

Valvole cardiache ingegnerizzate: stato dell'arte

Luca Dainese¹, Fabio Barili¹, Daniele Andreini², Anna Guarino¹, Barbara Micheli¹, Cristina Anna Borsetti¹, GianLuca Polvani¹, Alessandro Parolari¹, Melissa Fusari¹, Paolo Biglioli¹

¹U.O. di Cardiocirurgia, ²Servizio di Cardio-Radiologia, Centro Cardiologico Monzino IRCCS, Università degli Studi, Milano

Key words:
Decellularized scaffold;
Heart valves;
Tissue engineering;
Valvular scaffold.

Engineered heart valves promise to be the ideal heart valve replacement: they have the potential to grow and repair within the host, to minimize inflammatory and immunological responses and to limit thromboembolism. In particular, pediatric patients with congenital defects would greatly benefit from growing replacement materials by reducing the need for surgical reinterventions due to the lack of prosthetic material growth. In fact, viable cells included in engineered heart valves can theoretically adapt to a growing and changing environment exactly as a native biological structure. Engineered heart valves represent thus a novel experimental approach to create autologous, living replacements with the potential to grow, regenerate, and remodel. The aim of this paper is to present a review concerning the research efforts to create a viable engineered heart valve.

(G Ital Cardiol 2008; 9 (3): 167-172)

© 2008 AIM Publishing Srl

Ricevuto il 2 agosto 2007;
nuova stesura il 31 ottobre
2007; accettato il 12
novembre 2007.

Per la corrispondenza:

Dr. Luca Dainese

U.O. di Cardiocirurgia
Centro Cardiologico
Monzino IRCCS
Università degli Studi
Via Parea, 4
20138 Milano
E-mail:
luca.dainese@ccfm.it

Le malattie valvolari cardiache rappresentano ancora oggi un'importante causa di morbidità e mortalità nel mondo determinando circa 20 000 casi di morte per anno. Sebbene l'intervento di sostituzione cardiaca abbia portato ad un aumento della sopravvivenza e della qualità della vita^{1,2}, circa il 60% dei pazienti sottoposti a intervento di sostituzione valvolare cardiaca sviluppa serie complicanze correlate alla protesi valvolare nei 10 anni successivi all'impianto¹.

Le protesi valvolari attualmente disponibili, meccaniche o biologiche, presentano limitazioni costituite, per le prime, dalla necessità di far uso di terapia anticoagulante per controllare il tromboembolismo e, per le seconde, dalla durata nel tempo legata ad eventuali deterioramenti strutturali, o calcificazioni³, o dalla esigua disponibilità nel caso di omoioinnesti. Negli ultimi 30 anni, grazie alle accresciute conoscenze ultrastrutturali riguardanti le valvole cardiache e la loro fisiologia, e allo svilupparsi della bioingegneria, sono state sviluppate valvole "ingegnerizzate" in grado di riprodurre le valvole cardiache native, mantenendo quindi la vitalità dei componenti cellulari. Tale caratteristica è di estrema importanza nel caso di pazienti pediatrici, nei quali l'impiego di valvole capaci di crescere, di ripararsi e di rimodellarsi contemporaneamente con lo sviluppo del ricevente potreb-

be in futuro eliminare la prospettiva di reinterventi chirurgici⁴⁻⁷.

La creazione di una valvola cardiaca ingegnerizzata comporta tuttavia una serie di sfide biotecnologiche coinvolgenti più settori, dalla medicina alla bioingegneria, alla chimica e alla biologia, determinando attualmente il delinearsi di due differenti strategie: il primo approccio prevede l'utilizzo di uno *scaffold*, o supporto valvolare, su cui impiantare cellule di differente tipo – fase *in vitro* – che quindi viene impiantato *in vivo* (Figura 1). La seconda strategia prevede invece che il supporto valvolare sia impiantato direttamente *in vivo* a contatto quindi con le cellule circolanti endogene ed evitando la fase di impianto *in vitro*.

Molti gruppi⁸⁻¹¹ hanno dimostrato la fattibilità di creare una valvola cardiaca vitale da una matrice sintetica o biologica sulla quale vengano "seminati" differenti tipi di cellule. Tale valvola deriva dall'unione di cellule che vengono poste a contatto con un supporto per creare una struttura capace di rispondere e rimodellarsi adeguatamente agli stress meccanici e dinamici che si realizzano a livello valvolare.

Quale sia la metodica utilizzata, l'elemento fondamentale del processo durante la fase *in vitro* e *in vivo* è rappresentato dalla proliferazione e migrazione nel supporto delle cellule, dall'organizzazione e produzione dei componenti la matrice extracellu-

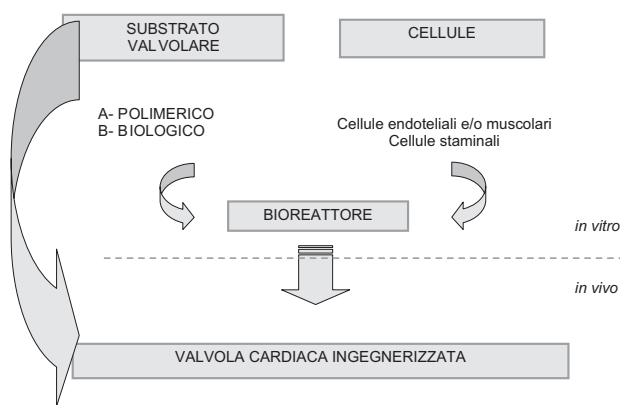


Figura 1. Flow-chart del processo di creazione delle valvole cardiache ingegnerizzate.

lare, dalla degradazione del substrato e dal rimodellamento tissutale¹².

Come *scaffold* è possibile impiegare materiale biodegradabile sintetico rappresentato, per esempio, dai diversi biopolimeri, oppure materiale biologico, come valvole umane o animali sottoposte ad asportazione delle cellule costituenti in modo da mantenerne la struttura di supporto (decellularizzazione).

Se si vanno delineando con più chiarezza quali siano i tipi di supporto valvolare da utilizzare, altrettanto non si può dire per quanto attiene ai differenti tipi di cellule da impiantare in tale supporto esistendone una grande variabilità che include cellule differenziate – quali cellule endoteliali e/o cellule muscolari – oppure cellule staminali autologhe o allogeniche.

Matrice valvolare sintetica

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

La regolazione dell'adesione cellulare al substrato e la riorganizzazione spaziale tridimensionale della val-

vola ingegnerizzata in tale modo creano problemi poiché le proteine della matrice extracellulare non sono costituenti naturali dei polimeri, che, invece, sono materiali di per sé isotropi. Le valvole ingegnerizzate devono, infatti, riprodurre le caratteristiche meccaniche delle valvole native ed essere capaci, quindi, di rimodellare il tessuto stesso con riassorbimento del substrato sintetico.

Durante la fase di degradazione e riassorbimento dei biopolimeri – fase cruciale – occorre, dunque, che gli spazi creati dal riassorbimento dei polimeri vengano occupati dalle cellule che costituiranno la matrice extracellulare; diversamente, si può creare tessuto fibroso con un'alterazione dell'architettura e della specializzazione cellulare che può venire alterata fino ad arrivare alla necrosi del tessuto per scarso apporto in ossigeno e dei nutrienti e per la mancata rimozione delle scorie. Nei primi lavori sperimentali, Shinoka et al.^{8,13} avevano ottenuto una valvola partendo da un biopolimero di acido poliglicolico seminato con cellule endoteliali. Tale struttura era stata impiantata in posizione della valvola polmonare e aveva evidenziato come i lembi valvolari risultassero molto più sottili, meno elastici e con ridotte capacità di flettersi, se paragonati con i lembi nativi.

Proseguendo in tale direzione, nel 2000, Hoerstrup et al.¹⁰ hanno impiantato in animale (pecora), per 5 mesi, una valvola partendo da un substrato sintetico di acido poliglicolico associato a polidrossibutirrato così da formare una struttura geometricamente simile ai tre lembi naturali. Su tale matrice sintetica erano stati dapprima seminati *in vitro* miofibroblasti e cellule endoteliali con l'ausilio di un bioreattore, uno strumento capace di riprodurre le condizioni dinamiche naturali di pulsatilità del flusso. In tale ambiente, la valvola ha mostrato la capacità di crescere *in vitro* con la formazione di proteine della matrice extracellulare con una struttura istologica ben organizzata. Innestata chirurgicamente in posizione della valvola polmonare e sottoposta a controllo ecocardiografico *in vivo*, presentava lembi mobili, funzionanti, con assenza di trombi o aneurismi e con caratteristiche meccaniche e di matrice extracellulare simili ad una valvola normale. In particolare, il biopolimero era stato degradato ottenendo un'endotelizzazione uniforme e una struttura trilaminare molto simile a quella presente su una valvola polmonare nativa di pecora.

Matrice valvolare biologica

L'uso di una matrice cellulare di origine umana o animale decellularizzata rappresenta attualmente il supporto che più si avvicina al modello naturale. Tuttavia, sono diversi i quesiti ancora da chiarire. Per esempio è necessario chiarire meglio quale sia la capacità di questi tipi di valvole e dei costituenti di indurre una risposta infiammatoria e immunologica, definendo, inoltre, la mi-

gliore metodica per effettuare la decellularizzazione. In tale senso non è ancora chiaro se questo processo renda la valvola immunologicamente inerte, se le cellule seminate possano penetrare la matrice e differenziarsi essendo quindi biologicamente attive. Se è stato, infatti, dimostrato che le valvole decellularizzate si comportano meglio rispetto a quelle non decellularizzate in relazione al fatto che la risposta immunologica, infiammatoria e la calcificazione sembrano essere correlabili con le cellule originariamente presenti nella matrice¹⁴, è vero anche che valvole decellularizzate ed impiantate in animale senza essere ricellularizzate presentano risultati peggiori in relazione alla possibilità di ricostituire tessuto interstiziale con collagene e glicani¹⁵⁻¹⁸.

La decellularizzazione di valvole porcine, attraverso detergenti enzimatici che alternano trattamenti ipertonici, sembra essere completa non permettendo la rilevazione di cellule della matrice residue o nuclei cellulari. Ciò appare di fondamentale importanza in relazione alla loro capacità di interagire con citochine o chemochine potendo quindi tale trattamento prevenire la risposta immunitaria^{19,20}. Per valutare quindi gli effetti dei diversi trattamenti enzimatici, il gruppo di Simon²¹ ha considerato l'efficacia di differenti metodi di decellularizzazione (Synergraft, Triton X-100, desossicolato di sodio, Igepal CA-630 e ribonucleasi) su valvole porcine, nei confronti della risposta immunitaria e della trombogenicità, e sulla capacità di totale rimozione delle cellule native.

Gli autori hanno dimostrato che la completa eliminazione delle cellule native non rende la matrice biologicamente inerte. La matrice di una valvola porcina decellularizzata esprime, infatti, la capacità potenziale di attrarre le cellule infiammatorie e di indurre attivazione delle piastrine suggerendo che è fondamentale controllare i differenti fattori che stimolano l'infiammazione per poter usare i tessuti porcini come tessuti ingegnerizzati.

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

Dal punto di vista clinico se Dohmen et al.^{22,23} hanno riportato esperienze positive utilizzando una valvola porcina decellularizzata con una metodica industriale brevettata, risultati scadenti, invece, sono stati ottenuti con l'impianto di tali valvole su bambini da Simon et al.¹⁴, mostrando che le valvole espianate presentano una reazione infiammatoria – neutrofili, macrofagi e linfociti – a livello della matrice extracellulare molto elevata, con una scarsa ripopolazione della matrice stessa da parte dei fibroblasti che appaiono incapaci di penetrare nella matrice extracellulare formando degli aggregati isolati.

Utilizzando omoinnesti valvolari umani decellularizzati con la stessa metodica, è stato invece rilevato

che la risposta antigenica è minima ad 1 anno; inoltre è stato evidenziato che le proprietà biomeccaniche, il modulo di elasticità, la resistenza agli stress di tali valvole cardiache sono sovrapponibili alle caratteristiche di valvole criopreservate e non sottoposte ad alcun trattamento. Tali valvole, oltre a mantenere le proprietà meccaniche, riescono anche a rimodellarsi *in vivo* grazie alla presenza di cellule seminate *in vitro*^{24,25}.

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

Ricellularizzazione: dispositivi per la crescita dinamica (bioreattore)

Uno dei momenti più importanti e delicati nella creazione di una valvola ingegnerizzata è rappresentato dalla ripopolazione cellulare.

Diversi studi hanno messo in evidenza che la ricellularizzazione si realizza meglio se viene utilizzato un bioreattore. Tale dispositivo permette di ricreare le condizioni fisiologiche più simili a quelle che si verificano nell'aorta ascendente rendendo possibile applicare condizioni di pressione variabile e di flusso pulsatile mediante stimoli meccanici. Quindi, l'utilizzo di tale dispositivo, nel quale è possibile posizionare i vari componenti in un *medium* con diversi fattori di crescita e sottoporlo a flussi che simulino il comportamento pulsatile *in vivo*, è in grado di stimolare la differenziazione cellulare. Si possono ottenere dunque elementi capaci di produrre i componenti della matrice extracellulare e lembi che hanno le proprietà meccaniche della valvola nativa, in particolare, con un aumento della massa cellulare, del contenuto in collagene ed elastina rispetto alla stessa ricellularizzazione effettuata in condizioni statiche^{26,27}.

Quali cellule utilizzare per le valvole ingegnerizzate?

Gli elementi cellulari presenti nella valvola aortica normale sono cellule endoteliali che ne ricoprono la superficie e cellule interstiziali. Mentre le prime sono responsabili della non trombogenicità tissutale e regolano le risposte immunitaria ed infiammatoria, le seconde sintetizzano i costituenti della matrice extracellulare e sono responsabili del rimodellamento della valvola.

Le cellule interstiziali costituiscono una popolazione cellulare che esprime un fenotipo variabile – da fibroblasti a miofibroblasti – in relazione ai diversi fattori biochimici e biomeccanici che giocano un importante ruolo nell'ambiente omeostatico tissutale valvolare. È stato, infatti, dimostrato che la stimolazione meccanica e/o la stimolazione mediante citochine (*trans-*

forming growth factor-β1) possono far variare la biosintesi delle proteine da parte delle cellule interstiziali valvolari e il loro stato contrattile²⁸.

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

Fondamentalmente gli studi sono indirizzati verso cellule differenziate tessuto-specifiche quali cellule endoteliali e/o muscolari o cellule staminali autologhe o allogene²⁹⁻³⁹.

Recentemente Schmidt et al.³⁰ hanno creato dei *patches* di tessuto ingegnerizzato ottenendo fibroblasti e progenitori di cellule endoteliali partendo da cellule provenienti da cordone ombelicale. Tali cellule hanno mostrato la capacità di differenziarsi in cellule endoteliali mature e mostrano un'eccellente capacità di crescita e di organizzazione.

Cellule endoteliali e miofibroblasti sono stati ottenuti inoltre da arterie e vene periferiche e si sono dimostrati in grado di crescere in appropriati supporti. La limitazione principale è che permangono le differenze morfofunzionali tra cellule vascolari e valvolari e la necessità di sacrificare comunque tessuto sano per il prelievo. Similarmente, Yang et al.⁴⁰ hanno usato cellule prelevate da aorta di bambini che, innestate su un *patch* sintetico, si sono dimostrate capaci di crescere e costituire il collagene e cellule muscolari.

Allo stesso modo Hoffman-Kim et al.⁴¹ hanno valutato la possibilità di ottenere fibroblasti da lembi di valvola tricuspidale, di arteria carotide e vena giugulare di ovino. Il maggior numero di cellule e la maggiore concentrazione di collagene per cellula sono stati ottenuti dalla vena giugulare. Utilizzando tecniche di immunoradiografia hanno evidenziato anticorpi specifici per α -actina muscolare, fibronectina e condroitinsolfato. Tali cellule hanno mostrato inoltre caratteristiche di sintesi per proteine quali collagene, glicosaminoglicani ed elastina. Affonso da Costa et al.⁴² hanno riportato l'esperienza clinica di impianto di allograft decellularizzato posto in cultura con cellule endoteliali vascolari autologhe. Ad 1 anno di follow-up, tali valvole hanno sviluppato una degenerazione strutturale progressiva con perdita della cellularità alla verifica seguente l'espianto, probabilmente immunomediata similmente a quello che accade nei trapianti evidenziando, però, il mantenimento dell'architettura cellulare normale, qualora venga utilizzata un'appropriata terapia immunosoppressiva. Cebotari et al.⁴³ hanno recentemente riportato l'esperienza clinica a 3.5 anni relativa all'impianto su bambini di valvole polmonari prelevate da cadavere, decellularizzate enzimaticamente e quindi sottoposte a ripopolazione per 22 giorni in bioreattore con

cellule provenienti dal sangue periferico di volontari. In base a rilievi solo ecocardiografici, gli autori ritengono di poter affermare che queste valvole hanno capacità di crescita nel tempo.

Attualmente grande interesse è riposto nelle cellule progenitrici derivati dal midollo osseo. Tali cellule hanno, infatti, la capacità di differenziarsi in multiple linee cellulari, il loro prelievo risulta relativamente agevole tramite puntura ossea, vengono principalmente isolate come sospensione cellulare e quindi sono più agevoli da processare e meno inclini alla contaminazione rispetto al tessuto solido. Le cellule staminali allogene derivate da tessuto embrionale possono essere utilizzate per ottenere cloni cellulari con un enorme potenziale differenziativo compreso di strutture cardiovascolari^{29,33-36}.

Recentemente cellule di derivazione stromale da midollo osseo sono state utilizzate creando una valvola cardiaca a tre lembi²⁹. Sebbene la valvola ottenuta presenti proteine caratteristiche della matrice extracellulare, quali collagene I e III e glicosaminoglicani, la tipica struttura a tre lamine dei lembi della valvola nativa non è stata riprodotta con un contenuto di proteine della matrice extracellulare che risulta inferiore rispetto a quello della valvola nativa.

Quale sia il tipo cellulare più adatto per poter essere impiegato nell'ambito delle valvole cardiache ingegnerizzate non è quindi ancora chiaro²⁹. Gli studi concernenti l'impiego di cellule staminali e varie altre cellule progenitrici sono ancora agli inizi e le conoscenze sugli aspetti biochimici e immunologici, e sulle proprietà meccaniche e funzionali dei tessuti ingegnerizzati *in vitro* risultano non ancora complete, così come le applicazioni cliniche, che sono ancora limitate.

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

Ringraziamenti

Si ringrazia la Dr.ssa Viviana Biagioli per il prezioso contributo alla revisione e stesura del testo.

Riassunto

Le valvole cardiache ingegnerizzate rappresentano teoricamente il sostituto valvolare ideale: sono capaci di crescere e di modificarsi con l'individuo ricevente, manifestando una minima risposta immunologica e infiammatoria, ovvero limitando i rischi di tromboembolismo. Le cellule vitali incluse nel supporto delle valvole cardiache ingegnerizzate possiedono potenzialmente la capacità di crescere e svilupparsi come accade per le valvole native. Quest'ultimo aspetto assume particolare importanza in campo pediatrico dove le protesi attualmente disponibili non sono in grado di svilupparsi con i giovani pazienti, rendendo necessari talvolta, nel corso della vita, interventi plurimi. La possi-

bilità quindi di ricreare una valvola cardiaca partendo da una matrice biologica o sintetica ricellularizzata con cellule del ricevente rappresenta una sfida che coinvolge molteplici campi scientifici. Lo scopo di questa rassegna è stato di esporre le attuali evidenze riguardanti le valvole cardiache ingegnerizzate.

Parole chiave: Ingegneria tissutale; Supporto decellularizzato; Supporto valvolare; Valvola cardiaca.

Bibliografia

- Hammermeister K, Sethi GK, Henderson WG, Grover FL, Oprian C, Rahimtoola SH. Outcomes 15 years after valve replacement with a mechanical versus bioprosthetic valve: final report of the Veterans Affairs randomized trial. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 1152-8.
- Rahimtoola SH. Choice of prosthetic heart valve for adult patients. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 893-904.
- Schoen FJ. Pathology of heart valve substitution with mechanical and tissue prostheses. In: Silver MD, Gotlieb AI, Schoen FJ, eds. *Cardiovascular pathology*. 3rd edition. New York, NY: Churchill Livingstone, 2001: 629-77.
- Kasimir MT, Weigel G, Sharma J, et al. The decellularized porcine heart valve matrix in tissue engineering: platelet adhesion and activation. *Thromb Haemost* 2005; 94: 562-7.
- Rieder E, Seebacher G, Kasimir MT, et al. Tissue engineering of heart valves: decellularized porcine and human valve scaffolds differ importantly in residual potential to attract monocytic cells. *Circulation* 2005; 111: 2792-7.
- Mol A, Bouten CV, Baaijens FP, Zünd G, Turina MI, Hoerstrup SP. Tissue engineering of semilunar heart valves: current status and future developments. *J Heart Valve Dis* 2004; 13: 272-80.
- Barili F, Dainese L, Topkara VK, Biglioli P, Polvani G. The future of human valve allografts: bioengineering and stem cells. *Artif Organs* 2005; 29: 923.
- Shinoka T, Breuer CK, Tanel RE, et al. Tissue engineering heart valves: valve leaflet replacement study in a lamb model. *Ann Thorac Surg* 1995; 60 (6 Suppl): S513-S516.
- Bader A, Schilling T, Teebken OE, et al. Tissue engineering of heart valves – human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves. *Eur J Cardiothorac Surg* 1998; 14: 279-84.
- Hoerstrup SP, Sodian R, Daebritz S, et al. Functional living trileaflet heart valves grown in vitro. *Circulation* 2000; 102 (19 Suppl 3): III44-III49.
- Elkins RC, Goldstein S, Hewitt C, et al. Recellularization of heart valve grafts by a process of adaptive remodeling. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 13 (4 Suppl 1): 87-92.
- Mendelson K, Schoen FJ. Heart valve tissue engineering: concepts, approaches, progress, and challenges. *Ann Biomed Eng* 2006; 34: 1799-819.
- Shinoka T. Tissue engineered heart valves: autologous cell seeding on biodegradable polymer scaffold. *Artif Organs* 2002; 26: 402-6.
- Simon P, Kashimir MT, Seebacher G, et al. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve Synergraft in pediatric patients. *Eur J Cardiothorac Surg* 2003; 23: 1002-6.
- Steinhoff G, Stock U, Karim N, et al. Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits in vivo restoration of valve tissue. *Circulation* 2000; 102 (19 Suppl 3): III50-III55.
- Cebotari S, Mertsching H, Kallenbach K, et al. Construction of autologous human heart valves based on an acellular allograft matrix. *Circulation* 2002; 106 (12 Suppl 1): I63-I68.
- Grauss RW, Hazekamp MG, van Vliet S, Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC. Decellularization of rat aortic valve allografts reduces leaflet destruction and extracellular matrix remodeling. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 126: 2003-10.
- Zehr KJ, Yagubyan M, Connolly HM, Nelson SM, Schaff HV. Aortic root replacement with a novel decellularized cryopreserved aortic homograft: postoperative immunoreactivity and early results. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 130: 1010-5.
- Fernandez-Botran R, Gorantla V, Sun X, et al. Targeting of glycosaminoglycan-cytokine interactions as a novel therapeutic approach in allotransplantation. *Transplantation* 2002; 74: 623-9.
- Juthier F, Vincentelli A, Gaudric J, et al. Decellularized heart valve as a scaffold for in vivo recellularization: deleterious effects of granulocyte colony-stimulating factor. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006; 131: 843-52.
- Kasimir MT, Rieder E, Seebacher G, et al. Decellularization does not eliminate thrombogenicity and inflammatory stimulation in tissue-engineered porcine heart valves. *J Heart Valve Dis* 2006; 15: 278-86.
- Dohmen PM, Ozaki S, Yperman J, Flameng W, Konertz W. Lack of calcification of tissue engineered heart valves in juvenile sheep. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 13 (4 Suppl 1): 93-8.
- Dohmen PM, Lembcke A, Hotz H, Kivelitz D, Konertz WF. Ross operation with a tissue-engineered heart valve. *Ann Thorac Surg* 2002; 74: 1438-42.
- Rabkin E, Hoerstrup SP, Aikawa M, Mayer JE Jr, Schoen FJ. Evolution of cell phenotype and extracellular matrix in tissue-engineered heart valves during in-vitro maturation and in-vivo remodeling. *J Heart Valve Dis* 2002; 11: 308-14.
- Kadner A, Zund G, Maurus C, et al. Human umbilical cord cells for cardiovascular tissue engineering: a comparative study. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004; 25: 635-41.
- Schenke-Layland K, Opitz F, Gross M, et al. Complete dynamic repopulation of decellularized heart valves by application of defined physical signals-an in vitro study. *Cardiovasc Res* 2003; 60: 497-509.
- Hoerstrup SP, Sodian R, Sperling JS, Vacanti JP, Mayer JE Jr. New pulsatile bioreactor for in vitro formation of tissue engineered heart valves. *Tissue Eng* 2000; 6: 75-9.
- Vesely I. Heart valve tissue engineering. *Circ Res* 2005; 97: 743-55.
- Hoerstrup SP, Kadner A, Melnitchouk S, et al. Tissue engineering of functional trileaflet heart valves from human marrow stromal cells. *Circulation* 2002; 106 (12 Suppl 1): I143-I150.
- Schmidt D, Molb A, Neuenschwander S, et al. Living patches engineered from human umbilical cord derived fibroblasts and endothelial progenitor cells. *Eur J Cardiothorac Surg* 2005; 27: 795-800.
- Perry TE, Kaushal S, Sutherland FW, et al. Thoracic Surgery Directors Association Award. Bone marrow as a cell source for tissue engineering heart valves. *Ann Thorac Surg* 2003; 75: 761-7.
- Schnell AM, Hoerstrup SP, Zund G, et al. Optimal cell source for cardiovascular tissue engineering: venous vs aortic human myofibroblasts. *Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 49: 221-5.
- Hoffman-Kim D, Maish MS, Krueger PM, et al. Comparison of three myofibroblast cell sources for the tissue engineering of cardiac valves. *Tissue Eng* 2005; 11: 288-301.
- Perry TE, Roth SJ. Cardiovascular tissue engineering: constructing living tissue cardiac valves and blood vessels using bone marrow, umbilical cord blood, and peripheral blood cells. *J Cardiovasc Nurs* 2003; 18: 30-7.

35. Sutherland FW, Perry TE, Yu Y, et al. From stem cells to viable autologous semilunar heart valve. *Circulation* 2005; 111: 2783-91.
36. Sarraf CE, Harris AB, McCulloch AD, Eastwood M. Cell proliferation rates in an artificial tissue-engineered environment. *Cell Prolif* 2005; 38: 215-21.
37. Gulbins H, Goldmund A, Anderson I, et al. Preseeding with autologous fibroblasts improves endothelialization of glutaraldehyde-fixed porcine aortic valves. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 125: 592-601.
38. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-7.
39. Shi Q, Rafii S, Wu MH, et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 1998; 92: 362-7.
40. Yang C, Sodian R, Fu P, et al. In vitro fabrication of a tissue engineered human cardiovascular patch for future use in cardiovascular surgery. *Ann Thorac Surg* 2006; 81: 57-64.
41. Hoffman-Kim D, Maish MS, Krueger PM, et al. Comparison of three myofibroblast cell sources for the tissue engineering of cardiac valves. *Tissue Eng* 2005; 11: 288-301.
42. Affonso da Costa FD, Dohmen PM, Lopes SV, et al. Comparison of cryopreserved homografts and decellularized porcine heterografts implanted in sheep. *Artif Organs* 2004; 28: 366-70.
43. Cebotari S, Lichtenberg A, Tudorache I, et al. Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells. *Circulation* 2006; 114 (1 Suppl I): I132-I137.