

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
Scienze Mediche Specialistiche
(Cardiochirurgia Pediatrica)**

Ciclo Ventinovesimo

Settore Concorsuale di afferenza: MED23

Settore Scientifico disciplinare: 06E1

TITOLO TESI

**NUOVE STRATEGIE PER LA CHIUSURA DEI DIFETTI
SETTALI INTRACARDIACI**

(SVILUPPO DEL DISPOSITIVO E APPLICAZIONI CLINICHE)

Presentata da: dott.ssa Assunta Fabozzo

Coordinatore del Dottorato

Prof. G. D. Gargiulo

Relatore

Prof. G. D. Gargiulo

Esame finale anno 2017

A mio marito e a mio figlio...

"I'll be the shelter that won't let the rain come through"

Indice

1. Premessa

2. Estratto

3. Introduzione

3.1. Difetti Cardiaci

3.2. Difetti extracardiaci

3.3. Collanti biologici

3.4. Prima fase della sperimentazione (sviluppo e caratterizzazione di un collante biodegradabile e biocompatibile)

3.5. Seconda fase della sperimentazione (sviluppo del dispositivo)

4. Materiali e metodi

4.1. Disegno dello studio

4.2. Dimostrazioni ex vivo ed in vivo delle potenziali applicazioni cliniche

4.3. Test di Pull-off e burst pressure testing

4.4. Tests in vivo

4.5. Metodi statistici

4.6. Elenco dei Supplementary Materials (disponibili online)

5. Risultati

5.1. Una tecnologia transcateretere luce-riflettente per la chiusura atraumatica di difetti tissutali

- 5.2. Sviluppo ed ottimizzazione della riflessione della luce ultravioletta
- 5.3. Ottimizzazione del profilo della fibra ottica per una più efficace dispersione della luce
- 5.4. Valutazione in vivo ed ex vivo delle potenziali applicazioni cliniche
- 5.5. Perfezionamento dei parametri per applicazione intracardiaca
- 5.6. Riduzione delle dimensioni di difetti interventricolari in vivo

6. Discussione

7. Bibliografia

Elenco Figure:

Figura 1. Caratterizzazione e Sviluppo del PGSA

Figura 2. Studio di Compatibilità e di Adesione del PGSA/PGSU

Figura 3. Adesione del patch con PGSA al setto interventricolare del cuore

Figura 4. Valutazione del PGSA come emostatico

Figura 5. Una nuova tecnologia transcateretere che rilascia e attiva un collante biologico

Figura 6. Sviluppo e caratterizzazione di un pallone riflettente e flessibile

Figura 7. Ottimizzazione delle caratteristiche della fibra ottica

Figura 8. Dimostrazione delle potenziali applicazioni ex vivo usando organi e tessuti porcini

Figura 9. Risposta infiammatoria nel modello roditore e forze applicate ciclicamente e tangenziali

Figura 10. Caratterizzazione del dispositivo per applicazioni cardiache

Figura 11. In vivo proof of concept del device

Nuove strategie terapeutiche nel trattamento dei difetti settali

(Sviluppo del dispositivo)

1. Premessa

Questo lavoro è il prodotto delle sperimentazioni svoltesi nell'ambito di un progetto, che ha visto la collaborazione internazionale di molteplici Università e Istituti di Ricerca.

Nel corso di quasi sei anni, presso i laboratori della Cardiochirurgia Pediatrica del Boston Children's Hospital, il nostro team è riuscito a:

- sviluppare e caratterizzare le proprietà di un innovativo collante del tutto biocompatibile e biodegradabile (prima fase) e
- progettare e testare un dispositivo transcatetere, unico nel suo genere, per la traslazione clinica dell'innovativo tessuto adesivo (seconda fase).

Il progetto di sviluppo del dispositivo medico-chirurgico, di cui sono stata responsabile in prima persona, è stato presentato come oggetto del Dottorato in Scienze Mediche Specialistiche (29simo ciclo) presso l'Alma Mater Studiorum dell'Università di Bologna nel Novembre 2013; accolto e accettato con grande partecipazione dai membri della commissione giudicatrice, è oggetto della presente tesi.

Di seguito sono elencate le Istituzioni che hanno contribuito al raggiungimento dei nostri propositi scientifici:

- School of Engineering and Applied Sciences, Harvard University, 29 Oxford Street, Cambridge, MA 02138, USA.
- Wyss Institute for Biologically Inspired Engineering at Harvard, 3 Blackfan Circle, Boston, MA 02115, USA.
- Dipartimento di Chirurgia Cardiaca, Boston Children's Hospital, Harvard Medical School, 300 Longwood Avenue, Boston, MA 02115, USA.
- Dipartimento di Chirurgia Cardiaca Pediatrica, Alma Mater Studiorum, University of Bologna e Ospedale Sant'Orsola Malpighi, Via Massarenti 9, 40126 Bologna, Italia (dal 11/03).
- Dipartimento di Chirurgia Cardiaca, Azienda Ospedaliera di Padova e Università degli Studi di Padova , Via Giustiniani 2, 35128, Padova, Italia (dal 07/2012 al 03/32013)
- Division of Biomedical Engineering, Department of Medicine, Center for Regenerative Therapeutics, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Harvard Stem Cell Institute, Harvard-MIT Division of Health Sciences and Technology, 65 Landsdowne Street, Cambridge, MA 02139, USA.
- Department of Mechanical Engineering, Technical University of Munich, Boltzmannstrasse 15, 85748 Garching n. Munich, Germany.
- Gecko Biomedical, 74 rue du Faubourg, Saint Antoine, 75012 Paris, France.

- Department of Biological Engineering, Massachusetts Institute of Technology, 500 Main Street, Cambridge, MA 02139, USA.
- School of Mechanical and Materials Engineering, University College Dublin, Belfield, Dublin 4, Ireland.

2. Estratto

Nell'uomo, la presenza di un difetto (soluzione di continuità), congenito o acquisito, a carico di qualsiasi tessuto biologico richiede la chiusura chirurgica dello stesso, spesso in condizioni di emergenza, che si basa per lo più sull'utilizzo di componenti sintetiche e/o metalliche, a loro volta responsabili di fenomeni infiammatori a causa della loro scarsa biocompatibilità.

L'utilizzo di collanti biodegradabili, idrorepellenti ed attivabili all'uopo, rappresenta un'alternativa appetibile ai comuni metodi di sutura, ma la mancanza di un dispositivo medico-chirurgico, appositamente disegnato, ed in grado di rilasciare in maniera appropriata ed efficace il collante, senza risultare traumatico per il tessuto, nè limita la traslazione in ambito clinico.

Il nostro team di ricerca, composto da ingegneri, biotecnologi, biologi, veterinari e personale tecnico di assistenza, ha sviluppato un dispositivo per la chiusura di difetti tissutali, multifunzionale, la cui tecnologia, basata su cateteri, non prevede l'impianto permanente di componenti sintetiche e/o metalliche e funziona mediante a) dispiegamento di un patch elastico e biocompatibile rivestito da collante foto-attivabile; b) dal rilascio di un doppio pallone necessario alla stabilizzazione del tessuto durante procedura e ad applicare il giusto grado di pressione sul patch; c) da un sistema di fibre ottiche per l'emanazione di luce

ultravioletta e d) un rivestimento di alluminio per una uniforme dispersione della luce indispensabile per l'attivazione del collante.

Utilizzando questo dispositivo, abbiamo dimostrato di poter chiudere un difetto tissutale, sul versante più distale dello stesso, nel modello animale, in distretti corporei di diversa natura anatomica e funzionale e più specificamente, sulla parete addominale, stomaco e setto interventricolare *ex vivo*.

Il dispositivo è stato ulteriormente valutato come strumento per la chiusura *in vivo* di difetti cardiaci nel modello animale di piccola taglia (ratto) e come strumento per la chiusura perventricolare di difetti settali nell'animale di grossa taglia (maiale).

Nel modello suino, il patch si è dimostrato adeso e resistente al passaggio tangenziale del flusso sanguigno ad alta pressione, riducendo acutamente le dimensioni del difetto a <1.6 mm (non emodinamicamente significativo).

Questa nuova piattaforma ha il potenziale di garantire la riparazione atraumatica e mini-invasiva dei difetti tissutali nei pazienti di ogni età, anche se tecnicamente difficili da raggiungere.

3. Introduzione

La presenza di un difetto, congenito o acquisito, a carico di tessuti di organi cavi del nostro organismo, richiede interventi di chiusura, talvolta emergenti, che siano rapidi ed efficaci.

La chirurgia è a tuttora la scelta primaria, ma approcci mininvasivi (basati in genere sull'uso di cateteri introdotti sotto visione endoscopica) per la diagnosi e il trattamento offrono un'alternativa migliore in termini di sicurezza e minor trauma chirurgico.

3.1. Difetti cardiaci

I difetti cardiaci settali sono la patologia più comune tra le cardiopatie congenite nei giovani (1-2). Possono presentarsi in forma isolata o essere elementi più o meno costanti di quadri patologici complessi (ritorno venoso anomalo totale o parziale delle vene polmonari, tetralogia di Fallot, trasposizione delle grandi arterie, etc).

Sin da prima dell'inizio dell'era moderna della chirurgia cardiaca, apertasi con l'introduzione della circolazione extracorporea (Gibbon, 1953), (3) l'approccio chirurgico ha rappresentato l'unica vera opzione terapeutica per la chiusura dei difetti interatriali e interventricolari.

La chirurgia, ancora oggi, prevede l'utilizzo di suture e di altri materiali sintetici (ad esempio patch in dacron), può essere tecnicamente indaginosa, richiedere lunghi tempi operatori e presentare importanti complicanze peri e post procedurali. Inoltre, l'utilizzo della circolazione

extracorporea di per sé, può essere fonte di problematiche quali eventi trombo-embolici, complicanze neurologiche e attivazione di fenomeni infiammatori reattivi (4-5).

Un'ulteriore considerazione merita la difficoltà alla corretta esposizione chirurgica del difetto settale. Nella fattispecie, alcuni difetti interventricolari sono difficili da "raggiungere" attraverso l'atriotomia destra (preferenziale via d'accesso al setto interventricolare), e richiedono incisioni della parete ventricolare (ventricolotomie), più o meno estese, potenzialmente capaci di aumentare le complicanze peri- e post- operatorie a breve e a lungo termine. La scelta dell'approccio chirurgico dalla parte "destra del cuore" è tutt'altro che casuale, derivando, infatti, dalla necessità di "limitare" complicanze aritmiche e meccaniche (alterazioni della cinetica segmentale, riduzione della frazione d'eiezione, etc.), che avrebbero significato sicuramente più disastroso qualora fossero eseguite a carico delle sezioni sinistre. Eppure così diversi regimi pressori ai due lati del setto interventricolare (e in misura minore anche atriale), la differenza strutturale del setto sui due versanti [a destra la superficie è irregolare, per la presenza di trabecole carnose e corde tendinee (settofilia della valvola atrioventricolare di destra); a sinistra, la superficie è liscia e non raggiunta da corde tendinee (settofobia della valvola atrioventricolare di sinistra)] lasciano facilmente intuire quanto in realtà più efficace e sicuro

sarebbe poter chiudere i difetti del setto interventricolare dal versante sinistro.

La necessità di ridurre invasività e complicanze legate alle tecniche chirurgiche, ha fatto sì che in epoca contemporanea emergessero approcci terapeutici endovascolari, che, pur promettendo vantaggi in termini di outcomes procedurali (riduzione dei tempi di degenza e più rapido recupero postoperatorio), si sono rivelati tutt'altro che scevri da complicanze.

Una delle più grandi problematiche riscontrate con questo tipo di approccio è rappresentata dall'ancoraggio del device (di qualunque tipo esso sia) al tessuto che circonda il difetto, interatriale o interventricolare. Nello specifico, il meccanismo di fissaggio al tessuto della maggior parte dei device introdotti per via transcatetere, è garantito dal *gripping* (letteralmente "afferrare") al tessuto da parte delle maglie per lo più metalliche di cui sono composti. Questo può provocare danno a strutture cruciali del cuore, quali apparati valvolari e tessuto miocardico di conduzione. Altro grande limite dei sistemi endovascolari è la necessità di selezione dei pazienti in base alle caratteristiche di conformazione e posizione del difetto, laddove la chirurgia è invece sempre applicabile (6-8).

3.2 Difetti extracardiaci

Relativamente alle ernie della parete addominale, il suo rinforzo può essere ottenuto attualmente impiantando chirurgicamente o sotto visione endoscopica (laparoscopia), una rete (mesh) protesica attraverso l'uso di suture, che possono a lungo termine essere causa di complicanze (sviluppo di tenaci aderenze) e predisporre alla recidiva di erniazione (9-11).

Metodi innovativi di ancoraggio delle reti protesiche o di materiali completamente biodegradabili, mediante dispositivi introducibili per via laparoscopica, sono auspicabili e potrebbero essere rapidamente introdotti nella pratica clinica.

Un altro esempio di difetto tissutale extracardiaco è l'ulcera peptica, che può essere perforata e risultare in una fissurazione del tessuto gastroenterico, richiedendo il trattamento salva-vita tempestivo. Attualmente questa emergenza clinica è trattata o con intervento chirurgico classico o attraverso laparoscopia.

I primi risultati del registro "Natural Orifice Transluminal Endoscopic Surgery (NOTES) device" sono promettenti in termini di riduzione dei tempi di recupero dei pazienti, ma presentano anch'essi importanti limitazioni; in particolare, le componenti metalliche che restano in sede al termine della procedura, sono responsabili dello sviluppo di processi infiammatori e aderenze cicatriziali (clips metalliche) (12-14).

Anche in questo caso, un approccio che consentisse la chiusura efficace e permanente del difetto senza lasciare elementi protesici scarsamente biocompatibili a permanenza, rappresenterebbe un rilevante vantaggio per il paziente.

3.3. Collanti biologici

Una valida alternativa terapeutica ai sistemi di riparazione adesso in uso, risiede nell'utilizzo di materiali biocompatibili e biodegradabili, in grado di agire in presenza di sangue e a cuore battente e di garantire allo stesso tempo rapidità ed efficacia alla procedura chirurgica.

I cosiddetti "*tessuti adesivi*" o "colle chirurgiche" fanno parte dell'armamentario corrente del chirurgo (15-17); sono prevalentemente utilizzate a scopo emostatico, per quanto sia dimostrata, soprattutto nel caso di tessuti fragili o severamente danneggiati, la loro capacità di far aderire tra loro tessuti e i tessuti a materiali sintetici, senza la necessità di ancoraggio meccanico, evitando così compressione ed erosione degli stessi.

Soprattutto nel caso d'interventi di chirurgia cardiovascolare, un "*tessuto adesivo*" dovrebbe avere le seguenti proprietà:

1. Essere applicabile facilmente all'area desiderata;
2. Resistere al lavaggio da parte del sangue e dei fluidi corporei in genere, facilitando l'applicazione e l'eventuale riposizionamento di device impiantabili, durante procedure mininvasive;

3. Essere attivato soltanto quando voluto, allo scopo di assicurare un corretto e accurato rilascio del device nella sede desiderata;
4. Avere adeguata forza di adesione ai tessuti in presenza di sangue e/o altri fluidi corporei;
5. Avere adeguata capacità di resistere ai movimenti dei tessuti ai quali è adeso (ad esempio al cuore battente);
6. Essere in grado di garantire emostasi;
7. Generare nulla o solo minima risposta infiammatoria tissutale;
8. Essere biodegradabile.

Sfortunatamente, i collanti attualmente disponibili non possiedono le suddette proprietà o almeno le possiedono solo parzialmente. Essi, infatti, sono facilmente “lavabili” in condizioni dinamiche (quali il cuore battente) se esposti al flusso sanguigno, alcuni sono tossici, o esibiscono proprietà adesive non sufficienti a tollerare le forze attive all'interno delle camera cardiache e dei grossi vasi. Inoltre lo scarso controllo nell'attivazione non consente aggiustamenti o riposizionamenti di eventuali devices (18-19).

3.4. Prima fase della sperimentazione (sviluppo e caratterizzazione di un collante biodegradabile e biocompatibile)

Nei primi anni della nostra sperimentazione, lavorando nel team di ricercatori diretto dalla dott.ssa Lang, abbiamo dimostrato le proprietà di un collante, attivabile con la luce ultravioletta, di far aderire al setto

interventricolare un patch, della stessa natura, trasparente, biodegradabile e idrofobico, in maniera veloce, efficace e atraumatica.

In particolare, abbiamo sviluppato un precursore biomimetico stabile, in grado di resistere all'esposizione ai fluidi corporei, aderire a substrati bagnati (da sangue o da altri fluidi), essere attivato *in situ* attraverso uno stimolo luminoso, e quindi di aderire ai substrati solo quando correttamente applicato (20).

Questo prepolimero, denominato Poly(glycerol sebacate acrylate) o PGSA, è idrofobico, biodegradabile, biocompatibile, e attivabile da parte di raggi ultravioletti. La molecola principale di questo materiale è il glicerolo, fondamentale componente di lipidi e acido sebacoico, e metabolita di acidi grassi (20-21).

Un'altra ricercata caratteristica di questo prepolimero, è la sua capacità di non essere eliminato facilmente dalla superficie di un tessuto a cui sia applicato e pertanto di rimanere attivabile, conservando la sua forza di adesione nonostante prolungato contatto con il sangue.

Nello stesso periodo, partendo dallo stesso composto di base (l'acido sebacoico e il glicerolo), ma fondendo lo stesso con una base di uretano, è stato possibile ottenere un patch, trasparente (per garantire adeguato passaggio della luce ultravioletta), elastico e biodegradabile, denominato Poli(glycerol-sebacate)urethane, o PGSU (22).

I risultati di questa prima fase della sperimentazione non sono oggetto di questa tesi di dottorato, ma essendo indispensabili alla comprensione delle caratteristiche tecniche del device, sono sintetizzati in Figura 1, 2, 3 e 4.

3.5. Seconda fase della sperimentazione (sviluppo del dispositivo)

La traslazione di questa tecnologia molecolare nella pratica clinica, necessita l'ingegnerizzazione di uno strumento appropriato di rilascio e attivazione del collante. Il dispositivo per la chiusura di difetti intracardiaci, deve ovviare:

- all'invasività delle odierne procedure chirurgiche pur conservando efficacia e sicurezza,
- alla circolazione extracorporea e alle sue potenziali complicanze,
- alla somministrazione di mezzi di contrasto e di raggi X
- all'utilizzo di materiali sintetici e metallici,
- al danno tissutale a carico del miocardio specifico e di lavoro

ed è basato sull'utilizzo di:

- materiali biocompatibili e biodegradabili,
- monitoraggio intraprocedurale ecocardiografico bidimensionale e tridimensionale,
- e che in ultimo permetta una chiusura efficace e sicura del difetto sul versante "corretto" del setto interventricolare, quello sinistro.

Infine, un dispositivo occludente (patch) biodegradabile, ha il potenziale di agire come scaffold temporaneo, permettendo il ripopolamento del

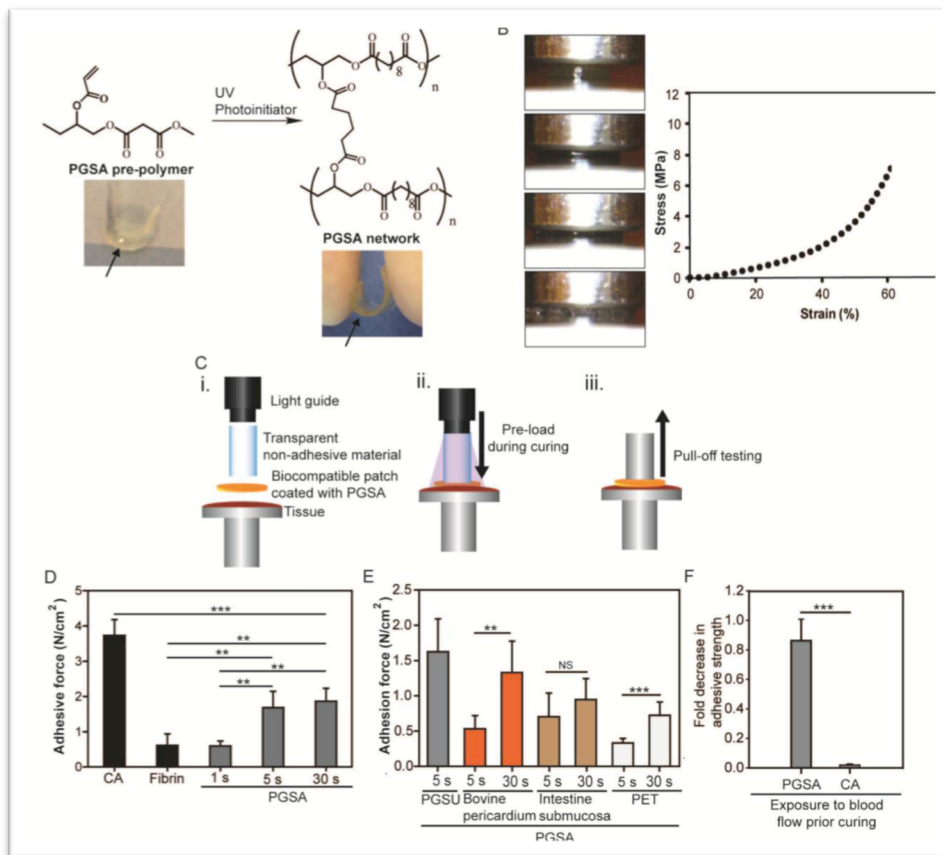


Figura 1. Sviluppo e caratterizzazione del PGSA.

(A e B), inattivo PGSA è un polimero altamente viscoso che può essere facilmente applicato su di una superficie. Esposto alla luce ultravioletta, ed in presenza di un fotoiniziatore, diventa una pellicola con maggiore flessibilità. I legami si sviluppano grazie alla presenza di gruppi acrilati (grado di acrilazione 0.5); dopo 24 ore di immersione in PBS a 37°C PGSA attivato ha un modulo di compressione di 2.9 ± 1.2 MPa, ed una forza tensile massima di 6.4 ± 1.7 MPa. La capacità del PGSA di far aderire patches di diverso materiale a tessuti biologici (epicardio) è stata valutata attraverso tests basati sulla quantificazione delle forze di "pull-off". (C). PGSA è stato selezionato tra gli altri materiali per la sua maggiore trasparenza alla luce ultravioletta. Il sistema utilizzato per questo tipo di esperimenti è stato stabilito per assicurare una prestabilita e consistente compressione del PGSA-PGSU contro il tessuto durante l'attivazione (C). PGSA raggiunge il massimo delle sue forze di adesione dopo 5 secondi di esposizione alla luce ultravioletta (D); dopo cinque secondi di esposizione ai raggi UV, il PGSA ha approssimativamente una forza di adesione pari a metà di quella del cianoacrilato (CA), e si rivela essere più forte dei fibrino-derivati, disponibili in commercio, di circa tre volte (Figura. 1D). La versatilità del PGSA è stata valutata anche su altri tipi di patch, attualmente disponibili nell'applicazione clinica (patch di pericardio bovino, sottomucosa intestinale, etc...); dopo 5 secondi di attivazione, le forze di adesione, misurate su tessuto epicardico fresco, erano inferiori rispetto a quelle misurate con il PGSU (E). Questo è probabilmente legato alla minore trasparenza di questi materiali alla luce UV; pertanto abbiamo testato, la possibilità di aumentare il tempo di attivazione da 5 a 30 secondi, ottenendo in ultimo simili forze di adesione per questi materiali ed il PGSU (E) Abbiamo inoltre comparato la capacità del PGSA rispetto al CA di resistere al possibile "lavaggio" quando esposti al flusso sanguigno – situazione che potrebbe verificarsi ad esempio, in condizioni di direzionamento di un device verso il target (ad esempio VSD). Ebbene, tests di adesione eseguiti su campioni di PGSA e del CA - applicati su patches - precedentemente esposti al flusso sanguigno in ambiente dinamico, hanno dimostrato una immediata inattivazione del CA, ed al contrario una non significativa variazione delle proprietà adesive del PGSA (F).

tessuto fibroso connettivo e l'endotelizzazione, e gradualmente la sostituzione per assorbimento del patch e del collante, con tessuto completamente nativo.

Pertanto, abbiamo sviluppato un dispositivo medico-chirurgico che ha la capacità di chiudere difetti tissutali fissando un patch elastomerico in corrispondenza di un sito "cieco" (non visibile dal lato dell'operatore"), mediante approccio mininvasivo utilizzando un collante attivabile con luce ultravioletta.

Il nostro device è in grado di rilasciare un patch rivestito di un collante foto-attivabile, dispiegare un patch e riflettere uniformemente la luce ultravioletta emanata da una fibra ottica interna, attivando il collante pre-applicato sul patch, applicare pressione sullo stesso, permettendo infine la chiusura del difetto tissutale.

Abbiamo, inoltre, dimostrato la corretta funzionalità del dispositivo in tre modelli di chiusura di soluzioni di continuità potenzialmente riscontrabili nell'uomo,: difetti intracardiaci., della parete addominale e ulcere peptiche perforate.

Molti altri sono le possibili applicazioni cliniche di questo dispositivo, potenzialmente e applicabile a ogni difetto di organi viscerali cavi (perforazioni di intestino, vescica, esofago).

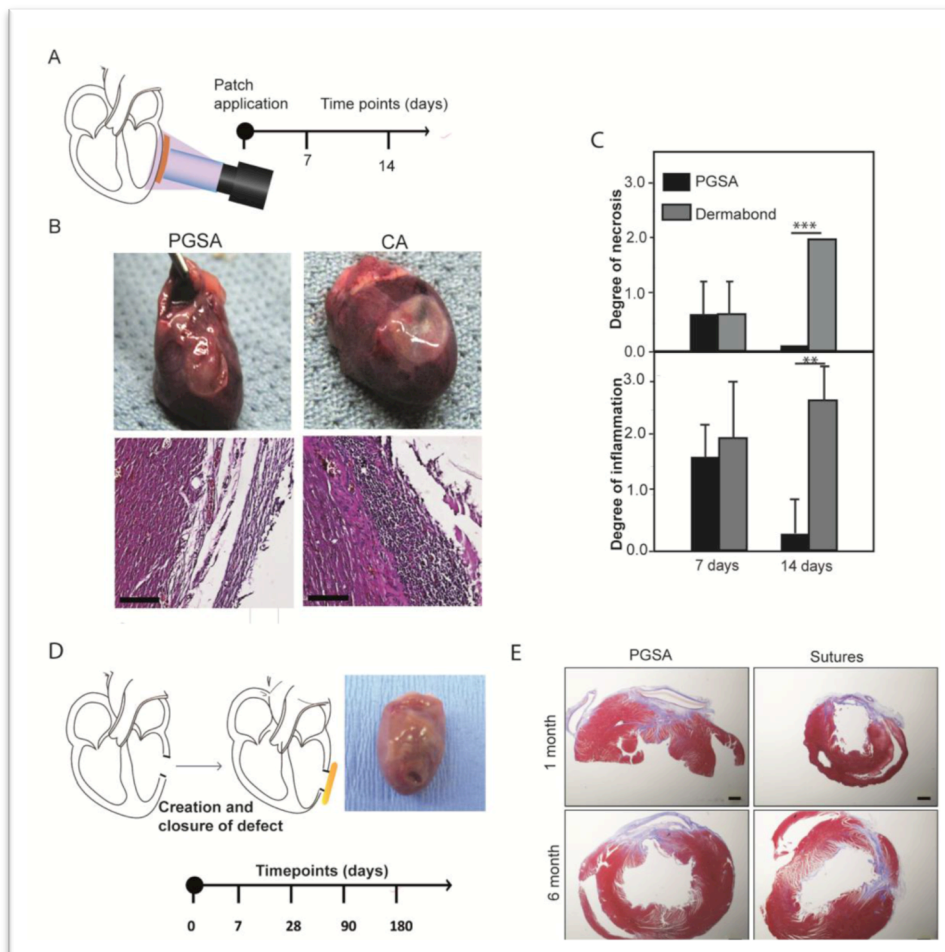


Figura 2. (A) *Studio di compatibilità e di adesione del PGSA/PGSU.*

Studio di biocompatibilità e le capacità di adesione del PGSA in condizioni dinamiche ed in presenza di fluidi corporei, modello animale in vivo, ratti Wistar (300-350g), nei quali il PGSA applicato atches di PGSU biocompatibili è stato attaccato alla superficie esterna del cuore. La procedura ha avuto successo in tutti i casi (PGSA: n=8, CA: n=7). Gli animali sono quindi stati rivalutati secondo specifici time points: dopo 7 giorni dall'impianto, il 100% di patches si presentava attaccato all'epicardio in entrambi i gruppi (n=3). Il grado di necrosi e di infiammazione si è rivelato significativamente minore nel gruppo PGSA rispetto al gruppo CA, all'analisi istologica con ematossilina ed eosina dei tessuti (B e C). La reazione infiammatoria era simile nei due gruppi: infiltrato di natura linfocitaria e macrofagica circondava i patches a 7 e 14 giorni dopo l'impianto; ma dopo 14 giorni l'infiltrato infiammatorio era significativamente ridotto nel gruppo PGSA. Tutti gli impianti hanno presentato la formazione di una capsula fibrosa intorno ai patches, ancor più tenace nei successivi *time points* (D). Nel gruppo PGSA (e PGSU), con il consolidamento della tecnica chirurgica, la chiusura del difetto nel ventricolo sinistro è stata ottenuta in 17 animali. La chiusura con sutura è stata possibile con successo in 14 di 15 animali, con uno degli animali sacrificato in anticipo per una severa depresso della funzione ventricolare. Dopo 28 giorni di osservazione, l'analisi ecocardiografica rivelava una funzione cardiaca estremamente ridotta, legata alle modalità della procedura, in entrambi i gruppi. Tessuto cicatriziale, con accumulo di collagene organizzato, era visibile in entrambi i gruppi come risultato di un danno tissutale provocato durante la creazione del difetto (E).

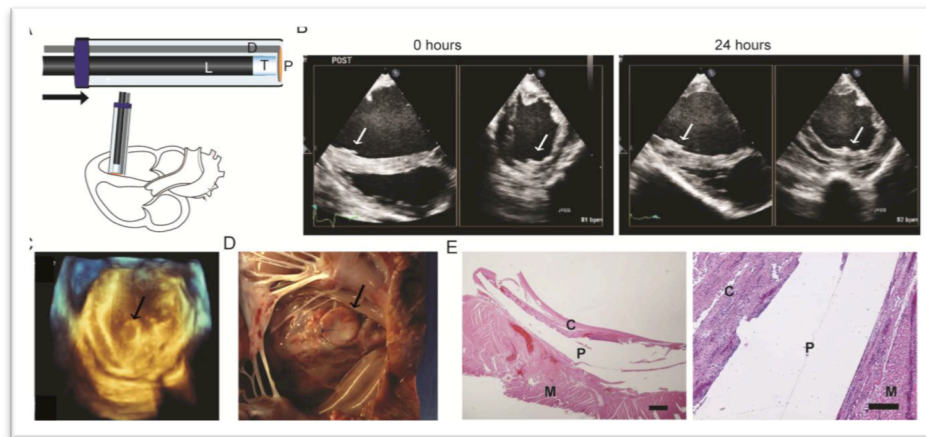


Figura 3. Adesione del patch con PGSA al setto interventricolare del cuore

Per dimostrare la capacità del PGSA di essere utilizzato nell'ambito di procedure intracardiache mininvasive, per confermare la sua abilità a resistere al flusso sanguigno in un sistema in movimento e sotto pressione, abbiamo sviluppato una tecnica per applicare patches (PGSU) con PGSA al setto interventricolare in un modello animale di razza suina, specie Yorkshire.

Per questa procedura abbiamo utilizzato un sistema di patch delivery già descritto, che consiste in una cornice di nitinolo, che avvolge un patch di PGSU, il quale viene assicurato ad essa, non tenacemente, con suture in prolene. Nella cornice scorrono due fili di nitinolo, il cui ritiro contribuisce al rilascio del patch. Abbiamo modificato questo iniziale prototipo con uno che identico per caratteristiche funzionali, ha un'angolatura di 90°, per assecondare l'angolazione del setto. I patches di PGSU (diametro 14mm), previa applicazione del PGSA, sono stati suturati alla sottile cornice di nitinolo del delivery system. Una fonte luminosa di raggi UV (5 mm di diametro) ed il sistema di rilascio del patch sono stati inseriti in un introduttore di 15 mm (A). La procedura ha avuto buon esito nei quattro animali testati (B e C). Alla quarta ora di osservazione (in due animali) la somministrazione di adrenalina, volta a dimostrare il comportamento del patch in condizioni iperdinamiche, (pressione arteriosa media 200 mmHg e frequenza cardiaca di picco 180 bpm) ha mostrato una tenace adesione del patch al setto. Dopo 24 ore di osservazione (in due animali), il patch si presentava invariato in posizione all'ecocardiogramma epicardico, pre-sacrificio (B). Dopo l'espianto del cuore, l'analisi macroscopica ha evidenziato la presenza del patch in tutti e quattro gli animali (D) e l'analisi istopatologica (E) ha mostrato la formazione di una capsula di fibrina dopo 24 ore.

Materiali e metodi

4.1. Disegno dello studio

Lo studio è stato disegnato allo scopo di dimostrare il funzionamento di una tecnologia innovativa per il rilascio, la trasmissione e la diffusione di luce ultravioletta, necessaria per l'attivazione di un collante biologico fotosensibile, ottenendo in ultimo la chiusura atraumatica e mini-invasiva di un difetto in un tessuto appartenente ad organi viscerali.

I test sono stati eseguiti in maniera randomizzata, non cieca (eccetto che per i campioni istologici dopo in vivo).

Per la corretta riflessione della luce ultravioletta, una superficie riflettente al 99% è stata usata come controllo positivo, con una numerosità del campione pari a 4. Le simulazioni di luce sono state sviluppate usando tre condizioni differenti con due tipi di fibre ottiche.

Un campione di tre esemplari è stato usato per i burst test e la misurazione delle forze di adesione su tessuto (cardiaco, gastrico e parete addominale) e 17 campioni sono stati poi utilizzati per i test di adesione endocardio vs pericardio.

I test di adesione in vivo sono stati svolti su cinque campioni. Infine, il proof-of-concept del dispositivo è stato dimostrato nell'animale di grossa taglia (suino, Yorkshire, femmina di 45-50Kg) e ripetuto per tre esperimenti consecutivi.

L'outcome considerato è stato il corretto posizionamento del patch e il mantenimento dello stesso attaccato al tessuto dopo rimozione del dispositivo.

Ulteriori dimostrazioni non sono stati possibili, per l'indisponibilità temporanea della produzione del collante. In ogni caso, riteniamo di avere prove sufficienti della fattibilità dell'approccio procedurale.

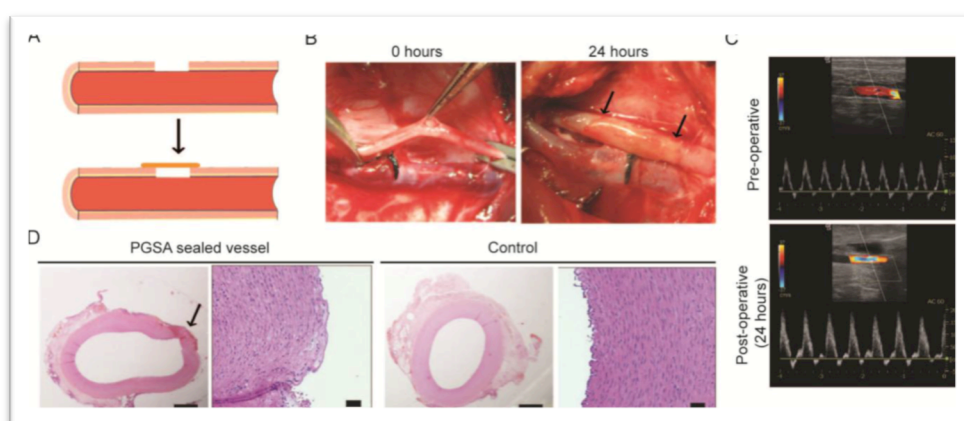


Figura 4. *Valutazione del PGSA come emostatico.*

Tests in vitro (burst pressure tests) hanno mostrato un valore di 203.5 ± 28.5 mmHg per difetti di piccole dimensioni chiusi con la sola applicazione di PGSA. La sperimentazione in vivo (maiali di razza Yorkshire), eseguita su 4 animali, ha evidenziato che difetti di piccole dimensioni (2 mm) possono essere chiusi con la sola applicazione di PGSA (A,B,C). Controlli sugli animali a 24 ore non hanno evidenziato complicanze procedurali. L'analisi morfo-funzionale (eco-doppler, C) delle carotidi espuntate non ha mostrato segni di trombosi o di accelerazioni di flusso significative, e l'analisi istologica (ematossilina-eosina) ha confermato la presenza di endotelio intatto (D).

4.2. Dimostrazioni ex vivo e in vivo delle potenziali applicazioni cliniche

In vivo. Patches di PGSU (200 µm di spessore, 4 mm di diametro) sono stati attaccati a tessuto sottocutaneo (n=5), addome (n=2) e cuore (n=2) di ratti (Sprague Dawley), mediante l'attivazione di uno strato pre-applicato di PGSA, ottenuta con un device miniaturizzato, connesso ad una sorgente di luce ultravioletta (OmniCure S2000, Lumen Dynamics Group Inc.) per 15 secondi all'intensità del 100% con un range di for 320-390 nm. I patches attaccati al tessuto sottocutaneo addominale (n=5 a 1, 7, e 14 giorni) sono stati confrontati mediante standard pull-off tests con tessuti di animali nei quali la procedura di posizionamento del patch è stata eseguita con suture.

Un micro-gripper è stato utilizzato per afferrare il patch a uno dei suoi lati e tests di pull-off sono stati eseguiti con Instron 5566 (100-N load cell). I patches attaccati sul tessuto sottocutaneo della parete addominale e sull'epicardio del cuore sono stati processati e inviati per istologia (n=2 a 1, 7, e 14 giorni) e colorati con ematossilina e eosina.

Ex vivo. Cuori di maiale freschi (n=3) sono stati usati per dimostrare le tappe della procedura. Questi passaggi (i) sono stati eseguiti sotto diretta visione con la parete del ventricolo sinistro rimossa (n=2) o (ii) senza visione alcuna (ventricolo chiuso, n=1). Allo scopo di simulare il cuore sotto-pressione, un cuore è stato prelevato da maiale, sacrificato nell'ambito di altri esperimenti, estranei a questo protocollo. (Figura 8 C),

Entrambe le valvole semilunari (polmonare e aortica) sono state rimosse e i grandi vasi connessi con due colonne d'acqua (soluzione fisiologica) corrispondenti a 20 mmHg e 100 mmHg, rispettivamente.

L'ecocardiografia è stata utilizzata per monitorare la procedura. La stessa procedura è stata poi eseguita in un animale (maiale) già sacrificato per altri scopi, per valutare l'attacco del patch allo strato più interno della parete addominale (peritoneo parietale) (Figura 8D).

In particolare sono stati praticati un'incisione di 6 mm della cute dell'addome dell'animale e un tunnel sottocutaneo per facilitare l'inserzione del dispositivo nella cavità addominale.

Lo stomaco di un maiale (n=2) è stato usato per studi di fattibilità procedurale e patch attachment sulla superficie esterna dello stomaco.

Usando nuovamente un animale già sacrificato, un'incisione di 5 mm è stata praticata sulla parete anteriore dello stomaco per simulare la presenza di un'ulcera gastrica.

Il device è stato inserito attraverso l'esofago (come si farebbe con una normale gastroscopia) e il patch attaccato sulla parete gastrica sul versante esterno (peritoneale). A questo punto, per dimostrare la capacità del patch di rimanere in sede anche a condizioni sovralfisiologiche, abbiamo simulato un'iper-distensione dello stomaco, espiantando e montando lo stesso su di un supporto. Il patch attaccato mediante l'utilizzo del device, è stato attaccato alla superficie esterna dello stomaco (Figura. 8E). 1 ml di PGSA/HLAA è stato aggiunto e

attivato alla valvola ancora aperta (modello ex vivo) sulla superficie esterna. L'organo è stato quindi completamente riempito (ca. 1L di soluzione fisiologica).

4.3. Test di Pull-off e burst pressure testing

Tessuti derivanti dalla parete addominale, stomaco e cuore (n=3) di maiale sono stati collezionati da animali sacrificati.

Patches di PGSU (200- μ m di spessore, 20 mm di) sono stati attaccati ai campioni di tessuto mediante attivazione di uno strato preapplicato di PGSA/HLAA con il device (120 secondi di attivazione con 3 N di carico) connesso ad una sorgente di luce ultravioletta (OmniCure S2000, Lumen Dynamics Group Inc.), al 100% di intensità con un range di 320-390 nm.

I campioni di tessuto sono stati mantenuti umidificati durante tutto l'esperimento.

I tests standard di pull-off sono stati eseguiti utilizzando un Instron 5566 (1 kN di carico).

In breve, un patch di PGSU già incollato al tessuto biologico, è stato attaccato dal versante opposto ad una sonda piatta mediante cianoacrilato (Loctite 4601). A questo punto, applicando un carico compressivo di 1 N, il patch è stato pressato per 5 secondi e successivamente "tirato" alla velocità dei 8 mm/min.

Per test di carico, i tests di adesione all'epicardio sono stati ripetuti con vari precarichi (1, 3, e 5 N) . Successivi tests di pull-off sono stati eseguiti con patch identici e tessuto epicardico ed endocardico di maiale fresco, come precedentemente descritto (21)

Burst pressure tests sono stati eseguiti su miocardio porcino con HLAA-coated PGSU patches come descritto nei materiali supplementari (disponibili online).

4.4. Tests in vivo

Il protocollo animale è stato rivisto e approvato dal Boston Children's Hospital Institutional Animal Care and Use Committee. Tutti gli animali hanno ricevuto osservazione e cura secondo le linee guida (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) raccomandate dall'Istituto Nazionale di Sanità degli Stati Uniti d'America (US NIH).

Sono stati usati maiali di sesso femminile di tipo Yorkshire, del peso di 45-50 Kg. Brevemente, una toracotomia laterale destra è stata eseguita a livello del 4° spazio intercostale ed il pericardio è stato aperto. Due borse di tabacco concentriche sono state confezionate con suture in prolene 3-0, sulla parete libera del ventricolo destro, per permettere l'inserzione del device (approccio perventricolare). Anche in questo caso, l'ecocardiografia è stata utilizzata come strumento di monitoraggio intraoperatorio. Non è stato utilizzato il supporto di circolazione extracorporea in nessun caso. Il device è stato inserito e avanzato attraverso un difetto interventricolare, contestualmente determinato, nel

ventricolo sinistro. In seguito, il dispositivo è stato ritirato nel ventricolo destro e gli steps procedurali sono stati eseguiti.

4.5. Metodi statistici

Nei materiali supplementari è possibile consultare i datasets (tabelle S1-S8). Usando il software Graphpad Prism è stato possibile elaborare l'analisi statistica e i grafici. Per ogni dataset è stato creato un istogramma per determinare la distribuzione dei dati e creare un sommario delle valutazioni statistiche, incluse media e mediana.

Per distribuzioni “non normali” è stato utilizzato il test di Mann Whitney a due code. Per confronti di coppie appaiate (con Dunnetts's post-hoc test), e Kruskal-Wallis one-way analisi per multiple comparazioni (con Dunn's post-hoc test).

I risultati sono stati considerati significativi dal punto di vista statistico se P value ≤ 0.05 .

4.6. Elenco dei Supplementary Materials (disponibili online)

Figura S1: Progettazione delle singole componenti dell'impugnatura.

Figura S2: Meccanismo di “disaccoppiamento” per gli strumenti dell'impugnatura.

Figura S3: Progettazione del “raster rod”.

Figura S4: Progettazione degli strati e del loro movimento relativo.

Figura S5: Progettazione dell'impugnatura

Figura S6: Spettrometro della dispersione di energia

Figura S7: Adesione dello strato di alluminio e successivi tests,

Figura S8: Simulazione luce a pallone gonfio.

Figura S9: Analisi dei raggi di luce riflessi con punte di fibre ottiche piatte e coniche

Figura S10: Catetere modificato allo scopo di applicare la luce direttamente (non riflessa)

Figura S11: Dimostrazione dell'accesso vascolare nel cuore di maiale espantato.

Figura S12: Patches aderenti al tessuto endocardico

Tabella S1: Riflettività con vari tipi di rivestimento del pallone \pm pretrattamento al plasma

Tabella S2: Riflettività con vari tipi di rivestimento esterno

Tabella S3: Risultati diversi con fibre ottiche a punta piatta e conica

Tabella S4: Forze di pull-off *in vivo* per tessuto sottocutaneo addominale di ratto

Tabella S5: Forze di pull-off per tessuto porcino *ex vivo* (endocardio, parete addominale e stomaco).

Tabella S6: Forze di pull-off per endocardio ed epicardio.

Tabella S7: Burst pressures per eventualità 1 e 2 per varie situazioni di rapporto patch/difetto

Tabella S8: Forze di pull-off per differenti pre-carichi.

Filmato S1: Visione generale del funzionamento del device.

Filmato S2: Analisi della luce ultravioletta con fibra ottica a punta conica, in movimento all'interno del pallone

Filmato S3: Flussimetria al Doppler prima e dopo chiusura del difetto interventricolare.

Filmato S4: Rilascio del patch *in vitro* e *in vivo*.

Filmato S5: Stabilizzazione del patch *in vitro* and *in vivo*.

Filmato S6: Patch aderente *in vivo* a cuore battente.

Tutti i materiali supplementari ed in particolare i filmati sono visualizzabili online, utilizzando questo link:

www.sciencetranslationalmedicine.org/cgi/content/full/7/306/306ra149/

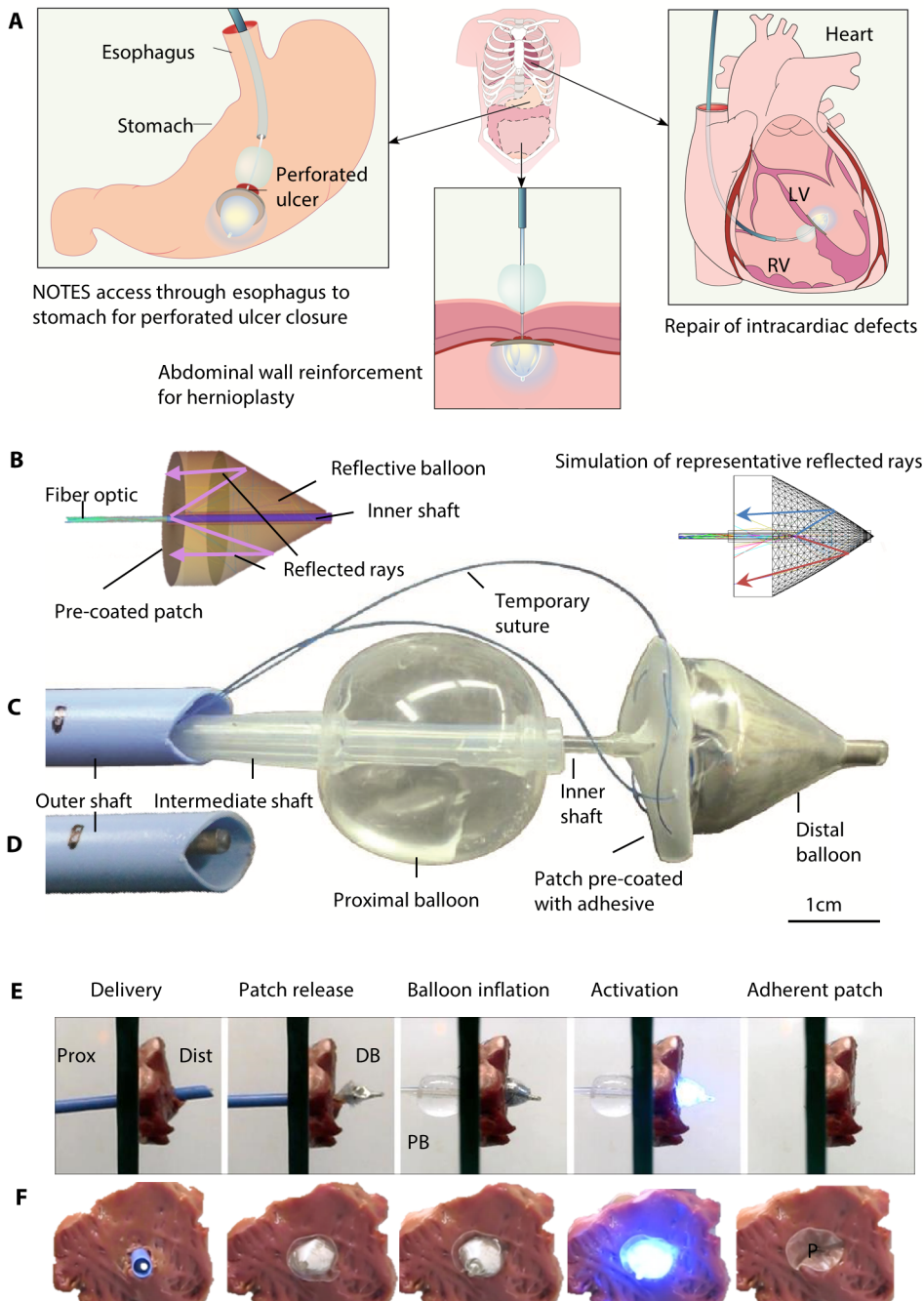


Figura 5. Una nuova tecnologia transcaterere che rilascia e attiva PGSA. (A) Rappresentazione grafica delle potenziali applicazioni per il device, incluso ulcere peptiche perforate, parete addominale e difetti intracardiaci. (B) Schema rappresentante i raggi di luce riflessi all'interno del pallone su un patch pre-rivestito con PGSA e una simulazione computerizzata del processo. (C) Componenti funzionali del device: pallone prossimale, catetere intermedio, pallone distale rivestito da un ulteriore strato di uretano utile all'aggancio del patch con suture rimovibili e patch con PGSA. (D) Catetere esterno caricato con le componenti del device, pronte per essere rilasciate (E ed F). Passaggi procedurali (visione laterale, (in E) e frontale (in F) simulati su campioni di tessuto: rilascio in cavità, rilascio del patch, gonfiaggio del pallone, attivazione del PGSA, e rimozione del device dopo attacco del patch.

Risultati

5.1. Una tecnologia transcaterere luce-riflettente per la chiusura atraumatica di difetti tissutali.

Il concetto fondamentale su cui è basato lo sviluppo di questo dispositivo e le potenziali applicazioni cliniche sono raffigurate in Figura 5.

In breve, il funzionamento di questo dispositivo transcaterere è basato sull'emanazione di raggi ultravioletti da parte di una fibra ottica interna verso una superficie riflettente, a sua volta adesa alla superficie esterna di un pallone. La luce ultravioletta una volta riflessa, attraversa un patch trasparente di PGSU posto alla base del pallone, attivando uno strato preapplicato di collante fotosensibile (PGSA) (Figura 5B) e determina quindi l'attacco del patch ad un tessuto biologico.

Le componenti funzionali del device includono: un pallone distale fissato ad un catetere interno e un pallone prossimale per la stabilizzazione del tessuto durante la procedura fissato su un catetere intermedio (Figura 5C).

La fibra ottica (connessa ad una sorgente di raggi UV ad un'estremità, e la cui altra estremità è stata disegnata per una ottimale dispersione della luce, è una componente mobile essenziale del dispositivo e può essere avanzata lungo il catetere più interno fino alla punta del pallone più distale.

La superficie basale del pallone distale presenta uno strato esterno che permette l'attacco temporaneo del patch, pre-trattato con il collante, mediante suture (Figura 5C). Le suture permettono patch di dispiegarsi simultaneamente al gonfiaggio del pallone distale e di essere rilasciato in situ con la loro rimozione. Tutte le componenti possono essere caricate all'interno di un catetere esterno di più grandi dimensioni (Figura 5D). Gli steps procedurali sono rappresentati in Figura 5E (visione laterale), 5F (visione frontale dal lato distale) e filmato S1 dei Materiali Supplementari.

In sintesi:

i) il catetere è inserito attraverso il difetto, ii) il patch è rilasciato mediante ritiro delle suture che lo tenevano connesso ad una membrana esterna al pallone distale, iii) I due palloni sono rilasciati (prima quello distale, poi il prossimale), iv) la luce UV è emessa per attivare il collante, preapplicato al patch, e v) entrambi i palloni sono completamente sgonfiati e rimossi dal corpo.

Durante l'ultimo step, il pallone distale (riflettente) è estratto attraverso il patch attaccato al tessuto. Il patch presenta nella regione centrale un meccanismo di valvola a quattro lembi, che riduce ulteriormente le dimensioni del foro residuo.

Ogni catetere del dispositivo può essere connesso ad un'impugnatura esterna ergonomica, che permette il meccanismo di coupling-decoupling dei cateteri connessi e permette il gonfiaggio e lo

sgonfiaggio dei palloni controllando volume e pressione dei liquidi usati (Figura. S1 to S5).

5.2. Sviluppo ed ottimizzazione della riflessione della luce ultravioletta

Un processo di rivestimento con materiali metallici, per palloni di uso medico basati su uretano, è stato sviluppato per riflettere la luce da una fibra ottica interna per l'attivazione di un agente foto-attivabile.

Allo scopo di ottenere una superficie riflettente ottimale, test di "riflettività" sono stati eseguiti su campioni di uretano rivestiti con vari metalli, poi trasferiti su lastre di vetro e montate all'interno di uno specifico setting di prova (Figura 6A), per permettere il confronto tra campioni. Uno specchio con una capacità di riflessione >99% è stato usato come controllo positivo. Il trattamento al plasma, che accresce l'adesione tra il rivestimento metallico e l'uretano di cui il pallone è composto, ha determinato un aumento della riflettività per il palladio e l'alluminio (Figura 6B, tabella S1). Per selezionare un rivestimento esterno protettivo, che avesse lo scopo di prevenire il contatto dell'alluminio con il sangue (per le applicazioni cardiovascolari), uretano, oro e parilene sono stati utilizzati per rivestire l'alluminio e i test sono stati così ripetuti.

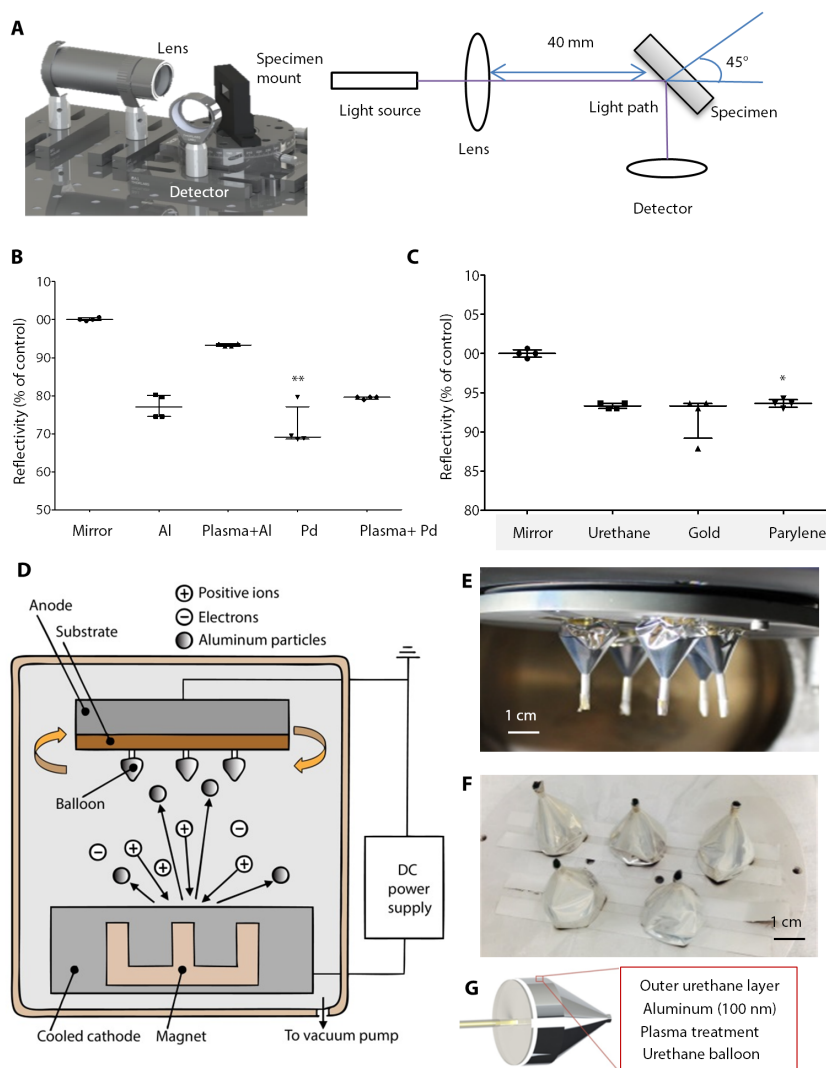


Figura 6. *Sviluppo e caratterizzazione di un pallone riflettente e flessibile.* (A) Foto e rappresentazione che mostrano un campione di uretano montato con un angolo di 45° ad una sorgente di luce, accanto ad una lente e un detector. (B) Riflettività (misura % di uno specchio in grado di riflettere il 99% di una luce UV) per campioni di uretano rivestiti di alluminio (Al) e palladio (Pd) con o senza pre-trattamento al plasma. I dati sono espressi in mediane e ranges interquartili (n=4) ** $p=0.0022$. (C). Riflettività per campioni di uretano rivestiti di alluminio e ricoperti da uno strato di parylene o oro dopo trattamento al plasma. I dati sono espressi in mediane e ranges interquartili (n=4). * $p=0.0197$ rispetto allo specchio. Per (B e C), p value è stato determinato con Kruskal-Wallis test e Dunn's multiple comparison post-hoc test. (D) Disegno schematico dello sputter coating: corrente DC è stata applicata all'Al catodo in argon plasma. Le particelle di alluminio si sono depositate quindi sull'anodo, ricoprendo il pallone. (E) I palloni in uretano sono montati su un supporto rotante nella sputter chamber durante il processo di deposizione dell'alluminio. (F) Palloni rivestiti. (G) Disegno schematico che mostra gli strati del pallone riflettente: uno strato protettivo esterno di uretano, 100 nm di alluminio e un pallone di uretano trattato al plasma.

Tutti i rivestimenti esterni sperimentati hanno dato simili risultati in termini di riflettività (Figura 6C, tabella S2).

Le particelle di alluminio sono state depostate sui palloni, in ambiente sottovuoto (4 mtorr) (Figura 6D), e in corrispondenza di un getto diretto.

La superficie piatta (futura sede del patch) dei palloni di uretano è stata mascherata e attaccata con nastro adesivo su un piatto rotante all'interno di una "sputter chamber" (Figura. 6E). La Figura 6F mostra il risultato di questa operazione, con i palloni rivestiti da uno strato di alluminio di 100 nm. La fase finale di questo processo è mostrata in Figura 6G. Un pallone di uretano, pretrattato con plasma è stato rivestito da uno strato di alluminio di 100 nm di spessore, mentre un secondo pallone, dello stesso materiale, è stato utilizzato come rivestimento esterno dello stesso con due finalità: la prima, impedire il contatto diretto dell'alluminio con il sangue/liquidi biologici e la seconda, per permettere l'ancoraggio temporaneo del patch a mezzo di suture.

Lo spessore del rivestimento a questo punto è maggiore ma non ha interferito in maniera significativa sulla sua capacità di riflessione. (Figura S6).

L'adesione del rivestimento è stata ulteriormente migliorata con il pretrattamento con parylene (Figura S7).

5.3. Ottimizzazione del profilo della fibra ottica per una più efficace dispersione della luce

Affinchè la luce ultravioletta si riflettesse in modo da ricoprire una superficie ampia, la fibra ottica interna è stata appositamente disegnata e “scolpita”.

Modificando la forma della punta della fibra ottica interna ed rivalutando il suo movimento lungo il catetere interno del dispositivo, è stato possibile ottenere una riflessione della luce su un’area più estesa, rispetto a quanto possibile con una fibra ottica dalla punta piatta.

Le simulazioni della direzione dei raggi UV sono state utilizzate per esaminare i risultati ottenuti con fibre a diversa conformazione della estremità distale (diritte e a punta conica di 20°), a diversa distanza dalla superficie piatta (base) del pallone (0, 10, e 18.5 mm), per una data geometria del pallone stesso una volta gonfiato (Figura. 7A, B; Figura. S8 and S9; filmato S2). La mappa di riflessione della luce ha dimostrato risultati migliori con la fibra ottica a punta conica che a punta piatta (non scolpita) (Figura. 7B). La più favorevole dispersione della luce è ulteriormente evidenziata in Figura. 7C e tabella S3, dove le mappe di riflettanza della luce ad ogni profondità di inserzione della fibra sono state comparate. La fibra a punta piatta si è dimostrata variabile in termini di efficienza, in quanto è sensibile alla posizione nella quale si trova lungo il catetere centrale. La fibra a punta conica,

invece, ha presentato migliore efficienza e minore variabilità in base alla posizione. (Figura S9).

Da questi risultati, pertanto, abbiamo optato per un disegno finale della fibra ottica a punta conica (Figura 7D), la quale consente la dispersione della luce sull'intera superficie del patch, di circa 20 mm di diametro, semplicemente muovendo la fibra ottica lungo il catetere centrale nel quale essa è inserita, nel contesto del pallone distale rivestito di alluminio. In base alla geometria del pallone e alle diverse applicazioni cliniche, la punta della fibra ottica può essere variamente scolpita, testata e può dunque adattarsi alle necessità specifiche del caso.

5.4. Valutazione in vivo ed ex vivo delle potenziali applicazioni cliniche

Le forze di adesione in vivo sono state testate utilizzando un patch di poly(glycerol sebacate urethane) (PGSU) ricoperto (su di un versante) da un collante idrofobico e attivabile con la luce ultravioletta (HLAA/PGSA). Il modello animale per primo utilizzato è stato il ratto (Sprague Dawley rats, 200-250 g), dal quale i campioni estratti sono stati di tessuto sottocutaneo addominale. Per questo modello è stato indispensabile ottenere e adattare un prototipo miniaturizzato del device.

I patches attaccati al tessuto utilizzando il device hanno dimostrato simili forze di adesione dei modelli in cui i patches sono stati attaccati con suture. Entrambi i gruppi hanno presentato incremento

dell'adesione dopo due settimane, probabilmente dovuto alla formazione di una capsula fibrosa intorno al patch in vivo (Figura 8A, tabella S4). Test di adesione su sezioni di cuore, parete addominale e stomaco di maiale, sono stati eseguiti inoltre utilizzando il device, nella sua originale conformazione, per attaccare un patch di PGSU con un pre-carico di 3 N. Le forze di adesione hanno presentato un range compreso tra 0.598-2.541 N (Figura 8B) Inoltre, volendo simulare ex vivo un difetto del setto interventricolare cardiaco, un patch è stato attaccato all'interno di cuori di maiale espantati e allo stesso modo all'interno del cuore di maiale sottoposto a presurrizzazione a livelli fisiologici (20 e 120 mmHg per il ventricolo destro e sinistro rispettivamente) sotto guida ecocardiografica. (Figura. 8C), utilizzando un set-up già precedentemente descritto (22).

La procedura di rinforzo della parete addominale è stata eseguita in un animale (maiale), già sacrificato per altri esperimenti, diversi da quello in oggetto, per valutare la relazione spaziale tra il device inserito e gli organi splancnici (Figura 8D), dimostrando che vi è spazio sufficiente per il corretto utilizzo del dispositivo.

La fattibilità della procedura e l'attacco del patch allo strato più interno della parete addominale è stata dimostrata con successo. Il patch di PGSU è stato disegnato come biodegradabile, per questa applicazione, può essere sostituito da un altro tipo di patch sintetico, purchè trasparente, o da rete protesica (23). Il catetere è stato inoltre valutato

come potenziale strumento per la chiusura endoscopica di difetti nel tessuto gastroenterico (Figura 8E). La procedura è stata svolta su stomaco di maiale, sia nell'animale sacrificato (nell'ambito di altra sperimentazione) che sul tavolo di laboratorio. Il catetere è stato inserito nello stomaco attraverso l'esofago e indirizzato verso il difetto artificialmente creato sulla parete anteriore dello stomaco. Dopo attivazione del collante, il patch è risultato fermamente incollato alla parete dello stomaco.

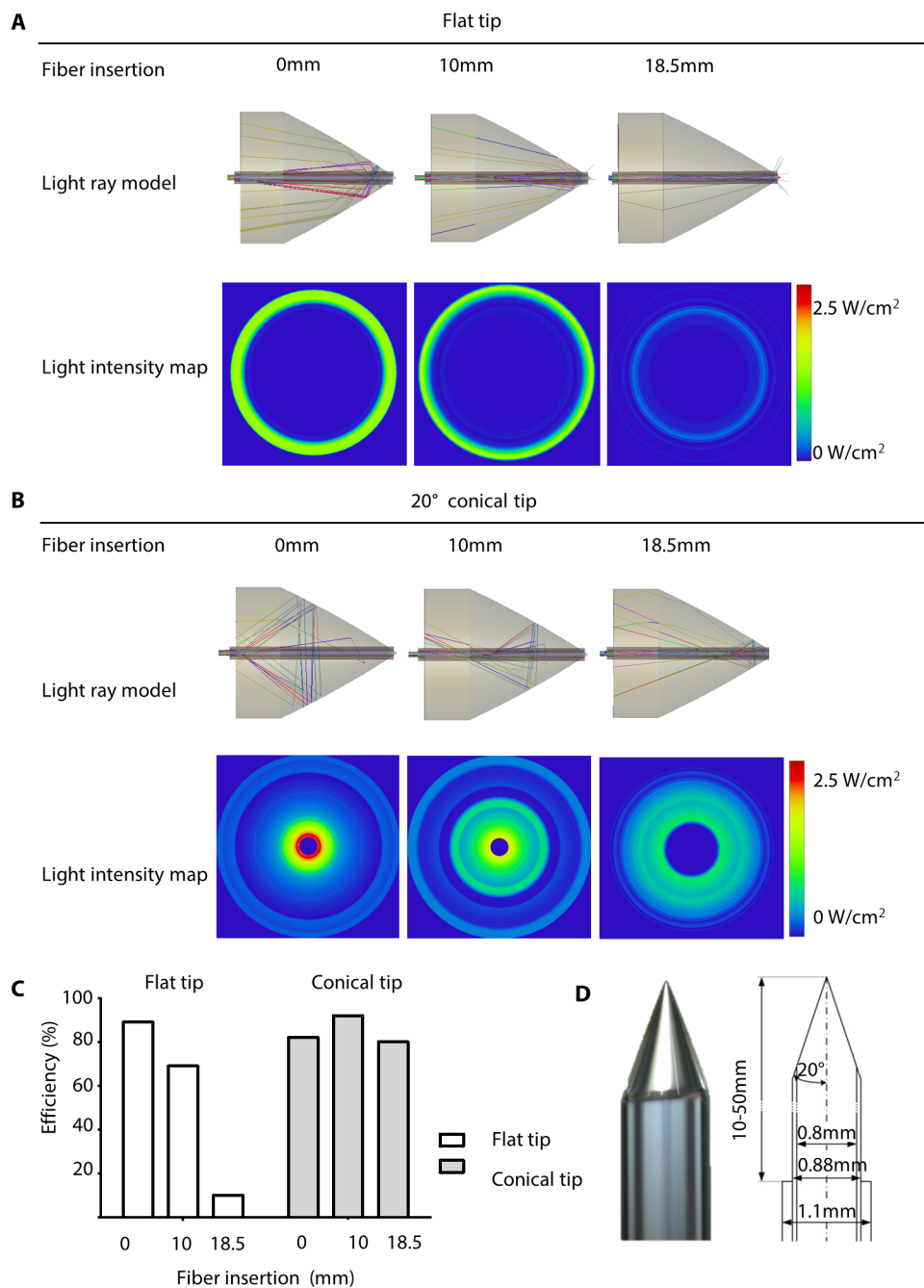


Figura 7. *Ottimizzazione delle caratteristiche della fibra ottica.*

(A e B) Modelli di raggi di luce e mappe di intensità sul patch/setto ottenuti con una fibra ottica a punta piatta (A) e conica (B) (20° half-angle) con una distanza di inserzione della fibra nel pallone di 0, 10, e 18.5 mm. Le immagini al di sopra di ogni pannello sono individuano un esempio di raggi random. Le simulazioni al di sotto di ogni pannello sono basate su 10^8 raggi per un potenziale di 1 W. L'efficienza è stata calcolata assumendo che all'interno della fibra fosse presente il 100% della luce emessa dalla sorgente subito prima che la luce fosse emanata nel catetere a diverse distanze (0, 10, e 18.5 mm). (C) Efficienza di una fibra a punta piatta e di una a punta conica. I dati presentati sono il risultato di simulazioni ($n=1$ per ogni punta) ad ogni distanza di misurazione. (D) fibra ottica a punta conica e relative dimensioni.

Allo scopo di sottoporre il sistema a pressione, una piccola quota di PGSA è stata poi distribuita e attivata con un device modificato (Figura S10) in corrispondenza della valvola centrale al patch (che nel vivente si suppone possa impedire il passaggio di liquido biologico residuo e successivamente chiudersi per formazione di tessuto autologo cicatriziale). Lo stomaco quindi è stato completamente riempito (>1 litro) dimostrando l'assenza di perdite e il mantenimento di un adeguato livello di adesione del patch alla parete dello stomaco (Figura 8E).

Infine, usando un device miniaturizzato (Figura 9A), un patch di PGSU (200 μm thick, 4 mm di diametro) è stato impiantato sulla parete addominale e sul cuore di un modello di animale di piccola taglia, ed entrambi hanno dimostrato un moderato livello di risposta infiammatoria a distanza di due settimane (Figura 9, B-D).

Il patch è stato inoltre testato secondo cicliche e tangenziali condizioni di carico dopo adesione al tessuto epicardico, ottenuto con il dispositivo (Figura 9, E-F).

Un carico compressivo è stato applicato ciclicamente. Il sistema patch/adesivo non ha modificato le sue proprietà biomeccaniche per un minimo di 100 cicli. Parallelamente, le forze tangenziali necessarie affinché il patch si staccasse dal tessuto sono risultate intorno ai 100 Pa e hanno dimostrato di essere sufficienti a mantenere il patch al setto in presenza di sangue circolante (21).

5.5. Perfezionamento dei parametri per applicazione intracardiaca

Lavori precedenti hanno dimostrato che il sistema HLAA/PGSU presenta sufficiente forza di adesione per mantenere un patch attaccato all'epicardio, setto e difetti vascolari in vivo ($0.5-2 \text{ N/cm}^2$, a seconda delle condizioni testate), e hanno presentato risultati iniziali incoraggianti per le applicazioni cardiache (21).

Nel nostro caso, abbiamo dimostrato che simili forze di adesione sono riscontrabili su tessuto endocardico espianato quando il patch è attaccato anche mediante utilizzo del device. ($0.7-4.8 \text{ N/cm}^2$) (Figura 10A, tabella S6).

Gli effetti di due fattori – il rapporto tra le dimensioni del patch e quelle del difetto, e la presenza di un gradiente pressorio ai due lati sono stati testati mediante apposito set-up in vitro.

Un difetto di circa 5 mm di diametro è stato creato su un pezzo di tessuto ricavato da cuore di maiale, chiuso con PGSU/HLAA attivato mediante applicazione di luce ultravioletta e poi fissato ad una camera, capace di imprimere pressione e misurare capacità (Figura 10B).

Due eventualità sono state esplorate: nel primo caso, la pressione era più elevata nella camera, simulando la situazione nella quale il patch era adeso sul versante destro (fisiologicamente a più bassa pressione) del setto interventricolare cardiaco; nel secondo caso, la pressione era più alta fuori dalla camera, simulando l'attacco del patch sul versante sinistro del setto interventricolare. (fisiologicamente a più alta

pressione). Inoltre tre diversi rapporti patch-to-defect sono stati considerati (2.3, 1.75 and 1.4). Il livello più alto di burst pressure è stato ottenuto nelle'eventualità di patch posizionato sul versante sinistro (caso 2) con il rapporto patch-to-defect più elevato (Figura 10B, Tabella S7).

Il device si è dimostrato, pur essendo composto da un sistema a catateri multipli, flessibile tanto da poter essere in futuro utilizzato sia per approcci transatriali che transvascolari (Figura. S11).

Le forze applicate mediante retrazione manuale (da parte del chirurgo) del device sono state misurate essere pressappoco pari a 2.5 N usando un tester biomeccanico.

La forza di pull-off sul patch dopo applicaizone del device è stata valuvata usando diversi precarichi (1, 3, and 5 N) , mantenendo costanti livello e tempi di attivazione necessari a mantenere il patch adeso ex vivo al tessuto porcino (Figura S12).

Questo test ha dimostrato che il precarico non ha influito significativamente sulle capacità di adesione al tessuto. Dopo attivaizone col device (Figura 10C, Tabella S8).

5.6. Riduzione delle dimensioni di difetti interventricolari in vivo

La funzionalità del device (rilascio comandato delle singole componenti, stabilizzazione dle patch, attivazione della luce UV e del collante,

adesione del patch e rimozione del dispositivo) sono state dimostrate nel modello animale (maiale) in vivo.

Un difetto interventricolare è stato creato dirigendo il catetere esterno del dispositivo (e quindi l'intero sistema in esso incluso) attraverso il setto interventricolare nel ventricolo sinistro.(Figura 11 A-B) e la procedura eseguita sotto guida ecocardiografica a cuore battente (Figura 11C-G). Non si sono registrate complicanze perioperatorie quali sanguinamenti eccessivi o aritmie in tutti e tre gli animali utilizzati.

Il patch in PGSU si è dimostrato attaccato al setto in tutti e tre gli esperimenti, come confermato all'esame ecocardiografico (Figura 11, F e G; Filmati S3-S6) e alla valutazione post-mortem (Figura 11H). Non è stato possibile eseguire tests di pull-off sui campioni in vivo.

In un caso, il difetto interventricolare è stato creato in due tempi (un catetere inserito nel ventricolo sinistro, estratto e nuovo inserimento di altro dispositivo).

In questo caso, è stato possibile evidenziare una riduzione del diametro del difetto e del jet di flusso attraverso lo stesso da 5.5. mm (Figura 11E) a 1.4 mm (Figura 11F; Filmato S3). Una riduzione del difetto al di sotto di ≤ 1.6 mm dopo chirurgia a cuore aperto è considerata adeguata per l'essere umano, dal momento che è riportato che difetti inferiori a 2 mm si chiudono spontaneamente entro un anno (24).

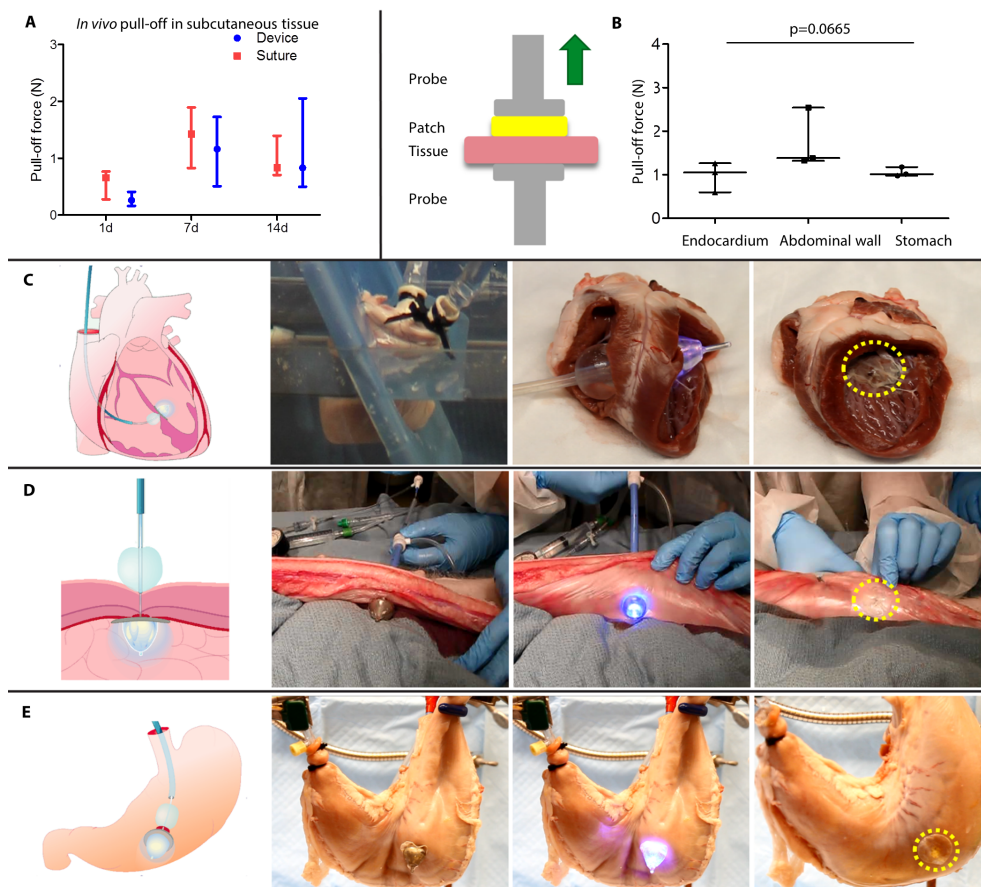


Figura 8. Dimostrazione delle potenziali applicazioni ex vivo usando organi e tessuti porcino. (A) Forze di pull-off su un patch attaccato grazie a PGSA/HLAA o suture sull'addome a diversi timepoints. I dati sono espressi in mediane e ranges interquartili ($n=5$). $P=0.6029$ tra device e suture; $p=0.0077$ per effetto del tempo; two-way ANOVA. (B) Disegno schematico dei tests di pull-off su un tester meccanico e forze di adesione misurate per ogni tipo di tessuto in esame. I dati sono rappresentati da uno scatterplot con mediane e range ($n=3$). p value è stato determinato da un Kruskal-Wallis analysis con Dunn's multiple comparison test. (C) Proof of concept di chiusura del difetto interventricolare. Da sinistra: schema del device che attacca un patch di PGSU al setto interventricolare di cuore di maiale; water tank per ottenere la pressurizzazione artificiale del cuore; il device attiva il PGSA ex vivo e il patch aderisce al setto dopo rimozione del patch. (D) Proof-of-concept del device sulla parete addominale di maiale (ex vivo). Da sinistra: schema del device che fissa un patch sulla superficie interna della parete addominale, rilascio e attivazione della luce, fino a rimozione del dispositivo attraverso il patch e il patch in sede ben adeso. (E) Proof-of-concept di un accesso NOTES per ulcera peptica perforata. Da sinistra: accesso gastroscopico, il dispositivo attraversa il sito ulcerato e viene attivato, attaccando il patch alla superficie esterna dello stomaco. Una quota aggiuntiva di collante è stato poi adeso al punto centrale del patch per poter riempire l'organo e testare l'adesione del patch in condizioni sovralfisiologiche, senza evidenza di leaks.

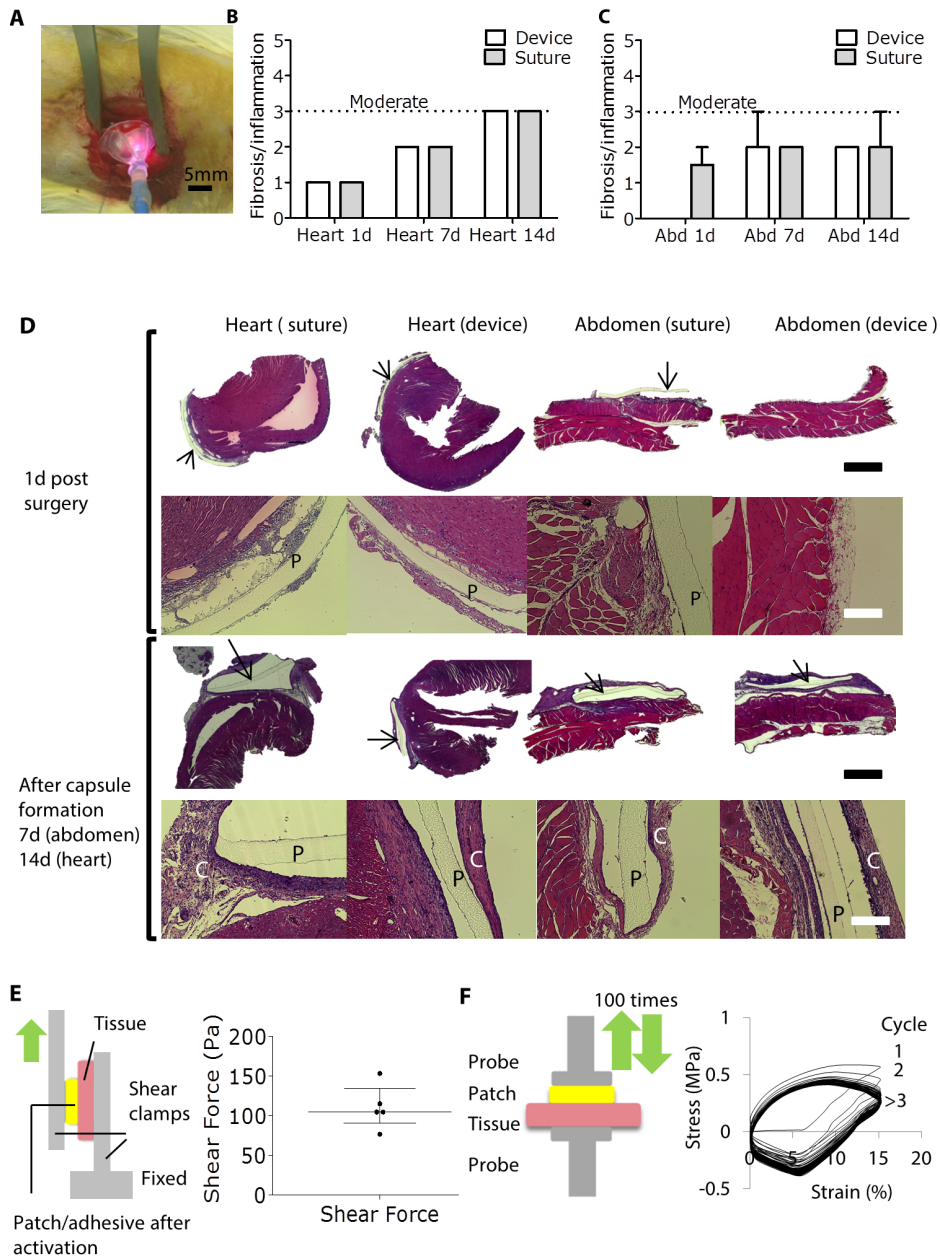


Figura 9. *Risposta infiammatoria nel modello roditore e forze applicate ciclicamente e tangenziali.* (A) Attacco del patch alla parete esterna del cuore di ratto usando un dispositivo modificato e miniaturizzato. (B e C) Livello di fibrosi/infiammazione in campioni di cuore di ratto e addome (abd) dopo applicazione di patches con il device o con suture. I dati sono espressi in medie e range (n = 2 per gruppo ad ogni timepoint). (D) Immagini rappresentative dei reperti istologici., 1 giorno dopo chirurgia per cuore e addome e ad una settimana per addome e due settimane per il cuore. I patch di PGSU sono segnalati con la lettera “P” mentre la capsula fibrosa con lettera “C”. black scale bar, 1 mm; white scale bar, 125 μ m. In un caso il patch è venuto via durante il processo di preparazione del campione. (E) Shear test set-up sulla sinistra. I dati sono rappresentati in uno scatterplot con mediane e ranges interquartili (n = 5). (F) Test set-up e risultati per test di forza ciclic sul sistematch/adhesive with tissue (100 cicli compressivi).

6. Discussione

Abbiamo sviluppato una tecnologia in grado di chiudere, in maniera atraumatica e mini –invasiva, difetti in tessuti biologici mediante l’emanazione e la riflessione appropriata di luce ultravioletta, indispensabile per attivazione di un collante fotosensibile, completamente biologico e biodegradabile.

Questo dispositivo, basato sull’utilizzo di cateteri di varie dimensioni può ottenere l’adesione di un patch al tessuto mediante la trasmissione, riflessione e dispersione di luce ultravioletta, senza utilizzare sistemi meccanici di ancoraggio e senza lasciare materiali estranei all’interno dell’organismo.

Il dispositivo è stato disegnato per permettere accesso minivasivo al sito da curare, di dispiegare appropriatamente un patch, anche in situazioni anatomiche difficili, quali il setto interventricolare del cuore.

La presenza di un pallone prossimale ha lo scopo di ottenere una più corretta stabilizzazione del tessuto da trattare e di applicare un adeguato quantitativo di precarico, fondamentale per ottenere l’attivazione omogenea ed efficace della colla.

L’intera procedura può essere eseguita per via ecocardiografica (in 2D e 3D) o endoscopica.

Sebbene dispositivi per la chiusura di difetti nei tessuti corporei siano stati già precedentemente proposti (25–27), molti di essi sono prevalentemente basati sul rilascio di componenti metalliche o suture

per la chiusura dei difetti, che possono erodere il tessuto a lungo andare (7).

Con il nostro dispositivo, un adesivo elastico e biodegradabile può garantire la fissazione di un patch delle stesse caratteristiche al tessuto

.
Il dispositivo resta all'interno dell'organismo per meno di cinque minuti e non si sono presentate complicanze collegate al device.

Noi prevediamo un grande vantaggio derivante dall'utilizzo del nostro dispositivo: un device che rilascia e determina l'adesione di un patch elastico e biodegradabile al setto interventricolare cardiaco è auspicabile perché la fissazione del patch al setto non si basa sull'ancoraggio meccanico del sistema occludente.

L'attacco del patch sul versante sinistro del setto interventricolare è favorevole anche in relazione ai gradienti pressori.

Una volta fissato al setto, un patch elastico previene l'erosione del tessuto e il danno al tessuto elettrico di conduzione.

Altri dispositivi biodegradabili sono stati sviluppati nel corso degli ultimi anni (28-29), ma essi si basano comunque su sistemi di ancoraggio meccanici, che eventualmente possono erodere il tessuto e causare perforazioni di organi (30). Un patch biodegradabile per chiudere difetti intracardiaci è stato testato in pazienti umani (31-32). Iniziali prototipi si basavano sul principio di endotelizzazione precoce per un periodo di circa 48 ore, durante le quali il pallone rimaneva insufflato in sede.

Più recentemente, un device per il rilascio di patch/occluder biodegradabile è stato descritto, ma senza l'utilizzo di un adesivo; sebbene promettente, problematiche di adesione e quindi di dislocamento del dispositivo sono state osservate (33-34).

Incoraggianti risultati sono stati riportati quando un device è stato utilizzato in associazione ad un adesivo attivabile mediante variazioni di pH, la cui limitazione principale risiede nel fatto che il tempo medio per una corretta attivazione era di circa 45 minuti e un monitoraggio angiografico (35).

Al contrario, noi abbiamo dimostrato di richiedere un tempo massimo di due minuti per attivazione del collante, senza uso di angiografia e utilizzando l'ecocardiografia come unico strumento di monitoraggio intraoperatorio.

Per la riparazione di ernie della parete addominale, l'area indebolita della parete muscolare può essere riparata usualmente mediante chirurgia. In ogni caso la chirurgia è limitata ad aree di erniazione di piccola dimensione circondate da tessuto sostanzialmente sano. In alternativa mesh sintetiche sono attaccate lungo tutta l'area di erniazione (11).

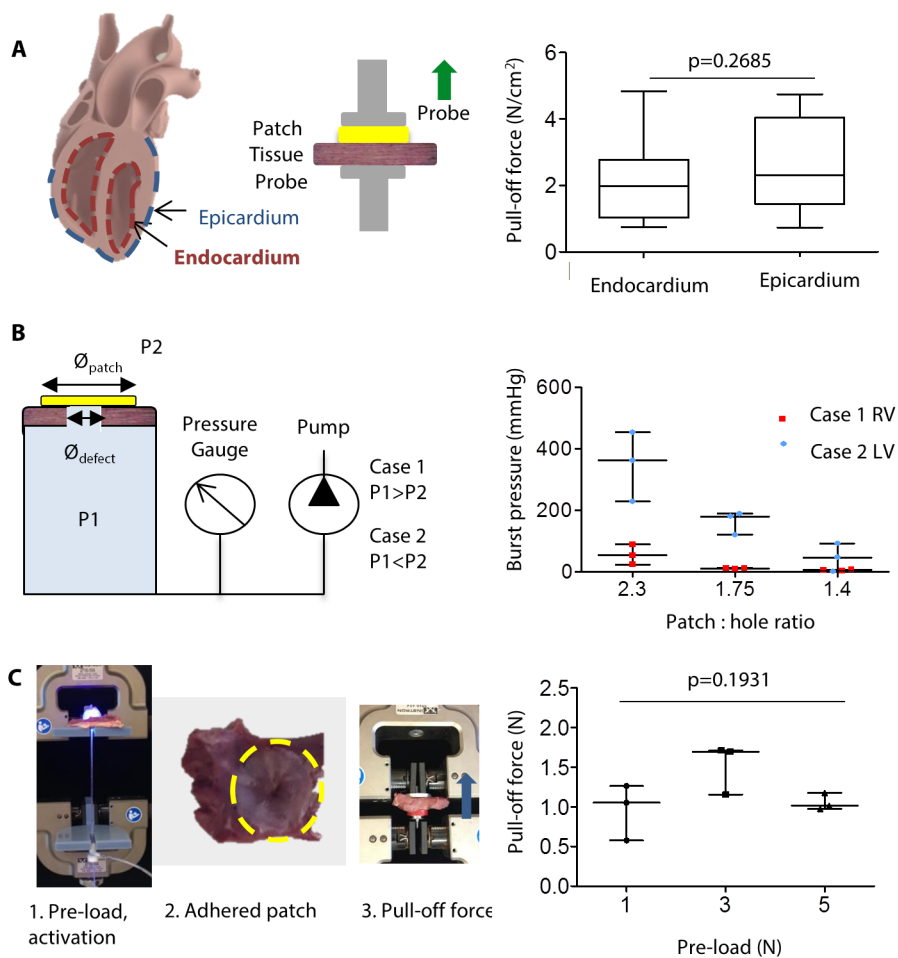


Figura 10. *Caratterizzazione del dispositivo per applicazioni cardiache.*

(A) Schema che mostra la superficie di tessuto endocardico ed epicardico del cuore e apparato usato per eseguire i tests di pull-off con un tester meccanico, accanto ai risultati sui due tipi di superficie. I dati sono in box e plots con mediane e quartili, massimo e minimo valore. P value è stato determinato usando Mann-Whitney test a due code ($n=17$ campioni tessuto/patch). (B) Set-up per burst pressure testing che mostra una camera pressurizzata (P1) ed una pressione esterna P2. R è il rapporto tra la misura del patch e il diametro del difetto. I dati sono rappresentati in uno scatter plot con mediana e quartili ($n=3-6$ campioni di tessuto). (C) Set up per testare vari precarichi. I dati sono rappresentati in scatter plot con mediana e range interquartili ($n=3$ campioni di tessuto). P value è stato determinato usando Kruskal Wallis test con Dunn's multiple comparison post-hoc test.

L'ernioplastica endoscopica richiede l'applicazione di un patch sintetico sul versante interno della parete addominale, tenuto in sede da componenti metalliche (13). Questa procedura deve essere eseguita mediante piccole incisioni, quindi in maniera mini-invasiva, che permettono anche un più rapido recupero del paziente nel periodo postoperatorio, ma sono associate ad un rischio maggiore di infezioni e recidiva di erniazione.

L'utilizzo del nostro device per riparare ernia addominali con un patch e un collante entrambi biodegradabili possono implementare i vantaggi della chirurgia laparoscopia, come dimostrato nel nostro modello porcino.

La perforazione gastrica è correlata ad un tasso di mortalità pari a 30% ad un anno, presentando inoltre eventi avversi dopo chirurgia che possono ulteriormente contribuire ad incrementare questo dato.

Opzioni chirurgiche includono plastica del piloro e resezioni gastro-digiunali/gastro duodenali estese e loro ricostruzione.

Il ruolo delle procedure, esse siano elettive ed emergenti, endoscopiche per il trattamento delle ulcere peptiche è controverso, prevalentemente dovuto alla mancanza di un dispositivo che sia in grado di chiudere le zone ulcerate. Una procedura mininvasiva volta a chiudere le ulcere è desiderabile, ma la mancanza di metodi efficaci per la chiusura dei difetti resta una limitazione significativa all'adozione di queste metodiche. La nostra preliminare dimostrazione di chiusura di difetti

nello stomaco di maiale mette luce su un approccio che può risolvere questo problema.

Sebbene questo studio dimostra il *proof of concept* del nostro dispositivo, basato sull'utilizzo di materiali biocompatibili e biodegradabili, riscontriamo in esso la presenza di alcuni limiti, che necessitano di essere superati affinché esso possa essere definitivamente traslato in ambito clinico.

Innanzitutto, il modello sperimentale in vivo per le applicazioni cardiache, nel nostro caso prevede che il difetto sia creato artificialmente e poi richiuso usando un approccio perventricolar, ma per le future applicazioni in clinica sarà necessario adattare il sistema ad un approccio transatriale o ancor più impegnativo, transvascolare.

In secondo luogo, il nostro device prevede che esso venga rimosso passando attraverso il patch, lasciando un residuo difetto di piccole dimensioni. Questo piccolo difetto residuo può essere accettabile per una serie di applicazioni cliniche (difetti intracardiaci), ma non necessariamente lo è per altre (ulcere, perforazioni gastrointestinali).

Ulteriori studi in vivo sono indispensabili per la migliore comprensione del funzionamento del dispositivo a distanza.

Dopo aver dimostrato la fattibilità della procedura mediante approccio miniminvasivo, futuri lavori dovranno concentrarsi nella creazione di un meccanismo ancor più flessibile, forse basato sull'utilizzo di un sistema a multiple fibre ottiche, nell'includere un'ulteriore canale per il passaggio

di un filo guida, sul quale fare scivolare il sistema per le applicaizoni cliniche.

Il rimanente orifizio nella porzione centrale del patch può essere chiuso mediante ulteriori strumenti incorporati nel device, che siano in grado di applicare ed attivare ulteriore colla dopo la rimozione del dispositivo.

Lavoro aggiuntivo dovrà essere svolto nel incrementare l'elasticità del patch e nel disegno di un sistema a valvolare come dimostrato ad esempio in Permaseal™ apical closure device (Micro Interventional Device, Inc.).

Il nostro device può essere modificato in base alla dimensione, geometria del pallone e del patch, a loro volta determinati sulla base dell'applicazione clinica.

Future applicazioni cliniche includono la chiusura di altri difetti cardiaci (interatriali, difetti iatrogeni post procedure, come nel caso degli accessi transapicali, attualmente molto utilizzati nella chirurgia "sostitutiva" di valvole aortiche e nel trattamento ricostruttivo delle valvole mitrali).

Accanto alle perforazioni gastriche, anche altre applicazioni in ambito gastrointestinale possono includere perforazioni del duodeno, digiuno e intestino tenue.

In conclusione, noi presentiamo un dispositivo transcateretere, che è in grado di chiudere difetti nei tessuti biologici, mediante il rilascio e l'attivazione di materiali elastici e biodegradabili.

Il dispositivo ha il potenziale di ridurre l'invasività delle procedure chirurgiche, i tempi operatori e di conseguenza migliorare i risultati delle procedure riducendo gli eventi avversi.

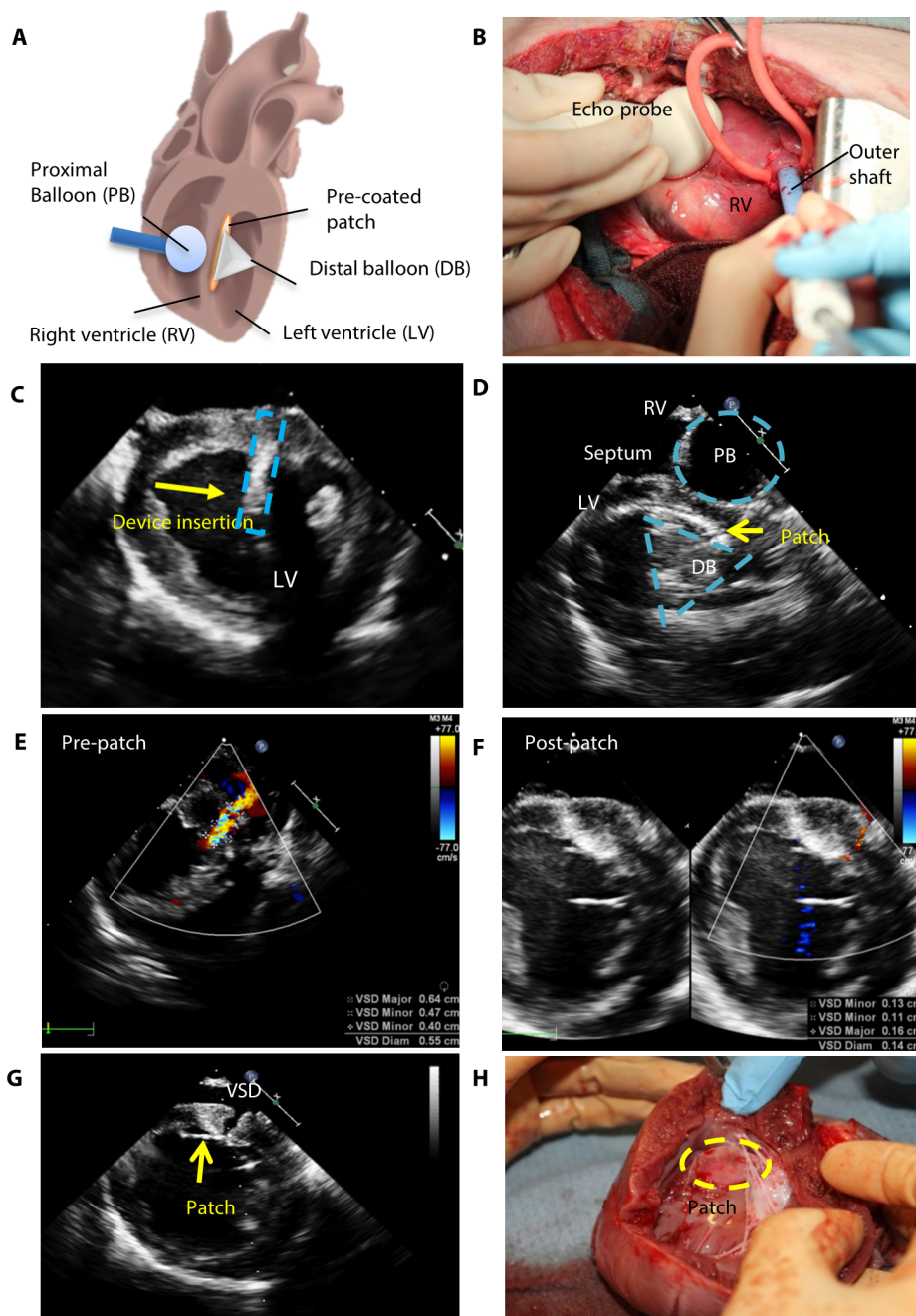


Figura 11. *In vivo proof of concept del device.* (A) Schema di funzionamento del device. (B) Accesso toracotomico laterale per procedura in vivo, posizione della sonda ecocardiografica e accesso attraverso la parete libera del ventricolo destro attraverso borse di tabacco. (C) Ecocardiogramma che mostra il device inserito nel ventricolo sinistro. (D) Ecocardiogramma che mostra i due palloni gonfi ai due lati del setto interventricolare. (E) Dimensioni e flusso attraverso il difetto del setto interventricolare prima e dopo /F) l'applicazione del patch. (G) Patch attaccato al setto interventricolare, sul versante sinistro in ecocardiografia 2D. (H) valutazione del patch attaccato al setto interventricolare dopo espianto del cuore.

Notizie Aggiuntive:

I risultati di questi anni di sperimentazione sono stati recentemente pubblicati su Science Translational Medicine ed inoltre scelti dall'editore come copertina di rivista:

1. Blood-Resistant Surgical Glue for Minimally Invasive Repair of Vessels and Heart Defects. N. Lang, M. J. Pereira, Y. Lee, I. Friehs, N. V. Vasilyev, E. N. Feins, K. Ablasser, E. D. O'Carbhaill, C. Xu, **A. Fabozzo**, R. Padera, S. Wasserman, F. Freudenthal, L. S. Ferreira, R. Langer, J. M. Karp, P. J. d. Nido, A Sci. Transl. Med. 6, 218ra6 (2014).
2. A light-reflecting balloon catheter for atraumatic tissue defect repair. Ellen T Roche†, **Assunta Fabozzo†**, Y. Lee§, P. Polygerinos§, I. Friehs§ L. Schuster, A. Casar Berzaluce, A Bueno, N. Lang, M. J.N.Pereira, E. Feins, S. Wassermann, E. D. O'Carbhaill, N. V. Vasilyev, D. J. Mooney, J. M. Karp, P. J. del Nido*, C. J. Walsh* (**first joint co-author**, Sci. Transl. Medicine; 23 Sep 2015: Vol. 7, Issue 306, pp. 306ra149).
3. Patent file number WO 2015175662A1. Title. *Catheter device for transmitting and reflecting light*. Inventori:Conor Walsh, Ellen Roche, Panagiotis Polygerinos, Lucia Schuster, Jeffrey Karp, Yuhan Lee, Nido Pedro Del, Fabozzo Assunta, Ingeborg Friehs, Steven Wasserman.

7. Bibliografia

1. Van der Linde, D., *et al.* Birth prevalence of congenital heart disease worldwide: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* **58**, 2241-2247 (2011).
2. J. I. E. Hoffman, S. Kaplan, The incidence of congenital heart disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 39,1890–1900 (2002).
3. Gibbon J.H.: Application of a mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery. *Minn Med* 1954; 37:171-185.
4. J. W. Newburger, R. A. Jonas, G. Wernovsky, D. Wypij, P. R. Hickey, K. C. Kuban, D. M. Farrell, G. L. Holmes, S. L. Helmers, J. Constantinou, *A comparison of the perioperative neurologic effects of hypothermic circulatory arrest versus low-flow cardiopulmonary bypass in infant heart surgery.* (1993; <http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJM199310073291501>).
5. D. C. Bellinger, R. a Jonas, L. a Rappaport, D. Wypij, G. Wernovsky, K. C. Kuban, P. D. Barnes, G. L. Holmes, P. R. Hickey, R. D. Strand, Developmental and neurologic status of children after heart surgery with hypothermic circulatory arrest or low-flow cardiopulmonary bypass., *N. Engl. J. Med.* **332**, 549–55 (1995).
6. Predescu, D., *et al.* Complete heart block associated with device closure of perimembranous ventricular septal defects. *J Thorac Cardiovasc Surg* **136**, 1223-1228 (2008).
7. G. B. Crawford, R. G. Brindis, M. W. Krucoff, B. P. Mansalis, J. D. Carroll, Percutaneous atrial septal occluder devices and cardiac erosion: A review of the literature. *Catheter. Cardiovasc. Interv.* 80, 157–167 (2012).
8. U. Krumsdorf, S. Ostermayer, K. Billinger, T. Trepels, E. Zadan, K. Horvath, H. Sievert, Incidence and clinical course of thrombus formation on atrial septal defect and patient foramen ovale closure devices in 1,000 consecutive patients. *J. Am. Coll. Cardiol.* 43, 302–309 (2004).
9. R. Shalaby, M. Ismail, A. Samaha, A. Yehya, R. Ibrahim, S. Gouda, A. Helal, O. Alsamahy, Laparoscopic inguinal hernia

- repair; experience with 874 children. *J. Pediatr. Surg.* 49, 460–464 (2014).
10. L. Neumayer, A. Giobbie-Hurder, O. Jonasson, R. Fitzgibbons, D. Dunlop, J. Gibbs, D. Reda, W. Henderson, Open mesh versus laparoscopic mesh repair of inguinal hernia. *N. Engl. J. Med.* 350, 1819–1827 (2004).
 11. J. P. Fischer, J. D. Wink, J. A. Nelson, S. J. Kovach III, Among 1,706 cases of abdominal wall reconstruction, what factors influence the occurrence of major operative complications? *Surgery* 155, 311–319 (2014).
 12. S. C. Azoury, A. P. Dhanasopon, X. Hui, C. De La Cruz, S. H. Tuffaha, J. M. Sacks, K. Hirose, T. H. Magnuson, C. Liao, M. Lovins, M. A. Schweitzer, H. T. Nguyen, A single institutional comparison of endoscopic and open abdominal component separation. *Surg. Endosc.* 28, 3349–3358 (2014).
 13. K. A. LeBlanc, Tack hernia: A new entity. *JLS* 7, 383–387 (2003).
 14. M. H. Møller, S. Adamsen, M. Wøjdemann, A. M. Møller, Perforated peptic ulcer: How to improve outcome? *Scand. J. Gastroenterol.* 44, 15–22 (2009).
 15. Bhamidipati CM, Coselli JS, LeMaire SA. Bioglue in 2011: what is its role in cardiac surgery? *J. Extra Corpor Technol.* 2012 Mar, 44 (1). 6-12.
 16. Artzi, N., Shazly, T., Baker, A., Bon, A. & Edelman, E. Aldehyde-amine chemistry enables modulated biosealants with tissue-specific adhesion. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)* **21**, 3399-3403 (2009).
 17. Shao, H. & Stewart, R.J. Biomimetic Underwater Adhesives with Environmentally Triggered Setting Mechanisms. *Advanced Materials* **22**, 729+ (2010).
 18. Stewart, R.J. Protein-based underwater adhesives and the prospects for their biotechnological production. *Applied Microbiology and Biotechnology* **89**, 27-33 (2011).

19. Federle, W., Riehle, M., Curtis, A.S.G. & Full, R.J. An integrative study of insect adhesion: Mechanics and wet adhesion of pretarsal pads in ants. *Integrative and Comparative Biology* **42**, 1100-1106 (2002).
20. Nijst, C., *et al.* Synthesis and characterization of photocurable elastomers from poly(glycerol-co-sebacate). *Biomacromolecules* **8**, 3067-3073 (2007)
21. N. Lang, M. J. Pereira, Y. Lee, I. Friehs, N. V. Vasilyev, E. N. Feins, K. Ablasser, E. D. O’Cearbhaill, C. Xu, A. Fabozzo, R. Padera, S. Wasserman, F. Freudenthal, L. S. Ferreira, R. Langer, J. M. Karp, P. J. del Nido, A blood-resistant surgical glue for minimally invasive repair of vessels and heart defects. *Sci. Transl. Med.* **6**, 218ra6 (2014).
22. H. Yamauchi, E. N. Feins, N. V. Vasilyev, S. Shimada, D. Zurakowski, P. J. del Nido, Creation of nonischemic functional mitral regurgitation by annular dilatation and nonplanar modification in a chronic in vivo swine model. *Circulation* **128**, S263–S270 (2013).
23. Pereira, M.J., *et al.* A Highly Tunable Biocompatible and Multifunctional Biodegradable Elastomer. *Adv Mater* (2012)
24. A. Dodge-Khatami, W. Knirsch, M. Tomaske, R. Prêtre, D. Bettex, V. Rousson, U. Bauersfeld, Spontaneous closure of small residual ventricular septal defects after surgical repair. *Ann. Thorac. Surg.* **83**, 902–905 (2007).
25. D. Balzer, Current Status of Percutaneous Closure of Ventricular Septal Defects, *Pediatr. Ther.* **02** (2012), doi:10.4172/2161-0665.1000112.
26. I. Michel-Behnke, P. Ewert, A. Koch, H. Bertram, M. Emmel, G. Fischer, R. Gitter, R. Kozlik-Feldman, R. Motz, E. Kitzmüller, O. Kretschmar, Device closure of ventricular septal defects by hybrid procedures: a multicenter retrospective study., *Catheter. Cardiovasc. Interv.* **77**, 242–51 (2011).
27. P. Chungsomprasong, K. Durongpisitkul, C. Vijarnsorn, J. Soongswang, T. P. Lê, The results of transcatheter closure of

- VSD using Amplatzer® device and Nit Occlud® Lê coil., *Catheter. Cardiovasc. Interv.* **78**, 1032–40 (2011).
28. G. Morgan, K.-J. Lee, R. Chaturvedi, L. Benson, A biodegradable device (BioSTAR) for atrial septal defect closure in children., *Catheter. Cardiovasc. Interv.* **76**, 241–5 (2010).
29. Y. Zhu, X. Huang, J. Cao, J. Hu, Y. Bai, H. Jiang, Z. Li, Y. Chen, W. Wang, Y. Qin, X. Zhao, Animal experimental study of the fully biodegradable atrial septal defect (ASD) occluder., *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, 735989 (2012).
30. E. Ivens, C. Hamilton-Craig, C. Aroney, A. Clarke, H. Jalali, D. J. Burstow, Early and late cardiac perforation by Amplatzer atrial septal defect and patent foramen ovale devices., *J. Am. Soc. Echocardiogr.* **22**, 1067–70 (2009).
31. E. B. Sideris, B. Macuil, V. Varvarenko, S. Toumanides, Transcatheter patch occlusion of perimembranous ventricular septal defects., *Am. J. Cardiol.* **95**, 1518–21 (2005).
32. B. Sideris, E. Sideris, M. Calachanis, V. Papantoniou, S. Mouloupoulos, The immediate release patch in the correction of experimental atrial septal defects., *Catheter. Cardiovasc. Interv.* **76**, 572–7 (2010).
33. E. M. Rad, P. N. Davari, H. Mortezaeian, Embolization of Immediate Release Transcatheter Patch for Atrial Septal Defect Occlusion: The Causes and the Pitfalls to Avoid, *J. Invasive Cardiol.* **24** (2012).
34. S. Toumanides, E. B. Sideris, T. Agricola, S. Mouloupoulos, Transcatheter patch occlusion of the left atrial appendage using surgical adhesives in high-risk patients with atrial fibrillation., *J. Am. Coll. Cardiol.* **58**, 2236–40 (2011).
35. A. M. Kaiser, N. Katkhouda, Laparoscopic management of the perforated viscus., *Semin. Laparosc. Surg.* **9**, 46–53 (2002).
36. D. Rattner, A. Kalloo, ASGE/SAGES Working Group on Natural Orifice Transluminal Endoscopic Surgery, *Surg. Endosc.* **20**, 329–333 (2006).

37. B. a Goff, J. Blake, M. P. Bamberg, T. Hasan, Treatment of ovarian cancer with photodynamic therapy and immunoconjugates in a murine ovarian cancer model., *Br. J. Cancer* **74**, 1194–8 (1996).
38. J. J. McCaughan, Photodynamic therapy: a review, *Drugs Aging* **15**, 49–68 (1999).
39. P. R. Arany, a. Cho, T. D. Hunt, G. Sidhu, K. Shin, E. Hahm, G. X. Huang, J. Weaver, a. C.-H. Chen, B. L. Padwa, M. R. Hamblin, M. H. Barcellos-Hoff, a. B. Kulkarni, D. J. Mooney, Photoactivation of Endogenous Latent Transforming Growth Factor-1 Directs Dental Stem Cell Differentiation for Regeneration, *Sci. Transl. Med.* **6**, 238ra69–238ra69 (2014).
40. M.R. Cutkosky, R. D. Howe, in *Dexterous Robot Hands*, S. Venkataraman, T. Iberall, Eds. Springer-Verlag, 5–31 (1990).

Ringraziamenti

Per la realizzazione di questo progetto, è stato necessario creare e coordinare un gruppo di lavoro numeroso e vario per esperienze e attitudini. Ritengo doveroso pertanto ringraziare le persone che mi hanno permesso di poterne fare parte, in particolare il dott. Del Nido, direttore della Cardiochirurgia Pediatrica del Children's Hospital di Boston, MA, USA.

Ringrazio Ellen, mia fidatissima e geniale amica, collega e coautrice: per tutte le ore trascorse in laboratorio e in sala operatoria; per l'interesse all'aspetto clinico dello studio e per la grande umanità; per l'amicizia e per la reciproca stima.

Ringrazio il prof. Gargiulo, che ha dato l'opportunità di coltivare il mio progetto anche in Italia e ne ha sostenuta la causa; per avermi dato la possibilità di reinserirmi nell'ambito clinico, e per la fiducia dimostratami in molteplici occasioni.

Ringrazio la mia famiglia. I sacrifici non sono mai stati solo miei, così come non lo sono le gioie.

Ringrazio mio figlio Raffaele, con te sono nata di nuovo anch'io.