerini L. **ET(A)/ET(B) receptor antagonist bosentan inhibits neointimal development in collared carotid arteries of rabbits.** *Life Sci* 1998;63(18):PL259-66
8. M. Grigioni, G. Marano, R. Formigari, C. Daniele, G. D'Avenio, L. Ballerini, P. Bernucci, S. Palazzesi. **Wall shear stress swing and the development of intimal hyperplasia in rabbit carotid artery.** XXV ESAO Congress 11-13 Novembre 1998, Bologna, the International Journal of Artificial Organs, Vol 21, n.10, pag 619.

Studio di un sistema di valutazione domiciliare di dispositivi per il trattamento delle tachiaritmie

Marcello BRACALE

Università di Napoli "Federico II"

Dipartimento di Ingegneria Elettronica e delle Telecomunicazioni

Via Claudio 21

80125 Napoli

Principali partecipanti: A. Pepino¹, L. Argenziano², M. Cesarelli¹

¹ Dipartimento di Ingegneria Elettronica e delle Telecomunicazioni, Università di Napoli "Federico II"

² Casa di Cura "Clinica Villalba", Napoli

Sintesi dell'attività svolta nel corso del secondo anno

Nel secondo anno la ricerca da un lato è stata rivolta allo sviluppo di dispositivi avanzati per il rilievo di ECG a banda ampia dedicati alla valutazione dei portatori di pacemakers, dall'altro alla messa a punto i protocolli di impiego clinico al fine anche di creare una "rete pilota" costituita in prevalenza da medici di base volontari, dimostrativa dell'applicazione in oggetto.

Introduzione

Nel corso del primo anno la ricerca si è incentrata principalmente sullo sviluppo software e hardware di sistemi per la registrazione dei dati basati su microcontrollori, per cui si è anche attrezzata una stazione di sviluppo che ha consentito fondamentalmente una attività di sviluppo tecnologico. (Su questa parte si è ampiamente riferito nel report del I anno di attività.)

Nel secondo anno si è ritenuto necessario, posto che sono in corso in ambito industriale nazionale ed internazionale, già da alcuni anni, alcuni progetti di sviluppo di dispositivi holter avanzati di questo tipo; di indirizzare la ricerca anche alla messa a punto di protocolli di tele-cardiologia domiciliare attraverso sperimentazioni pilota facenti uso delle tecnologie già esistenti. Questo allo scopo di cominciare a creare, sin da ora, una base di consenso sulla problematica da parte dei medici di base che, anche alla luce delle recenti indicazioni dell'ultimo piano sanitario nazionale, risultano essere i naturali "utenti intermedi" di queste nuove tecnologie.

E' stata avviata ed è tuttora in corso la Sperimentazione Clinica di un sistema di Home Care. Questa sperimentazione è stata resa possibile da una collaborazione in atto tra il Dipartimento di Ingegneria Elettronica, La Divisione. Medicali della Hewlett & Packard e la Casa di Cura "Clinica Villalba".

La sperimentazione riguarda due gruppi di pazienti. Il primo, che verrà denominato in seguito "gruppo a", è costituito da portatori di pacemakers già regolarmente controllati presso la Casa di Cura "Clinica Villalba". Il secondo gruppo, denominato in seguito "gruppo b", è invece costituito da pazienti affetti da episodi di fibrillazione atriale.

Presso La Casa di Cura "Clinica Villalba" dal 1972 opera un Centro per l'Impianto ed il controllo dei Portatori di Pacemakers, convenzionato con il SSN. Presso il centro afferiscono circa 800 pazienti per un numero medio di 2000 controlli l'anno. I pazienti provengono da tutte le province della Campania, ma anche da altre regioni (Lazio, Abruzzo, Molise, Calabria, Basilicata).

Si possono individuare nel ciclo di vita di un apparecchio e/o impianto ex novo due fasi fondamentali: **follow-up iniziale** nel quale vengono messi a punto i parametri di stimolazione e un **follow-up generale** nel quale vengono controllati i principali parametri clinici e vengono tenuti sotto controllo i principali parametri di stimolazione, in particolare la frequenza di stimolazione. E' noto infatti che tutti i dispositivi di elettrostimolazione cardiaca prevedono come indicatore (in modalità asincrona o cosiddetta "magnetica") la variazione di questo parametro in funzione del livello di carica della batteria.

La fase del follow-up generale può durare da qualche anno fino a (in teoria) anche tutta la vita del paziente: infatti in moltissimi casi il pacemaker attiva la stimolazione solo saltuariamente per cui il dispositivo può durare anche più di 20 anni. Evidentemente questa valutazione è molto semplificata poiché sono molti i fattori che intervengono (frequenza, Tensione di stimolazione, Impedenza di elettrodo etc.); sebbene siano comunque quasi tutti associati alla eventualità della stimolazione.

Da questo si comprende quale sia l'importanza di un controllo periodico per i portatori di dispositivi di elettrostimolazione impiantati, al fine di prolungare la vita dell'apparecchio con ovvio beneficio per il paziente e altrettanto ovvii risparmi economici per il SSN. L'ipotesi del presente lavoro è quella di verificare se attraverso un sotto-insieme dei parametri normalmente rilevati durante la fase di follow-up generale, sia comunque possibile monitorare in maniera efficace il funzionamento del dispositivo impiantato.

Un altro settore tipico di applicazione degli strumenti di teleassistenza domiciliare è proprio quello della diagnosi e del controllo periodico dei pazienti affetti da fibrillazione atriale; Questo tipo di patologia in molti casi si manifesta solo sporadicamente, e quindi difficilmente valutabile con sistemi di registrazione che operano esclusivamente nell'arco delle 24 h. Un sistema di home care permette quindi di effettuare la registrazione contestualmente alle crisi. I pazienti che partecipano alla sperimentazione (gruppo b) sono affetti da episodi recidivanti di fibrillazione atriale sintomatici per palpitazioni resistenti alla terapia farmacologica con farmaci antiaritmici.

Materiali e Metodi

La metodologia di lavoro prevede di impiegare un sistema di tele-trasmissione ECG per la valutazione domiciliare delle due popolazioni prima menzionate.

Il sistema in fase di sperimentazione è stato messo a disposizione dalla HP ed è costituito da:

- 1) Una centrale di ascolto Card Guard collegata ad una linea ISDN al fine di poter essere consultata efficientemente anche da una stazione remota (Computer portatile, Palm top etc.)
- 2) Software di gestione composto da :
 - a) programma di acquisizione transtelefonica e analisi dei tracciati ECG
 - b) cartella clinica per la registrazione dei dati relativi ai pazienti, Controlli periodici, Medici di Base etc.
- 3) Data Base aggiornato delle caratteristiche di tutti i modelli di Pacemaker disponibili in commercio
- 4) Un Terminal Adapter ISDN in grado di gestire la linea digitale per l'accesso remoto
- 5) n.5 Registratori Card Guard CG 7100 fig. 1
- 6) n.5 Registratori Card Guard CG 6106 fig. 2

Protocollo pazienti gruppo a)

Il gruppo di pazienti, è stato selezionato per questa prima fase sulla base dei seguenti criteri.

- Impianto effettuato da almeno 6-8 mesi
- Prevalenza di ritmo spontaneo
- Condizioni generali accettabili
- Che abbiano emesso il consenso informato scritto
- Livello culturale medio-alto

I pazienti sono già registrati presso il centro, per cui la loro storia clinica è già nota, durante la sperimentazione i pazienti si recheranno comunque almeno una volta presso il Centro per effettuare un riscontro delle misure effettuate domiciliariamente.

Tramite il registratore ECG riportato in Fig. 1, in grado di catturare l'impulso del pacemaker e di visualizzarlo come marker sul tracciato, si possono rilevare le seguenti informazioni:

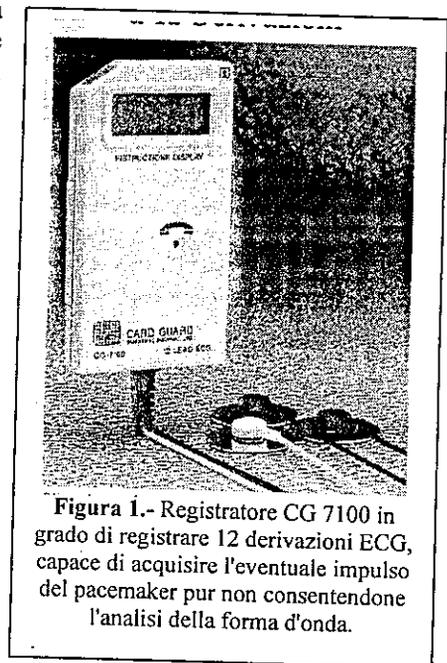


Figura 1.- Registratore CG 7100 in grado di registrare 12 derivazioni ECG, capace di acquisire l'eventuale impulso del pacemaker pur non consentendone l'analisi della forma d'onda.

- Periodo di stimolazione Ventricolare in demand o in asincrono (con la apposizione di un magnete)
- Periodo di stimolazione Atriale, in demand o in asincrono (con la apposizione di un magnete)
- Intervallo AV in demand o in asincrono (con la apposizione di un magnete)
- Presenza o meno di ritmo competitivo (difetto di sensing)
- Presenza o meno di fusioni (necessità di ri-programmazione)
- Assenza di cattura (interruzione di elettrodo)

Il protocollo prevede che il medico di base in occasione delle visite periodiche applica gli elettrodi ed effettua una registrazione di ECG in condizioni normali, seguita da un'altra effettuata apponendo il magnete sul pacemaker (modalità magnetica).

I dati così registrati vengono inviati alla centrale di ascolto dove vengono acquisiti e memorizzati da una segretaria; quindi senza la necessità di personale specialistico. In un momento successivo un Bioingegnere prima ed un Cardiologo poi provvederanno a refertare il tracciato (Fig. 3) che sarà successivamente inviato via fax o e-mail al medico curante. Sui tracciati pervenuti vengono effettuate le



Figura 2.- Registratore card guard CG 6106, registratore tipo "event recorder" in grado di registrare n. 6 brani di una singola derivazione con la singola pressione di un tasto. Ogni brano dura 90 sec. di cui i primi 30 sec. relativi al periodo precedente alla pressione del tasto, mentre i rimanenti 60 sec. corrispondono a quelli immediatamente successivi.

seguenti misurazioni:

- TV_D: Periodo di stimolazione Ventricolare in Demand
- TV_A: Periodo di stimolazione Ventricolare in Asincrono
- TA_D: Periodo di stimolazione Atriale in Demand
- TA_A: Periodo di stimolazione Atriale in Asincrono
- TAV_D: Periodo di stimolazione Atrio-Ventricolare in Demand
- TAV_A: Periodo di stimolazione Atrio-Ventricolare in Asincrono

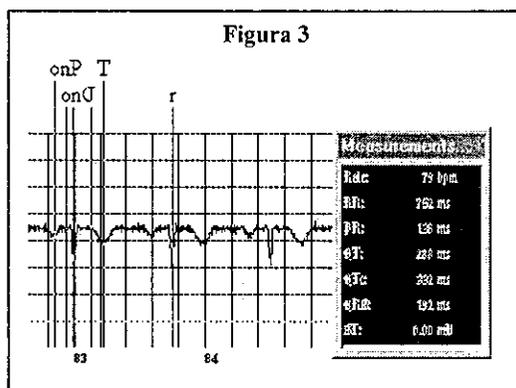
Viene quindi compilata la seguente checklist:

Cattura impulso	S/N
Presenza di Fusioni	S/N
Inibisce Correttamente	S/N

La sequenza temporale dei dati raccolti viene analizzata e confrontata con i riscontri strumentali ottenuti presso il Centro, ovviamente nel caso in cui i dati registrati per via telematica dovessero differire significativamente da quelli relativi al controllo precedente il paziente sarebbe immediatamente convocato per un controllo presso il Centro.

Terminato il periodo di sperimentazione che si prevede essere di 6-12 mesi. Tramite una apposita modulistica di valutazione da distribuire sia ai medici che ai pazienti, si cercherà di dare una risposta alle seguenti domande:

- 1) I dati rilevati per via telematica garantiscono lo stesso grado di accuratezza di quelli misurati presso il centro?
- 2) E' disponibile ed in quali casi il paziente a sostituire il controllo effettuato presso il centro specialistico con un controllo telematico?
- 3) Il medico di base è disponibile a rappresentare un elemento di interfaccia tra il portatore di pacemaker ed un centro di controllo specialistico?
- 4) Quali sono le risorse uomo necessarie per gestire la centrale di ascolto?



Protocollo pazienti gruppo b)

I pazienti inclusi soddisfano i seguenti requisiti:

- uomini e donne
- di qualunque ceppo etnico

- adulti ed anziani (età maggiore di 18 anni compiuti al momento dell'arruolamento)
 - diagnosi confermata di episodi recidivanti di fibrillazione atriale
 - che abbiano emesso il consenso informato scritto
 - che presentino al momento dell'arruolamento un ritmo sinusale e siano in condizioni cliniche stabili;
- In questo caso i pazienti vengono preventivamente visitati dal Medico di Base (Cardiologo) che partecipa al progetto e vengono sottoposti comunque ad un esame ECG tradizionale a riposo.

Per questa sperimentazione viene adoperato il registratore riportato in fig.1 espressamente progettato per funzionare come event recorder. In questo caso il dispositivo viene affidato dal medico direttamente al paziente, il quale viene istruito sull'uso del dispositivo eventualmente con l'ausilio di un familiare.

Viene inoltre consegnato al paziente un modulo su cui scrivere delle annotazioni relative ai sintomi osservati in coincidenza dei sei eventi registrabili. All'atto della collegamento con la centrale di ascolto i dati trascritti nel modulo vengono comunicati all'operatore che li riporta in apposite annotazioni collegate al tracciato. Una volta ricevuto il tracciato, questo viene refertato unicamente dal cardiologo che lo valuta in relazione alle annotazioni fornite. Viene valutato sull'ECG: il ritmo di base ed in particolar modo per l'assenza di onde P e l'irregolarità dell'intervallo RR. Sarà valutata anche l'osservazione di altri tipi di aritmie ipercinetiche (flutter atriale, tachicardia atriale, tachicardia ventricolare, ecc.) Come nel caso precedente viene prodotto un referto via fax o e-mail per il medico curante. (Fig. 3) Terminato il periodo di sperimentazione che si prevede essere di 6-12 mesi. Tramite una apposita modulistica di valutazione da distribuire sia ai medici che ai pazienti, si cercherà di dare una risposta alle seguenti domande:

1. Il paziente è in grado di gestire in modo autonomo l'uso del dispositivo di tele-trasmissione?
2. Il tracciato registrato in queste condizioni risulta essere di qualità accettabile per rilevare la presenza di fibrillazione atriale?
3. Quali sono le risorse uomo necessarie per gestire la centrale di ascolto?

Risultati attesi

Il mercato sta vivendo un momento di grande eccitazione per quanto riguarda le applicazioni di assistenza domiciliare, tuttavia i protocolli di utilizzo e gli schemi organizzativi non sono affatto definiti. Appare comunque evidente che esiste attualmente un mercato e questo è di conforto per le aziende che hanno scelto di investire nella ricerca e sviluppo in questo settore.

I risultati che ci si attendono dal lavoro in corso si possono riassumere in:

- a) Creazione di una rete di medici di base dimostrativa della efficacia dell'approccio metodologico, e che sia disponibile nell'immediato futuro per la applicazione di altri dispositivi più avanzati appositamente disegnati per la valutazione di dispositivi di defibrillazione impiantabili
- b) Messa a punto e valutazione di schemi logistici e organizzativi.
- c) Individuazione dei limiti di impiego dei dispositivi di tipo transtelefonico e indicazione dei protocolli più idonei al loro uso.

Publicazioni

1. M. Cesarelli, P. Bifulco, M. Sansone, M. Bracale - **Adaptive Algorithm for Time-Varying Heart Rate Variability Spectral Analysis** World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering. Nizza, 14 -19 settembre 1997. Medical Biological Engineering & Computing Vol 35, Supplement part.1, p. 541
2. M. Cesarelli; P. Bifulco; M. Bracale - **An Algorithm for the Detection of Atrial Fibrillation from the Surface ECG for a Home-Care Evaluation of Implanted Atrial Defibrillators.** Medicon98 – Cyprus 14-17 June 1998, pp. 126 n.132
3. A. Pepino, M. Bracale, L. Argenziano- **Clinical Evaluation of a Home Care System for Patients with Implanted Pacemakers.** Eurorec '99, 6-7 Maggio Siviglia, Proceedings, pp. 263-267