

# Università degli Studi di Milano-Bicocca



## Scuola di Dottorato in Scienze Mediche Sperimentali e Cliniche

Dottorato in Ipertensione e Prevenzione del Rischio Cardiovascolare

Dal Progetto Europeo SensorART all'attività di  
ricerca clinica: focus sui pazienti in assistenza  
ventricolare meccanica.

---

From SensorART European Project to clinical research: focus on patients on  
ventricular assist device.

Dottorando  
Alessandro Verde  
Matricola: 774823

Relatore  
Prof.ssa Cristina Giannattasio

Co-relatore  
Dr.ssa Maria Giovanna Trivella



## **SOMMARIO**

<b>DEDICA.....</b>	<b>5</b>
<b>EXECUTIVE SUMMARY .....</b>	<b>6</b>
IL PROBLEMA DI SALUTE .....	6
IL CARDIO CENTER DELL'OSPEDALE NIGUARDA CA' GRANDA.....	7
SENSORART - A REMOTE CONTROLLED SENSORIZED ARTIFICIAL HEART ENABLING PATIENTS EMPOWERMENT AND NEW THERAPY APPROACHES (PROJECT IDENTIFIER: FP7-2009-ICT-248763) .....	8
<b>INTRODUZIONE .....</b>	<b>10</b>
<b>NUOVE PROSPETTIVE NELLA TERAPIA DELL'INSUFFICIENZA CARDIACA CRONICA REFRAATTARIA ALLA TERAPIA MEDICA STANDARD. ....</b>	<b>10</b>
<b>I DISPOSITIVI DI ASSISTENZA MECCANICA AL CIRCOLO .....</b>	<b>12</b>
QUALE ASSISTENZA VENTRICOLARE?.....	18
INSUFFICIENZA CARDIACA REFRAATTARIA IN PAZIENTI NON CANDIDABILI AL TRAPIANTO – DESTINATION THERAPY (DT) O BRIDGE TO CANDIDANCY (BTC) .....	20
BRIDGE TO RECOVERY (BTR) .....	21
IL RUOLO DEL VENTRICOLO DESTRO: .....	22
FATTORI DI RISCHIO .....	24
L'ATTIVITÀ DI IMPIANTO LVAD A NIGUARDA .....	27
<b>SENSORART - A REMOTE CONTROLLED SENSORIZED ARTIFICIAL HEART ENABLING PATIENTS EMPOWERMENT AND NEW THERAPY APPROACHES (PROJECT IDENTIFIER: FP7-2009-ICT-248763) .....</b>	<b>28</b>
VAD MUNITO DI SENSORI E CONTROLLATO IN MODALITÀ WIRELESS. ....	28
SISTEMA DI TRASMISSIONE TRANSCUTEA DELL'ENERGIA (TRANSCUTANEOUS ENERGY TRANSMISSION SYSTEM - TET). ....	31
UNITÀ DI MONITORIZZAZIONE DEL PAZIENTE (PATIENT'S MONITORING APPLICATION - PMA). ....	33
UNITÀ DEDICATA AL PERSONALE SANITARIO PER LA GESTIONE DA REMOTO DEL PAZIENTE PORTATORE DI VAD (SPECIALISTS' MONITORING APPLICATION - SMA). ....	34
UNITÀ DI SENSORI INDOSSABILI DAL PAZIENTE. ....	36
SIMULATORE NUMERICO E SIMULATORE IBRIDO. ....	37
ANALISI DEI BIOMARCATORI / POINT-OF-CARE.....	38
<b>LE ESIGENZE DI INNOVAZIONE .....</b>	<b>39</b>
<b>LA RICERCA CLINICA SULL'INFIAMMAZIONE .....</b>	<b>42</b>
<b>STUDIO DEI BIOMARCATORI NEI PAZIENTI SOTTOPOSTI A IMPIANTO DI VAD .....</b>	<b>42</b>
BIOMARCATORI DI INFIAMMAZIONE NELLA FASE INIZIALE DI SUPPORTO LVAD .....	43
CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI LVAD CON ESITO CRITICO COMPOSITO .....	45
PERMANENZA IN UTI, IN OSPEDALE, E IL PUNTEGGIO T-SOFA A 1 SETTIMANA IN BASE ALL'OUTCOME COMPOSITO .....	51
EMODINAMICA POSTOPERATORIA, T-SOFA E CRP TRA I PAZIENTI LVAD CON DIVERSA EVOLUZIONE DELLA MOFS SEVERA ....	52
PROFILI POSTOPERATORI DELLE CITOCHINE PRO-INFIAMMATORIE .....	54
CRP POSTOPERATORIA, IL-8 E TNF-A IN BASE AI GRUPPI DI PAZIENTI.....	54
PROFILI POSTOPERATORIE DI MOLECOLE DI ADESIONE E NEOPTERINA SECONDO I GRUPPI DI PAZIENTI .....	57
PROFILI POSTOPERATORIE DI CITOCHINE ANTI-INFIAMMATORIE IN BASE A GRUPPI DI PAZIENTI .....	59
COMMENTI.....	61

PROFILI INFIAMMATORIE DURANTE PERIODO PROLUNGATO DI ASSISTENZA MECCANICA AL CIRCOLO .....	63
COMMENTI.....	65
<b>RICERCA DI NUOVI BIOMARCATORI COINVOLTI NEL RECUPERO DELLA FUNZIONE VENTRICOLARE SINISTRA .....</b>	<b>68</b>
MICRO-RNAS PATTERN DOPO SUPPORTO CON LVA A LUNGO TERMINE .....	68
PROFILO DI ESPRESSIONE MIRNA .....	73
VALIDAZIONE DEI MICRORNA PER REAL-TIME PCR.....	73
ASSOCIAZIONE TRA L'ESPRESSIONE DI MICRORNA E PARAMETRI CLINICI .....	76
COMMENTI.....	78
<b><u>CONCLUSIONE .....</u></b>	<b><u>79</u></b>
<b><u>BIBLIOGRAFIA .....</u></b>	<b><u>80</u></b>

## Dedica

A Raffaele, al suo sconfinato amore per la sua famiglia, per sua moglie e per il suo bimbo.

Alla sua capacità di affrontare le difficoltà giornaliere con buon umore e spirito di iniziativa.

Al suo sguardo felice, quando l'entusiasmo di una nuova idea per un possibile progetto di ricerca scatenava immediatamente una ricerca bibliografica compulsiva.

Alla luce che brillava nei suoi occhi quando gli chiedevo del suo piccolo Lorenzo.

Alla sua determinazione ed al suo spirito di sacrificio per la Ricerca, esempio trainante in più di un'occasione.

Al suo essere stato un pragmatico sognatore.

A lui, che troppo, troppo presto ha chiuso gli occhi, non solo devo gran parte dei risultati scientifici che ho raggiunto, devo gran parte della mia crescita personale ed emotiva negli anni in cui i nostri cammini si sono intrecciati.

A lui, che per pochi anni mi ha preceduto e guidato nei primissimi passi da padre, dedico questo lavoro.

Ancora una volta, il tuo lavoro mi prende per mano e mi guida nella stesura delle prossime righe.

## Executive Summary

La decisione, da medico “clinico” specializzato in Cardiologia, di iniziare un percorso di studio focalizzato più sulla ricerca che sulla clinica, nasce dalla volontà di approfondire un ambito che ritengo essere un prezioso e indispensabile background per la formazione professionale del medico clinico.

La partecipazione in qualità di sperimentatore al Progetto Europeo “SensorART” dal Novembre 2010, è stata congiuntamente trampolino di lancio e supporto per l’intera durata del Dottorato di Ricerca. All’interno di esso, infatti, sono dapprima nate le ipotesi di lavoro, e successivamente hanno preso forma progetti di ricerca a cui ho collaborato, passando da essere coinvolto con piccoli contributi, a ritrovarmi, con il tempo, tra gli attori principali.

### Il problema di salute

L'insufficienza cardiaca (IC) è la causa più crescente di morte nei paesi occidentali. Non è una patologia specifica, ma una costellazione di segni e sintomi derivanti da varie cause di cui le principali sono: ipertensiva, idiopatica/primitiva, post-ischemica, valvolare, esotossica (da chemoterapici, alcolici, abuso di sostanze), e le malattie cardiache congenite. L'IC è uno stato fisiopatologico in cui un'anomalia della funzione cardiaca è responsabile dell'incapacità del cuore di pompare sangue in quantità commisurata alle esigenze metaboliche dei tessuti metabolizzare, o farlo utilizzando elevate pressioni di riempimento ventricolare aumentando patologicamente i volumi diastolici. Esso rappresenta un importante problema di salute pubblica nei paesi industrializzati. Sembra essere l'unica condizione cardiovascolare comune che sta aumentando di prevalenza e di incidenza. Dal Rapporto della Task Force dell'American College of Cardiology e dell'American Heart Association risulta che negli Stati Uniti, l'insufficienza cardiaca è responsabile di quasi 1 milione di ricoveri ospedalieri e 40.000 decessi all'anno. Quasi 5 milioni di pazienti sono

affetti da IC, con quasi 500.000 nuovi casi ogni anno. Questa patologia è la principale motivazione per 12-15 milioni di visite ambulatoriali e 6,5 milioni di giorni di degenza ogni anno. Nel corso degli ultimi 10 anni, il numero annuale di ricoveri per IC è aumentato da circa 550.000 a circa 900.000. Quasi 300.000 pazienti muoiono di IC come causa primaria o contributiva ogni anno, e il numero di morti aumenta costantemente, nonostante i progressi nella terapia. L'IC è l'unica malattia cardiovascolare che continua ad aumentare di incidenza e la diffusione negli ultimi decenni. La sua stima di prevalenza è 1.1-2%, con un aumento della prevalenza del 6-10% nelle persone di età superiore ai 65 anni. Circa 80% dei pazienti ospedalizzati con IC hanno più di 65 anni.

### **Il Cardio Center dell'Ospedale Niguarda Ca' Granda**

Il Cardio Center è dedicato al Prof. Angelo De Gasperis, grazie al quale nel 1956 fu aperto a Niguarda il primo reparto italiano di Chirurgia Toracica, e che ha eseguito, nello stesso anno, il primo intervento a 'cuore aperto' per la chiusura di un difetto del setto intraventricolare in una bambina di 18 mesi. Si trattava del primo intervento in circolazione extracorporea eseguito in Italia. Da quel primo passo, il Cardio Center è divenuto punto di riferimento nazionale per la cura delle patologie cardiache ed in particolar modo, dal primo impianto di cuore artificiale come ponte al trapianto cardiaco, avvenuto nel 1988 (tra i primi in Europa e al mondo), si è contraddistinto per l'implementazione delle nuove tecnologie nella cura dell'insufficienza cardiaca avanzata. Complessivamente, la Struttura Complessa di Cardiologia 2 - Insufficienza Cardiaca e Trapianti segue più di 600 pazienti trapiantati di cuore (nel 2015 eseguito il trapianto n. 1000) e più di 800 pazienti con insufficienza cardiaca cronica.

Il Cardio Center rappresenta inoltre uno dei maggiori centri di riferimento italiani per l'impianto dei dispositivi di assistenza ventricolare meccanica sinistra nei pazienti affetti da insufficienza cardiaca avanzata.

**SensorART - A remote controlled Sensorized ARTificial heart enabling patients empowerment and new therapy approaches (Project Identifier: FP7-2009-ICT-248763)**  
<http://www.sensorart.eu/>

Il progetto SensorART nasce dall'idea della Dr.ssa Trivella (Istituto di Fisiologia Clinica - Centro Nazionale delle Ricerche) di unire in un consorzio per la partecipazione ad un bando di ricerca dell'Unione Europea, le competenze e le potenzialità di Istituti ed Enti di Ricerca, Università, Ospedali e Aziende, al fine di:

1. sviluppare servizi di telemedicina innovativi che supportano i pazienti affetti da severa insufficienza cardiaca cronica refrattaria alla terapia medica, e gli operatori sanitari, consentendo ai pazienti di essere curati a casa senza rinunciare a cure ad elevata competenza medica;
2. sviluppare servizi di telecontrollo innovativi (mediante trasmissione wireless e tramite web dei dati tra unità interne impiantabili, unità esterne e datacenter) che consentono al paziente e all'operatore sanitario di tenere sotto controllo le prestazioni del dispositivo di assistenza ventricolare (VAD – ventricular assist device) impiantato nel torace del paziente
3. sviluppare componenti hardware per la trasmissione wireless dell'energia per la ricarica di batterie del VAD impiantabili
4. dimostrare efficienza ed economicità dei servizi di telemedicina specializzati e l'impatto positivo sul sistema sanitario riducendo i tempi di ospedalizzazione, considerando anche un più alto grado di accettazione del dispositivo al domicilio attraverso la formazione del paziente e la sua maggiore autonomia ("patient empowerment").
5. modellazione e simulazione del sistema cardio-circolatorio e della sua dinamica, adattati per ricostruire lo stato del paziente e analizzare separatamente gli effetti del VAD sul cuore e sul sistema cardio-vascolare. Attraverso questa applicazione, i tirocinanti avranno la

possibilità conoscere i VADs, acquisendo esperienza “in-vitro” nel trattamento dell’insufficienza cardiaca acuta e cronica;

6. analizzare le prospettive del mercato dei dispositivi medici e l’eventuale sviluppo e collocazione di un sistema aperto, standardizzato, interoperabile, in grado di interagire facilmente con i prodotti esistenti.

## Introduzione

### Nuove prospettive nella terapia dell'insufficienza cardiaca cronica refrattaria alla terapia medica standard.

I progressi della terapia di resincronizzazione cardiaca (CRT – Cardiac Resynchronization Therapy) uniti alla terapia medica ottimale (OMT – optimal medical therapy) hanno notevolmente migliorato la prognosi e la qualità di vita nei pazienti affetti da insufficienza cardiaca. Tuttavia circa il 4-5% di questi pazienti, nonostante OMT e CRT giunge a condizioni di scompenso cardiaco avanzato, e circa l' 1,5-2% presenta quadri di scompenso cardiaco refrattario, cioè non responsivo alle terapie farmacologiche. I pazienti con scompenso cardiaco avanzato hanno una mortalità del 35% a 1 anno e del 69% a 5 anni (1). Quelli con scompenso cardiaco refrattario presentano una mortalità a 1 anno del 50-75% e a 2 anni superiore al 90%(2). Sebbene terapie con infusione di farmaci inotropi (Dobutamina, Enoximone) al domicilio abbiamo dimostrato di essere in grado di ottenere un miglioramento della qualità di vita, esse non sono state in grado di migliorare la sopravvivenza, ma tendono, anzi, a peggiorarla (3). Ed è così che, quando percorribile, l'opzione del trapianto di cuore (TxC) rimane il gold standard, è cioè ancora la terapia che assicura la migliore sopravvivenza a lungo termine e il minor tasso di complicanze nel breve termine. Tuttavia, nell'ultimo decennio, al trapianto di cuore si sono affiancate nuove strategie terapeutiche tecnologicamente avanzate che possono oggi essere considerati una nuova, reale, e soprattutto attuale opzione terapeutica per il paziente affetto da scompenso cardiaco avanzato/terminale. Parliamo dei più recenti dispositivi di assistenza ventricolare sinistra (LVAD – Left Ventricular Assist Device) che hanno dimostrato avere un buon impatto sulla sopravvivenza. Il trapianto di cuore, oltre ad essere gravato da un trend in forte riduzione delle donazioni, sta infatti perdendo il primato nella sopravvivenza a dodici mesi. La curva di sopravvivenza del registro

INTERMACS (4) riferito ai pazienti portatori di VAD con un profilo INTERMACS-3 mostra infatti una sopravvivenza a 1 anno sovrapponibile rispetto al trapianto (Figura 1-2)

Figura 1. Curva di sopravvivenza dei pazienti sottoposti a impianto di un supporto meccanico al circolo di lungo periodo (4)

**Intermacs** Continuous Flow LVAD/BiVAD Implants: 2008 – 2014, n=12030

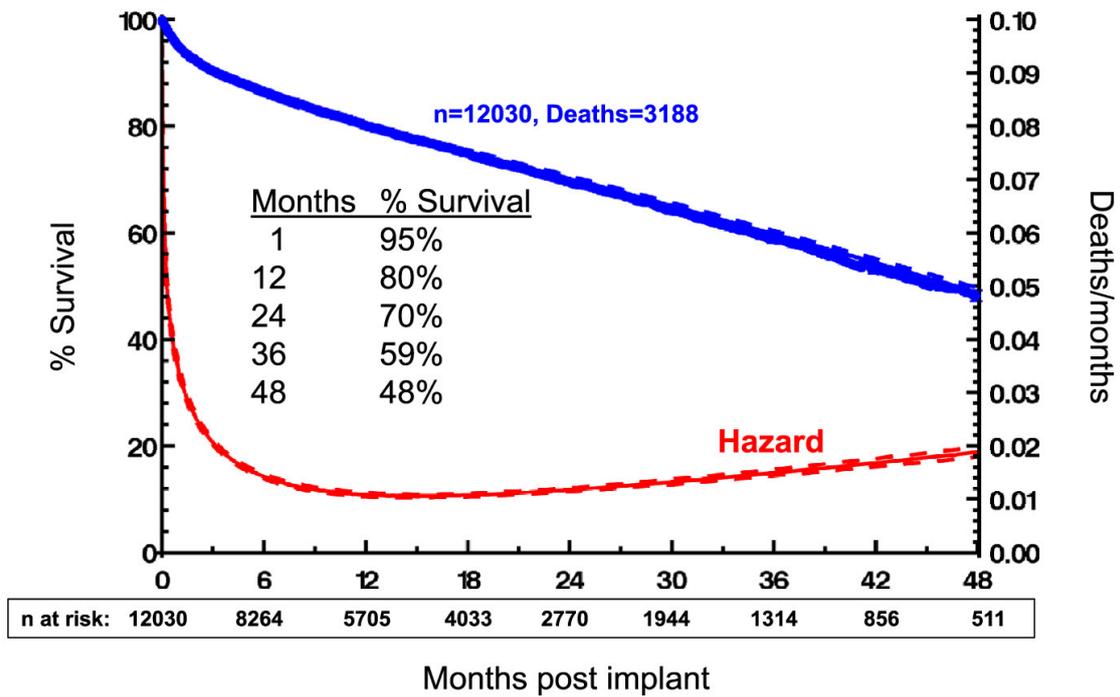
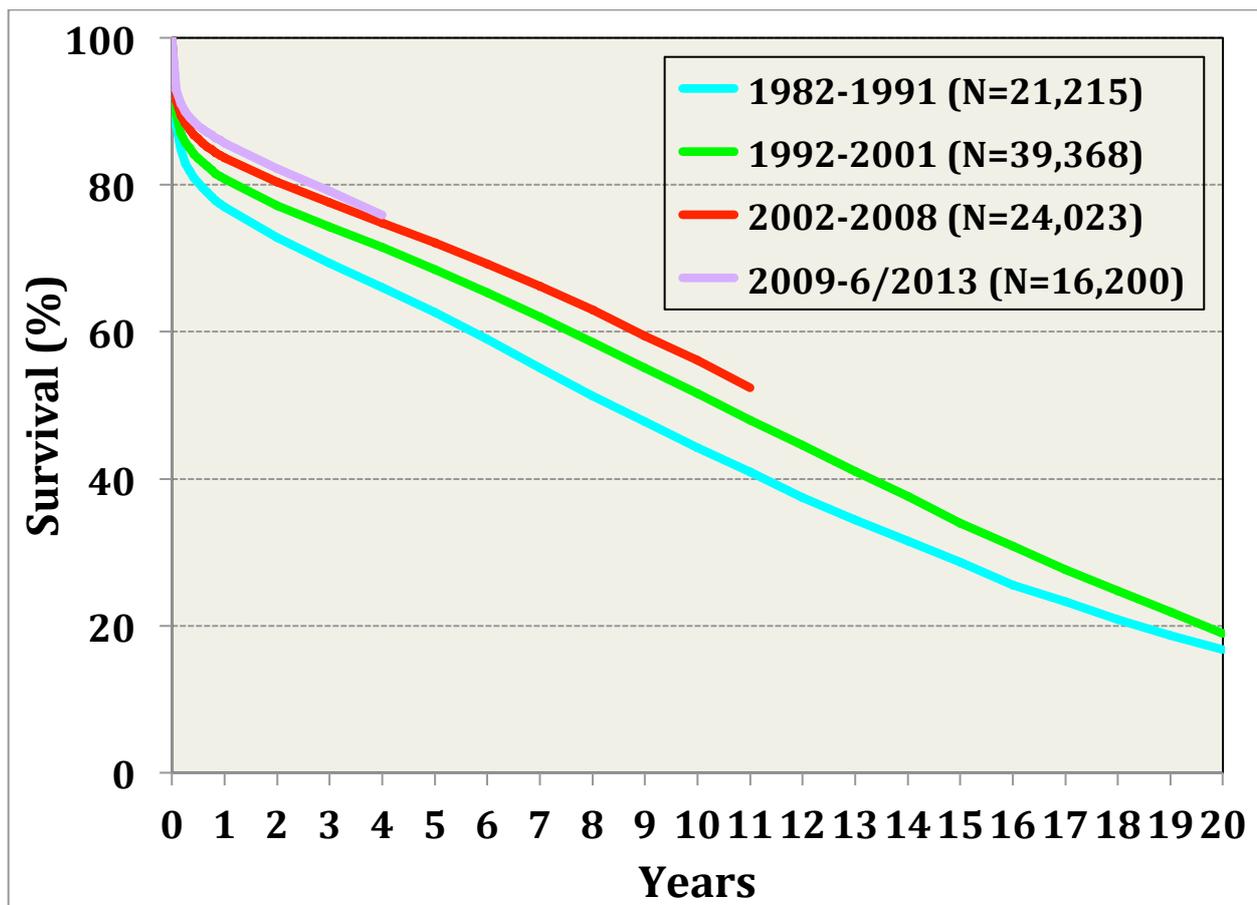


Figura 2. Curva di sopravvivenza di pazienti sottoposti a trapianto di cuore (5)



### I dispositivi di assistenza meccanica al circolo

Per espandere le opzioni terapeutiche nel trattamento della insufficienza cardiaca avanzata, negli anni '70 nasce e si sviluppa la ricerca di sistemi per l'assistenza meccanica al circolo, con esperienze pionieristiche condotte negli anni '60 da DeBakey, Liotta, Hall e Cooley (6). Dagli anni '80 vengono sviluppati i sistemi d'assistenza meccanica al circolo (MCS - Mechanical Circulatory Support) di tipo impiantabile, al fine di vicariare il lavoro del cuore nativo nella sua funzione di pompa (7). Accanto a sistemi di assistenza ventricolare (VAD - Ventricular Assist Device), vengono anche progettati ed impiegati dispositivi per la sostituzione integrale (ortotopica) del cuore nativo (TAH - Total Artificial Heart) (8,9). Tuttavia la completa rimozione del cuore nativo (con l'eccezione delle sole cuffie atriali), oltre ad essere un atto chirurgico estremamente invasivo, elimina la possibilità che, in caso di malfunzionamento del sistema artificiale, il cuore nativo possa sostenere

anche solo parzialmente il circolo, almeno fino alla risoluzione del problema. I risultati migliori e l'esperienza più vasta riguardano sistemi VAD che supportano la funzione ventricolare, con una tecnica di impianto che non prevede la rimozione del cuore nativo.

Sono disponibili diversi modelli, per un supporto sia biventricolare (BVAD: Biventricular Assist Device) sia monoventricolare sinistro (LVAD – Left-VAD) che monoventricolare destro (RVAD – Right-VAD), e con caratteristiche peculiari dei singoli modelli che ne consentono l'utilizzo per assistenze di durata variabile (da 24-48 ore all'impiego come terapia permanente o "destination therapy"). Tali sistemi negli anni '90 si sono dimostrati un valido trattamento ponte nel trapianto cardiaco: oltre 4000 pazienti sono stati impiantati in tutto il mondo (10); nel 2001 il 20% di pazienti sottoposti a TxC negli USA aveva precedentemente impiantato un sistema di MCS; le linee guida per l'insufficienza cardiaca American College of Cardiology – American Heart Association (ACC-AHA) del 2001 (11) identificavano come raccomandazione di classe I, l'impianto di VAD come bridge al trapianto cardiaco (TxC). Nel 2002, sulla base dei risultati dello studio REMATCH(12) l'assistenza meccanica al circolo è stata approvata anche come terapia definitiva ("destination therapy") in pazienti con cardiopatia grave e scompenso refrattario non candidabili a TxC per età o comorbidità.

I sistemi di assistenza meccanica al circolo possono essere utilizzati come trattamento ponte al trapianto ("bridge to transplant" o BTT) in pazienti in lista d'attesa, prima che le condizioni cliniche del paziente siano troppo scadenti per affrontare il trapianto stesso, o in pazienti non eleggibili a trapianto cardiaco per controindicazioni legate all'età del paziente, o alle sue condizioni cliniche (e.g. elevate resistenze polmonari) (13). In questi pazienti non candidabili a trapianto, la terapia con assistenza ventricolare può essere considerata definitiva ("destination therapy" o DT) nel caso in cui la controindicazione al trapianto rimanga permanente; l'impianto di un VAD può diventare invece un ponte alla candidatura a TxC ("bridge to candidacy" o BTC) quando, dopo l'impianto, si

assiste al miglioramento delle condizioni cliniche che lo avevano precedentemente controindicato. In una minoranza di pazienti si può assistere ad un recupero funzionale del ventricolo sinistro, con miglioramento della frazione d'iezione, e riduzione dei diametri del ventricolo sinistro, delle pressioni di riempimento e delle resistenze vascolari polmonari. In questi casi diventa possibile espiantare il VAD lasciando che il cuore nativo torni a svolgere autonomamente la sua funzione; si parla di ponte al "weaning" o al "recovery" del ventricolo sinistro ("bridge to recovery" o BTR) e la condizione clinica più frequente è rappresentata dalle miocarditi acute.

L'assistenza meccanica al circolo trova indicazione quando il trattamento intensivo convenzionale, farmacologico e non farmacologico, non è più in grado di assicurare condizioni cliniche ed emodinamiche accettabili, con il mantenimento di una perfusione di organi (soprattutto rene e fegato) e tessuti sufficiente ad evitarne il deterioramento funzionale. Classicamente il profilo emodinamico dei candidati all'assistenza meccanica è caratterizzato da:

- pressione arteriosa sistolica  $\leq 80\text{mmHg}$
- pressione capillare polmonare  $> 20\text{mmHg}$
- indice cardiaco  $< 2 \text{ l/min/m}^2$

nonostante terapia farmacologica massimale ed eventuale contropulsazione aortica.

Gli strumenti a nostra disposizione per un corretto triage nell'insufficienza cardiaca end-stage rimangono molto controversi. Tradizionalmente i parametri utilizzati per la valutazione del paziente con insufficienza cardiaca, comprendono criteri clinici (segni/sintomi di congestione e/o ipoperfusione), indicatori di danno d'organo (indici di funzionalità epatica e renale, elettroliti plasmatici e livelli di emoglobina), e parametri emodinamici (indice cardiaco, pressioni polmonari, pressione di incuneamento capillare, resistenze vascolari polmonari).

In letteratura sono state pubblicate casistiche di centri molto accreditati che, raccogliendo questi indicatori, hanno sviluppato degli strumenti per calcolare SCORE di rischio pre- e post-impianto di una MCS (14-17).

Tuttavia questi score pur dimostrandosi utili nell'identificare i pazienti ad altissimo rischio di morte dopo l'impianto, non sono ancora in grado di identificare con precisione quali pazienti ne trarranno un beneficio sicuro rispetto alla terapia medica o all'attesa di un TxC (18-21).

Dal 1 luglio 2006 è attivo un registro istituito nel 2005 dalla United States National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI) dove si ha l'obbligo di inserire i dati dei pazienti sottoposti, in Nord America, ad impianto di uno dei device di supporto al circolo approvati dalla Food and Drug Administration (FDA) per il trattamento dell'insufficienza cardiaca avanzata. Questo registro prende il nome di INTERMACS (Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support), e grazie alla sua istituzione è stato possibile raccogliere ed analizzare i dati di più di 1500 pazienti impiantati con un MCS (22).

Entrambe le classificazioni più utilizzate per l'insufficienza cardiaca, quella funzionale (per classi NYHA da I a IV) (23), e quella sintomatologica delle più recenti linee guida sull'argomento (stadi da "A" a "D") (11), inquadravano tutti i pazienti potenzialmente candidabili ad impianto di un MCS nel gruppo a maggior gravità, non tenendo conto che tra i pazienti con insufficienza cardiaca avanzata esistono sottogruppi molto diversi per caratteristiche cliniche. Con l'istituzione del registro INTERMACS, è stata creata un'ulteriore classificazione degli stadi dell'insufficienza cardiaca avanzata per livelli di stabilità/instabilità clinica con possibilità di confronto anche in termini prognostici (vedi tab 1- Livelli INTERMACS – Profili e tempistica di intervento). Tale classificazione prevede 7 livelli: dal livello 1 che caratterizza il paziente più severo, in shock cardiogeno, fino al livello 7 che include i soggetti con insufficienza cardiaca avanzata clinicamente stabili.

Nel lavoro della Stevenson et al. (24), nel 2009, oltre ad una accurata descrizione dei profili, viene introdotto il concetto di evento clinico in grado di modificare in senso peggiorativo il livello di compromissione del paziente. Ad esempio, un paziente inquadrabile in un livello 4 (cioè con sintomi a riposo in sola terapia medica), qualora richiedesse frequenti ospedalizzazioni (“Frequent Flyer”), verrebbe inquadrato nel profilo 3. Questa metodologia di classificazione si è dimostrata quindi essere molto duttile ed adattabile all’evoluzione della patologia, in un paziente complesso come lo è quello affetto da insufficienza cardiaca avanzata. Una analisi retrospettiva del registro ha confrontato le curve di sopravvivenza in base al profilo clinico del paziente confermando le potenzialità di questa classificazione come strumento per decidere il timing dell’impianto.

**Tabella 1. Livelli INTERMACS – Profili e tempistica di intervento (adattata da Stevenson et al) (24)**

Descrizione dei Profili INTERMACS	Tempistica di intervento
<b>Livello 1: Shock cardiogeno critico – “Crush and burn”</b>	Necessario intervento definitivo entro poche ore
Pazienti con ipotensione severa nonostante rapido aumento del supporto inotropo, “critica” ipoperfusione d’organo, spesso associata a peggioramento dell’acidosi e/o dei livelli di lattati	
<b>Livello 2: Declino progressivo – “Sliding on inotropes”</b>	Necessario intervento definitivo entro pochi giorni
Pazienti con declino funzionale nonostante supporto inotropo e.v., può manifestarsi con peggioramento della funzione renale, declino dello stato nutrizionale, impossibilità di ripristinare un adeguato equilibrio volmico. Descrive, inoltre, lo stato di declino di quei pazienti intolleranti alla terapia con inotropi (e.g. a causa di aritmie)	
<b>Livello 3: Stabile ma dipendente da inotropi – “Stabilmente dipendenti”</b>	Intervento definitivo elettivo nell’arco di settimane o pochi mesi
Pazienti con stabilità della pressione arteriosa, della funzione d’organo, dello stato nutrizionale e dei sintomi con supporto inotropo continuo e.v. (o con dispositivo supporto circolatorio temporaneo o entrambi), ma con ripetuti fallimenti dei tentativi di svezamento dal supporto inotropo/meccanico, a causa del ripresentarsi di ipotensione severa o disfunzione renale.	
<b>Livello 4: Sintomi a Riposo</b>	Intervento definitivo elettivo nell’arco di settimane o pochi mesi
Il paziente può essere stabilizzato in condizioni prossime all’euvoemia, ma presenta quotidianamente sintomi da congestione a riposo o durante le normali attività quotidiane. Generalmente il dosaggio del diuretico si attesta su valori molto alti. Devono essere adottati sia una gestione più intensiva che strategie di monitoraggio, che, in alcuni casi, possono compromettere la compliance e di conseguenza il risultato, con qualsiasi terapia. Alcuni pazienti possono fluttuare tra il livello 4 e 5.	
<b>Livello 5: Intolleranza all’esercizio</b>	Urgenza variabile, dipende dallo stato nutrizionale, dalla disfunzione d’organo e dalla tolleranza all’esercizio
Paziente asintomatico a riposo e durante le normali attività quotidiane, ma incapace di intraprendere qualsiasi altra attività, vivendo prevalentemente in casa. È un paziente asintomatico a riposo, ma può avere comunque un sovraccarico di volume refrattario alla terapia diuretica, e spesso associato a insufficienza renale.	

Livello 6: Limitazione all'esercizio – "walking wounded"	Variabile, dipende dallo stato nutrizionale, dalla disfunzione d'organo e dalla tolleranza all'esercizio
Il paziente, scervo da sovraccarico di volume, è asintomatico a riposo, durante le normali attività quotidiane e le piccole attività fuori casa, ma diventa rapidamente sintomatico dopo pochi minuti di attività fisica significativa. L'attribuzione ad un sottostante deficit cardiaco richiede una attenta misurazione del picco di consumo di ossigeno, e, in alcuni casi, una valutazione emodinamica, a conferma della severità della disfunzione cardiaca.	
Livello 7: NYHA III avanzata	Trapianto o supporto circolatorio potrebbero non essere indicati al momento
Questo livello si apre a future nuove descrizioni più precise. Include pazienti senza attuali o recenti episodi di instabilità e ritenzione di fluidi, che vivono asintomatici e sono in grado di tollerare attività fisiche significative fino all'attività fisica lieve.	
Eventi in grado di aggravare il profilo INTERMACS	
TCS – Temporary Circulatory Support (supporto circolatorio temporaneo)	Applicabile ai Livelli 1, 2, 3 di pazienti ospedalizzati
Include contropulsazione aortica (IABP), ECMO, TandemHeart, Levitronix, BVS5000 o AB5000, e Impella. Si applica solo a pazienti ricoverati in ospedale.	
A – Aritmia	Applicabile a tutti i Livelli INTERMACS
È applicabile a qualsiasi profilo. Tachi-aritmia ventricolare ricorrente che recentemente ha sostanzialmente contribuito alla compromissione clinica del paziente. Include frequenti interventi appropriati dell'ICD o la necessità di defibrillazione elettrica esterna, solitamente più di 2 volte a settimana.	
FF – "Frequent Flyer"	Livello 3, se a domicilio, 4, 5, 6. Un Paziente "Frequent Flyer" è raramente ad un livello 7
È applicabile solo a pazienti non ospedalizzati, descrivendo quei pazienti che richiedono frequenti rivalutazioni cliniche in emergenza o ospedalizzazioni per terapia diuretica, ultrafiltrazione, o infusione temporanea di terapia vasoattiva.	

Nel secondo rapporto annuale del registro INTERMACS, pubblicato nel 2010, sono riportate le curve di sopravvivenza di 1092 pazienti sottoposti ad impianto primario di assistenza sinistra (L-VAD) tra Luglio 2006 e Marzo 2009 (25). La sopravvivenza stratificata per livelli INTERMACS risultava peggiore quando i pazienti presentavano un livello 1 all'impianto, e ciò era in gran parte dovuto alla mortalità precoce di questi pazienti, già particolarmente compromessi prima dell'operazione. I risultati migliori si sono invece ottenuti nei pazienti con un livello 3, cioè in condizioni cliniche stabili ma in terapia con inotropi. Questo gruppo di pazienti aveva una sopravvivenza a 12 mesi intorno all'82%.

Sempre nella medesima popolazione, la stratificazione per tipo di flusso (continuo vs pulsatile), ha invece dimostrato una significativa superiorità, in termini di sopravvivenza, dei device a flusso

continuo (88% a 6 mesi) rispetto al flusso pulsatile (78% a 6 mesi) nei pazienti con indicazione a bridge to transplant o to candidacy.

## Quale assistenza ventricolare?

Le soluzioni tecniche a nostra disposizione sono riassunte in tabella 2.

**Tabella 2. Soluzioni Tecniche per il support meccanico al circolo**

<u>Tipologia di flusso</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Continuo</li> <li>- Pulsatile</li> <li>- semipulsatile</li> </ul>	<u>Posizionamento</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Extracorporeo</li> <li>- Paracorporeo</li> <li>- Intracorporeo</li> </ul>	<u>Principio di propulsione</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- A spostamento di volume</li> <li>- Turbine assiale</li> <li>- Pompa centrifuga</li> </ul>
<u>Conversione dell'energia</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Elettro -pneumatica</li> <li>-meccanica</li> <li>-magnetica</li> <li>-idraulica</li> <li>-Termomeccanica</li> </ul>	<u>Durata del supporto al circolo</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Temporaneo               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ore</li> <li>- Giorni</li> <li>- Settimane</li> </ul> </li> </ul>	<u>Tipo di funzione circolatoria</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Assistenza al ventricolo               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Sinistro (L-VAD)</li> <li>- Destro (R-VAD)</li> <li>- Bi-ventricolare (B-VAD)</li> </ul> </li> <li>- Sostituzione del Cuore</li> </ul>

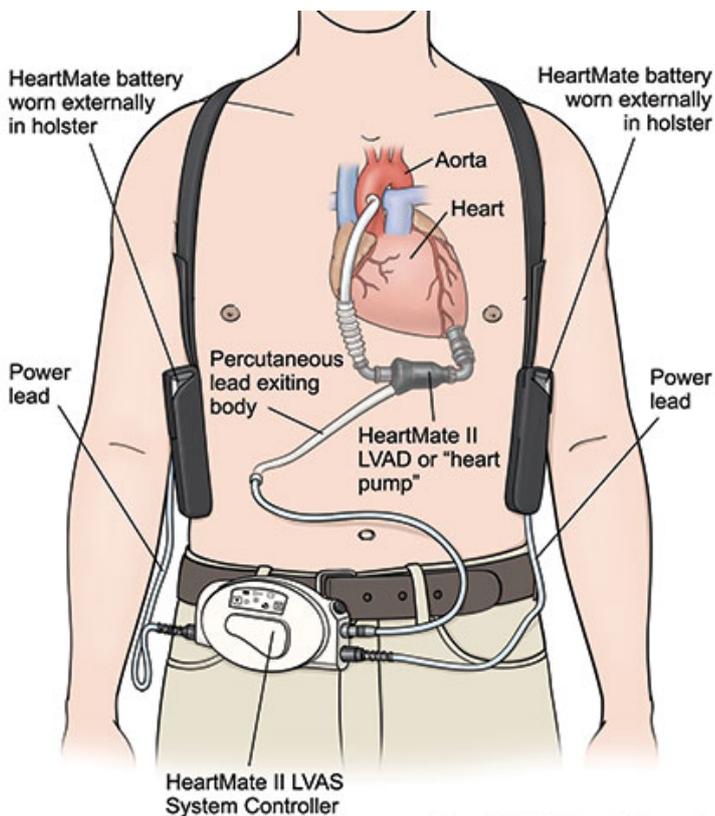
I device di assistenza meccanica al circolo possono essere principalmente classificati in base a:

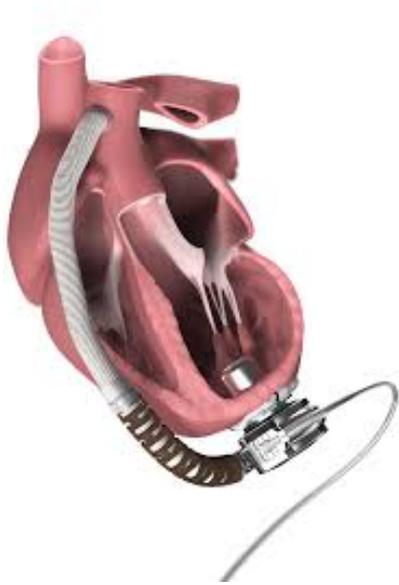
1. tipo di flusso generato: flusso pulsatile, come i sistemi tipo Thoratec, Excor, Novacor, Heartmate I, Abiomed, o continuo, come le pompe assiali tipo Heartmate II (Figura 3), Incor, DeBakey, Heartware e Jarvik 2000.
2. sede di impianto: *extracorporeo* (la pompa, l'ossigenatore, e la fonte di energia ed il sistema di controllo sono all'esterno del paziente, e sono collegati al cuore e ai grossi vasi dalle cannule di efflusso ed afflusso attraverso dei tramiti percutanei); *paracorporeo* (la pompa, la fonte di energia ed il sistema di controllo sono all'esterno del paziente, e sono collegati al cuore e ai grossi vasi dalle cannule di efflusso ed afflusso attraverso dei tramiti percutanei); *intracorporeo* (la pompa e quindi anche le cannule di efflusso ed afflusso sono all'interno del paziente, mentre il sistema di controllo e la fonte di energia sono all'esterno e sono collegati alla pompa tramite un cavo percutaneo). Il sistema Jarvik 2000 ha la possibilità di essere collegato al sistema di controllo non a livello addominale ma tramite un sistema "plug-in" fissato a livello della mastoide nella regione retroauricolare. Il sistema

LionHeart, caratterizzato dalla trasmissione transcutanea dell'energia senza fuoriuscita di cavi dal corpo del paziente, era stato proposto all'inizio degli anni 2000 ma il numero di impianti è stato molto limitato. Il problema della trasmissione percutanea di energia non è attualmente risolto;

3. possibilità di impiego come supporto ventricolare solo sinistro (come HeartMate I, HeartMate II, Incor, Heartware, DeBakey, Jarvik 2000) o sia mono- che bi- ventricolare (come Thoratec, Abiomed BVS 500, Medos, Impella);
4. potenziale durata del sistema di assistenza: breve (da qualche ora a pochi giorni: pompe centrifughe, Impella), media (intorno alle due-quattro settimane: sistemi paracorporei tipo Abiomed BVS 5000, Medos), lunga (da oltre quattro settimane a tempo, almeno potenzialmente, indeterminato: es. Heartmate, DeBakey, Incor, Heartware (Figura 4), Jarvik2000).

Figura 3 rappresentazione schematica di LVAD HeartMate II®





**Figura 4 LVAD Heartware**

I sistemi di assistenza ventricolare comunemente utilizzati (ad esclusione dei THA) constano di una cannula di afflusso (o cannula di in-flow – che porta il sangue dal ventricolo sinistro o dall’atrio destro al ventricolo artificiale), di una pompa (con uno di sistemi di propulsione del sangue sopraelencati), e di una cannula di efflusso (o cannula di out-flow – che convogliano il sangue in una grande arteria – solitamente aorta ascendente, più raramente aorta discendente toracica con approccio minitoracotomico). Nei sistemi a flusso continuo non vi è la camera ventricolare e quindi non c’è la necessità delle valvole artificiali. Nei sistemi a flusso pulsatile, le cannule di afflusso e di efflusso sono dotate di protesi valvolari cardiache biologiche o meccaniche. Le dimensioni di questi ultimi sono tali da richiedere la preparazione chirurgica di una tasca addominale nella quale alloggiare il ventricolo artificiale.

#### **Insufficienza cardiaca refrattaria in pazienti non candidabili al trapianto – Destination Therapy (DT) o Bridge to Candidacy (BTC)**

In questi casi, si prospetta un’assistenza di lunga durata, come trattamento definitivo e alternativo al trapianto. E’ mandatorio utilizzare device totalmente impiantabili, per garantire la mobilizzazione e la completa autonomia del paziente, tenendo presente il problema dell’affidabilità meccanica del device nell’uso prolungato. Lo studio REMATCH (12) valutò un gruppo di pazienti con insufficienza cardiaca refrattaria non idonei al trapianto per età avanzata o comorbidità, randomizzati a terapia medica (n=61) o a impianto di LVAD tipo HeartMate I (n=68). I pazienti di questo studio erano ospedalizzati, in classe NYHA IV, con FE <0.25, dipendenti da inotropi o con un consumo massimo di ossigeno <14 ml/Kg/min. La sopravvivenza è stata

significativamente maggiore nel gruppo LVAD (52% vs. 25% e 23% vs. 8% nei trattati in confronto ai controlli a 1 anno e a 2 anni rispettivamente). Anche gli eventi sono stati più numerosi nei trattati, per l'elevata incidenza di infezioni (6.45/pz/anno) e di problemi neurologici (0.56/pz/anno). Le principali cause di morte nei trattati sono state la sepsi (17 casi) e il malfunzionamento del device (7 casi); tra i controlli, 50 sono morti per peggioramento dello scompenso. Questo fu il primo studio randomizzato che dimostrò l'efficacia dell'assistenza meccanica al circolo in pazienti estremamente compromessi (mortalità >75% a 1 anno in terapia medica). Se la sopravvivenza a 12 mesi dei pazienti del REMATCH randomizzati ad L-VAD era del 52%, risultati ancora più incoraggianti li ritroviamo nei dati del registro INTERMACS pubblicati nel Gennaio 2010. Qui, la sopravvivenza dei pazienti sottoposti d impianto primario di L-VAD si attesta al 74% nell'intera popolazione, e, stratificando per livello INTERMACS, raggiunge l'82% nei pazienti con un livello INTERMACS 3 al momento dell'impianto (25). Una possibile controindicazione a trapianto cardiaco è la presenza di ipertensione polmonare non reversibile al test farmacologico. In letteratura ed anche nella nostra esperienza, in presenza di un ventricolo destro non severamente compromesso, l' "unload" ottenuto con un L-VAD è in grado di ottenere nella maggior parte dei pazienti un miglioramento significativo del profilo emodinamico e conseguente candidabilità del paziente a trapianto (26).

### **Bridge to recovery (BTR)**

Sebbene il recovery del ventricolo sia nelle speranze di ogni clinico e paziente, al momento dell'impianto non è possibile predire quali e a quanti pazienti potranno andare in contro ad un ripristino tale della funzione di pompa, da permettere l'espianto del device. Tuttavia, durante supporto prolungato con VAD, in una minoranza di pazienti si è osservato un miglioramento progressivo della funzione ventricolare sinistra, tale da consentire la rimozione del device, con

persistenza di una funzione ventricolare sinistra accettabile (>40%) per periodi di tempo più o meno prolungati (27). Si ritiene che l' unloading progressivo determinato dall' assistenza, la normalizzazione del regime emodinamico, la riduzione dell'attività simpatica (coadiuvata anche dal trattamento farmacologico con beta-bloccanti) siano responsabili del "reverse remodeling" osservato in corso di assistenza. A seconda dei Centri, sono stati utilizzati diversi protocolli per valutare e talora indurre in pazienti selezionati il recovery del cuore, impiegando regimi farmacologici mirati a stimolare l'ipertrofia/ipertrofia dei miociti. Tuttavia uno step fondamentale è la valutazione ecocardiografica del cuore a device fermo (pump-stop) o a flusso consistentemente ridotto. Va sconsigliata, inoltre, una rivalutazione a breve termine della capacità funzionale del paziente dopo espianto del device, in quanto il test provocativo (con farmaci o esercizio fisico massimale) potrebbe portare a nuova perdita di funzione del ventricolo. Solitamente i pazienti nei quali è possibile rimuovere il device, sono affetti da cardiomiopatia dilatativa idiopatica o da miocardite, hanno una storia di malattia più breve (attualmente è quasi impossibile pensare ad un recupero di un ventricolo danneggiato da cicatrici post-ischemiche), e vanno incontro a una riduzione del titolo di anticorpi anti-beta-recettori durante la permanenza in assistenza. Anche un maggior grado di riduzione dei valori plasmatici di peptide natriuretico cerebrale (BNP) potrebbe essere associato a una maggiore probabilità di weaning dall'assistenza (28). Va ricordato comunque che i pazienti con miglioramento stabile a distanza sono una minoranza di quelli posti in assistenza.

### **Il ruolo del ventricolo destro:**

la presenza di LVAD produce due effetti emodinamici principali: 1) decarica le sezioni sinistre del cuore provocando una caduta della pressione telediastolica atriale sinistra e della componente post-capillare delle resistenze vascolari polmonari; 2) aumenta la portata sistemica, il che a sua

volta determina un aumento del ritorno venoso sistemico e quindi del precarico del ventricolo destro. In questa situazione (precarico aumentato e postcarico ridotto), un ventricolo destro anche con una funzione sistolica ridotta sarà comunque in grado di garantire un'adeguata gittata sistolica, necessaria al riempimento del device di assistenza sinistra, purché non si sia già sviluppata un'ipertensione polmonare irreversibile che di fatto impedisce la necessaria caduta del postcarico. La grave insufficienza ventricolare destra post-impianto di LVAD si manifesta essenzialmente con una sindrome da bassa portata (la pompa non riceve un adeguato precarico dal sistema VD/circolo polmonare) associata a segni di congestione periferica. Il ricorso ad un supporto destro temporaneo (e.g. ECMO) viene valutata caso per caso, al momento dell'uscita dalla circolazione extracorporea. Alcuni centri ne fanno un uso più sistematico, mentre nell'esperienza del nostro Centro l'utilizzo di una assistenza ventricolare destra temporanea post-impianto di LVAD è stato episodico (29). Riteniamo che tale risultato sia dovuto sia alla attenta selezione dei pazienti che alla efficacia del trattamento farmacologico di sostegno al sistema ventricolo destro/circolo polmonare, che si avvale di inotropi e vasodilatatori e.v., ossido nitrico per via inalatoria nonché di una attenta gestione della volemia. Molti dei pazienti con severa disfunzione ventricolare sinistra che vengono trattati con L-VAD hanno un certo grado di disfunzione ventricolare destra per il cui sviluppo sono anche stati identificati alcuni fattori predittivi di rischio (30). I fattori di rischio più noti per insufficienza destra significativa post-operatoria sono:

- a. cardiopatia con *evidente/preminente interessamento del ventricolo destro* (che rappresenta, in sostanza, una controindicazione o meglio una non indicazione ad una assistenza solo sinistra): tra queste ricordiamo, ad esempio, la displasia ventricolare destra e gli esiti di esteso infarto ventricolare destro.

b. significativa *ipertensione polmonare preoperatoria*, con resistenze vascolari polmonari fisse, non reversibili in corso di test farmacologico con vasodilatatori in acuto. A questo proposito, è necessario porre particolare attenzione a quei pazienti con severa riduzione dell'indice cardiaco, in cui una disfunzione ventricolare destra determina l'incapacità a sviluppare una pressione adeguata in arteria polmonare. In questo caso, valori di pressione polmonare e di resistenze vascolari polmonari non particolarmente elevati possono mascherare invece una severa alterazione vascolare polmonare associata a severa disfunzione destra. Quadro che pregiudicherà drasticamente la performance emodinamica dopo l'impianto di L-VAD. Per tale motivo è indispensabile una approfondita valutazione multiparametrica della funzione ventricolo destro, che deve avvalersi di parametri ecocardiografici sia morfologici (e.g. dimensioni del ventricolo dx, axial/longitudinal index) che funzionali (TAPSE, PAPs, strain, strain-rate). Purtroppo non è stato ancora possibile individuare un cut-off univoco, e ognuno dei risultati ottenuti deve essere inserito in una valutazione d'insieme la più completa possibile.

### **Fattori di rischio**

I fattori di rischio generici riscontrati nelle varie esperienze (31-36) sono: l'età maggiore di 60 o 70 anni a seconda delle casistiche; pregressi interventi cardiocirurgici (sia per la necessità di una nuova sternotomia che per l'aumentato rischio di sanguinamento durante la lisi delle aderenze esiti del pregresso intervento); la disfunzione epatica, espressa dalla riduzione dell'attività protrombinica spontanea e/o dall'aumento della bilirubina (>3 mg/dl); l'insufficienza renale con oliguria (<30 ml/h); la presenza di infezione ( $T^{\circ}>39^{\circ}\text{C}$  e leucocitosi  $>15000/\text{mm}^3$  o di quadro emodinamico da sindrome settica); le condizioni del paziente legate alla bassa portata; la necessità di altri supporti quali il ventilatore meccanico o l'ultrafiltrazione; la cachessia come

indice di lunga durata dello scompenso. I pazienti, inoltre, non devono avere controindicazioni alla terapia anticoagulante e antiaggregante.

I problemi prettamente chirurgici comprendono la presenza di *valvulopatie* o di protesi valvolari, di patologie dell'aorta toracica o di shunt intracardiaci. In generale, la presenza di valvulopatie diverse dalla sola insufficienza mitralica (che trae ovviamente vantaggio dall'unloading del ventricolo sinistro) deve essere valutata attentamente in ogni singolo caso.

- La presenza di *insufficienza aortica* costituisce una controindicazione in quanto una significativa quota della portata della pompa, che viene espulsa in aorta ascendente dalla cannula di out-flow, ritornerebbe nel VS creando una sorta di corto-circuito tra aorta ascendente e ventricolo sinistro, dove la cannula di in-flow non farebbe che ripescare lo stesso sangue appena immesso in aorta. Le possibili soluzioni per porvi rimedio (comunque messe in pratica sporadicamente da centri ad elevata esperienza), sono essenzialmente tre. La strategia più utilizzata consiste nella sostituzione della valvola aortica con una valvola biologica. Alternativamente è possibile superare questo problema correggendo l'insufficienza conservativamente, o, ancora, chiudendo la radice aortica a livello sopracoronarico. Quest'ultima soluzione è gravata da un elevato rischio, dato che una eventuale disfunzione del dispositivo porterebbe inevitabilmente alla morte del paziente in brevi istanti, poiché, anche una possibile residua contrattilità del ventricolo incontrerebbe un ostacolo insuperabile all'efflusso ventricolare sinistro.
- La presenza di una *protesi aortica meccanica o di un tubo valvolato* (protesi valvolare aortica montata su una protesi vascolare che sostituisce l'aorta ascendente) rappresenta una controindicazione assoluta in quanto il device, drenando sangue dal ventricolo sinistro, aggrava notevolmente la "fisiologica" insufficienza intrapotesica.

- La presenza di una *significativa patologia dell'aorta toracica* (dilatazione e/o presenza di estese calcificazioni) rappresenta un fattore di rischio e una potenziale controindicazione, per la possibilità di lacerazione della parete aortica o per impossibilità di confezionare adeguatamente l'anastomosi della cannula di efflusso (quella che porta il sangue dalla pompa al circolo sistemico). Allo stato attuale queste patologie meritano una attenta valutazione individuale perché le esperienze in questo senso sono molto limitate; nel nostro Centro, in qualche caso è stata corretta con successo la presenza di insufficienza valvolare aortica e di difetti del setto interatriale, contestualmente all'impianto dell'assistenza meccanica.

Altri aspetti importanti nell'indicazione all'assistenza, specie se prevista di medio-lungo periodo (ponte al trapianto o terapia definitiva), sono quelli psicologici e organizzativi: il paziente, oltre che conoscere e accettare i potenziali vantaggi ed i rischi dell'intervento, deve essere in grado di tollerare la dipendenza dall'apparecchiatura (inclusa la sua eventuale rumorosità), di comprendere e seguire le istruzioni per la gestione domiciliare, di recarsi presso il Centro competente in tempi brevi in caso di problemi significativi.

Attualmente i più importanti fattori determinanti il successo dell'assistenza rimangono l'indicazione ed il timing dell'intervento. Le figure professionali coinvolte devono avere una buona conoscenza ed esperienza clinica in questo campo così complesso. Devono conoscere non solo le opzioni di terapia medica ma in eguale misura comprendere la reale efficacia e affidabilità dei vari dispositivi, così come il ruolo del TxC nel trattamento di questi pazienti. E' essenziale maturare una esperienza con vari dispositivi perché un singolo sistema di assistenza ventricolare non può essere appropriato in tutti i pazienti.

### L'attività di impianto LVAD a Niguarda

1988: impianto di cuore artificiale come ponte al trapianto cardiaco, tra i primi in Europa e al mondo

1990: primo impianto in Italia di device d'assistenza ventricolare intracorporeo

2000: trapiantato con successo il paziente con la più lunga assistenza ventricolare al mondo

2000: primo impianto con successo in Italia di assistenza ventricolare a flusso continuo

2002: primo impianto in Italia di turbina intra-ventricolare

Al 2015 sono stati impiantati più di 100 dispositivi di assistenza ventricolare meccanica di lungo periodo, di cui 78 a flusso continuo.

## SensorART - A remote controlled Sensorized ARTificial heart enabling patients empowerment and new therapy approaches (Project Identifier: FP7-2009-ICT-248763)

Il progetto SensorART, si è aggiudicato i fondi per la ricerca messi a disposizione dalla Comunità Europea nell'ambito del FP7-2009 ICT for Health, con un finanziamento di € 6,240,000 su un totale di € 8,551,897. Il progetto della durata di 4 anni, inizia nel 01/03/2010. Gli enti partecipanti al consorzio sono elencati in tabella 3.

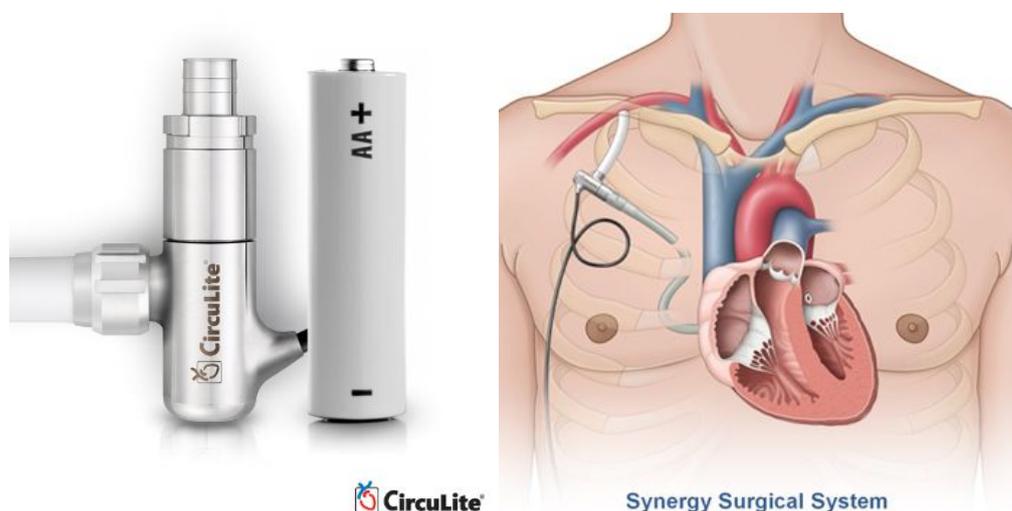
Per una descrizione dettagliata di ogni ente si rimanda alla pagina internet dedicata [http://www.sensorart.eu/index.php?option=com\\_content&view=article&id=6&Itemid=4](http://www.sensorart.eu/index.php?option=com_content&view=article&id=6&Itemid=4)

SensorART è focalizzato sulla gestione ed il trattamento da remoto dei pazienti affetti da insufficienza cardiaca avanzata. A tal fine il progetto ha sviluppato avanzamenti tecnologici nel campo dell'ICT (Information Communication Technology) mediante la realizzazione di componenti altamente innovativi.

### VAD munito di sensori e controllato in modalità wireless.

Il partner industriale Circulite GmbH ha messo a disposizione il sistema di assistenza circolatoria CircuLite Synergy Pocket Micro-Pump (CircuLite Inc., Saddle Brook, NJ, USA), un VAD a flusso continuo miniaturizzato (delle dimensioni di una batteria AA) (Figura 5a),

Figura 5a e 5b. CircuLite Synergy Pocket Micro-Pump



impiantato con una procedura senza circolazione extracorporea attraverso una minitoracotomia destra (Figura 5b). Il dispositivo pompa sangue dall'atrio sinistro alla succlavia destra, con una portata nominale massima di 4.25 l/min. Il sistema assicura pertanto un supporto emodinamico parziale, coadiuvando e non sostituendo la funzione cardiaca nativa. L'assunto alla base dello sviluppo di questo dispositivo è che una procedura di impianto meno invasiva può permettere di allargare l'impiego dei VAD anche

**Tabella 3. Elenco enti partecipanti al consorzio SensoART.**

N.	Nome	Sigla	Nazione
1	Consiglio Nazionale Delle Ricerche	CNR	Italy 
2	Scuola Superiore Di Studi Universitari e di Perfezionamento Sant'Anna	SSSA	Italy 
3	Katholieke Universiteit Leuven	Kuleuven	Belgium 
4	Azienda Ospedaliera Ospedale Niguarda Ca' Granda	Honig	Italy 
5	Implemental Systems SL	IS	Spain 
6	Foundation For Research And Technology Hellas	FORTH	Greece 
7	Circulite GMBH	CL	Germany 
8	Universite Claude Bernard Lyon 1	UCBL	France 
9	DataseL Bilgi Sistemleri As	DataseL	Turkey 
10	Institute of Biocybernetics and Biomedical Engineering - Polish Academy of Sciences	IBBE-PAS	Poland 
11	Velti Anonymos Etairia Proionton Logismikou & Synafon Proionton & Ypiresion	VLT	Greece 

12	Intrarom S.A.	Intrarom	Romania 
13	Em-tec GmbH	Em-tec	Germany 

a pazienti con insufficienza cardiaca avanzata ma non terminale e/o più fragili di coloro che sono attualmente candidati all'impianto di VAD. All'interno di SensoART, la Katholieke Universiteit Leuven ha sviluppato e implementato in Synergy un sensore di flusso a livello della cannula di out-flow ed un sensore di pressione a livello della cannula di inflow. Attualmente, sul mercato, solo un dispositivo è dotato di sensore doppler di flusso per la stima diretta reale della portata del VAD, mentre tutti gli altri dispositivi propongono un sistema di stima indiretta della portata derivante dal consumo di corrente del VAD, dando luogo a possibili errori di valutazione. Con il sensore di flusso messo a punto in SensorART è invece possibile, attraverso una stima puntuale, conoscere esattamente il flusso erogato dal VAD, permettendo di riconoscere rapidamente e con certezza eventuali malfunzionamenti e aiutando a individuarne la causa. Nessun dispositivo attualmente sul mercato è invece dotato di un sensore di pressione a monte della pompa. Questo tipo di innovazione permette una accurata valutazione del range ottimale di velocità della pompa sulla base del precarico, ed aiuta ad evitare complicanze, molto frequenti negli altri dispositivi, legate a fenomeni di suzione (trombo-embolia, aritmie, emolisi). In collaborazione con Em-tec GmbH e Scuola Superiore Di Studi Universitari e di Perfezionamento Sant'Anna sono invece stati sviluppati gli hardware e i software in grado di raccogliere i dati dei sensori e della pompa (in modalità wired) in una unità interna (Internal Control Unit - ICU) impiantata nel paziente assieme al VAD, e di inviarli, in modalità wireless, ad un controller esterno portatile. A causa dell'impossibilità di

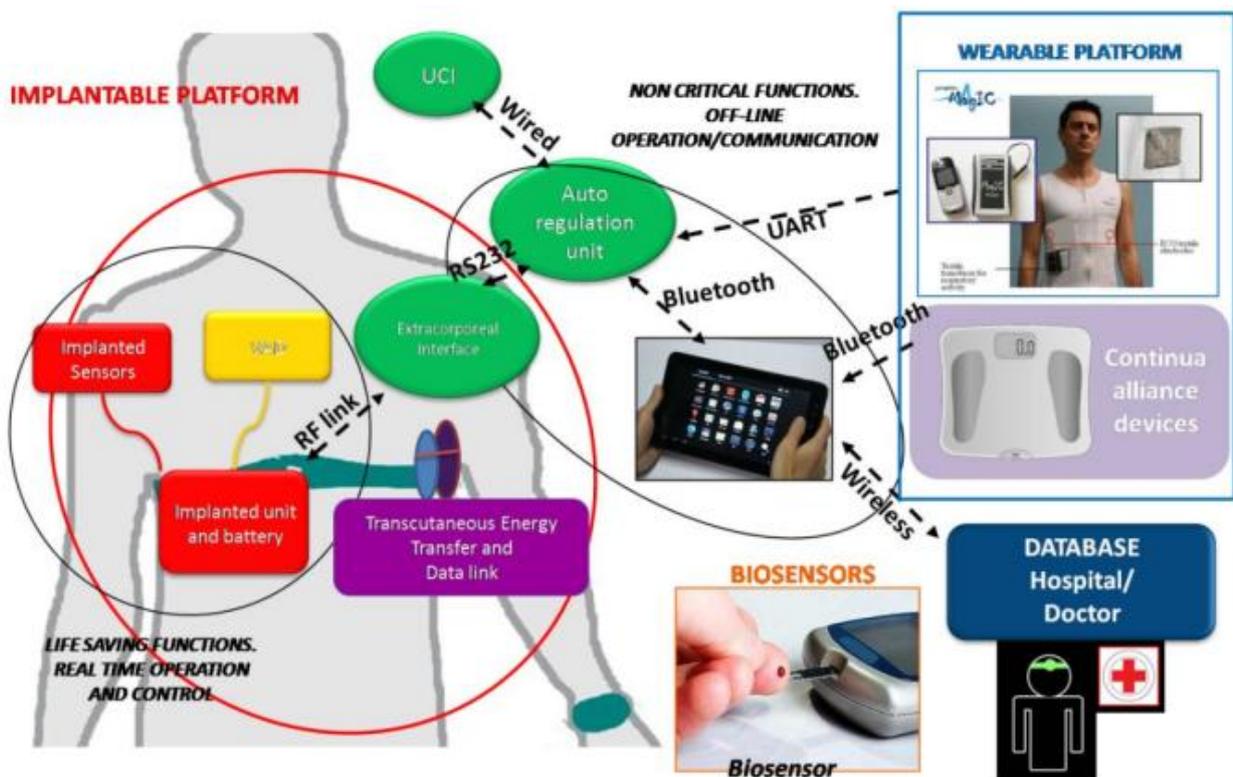
dimostrare, nel breve arco di tempo del progetto (4 anni), la safety di un algoritmo di autoregolazione del VAD, il controller esterno è stato sviluppato in 2 modalità:

- 1) Unità di autoregolazione (Auto-Regulation-Unit – ARU) come “*proof-of-concept*”, dimostrando in-vitro la possibilità di modulare la velocità del VAD, e quindi la sua performance, adattandosi in automatico (senza cioè l'intervento dell'operatore sanitario) allo stato di salute del paziente ed alle sue richieste motorie ed emotive. Il test è stato eseguito inviando alla ARU i parametri fisiologici di un paziente reale (frequenza cardiaca, frequenza respiratoria, accelerazioni del paziente nello spazio) raccolti tramite dei sensori indossabili dal paziente (di cui si parlerà in seguito). La ARU variava quindi la performance di un VAD in vitro sulla base di un algoritmo che prende in considerazione anche i dati derivanti dal sensore di flusso e di pressione sviluppati in SensorART e indicativi del grado di adattamento del VAD alle richieste del paziente.
- 2) Unità di controllo esterna (External-Control-Unit – ECU) come semplice unità di controllo del VAD che riceve i dati e li trasmette in modalità bi-direzionale sia alla Patient's Monitoring Application (PMA) che alla Specialist's Monitoring Application (SMA). Tramite quest'ultima è poi possibile, oltre a monitorare i parametri del VAD, modificarne da remoto le impostazioni di funzionamento (velocità della turbina, soglie allarmi, etc) inviando il comando alla ECU che a sua volta lo invierà alla ICU.

### **Sistema di trasmissione transucatea dell'energia (Transcutaneous Energy Transmission System - TET).**

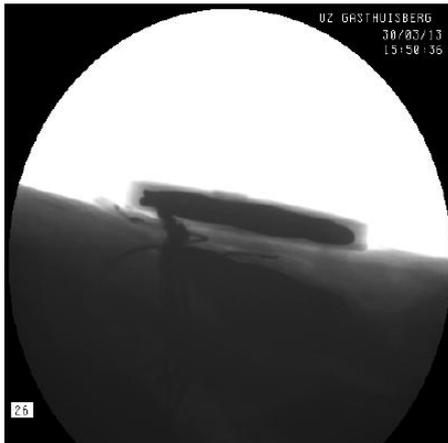
Em-tec GmbH ha sviluppato un sistema per la transimmissione transcutanea di energia necessaria a ricaricare la batteria interna del VAD. Allo stato attuale, le batterie che forniscono al VAD l'energia necessaria al suo funzionamento sono esterne al copro e

Figura 6. Schema architettura piattaforma SensorART



collegate alla pompa tramite un cavo elettrico transcutaneo che, partendo dalla pompa, viene tunnellizzato nel sottocute fino a fuoriuscire in sede addominale o retroauricolare. Attualmente il cavo di alimentazione transcutaneo viene considerato una delle maggiori criticità poiché gravato da complicanze, quali severe infezioni del tramite cutaneo o danneggiamento del cavo stesso, che compromettono fortemente l'outcome dei pazienti portatori di VAD. La realizzazione di un sistema TET funzionante (Figura 7), rappresenta uno dei traguardi di maggiore interesse e con il più alto impatto clinico raggiunto da SensorArt, oltre che mai raggiunto prima ad un così avanzato stato di concretizzazione. Le criticità nello sviluppo di questa tecnologia comprendono, tra le altre, il rischio di elevata temperatura cutanea nel sito di erogazione dell'energia, la necessità di accoppiamento dei coil sottocutanei con quelli esterni e l'interferenza dei campi magnetici con la trasmissione wireless dei dati, sia di gestione della VAD che di acquisizione dei dati provenienti dai sensori.

**Figura 7. Immagine a Raggi-X della TET impiantata su animale da esperimento**



### **Unità di monitoraggio del paziente (Patient's Monitoring Application - PMA).**

La PMA è frutto della collaborazione tra Velti Anonymos Etairia Proionton Logismikou & Synafon Proionton & Ypiresion, Datasel Bilgi Sistemleri As, Consiglio Nazionale Delle Ricerche, Scuola Superiore Di Studi Universitari e di Perfezionamento Sant'Anna, Katholieke Universiteit Leuven e l'Azienda Ospedaliera Ospedale Niguarda Ca' Granda. A dispetto del nome, questa unità non costituisce solo un utile strumento nelle mani del paziente per monitorare i parametri del VAD e registrare il proprio stato di salute, ma è un tassello fondamentale nell'architettura del progetto SensorART. Si tratta di un software installato su un tablet con sistema operativo Android© con le seguenti funzioni

- permettere al paziente di accedere ad una applicazione specifica :
  - visualizzare i parametri del proprio VAD
  - inserire manualmente informazioni cliniche come diuresi, peso, introito idrico, pressione arteriosa sistemica, etc
  - collegare il tablet tramite Bluetooth a dispositivi per l'upload automatico di dati clinici (peso, pressione arteriosa, saturimetria, etc) da dispositivi che utilizzano il protocollo di scambio dati Connected Health Alliance (<http://www.continuaalliance.org/>)

- agenda per la pianificazione dei controlli clinici in ospedale o da remoto
- una chat per la comunicazione diretta con il personale sanitario
- un tasto di allarme che, premuto in caso di emergenza, mostra i numeri di telefono da contattare e le precauzioni da prendere nella gestione del primo soccorso.

Al fine di misurare il grado di usabilità dell'interfaccia utente, essa è stata sottoposta a più revisioni sulla base di sedute di test con pazienti a bassa scolarità e con età superiore ai 65 anni .

- ricevere in automatico i dati provenienti dal VAD, dai sensori sia impiantabili che indossabili, nonché del VAD e del suo stato di funzionamento, e trasmetterli al database centrale di SensorART.

### **Unità dedicata al personale sanitario per la gestione da remoto del paziente portatore di VAD (Specialists' Monitoring Application - SMA).**

La SMA si suddivide in 3 applicazioni principali:

- 1) una sezione è finalizzata alla monitorizzazione dei dati del VAD e del paziente inviati dalla PMA al server centrale di SensorART. Questa applicazione permette la loro organizzazione in un database dotato di interfaccia web suddivisa per paziente e a cui è possibile accedere con delle credenziali di accesso personali e con un diverso grado di privilegi e funzionalità in base al potere decisionale/competenza dell'utente nell'eventuale modifica dei parametri del VAD (dai medici VAD specialist con il massimo grado di privilegi fino alla figura con il minimo dei privilegi, in grado di consultare parzialmente i dati, ma senza poter apportare alcuna modifica). Sono inoltre presenti delle funzionalità avanzate per la gestione del paziente, quali la visualizzazione dei valori sia puntuale che organizzata in grafici mensili/semestrali/annuali, la possibilità di impostare allarmi, con diverso grado di

priorità, in caso di parametri provenienti dai sensori (impiantabili/indossabili) fuori range, e l'invio di comandi per la variazione delle impostazioni di funzionamento del VAD. Il sistema è inoltre in grado di eseguire l'upload dei dati di laboratorio (esami ematochimici) sotto forma di referti elettronici in pdf e di acquisirne i singoli valori organizzandoli nel database del paziente. È poi presente un'agenda per la gestione del follow-up con la possibilità di inviare e ricevere conferma degli appuntamenti, e di una chat tra l'operatore sanitario ed il paziente.

- 2) Una applicazione più complessa e articolata chiamata Specialist' Decision Support System (SDSS). Questa applicazione, sviluppata da Foundation for Research and Technology-Hellas (FORTH) in collaborazione con Katholieke Universiteit Leuven e Azienda Ospedaliera Ospedale Niguarda Ca' Granda, è composta da più moduli finalizzati a supportare le decisioni del medico nella cura dei pazienti portatori di VAD tramite l'analisi avanzata del database generale di SensorART. Accanto a moduli con funzionalità prettamente statistiche (in grado di eseguire analisi statistiche del database quali medie, mediane, deviazioni standard, test parametrici e non parametrici per l'analisi delle medie o delle frequenze, curve di sopravvivenza) sono presenti moduli che utilizzano funzionalità di intelligenza artificiale per analizzare il database generale di SensorART e aiutare nella previsione degli eventi avversi, nella loro diagnosi o nel provare a prevedere l'outcome in base a tentativi di modifiche della terapia del paziente o delle impostazioni di funzionamento del VAD. Sono inoltre presenti moduli che permettono di calcolare gli score di rischio dei pazienti affetti da insufficienza cardiaca avanzata ed in previsione di un eventuale impianto di VAD. La SDSS è quindi uno strumento fondamentale che affianca il medico specialista, supportandone le decisioni con risultati di analisi di

intelligenza artificiale che prende in considerazione tutti i dati (compresi quelli inviati dai sensori) e gli eventi registrati nel database di SensorART. La sfida vinta nello sviluppo della SDSS di SensorART è stata la capacità di sviluppare algoritmi di intelligenza artificiale che solitamente lavorano su popolazioni numericamente elevate, adattandoli alle ridotte dimensioni delle popolazione di pazienti attualmente impiantati con VAD.

- 3) Un modulo dedicato alla formazione del personale sanitario, chiamato Learning Module System (LMS), nell'ambito dell'insufficienza cardiaca avanzata e dei VAD, sviluppato da INTRAROM e popolato di contenuti scientifici da Azienda Ospedaliera Ospedale Niguarda Ca' Granda e Consiglio Nazionale delle Ricerche. LMS permette di accedere a documenti scientifici e/o contenuti multimediali e di conseguire delle certificazioni sulla base dei risultati di test creati ad hoc per valutare il grado di competenza in ambito VAD. LMS è inoltre collegato ad sia ad un simulatore numerico ed uno ibrido (meccanico e numerico assemblati assieme) del sistema cardiovascolare che permette ai partecipanti al corso di esercitarsi sulle indicazioni e la gestione del VAD su un paziente virtuale.

Come per la PMA, anche la SMA è stata sottoposta a più revisioni sulla base di sedute di test con gli specialisti volte a misurarne il grado di usabilità sia dell'interfaccia che delle funzionalità progettate al suo interno.

#### **Unità di sensori indossabili dal paziente.**

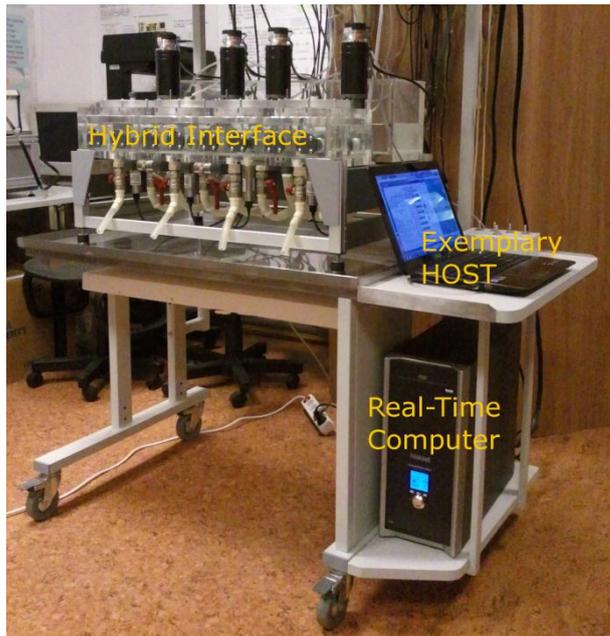
Accanto ai sensori impiantabili, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Scuola Superiore Di Studi Universitari e di Perfezionamento Sant'Anna, Katholieke Universiteit Leuven e l'Azienda Ospedaliera Ospedale Niguarda Ca' Granda hanno implementato all'interno di

SensorART la possibilità di utilizzare un dispositivo indossabile dal paziente, messo a punto dalla Fondazione Don Carlo Gnocchi, per la rilevazione di 3 parametri clinici: ECG monotraccia, frequenza respiratoria e movimento nello spazio del paziente. Il dispositivo è formato da una particolare maglietta, aderente al corpo del paziente, dotata di elettrodi, e collegata ad un dispositivo che raccoglie i suddetti parametri e li invia alla PMA.

### **Simulatore numerico e simulatore Ibrido.**

Consiglio Nazionale delle Ricerche ha invece modellizzato, dal punto di vista bio-informatico, il sistema cardiocircolatorio, creando un simulatore numerico dotato dei principali fattori che lo caratterizzano dal punto di vista emodinamico, quali inotropismo, cronotropismo, sistema di resistenze vascolari polmonari e periferiche. Il simulatore è stato poi progettato per rispondere in maniera fisiologica ad eventi quali la modifica di parametri come frequenza cardiaca, pressione o volemia, o a circostanze come l'utilizzo di alcuni farmaci o l'impianto di un VAD. Il simulatore numerico è stato poi unito ad un simulatore meccanico del cuore messo a punto da Institute of Biocybernetics and Biomedical Engineering - Polish Academy of Sciences, dando vita ad un simulatore ibrido (numerico/meccanico) in grado di superare i limiti di entrambe le metodiche (Figura 8). È quindi stato creato un paziente virtuale sui cui è possibile esercitarsi o simulare i parametri di pazienti reali al fine di riprodurre la risposta di quel paziente alla somministrazione di farmaci o all'impianto di VAD.

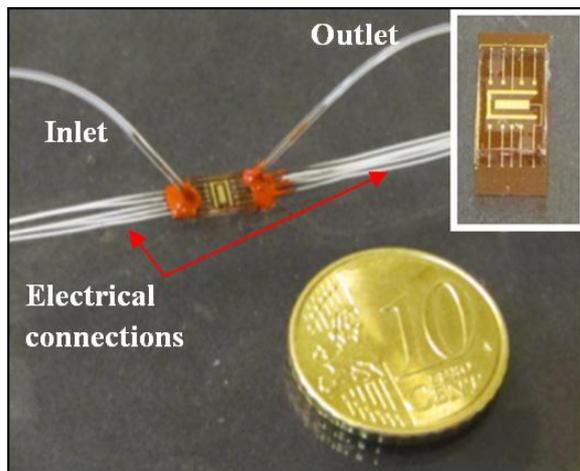
**Figura 8. Simulatore Ibrido**



#### **Analisi dei biomarcatori / Point-of-Care.**

Uno degli obiettivi principali di SensorART è quello di identificare i pazienti che con più alte probabilità sarebbero andati incontro ad un recupero del cuore nativo durante assistenza con VAD. Per fare questo sono state percorse 2 linee di ricerca volte a indagare l'infiammazione e lo stress ossidativo da un lato, e lo studio dei microRNA dall'altro. L'analisi dei parametri più significativi andrà successivamente a far parte di quello che viene definito Point-of-Care (Figura ), cioè un dispositivo domiciliare in grado di analizzare in poche gocce di sangue (simile all'attuale misurazione domiciliare della glicemia) i livelli dei biomarcatori giudicati più significativi sulla base delle attività di ricerca svolte in SensorART. Universite Claude Bernard Lyon ha infatti messo a punto un innovativo sistema di dosaggio dei suddetti biomarcatori. Il sistema è poi stato validato in collaborazione con Azienda Ospedaliera Ospedale Niguarda Ca' Granda e Consiglio Nazionale delle Ricerche. I dati derivanti dal Poin-of-Care vengono inviati in automatico alla PMA.

Figura 9. BioLab-on-a-chip formulated with gold microelectrodes on flexible PI with electrical connections for the WE, CE, and RE respectively. The inlet and outlet for the PDMS microfluidic devices are observed for the introduction of LVAD patient samples



### Le esigenze di innovazione

Attualmente i VAD sono utilizzati principalmente come un ponte per il trapianto di cuore, tuttavia l'indicazione alla "destination therapy" sta sempre più prendendo spazio sia a causa della carenza di donatori di cuore, che per l'aumento dell'incidenza dell'IC correlata all'invecchiamento della società. Ci sono prove sperimentali che "l'unloading" del ventricolo sinistro, ottenuto tramite il VAD, porta al rimodellamento inverso e al miglioramento della funzione cardiaca. Tuttavia, anche se si osservano un "recovery" cellulare e un miglioramento della funzione ventricolare, nella maggior parte dei pazienti con insufficienza cardiaca cronica, il grado di guarigione clinica è insufficiente per giustificare la rimozione del VAD dispositivo.

Alcune esperienze cliniche riportano la possibilità di migliorare la funzione cardiaca nella misura in cui il paziente potrebbe essere svezzato dal dispositivo ed eventualmente evitare il trapianto di cuore. I meccanismi alla base del rimodellamento inverso sono, tuttavia, non ben compresi.

Da un punto di vista sperimentale, ci sono prove che VADs impiantati precocemente su modelli animali permettono di sviluppare pressione e portata con evidenza di recovery dopo un periodo di assistenza temporanea. I meccanismi di recupero miocardico e il tempo necessario sono ancora

sconosciuti poiché oggi i VAD sono impiantati principalmente su pazienti affetti da insufficienza cardiaca terminale con insufficienza multiorgano. Tuttavia, anche in alcuni pazienti affetti da cardiomiopatia idiopatica con insufficienza cardiaca avanzata terminale, è stato possibile ottenere una importante riduzione delle dimensioni del ventricolo sinistro durante supporto con LVAD, con un miglioramento o addirittura il ripristino della funzione cardiaca. L'incidenza di recovery, sufficiente a consentire l'espianto del LVAD in pazienti affetti da cardiomiopatia cronica, varia dal 18 al 72% a seconda dell'esperienza clinica riportata in letteratura. Sta quindi emergendo l'importante ed il significato clinico della strategia bridge-to-recovery. Permette l'utilizzo del VAD:

- a. come alternativa al trapianto di cuore in un'epoca caratterizzata dalla scarsità dei donatori
- b. in caso di complicanze pericolose per la vita (ad esempio ricorrente tromboembolia o infezione del dispositivo)
- c. quando il trapianto non è controindicato

Inoltre, vi è evidenza che i pazienti hanno una migliore qualità della vita a seguito del recovery rispetto ai pazienti ancora impiantati o sottoposti a trapianto di cuore. Questa possibilità va approfondita anche nei giovani, dove il buon recupero della capacità funzionale ottenuto grazie al VAD porta ad una più bassa probabilità di essere trapiantati e un'alta probabilità di assistenza ventricolare a lungo termine.

Per facilitare tale approccio rivoluzionario, il progetto SensorART mira a comprendere meglio le interazioni paziente-dispositivo attraverso una strategia di monitoraggio remoto supportato dai sensori miniaturizzati impiantabili di flusso e pressioni al fine di:

- personalizzare e ottimizzare il grado di “unloading” del ventricolo sinistro
- comprendere i segnali biumorali durante l'assistenza ventricolare e i possibili cambiamenti cellulari prima e dopo l'impianto di un VAD

- misurare la capacità del cuore naturale di sviluppare portata maggiore o minore a seconda del tempo di assistenza con VAD
- individuare i tempi di recupero e i meccanismi nonché i segnali bioumorali in pazienti assistiti con VAD per comprenderne i risultati potenziali

I sensori indossabili possono inoltre consentire di valutare l'interazione paziente/VAD, al fine di identificare l'effettivo contributo del cuore nativo. Questo può diventare importante quando si vuole valutare l'effetto di farmaci o altre terapie (cellule staminali) sul recupero del ventricolo sinistro. Infine, il monitoraggio della funzione cardiaca nativa durante l'attività giornaliera può dare informazioni circa il contributo di quest'ultima sul recupero del miocardio.

## La ricerca clinica sull'infiammazione

All'interno del progetto di ricerca SensorART si inserisce il contenuto principale del mio percorso di ricerca nell'ambito della Scuola di Dottorato.

Al fine di meglio comprendere i meccanismi cellulari alla base delle modifiche strutturali del cuore dopo impianto di VAD, è stata eseguita una valutazione di differenti biomarcatori implicati nel nell'outcome clinico dei pazienti affetti da insufficienza cardiaca allo stadio terminale (end-stage heart failure – ESHF) prima e dopo impianto di VAD.

Il capitolo è diviso in due parti: la prima parte mostra il ruolo di parametri infiammatori e non-infiammatori nei pazienti affetti da ESHF e sottoposti ad impianto di LVAD presso l'Azienda Ospedaliera Ospedale Niguarda Ca' Granda. La seconda parte descrive le attività di ricerca focalizzate per identificare diversi biomarcatori, relativi a diverse vie metaboliche, connessi con il recupero funzionale o parziale rimodellamento inverso del cuore supportato da LVAD.

## Studio dei biomarcatori nei pazienti sottoposti a impianto di VAD

I pazienti con insufficienza cardiaca allo stadio terminale candidati a impianto di LVAD, e caratterizzati da un deterioramento della della funzione renale, hanno maggiori probabilità avere un decorso clinico post-impianto critico o sviluppare una grave sindrome da insufficienza multiorgano (MOFS), spesso destinata a evolvere verso un esito sfavorevole.

Il comportamento del sistema infiammatorio è stato valutato sia durante la fase acuta post-impianto di LVAD (1 mese), che considerando una fase più prolungata (fino a 1 anno), per valutare se l'attivazione infiammatoria persiste anche durante la fase successiva di supporto con LVAD, influenzando eventuali complicanze a lungo termine di questi pazienti. Infatti, se la MOFS è la

principale complicazione nella fase acuta, le infezioni ed gli eventi trombotici si manifestano principalmente nel lungo periodo.

### **Biomarcatori di infiammazione nella fase iniziale di supporto LVAD**

La valutazione di biomarcatori infiammatori coinvolti nell'outcome clinico è stata eseguita in 55 ESHF-pazienti impiantati con LVAD come ponte verso il trapianto, presso il Dipartimento Cardiovascolare dell'Azienda Ospedaliera Ospedale Niguarda Ca' Granda di Milano. Trentuno dei 55 pazienti sono stati arruolati dall'inizio del progetto SensorART, mentre i dati degli altri pazienti sono stati ottenuti dal database storico. Cinquantaquattro pazienti hanno ricevuto un dispositivo a flusso continuo assiale [8 De Bakey LVADs (MicroMed Tecnologia, Houston, TX), 6 Incor LVADs (Berlin Heart AG, Germania), 7 HeartWare (HeartWare International, Inc, Framingham, MA), e 33 LVADs HeartMate II (Thoratec, Pleasanton, CA)], mentre una pompa pulsatile-flow (Novacor mondiale del cuore, Oakland, CA) è stata impiantata in un solo paziente.

I mediatori di infiammazione indagati sono state:

- a. C-reactive protein (CRP) nel siero, attualmente il principale biomarker di infiammazione utilizzato di routine nelle Unità di terapia intensiva (UTI) per il monitoraggio di infiammazione nei pazienti impiantati con LVAD
- b. le citochine pro-infiammatorie, IL-1, IL-6, IL-8 e il fattore di necrosi tumorale (TNF) - (con il metodo ELISA, Cayman e R & D Systems),
- c. le citochine antinfiammatorie, IL-10 e l'antagonista recettoriale di IL-1 (IL-1ra) - (con il metodo ELISA; R & S Systems)
- d. Neopterin urinaria, normalizzata per creatinina (rapporto Neo/Cr), conosciuto come marker di attivazione dei monociti.

Tutti i pazienti hanno firmato consenso informato scritto acconsentendo al prelievo di campioni biologici ed al trattamento dei dati personali a fini di ricerca.

Durante il primo mese, sono stati raccolti campioni biologici per ottenere campioni di plasma ed urina necessarie per i dosaggi di mediatori dell'infiammazione al

- T1: pre-impianto
- T2: 4 ore
- T3: 24 ore
- T4: 72 ore
- T5: 1 settimana
- T6: 2 settimane
- T7: 4 settimane

dopo impianto di VAD. In seguito, i campioni sono stati raccolti ogni mese fino al 6 ° mese, e a 9 e 12 mesi dopo LVAD.

L'eventuale MOFS è stata valutata nel pre-operatorio e fino ad un massimo di 2 settimane dopo, attraverso il t-SOFA (total Sequential Organ Failure Assessment). Lo score SOFA, usato per predire la mortalità in UTI (intensive Care Unit - UTI), è un punteggio giornaliero da 0-4, assegnato in proporzione alla gravità del deterioramento funzionale per ciascuno dei 6 sistemi di organi (cardiovascolare, respiratorio, epatico, renale, neurologico, ed emocoagulativo). Diversi studi hanno riportato che, dopo chirurgia cardiaca, il grado di gravità della MOFS sviluppato nei primi giorni in UTI è associato al risultato clinico. Punteggi più alti t-SOFA sono proposti come utili predittori di outcome (37); indipendentemente dal punteggio iniziale, un incremento del punteggio t-SOFA di 8-11 durante le prime 48 ore è associato a tassi di mortalità che vanno dal 60% al 90%. Nei nostri dati, un aumento nei punteggi t-SOFA  $\geq 11$  durante le prime settimane in UTI, è considerato come punteggio soglia per distinguere quei pazienti impiantati con LVAD in

procinto di sviluppare una grave MOFS, rispetto a quelli che hanno subito un danno multiorgano moderato (t-SOFA punteggio <11).

I profili infiammatori sono stati confrontati con i diversi outcome per valutare l'influenza dell'infiammazione nei meccanismi biologici degli eventi avversi e le complicanze durante LVAD. I principali outcome considerati sono stati: lo sviluppo di gravi MOFS, definito dal punteggio postoperatorio t-SOFA  $\geq 11$ , e/o la morte in Unità di Terapia Intensiva (outcome composito) e la sopravvivenza durante i primi tre mesi.

Poiché nei pazienti arruolati si sono verificate diverse complicanze durante i primi mesi di supporto con LVAD (es. MOFS reversibile, eventi emorragici, infezioni), sono stati considerati anche altri esiti surrogati che riflettono la gravità delle varie complicanze e del decorso clinico, come ad esempio il grado di punteggio t-SOFA a 1 settimana postoperatoria, la durata della permanenza in UTI e dell'ospedalizzazione (durata dell'ospedalizzazione compreso il tempo in UTI).

### **Caratteristiche dei pazienti LVAD con esito critico composito**

Come riportato nella tabella 4, l'età media era di 55 (48-61) anni, con prevalenza di pazienti maschi (93%). Tredici (24%) pazienti sono stati classificati con profilo INTERMACS 1, 14 (25%) con il profilo INTERMACS 2, 27 (49%) con un profilo INTERMACS 3 e 1 (2%) con il profilo INTERMACS 4. I pazienti arruolati erano affetti da cardiopatia ischemica e cardiomiopatia dilatativa idiopatica con frequenza paragonabile. I pazienti presentavano una severa disfunzione emodinamica, con indice cardiaco (Cardiac Index – CI) estremamente basso e alti valori di pressione capillare polmonare (PCWP); un rimodellamento cardiaco avanzato con bassi valori di frazione di eiezione del ventricolo sinistro (EFLV) e un aumento severo del Volume telediastolico del ventricolo sinistro (Tabella 4).

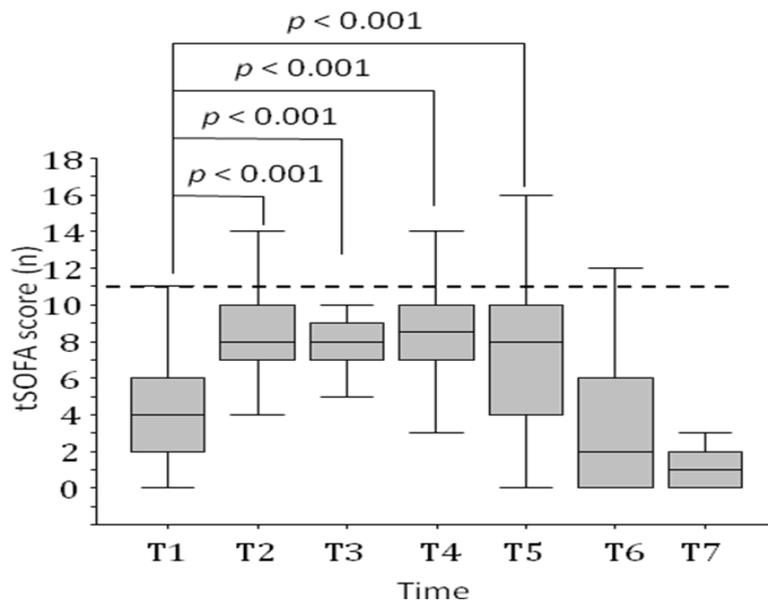
Tabella 4. Caratteristiche cliniche della popolazione in studio

	All cases	Without composite outcome	With composite outcome	P	OR	95% CI
	(n=55)	(A-Group = 36)	(B-Group = 19)			
Age, yrs	55 [48-61]	54 [47-60]	56 [54-64]	0.098	1.058	0.990 – 1.130
Male gender, n (%)	51 (93)	35 (97)	16 (84)	0.115	0.152	0.015 – 1.581
INTERMACS profile, n (%)						
1+2	27 (49)	17 (47)	10 (53)	0.776	10.176	0.385 – 3.599
3+4	28 (51)	19 (53)	9 (47)	Reference		-
Etiology, n (%)						
ICM	26 (47)	16 (44)	10 (53)	0.564	1.389	0.455 – 4.235
IDC	29 (53)	20 (56)	9 (47)	Reference		-
sP-selectin/PLT, pg/10 <sup>6</sup>	226 [151-445]	216 [158-420]	312 [132-507]	0.464	1.001	0.999 – 1.002
Neo/Cr ratio, µmol/mmol	0.28 [0.19-0.45]	0.27 [0.17-0.45]	0.31 [0.23-0.57]	0.645	0.773	0.259 – 2.309
MAP, mmHg	75 [70-82]	77 [72-82]	74 [68-83]	0.404	0.972	0.911 – 1.038
LVEF, %	22 [18-26]	23 [18-26]	20 [17-26]	0.189	0.923	0.819 – 1.040
LVEDV, mL	259 [190-312]	259 [190-330]	259 [185-302]	0.506	0.998	0.990 – 1.005
RAP, mmHg	6.0 [3.5-10.0]	6.0 [3.0-8.3]	9.0 [4.0-14.0]	0.148	1.095	0.968 – 1.240
PCWP, mmHg	25 [18-30]	24 [17-30]	26 [20-33]	0.642	1.016	0.950 – 1.086
CI, L/min/m <sup>2</sup>	1.68 [1.46-1.93]	1.70 [1.51-2.00]	1.55 [1.33-1.76]	0.063	0.197	0.036 – 1.095
Treatments, n (%)						
ACEi+ATII	38 (73)	26 (74)	12 (71)	0.778	0.831	0.229 – 3.017
Beta-Blocker	39 (72)	26 (74)	13 (68)	0.646	0.750	0.219 – 2.563
Statins	18 (35)	12 (35)	6 (33)	0.888	0.917	0.274 – 3.063
Diuretic	14 (26)	9 (25)	5 (26)	0.915	1.071	0.301 – 3.814
Inotropic	34 (65)	22 (65)	12 (67)	0.888	1.091	0.327 – 3.645
Inotropic equivalents, n	3.0 [0-8.0]	3.0 [0-8.3]	3.5 [0-8.3]	0.963	1.003	0.890 – 1.129
IABP, n (%)	19 (36)	12 (34)	7 (39)	0.741	1.220	0.376 – 3.957
WBC, 10 <sup>9</sup> /L	8.3 [6.3-10.0]	8.3 [6.7-11.1]	8.3 [5.7-8.8]	0.916	0.992	0.852 – 1.155
INR, n	1.14 [1.08-1.41]	1.13 [1.03-1.43]	1.20 [1.11-1.36]	0.729	0.977	0.859 – 1.112
Lactate, mg/dL	1.20 [0.75-1.75]	1.30 [0.80-1.70]	1.00 [0.70-2.45]	0.343	1.231	0.801 – 1.891
eGFR, ml/min/1.73m <sup>2</sup>	79 [55-92]	84 [67-107]	58 [48-73]	0.007	0.959	0.930 – 0.988
t-Bil, mg/dL	0.91 [0.60-1.72]	0.85 [0.55-1.77]	1.02 [0.62-1.55]	0.721	1.122	0.596 – 2.114
tSOFA score, n	4.0 [2.0-6.0]	3.50 [2.00-5.00]	5.00 [3.00-6.00]	0.040	1.309	1.012 – 1.693
NT-proBNP, ng/L	2342 [1333-5739]	2370 [1226-5721]	2307 [1467-11667]	0.190	1.000	1.000 – 1.000
<b>Perioperative data</b>						
Surgery time, min	315 [263-381]	308 [266-373]	330 [240-390]	0.583	1.002	0.996 – 1.007
CPB time, min	83 [71-104]	80 [66-106]	92 [75-100]	0.639	1.005	0.985 – 1.025

Data are expressed as median and interquartile range [25th-75th] or number (percentage). ACEi, angiotensin converting enzyme inhibitor; ATII, angiotensin II receptor antagonists; CI, cardiac index; CPB, cardiopulmonary bypass; eGFR, estimated glomerular filtrate rate; IABP, intraortic balloon pump; IDC, idiopathic dilated cardiomyopathy; ICM, ischemic cardiomyopathy; INR, International Normalized Ratio; INTERMACS, Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support; LVEDV, left ventricular end-diastolic volume; LVEF, left ventricular ejection fraction; MAP, mean arterial pressure; NT-proBNP, N-terminal pro-hormone of brain natriuretic peptide; NYHA, New York Heart Association; PCWP, pulmonary capillary wedge pressure; RAP, right atrial pressure; tBil, total bilirubine, tSOFA, total Sequential Organ Failure Assessment; WBC, white blood cells count.

**Figura 10** Figure 1 Time course of the t-SOFA score in all LVAD-patients.

The tSOFA score  $\geq 11$  is pointed out by a dashed line. T1, pre-implant; T2, 4 hours after LVAD implantation; T3, 24 hours after LVAD implantation; T4, 72 hours after LVAD implantation; T5, 1 week after LVAD implantation; T6, 2 weeks after LVAD implantation; T7, 4 weeks after LVAD implantation. Differences from baseline by Friedman text corrected by Wilcoxon text.



Dopo 1 settimana di supporto con LVAD, è stato osservato un miglioramento emodinamico in tutti i pazienti con un aumento di CI [1,7 (1,5-1,9) vs 3,0 (2,5-3,5) L/min/m<sup>2</sup> rispettivamente al pre-impianto e a 1-settimana post-LVAD,  $p < 0.001$ ] e una riduzione della PCWP [25 (18-30) contro 11 (8-13) mmHg rispettivamente al pre-impianto e a 1 settimana di post-LVAD,  $p < 0.001$ ]. Al contrario, il punteggio t-SOFA è risultato significativamente aumentato 1 giorno dopo l'intervento rispetto al valore pre-impianto (figura 10), raggiungendo i valori più elevati a 3 giorni e 1 settimana postoperatoria. A 2 settimane dopo l'intervento, il punteggio t-SOFA era paragonabile al basale (Figura 10).

Durante la permanenza in UTI 10 pazienti su 55 (18%) sono deceduti in seguito a MOFS, shock settico ed emorragia esofagea [10 (14-29) giorni]. Tra i sopravvissuti, la durata del soggiorno UTI è stato di 12 (9-18) giorni, mentre l'ospedalizzazione di 49 (41-77) giorni. Nove dei pazienti sopravvissuti hanno sviluppato una grave insufficienza multi-organo postoperatoria con un t-SOFA  $\geq 11$  (Figura 1). Diciannove dei 55 pazienti (35%) hanno mostrato un punteggio postoperatorio t-

SOFA  $\geq 11$  e/o morte in Unità di Terapia Intensiva (gruppo B), outcome composito che riflette un decorso complicato, mentre gli altri 36 pazienti hanno avuto un punteggio postoperatorio t-SOFA  $< 11$  (gruppo A). insufficienza cardiaca destra e insufficienza renale sono state le principali complicanze che hanno contribuito all'aumento del t-SOFA. Infatti, insufficienza cardiaca destra post-operatoria, definita come pressione atriale destra post-operatoria  $> 10$  mmHg e/o necessità inotropi  $> 10$ , è stata significativamente più frequente nel gruppo B rispetto al gruppo A (95 vs 60%, rispettivamente,  $p = 0,009$ ), così come, l'insufficienza renale, definita come filtrato glomerulare stimato (eGFR) postoperatorio  $< 60$  ml/min/1,73m<sup>2</sup> o riduzione postoperatoria eGFR  $> 25\%$  rispetto al basale (T1), era risultata essere significativamente più frequente nel gruppo B rispetto al gruppo A (84 vs. 50%, rispettivamente,  $p = 0,019$ ). Le caratteristiche pre-impianto dettagliate e dati perioperatori di questi 2 gruppi sono descritti nella Tabella 4.

**Tabella 5. Univariable logistic regression analysis of inflammatory variables associated to patient group with composite critical outcome**

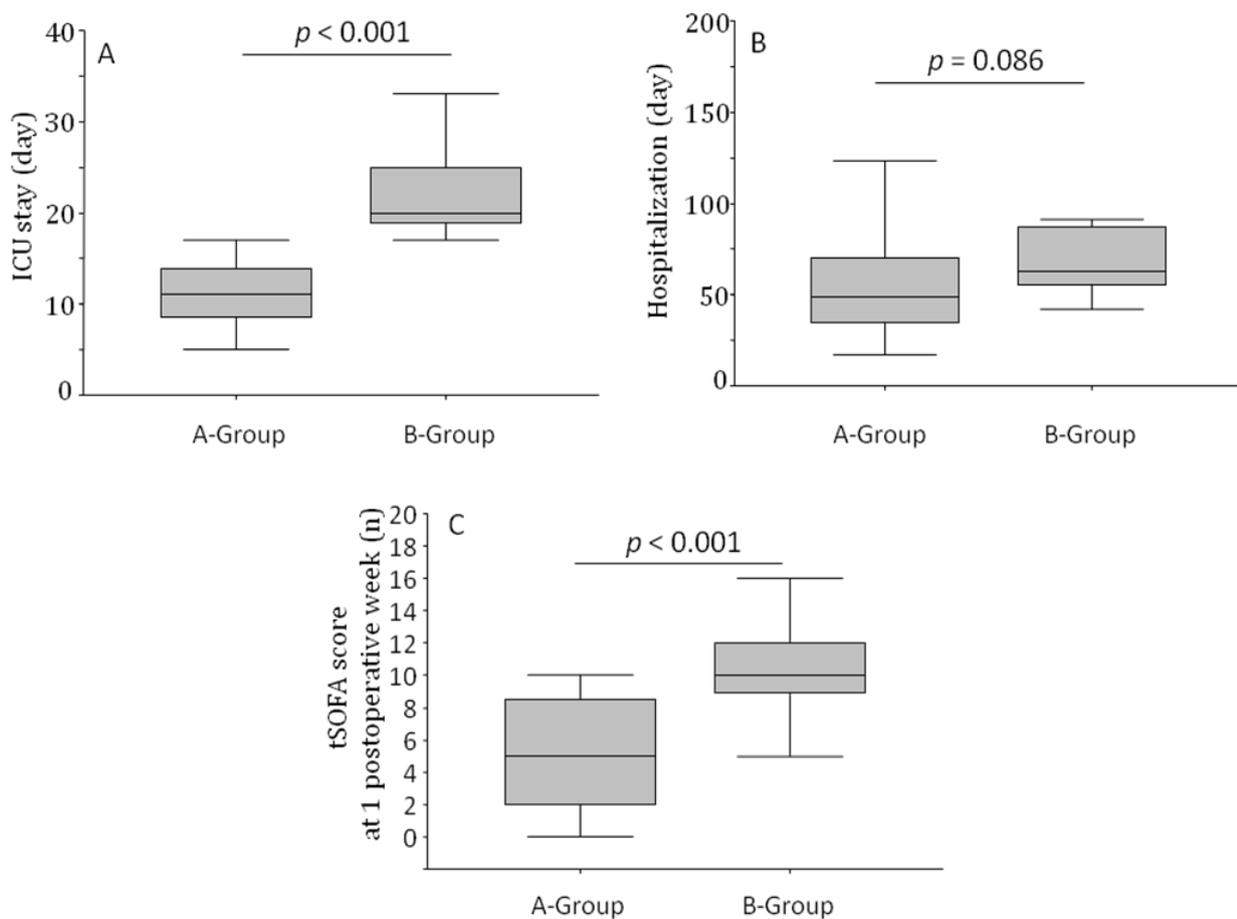
	All cases (n=55)	Without composite outcome (A-Group = 36)	With composite outcome (B-Group = 19)	P	OR	95% CI
IL-1 $\beta$ , pg/mL	16.3 [10.0-28.1]	17.8 [10.5-30.7]	13.7 [9.5-25.1]	0.381	0.980	0.936 - 1.026
TNF- $\alpha$ , pg/mL	8.6 [5.1-10.9]	6.9 [4.9-10.0]	9.6 [7.7-12.7]	0.763	1.012	0.936 - 1.095
IL-6, pg/mL	8.8 [3.3-24.9]	5.9 [2.5-21.4]	18.2 [8.4-25.8]	0.260	1.006	0.995 - 1.017
IL-8, pg/mL	6.30 [4.40-11.30]	6.35 [4.42-9.80]	6.30 [3.80-16.30]	0.156	1.048	0.982 - 1.119
CRP, mg/dL	1.30 [0.40-3.10]	1.00 [0.30-2.83]	2.20 [0.80-8.20]	0.068	1.168	0.989 - 1.379
IL-10, pg/mL	0.20 [0-5.83]	0.20 [0-5.65]	0.85 [0-6.18]	0.637	0.993	0.965 - 1.022
IL-1ra, pg/mL	499 [294-928]	407 [279-708]	674 [308-1448]	0.092	1.001	1.000 - 1.002
sICAM-1, pg/mL	296 [218-397]	279 [216-412]	306 [210-406]	0.717	1.000	0.998 - 1.003
sP-selectin/PLT, pg/10 <sup>6</sup>	226 [151-445]	216 [158-420]	312 [132-507]	0.464	1.001	0.999 - 1.002
Neo/Cr ratio, $\mu$ mol/mmol	0.28 [0.19-0.45]	0.27 [0.17-0.45]	0.31 [0.23-0.57]	0.645	0.773	0.259 - 2.309

Data are expressed as median and interquartile range [25th-75th]. CRP, C-reactive protein; IL, interleukin; Neo/Cr, neopterin levels normalized by urine creatinine levels; sICAM-1, soluble form of intercellular adhesion molecule type 1; sP-selectin/PLT, soluble platelet selectin normalized by platelet count; TNF, tumor necrosis factor.

I livelli di pre-impianto di biomarcatori infiammatori sono descritti nella Tabella 5. Tra le variabili infiammatorie, solo CRP e IL-1Ra si sono distribuiti in modo diverso tra i gruppi. Le variabili nelle

tabelle 4 e 5 che hanno raggiunto il livello di significatività di  $p < 0,10$  sono stati inseriti nell'analisi di regressione logistica multivariata finale. L'unico parametro associato in modo indipendente con l'outcome composito è stato il valore pre-impianto eGFR (OR 0,942, 95% CI 0,896-,989,  $p = 0.017$ ), suggerendo che i candidati ad LVAD con funzione renale peggiore erano più inclini a sperimentare un decorso complicato dopo l'impianto.

**Figura 11. Length of Intensive Care Unit stay, hospitalisation and 1-week tSOFA score**



Length of ICU stay (A), hospitalisation (B) and 1-week tSOFA score (C) according to composite critical outcome. A-group: patients with adverse composite outcome; B-group: patients without adverse composite outcome.

**Tabella 6. Ordinal logistic regression analysis of pre-implant variables associated to patient group with adverse outcome**

	max tSOFA score <11	max tSOFA score ≥11	P	OR	95% CI
	(A-Group = 36)	Positive Outcome (B-Group = 9)			
Age, yrs	54 [47-60]	55 [49-62]			
Male gender, n (%)	35 (97)	8 (89)	0.057	1.066	0.997-1.140
INTERMACS profile, n (%)			0.080	0.172	0.024-1.230
1+2	17 (49)	5 (56)	0.821	1.134	0.381-3.379
3+4	19 (51)	4 (44)	reference		-
Etiology, n (%)					
ICM	26 (47)	16 (44)	0.564	1.389	0.498-4.405
IDC	29 (53)	20 (56)	reference		-
MAP, mmHg	77 [72-82]	75 [69-83]	0.464	0.976	0.917-1.039
LVEF, %	23 [18-26]	25 [18-28]	0.153	0.919	0.817-1.033
LVEDV, mL	259 [190-330]	289 [180-315]	0.469	0.997	0.989-1.005
RAP, mmHg	6.0 [3.0-8.3]	6.0 [3.5-14.5]	0.195	1.080	0.960-1.215
PCWP, mmHg	24 [17-30]	20 [12-32]	0.483	1.024	0.958-1.095
CI, L/min/m <sup>2</sup>	1.70 [1.51-2.00]	1.34 [1.08-1.55]	0.157	0.330	0.071-1.532
Treatments, n (%)					
ACEi+ATII	26 (74)	5 (63)	0.893	0.917	0.257-3.271
Beta-Blocker	26 (74)	7 (78)	0.516	0.674	0.206-2.212
Statins	12 (35)	3 (33)	0.890	0.920	0.283-2.995
Diuretic	9 (25)	4 (44)	0.812	0.857	0.242-3.041
Inotropic	22 (65)	6 (67)	0.890	1.087	0.334-3.536
Inotropic equivalents, n	3.0 [0-8.3]	3.0 [0-7.5]	0.854	1.011	0.901-1.135
IABP, n (%)	12 (34)	3 (33)	0.669	1.285	0.408-4.045
INR, n	8.3 [6.7-11.1]	8.7 [5.8-15.8]	0.674	0.968	0.830-1.127
Lactate, mg/dL	1.13 [1.03-1.43]	1.20 [1.09-1.32]	0.733	0.977	0.855-1.117
eGFR, ml/min/1.73m <sup>2</sup>	1.30 [0.80-1.70]	1.10 [0.73-2.25]	0.558	1.062	0.869-1.297
t-Bil, mg/dL	84 [67-107]	57 [49-72]	0.005	0.959	0.931-0.987
tSOFA score, n	0.85 [0.55-1.77]	1.08 [0.90-2.15]	0.909	1.037	0.555-1.937
NT-proBNP, ng/L	3.50 [2.00-5.00]	4.00 [3.00-75.00]	0.030	1.313	1.027-1.677
2370 [1226-5721]	2271 [1453-8649]	2342 [1423-12874]	0.149	1.000	1.000-1.000
<b>Perioperative data</b>					
Surgery time, min	308 [266-373]	345 [315-445]	0.840	1.001	0.995-1.007
CPB time, min	80 [66-106]	93 [69-119]	0.722	1.003	0.984-1.023

Data are expressed as median and interquartile range (25th-75th) or number (percentage). ACEi, angiotensin converting enzyme inhibitor; ATII, receptorial antagonist of AT1 receptor; t-Bil, total Bilirubin; CI, cardiac index; CPB, cardiopulmonary by-pass; DCM, dilated cardiomyopathy; eGFR, estimated glomerular filtrate rate; IABP, intraortic balloon pump; ICM, ischemic cardiomyopathy; INP, International Normalized Ratio; INTERMACS, Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support; LVEF, left ventricular ejection fraction; LVEDV, left ventricular end-diastolic volume; MAP, mean arterial pressure; NT-proBNP, N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide; PCWP, pulmonary capillary wedge pressure; RAP, right atrial pressure; tSOFA, total Sequential Organ Failure Assessment; WBC, white blood cell count.

## Permanenza in UTI, in ospedale, e il punteggio t-SOFA a 1 settimana in base all'outcome composito

I pazienti con outcome composito sfavorevole, hanno mostrato una più prolungata permanenza UTI rispetto ai pazienti con outcome favorevole (Figura 11A). Il punteggio t-SOFA a 1 settimana dopo l'impianto, era più alto nei pazienti avverso outcome composito sfavorevole (Figura 11C).

Come sopra riportato, durante il soggiorno in UTI, 19 pazienti hanno avuto un t-SOFA  $\geq 11$ , e, tra questi, 10 pazienti (53% di questo gruppo, e il 18% tra tutti i casi) sono deceduti per MOFS, come causa primaria o secondaria di morte. Gli altri trentasei pazienti hanno presentato una MOFS moderata t-SOFA post-operatorio  $< 11$ , ed erano tutti vivi a 3 mesi dopo l'intervento. Questi dati suggeriscono che i pazienti LVAD con MOFS grave possono mostrare una diversa evoluzione quadro clinico.

I candidati al LVAD sono quindi stati divisi retrospettivamente in 3 gruppi in base al grado di severità della MOFS e dell'outcome a 3 mesi. Trentasei pazienti con t-SOFA  $< 11$  e senza eventi avversi sono stati assegnati al gruppo A; 9 pazienti con esito favorevole a 3 mesi, ma con t-SOFA  $\geq 11$  sono stati assegnati al gruppo B, mentre gli altri 10 pazienti con t-SOFA segnare  $\geq 11$  o deceduti sono stati assegnati al gruppo C. Caratteristiche dettagliate pre-impianto e dati perioperatorie di questi 3 gruppi sono descritti nella Tabella 6.

Anche in questo caso un basso eGFR e un elevato t-SOFA caratterizzavano negativamente l'outcome a 3 mesi (Gruppi B e C vs gruppo A). Eziologia, profili INTERMACS, parametri ecocardiografici ed emodinamici erano comparabili tra i gruppi. L'età e la percentuale di pazienti con sesso maschile sono stati diversamente distribuiti tra i gruppi, ma solo come tendenza (Tabella 6).

Caratteristiche dettagliate pre-impianto dei biomarcatori di infiammazione tra i gruppi sono descritti nella Tabella 7.

**Tabella 7. Ordinal logistic regression analysis of pre-implant inflammatory variables associated to patient group with adverse outcome**

	max tSOFA score <11	max tSOFA score ≥11		P	OR	95% CI
	(A-Group = 36)	Positive Outcome (B-Group = 9)	Negative Outcome (C-Group = 10)			
IL-1β, pg/mL	17.8 [10.5-30.7]	21.4 [10.5-35.8]	12.9 [9.1-19.5]	0.272	0.974	0.931-1.019
TNF-α, pg/mL	6.9 [4.9-10.0]	10.3 [2.6-16.3]	9.5 [9.1-11.4]	0.715	1.014	0.941-1.093
IL-6, pg/mL	5.9 [2.5-21.4]	17.8 [6.1-118.7]	20.2 [8.4-25.8]	0.554	1.002	0.994-1.010
IL-8, pg/mL	6.35 [4.42-9.80]	5.50 [3.70-15.95]	6.30 [4.73-21.05]	0.083	1.051	0.993-1.113
CRP, mg/dL	1.00 [0.30-2.83]	2.20 [0.90-12.85]	1.55 [0.75-3.28]	0.282	1.057	0.956-1.168
IL-10, pg/mL	0.20 [0-5.65]	1.65 [0-6.19]	0.85 [0-7.15]	0.649	0.994	0.967-1.022
IL-1ra, pg/mL	407 [279-708]	785 [268-1955]	674 [419-1086]	0.150	1.001	1.001-1.001
sICAM-1, pg/mL	279 [216-412]	332 [220-676]	283 [182-328]	0.972	1.000	0.998-1.002
sP-selectin/PLT, pg/10 <sup>6</sup>	216 [158-420]	410 [217-622]	232 [105-356]	0.829	1.000	0.988-1.012
Neo/Cr ratio, μmol/mmol	0.27 [0.17-0.45]	0.32 [0.15-0.50]	0.27 [0.23-0.59]	0.650	0.780	0.998-1.002

Data are expressed as median and interquartile range [25th-75th]. CRP, C-reactive protein; IL, interleukin; Neo/Cr, neopterin levels normalized by urine creatinine levels; sICAM-1, soluble form of intercellular adhesion molecule type 1; sP-selectin/PLT, soluble platelet selectin normalized by platelet count; TNF,

Le variabili nelle tabelle 6 e 7 che hanno raggiunto il livello di significatività con  $p < 0,10$  sono stati utilizzate per l'analisi di regressione logistica ordinale multivariata. Gli unici parametri associati in modo indipendente ad un outcome positivo (Gruppo A) sono stati: valori pre-impianto più elevati di eGFR (OR 0,962, 95% CI ,932-,992,  $P = 0.013$ ) e maggiore frequenza di sesso maschile (OR 0,112, 95% CI 0,013-0,926,  $p = 0,042$ ). Questi dati suggeriscono che i candidati LVAD, maschi e con una migliore funzione renale sono più inclini ad avere un decorso clinico senza complicanze.

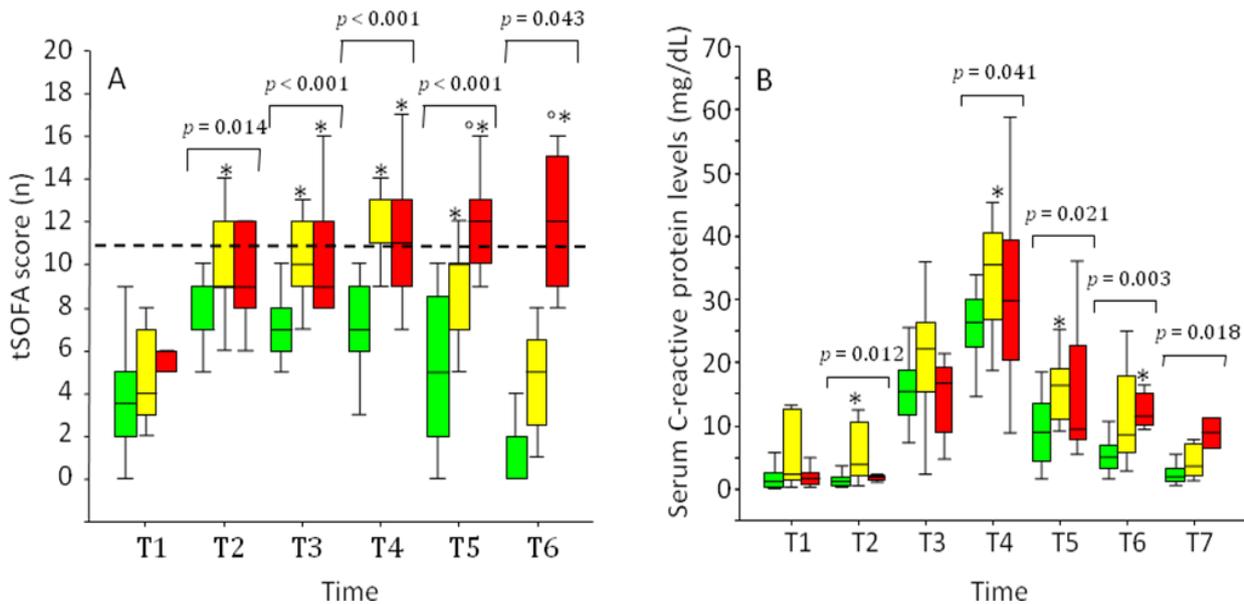
### **Emodinamica postoperatoria, t-SOFA e CRP tra i pazienti LVAD con diversa evoluzione della MOFS severa**

Il recupero post-operatorio e il miglioramento emodinamico sono risultati essere simili tra i due gruppi e si sono mantenuti durante supporto LVAD.

Durante la prima settimana post-operatoria, il punteggio t-SOFA cambiato in tutti i gruppi in maniera significativa ( $p < 0.001$ ); a 1-3 giorni il valore è stato costantemente più alto nei pazienti dei gruppi B e C rispetto al gruppo A (Figura 12A). A 7 e 14 giorni, il punteggio t-SOFA è diminuito nei

gruppi e A e B, mentre nel gruppo C è rimasto significativamente più elevato anche rispetto al solo gruppo B (Figura 12A). Questi dati suggeriscono la seconda settimana postoperatoria come periodo cruciale per valutare la prognosi precoce (3 mesi) nei pazienti caratterizzati da gravi disfunzioni multiorgano.

**Figura 12. Time course of the t-SOFA score and CRP levels**



Time course of the t-SOFA score (A) and CRP levels (B) in patients that experienced postoperative maximal tSOFA score < 11 (Group A: green box-plots), and patients with postoperative maximal tSOFA score  $\geq 11$ , with positive (Group B: yellow box-plots) or negative (Group C: red box-plots) 3-month outcome. The tSOFA score  $\geq 11$  is pointed out by a dashed line. T1, pre-implant; T2, 4 hours after LVAD implantation; T3, 24 hours after LVAD implantation; T4, 72 hours after LVAD implantation; T5, 1 week after LVAD implantation; T6, 2 weeks after LVAD implantation; T7, 4 weeks after LVAD implantation. P-values are for differences among groups at each time-point by Kruskal-Wallis text. \*p < 0.05 vs Group A by Mann-Whitney text corrected by Bonferroni. °p < 0.05 vs Group B by Mann-Whitney text corrected by Bonferroni.

I livelli sierici di CRP, l'indicatore principale dell'infiammazione comunemente impiegato nella gestione clinica dei pazienti portatori di un MCS, mostra un aumento rispetto al basale in tutti i gruppi di pazienti (p per il tempo < 0.01), con livelli di picco a 3 giorni comparabili tra il gruppo A e B e C (Figura 12B). Dopo 1 settimana dall'impianto, solo i livelli di CRP nei pazienti del gruppo B erano superiori a quelli dei pazienti del Gruppo A, mentre a 14 giorni, solo i livelli di CRP nei

pazienti del gruppo C, erano superiori a quelli del gruppo A. Inoltre non è stata osservata alcuna differenza significativa tra i pazienti dei gruppi B e C (Figura 12B).

### **Profili postoperatori delle citochine pro-infiammatorie**

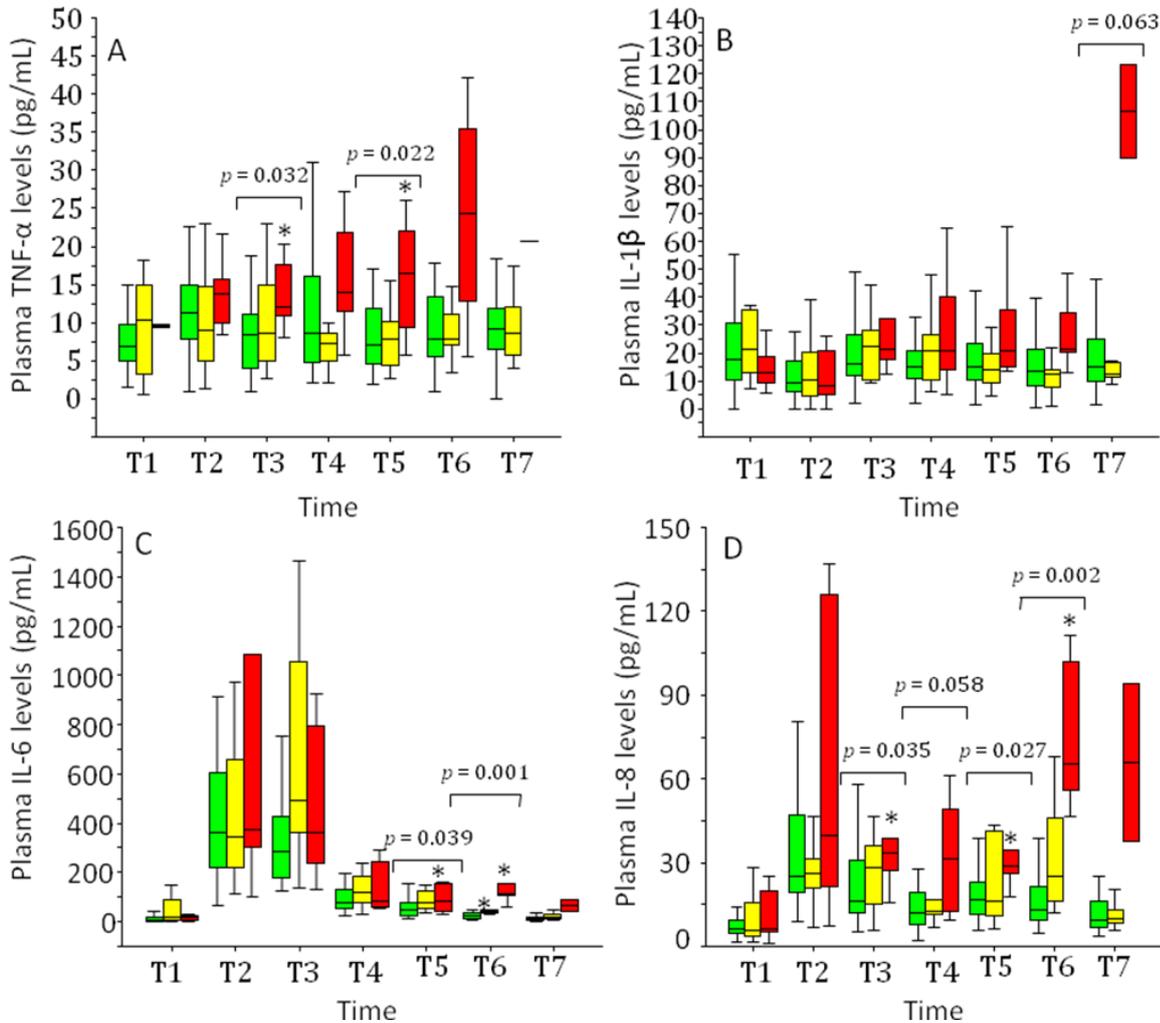
Durante i primi giorni postoperatori, livelli di TNF- $\alpha$  erano più elevati nel gruppo C, in particolare a 1 e 7 giorni (Figura 13A) . Diversamente, i livelli di IL-1b non hanno mostrato differenze significative tra i gruppi, ad eccezione a 1 mese (Figura 13B). Durante i primi giorni postoperatori, IL-6 mostra, in tutti i pazienti, livelli estremamente alti rispetto al basale, ma senza differenze significative tra i gruppi (Figura 13C). A 7 ha giorni inizia una differenziazione tra i gruppi che si amplifica a 14 giorni con livelli di IL-6 nei gruppi B e C superiori a quelli del gruppo A (Figura 13C). Allo stesso modo i livelli di TNF- $\alpha$  e IL-8 post-operatori sono più aumentati nel gruppo C rispetto agli altri gruppi di pazienti (Figura 4D); in particolare, a 1, 7 e 14 giorni, i livelli di IL-8 del gruppo C erano significativamente superiori a quelli del gruppo A (Figura 13D). Non sono state osservate differenze significative tra i livelli di TNF- $\alpha$  postoperatorio e di IL-8 nei gruppi A e B.

### **CRP postoperatoria, IL-8 e TNF- $\alpha$ in base ai gruppi di pazienti**

Oltre all'importanza dei livelli di citochine pro-infiammatorie in intervalli di tempo definiti durante la prima settimana postoperatoria, , come TNF- $\alpha$  e IL-8, anche il grado di esposizione nel tempo a queste citochine sembra svolgere un ruolo nell'influenzare l'evoluzione clinica dei pazienti caratterizzati da danno multiorgano grave. Pertanto, il grado di esposizione del paziente al TNF- $\alpha$  e IL-8 durante durante la prima settimana postoperatoria, è stato misurato calcolando l'area sotto la curva dei livelli di citochine da 4 ore a 1 settimana (pari a 164 ore) dopo l'intervento (AUC164hrs). Inoltre IL-8 e TNF-alfa AUC164hrs sono stati confrontati con AUC164hrs CRP.

IL-8 e TNF-alfa AUC164hrs dei pazienti del gruppo C gruppo erano superiori a quelli del gruppo A (Figura 14). Inoltre il TNF-alfa del gruppo C era superiore a quelli del gruppo B (Figura 14A). Il livello

Figura 13. Time course of pro-inflammatory cytokines

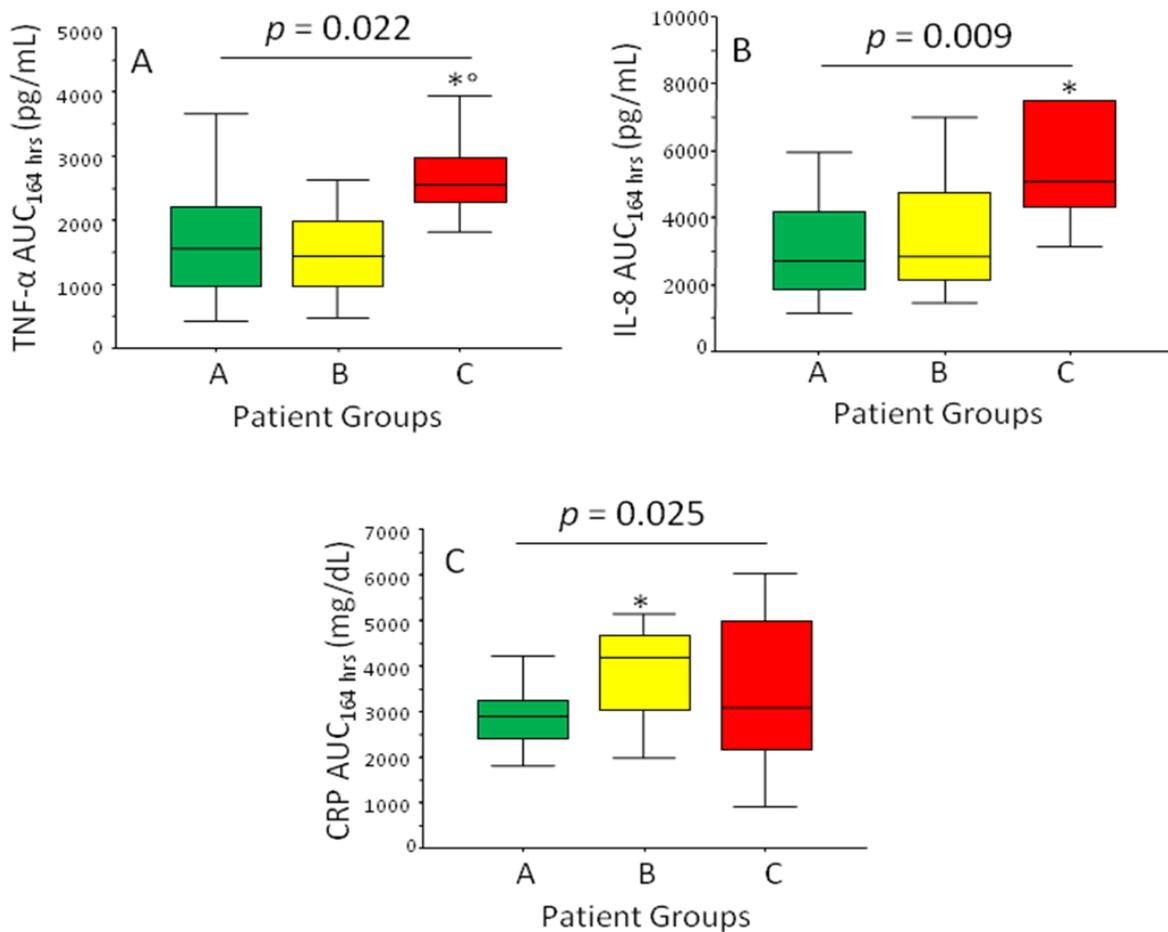


Time course of plasma TNF-α (A), IL-1β (B), IL-6 (C), and IL-8 (D) levels in patients that experienced postoperative maximal tSOFA score < 11 (Group A: green box-plots), and patients with postoperative maximal tSOFA score ≥11, with positive (Group B: yellow box-plots) or negative (Group C: red box-plots) 3-month outcome. T1, pre-implant; T2, 4 hours after LVAD implantation; T3, 24 hours after LVAD implantation; T4, 72 hours after LVAD implantation; T5, 1 week after LVAD implantation; T6, 2 weeks after LVAD implantation; T7, 4 weeks after LVAD implantation. P-values are for differences among groups at each time-point by Kruskal-Wallis text. \*p < 0.05 vs Group A by Mann-Whitney text corrected by Bonferroni. °p < 0.05 vs Group B by Mann-Whitney text corrected by Bonferroni.

di CRP AUC164hrs dei pazienti del gruppo C era paragonabile a quelli dei pazienti dei gruppi A e B (Figura 14C); solo AUC164hrs CRP di pazienti del gruppo B è stato superiore a quello dei pazienti di del gruppo A

Complessivamente, questi dati suggeriscono che, immediatamente dopo l'imianto di LVAD, l'entità della risposta infiammatoria, prevalentemente dovuta a TNF-alfa e IL-8, potrebbero influenzare lo sviluppo e il grado di severità della MOFS. Inoltre, questi dati suggeriscono che la valutazione CRP nella prima fase di supporto LVAD, non riflette i meccanismi infiammatori che sono associati o influiscono potenzialmente sull'evoluzione clinica dei pazienti che sviluppano un grave danno multiorgano.

Figura 14. The TNF- $\alpha$ , IL-8 and CRP exposure levels during the first postoperative week



The area under the curve of TNF- $\alpha$  (A), IL-8 (B) and CRP (C) levels from 4 hours at 1 week after intervention (AUC<sub>164hrs</sub>) in patients that experienced postoperative maximal tSOFA score < 11 (Group A: green box-plots), and patients with postoperative maximal tSOFA score  $\geq$ 11, with positive (Group B: yellow box-plots) or negative (Group C: red box-plots) 3-month outcome. P-values are for differences among groups by Kruskal-Wallis text. \*p < 0.05 vs Group A by Mann-Whitney text corrected by Bonferroni. <sup>o</sup>p < 0.05 vs Group B by Mann-Whitney text corrected by Bonferroni.

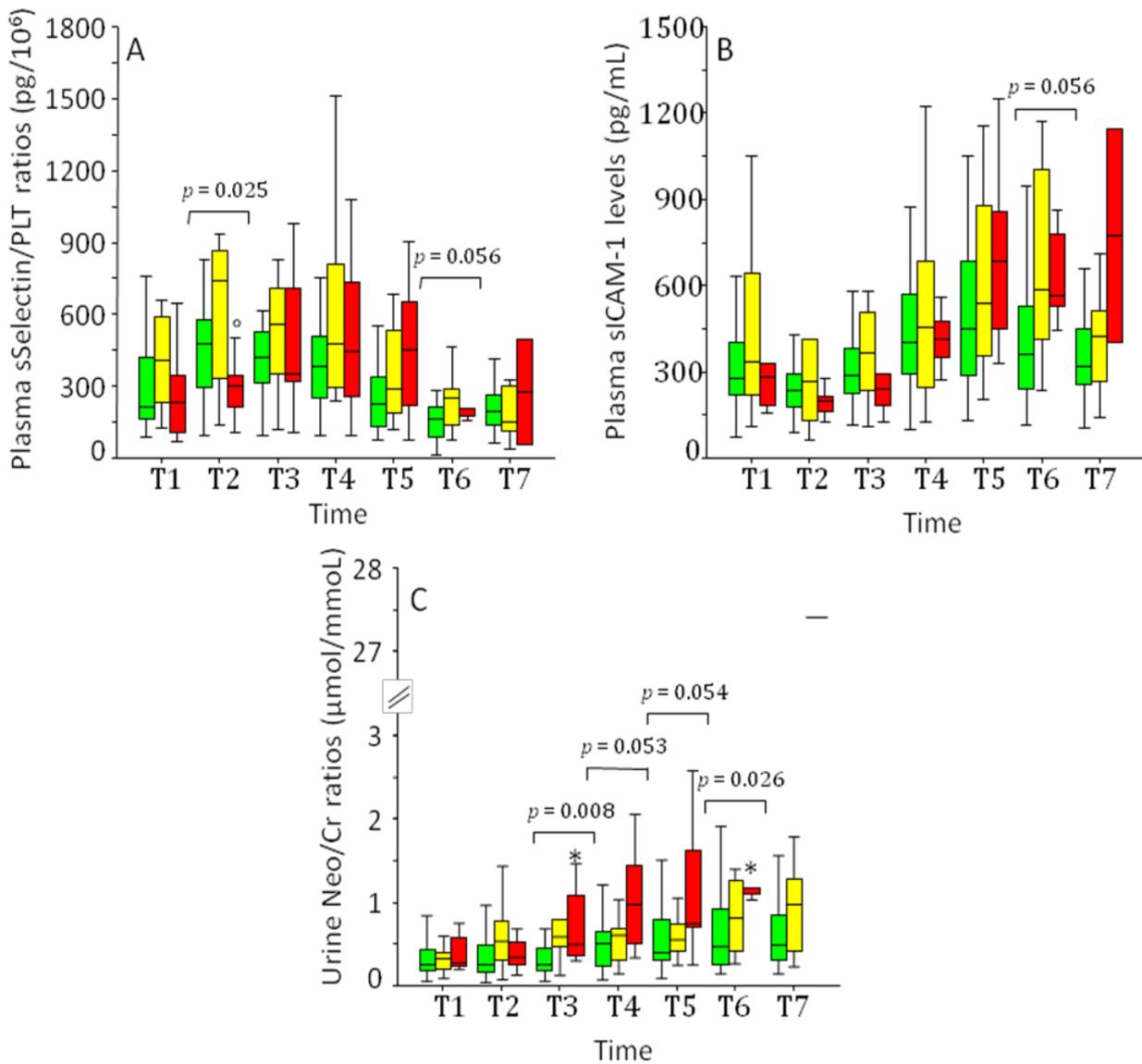
## Profili postoperatorie di molecole di adesione e neopterinina secondo i gruppi di pazienti

Durante la prima settimana postoperatoria, i livelli di P-selectina cambiano nel tempo solo nei pazienti dei gruppi A e C. Nel Gruppo A, il rapporto P-selectina/ PLT era più alto a 4 e 24 ore dopo l'impianto di LVAD basale (pre-impianto), mentre nel C-Group, il rapporto sP-selectina/PLT rispetto al basale, è stato più alto a 24 e 72 ore dopo l'impianto (figura 15A). Tuttavia, tra i gruppi di pazienti, il rapporto P-selectina/PLT si è distribuito in modo diverso solo 4 ore dopo l'intervento, con i livelli più bassi nei pazienti del gruppo C rispetto a quelli del gruppo B (figura 16A). Diversamente, i livelli sICAM-1 sono aumentati progressivamente in tutti i gruppi ( $P < 0,001$  in tutti i gruppi di test di Friedman), ma dopo 1 settimana, i livelli sICAM-1 erano superiori rispetto al basale solo nei pazienti del gruppo A e C (Figura 6B).

Durante la prima settimana post-operatorio, i livelli di neopterinina, un marcatore consolidato di attivazione dei monociti, sono aumentate progressivamente in tutti i pazienti. Tuttavia, dopo 1 settimana, i livelli di neopterinina erano superiori a quelli di riferimento solo in pazienti dei gruppi A e C (Figura 15C). Tra i gruppi di pazienti, i livelli di neopterinina erano più alti nei pazienti del gruppo C rispetto ai pazienti del gruppo A, in particolare a 24 ore e 2 settimane dopo LVAD impianto (Figura 6C). Inoltre, i livelli di neopterinina misurati a 1 settimana erano correlati positivamente con i livelli di TNF e IL-8 a 24 ore ( $\rho = 0.36$ ,  $P = 0.019$  e  $\rho = 0.43$ ,  $P = 0,002$ , rispettivamente), così come con TNF-alfa e IL-8 AUC164hrs ( $\rho = 0,50$ ,  $p = 0,001$  e  $\rho = 0.57$ ,  $p < 0.001$ , rispettivamente).

Complessivamente, questi dati suggeriscono che l'attivazione endoteliale, nella prima fase di supporto LVAD, è un fenomeno comune in tutti i pazienti LVAD, come si evidenzia dall'incremento delle molecole di adesione sICAM-1, mentre l'attivazione dei monociti sembra più presente in quei pazienti VAD caratterizzati da evoluzione negativa di un grave danno multiorgano sviluppato dopo l'intervento.

Figura 15. Time course of plasma sP-selectin, sICAM-1 and neopterin levels



Time course of plasma sP-selectin/PLTs (A), sICAM-1 (B) levels and urine neopterin/creatinine ratio (C) in patients with postoperative maximal tSOFA score < 11 (Group A: green box-plots), and patients with postoperative maximal tSOFA score ≥ 11 and positive (Group B: yellow box-plots) or negative (Group C: red box-plots) 3-month outcome. T1, pre-implant; T2, 4 hours after LVAD implantation; T3, 24 hours after LVAD implantation; T4, 72 hours after LVAD implantation; T5, 1 week after LVAD implantation; T6, 2 weeks after LVAD implantation; T7, 4 weeks after LVAD implantation. P-values are for differences among groups at each time-point by Kruskal-Wallis text. \*p < 0.05 vs Group A by Mann-Whitney text corrected by Bonferroni. °p < 0.05 vs Group B by Mann-Whitney text corrected by Bonferroni.

L'attivazione dei monociti e lesioni dell'endotelio sono fattori che possono contribuire, nel microcircolo, alla formazione di microtrombi ed alla coagulazione intravascolare, associati allo sviluppo e peggioramento della MOFS (38). Pertanto, sulla base dei dati osservati, nella fase iniziale di supporto con LVAD, i meccanismi infiammatori attivano monociti, e quindi attivano o

danneggiano l'endotelio del microcircolo, una combinazione che, sulla base della sua intensità, può avviare e perpetuare un grave danno multiorgano, in particolare contribuendo alla sua sfavorevole evoluzione clinica.

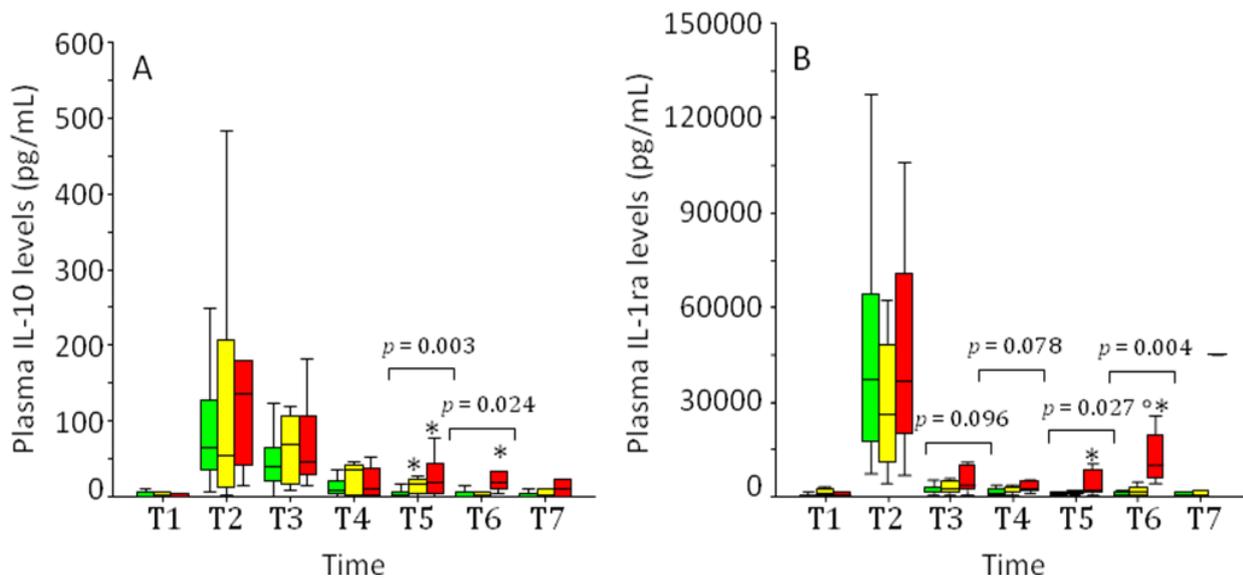
La P-selectina indotta è riportato accelerare la trombosi attraverso l'attivazione piastrine-leucociti e la loro interazione con endotelio, e attraverso l'espressione del fattore tissutale sui monociti (39). Inoltre, sP-selectina è riportato costituisca un attivatore endogeno dei processi di coagulazione attraverso la generazione di microparticelle che svolgono attività pro-coagulanti tramite l'espressione del fattore tissutale e l'attività pro-thrombinase (40). Quindi sP-selectina è considerato anche un induttore diretta di attività pro-coagulante associata a malattia trombotica. Infatti, alti livelli di sP-selectina sono stati riportati in pazienti affetti da coagulazione intravascolare disseminata (DIC) come risultato di danno piastrinico ed endoteliale, riflettendo una malattia infiammatoria del microcircolo.

Come sopra riportato, nella prima fase di supporto con LVAD, livelli postoperatori di sP-selectina sono aumentati principalmente nei gruppi A e C. Complessivamente questi dati suggeriscono che, nella prima fase di supporto con LVAD dei pazienti del gruppo C, e prima del loro decesso, persiste un'attivazione sinergica di endotelio-piastrine-leucociti favorendo una condizione trombotica e un danno endoteliale, fattori che potrebbero contribuire, nella microcircolazione, alla formazione della coagulazione intravascolare con microtrombi e associati allo sviluppo e peggioramento della insufficienza multi-organo.

#### **Profili postoperatorie di citochine anti-infiammatorie in base a gruppi di pazienti**

A 4 ore dopo l'intervento, IL-10 e IL-1Ra hanno mostrato livelli molto più elevati rispetto al basale in tutti i pazienti, senza differenze tra i gruppi (Figura 16). Solo a 7 e 14 giorni, i livelli di IL-10 dei pazienti del gruppo C aumentano più del gruppo A (Figura 16A). Inoltre, dopo 1 giorno

Figura 16. Time course of anti-inflammatory cytokines



Time course of plasma IL-10 (A) and IL-1ra (B) levels in patients with postoperative maximal tSOFA score < 11 (Group A: green box-plots), and patients with postoperative maximal tSOFA score  $\geq 11$  and positive (Group B: yellow box-plots) or negative (Group C: red box-plots) 3-month outcome. T1, pre-implant; T2, 4 hours after LVAD implantation; T3, 24 hours after LVAD implantation; T4, 72 hours after LVAD implantation; T5, 1 week after LVAD implantation; T6, 2 weeks after LVAD implantation; T7, 4 weeks after LVAD implantation. P-values are for differences among groups at each time-point by Kruskal-Wallis text. \* $p < 0.05$  vs Group A by Mann-Whitney text corrected by Bonferroni.  $^{\circ}p < 0.05$  vs Group B by Mann-Whitney text corrected by Bonferroni.

dall'impianto, i livelli di IL-1ra cominciarono a distribuirsi tra i gruppi, con livelli più elevati nel gruppo C rispetto agli altri gruppi, divenendo significativi dopo 1 e 2 settimane (Figura 16B).

Inoltre, i livelli di IL-1ra nel gruppo C a 2 settimane dall'intervento sono stati superiori anche rispetto ai pazienti del gruppo B (Figura 16B). Come precedentemente riportato da Caruso et al.

(41) in una popolazione più piccola, questi dati suggeriscono che questi pazienti sono caratterizzati da un alterato equilibrio della risposta infiammatoria, come evidenziato dal rilascio di citochine

anti-infiammatorie (IL-10 e IL -1ra) durante la fase iniziale dell'impianto di VAD, oltre a una reazione pro-infiammatoria massiccia, una condizione precedentemente descritta in una coorte

più limitata di pazienti (41). Queste condizioni riflettono una systemic inflammatory response syndrome (SIRS) postoperatoria, che di solito precede la MOFS in molti pazienti (42, 43). Inoltre, lo

sbilanciamento della risposta infiammatoria sembra contribuire alla comparsa di gravi MOFS con

evoluzione verso esito sfavorevole, poiché una risposta sistemica compensatoria antinfiammatoria sbilanciato può causare anergia e immunosoppressione (44), che riflette una condizione nota come immunoparalisi in pazienti con sepsi severa (45).

## Commenti

L'analisi dei dati ha evidenziato che i pazienti affetti da ESHF e candidati a impianto di LVAD, sono caratterizzati da un deterioramento critico della funzione renale, indipendentemente dallo stato emodinamico, hanno maggiori probabilità di avere un decorso clinico post-impianto complicato, o sviluppare una MOFS severa che evolve verso esito sfavorevole. Tuttavia, è da notare il fatto che, durante la prima settimana postoperatoria, il grado di risposta infiammatoria, particolarmente legata ai livelli ed al grado di esposizione a IL-8 e TNF- $\alpha$ , è associata ad uno esito negativo dei pazienti caratterizzati da una severa MOFS postoperatoria.

Tra i pazienti con post-t-SOFA  $\geq 11$  (grave MOFS), i punteggi t-SOFA elevati erano paragonabili fino al terzo giorno dopo l'intervento; cominciarono a differenziarsi a 1 settimana, e amplificare le differenze a 2 settimane, suggerendo che questo periodo è cruciale per l'evoluzione clinica di questi pazienti. Nei primi giorni postoperatori, i livelli di citochine, TNF- $\alpha$  e IL-8, e neopterinina aumentano maggiormente nei pazienti con esito sfavorevole della MOFS. Oltre all'importanza dei livelli di TNF- $\alpha$  e IL-8, ad intervalli di tempo definiti durante la prima settimana postoperatoria, anche il grado di esposizione nel tempo di queste citochine, (come dimostra confrontarne l'AUC calcolata da 4 ore a 1 settimana dopo l'intervento), sembra giocare un ruolo nell'influenzare l'evoluzione clinica del danno multiorgano grave.

TNF- $\alpha$  è noto come una citochina che può collegare l'infiammazione alla SIRS, che di solito precede MOFS in diversi pazienti malati (42, 43), mentre IL-8 è una chemochina specifica nell'attrarre monociti coinvolta nella modulazione dei monociti stessi, una condizione importante nello sviluppo di MOFS e complicanze emostatiche (46). Questi dati suggeriscono che, immediatamente

dopo l'impianto di LVAD, l'entità della risposta infiammatoria, correlata principalmente al TNF- $\alpha$  e IL-8, potrebbe influenzare lo sviluppo e la gravità della MOFS, contribuendo alla successiva evoluzione clinica. In particolare, i segnali infiammatori TNF- $\alpha$  e IL-8 dipendenti, sembrano influenzare monociti, come evidenziato dai rapporti trovati tra TNF- $\alpha$ , IL-8 e neopterin a 1 settimana. L'attivazione dei monociti e l'espressione di molecole di adesione e di chemiotassi coinvolte nella cascata di reclutamento dei leucociti e attivazione endoteliale, sono le caratteristiche distintive di infiammazione vascolare, una risposta fisiopatologica comune a diversi processi di malattia cardiovascolare, e stunning endoteliale nei pazienti UTI. Tuttavia, l'attivazione dei monociti appare un meccanismo chiave associato alla progressione clinica della MOFS severa, dal momento che sono stati osservati un incremento progressivo dei livelli di neopterin solo nei pazienti con esito sfavorevole, successivo sviluppo di un danno multiorgano grave. Pertanto, nel contesto di pazienti impiantati con LVAD, IL-8 e TNF- $\alpha$ , segnali che precedono e correlano con monociti, sembrano modulatori infiammatorie cruciali di monociti. Questi dati suggeriscono che la valutazione dei livelli di citochine specifiche, come IL-8 e TNF- $\alpha$ , già a 24 ore dopo l'impianto, permette di identificare i pazienti a rischio di eventi avversi, come la disfunzione multiorgano irreversibile.

Al pre-impianto, i livelli di mediatori infiammatori sono stati trovati simili tra i nostri gruppi di pazienti, un fatto che esclude potenzialmente un'attivazione preesistente dello stato infiammatorio che può agire, dopo l'intervento, come un trigger di una risposta infiammatoria anomala. Tuttavia, diversi studi hanno recentemente dimostrato, nei pazienti in condizioni critiche, il ruolo emergente dei sottotipi cellulari specializzati di derivazione mieloide con attività di soppressore, fenotipi monociti e cellule T-regolatorie, nella risoluzione di vie infiammatorie (47, 48). Pertanto, tra i pazienti candidati a impianto di LVAD, la valutazione dei sottotipi specializzati di cellule infiammatorie può essere utile, prima dell'impianto, per l'identificazione di collegamenti

specifici tra stato infiammatorio cellulare e la risposta infiammatoria sbilanciato associato a esito sfavorevole.

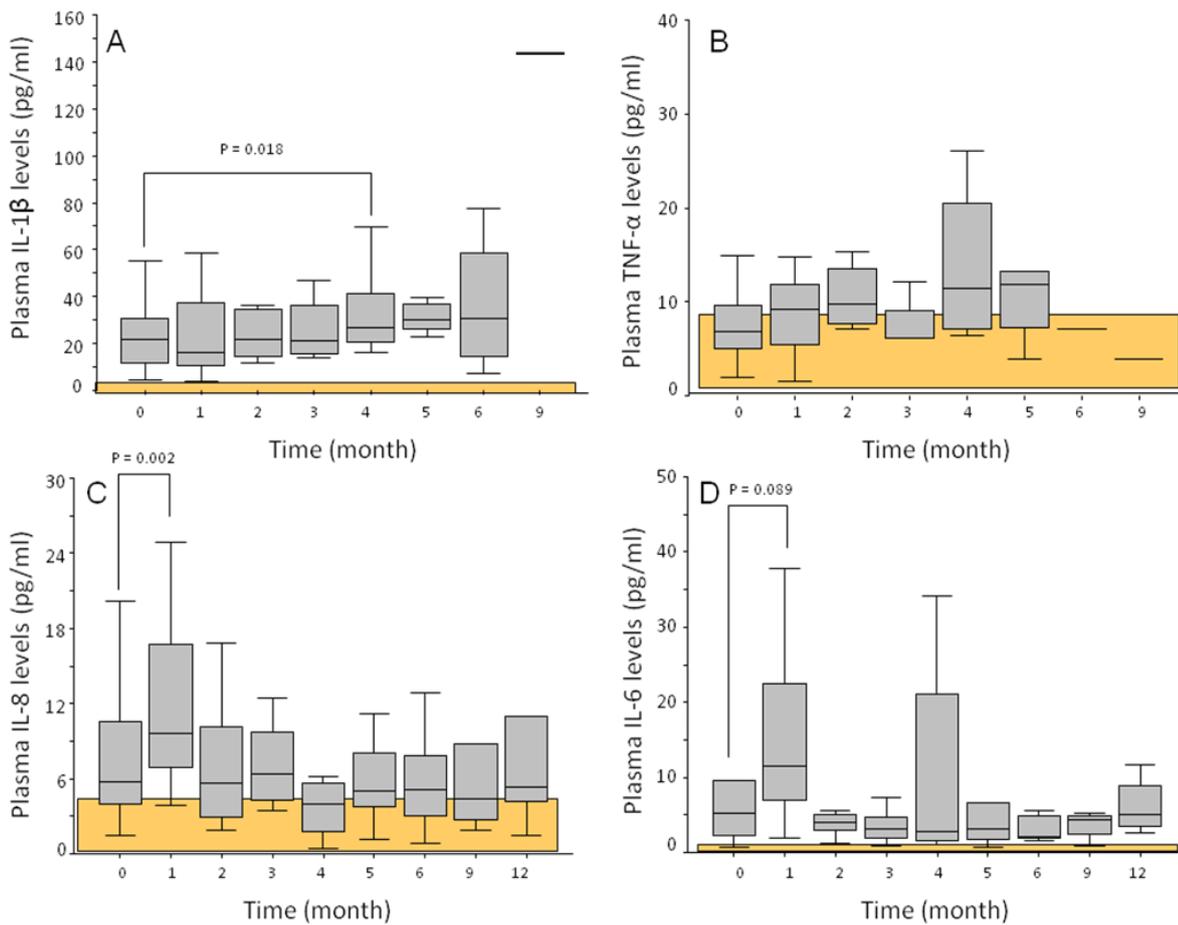
### Profili infiammatorie durante periodo prolungato di assistenza meccanica al circolo

Gli ultimi 25 pazienti arruolati presso l'AO Ospedale Niguarda Ca' Granda sono stati inclusi in un ulteriore protocollo di studio per monitorare i parametri infiammatori oltre il primo mese post-operatorio; in particolare, il protocollo è stato progettato in modo da avere ritiri mensili fino al sesto mese, e a 9 e 12 mesi dopo l'impianto del dispositivo. Al momento delle ultime analisi eseguite, solo 12 dei 25 pazienti monitorati sono arrivati alla fine del primo anno dall'intervento. Cinque su 25 pazienti sono morti: 2 pazienti a causa di MOFS entro 1 mese, 2 pazienti sono morti durante il primo anno post-impianto (emorragia cerebrale e MOFS con necrosi intestinale sono state le cause di morte), mentre 1 paziente è morto a causa di emorragia cerebrale durante il terzo anno post-impianto. Sei pazienti sono stati trapiantati, soprattutto durante il primo anno (n = 5), per problemi legati al dispositivo o all'infezione. In effetti, come si vede in tabella 8, l'infezione per via percutanea è la complicazione principale durante supporto LVAD prolungato con il primo episodio che si è verificato intorno a 189 (114-296) giorni dopo LVAD impianto.

**Tabella 8. Complications during prolonged LVAD support and causes of death "on-VAD"**

	<b>LVAD Patients (n = 25)</b>
Infections	
Drive-line infection	3 (12)
Pump infection	1 (4)
Percutaneous	13 (52)
Traumatic laceration	2 (8)
Septic shock	2 (8)
Right heart failure	1 (4)
Pulmonary hypertension	1 (4)
Ventricular fibrillation	1 (4)
Death causes "on-VAD"	
MOF	3 (12)
Cerebral haemorrhage	2 (8)
Septic shock	1 (4)

Figura 17. Pro-inflammatory cytokines during prolonged phase of LVAD support

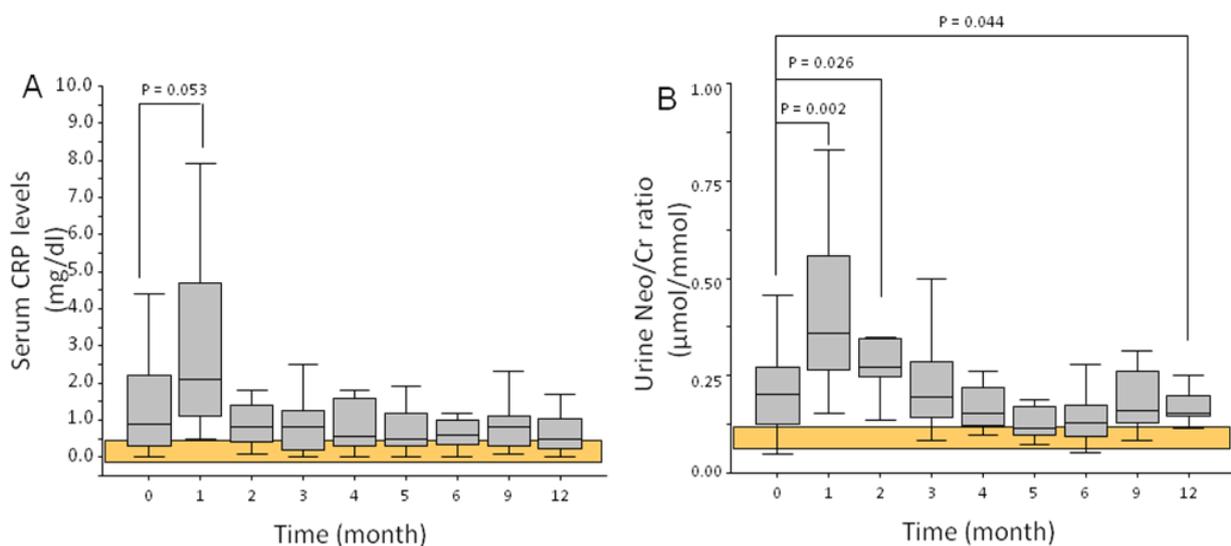


Circulating levels of IL-1 $\beta$  (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-8 (C) and IL-6 (D). The orange areas outline the physiological reference values

Per quanto riguarda l'infiammazione, come mostrato in figura 17, i pazienti, durante il primo anno postoperatorio, mantengono un'attivazione moderata del sistema infiammatorio paragonabile a quella osservata al pre-impianto. Tuttavia a 1 mese dall'intervento, i livelli di alcune citochine come IL-8 e IL-6, erano superiori rispetto al basale (Figura 17C e D). Intorno al 4 ° mese, i livelli circolanti di citochine, IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , ha un picco rispetto ai valori dei mesi precedenti e successivi, indicativi di una più marcata attivazione di infiammazione in questo periodo di supporto, probabilmente corrispondente alla comparsa di episodi di complicanze. Anche i valori di CRP nel siero sono stati più elevati a 1 mese dopo l'intervento rispetto ai valori basali. Dopo 1

mese, i livelli di CRP erano costanti con valori leggermente al di sopra dei livelli normali in alcuni pazienti, e senza picchi di crescita osservabili (figura 18A). Pertanto, diversamente dalle citochine pro-infiammatorie, i livelli di CRP non sembrano in grado di riflettere l'insorgenza di complicanze durante prolungata fase di LVAD impianto. Da notare che la neopterin mostra livelli più elevati nei primi mesi postoperatori (dal primo al terzo mese) rispetto ai valori basali. A 1 anno, i livelli di neopterin erano leggermente al di sopra dei livelli normali, ma inferiore in modo significativo rispetto pre-impianto (Figura 18B).

**Figura 18. Time course of C-reactive protein and neopterin during prolonged phase of LVAD support**



Circulating levels of CRP (A) and Neo/Cr ratio (B). The orange areas outline the physiological reference values.

## Commenti

I dati provenienti da pazienti monitorati durante il supporto con LVAD nel lungo periodo, mostrano il mantenimento dell'attivazione infiammatoria, in particolare con un incremento dell'ambiente infiammatorio a 1 mese dopo l'intervento, con alti livelli di citochine pro-infiammatorie. Ad 1 mese dopo l'intervento chirurgico, i livelli elevati di citochine pro-infiammatorie suggeriscono che i pazienti LVAD soffrono ancora di fase acuta postoperatoria, pur

con valori di citochine più deboli rispetto a quelli osservati nella prima settimana; inoltre l'ambiente infiammatorio a 1 mese probabilmente riflette monociti osservata in questo momento. Durante i mesi successivi, l'attivazione dei monociti ed i livelli di citochine pro-infiammatorie hanno mostrato una attenuazione, paragonabile a quelli pre-impianto ma in molti pazienti hanno mostrato livelli di citochine leggermente al di sopra del range fisiologico. Durante la fase prolungata di supporto con LVAD, la presenza di non trascurabili livelli di citochine pro-infiammatorie e neopterin suggeriscono la persistenza di un basso grado ambiente infiammatorio cronico che può rendere inclini questi pazienti a sviluppare complicanze correlate all'infiammazione. Infatti, picchi di incremento di alcune citochine pro-infiammatorie sono stati osservati a specifici intervalli di tempo di supporto LVAD, prossimi al verificarsi di complicanze, come infezioni, che i pazienti hanno sperimentato durante la fase di prolungata. Ad esempio, la citochina anti-infiammatoria, IL-10, mostrava picchi di incremento agli stessi intervalli di tempo, indicativi di una maggiore attivazione di infiammazione in questi pazienti. Attualmente, la limitata dimensione della popolazione campione in esame e la variabilità delle complicanze a intervalli diversi, non consentono di individuare citochine specifiche associate a complicanze. Tuttavia, le variazioni significative nei livelli di citochine osservate in alcuni pazienti sembrano suggerire che l'infiammazione è associata con meccanismi che promuovono eventi infettivi o altre complicazioni nella fase prolungata di supporto LVAD.

Il dosaggio della CRP viene normalmente utilizzato per monitorare l'infiammazione in questi pazienti. Dopo il primo mese postoperatorio, i livelli di CRP nel tempo mostrano un profilo attenuato costantemente, esente da picchi di incremento in qualsiasi momento, un fatto che suggerisce che la valutazione della CRP non è uno strumento molto utile per prevedere in anticipo l'insorgenza di complicanze o per ottenere accurate informazioni sullo stato di infiammazione di questi pazienti.

Sulla base di questi dati, le attività sui biosensori nell'ambito del progetto SensorART risultano estremamente importanti non solo per gli obiettivi raggiunti, ma in prospettiva, per la pianificazione di un punto di assistenza a casa dei pazienti, al fine di ottenere uno monitoraggio paziente-specifico mirato.

## **Ricerca di nuovi Biomarcatori coinvolti nel recupero della funzione ventricolare sinistra**

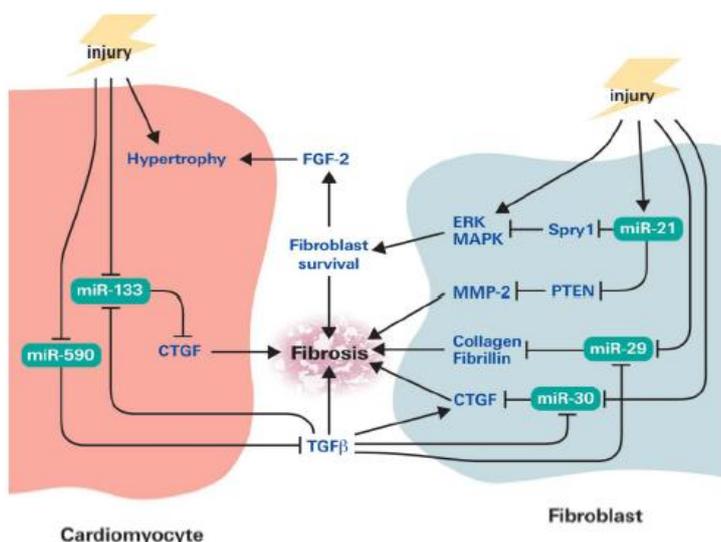
La seconda linea di ricerca, derivante dalla stretta collaborazione tra CNR e AO Ospedale Niguarda Ca' Granda, ha portato alla creazione di un Focus Group tra ricercatori di base e clinici, che si sono concentrati per indagare vie metaboliche e la trasmissione dei segnali associata a rimodellamento inverso potenzialmente attivato durante il de caricamento (“unloading”) del ventricolo sinistro. Lo scopo finale di questa attività di ricerca è stato quello di individuare, in pazienti candidati a impianto di LVAD, biomarcatori o caratteristiche cliniche che permettessero di identificare i pazienti più inclini ad attivare, in tutto o in parte, i meccanismi cellulari di rimodellamento inverso del ventricolo sinistro dopo impianto di LVAD. Il rimodellamento cardiaco che porta alla insufficienza cardiaca avanzata è un meccanismo complesso non ancora ben definito nei suoi fattori principali. In questo contesto, le attività di SensorART Heart Recovery Focus Group si sono concentrate su percorsi coinvolti sulla modulazione della matrice extracellulare o apoptosi, su meccanismi fondamentali che favoriscono la progressione dello scompenso cardiaco, non presenti e/o in contrasto con alcuni dati di letteratura. Inoltre è stata studiata la parte dell'infiammazione legata al sistema toll-like-receptor, recentemente associato allo sviluppo dello scompenso cardiaco, e la modulazione molecolare della trascrizione delle proteine da parte dei micro-RNA (miRNAs), al fine di identificare nuovi meccanismi associati al rimodellamento cardiaco, così come potenziali nuovi biomarcatori sia biochimici che molecolari, associati a rimodellamento inverso, attivato dall'unloading del ventricolo sinistro.

## **Micro-RNAs pattern dopo supporto con LVA a lungo termine**

I microRNA (miRNA) sono RNA endogeni, a singolo filamento, non codificante costituiti da circa 18 - 24 nucleotidi di lunghezza. Essi sono molto conservati ed espressi ubiquitariamente in tutte le specie (49). In generale, i miRNA agiscono come repressori endogeni di geni bersaglio, sia inibendo

traduzione e/o promuovendo la degradazione dell'mRNA. E' ampiamente accettato che un singolo miRNA possa influenzare centinaia di trascritti genici, coordinare programmi complessi di espressione genica e, in tal modo, influenza cambiamenti globali nella fisiologia di una cellula (50). Di conseguenza, i miRNA sono stati coinvolti come attori molecolari chiave in quasi tutti i processi cellulari, tra cui la proliferazione, la differenziazione, l'invecchiamento, la morte, e la manutenzione delle cellule staminali di auto-rinnovamento. Numerosi studi hanno rivelato che le alterazioni nello spettro dei miRNA intra/extracellulari sono correlati con varie condizioni cardiovascolari, come l'infarto del miocardio, l'ipertrofia, cardiomiopatia, e aritmie (51). Un cuore ipertrofico mostra un ampliamento della dimensione dei cardiomiociti e la valorizzazione della sintesi proteica attraverso l'attivazione di vie di segnalazione intracellulare e mediatori di trascrizione in miociti cardiaci. Questo processo è noto essere caratterizzato da una riprogrammazione dell'espressione genica cardiaca e l'attivazione di geni cardiaci "fetali". Dal momento che miRNA sono coinvolti nella regolazione genica, dovrebbero svolgere un ruolo importante nell'ipertrofia cardiaca, rimodellamento ventricolare e di insufficienza cardiaca (Figura 19).

**Figura 19. miRNAs implicated in cardiac fibrosis**



Lo straordinario livello di diversità nell'espressione dei miRNA in tutti i tessuti e stati fisiologici, e la grande quantità di informazioni diagnostiche codificate in un numero relativamente piccolo di miRNA, rendono questi regolatori potenti strumenti diagnostici e prognostici in diverse patologie cardiache. È importante notare che i miRNA possono essere rilevati nel siero e plasma di pazienti con malattie cardiovascolari, suggerendo la loro funzione biologica di fuori della cellula come molecole di segnalazione paracrina. Infatti, i miRNA circolanti sono protetti dalla degradazione RNase-dipendente per la loro inclusione in microvescicole, esosomi e corpi apoptotici, e attraverso la formazione di proteine-miRNA complessi resistenti alla degradazione.

Recenti analisi di profiling dei miRNA del cuore con o senza unloading meccanico da LVADs, hanno dato risultati estremamente contraddittori. Questo è probabilmente dipeso dai diversi approcci usati per la profilatura miRNA [Q-RT PCR (53, 54), microarray (52) e high-throughput sequencing (55)] e l'estrema variabilità delle condizioni del paziente. Tuttavia, gli studi hanno trovato che specifici pattern di miRNA miocardici sembrano favorire il rimodellamento inverso successivo a impianto di LVAD (53). In realtà, alcuni miRNA sono stati trovati essere espressi diversamente nel miocardio di pazienti che hanno raggiunto un recupero funzionale da unloading del ventricolo sinistro dovuto al LVAD, rispetto ai pazienti che sono rimasti LVAD-dipendenti (52, 53). Questi dati stimolano ad indagare i profili miRNA miocardici e circolanti in pazienti LVAD come biomarcatori potenzialmente utili di rimodellamento cardiaco inverso durante supporto LVAD. Nel presente capitolo, è descritta l'attività di ricerca svolta per valutare le differenze di miRNA profiling nei tessuti di cuore di pazienti con scompenso cardiaco cronico stabile (TxC-CTRL, n = 9), in terapia medica, senza previo supporto circolatorio, che ha subito TxC e nei pazienti affetti da ESHF dopo un lungo periodo di supporto con LVAD ( $357 \pm 66$  giorni) come un ponte per il trapianto (TxC-LVAD, n = 8). Al fine di ottenere una più profonda comprensione dei meccanismi molecolari che sono influenzati dall'unloading del ventricolo sinistro e che potrebbero essere associati ad un

potenziale recupero della funzionalità cardiaca dopo il supporto LVAD, abbiamo confrontato il profilo di espressione dei miRNA in campioni di ventricolo sinistro raccolti al momento del TxC da entrambi i gruppi di pazienti con insufficienza cardiaca avanzata, che avevano subito o meno un periodo di assistenza con LVAD, utilizzando la tecnologia Next Generation Sequencing (NGS) per una analisi qualitativa e quantitativa completa. Per entrambi i gruppi di pazienti, campioni di tessuto da ventricolo sinistro anteriore o basale-laterale state prese al momento del trapianto di cuore, ed immediatamente congelati in azoto liquido e conservati a -80 ° C. Diversi miRNA sono stati identificati come differentemente modulati nelle due popolazioni, e per alcuni di loro è stata osservata una correlazione con parametri cardiaci, potendone così ipotizzarne un ruolo nel recupero funzionale. Le caratteristiche cliniche dei pazienti sono riassunti nella Tabella 9.

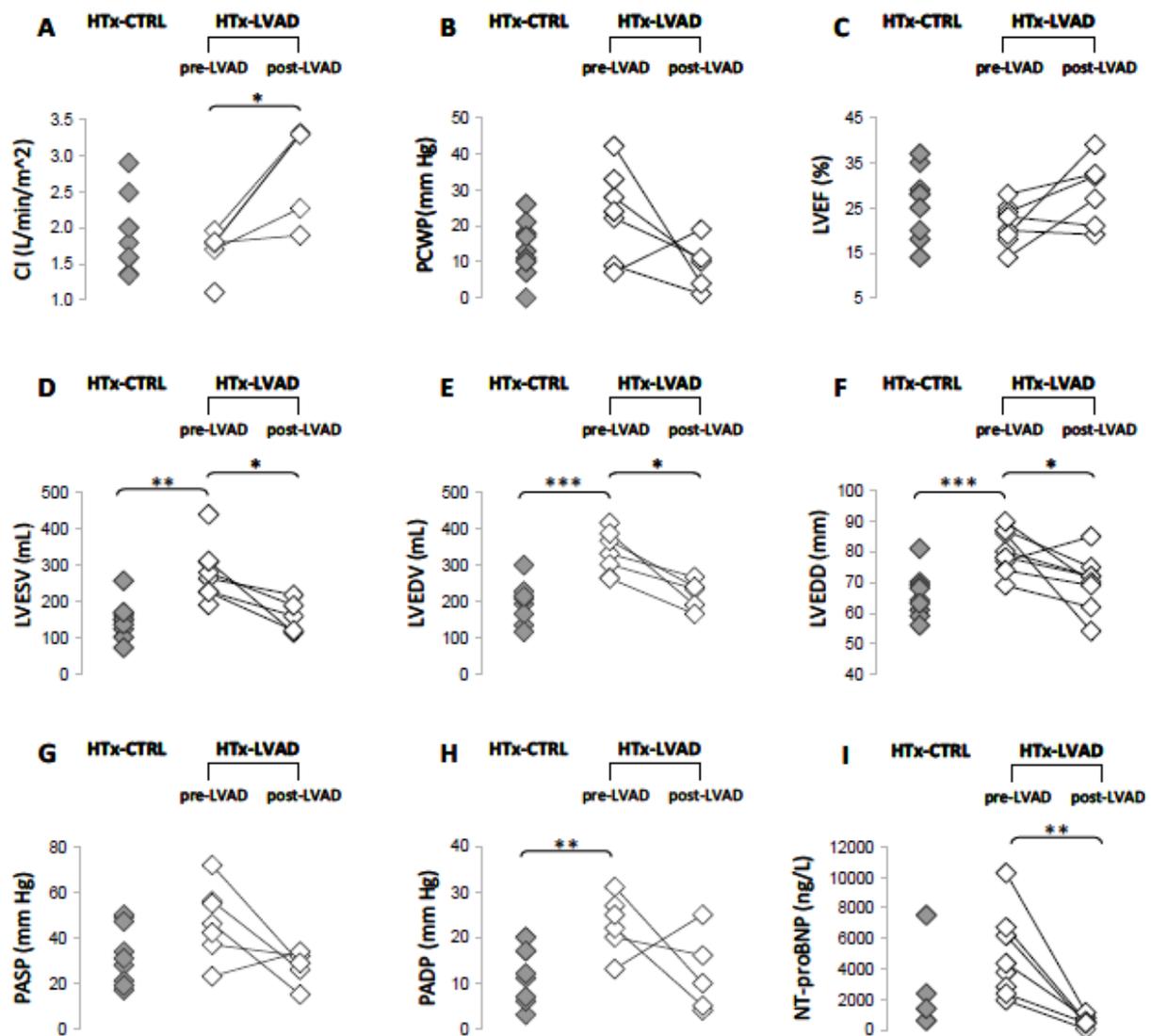
**Tabella 9. Clinical features of patient groups**

	HT-CTRL (n = 9)	HT-LVAD (n = 8)	
		Pre-LVAD	HT-time
Age, yrs	52 ± 3	46 ± 4	-
Male gender, n (%)	5 (56)	8 (100)	-
IHD, n (%)	2 (22)	1 (13)	-
CI, L/min/m <sup>2</sup>	1.90 ± 0.17	1.61 ± 0.13	2.82 ± 0.30 #***
PCWP, mmHg	14 ± 3	24 ± 5	9 ± 3 *
PAPs, mmHg	33 ± 4	47 ± 6	27 ± 3 *
PAPd, mmHg	13 ± 2	23 ± 3 <sup>ç</sup>	12 ± 4 *
LVEF, %	26 ± 3	21 ± 2	28 ± 3 *
LVEDV, mL	196 ± 8	357 ± 32 <sup>§</sup>	219 ± 18 **
LVEDD, mm	66 ± 2	80 ± 3 <sup>§</sup>	70 ± 3 *
NT-proBNP, ng/L	2976 ± 1562	4800 ± 991	576 ± 145 **

I pazienti con ESHF candidati per impianto di LVAD hanno mostrato un più avanzato rimodellamento negativo del ventricolo sinistro (LVEDV e LVEDD) rispetto ai pazienti del gruppo TxC-CTRL in terapia medica e senza precedente supporto circolatorio meccanico (Tabella 9). Al momento del TxC i pazienti del gruppo TxC-LVAD hanno mostrato una riduzione significativa dei volumi e diametri diastolici del ventricolo sinistro, nonché dei livelli NT- proBNP (Tabella 9), dati indicativi di un miglioramento del rimodellamento e della funzione cardiaca in questi pazienti. A supporto di questi dati, i dati individuali dei pazienti sono mostrati in Figura 20. LVAD ha indotto un aumento significativo del CI (p <0.05) e una riduzione del volume telesistolico e telediastolico

del ventricolo sinistro, nonché del diametro telediastolico ( $p < 0.05$ ), insieme ad una diminuzione dei livelli plasmatici di NT-proBNP ( $p < 0.01$ ). Tuttavia, si può osservare una risposta variabile del cuore all'unloading del VSx con alcuni pazienti che dimostrano chiaramente un miglioramento dei parametri funzionali dopo impianto di LVAD, mentre altri riportano solo un leggero cambiamento o, in alcuni casi, anche un peggioramento delle condizioni cliniche (Figura 20).

Figura 20. Individual data of patients



(A) CI, cardiac index; (B) PCWP, pulmonary capillary wedge pressure; (C) LVEF, left ventricular ejection fraction; (D) LVESV, left ventricular end-systolic volume; (E) LVEDV, left ventricular end-diastolic volume; (F) LVEDD, left ventricular end-diastolic diameter; (G) PAsP, pulmonary artery systolic pressure; (H) PAsD, pulmonary artery diastolic pressure; (I) NT-proBNP, N-terminal prohormone of Brain Natriuretic Peptide. Statistical significance is calculated according to Student's t-test (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ). In the HT-LVAD group, paired t-test is used to compare pre-LVAD and post-LVAD values.

## Profilo di espressione miRNA

Dopo l'estrazione totale di RNA dal tessuto, la tecnologia NGS è stata utilizzata per ottenere un profilo completo di miRNA in ciascun campione cardiaco. Nel complesso, più di 1.700 diversi microRNA potrebbero essere riconosciuti in questo tessuto cardiaco umano, anche se a un livello di espressione variabile. L'analisi dei livelli di espressione relativi nei due gruppi è stata eseguita per identificare i miRNA che sono stati espressi in maniera differente nei due gruppi di pazienti, quelli supportati da LVAD vs. il gruppo di pazienti che non hanno ricevuto una assistenza meccanica. Impostando una correzione FDR (False Discovery Rate)  $<0,1$  e  $p\text{-value} \leq 0,05$ , per un totale di 33 mRNA che sembravano essere espressi diversamente espressi (DE), di cui 22 sono risultati essere down-regolati e 11 up-regolati nella gruppo LVAD. L'elenco dei miRNA DE, ordinati a partire da quelli con la più alta abbondanza, è indicato nella tabella 10.

Tra i miRNA identificati in questo studio come differentemente regolati nei 2 gruppi, ci sono alcuni miRNA, come miR-142-5p e -3p (54-56), miR-223 (57,58), miR-135a (59), e miR-216a (58) che sono stati precedentemente indicati in letteratura come potenzialmente demodulati nello scompenso cardiaco o altre malattie cardiovascolari. Altri miRNA, come miR-29b e miR-27a si suppone abbiano un ruolo di modulazione più generale nel cuore e vasi, essere coinvolti in diversi percorsi che controllano l'apoptosi, la fibrosi e l'ipertrofia (60-62). Tuttavia, la nostra analisi ha rivelato anche alcuni miRNA per i quali attualmente in letteratura vi sono scarse informazioni disponibili, se non del tutto assenti.

## Validazione dei microRNA per Real-time PCR

I singoli saggi di PCR quantitativa in tempo reale sono stati eseguiti per validare i risultati di deep sequencing su un piccolo gruppo di miRNA DE, selezionati in base al livello di maggiore espressione e la rilevanza nelle patologie cardiovascolari secondo la letteratura precedente.

**Tabella 10. List of miRNAs differentially expressed in LVAD-supported vs “control” failing explanted**

miRNA	HT-CTRL	HT-LVAD	Fold Change	Log2 FC	P value	P adjusted
hsa-miR-142-5p	4564.80	10712.46	2.35	1.23	2.37E-04	8.51E-03
hsa-miR-29b-3p	5834.04	2399.81	0.41	-1.28	6.26E-05	2.63E-03
hsa-miR-4485	3540.88	96.19	0.03	-5.20	5.67E-36	7.14E-33
hsa-miR-374b-5p	2660.81	1052.73	0.40	-1.34	6.20E-05	2.63E-03
hsa-miR-4532	2451.07	802.08	0.33	-1.61	6.69E-06	4.00E-04
hsa-miR-223-3p	676.71	2374.60	3.51	1.81	1.93E-10	2.69E-08
hsa-miR-144-5p	916.38	1813.97	0.30	0.99	9.90-07	6.99E-03
hsa-miR-4792	1097.84	329.27	0.30	-1.74	9.90E-07	7.33E-05
hsa-miR-142-3p	515.35	990.88	1.92	0.94	3.65E-03	9.97E-02
hsa-miR-335-3p	473.88	923.82	1.95	0.96	1.00E-04	4.02E-03
hsa-miR-135a-5p	637.89	133.91	0.21	-2.25	3.45E-13	7.24E-11
hsa-miR-146b-3p	95.14	300.05	3.15	1.66	9.68E-06	5.53E-04
hsa-miR-376a-3p	208.40	68.20	0.33	-1.61	2.01E-05	1.01E-03
hsa-miR-4284	239.87	12.66	0.05	-4.24	2.80E-24	1.76E-21
hsa-miR-3195	168.30	75.83	0.45	-1.15	9.26E-04	3.07E-02
hsa-miR-3135b	144.32	34.66	0.24	-2.06	5.53E-08	4.96E-06
hsa-miR-27a-5p	58.78	114.60	1.95	0.96	1.19E-03	3.74E-02
hsa-miR-5096	105.28	15.54	0.15	-2.76	5.21E-11	8.19E-09
hsa-miR-1246	79.28	28.13	0.35	-1.49	1.87E-05	1.01E-03
hsa-miR-1299	44.49	57.32	1.29	0.37	1.41E-03	4.33E-02
hsa-miR-3123	74.12	1.59	0.02	-5.54	3.31E-23	1.39E-20
hsa-miR-433	52.37	27.60	0.53	-0.92	3.17E-03	9.17E-02
hsa-miR-1247-5p	29.33	53.10	1.81	0.86	3.02E-03	9.05E-02
hsa-miR-141-3p	24.58	55.97	2.28	1.19	1.12E-03	3.61E-02
hsa-miR-31-5p	23.57	54.90	2.33	1.22	4.78E-06	3.16E-04
hsa-miR-216a-5p	50.42	9.50	0.19	-2.41	1.20E-08	1.26E-06
hsa-miR-4488	50.20	8.17	0.16	-2.62	3.50E-09	4.01E-07
hsa-miR-1973	25.04	1.36	0.05	-4.20	4.33E-12	7.77E-10
hsa-miR-217	20.48	3.23	0.16	-2.67	3.29E-07	2.59E-05
hsa-miR-5095	17.12	1.17	0.07	-3.87	2.68E-08	2.60E-06
hsa-miR-4497	12.87	2.06	0.16	-2.64	1.39E-06	9.75E-05
hsa-miR-1248	8.71	1.63	0.19	-2.42	3.55E-03	9.94E-02
hsa-miR-216a-3p	7.76	1.20	0.15	-2.70	4.49E-05	2.17E-03

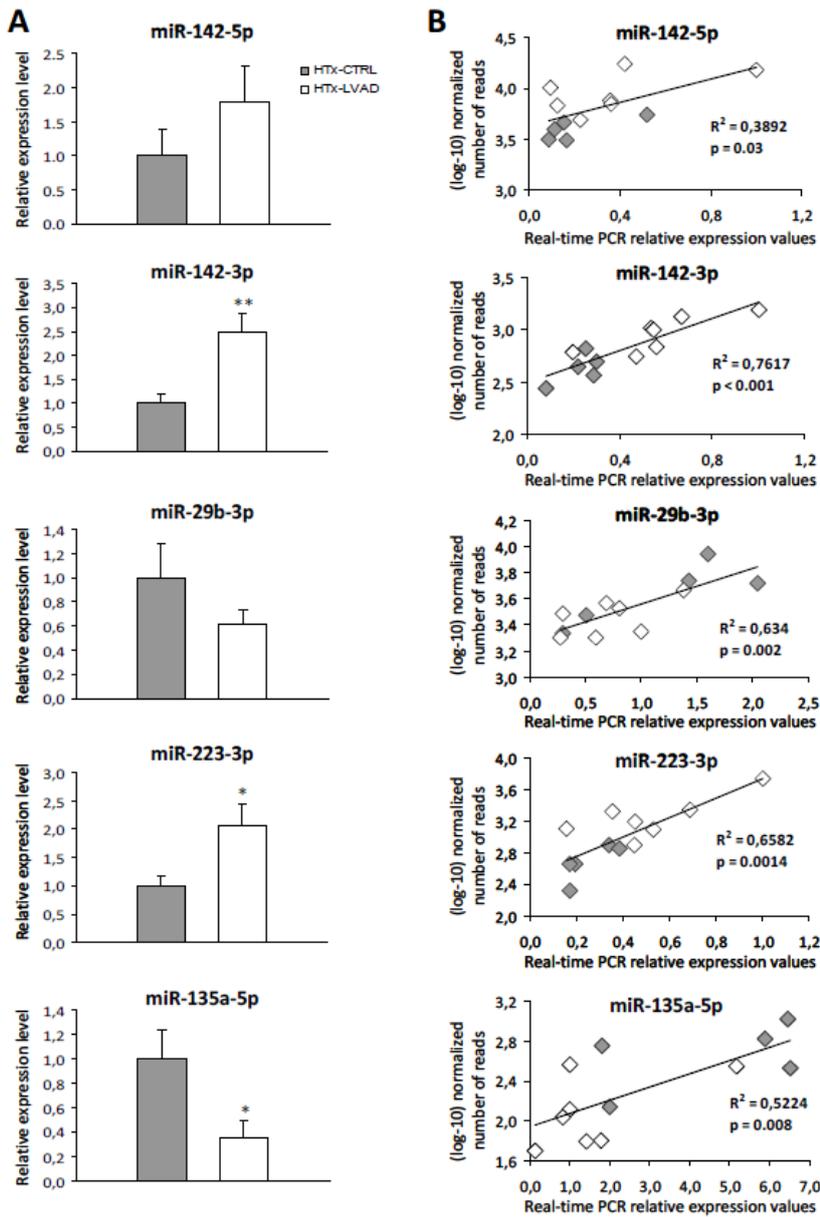
miRNAs DE are ranked according to the number of read counts. Up-regulated and down-regulated miRNAs are respectively shown in blue and white lines.

In particolare, miR-142-5p e -3p, miR-29b-3p, miR-223-3p e miR-135a-5p sono stati considerati per la convalida in un sottogruppo di TxC-CTRL (n = 5) e TxC-LVAD (n = 7) pazienti. La Figura 21 mostra, per ciascuno dei cinque miRNA, i relativi livelli di espressione come determinato da esperimenti di PCR in tempo reale (Figura 21A), e analizza la correlazione tra il valore risultante dalla PCR e quello del deep sequencing (Figura 21B).

Come mostrato nella Figura 30B, i valori di PCR sono significativamente correlati con i dati di sequenziamento per tutti i miRNA testati. Per alcuni dei miRNA selezionati (miR-142-3p, miR-223-3p e miR-135a-5p), vi è una differenza significativa nel livello di espressione tra i pazienti TxC-LVAD

e Tx-C-CTRL, ed è stata confermata anche da Real-time PCR ( Figura 21A). Negli altri due casi (miR-142-5p e miR-29b-3p), anche se una significatività statistica non è stata raggiunta, probabilmente a causa del ridotto numero di campioni utilizzati in esperimenti di PCR, i risultati hanno indicato, una consistenza chiara con i dati del sequenziamento (Figura 21A).

**Figura 21. Validation by Real-Time PCR and correlation with deep sequencing data**



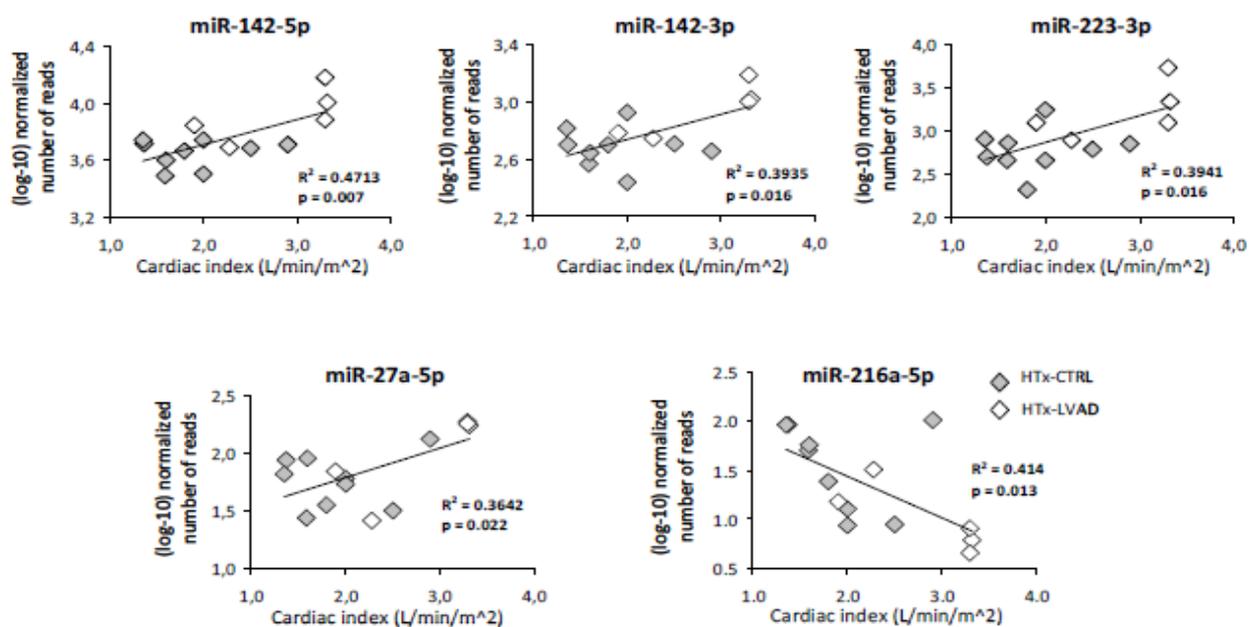
(A) Mean Real-time PCR normalized expression values of selected microRNAs in a subset of HT-CTRL (n=5, grey bars) and HT-LVAD (n=7, white bars) heart samples (\* p<0.05; \*\* p<0.01). (B) Correlation analyses between (log10)-transformed number of miRNA read counts and Real-time PCR relative expression values. Grey and white symbols are representative of HTx-CTRL and HTx-LVAD data pairs, respectively.

## Associazione tra l'espressione di microRNA e parametri clinici

Dopo la convalida dei dati di deep sequencing, abbiamo studiato se è stato possibile indagare una associazione tra l'espressione dei miRNA specifici differentemente modulati nei due gruppi di pazienti e i parametri clinici indicativi della funzione cardiaca. Lo studio di associazione si è concentrato su quei parametri clinici, come l'indice cardiaco (CI), che sembra essere notevolmente migliorato nella popolazione supportata da LVAD rispetto ai pazienti del gruppo Tx-C-CTRL ( $2,82 \pm 0,30$  vs  $1,90 \pm 0,17$  L / min / m<sup>2</sup>,  $p < 0,05$ ) (Tabella 9).

Come illustrato in Figura 22 l'analisi di correlazione ha rivelato che una associazione significativa tra i valori CI, prima del trapianto, e l'espressione di alcuni microRNAs. In particolare, una correlazione positiva è stata trovata con alcuni miRNA up-regolati nel gruppo Tx-C-LVAD: miR-142-5p ( $r = 0.686$ ,  $p = 0.007$ ), miR-142-3p ( $r = 0,627$ ;  $p = 0,016$ ), miR-223-3p ( $r = 0,628$ ;  $p = 0,016$ ) e miR-27a-5p ( $r = 0.603$ ,  $p = 0.022$ ). Viceversa, miR-216a-5p, un miRNA down-regolato nel gruppo LVAD, sembra essere negativamente associato con CI ( $r = -0,643$ ,  $P = 0.013$ ).

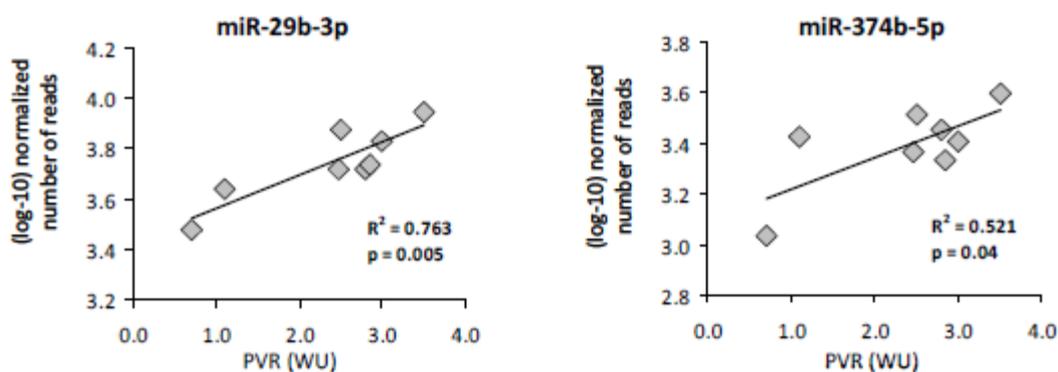
Figura 22. Correlation between miRNA expression and cardiac index



Correlation analyses between (log<sub>10</sub>)-transformed number of miRNA read counts and individual cardiac index in HT-CTRL (grey symbols, n=9) and HT-LVAD patients (white symbols, n=5).

È interessante notare, che i pazienti supportati da LVAD, che non dimostrano un recupero della funzione cardiaca e mantengono un basso CI anche dopo assistenza meccanica, mostrano una corrispondenza dei livelli di espressione miRNA simili ai pazienti TxC-CTRL (Figura 22). Questa osservazione sostiene ulteriormente l'ipotesi di un coinvolgimento di questi microRNA nella regolazione dei meccanismi molecolari associati con il recupero del cuore. Altre associazioni interessanti sono state trovate in relazione ai valori di resistenza vascolare polmonare, sebbene in questo caso le misure erano disponibili solo per i pazienti appartenenti al gruppo TxC-CTRL. Una correlazione positiva significativa è stata trovata con miR-29b-3p ( $r = 0,873$ ;  $p = 0.005$ ) e miR-374b-5p ( $r = 0,722$ ;  $p = 0.039$ ) (Figura 23). Entrambi questi microRNA hanno un alto livello di espressione nei campioni di cuore e sembrano essere down-regolati nei pazienti impiantati con LVAD (Tabella 10). Si è tentati di ipotizzare che la down-regolazione di questi miRNA dopo l'unloading meccanico, potrebbe essere associato con una diminuzione della resistenza vascolare polmonare e un miglioramento delle condizioni cliniche.

Figura 23. Correlation between miRNA expression and pulmonary vascular resistance



Correlation analyses between (log10)-transformed number of miRNA read counts and individual measurements of pulmonary vascular

## Commenti

In conclusione la nostra analisi, anche se effettuata su un numero limitato di pazienti che erano, inoltre, caratterizzati da un grado severo di malattia (insufficienza cardiaca allo stadio terminale), mostra differenze significative nei pattern di espressione dei miRNA in cuori disfunzionanti che sono andati incontro al trapianto, direttamente o dopo un lungo periodo di supporto con LVAD. L'osservazione che alcuni dei miRNA mostrano un più alto grado di regolazione, sia in correlazione con i parametri clinici indicativi della funzione cardiaca, sia permettendo di discriminare i pazienti che non hanno recuperato dopo il supporto LVAD, mette in evidenza il potenziale interesse di questi microRNA che potrebbero giocare un ruolo fondamentale nel processo recovery del ventricolo sinistro. Inoltre è interessante notare che alcuni dei miRNA identificati sono già stati identificati nel plasma di pazienti con vari tipi di malattie cardiovascolari (55-57, 59, 63). Sebbene i livelli di miRNA nel fluido corporeo non riflettono sempre il livello relativo nei tessuti, è interessante ipotizzare che questi miRNA hanno la potenzialità di diventare nuovi biomarker dei processi di rimodellamento.

## Conclusione

Le unità implementate dal progetto SensorART permettono di:

- monitorare e controllare le interazioni paziente-dispositivo
- ottimizzare/guidare gli interventi terapeutici
- aumentare l'accettabilità dell'impianto di un VAD
- aumentare la consapevolezza e l'autonomia del paziente
- migliorare l'assistenza sanitaria
- ridurre il tempo di ospedalizzazione
- aumentare l'utilizzabilità dei VAD sia come ponte al trapianto che come terapia definitiva
- individuare un eventuale recovery ed i fattori che lo hanno favorito
- creare un modello informatico/ibrido che permette di simulare un paziente reale, analizzando la risposta del sistema cardio-circolatorio in diverse condizioni di salute, a diversi interventi terapeutici (farmacologici/chirurgici/VAD).
- predisporre un una piattaforma per la formazione del personale sanitario in ambito VAD

## Bibliografia

1. Zannad F, Briancon S, Juilliere Y et al. and the EPICAL Investigators. Incidence, clinical and etiologic features, and outcomes of advanced chronic heart failure: the EPICAL Study. *J Am Coll Cardiol* 1999;33:734–42.
2. O'Connor CM, Gattis WA, Uretsky BF, et al. Continuous intravenous dobutamine is associated with an increased risk of death in patients with advanced heart failure: insights from the Flolan International Randomized Survival Trial (FIRST). *Am Heart J*. 1999 Jul;138(1 Pt 1):78-86
3. Oliva F, Latini R, Politi A, et al. Intermittent 6-month low-dose dobutamine infusion in severe heart failure: DICE multicenter trial. *Am Heart J*. 1999;138:247-53
4. Kirklin JK et al. Seventh INTERMACS annual report: 15,000 patients and counting. *JHLT*, 2015: 34(12), 1495–1504
5. Lund, Lars H. et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-second Official Adult Heart Transplantation Report—2015; Focus Theme: Early Graft Failure. *JHLT*. 2015 Oct; 34(10): 1244-1254
6. Liotta D., Hall C.W., Henly W.S., et al: Prolonged Assisted circulation during and after cardiac or aortic surgery. I. Prolonged left ventricular bypass by means of an intrathoracic circulatory pump. II. Diastolic pulsation of the descending thoracic aorta. *Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs.*, 9:182, 1963.
7. Henning LM, Mueller J, Spiegelsberger S et al Long-term circulatory support as a bridge to transplantation, for recovery from cardiomyopathy, and for permanent replacement. *Eur J Cardiothorac Surg* 1997;11:S18-S24
8. Copeland JG, Smith RG, Arabia FA, et al. Total artificial heart bridge to transplantation: a 9-year experience with 62 patients. *J Heart Lung Transplant* 2004;23:823-31.
9. El-Banayosy A, Arusoglu L, Morshuis M, et al. CardioWest total artificial heart: Bad Oeynhausen experience. *N Engl J Med* 2004; 351: 859-67.
10. US Department of Health and Human Service. 2002 Annual Report.
11. Hunt SA, Baker DW, Chin MH, et al. ACC/AHA Guidelines for the Evaluation and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: Executive Summary A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Revise the 1995 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): Developed in Collaboration With the International Society for Heart and Lung Transplantation; Endorsed by the Heart Failure Society of America. *Circulation*. 2001 Dec 11; 104(24):2996-3007.

12. Rose EA, Gelijns AC, Moskowitz AJ, et al, for the Randomized Evaluation of Mechanical Assistance for the Treatment of Congestive Heart Failure (REMATCH) Study Group. Long-term use of a left ventricular assist device for end-stage heart failure. *N Engl J Med* 2001;345:1435-43.
13. Mehra MR, Kobashigawa J, Starling R et al. Listing criteria for heart transplantation: International Society for Heart and Lung Transplantation guidelines for the care of cardiac transplant candidates--2006. *J Heart Lung Transplant*. 2006;25(9):1024-42.
14. Farrar DJ. Preoperative predictors of survival in patients with Thoratec ventricular assist devices as a bridge to heart transplantation. Thoratec Ventricular Assist Device Principal Investigators. *J Heart Lung Transplant*. 1994 Jan-Feb;13(1 Pt 1):93-100
15. Rao V, Oz MC, Flannery MA et al., Revised screening scale to predict survival after insertion of a left ventricular assist device, *J Thorac Cardiovasc Surg* 125 (2003), pp. 855–862
16. Knaus WA, Draper EA and Wagner DP et al., APACHE II: A severity of disease classification system, *Crit Care Med* 13 (1985), pp. 818–829.
17. Levy WC, D. Mozaffarian and Linker DT et al., The Seattle Heart Failure Model: prediction of survival in heart failure, *Circulation* 113 (2006), pp. 1424–1433 21.
18. Schaffer JM, Allen JG, Weiss ES et al. Evaluation of Risk Indices in Continuous-Flow Left Ventricular Assist Device Patients. *Ann Thorac Surg* 2009 88: 1889-1896.
19. Samuels LE, Kaufman MS, Thomas MP et al. Pharmacological criteria for ventricular assist device insertion following postcardiotomy shock: experience with the Abiomed BVS system. *J Card Surg*. 1999 Jul-Aug;14(4):288-93.
20. Hausmann H, Potapov EV, Koster A et al. Prognosis after the implantation of an intra-aortic balloon pump in cardiac surgery calculated with a new score. *Circulation*. 2002 Sep 24;106(12 Suppl 1):I203-6.
21. MacGowan GA, Kormos RL, McNamara DM et al. Predicting short-term outcome in severely ill heart failure patients: implications regarding listing for urgent cardiac transplantation and patient selection for temporary ventricular assist device support. *J Card Fail*. 1998 Sep;4(3):169-75.
22. Kirklin JK, Naftel DC and Stevenson LW *et al.*, INTERMACS database for durable devices for circulatory support: first annual report, *J Heart Lung Transplant* 2008, 27:1065–1072.
23. Fisher JD. New York Heart Association Classification. *Arch Intern Med*. 1972 May;129(5):836.
24. LW Stevenson, FD Pagani, JB Young et al. INTERMACS profiles of advanced heart failure:the current practice. *J Heart Lung Transplant* 2009;28:535-41.
25. Kirklin JK, Naftel DC, Kormos RL et al. Second INTERMACS annual report: more than 1,000 primary left ventricular assist device implants. *J Heart Lung Transplant*. 2010 Jan;29(1):1-10.
26. Zimpfer D, Zrunek P, Roethy W et al. Left ventricular assist devices decrease fixed pulmonary hypertension in cardiac transplant candidates. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2007;133(3):689-95.

27. Hetzer R, Muller J, Weng Y et al. Cardiac recovery in dilated cardiomyopathy by unloading with a left ventricular assist device. *Ann Thorac Surg* 1999; 68: 742-9.
28. Sodian R, Loebe M, Schmitt C et al. Decreased plasma concentration of brain natriuretic peptide as a potential indicator of cardiac recovery in patients supported by mechanical circulatory assist systems. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38:1942-9.
29. Vitali E, Lanfranconi M, Ribera E, et al. Successful experience in bridging patients to heart transplantation with the Micromed DeBakey ventricular assist device. *Ann Thorac Surg* 2003;75:1200-4.
30. Kiyotaka F, McCarthy PM, Smedira NG, et al. Preoperative risk factors for right ventricular failure after implantable left ventricular assist device insertion. *Ann Thorac Surg* 1999; 68: 2181-4.
31. Deng MC, Loebe M, El-Banayosy A, et al: Mechanical circulatory support for advanced heart failure: effect of patient selection on outcome. *Circulation* 2001;103:231-7.
32. Frazer OH, Rose EA, Oz MC, et al: Multicenter clinical evaluation of the HeartMate vented electric left ventricular assist system in patients awaiting heart transplantation. *J thorac Cardiovasc Surg* 2001;122:1186-95.
33. El-Banayosy A, Arusoglu L, Kizner L, et al: Predictors of survival in patients bridged to transplantation with the Thoratec VAD device: a single-center retrospective study on more than 100 patients. *J Heart Lung Transplant* 2000;19:964-968.
34. Reinhartz O, Farrar DJ, Hershon JH, et al.: Importance of preoperative liver function as a predictor of survival in patients supported with thoratec ventricular assist device as a bridge to transplantation. *J thorac Cardiovasc Surg* 1998;116:633-40
35. Oz MC, Goldstein DJ, Pepino P, et al: Screening scale predicts patients successfully receiving long-term implantable left ventricular assist devices. *Circulation* 1995;92(ssuppl 2):169-73.
36. Rao V, Oz M, Flannery MA, et Al. Revised screening scale to predict survival after insertion of a left ventricular assist device. *J Thorac Cardiovasc Surgery* 2003, 125: 855-62
37. Ferreira FL, Bota DP, Bross A, Mélot C, Vincent JL. Serial evaluation of the t- SOFA score to predict outcome in critically ill patients. *The Journal of the American Medical Association* 2001;286:1754-1758.
38. Masai T, Sawa Y, Ohtake S, Nishida T, Nishimura M, Fukushima N, Yamaguchi T, Matsuda H. Hepatic dysfunction after left ventricular mechanical assist in patients with end-stage heart failure: role of inflammatory response and hepatic microcirculation. *The Annals of Thoracic Surgery* 2002;73:549-555.
39. Furie B, Furie BC. The molecular basis of platelet and endothelial cell interaction with neutrophils and monocytes: role of P-selectin and the P-selectin ligand. PSGL-1. *Thrombosis Haemostasis*

1995;74:224-227.

40. André P, Hartwell D, Hrachovinová I, Saffaripour S, Wagner DD. Pro-coagulant state resulting from high levels of soluble P-selectin in blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2000;97:13835-13840.
41. Caruso R, Trunfio S, Milazzo F, Campolo J, De Maria R, Colombo T, Parolini M, Cannata A, Russo C, Paino R, Frigerio M, Martinelli L, Parodi O. Early expression of pro- and anti-inflammatory cytokines in left ventricular assist device recipients with multiple organ failure syndrome. *American Society for Artificial Internal Organs Journal* 2010;56:313-318.
42. Bishehsari F, Sharma A, Stello K, Toth C, O'Connell MR, Evans AC, LaRusch J, Muddana V, Papachristou GI, Whitcomb DC, TNF-alpha gene (TNF- $\alpha$ ) variants increase risk for multi-organ dysfunction syndrome (MODS) in acute pancreatitis. *Pancreatology* 2012;12:113-118.
43. Yousef AA, Suliman GA. The predictive prognostic values of serum TNF- $\alpha$  in comparison to SOFA score monitoring in critically ill patients. *BioMed Research International* 2013;2013:258029.
44. Bone RC. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Annals of Internal Medicine* 1996;125:680-687.
45. Loisa P, Rinne T, Laine S, Hurme M, Kaukinen S. Anti-inflammatory cytokine response and the development of multiple organ failure in severe sepsis. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 2003;47:319-325.
46. Wiel E, Vallet B, ten Cate H. The endothelium in intensive care. *Critical Care Clinics* 2005;21:403-416.
47. Fullerton JN, O'Brien AJ, Gilroy DW. Pathways mediating resolution of inflammation: when enough is too much. *The Journal of Pathology* 2013;231:8- 20.
48. Mantovani A, Garlanda C, Locati M. Macrophage diversity and polarization in atherosclerosis: a question of balance. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2009;29:1419-1423.
49. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281- 297.
50. Wang Z. MicroRNA: a matter of life or death. *World Journal of Biological Chemistry* 2010;1:41-54.
51. Wang Z, Luo X, Lu Y, Yang B. miRNAs at the heart of the matter. *Journal of Molecular Medicine* 2008;86:771-783.

52. Matkovich SJ, Van Booven DJ, Youker KA, Torre-Amione G, Diwan A, Eschenbacher WH, Dorn LE, Watson MA, Margulies KB, Dorn GW. Reciprocal regulation of myocardial microRNAs and messenger RNA in human cardiomyopathy and reversal of the microRNA signature by biomechanical support. *Circulation* 2009;119:1263–1271.
53. Ramani R, Vela D, Segura A, McNamara D, Lemster B, Samarendra V, Kormos R, Toyoda Y, Bermudez C, Frazier OH, Moravec CS, Gorcsan J 3rd, Taegtmeier H, McTiernan CF. A micro-ribonucleic acid signature associated with recovery from assist device support in 2 groups of patients with severe heart failure. *The Journal of American College of Cardiology* 2011;58:2270-2278.
54. Voellenkle C, van Rooij J, Cappuzzello C, Greco S, Arcelli D, Di Vito L, Melillo G, Rigolini R, Costa E, Crea F, Capogrossi MC, Napolitano M, Martelli F. MicroRNA signatures in peripheral blood mononuclear cells of chronic heart failure patients. *Physiological Genomics* 2010;42:420-426.
55. Nair N, Kumar S, Gongora E, Gupta S. Circulating miRNA as novel markers for diastolic dysfunction. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2013;376:33-40.
56. Ellis KL, Cameron VA, Troughton RW, Frampton CM, Ellmers LJ, Richards AM. Circulating microRNAs as candidate markers to distinguish heart failure in breathless patients. *The European Journal of Heart Failure* 2013;15:1138-1147.
57. Dickinson BA, Semus HM, Montgomery RL, Stack C, Latimer PA, Lewton SM, Lynch JM, Hullinger TG, Seto AG, van Rooij E. Plasma microRNAs serve as biomarkers of therapeutic efficacy and disease progression in hypertension- induced heart failure. *The European Journal of Heart Failure* 2013;15:650-659.
58. Greco S, Fasanaro P, Castelvechio S, D'Alessandra Y, Arcelli D, Di Donato M, Malavazos A, Capogrossi MC, Menicanti L, Martelli F. MicroRNA dysregulation in diabetic ischemic heart failure patients. *Diabetes* 2012;61:1633-1641.
59. Hoekstra M, van der Lans CA, Halvorsen B, Gullestad L, Kuiper J, Aukrust P, van Berkel TJ, Biessen EA. The peripheral blood mononuclear cell microRNA signature of coronary artery disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2010;394:792-797.
60. Nishi H, Ono K, Horie T, Nagao K, Kinoshita M, Kuwahara Y, Watanabe S, Takaya T, Tamaki Y, Takanabe-Mori R, Wada H, Hasegawa K, Iwanaga Y, Kawamura T, Kita T, Kimura T. MicroRNA-27a regulates beta cardiac myosin heavy chain gene expression by targeting thyroid hormone receptor  $\beta$ 1 in neonatal rat ventricular myocytes. *Molecular Cellular Biology* 2011;31:744-55.

61. Jentsch C, Leierseder S, Loyer X, Flohrschütz I, Sassi Y, Hartmann D, Thum T, Laggerbauer B, Engelhardt S. A phenotypic screen to identify hypertrophy- modulating microRNAs in primary cardiomyocytes. *The Journal of Molecular Cell Cardiology* 2012;52:13-20.
62. Kriegel AJ, Liu Y, Fang Y, Ding X, Liang M. The miR-29 family: genomics, cell biology, and relevance to renal and cardiovascular injury. *Physiological Genomics* 2012;44:237–244.
63. Zampetaki A, Willeit P, Tilling L, Drozdov I, Prokopi M, Renard JM, Mayr A, Weger S, Schett G, Shah A, Boulanger CM, Willeit J, Chowienczyk PJ, Kiechl S, Mayr M. 2012. Prospective study on circulating MicroRNAs and risk of myocardial infarction. *The Journal of American College of Cardiology* 2012;60:290-299.