

# POLITECNICO DI MILANO

Scuola di Ingegneria Industriale e dell'Informazione  
Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica



SVILUPPO DI UN SISTEMA *EX VIVO* BICOMPARTIMENTALE PER LA COLTURA DI  
SEGMENTI DI VENA SAFENA UMANA IN CONDIZIONI CONTROLLATE DI  
OSSIGENAZIONE

Relatore

Prof.ssa Ing. Monica Soncini

Correlatori

Prof. Ing. Gianfranco Beniamino Fiore

Ing. Marco Piola

Tesi di laurea di

Simona Seminati

813454

Anno Accademico 2015/2016



# Indice

Sommario.....	I
Abstract.....	XII
Introduzione.....	1
1. Le coronarie: patologie, interventi e cause di fallimento.....	3
1.1 Le coronarie.....	3
1.2 Coronaropatie: cause e incidenza sulla popolazione.....	5
1.3 Trattamento delle coronaropatie: angioplastica e bypass aortocoronarico.....	7
1.4 Struttura dei vasi sanguigni.....	9
1.5 Vasi autologhi, protesi e sostituti ingegnerizzati utilizzati nell'intervento di bypass aorto-coronarico.....	12
1.6 La vena grande safena.....	15
1.7 Vein Graft Disease.....	15
1.8 Effetti dell'ipossia sul graft venoso.....	19
1.9 Conclusioni.....	20
2. Stato dell'Arte.....	22
2.1 Stato dell'arte sui sistemi di coltura <i>ex-vivo</i> .....	22
2.1.1 Sistemi di coltura statici.....	23
2.1.2 Sistemi di coltura dinamici.....	26
2.1.2.1. Sistemi a stimolazione stazionaria.....	26
2.1.2.2. Sistemi a stimolazione pulsatile.....	32
2.2 L'effetto dell'esposizione a condizioni di ossigenazione anomala.....	37
2.3 Conclusioni.....	43
3. Materiali e Metodi.....	45
3.1 Obiettivo del lavoro.....	45
3.2 Caratterizzazione e Ottimizzazione del modulo de-ossigenante.....	46
3.2.1 Sistema di coltura <i>ex-vivo</i> .....	46
3.2.2 De-ossigenatore per coltura <i>ex-vivo</i> .....	49
3.2.3 Valutazione delle perdite di carico.....	51

3.2.4	Sensore di misura .....	52
3.2.5	Caratterizzazione del de-ossigenatore in assenza di ricircolo .....	54
3.2.6	Caratterizzazione del de-ossigenatore con ricircolo del mezzo .....	55
3.3	Modello analitico e andamento della concentrazione di ossigeno nel tempo.....	58
3.3.1	Descrizione del modello.....	58
3.3.2	Modello accurato.....	63
3.3.3	Modello finale .....	67
3.4	Campagna sperimentale con segmenti di vena safena.....	71
3.4.1.	Assemblaggio e preparazione del sistema.....	71
3.4.2.	Prove sperimentali.....	74
3.4.3.	Analisi e caratterizzazione biologica dei campioni di vena .....	77
3.4.3.1.	Analisi morfologiche: colorazioni istologiche e immunofluorescenza..	77
3.4.3.2.	Misura della <i>length density</i> dei <i>vasa vasorum</i> .....	79
3.4.3.3.	Quantificazione della proliferazione cellulare: analisi di immunisto chimica.....	80
4.	Risultati .....	81
4.1	Risultati della caratterizzazione del modulo de-ossigenante .....	81
4.1.1.	Perdite di carico introdotte dal nuovo de-ossigenatore .....	81
4.1.2.	Risultati della caratterizzazione del de-ossigenatore in assenza di ricircolo del mezzo .....	83
4.1.3.	Risultati della caratterizzazione con ricircolo del mezzo.....	85
4.2	Risultati sperimentali, previsioni del modello e sua verifica.....	87
4.3	Risultati campagna sperimentale su segmenti di vena safena .....	95
4.3.1.	Monitoraggio delle concentrazioni di ossigeno durante gli esperimenti con segmenti di vena safena.....	94
4.3.2	Analisi dei campioni biologici.....	98
4.3.2.1.	Mantenimento dell'integrità e della struttura caratteristica del tessuto vascolare.....	99
4.3.2.2.	Misura della <i>length density</i> dei <i>vasa vasorum</i> .....	106
4.3.2.3.	Analisi della proliferazione cellulare .....	107

5. Conclusioni e Sviluppi futuri .....	109
Appendice A.....	114
Appendice B.....	123
Appendice C.....	128
Bibliografia.....	129

# SOMMARIO

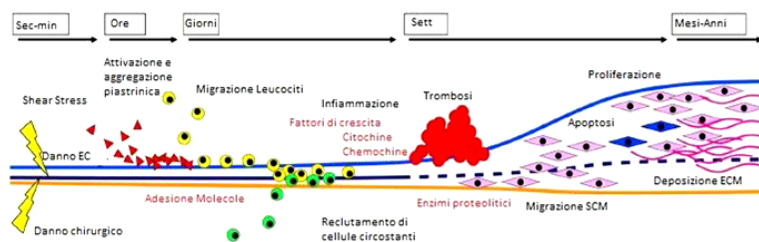
## INTRODUZIONE

Le circolazione coronarica garantisce il corretto afflusso sanguigno al muscolo miocardico. Le coronaropatie, causate da una modifica anatomica o funzionale delle coronarie, rappresentano una delle principali cause di morte nel mondo. L'intervento di bypass aorto-coronarico (Coronary Artery Bypass Graft surgery – CABG) è volto a ripristinare il flusso sanguigno nel vaso ostruito anastomizzando un vaso sano a monte e a valle dell'occlusione per creare un percorso alternativo al sangue.

La vena safena è il vaso di elezione negli interventi di bypass, soprattutto in caso di bypass multipli; tuttavia il 50% dei graft venosi va incontro a fallimento entro dieci anni dall'intervento. In seguito alla trasposizione in ambiente arterioso, la vena passa da una condizione di bassa pressione (5-10 mmHg), flusso non pulsatile a basse portate e *shear stress* di circa 0.2 dynes/cm<sup>2</sup>, a condizioni di pressione elevata (60-120 mmHg),

portate elevate, flusso pulsatile e *shear stress* compreso tra 3-6 dynes/cm<sup>2</sup>. Le nuove condizioni emodinamiche possono indurre un adattamento patologico, caratterizzato da rimodellamento anormale della parete e sviluppo di eccessiva iperplasia dell'intima. Inoltre la rimozione dei *vasa vasorum* al momento del prelievo della vena safena provoca, nella tonaca avventizia, un'improvvisa diminuzione di ossigeno, mentre il flusso coronarico all'interno del graft espone il lume a valori di pressione parziale di ossigeno arteriosi. Le condizioni di ossigeno alterate concorrono al rimodellamento patologico del graft; lo stimolo di ipossia, in particolare, produce nel tessuto lo sviluppo di una risposta adattativa di tipo angiogenico.

L'insieme dei processi che portano al fallimento del graft prende il nome di *vein graft disease* (VGD). I meccanismi che portano all'evoluzione della patologia sono cadenzati da una precisa tempistica e sono caratterizzati da trombosi nel breve periodo, iperplasia dell'intima nel medio termine e aterosclerosi nel lungo termine (Fig. 1) [1].



**Fig.1:** Evoluzione temporale dei meccanismi coinvolti nel VGD. Adattato da [1]

In letteratura esistono numerosi studi finalizzati a studiare, grazie allo sviluppo di sistemi di coltura *ex vivo*, gli effetti indotti nel tessuto dalle nuove condizioni fluidodinamiche cui è sottoposto il graft venoso in seguito a CABG [2, 3, 4].

Al contrario le conseguenze dovute a un'alterata disponibilità di ossigeno nel tessuto non sono ancora state indagate nel dettaglio.

Il presente lavoro di tesi, svolto presso il Laboratorio di Micro e Biofluidodinamica Sperimentale ( $\mu$ BSLab) del Dipartimento di Elettronica, Informazione e Bioingegneria (DEIB) del Politecnico di Milano, s'inserisce all'interno di un progetto più ampio, svolto in collaborazione con il gruppo di ricerca del Laboratorio di Ingegneria Tissutale Cardiovascolare (LIT) dell'IRCCS Centro Cardiologico Monzino. Fine ultimo del progetto è quello di ricreare *ex vivo* la stimolazione biochimica e biomeccanica cui è sottoposto il graft venoso, per comprendere i meccanismi molecolari e cellulari che si instaurano, così da averne una conoscenza completa che consenta in prospettiva l'individuazione di un trattamento di prevenzione o cura del VGD.

In questo contesto, l'obiettivo del progetto di tesi è caratterizzare e ottimizzare il sistema bicompartimentale sviluppato da Piola e colleghi nell'ambito di questa collaborazione [5], per stimolare segmenti di vena safena *ex vivo* simulando le condizioni di ossigenazione cui è sottoposta la vena in seguito a CABG.

In parallelo al lavoro di sviluppo del dispositivo è stato messo a punto un modello analitico in grado di predire il comportamento del sistema in termini di concentrazione di ossigeno che si raggiunge nei due compartimenti che lo compongono.

Infine è stata condotta una campagna sperimentale su campioni di vena safena umana presso l'IRCCS Centro Cardiologico Monzino, durante la quale sono stati indagati gli effetti provocati dall'esposizione del lato avventiziale della vena a condizioni di ipossia moderata oppure severa. Per studiare i cambiamenti che avvengono a livello tissutale e cellulare in seguito alla risposta adattativa del tessuto alle condizioni di ossigeno imposte sul lato avventiziale sono state svolte analisi istologiche, in immunofluorescenza e immunoistochimiche.

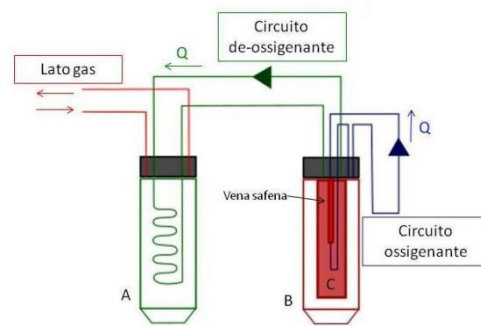
## MATERIALI E METODI

### *Caratterizzazione e ottimizzazione modulo de-ossigenante*

Il sistema di coltura utilizzato in questo studio sperimentale si basa sull'utilizzo di una camera bicompartimentale che permette di sottoporre la regione luminale e quella avventiziale della vena a diverse condizioni di ossigeno.

Il sistema è composto da due circuiti indipendenti che compongono il modulo ossigenante e il modulo de-ossigenante (Fig. 2).

In particolare, il mezzo di coltura nel compartimento luminale viene mantenuto a una pressione parziale di ossigeno pari a circa 150 mmHg ( $pO_2$  atmosferica), mentre il modulo de-ossigenante permette di ricircolare nel compartimento avventiziale un mezzo a bassa concentrazione di ossigeno. In questo modo si può simulare il gradiente di ossigeno tra tonaca avventizia e lume che si verifica nel graft venoso dopo l'impianto in posizione coronarica (CABG).



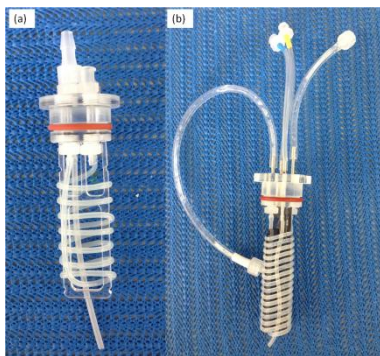
**Fig.2:** Rappresentazione schematica del sistema di coltura ex-vivo con la camera bicompartimentale. In verde è rappresentato il circuito de-ossigenante, in blu quello ossigenante.

Il de-ossigenatore è composto da un tubo in silicone lungo 40 cm (L40) (Fig.3.a), nel quale scorre il mezzo di coltura da de-ossigenare, alloggiato all'interno di una camera in cui si inietta azoto puro. Sfruttando il fenomeno della diffusione si riesce quindi ad abbassare la concentrazione di  $O_2$  nel mezzo.

Durante il presente lavoro di tesi il de-ossigenatore L40 è stato caratterizzato tramite prove senza ricircolo del mezzo, per valutare l'efficienza del de-ossigenatore in termini di scambio specifico di massa che riesce ad applicare, e tramite prove con ricircolo del mezzo, per valutare i valori di  $pO_2$  che si riescono a raggiungere nel compartimento avventiziale quando si riproducono le reali condizioni di funzionamento del sistema di coltura e si collega il de-ossigenatore alla camera di coltura bicompartimentale.

Durante le prove a banco, effettuate con un tubo in silicone per simulare la vena, è stato utilizzato un sensore ottico non invasivo, il cui funzionamento si basa sulla tecnologia degli optrodi e che permette di visualizzare *real time* e registrare i valori di  $pO_2$  nel mezzo di coltura. Per poter utilizzare il sensore è stata progettata e realizzata una camera di misura *ad hoc*.

Le prestazioni del de-ossigenatore sono state quindi ottimizzate allungando il tubo in silicone presente al suo interno fino a una lunghezza di 100 cm (L100) (Fig.3.b). Il de-ossigenatore L100 è stato quindi caratterizzato dal punto di vista idraulico e con prove per valutare l'efficienza senza e con ricircolo del mezzo.



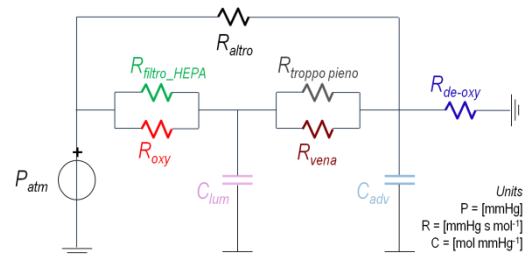
**Fig.3:** Immagine delle due versioni di de-ossigenatore a confronto. (a) De-ossigenatore L40 (b), de-ossigenatore L100.

#### Sviluppo di un modello predittivo

Parallelamente al lavoro di sviluppo del modulo de-ossigenante, è stato messo a punto un modello analitico in grado di

predire l'andamento nel tempo della pressione parziale di ossigeno nel compartimento avventiziale. Il sistema di coltura è stato modellizzato con un'analogia elettrica. Gli elementi permeabili all'ossigeno sono stati modellizzati come resistenze equivalenti, ottenute correggendo i valori di resistenza alla diffusione, ricavate sulla base della trattazione di Orr [6], con un fattore che permette di tenere conto degli aspetti convettivi. I volumi dei compartimenti luminale e avventiziale che nel tempo si "caricano" e si "scaricano" di moli di ossigeno, sono stati modellizzati come capacità, mentre la pressione atmosferica come un generatore ideale di tensione.

Per giungere ad un'espressione del modello rappresentativa del comportamento reale del sistema, è stato intrapreso un percorso iterativo: due versioni meno accurate del modello sono state elaborate, verificate sperimentalmente e corrette fino alla stesura del modello finale (Fig.4).



**Fig.4:** Schematizzazione dell'analogia elettrica con la quale si modellizza il sistema di coltura

In Tab.1 sono riportati i valori delle resistenze e capacità applicati, mentre per le unità di misura fare riferimento alla Fig. 4.

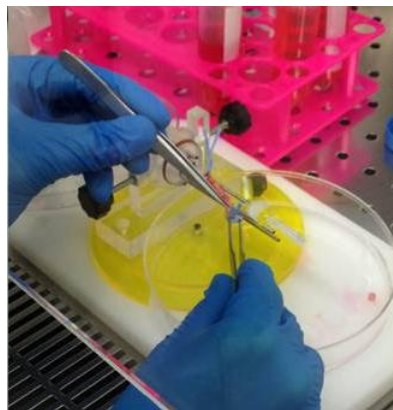
**Tab.1:** valori di resistenze e capacità nel modello finale

$R_{oxy}$	$2.34 \cdot 10^{10}$
$R_{vena}$	$2.56 \cdot 10^{11}$
$R_{deoxy}$	$2.34 \cdot 10^{10}$
$R_{troppo\_pieno}$	$1.09 \cdot 10^{11}$
$R_{filtro\_HEPA}$	$2.59 \cdot 10^{10}$
$R_{altro}$	$2.73 \cdot 10^{11}$
$C_{lum}$	$2.42 \cdot 10^{-7}$
$C_{adv}$	$1.033 \cdot 10^{-8}$

#### *Campagna sperimentale con campioni di vena safena umana*

È stata intrapresa presso il LIT dell'IRCCS Centro Cardiologico Monzino una campagna sperimentale con i campioni di vena safena umana.

Per facilitare il montaggio del campione all'interno della camera bicompartimentale è stato progettato e realizzato un supporto che, bloccando la camera in una posizione comoda per il posizionamento e l'ancoraggio della vena, consente all'operatore di disporre di entrambe le mani per montare il vaso (Fig. 5).



**Fig.5:** Supporto progettato e realizzato per facilitare la fase di montaggio della vena sui connettori della camera bicompartimentale.

Durante la campagna sperimentale i campioni biologici sono stati condizionati all'interno del sistema di coltura per 7 giorni.

La campagna sperimentale è stata condotta su 9 campioni biologici divisi in 3 gruppi, in base al valore di  $pO_2$  imposto sul lato avventiziale (il lato luminale è stato mantenuto al 21% in tutti i gruppi):

- 1) gruppo standard:  $pO_2$  avventiziale pari al 21%,
- 2) gruppo con ipossia moderata:  $pO_2$  avventiziale pari al 5%,
- 3) gruppo con ipossia severa:  $pO_2$  avventiziale pari al 2.5%.

Per ottenere i valori di  $pO_2$  desiderati nel gruppo con ipossia moderata, in due campioni è stato utilizzato il de-ossigenatore L40 iniettando azoto puro, mentre nel terzo campione è stato utilizzato il de-ossigenatore L100 con una miscela composta per il 90% da azoto e

per il 10% da aria. I campioni del gruppo con ipossia severa sono stati condizionati con il de-ossigenatore L100 iniettando una miscela di azoto puro. Durante gli esperimenti i valori di concentrazione di ossigeno sono stati monitorati con il sensore di ossigeno.

Al termine dell'esperimento sono stati prelevati i campioni per le successive analisi biologiche.

Sui campioni sono state eseguite analisi morfologiche tramite colorazioni istologiche (Ematossilina ed Eosina – *Hematoxilin and Eosin*- H&E e tricromica di Masson) e analisi in immunofluorescenza, marcando le componenti cellulari d'interesse. In particolare sono state marcate le cellule muscolari lisce (*Smooth Muscle Cells*-SMC), con anticorpi specifici per marcare l' $\alpha$ -actina delle cellule muscolari lisce, e le cellule endoteliali (*Endothelial Cells* –EC), con anticorpi specifici per il fattore CD31 e il fattore di Von Willebrand. Grazie alle colorazioni istologiche e alle immagini in immunofluorescenza sono stati valutati in modo qualitativo i cambiamenti morfologici indotti dalle diverse condizioni di ossigenazione (standard, ipossia moderata, ipossia severa). Inoltre le immagini dei *vasa vasorum* ottenute

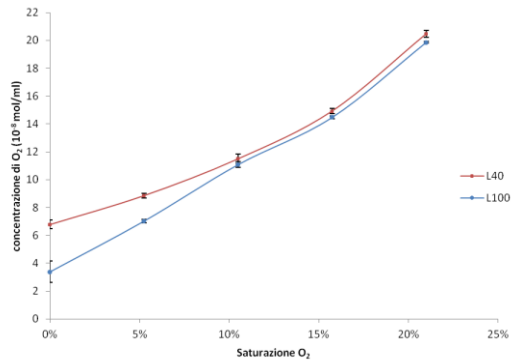
con colorazione H&E e acquisite con ingrandimento 40X sono state utilizzate per quantificare possibili variazioni nella *length density* dei *vasa vasorum* in seguito al condizionamento dei campioni. Infine sono state eseguite analisi immunoistochimiche per valutare qualitativamente la proliferazione cellulare grazie al marcatore Ki67.

## RISULTATI

### *Risultati della caratterizzazione e ottimizzazione modulo de-ossigenante*

Dalle prove di caratterizzazione del modulo de-ossigenante, è stato possibile confrontare le prestazioni del de-ossigenatore L40 e L100.

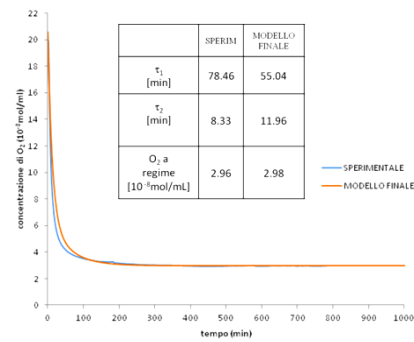
Il de-ossigenatore L100 si è rivelato più efficace del de-ossigenatore L40. Infatti il de-ossigenatore L100 genera valori di scambio di massa maggiori rispetto al de-ossigenatore L40 e, con ricircolo del mezzo, permette di raggiungere, utilizzando come miscela de-ossigenante azoto puro, una  $pO_2$  del 2-3% nel compartimento avventiziale, mentre il de-ossigenatore L40 non è in grado di scendere al di sotto del 5-6% (Fig.6).



**Fig.6:** Confronto tra il valore minimo di  $pO_2$  che si raggiunge nel compartimento avventiziale con il de-ossigenatore L40 e L100 al variare della composizione della miscela de-ossigenante

### Modello predittivo: risultati e verifica

Il modello definito finale è in grado di descrivere il comportamento reale del sistema con una buona approssimazione. L'andamento di  $pO_2$  nel tempo predetto dal modello è stato confrontato con i dati sperimentali sia in termini delle due costanti di tempo caratteristiche del sistema bicompartimentale, sia in termini di valore di  $pO_2$  raggiunto a regime. In Fig.7 è mostrato il confronto grafico tra le previsioni del modello finale e l'andamento sperimentale registrato durante una prova con ricircolo del mezzo, iniettando azoto puro nel de-ossigenatore L100.



**Fig.7:** Confronto tra gli andamenti previsti dal modello analitico e i dati sperimentali

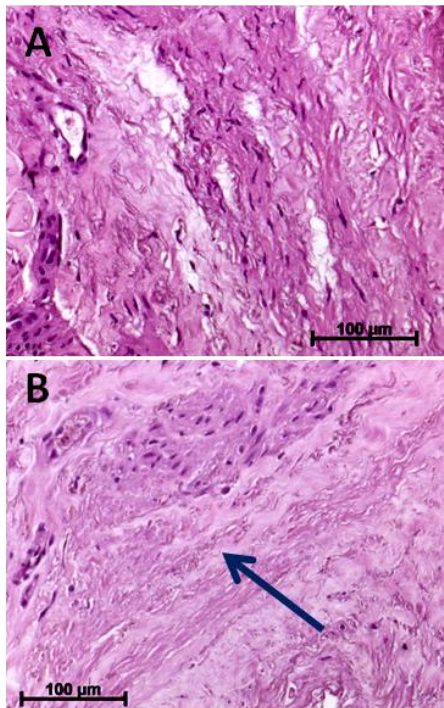
### Risultati della campagna sperimentale con campioni di vena safena umana

Il monitoraggio della  $pO_2$  nel lato avventiziale ha permesso di confermare che, in presenza del campione biologico, il modulo de-ossigenante è in grado di generare i valori di ossigeno desiderati (cioè standard, ipossia moderata e ipossia severa).

L'analisi qualitativa delle immagini ottenute con H&E ha evidenziato una globale conservazione della struttura della parete della vena dopo 7 giorni di stimolazione, in tutte le condizioni (standard, ipossia moderata e ipossia severa) rispetto al tessuto nativo.

Nelle immagini ottenute da colorazione H&E ad ingrandimento 20X e nelle immagini ottenute con tricromia di Masson, si nota, a livello della tonaca media, una diminuzione del numero di cellule nei campioni stimolati con ipossia.

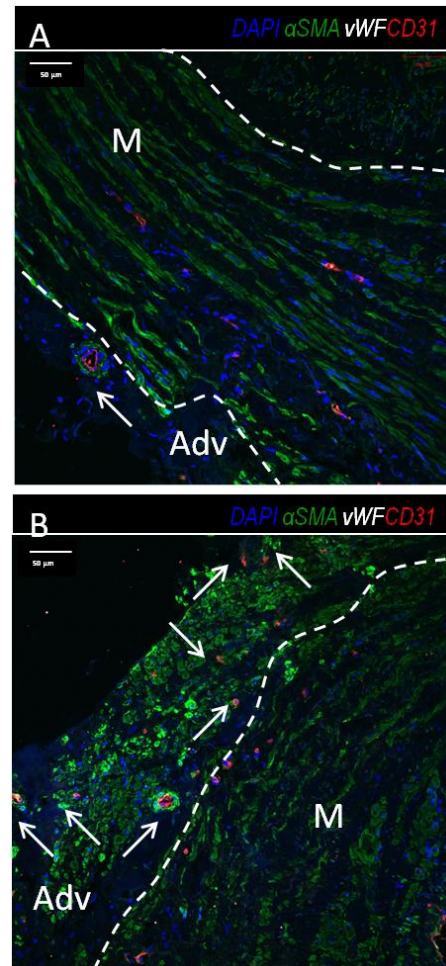
Tale diminuzione, in particolare, è più marcata nei campioni stimolati con ipossia severa, nei quali la tonaca media risulta quasi priva di cellule (Fig.8).



**Fig.8:** Immagine da H&E acquisita con ingrandimento 20X della parete di un vaso nativo (A) e di uno stimolato con ipossia severa (B). La freccia indica la regione della tonaca media spopolata di cellule.

Le immagini in immunofluorescenza hanno confermato quanto evidenziato nelle colorazioni istologiche. A livello della tonaca media si osserva infatti una diminuzione del numero di cellule e una perdita dell'organizzazione delle cellule. Inoltre, le immagini in immunofluorescenza mostrano il mantenimento della struttura del lume anche dopo la stimolazione e un aumento del numero dei *vasa vasorum* nella tonaca

avventizia in seguito a stimolazione con ipossia moderata o severa (Fig. 9).



**Fig.9:** Immagine in immunofluorescenza acquisita con ingrandimento 10X di un campione nativo (A) e di uno stimolato con ipossia severa (B); le frecce indicano i vasa vasorum nell'avventizia. Adv, avventizia; M, media. La linea tratteggiata permette di separare la tonaca media e l'avventizia.

Tale evidenza è stata quantificata misurando la *length density* dei *vasa vasorum* nei campioni stimolati nelle tre condizioni e confrontando i valori ottenuti dei campioni nativi.

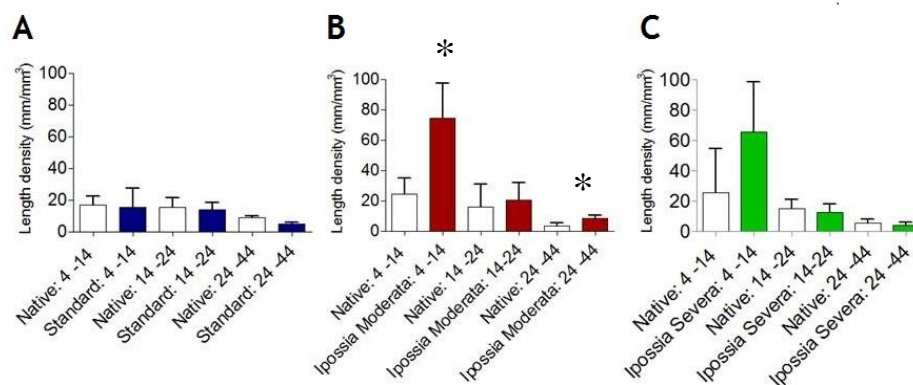
I risultati dimostrano che stimolando il campione in condizioni di ipossia moderata il numero di *vasa vasorum* di piccolo e grande calibro aumenta in modo statisticamente significativo, mentre stimolando il campione con ipossia severa aumenta il numero di *vasa vasorum* di piccolo calibro (Fig.10).

Infine l'analisi qualitativa delle immagini dei campioni ottenute con tecniche immunoistochimiche (Ki67) ha permesso di osservare un aumento del numero di cellule proliferanti nei campioni stimolati

in condizioni di ipossia moderata e ipossia severa rispetto al tessuto nativo.

## DISCUSSIONE

Durante il presente lavoro di tesi, il modulo de-ossigenante di un sistema di coltura bicompartimentale precedentemente sviluppato è stato caratterizzato al fine di garantire il controllo dei valori di ossigeno durante le prove sperimentali. Infatti il de-ossigenatore L100 consente di stimolare il campione biologico in condizioni di ossigeno controllate e di raggiungere livelli di ipossia moderata regolando il rapporto aria/azoto in condizioni di esercizio, senza doverlo utilizzare sempre



**Fig.10:** Risultati della misura della *length density* dei *vasa vasorum*. **A** gruppo in condizioni standard, **B** gruppo in condizioni di ipossia moderata, **C** gruppo in condizioni di ipossia severa. Sia nei campioni con ipossia moderata che quelli con ipossia severa, si nota un evidente incremento della *length density* dei *vasa vasorum* di piccolo calibro. Nei campioni stimolati con ipossia moderata la differenza di *length density* si è dimostrata statisticamente significativa (\*) per quanto riguarda i *vasa vasorum* di piccolo e grande calibro ( $P$  value < 0.05)

al limite inferiore di funzionamento, come avviene invece nel de-ossigenatore L40.

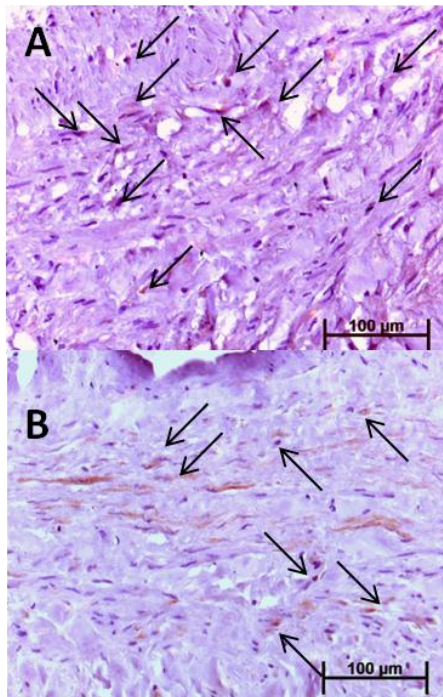
Il modello analitico elaborato è in grado di descrivere con una buona approssimazione il comportamento reale del sistema. Gli andamenti previsti dal modello finale possono suggerire modifiche da apportare agli elementi del sistema per ottimizzare ulteriormente le prestazioni del modulo de-ossigenante.

L'analisi delle immagini ottenute dai campioni biologici ha mostrato che, in seguito a stimolazione in condizioni di ipossia severa, si assiste a uno spopolamento della regione della tonaca media. Questo comportamento può essere spiegato facendo riferimento al modello di consumo di ossigeno elaborato in un precedente lavoro di tesi [7], secondo il quale, stimolando il lato avventiziale con un valore di  $pO_2$  pari a 2.5%, a livello della tonaca media si raggiunge una concentrazione di ossigeno praticamente nulla. Livelli così bassi di ossigeno sono sfavorevoli per le cellule, che potrebbero migrare verso regioni della parete con condizioni di ossigeno più favorevoli, oppure andare incontro a morte cellulare. Presso il Centro Cardiologico Monzino sono al momento in atto colorazioni con

saggio Tunel per verificare questa ipotesi.

L'aumento del numero di *vasa vasorum* nella regione avventiziale, osservato nelle analisi in immunofluorescenza e confermato dalla misura della *length density*, è in accordo con quanto riportato in letteratura. Infatti l'ipossia è uno stimolo che genera nel tessuto risposte adattative di tipo angiogenico [8].

Il dato qualitativo sulla proliferazione cellulare, ricavato da analisi immunoistochimiche, denota un aumento del numero di cellule proliferative (Fig.11). Per stimare le zone della parete vascolare con maggiore contenuto di cellule proliferanti devono essere svolte analisi quantitative per attribuire la proliferazione a specifiche risposte adattative; quantificando ad esempio il numero di cellule proliferanti nella regione avventiziale, si può comprendere se tali cellule siano implicate nella generazione di nuovi *vasa vasorum*.



**Fig. 11:** Confronto tra campione nativo e campione trattato con ipossia. Le frecce indicano le cellule positive al Ki67

## CONCLUSIONI E SVILUPPI

### FUTURI

Il sistema bicompartimentale oggetto del presente lavoro di tesi si è dimostrato un valido strumento per investigare con un approccio bioingegneristico le risposte adattative del tessuto alle diverse condizioni di ossigenazione cui è sottoposta la vena safena in sede di bypass aortocoronarico. Esso fornisce un modello per lo studio e la comprensione dei meccanismi molecolari e cellulari coinvolti nello sviluppo della patologia del graft è alla base dell'individuazione,

in previsione futura, di un trattamento di prevenzione o cura del VGD.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] A. Muto et Al., "Mechanisms of vein graft adaptation to the arterial circulation: insights into the neointimal algorithm and management strategies.," *Circ. J.*, vol. 74, no. 8, pp. 1501–1512, 2010
- [2] A. Longchamp et Al., "The use of external mesh reinforcement to reduce intimal hyperplasia and preserve the structure of human saphenous veins," *Biomaterials*, vol. 35, no. 9, pp. 2588–2599, 2014
- [3] J. Golledge et Al., "Development of an in vitro model to study the response of saphenous vein endothelium to pulsatile arterial flow and circumferential deformation," *Eur. J. Vasc. Surg.*, vol. 13, no. 6, pp. 605–612, 1997.
- [4] B. S. Conklin et Al., "A simple physiologic pulsatile perfusion system for the study of," *Med. Eng. Phys.*, vol. 22, no. 6, pp. 441–449, 2000.
- [5] M. Piola et Al., "Human Saphenous Vein Response to Trans-wall Oxygen Gradients in a Novel Ex Vivo Conditioning Platform," *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 44, no. 5, pp. 1449–1461, 2016.
- [6] D. E. Orr and K. J. L. Burg, "Design of a modular bioreactor to incorporate both perfusion flow and hydrostatic compression for tissue engineering applications," *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 36, no. 7, pp. 1228–1241, 2008.
- [7] M. Malavasi, "Studio ex vivo del rimodellamento di campioni di vena safena umana indotto da differenti condizioni di ossigenazione," Politecnico di Milano, 2014
- [8] C. Michiels et Al. "Endothelial cell responses to hypoxia: initiation of a cascade of cellular interactions," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1497, no. 1, pp. 1–10, 2000

# ABSTRACT

## INTRODUCTION

Coronary circulation provides the proper blood supply to the myocardium. Coronary artery disease, due to an alteration of the coronary functionality, is one of the most common cause of death worldwide. Coronary Artery Bypass Graft (CABG) surgery restores the proper blood flow through the occluded vessel, by creating an anastomosis with an healthy vessel upstream and downstream of the occlusion. Human saphenous vein is the gold standard for CABG, especially especially when multiple conduits are required. However, 50% of venous grafts fail within ten years after surgery. Briefly, in their natural bed SVs are subjected to a quasi-steady, low flow pattern, and to low wall shear stress (0.2 dynes/cm<sup>2</sup>) and pressure loads (5-10 mmHg). By contrast, after CABG surgery SV segments are exposed to pulsatile flow (mean flow rate up to 250 ml/min), high WSS in the range of 3-6 dynes/cm<sup>2</sup>,

and a systolic/diastolic pressure of approximately 120/60 mmHg.. The new hemodynamics causes pathological modification of the tissue, with abnormal wall remodeling and neointima hyperplasia formation. Moreover *vasa vasorum* resection, due to vein harvesting, cause a sudden drop in the tunica adventitia oxygen content, while the vein lumen is exposed to an oxygen partial pressure typical of the artery circulation. The new oxygen environment is also responsible for graft pathological remodeling: hypoxia is known to produce angiogenic response. The failure of vein grafts is due to a pathologic condition named vein graft disease (VGD). The first pathological adaptations start soon after the CABG surgery, then VGD develops with a precise timing; thrombosis appears in the short term, neointimal hyperplasia in the middle term and atherosclerosis in the long term (Fig.1) [1].

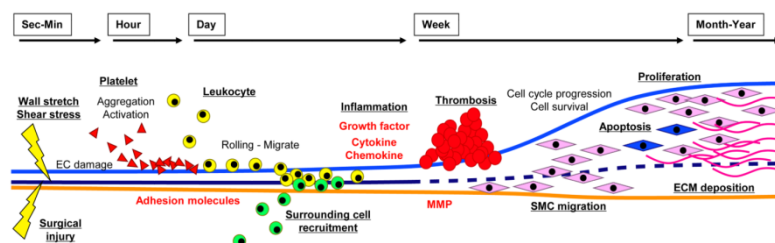


Fig.2: Time-course of VGD. Adapted from [1]

While *ex vivo* vessel culture systems (EVCS) have been developed to assess the effects of the altered mechanical stimuli consequent to the switch from a constant/low to a pulsatile/high blood pressure [2, 3, 4], the biological consequences of the altered oxygen availability in the arterialized veins have not been addressed so far.

This thesis project takes part in an ongoing project developed at the Laboratory of Experimental Micro and Bio-Fluid Dynamics of the Politecnico di Milano, in collaboration with the Cardiovascular Tissue Unit of the IRCCS Centro Cardiologico Monzino, with the final aim of reproducing *ex-vivo* the CABG-like environment to understand the molecular and cellular mechanisms involved in VGD and to find, in the future, a possible clinical treatment to prevent vein graft failure.

This thesis aims at characterizing and optimizing the bicompartimental system developed by Piola and colleagues [5] to treat human saphenous vein samples with oxygen stimuli, typical of the CABG environment.

Moreover, during this thesis, an analytical model, adopted to predict  $pO_2$  trends inside the EVCS, was developed.

Finally, an experimental campaign with human saphenous vein samples has been performed at Centro Cardiologico Monzino, in order to study the consequences induced by adventitia exposure to moderate or severe hypoxia. Histological, immunofluorescences and immunohistochemical analysis have been performed in order to understand tissue and cellular modifications/alterations.

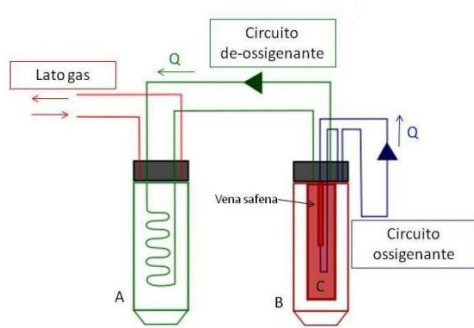
## MATERIALS AND METHODS

### *De-oxygenator module characterization and optimization*

Thanks to a bicompartimental chamber, the EVCS manages to keep the adventitial compartment separated from the luminal one, in order to apply an inside-out oxygen gradient by setting a low  $O_2$  content at the adventitial side and an arterial  $O_2$  content at the luminal side.

The EVCS is composed by two independent circuits, an oxygenating module and a de-oxygenating one (Fig.2). In details, culture medium in the luminal side is kept at a  $pO_2$  of about 150 mmHg, while in the de-oxygenating module the medium is kept at a low oxygen concentration.

In this way, it is possible to mimic the typical trans-wall oxygen gradient occurring after CABG.



**Fig.2:** Schematic representation of the EVCS with the bicompartimental chamber. In green the de-oxygenation circuit, in blue the oxygenating one.

The de-oxygenator consists of a 40 cm silicone tubing (L40) (Fig.3a) rolled up a tubing support made with polymethylmetacrylate, in which the culture medium flows. Silicone tubing are hosted in a commercial falcon tube filled with pure nitrogen. Thanks to oxygen diffusion, the oxygen concentration inside the medium decreased.

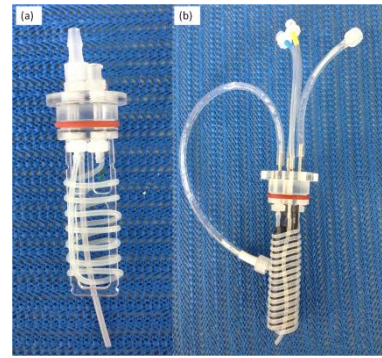
During the thesis, L40-de-oxygenator has been characterized through open loop bench tests, to evaluate the de-oxygenator efficacy in terms of mass exchange, and through closed loop bench tests to understand which  $pO_2$  values could be reached in the adventitial compartment during experiments, with the de-oxygenator coupled with the

bicompartimental chamber. During bench tests, a silicone tube is used to mimic the vein characteristics.

A non-invasive oxygen sensor, based on optrodes technology, has been used to monitor and record the  $pO_2$  values.

A custom made chamber has been designed and realized to measure the oxygen level in the EVCS.

De-oxygenator performances have been improved by using a silicone tube long 100 cm (L100) (Fig. 3.b).



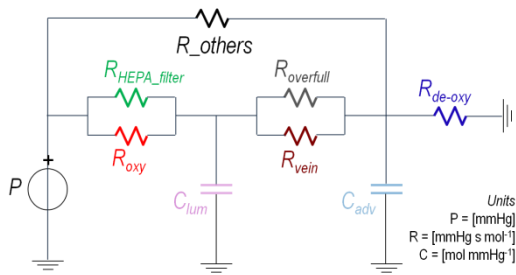
**Fig.3:** Comparison between the two de-oxygenator (a) L40 de-oxygenator (b), L100 de-oxygenator.

L100 de-oxygenator has been characterized by hydraulic tests and with open and close loop bench tests as previously described.

#### *Development of an analytical and predictive model*

An analytical model to predict  $pO_2$  trend in the adventitial compartment has been developed. The EVCS has been modeled with an electrical circuit. In this model, oxygen permeable elements are modeled

by resistances, according to Orr [6]. Luminal and adventitial volumes are represented by capacitors, whereas the atmospheric oxygen partial pressure by an ideal voltage generator. To obtain a representative model, it has been followed an iterative path: step by step two rough models have been verified and upgraded until the final version is conceived (Fig.4).



**Fig.4:** Schematic representation of the electrical circuit to model the EVCS.

In Tab.1, the resistances and capacitances of the model are reported. For the dimension refers to Fig. 4.

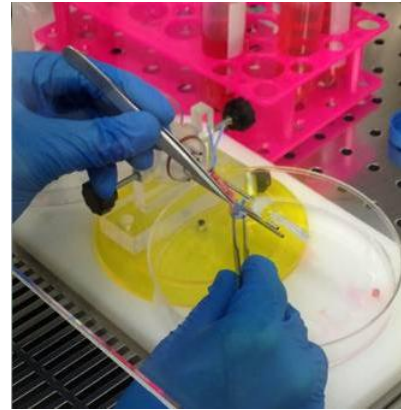
**Tab.2:** Resistances and capacitances of the final model

$R_{oxy}$	$2.34 \cdot 10^{10}$
$R_{vein}$	$2.56 \cdot 10^{11}$
$R_{deoxy}$	$2.34 \cdot 10^{10}$
$R_{overfull}$	$1.09 \cdot 10^{11}$
$R_{HEPA\_filter}$	$2.59 \cdot 10^{10}$
$R_{others}$	$2.73 \cdot 10^{11}$
$C_{lum}$	$2.42 \cdot 10^{-7}$
$C_{adv}$	$1.033 \cdot 10^{-8}$

### Experimental campaign with human saphenous vein

The EVCS has been used to condition human saphenous veins at Centro Cardiologico Monzino

A purpose developed holder has been designed to block the bicompartimentale chamber during the vein mounting procedures (Fig.5).



**Fig.5:** Holder designed and realized to facilitate the vein mounting into the bicompartimentale chamber.

Nine human saphenous vein samples were conditioned within the EVCS for a culture period of 7 days.

Three experimental groups were designed to test three different adventitial  $pO_2$  conditions (luminal sides has been kept at 21% in every group):

- 1) standard group: adventitial  $pO_2$  of 21%,
- 2) moderate hypoxia: adventitial  $pO_2$  of 5%,

3) severe hypoxia: adventitial  $pO_2$  of 2.5%.

L40 de-oxygenator, with pure nitrogen, was used to condition two samples with moderate hypoxia, L100, with a gas blend of 90% nitrogen and 10% air, has been used for the third sample. L100 with pure nitrogen provided the severe hypoxia conditioning.

During the experiments, oxygen values have been monitored with the oxygen sensor.

At the end of the experiments, samples were processed for the biological analysis.

Histological staining (Hematoxilin and eosin –H&E and Masson's thricrome) and immunofluorescences analysis allowed morphological investigations. For the immunofluorescence smooth muscles cells (SMC) were marked with anti-  $\alpha$ SMA antibodies, while CD31 and von Willebrand Factor were used as target for endothelial cells (EC)

Thanks to histological staining and immunofluorescences images, qualitative estimation of morphological changes due to different oxygen conditions (standard, moderate hypoxia, severe hypoxia) has been performed.

*Vasa vasorum* lenght density quantification in the three oxygen

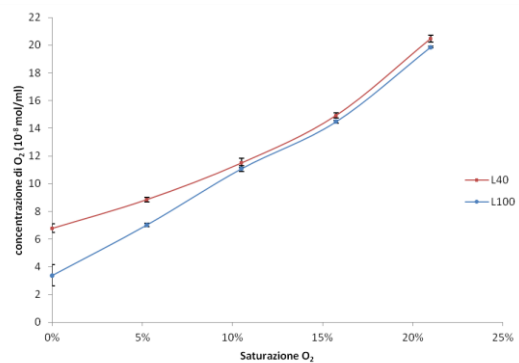
conditions was performed on H&E 40X magnification images.

Finally a qualitative estimation of the proliferative cells was performed using Ki67 proliferation marker .

## RESULTS

### *Results of the characterization of the de-oxygenator*

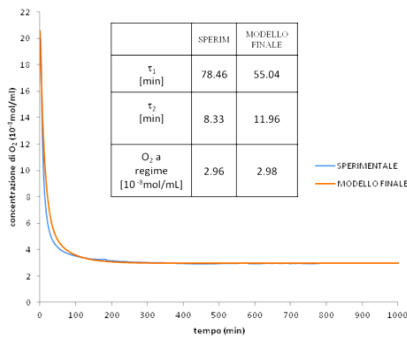
The L100 de-oxygenator shows higher mass exchange values compared to L40 de-oxygenator. Moreover, in the open loop bench tests, with a pure nitrogen blend, the L100 de-oxygenator reaches an adventitial  $pO_2$  of 2-3%, while the L40 de-oxygenator cannot reach values lower than 5-6% (Fig.6).



**Fig.6:** Comparison between L40 and L100 de-oxygenator efficacy varying oxygen saturation in the de-oxygenating blend

*Analytical model predictions and experimental validation*

The so called “final model” predicts with a good fidelity the behavior of the EVCS. Fig.7 shows a comparison between the analytical solution and experimental data, in terms of pO<sub>2</sub> time course, bi-compartmental two exponential time decays and the plateau pO<sub>2</sub> values.



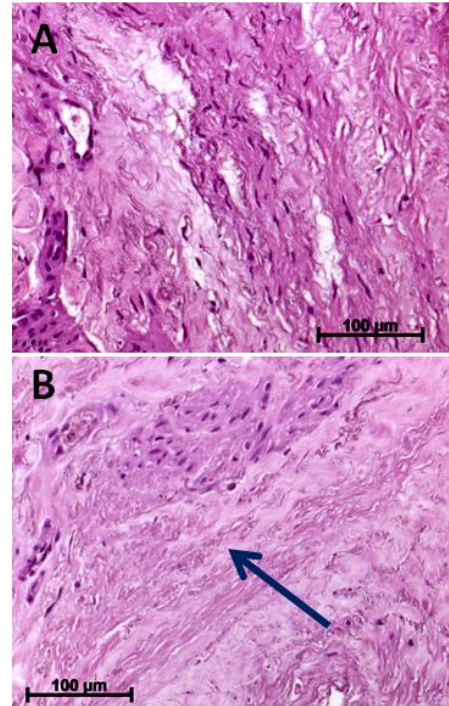
**Fig.7:** Comparison between analytical solution and experimental data

*Results of the experimental campaign with human saphenous veins*

H&E images show a good preservation of the vein wall structure after 7 days of conditioning with standard oxygen conditions, moderate hypoxia and severe hypoxia compared to native samples.

Looking at H&E images acquired at 20X magnification and Masson’s Thricrome images, it is possible to observe that the tunica media of the samples conditioned

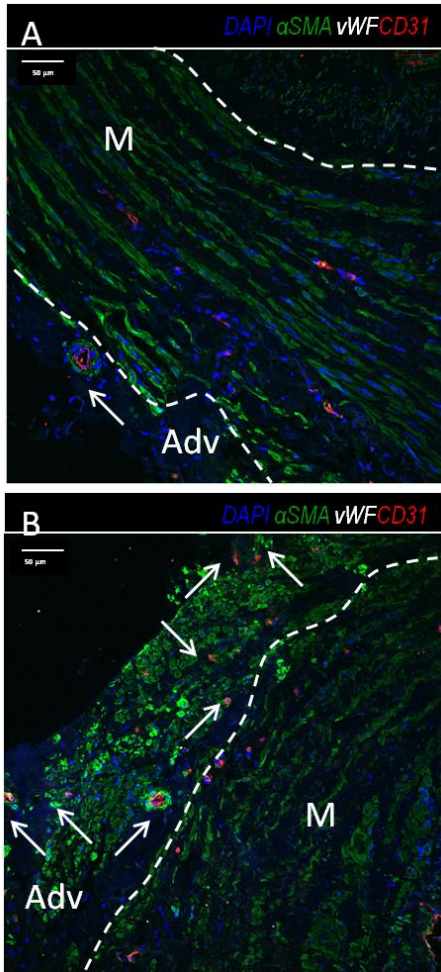
with hypoxia is deprived of cells. This behavior is remarkable in the samples treated with severe hypoxia (Fig.8).



**Fig.8:** H&E image at 20X magnification of the vessel wall of a native sample (A) and of a sample conditioned with severe hypoxia (B). Arrow show the tonaca media denudation

Immunofluorescenes images confirmed the H&E evidences.

Moreover, immunofluorescence images show that, after conditioning, the lumen structure is kept intact and in the adventitial area it is possible to see an increased number of vasa vasorum after conditioning with moderate and severe hypoxia (Fig. 9).



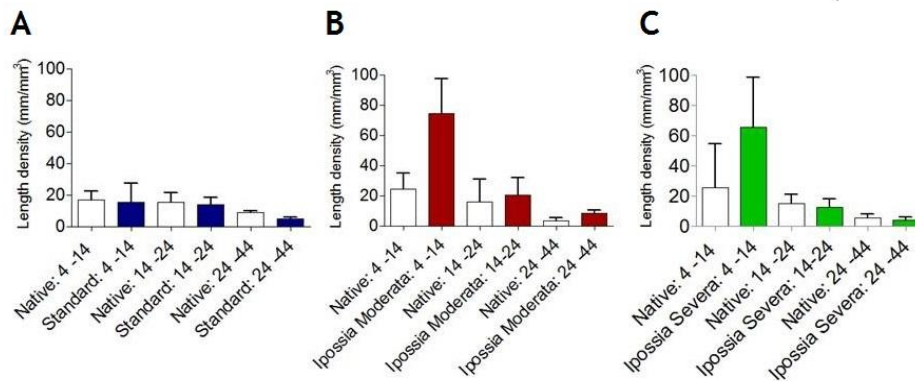
**Fig.9:** Immunofluorescence image acquired at 10X magnification of a native sample (A) and of a severe hypoxia sample(B); arrows show adventitial vasa vasorum. Adv, adventitia; M, media. Dotted line is placed between tonaca media and adventitia.

The *vasa vasorum* increase has been

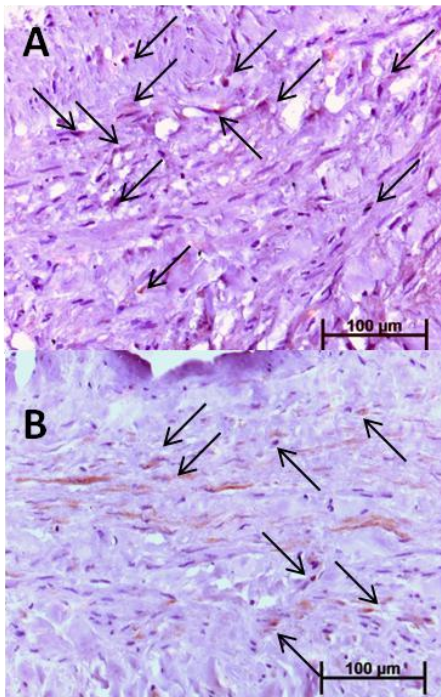
quantified by measuring the *length density* of the *vasa vasorum* in the conditioned samples and by comparing datas with the one of the native samples. Moderate hypoxia caused a statistical \* significant increase in the small and big caliber *vasa vasorum*, while. Conditioning with severe hypoxia caused an increase in small caliber *vasa vasorum* (Fig.10).

Finally, a qualitative evaluation of Ki67 positive cells showed an increasing number of proliferating cells in the hypoxia conditioned samples, with respect to native and standard ones (Fig.11).

\*



**Fig.10:** Quantification of vasa vasorum length density. **A** standard group, **B** moderate hypoxia group **C** severe hypoxia group. Both in **B** and **C** there is an increase in small caliber vasa vasorum length density. Moreover in **B** the length density comparison between conditioned and native samples is statistically significant (\*) for small and big caliber vasa vasorum ( $P$  value < 0.05)



**Fig. 11:** Comparison between native and treated sample with hypoxia. Arrows indicated Ki67 positive cells

## DISCUSSION

During this thesis, the de-oxygenating module of an existing EVCS has been characterized, in order to better control the oxygen levels during experiments.

As a matter of fact, the L100 de-oxygenator could be used to reproduce different oxygen condition by setting different gas blend composition,

The analytical model developed in this thesis describes with a good approximation the EVCS behavior.

Biological analysis showed a denudation of the tonaca media due to severe hypoxia condition.

The oxygen consumption model developed in a previous thesis [7], can explain this behaviour.

As a matter of fact, according to this model, when the adventitial region is

exposed to a 2.5% of pO<sub>2</sub>, in the tunica media the oxygen concentration is almost zero. The cells couldn't find a suitable environment and they could migrate towards areas of the vein with higher oxygen values, or enter in apoptosis. At the Centro Cardiologico Monzino TUNEL assays are ongoing to verify this hypothesis.

The adventitial *vasa vasorum* number increases, as observed in the immunofluorescence images. This evidence is confirmed by measuring the *length density* and it has also been found in literature. As a matter of fact, the hypoxia stimulus induces an angiogenic response in the tissue [8].

The qualitative evaluation of immunohistochemical proliferation analysis show an increasing number of proliferative cells. Quantitative analysis of these results are ongoing.

## CONCLUSIONS AND FUTURE WORKS

The bi-compartmental EVCS developed in this thesis is a powerful tool to investigate the adaptive responses induced by different oxygen conditions on the human saphenous vein after CABG. *Ex vivo* reliable models are

important to replicate physiopathological processes that cause VGD.

The knowledge of the molecular and cellular mechanisms involved in VGD is important to find, in the future, a clinical treatment to avoid vein graft failure.

## BIBLIOGRAPHY

- [1] A. Muto et Al., "Mechanisms of vein graft adaptation to the arterial circulation: insights into the neointimal algorithm and management strategies.," *Circ. J.*, vol. 74, no. 8, pp. 1501–1512, 2010
- [2] A. Longchamp et Al., "The use of external mesh reinforcement to reduce intimal hyperplasia and preserve the structure of human saphenous veins," *Biomaterials*, vol. 35, no. 9, pp. 2588–2599, 2014
- [3] J. Golledge et Al., "Development of an in vitro model to study the response of saphenous vein endothelium to pulsatile arterial flow and circumferential deformation," *Eur. J. Vasc. Surg.*, vol. 13, no. 6, pp. 605–612, 1997.
- [4] B. S. Conklin et Al., "A simple physiologic pulsatile perfusion system for the study of," *Med. Eng. Phys.*, vol. 22, no. 6, pp. 441–449, 2000.
- [5] M. Piola et Al., "Human Saphenous Vein Response to Trans-wall Oxygen Gradients in a Novel Ex Vivo Conditioning Platform," *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 44, no. 5, pp. 1449–1461, 2016.
- [6] D. E. Orr and K. J. L. Burg, "Design of a modular bioreactor to incorporate both perfusion flow and hydrostatic compression for tissue engineering applications," *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 36, no. 7, pp. 1228–1241, 2008.
- [7] M. Malavasi, "Studio ex vivo del rimodellamento di campioni di vena safena umana indotto da differenti

condizioni di ossigenazione,” Politecnico di Milano, 2014

[8] C. Michiels et Al. “Endothelial cell responses to hypoxia: initiation of a cascade of cellular interactions,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1497, no. 1, pp. 1–10, 2000



# INTRODUZIONE

Il lavoro di tesi, svolto presso il Laboratorio di Micro e Biofluidica Sperimentale ( $\mu$ BSLab) del Dipartimento di Elettronica, Informazione e Bioingegneria (DEIB), s'inserisce all'interno di un progetto più ampio, svolto in collaborazione con il gruppo di ricerca del Laboratorio di Ingegneria Tissutale Cardiovascolare (LIT) dell'IRCCS Centro Cardiologico Monzino. Fine ultimo del progetto è quello di ricreare *ex vivo* la stimolazione biochimica cui è sottoposta la vena safena utilizzata come graft nell'operazione chirurgica di bypass aorto-coronarico (*Coronary Artery Bypass Grafting- CABG*) per comprendere i meccanismi cellulari e molecolari che concorrono allo sviluppo delle patologie della vena safena, o *vein graft disease* (VGD), così da averne una conoscenza completa, che consenta in prospettiva l'individuazione di un trattamento di prevenzione o cura del VGD.

Obiettivo del progetto di tesi è caratterizzare e ottimizzare un sistema precedentemente sviluppato per stimolare segmenti di vena safena *ex vivo* con le condizioni di ossigenazione cui è sottoposta la vena in seguito a CABG.

La vena safena rappresenta, infatti, il sostituto di elezione per gli interventi di rivascularizzazione del miocardio soprattutto in presenza di bypass multipli; tuttavia, a causa delle differenze morfologiche, strutturali e funzionali e delle differenti condizioni emodinamiche caratteristiche del sistema venoso rispetto a quello arterioso e a causa dell'esposizione a un ambiente biochimico anomalo per la vena, nel lungo termine si assiste al fallimento del graft venoso nel 50% dei casi.

In precedenti lavori di tesi [1] [2], svolti sempre presso il  $\mu$ BSLab, è stato sviluppato un sistema bicompartimentale in grado di esporre il compartimento luminale della vena e quello avventiziale a diverse condizioni di ossigenazione. Tale sistema è stato quindi messo in esercizio per condizionare campioni di vena safena umana che sono campioni di scarto, non utilizzati per l'intervento di CABG.

A partire da un'analisi delle caratteristiche del sistema esistente, il presente lavoro di tesi è stato impostato e strutturato come segue: la prima parte del lavoro è stata dedicata a una dettagliata caratterizzazione del sistema pre-esistente.

Successivamente è stata progettata una versione ottimizzata del sistema, così da ottenere un sistema controllabile in grado di raggiungere valori di ossigeno più bassi nel compartimento avventiziale.

In parallelo al lavoro di caratterizzazione e ottimizzazione è stato sviluppato un modello analitico predittivo del comportamento del sistema.

Infine il sistema sviluppato è stato utilizzato nell'ambito di una campagna sperimentale su campioni di vena safena presso il Centro Cardiologico Monzino, per confrontare i cambiamenti indotti sul tessuto dall'esposizione a valori di ipossia severa o moderata rispetto alla normossia.

Nel Capitolo 1 si presenta un breve excursus sulla fisiologia e sulla fisiopatologia delle coronarie, seguito dalla descrizione delle procedure chirurgiche di rivascolarizzazione e dei vasi utilizzati come graft, ponendo l'accento sulla grande vena safena. Infine si presentano i meccanismi coinvolti nello sviluppo del VGD, sottolineando gli effetti causati dall'ipossia.

Nel Capitolo 2 viene descritto lo stato dell'arte relativo ai sistemi di coltura *ex vivo* di segmenti vascolari e si mostrano alcuni lavori volti a studiare le conseguenze indotte dall'ipossia.

Nel Capitolo 3, dopo una presentazione del sistema di coltura *ex vivo*, vengono illustrate le prove di caratterizzazione che sono state eseguite sul sistema e le soluzioni messe in atto per ottimizzarne le prestazioni. Vengono inoltre illustrati i passaggi che hanno portato all'elaborazione di un modello analitico predittivo del comportamento del sistema. Infine viene descritta la campagna sperimentale svolta con i segmenti di vena safena presso il Centro Cardiologico Monzino e le analisi condotte sui campioni biologici.

Nel Capitolo 4 vengono presentati e discussi i risultati delle prove di caratterizzazione svolte presso il  $\mu$ BSLab. Si presenteranno anche i risultati delle prove svolte per validare i risultati del modello analitico. Infine si mostreranno i risultati della campagna sperimentale con i campioni biologici, mostrando gli andamenti di pressione parziale di ossigeno monitorati nel sistema in esercizio con i campioni biologici, e si porrà l'accento sulle evidenze riscontrate dalle immagini istologiche e immunoistochimiche effettuate sui campioni prima e dopo la coltura in diverse condizioni di ossigenazione (normossia, ipossia moderata o ipossia severa nel compartimento avventiziale).

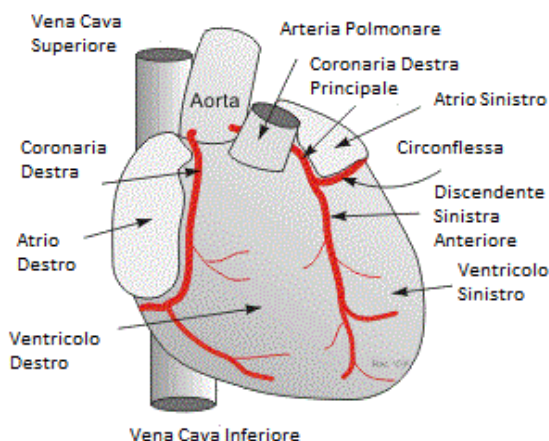
A partire dai risultati ottenuti saranno quindi tratte considerazioni conclusive e introdotti alcuni possibili sviluppi del sistema oggetto del lavoro di tesi.

# 1.LE CORONARIE: PATOLOGIE, INTERVENTI E CAUSE DI FALLIMENTO

*Questo capitolo è dedicato alla descrizione delle coronarie e del trattamento delle patologie coronariche. Vengono esposte le possibili tipologie di intervento e si pone un accento particolare sulla grande vena safena. Infine si prendono in considerazione le conseguenze legate all'utilizzo di tale sostituto venoso autologo e si descrivono quindi i meccanismi alla base del vein graft disease, dando un rapido sguardo in particolare agli effetti causati dalla condizione di ipossia.*

## 1.1 LE CORONARIE

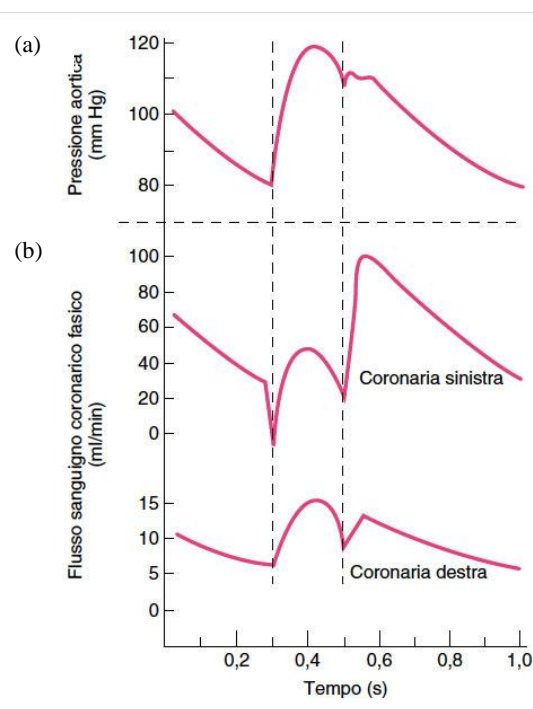
La circolazione coronarica svolge la fondamentale funzione di garantire il corretto afflusso sanguigno al muscolo miocardico. Le coronarie, per sostenere il funzionamento del cuore, sequestrano una portata di sangue pari circa al 5/10 % della gittata cardiaca. Ciò significa che nell'intero circuito coronarico scorre una portata di circa 250/500 ml/min, distribuita in una fitta rete costituita da vasi di medio calibro e capillari [3]. Le arterie coronariche originano dalla radice dell'aorta, in corrispondenza dei seni di Valsalva: la coronaria destra si diparte dal seno aortico anteriore destro e irrora il ventricolo destro e la parte posteriore del setto, mentre la sinistra dall'anteriore sinistro e irrora il ventricolo sinistro e la metà anteriore del setto. Il circolo è completato dalle vene coronarie, nelle quali confluisce il sangue deossigenato che viene riversato nel seno coronarico e, successivamente, nell'atrio destro (Fig. 1.1) [4].



*Fig. 1.1 Il circolo coronarico. Le coronarie hanno origine nel primo tratto dell'aorta. L'arteria coronaria sinistra si origina dal seno aortico sinistro, mentre l'arteria coronaria destra dal seno aortico destro.*

Il flusso coronarico è legato alla richiesta di ossigeno da parte del miocardio; il cuore presenta un consumo di ossigeno molto elevato, pari a circa 8-10 ml O<sub>2</sub>/min/100g, ed è l'organo con la differenza artero-venosa più alta, circa 10-13 ml/100 ml. In un cuore non patologico l'aumento dell'attività cardiaca e del consumo di ossigeno è accompagnata da un aumento di flusso coronarico. I fattori che regolano tale flusso sono sostanzialmente tre: meccanico, metabolico e nervoso.

Il fattore meccanico è dovuto alla contrazione della muscolatura cardiaca, che ad ogni contrazione comprime le arterie coronariche e aumenta la loro resistenza al flusso (Fig. 1.2).



*Fig. 1.2: Pressione aortica e flusso coronarico. Il 70% del flusso coronarico si verifica durante la diastole. Le due linee tratteggiate verticali delineano il periodo della sistole, durante le quali si verifica il picco di pressione aortica: il flusso della coronaria sinistra diminuisce bruscamente e può diventare retrogrado durante la sistole. Questo effetto è meno marcato nella coronaria destra in quanto la compressione del ventricolo destro è minore. Durante la diastole, in corrispondenza della diminuzione della pressione nell'aorta, il flusso coronarico raggiunge il valore massimo.*

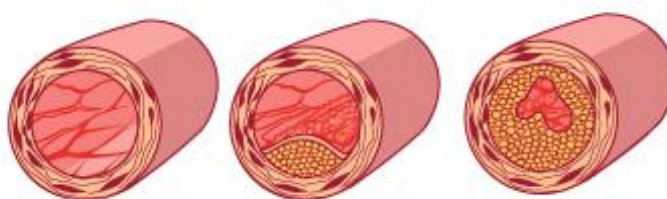
Il fattore metabolico è rappresentato dall'autoregolazione, che tende a rendere il flusso indipendente dalla pressione. Quando il flusso coronarico non è sufficiente a sostenere l'aumento del consumo di ossigeno da parte del cuore, vengono rilasciati metaboliti, come l'adenosina, che provocano la vasodilatazione delle coronarie. L'autoregolazione provvede quindi a mantenere il flusso medio uniforme, nonostante il maggiore impedimento meccanico.

Il terzo fattore, quello del controllo nervoso, svolge invece un ruolo secondario nella regolazione del flusso coronarico e può indurre vasodilatazione e nel contempo aumento della contrattilità e della frequenza cardiaca [5].

## 1.2 CORONAROPATIE: CAUSE E INCIDENZA SULLA POPOLAZIONE

Con il termine generico di coronaropatia (*Coronary Heart Disease- CHD*, oppure *Coronary Artery Disease- CAD*) si intende una modifica anatomica o funzionale delle arterie coronariche.

Le coronaropatie aterosclerotiche sono dovute alla presenza all'interno dei vasi coronarici di stenosi che portano ad una diminuzione del flusso sanguigno, con conseguente squilibrio metabolico dovuto all'alterazione del rapporto tra fabbisogno e apporto di sangue al cuore (Fig. 1.3). Tali restringimenti sono dovuti principalmente all'eccessivo deposito di colesterolo e altri grassi nelle pareti dei vasi, all'infiltrazione dei leucociti e a fenomeni di infiammazione vascolare.



*Fig. 1.3: Progressiva occlusione di un vaso coronarico. A sinistra la coronaria è pervia, al centro si evidenzia una placca aterosclerotica più avanzata, a destra la stenosi interessa quasi interamente il lume del vaso*

I primi danni per le cellule endoteliali si presentano già nella fase precoce della patologia con gravi conseguenze sulla funzione coronarica; l'endotelio rilascia infatti sostanze fondamentali come l'ossido nitrico e le prostaglandine e il suo danneggiamento conduce a vasospasmi coronarici, alterazione delle proprietà elastiche dei tessuti e formazione di

trombi [5]. La riduzione progressiva del lume diventa critica quando supera un restringimento superiore al 75 % del calibro del lume stesso, con comparsa della sintomatologia nota con il nome di *angina pectoris*. Tale sintomatologia peggiora all'aumentare dell'occlusione.

L'occlusione improvvisa di una coronaria comporta la necrosi della porzione di muscolo cardiaco a valle della coronaria ostruita e quindi la comparsa di un infarto miocardico. La regione di tessuto miocardico colpita da necrosi va incontro a un processo riparativo di tipo cicatriziale-fibrotico e quindi alla perdita della funzione cardiaca [6].

L'anatomia coronarica prevede l'esistenza di una sorta di sistema di sicurezza rappresentato dai circoli collaterali: una rete di condotti arteriosi alternativi che connettono le due coronarie destra e sinistra e forniscono una via alternativa per il flusso sanguigno verso il miocardio, soprattutto in pazienti affetti da cardiopatia ischemica [7].

Secondo i dati dell'Organizzazione Mondiale della Sanità le malattie cardiovascolari hanno rappresentato nel 2012 la principale causa di morti nel mondo con 17.5 milioni di morti. In particolare nel 2012 le cardiopatie ischemiche sono al primo posto nella lista delle malattie mortali, avendo causato la morte di 7.4 milioni di persone, che in termini percentuali rappresentano il 13.2% delle principali cause di morte, seguite dall'ictus, che ha provocato la morte di 6.7 milioni di persone (pari all'11.9%) e dalla broncopatia cronica ostruttiva (3.1 milioni di morti, cioè il 5.6%) (Fig. 1.4) [8].

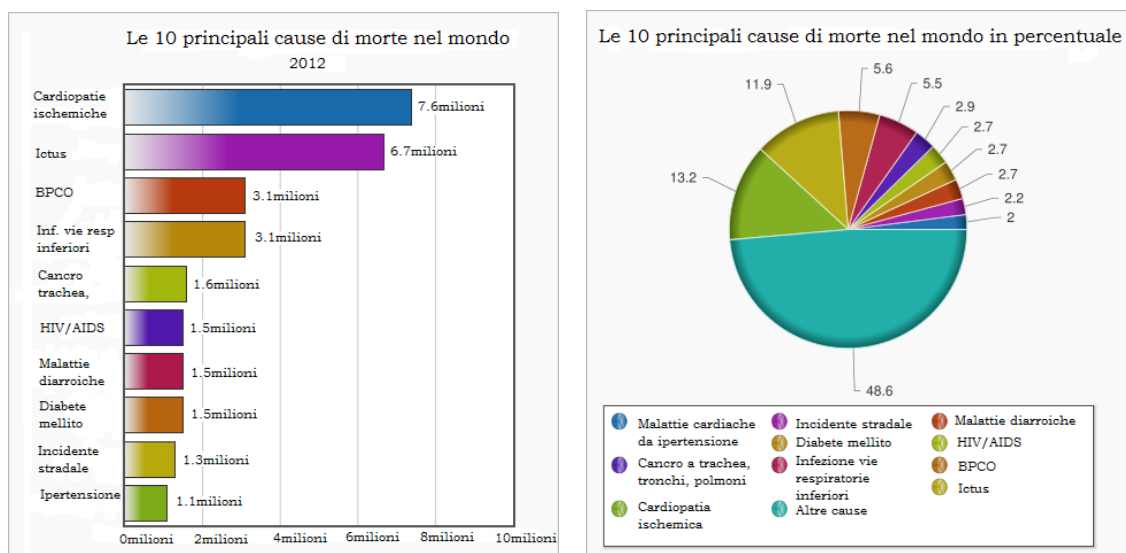
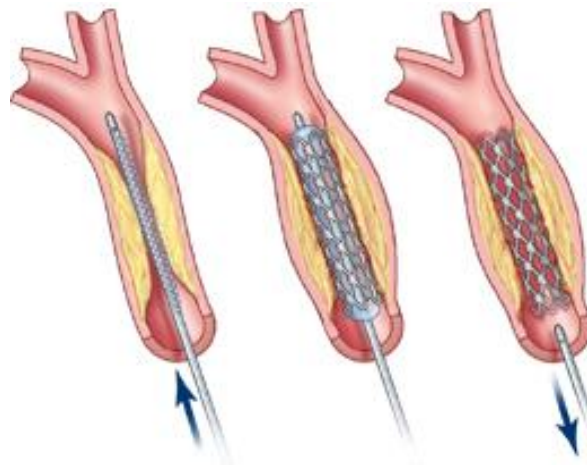


Fig. 1.4: A sinistra le dieci principali cause di morte nel mondo nel 2012 per numero di morti, al primo posto le cardiopatie ischemiche. A destra distribuzione percentuale delle principali cause di morte: le cardiopatie ischemiche rappresentano il 13.2 % delle cause totali di decesso. Adattato da [8].

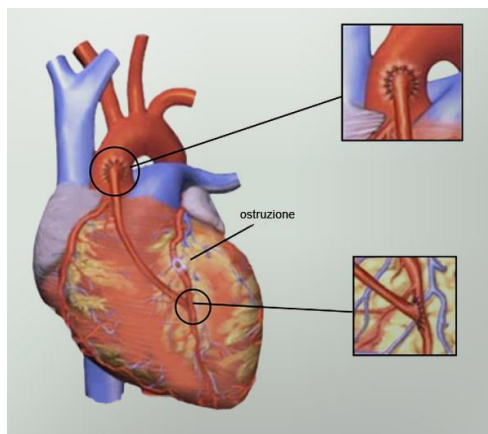
### 1.3 TRATTAMENTO DELLE CORONAROPATIE: ANGIOPLASTICA E BYPASS AORTOCORONARICO

Qualsiasi sia il tipo di intervento per risolvere una coronaropatia l'obiettivo è quello di ripristinare il flusso sanguigno all'interno del vaso ostruito per riportare i valori di flusso entro i limiti fisiologici. Si possono individuare due tipologie di intervento: gli interventi di angioplastica e il bypass aortocoronarico (Coronary Artery Bypass Graft surgery - CABG). L'angioplastica coronarica è una tecnica relativamente moderna, nata nel 1976, quando il medico Andreas Gruentzig per primo trattò una stenosi coronarica servendosi di un palloncino [9]. Per ridurre i casi di ristenosi, nacque poi a metà degli anni '80 lo stent metallico (BMS), una sorta di rete metallica inserita in prossimità del restringimento del vaso durante l'intervento di angioplastica; esso funge da supporto e aiuta a mantenere pervio il vaso in modo permanente (Fig. 1.5). La necessità di limitare ulteriormente i casi di riuclusione, dovuti principalmente alla formazione di tessuto cicatriziale all'interno del dispositivo metallico, ha portato, alla nascita degli stent medicati (DES); le retine tubolari vengono ricoperte da farmaci che, rilasciati progressivamente *in situ*, limitano la proliferazione di tessuto cicatriziale all'interno dello stent e impediscono così il restringimento [10].



*Fig. 1.5: Angioplastica con stent. Nell'immagine a sinistra lo stent è montato su un palloncino che viene espanso all'interno della coronaria per comprimere la placca e ripristinare il flusso sanguigno. Al centro si mostra come, dopo avere compresso la placca contro la parete del vaso, lo stent viene portato alla massima espansione. Infine a destra il palloncino viene rimosso mentre lo stent rimane in sede e funziona da supporto affinché il vaso rimanga pervio.*

L'intervento chirurgico di bypass consiste nell'utilizzare un vaso per creare un percorso alternativo al sangue così che il miocardio possa tornare ad essere perfuso in modo adeguato; i due capi del vaso utilizzato per il bypass vengono anastomizzati l'uno sull'aorta, a monte della stenosi, e l'altro sull'arteria coronaria, a valle della stenosi (Fig. 1.6) [9].



*Fig. 1.6: Intervento di bypass aortocoronarico (CABG) . Dopo aver avuto accesso al cuore tramite una incisione dello sterno – sternotomia. Il chirurgo sutura un vaso a monte (sull'aorta) e a valle (sulla coronaria) dell'occlusione per ripristinare il flusso sanguigno.*

Diversi studi hanno dimostrato che in termini di mortalità a lungo termine e infarto miocardico queste due tecniche ottengono risultati del tutto simili [11] [12] [13] [14]. Alcuni gruppi di ricerca hanno provato a confrontare i due tipi di intervento sulla base della qualità della vita, ma non è ancora stato possibile stabilire in modo univoco quale dei due raggiunga esiti migliori in questi termini [15].

Esistono quindi delle linee guida che suggeriscono il trattamento più adatto in funzione della gravità della patologia e del profilo clinico del paziente [16]. In base ai dati a disposizione attualmente, è raccomandabile consigliare l'intervento di angioplastica ai pazienti con malattia mono- o bivasale che presentino funzioni ventricolari normali e lesioni anatomicamente idonee. Al contrario si dovrebbe ricorrere all'innesto di bypass aortocoronarico per i pazienti con malattia trivasale e alterata funzione ventricolare sinistra o con diabete mellito o con disturbi e lesioni anatomiche che non rendono adatte procedure basate sull'utilizzo di cateteri. La decisione rimane comunque piuttosto complessa, motivo per il quale è auspicabile una collaborazione multidisciplinare che includa un cardiologo, un cardiocirurgo e il medico di base del paziente, e la loro indicazione non può inoltre prescindere dalle preferenze del paziente [9].

## 1.4 STRUTTURA DEI VASI SANGUIGNI

Le pareti dei vasi sanguigni sono composte da tre strati: tonaca intima, cioè il rivestimento interno formato da un singolo strato di cellule epiteliali, tonaca media, lo strato intermedio composto principalmente da muscolatura liscia, e tonaca avventizia, lo strato esterno di tessuto connettivo. La tonaca media è quella che presenta maggiore variabilità sia in termini di spessore che in termini di organizzazione; la tonaca media delle arterie di grosso calibro, ad esempio, contiene prevalentemente componenti elastiche (Fig. 1.7) [17].

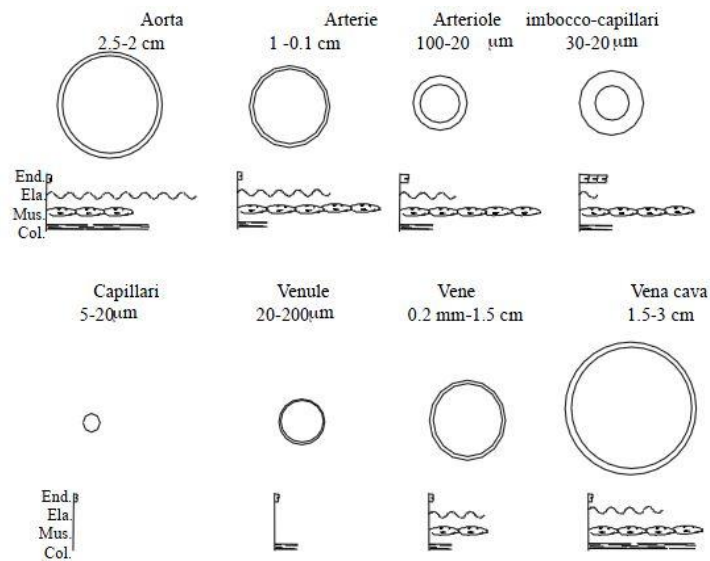


Fig.1.7: Dimensioni e composizione di alcuni tipi di vaso sanguigno. Adattato da [17]

Le arterie trasportano il sangue ai tessuti sotto elevati regimi pressori e in esse il sangue scorre a velocità elevate, per questo motivo presentano pareti più robuste.

Le vene funzionano come condotti per trasportare il sangue dai distretti periferici al cuore e costituiscono una grande riserva di sangue. Non essendo esposte a valori di pressione elevati, le pareti venose sono sottili, ma possiedono comunque uno strato muscolare sufficiente a determinarne la contrazione e il rilassamento. Un'altra differenza sostanziale a livello anatomico tra arterie e vene è data dalla presenza, all'interno delle vene, delle valvole a nido di rondine, ossia valvole fatte in modo tale che il flusso sanguigno possa essere direzionato solo e unicamente verso il cuore e non possa esserci reflusso (Fig. 1.7) [18].

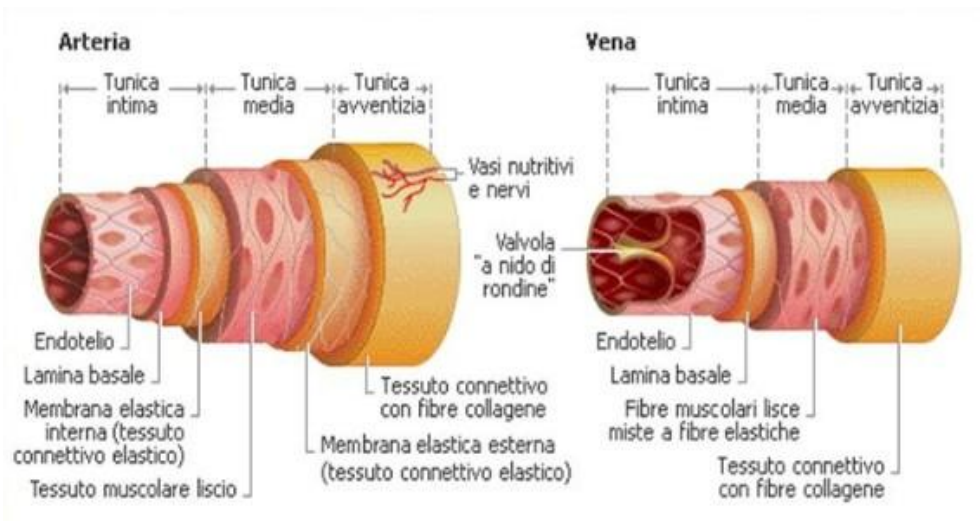


Fig. 1.7: Rappresentazione schematica degli strati e delle varie componenti di una parete arteriosa, a sinistra, e venosa, a destra. In evidenza la presenza delle tre tuniche, intima, media e avventizia costituite per la maggior parte rispettivamente da endotelio, tessuto muscolare liscio e tessuto connettivo con fibre di collagene. Una caratteristica delle vene, assente completamente nei vasi arteriosi, è la presenza delle valvole a nido di rondine per evitare il reflusso del sangue.

Per quanto riguarda l'organizzazione della substruttura si può fare riferimento allo schema proposto da Azuma e Hasegawa (Fig. 1.8) per il quale le fibre muscolari si avvolgono ad elica, l'elastina forma una lamina con fenestrature in direzione longitudinale e le fibre di collagene creano una rete disordinata che si organizza progressivamente all'aumentare delle sollecitazioni [19].

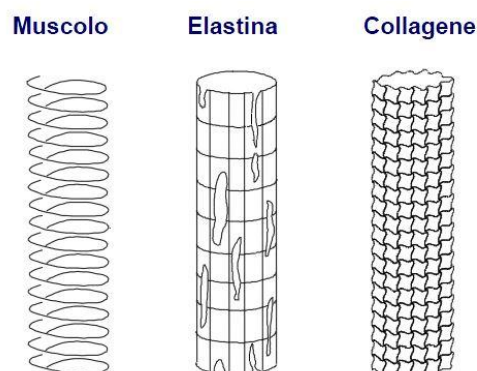


Fig. 1.8: Substruttura dei tessuti che compongono la parete dei vasi sanguigni. Adattato da [19]

Dal punto di vista biomeccanico l'elastina è una proteina con un modulo elastico di circa 1MPa, comportamento elastico lineare, bassa isteresi e basso rilassamento. Il collagene ha un modulo elastico di tre ordini di grandezza superiore a quello dell'elastina, comportamento non lineare dovuto sia alle proprietà del materiale stesso sia al fatto che le fibre entrano in azione in modo progressivo, moderata isteresi e moderato rilassamento. La componente muscolare, infine, ha basse proprietà meccaniche, isteresi elevata con carichi ciclici e rilassamento che tende a zero con tempi elevati.

Se si osserva la curva sforzo-deformazione della parete di un vaso (Fig. 1.9) si può attribuire all'elastina il comportamento elastico lineare per basse deformazioni, mentre al collagene il comportamento non lineare ad alte deformazioni [19].

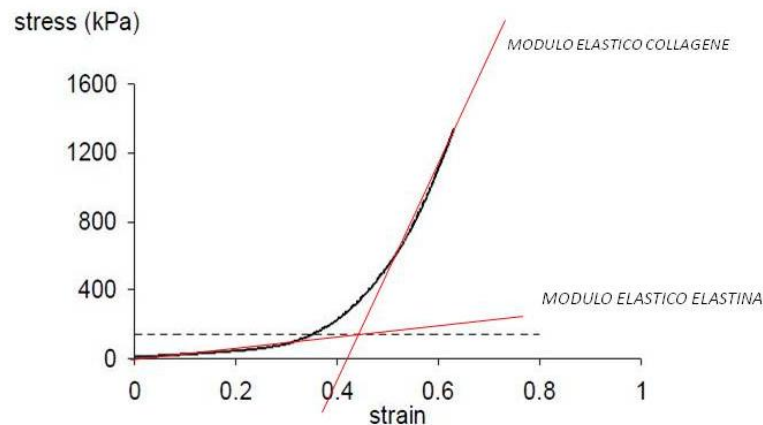


Fig. 1.9: Comportamento di un vaso aortico se sottoposto a trazione fino a rottura in direzione circonferenziale. Adattato da [19].

Uno dei parametri più importanti quando si svolgono studi emodinamici è infine la compliance vascolare, che misura il volume di sangue che può essere immagazzinato in una specifica parte del circolo per ogni unità di aumento pressorio.

La formula con la quale si può esprimere la compliance è data da:

$$C = \frac{\text{Aumento di volume}}{\text{Aumento di pressione}} = \frac{\Delta V}{\Delta P}$$

In generale il circolo venoso è molto più compliant di quello arterioso; la compliance di una vena sistemica è infatti circa 25 volte maggiore di quella della sua arteria

corrispondente (Fig.1.11). Questo spiega la capacità di una vena di accogliere ingenti volumi di sangue in seguito a piccole variazioni della pressione al suo interno [18].

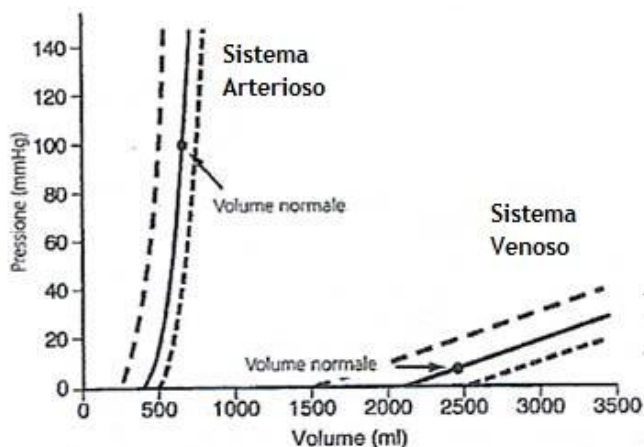


Fig. 1.10: Confronto tra la curva Pressione-Volume arteriosa e quella venosa. La compliance venosa è maggiore rispetto a quella arteriosa e permette al sistema venoso di accogliere ingenti volumi di sangue a fronte di piccole variazioni di pressione al suo interno.

## 1.5 VASI AUTOLOGHI, PROTESI E SOSTITUTI INGEGNERIZZATI UTILIZZATI NELL'INTERVENTO DI BYPASS AORTO-CORONARICO

I vasi autologhi di elezione per la realizzazione di un bypass aortocoronarico sono l'arteria mammaria e la vena safena perché presentano un'eccellente stabilità meccanica e per la loro naturale assenza di trombogenicità [20]. L'utilizzo dell'arteria mammaria è limitato dalla sua lunghezza e dalle possibili complicazioni causate dall'operazione di estrazione di un'arteria. Scegliere come sostituto autologo la vena safena garantisce la possibilità di avere un vaso sufficientemente lungo da permettere di realizzare bypass multipli. Si tratta inoltre di un vaso con poche valvole e ramificazioni, facilmente prelevabile dalla gamba e di un diametro simile a quello delle coronarie [17]. Tuttavia utilizzare una vena per sostituire un vaso arterioso non è la soluzione ideale; infatti il vaso venoso passa da una condizione di bassa pressione, flusso non pulsatile e shear stress di circa  $0.2 \text{ dynes/cm}^2$  a una condizione di alta pressione, flusso pulsatile e shear stress di  $3-6 \text{ dynes/cm}^2$ , cui si sommano nuove forze emodinamiche tra cui la deformazione radiale e circonferenziale [21] [22]. Nonostante queste criticità e nonostante la sua predisposizione al fallimento (entro un anno dall'operazione il 10/15% dei graft venosi va incontro ad occlusione e quasi

la metà va incontro a fallimento entro dieci anni), la vena safena rimane il vaso più utilizzato per eseguire CABG [23].

La necessità di trovare sostituti vascolari di piccolo calibro funzionali e già disponibili ha fatto sì che numerosi gruppi di ricerca si siano mossi in questa direzione. I materiali più utilizzati per realizzare graft sintetici sono il politetrafluoroetilene espanso (ePTFE) e il polietilene teleftalato in forma *woven*, conosciuto con il nome commerciale di Dacron, mentre i poliuretani sono in fase di studio per la loro maggiore compliance, che li rende più compatibili con le proprietà meccaniche e idrauliche dei vasi naturali [20]. Le protesi in Dacron e in ePTFE vengono utilizzate con successo per la ricostruzione vascolare periferica di vasi con un calibro superiore ai 5 mm, ma non sono adatte per la sostituzione di vasi di piccolo calibro, quindi non possono essere utilizzati per il CABG [24].

Un'alternativa ai vasi di origine autologa è rappresentata dalle protesi biologiche, che pur essendo state utilizzate per la sostituzione di arterie coronariche, sono andate incontro a fallimento nella maggior parte dei casi a causa della loro trombogenicità e della degenerazione del tessuto [20]. I graft biologici che vengono utilizzati sono la vena ombelicale umana [25], arterie bovine trattate [26] [27] [28] [29] e vasi biologici di origine porcina [30][31]. Le protesi di origine naturale vengono trattate con reagenti ed enzimi per eliminare le conseguenze legate alla reazione immunitaria e al rigetto causato dalle differenze antigeniche tra specie xenogeniche. Gli scaffold decellularizzati offrono la possibilità di incorporare fattori di crescita e cellule endoteliali sulla superficie interna dei vasi, ma le criticità legate alla degenerazione restano un nodo da risolvere [32].



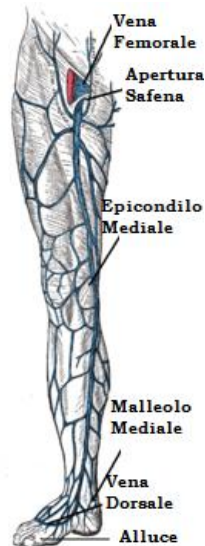
*Fig. 1.11: Esempio di un sostituto vascolare biologico derivato da vasi porcini decellularizzati. Il vantaggio di utilizzare questi vasi per la rivascolarizzazione periferica o per la riparazione e sostituzione di brevi tratti vascolari consiste nella perfetta emocompatibilità e nella maggiore integrazione con i tessuti ospiti. Purtroppo però questi vasi vanno incontro a degenerazione e presentano una trombogenicità elevata.*

I vasi ingegnerizzati rappresentano quindi un'alternativa in fase di studio, ma le sfide che l'ingegneria dei tessuti deve affrontare sono molteplici: l'obiettivo è quello di creare vasi elastici in grado di sopportare carichi ciclici, con una compliance che permetta una buona interazione con i vasi naturali ai quali vengono anastomizzati e un lume antitrombotico. Le strategie messe in atto prevedono di utilizzare degli scaffold sia permanenti che biodegradabili che fungano da supporto per la crescita di cellule al fine di creare un costrutto cellulare che venga adeguatamente stimolato per promuoverne la maturazione. Le cellule che vengono utilizzate in questo tipo di applicazione sono principalmente cellule endoteliali (*Endothelial Cells* -EC), cellule muscolari lisce (*Smooth Muscle Cells* -SMC), cellule mesoteliali e fibroblasti [32].

Alcuni gruppi di ricerca hanno messo in atto infine anche altri approcci; è il caso ad esempio del gruppo di Heureux che, coltivando cellule senza il supporto di scaffold, ha ottenuto vasi composti da tre strati coesivi composti da cellule vive ben organizzate in una matrice endogena e che presentano proprietà meccaniche simili a quelli umani [33].

## 1.6 LA VENA GRANDE SAFENA

L'utilizzo della Vena Grande Safena, come già ricordato, rappresenta ad oggi il gold standard per gli interventi di rivascularizzazione soprattutto in presenza di bypass multipli [23]. Si tratta di un vaso sanguigno superficiale che scorre nel tessuto subcutaneo degli arti inferiori e che si appoggia sulla fascia muscolare [34]. Essa si forma nel punto in cui la vena dorsale dell'alluce si unisce all'arco venoso dorsale del piede e, dopo aver percorso anteriormente l'apofisi del malleolo mediale, corre lungo la superficie mediale della gamba. Quindi all'altezza del ginocchio passa posteriormente all'epicondilo mediale femorale e quindi scorre lungo la superficie anteriore della gamba prima di congiungersi con la vena femorale (Fig. 1.12). Lungo il suo percorso la vena grande safena si anastomizza in più punti con la piccola vena safena e presenta all'incirca 10/12 valvole [17].



*Fig. 1.12: Percorso della vena grande safena dal piede alla vena femorale e punti di riferimento lungo il suo percorso.*

## 1.7 VEIN GRAFT DISEASE

L'efficacia a lungo termine dell'operazione di rivascularizzazione tramite graft venosi è limitata dal fallimento del graft, causato dall'insieme dei processi che prendono il nome di *vein graft disease* (VGD).

Il mantenimento della pervietà del vaso nel tempo è condizionato dalla qualità, dalla taglia e dal diametro della vena stessa, dalla taglia e dal diametro dell'arteria ospite, dalle abilità chirurgiche, dal trattamento del materiale del graft e dai trattamenti medici.

È importante sottolineare che i meccanismi che portano all'evoluzione del VGD sono cadenzati da una precisa tempistica che si sviluppa a partire dal momento dell'operazione chirurgica sino al completo fallimento del bypass. Tali eventi che si verificano a 30 giorni, nell'arco di un anno e dopo due anni dall'intervento sono riassunti e schematizzati in Tabella 1.

Tabella 1 : evoluzione delle cause che portano al VGD a diversi istanti temporali, adattato da [23]

VGD acuto (< 30 giorni)	VGD precoce (1-24 mesi)	VGD avanzato (> 2 anni)
Difficoltà tecniche Trombosi	Iperplasia Neointima a livello dell'anastomosi	Degenerazione aterosclerotica
Caratteristiche del vaso Diametro troppo piccolo Patologia pre-esistente della vena	Trombosi	Iperplasia Neointima generalizzata
Problemi estrinseci Trombosi Eccessiva coagulazione Deflusso limitato		

Il prelievo chirurgico della vena safena provoca il distacco dei *vasa vasorum*, un complesso di vasi di piccolo calibro che provvedono al nutrimento e all'ossigenazione della vena e alla rimozione dei prodotti di scarto. Di conseguenza si genera una condizione di ipossia che porta alla formazione di radicali liberi e induce l'arterializzazione.

L'esposizione della vena durante il prelievo, la successiva distensione manuale per evitare spasmi e i successivi tagli e suture per preparare il graft all'anastomosi producono un danno a livello dell'endotelio. La manipolazione e l'impianto del graft possono quindi innescare una reazione infiammatoria, causando l'adesione di piastrine e leucociti nella regione luminale che può portare a trombosi e occlusione precoce del graft [23].

Recentemente è stata introdotta una moderna tecnica di prelievo che prende il nome di “*no touch*” grazie alla quale è possibile minimizzare le complicazioni dovute all’intervento (Fig. 1.13). La vena safena viene marcata prima dell’intervento utilizzando il metodo degli ultrasuoni così da limitare le ferite durante il prelievo. Quindi il vaso viene asportato mantenendo attorno una porzione di tessuto di circa 0.5 cm. Durante l’anastomosi la vena è maneggiata solo tramite questa appendice di tessuto, impedendo qualsiasi altra interazione diretta degli strumenti con il graft. Si evitano in questo modo spasmi e si lascia intatto l’endotelio luminale; inoltre si preservano i *vasa vasorum* così da mantenere un supporto di ossigeno e di nutrimenti e le si garantisce anche una sorta di supporto meccanico [35] [36].

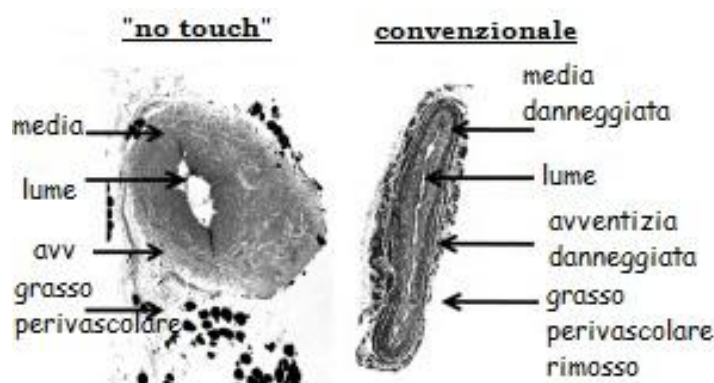


Fig. 1.13: Confronto tra i risultati ottenuti con la tecnica *no touch* e con la tecnica convenzionale. Nel primo caso, immagine di sinistra, si conserva l'architettura normale del vaso, si mantiene l'endotelio intatto, non si danneggia la parete del vaso e si preserva il tessuto adiposo perivascolare. Nel secondo caso, a destra, si delineano le conseguenze del danno chirurgico: denudazione endoteliale, assottigliamento della parete, danno avventiziale e rimozione del tessuto adiposo. Adattato da [35].

La vena dopo il bypass è esposta al flusso coronarico. Il regime pressorio al quale viene sottoposta è quello tipicamente arterioso, cioè con un flusso pulsatile e con valori di pressione di un ordine di grandezza maggiori rispetto a quelli venosi, con conseguente *wall shear stress* longitudinale. L’esposizione della vena a un ambiente alterato ne provoca il rimodellamento e porta al fallimento del graft.

In particolare la risposta a questo tipo di stimolo induce la formazione di neointima da parte del vaso. La natura della neointima può essere considerata come una sorta di combinazione dello strato medio e avventiziale di una normale arteria ed è composta

principalmente da SMC vascolari. Inizialmente le cellule muscolari lisce proliferano in risposta al rilascio di fattori di crescita e citochine da parte delle piastrine, dalle cellule endoteliali attivate, dai macrofagi e da altri fattori infiammatori. Quindi le cellule muscolari migrano verso l'intima dove continuano a proliferare. In seguito la sintesi e deposizione di matrice extracellulare (ECM) da parte delle SMC attivate promuove la formazione di fibrosi dell'intima (Fig. 1.14). Nel frattempo anche le cellule endoteliali proliferano e migrano per ripopolare lo strato endoteliale denudato.

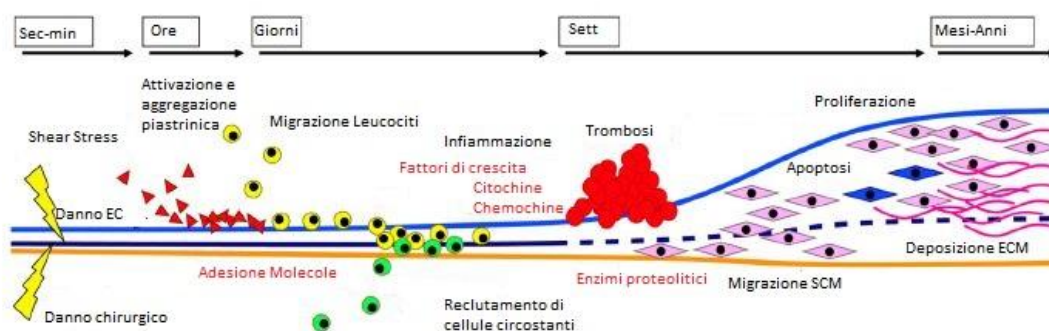


Fig. 1.14: Evoluzione temporale degli eventi che provocano la formazione di neointima. Adattato da [37].

Oltre a questi processi di formazione della neointima e re-endotelializzazione, nelle successive 4-12 settimane la neointima continua ad ispessirsi e la parete del vaso aumenta progressivamente la sua rigidità. A tutto ciò possono aggiungersi altre complicazioni dovute ad anomalie della vena pre-esistenti, all'operazione di distensione della vena e alla cattiva interazione con il tessuto ospite.

Un altro importante fattore che concorre allo sviluppo della patologia è l'ischemia del tessuto indotta dalla rimozione dei *vasa vasorum*, aspetto che verrà approfondito nel paragrafo 1.8.

L'iperplasia neointima si verifica in tutto il graft, ma in modo particolare in corrispondenza dei siti di anastomosi; infatti il brusco cambiamento di elasticità tra arteria e vena porta a ulteriori disturbi emodinamici con aumento della turbolenza del flusso e stasi del fluido nelle zone distali rispetto alla linea di sutura. Di conseguenza si verifica una progressiva riduzione del lume del graft che entro due anni può provocarne la totale occlusione.

Dopo un anno dall'operazione di rivascolarizzazione il maggiore responsabile del VGD non è più l'iperplasia della neointima, ma piuttosto l'aterosclerosi. La predisposizione a fattori aterosclerotici è la stessa dei condotti arteriosi nativi e l'ateroma venoso, come

quello arterioso, può rompersi o può provocare l'occlusione del vaso. A differenza dell'ateroma arterioso, quello venoso è però dislocato su tutta la lunghezza del vaso, meno concentrico, meno calcifico e presenta una capsula fibrotica meno sviluppata o assente. Gli eventi che guidano il processo aterosclerotico hanno inizio nel momento in cui i monociti penetrano all'interno della neointima, diventano macrofagi e cambiano fenotipo per formare la placca aterosclerotica, cui aderiscono piastrine e leucociti. Questo processo rallenta progressivamente e alla fine si verifica una stenosi intraluminale.

Sono stati identificati numerosi fattori di rischio che possono aumentare la predisposizione al VGD tra cui il fumo, l'iperlipidemia, la trigliceridemia, l'appartenza al sesso femminile e un'alta concentrazione di fibrinogeno.

Numerose strategie sono state messe in atto per cercare di limitare il VGD: il miglioramento delle tecniche e delle procedure di preparazione chirurgica in fase operatoria ha garantito buoni esiti solo per i fallimenti a breve termine, ma non ha effetti sul VGD avanzato. Un altro interessante campo di ricerca prevede di utilizzare supporti esterni al graft come guaine o stent per ridurre gli sforzi tangenziali sulla parete del vaso, e conseguentemente l'iperplasia della neointima, e conservare l'endotelio.

Vengono utilizzati anche interventi farmacologici per prevenire il VGD: ad esempio utilizzare le statine per ridurre la concentrazione di colesterolo aiuta a prevenire l'iperplasia neointimale, mentre una terapia antitrombotica riduce potenzialmente l'occlusione trombotica del graft, ma non garantisce il mantenimento della pervietà a lungo termine e non inibisce lo sviluppo di iperplasia neointima.

Sono in fase di esplorazione anche le terapie molecolari, che oggi ha un impatto minimo nella prevenzione del VGD, ma potrebbero assumere un ruolo fondamentale nell'immediato futuro.

Nel caso di fallimento del graft si procede con una nuova operazione chirurgica di CABG [23][38].

## 1.8 EFFETTI DELL'IP OSSIA SUL GRAFT VENOSO

L'ipossia svolge un ruolo importante nel rimodellamento del graft venoso. Innanzitutto la rimozione chirurgica della vena safena provoca la perdita di continuità del tessuto con i *vasa vasorum* e di conseguenza induce il tessuto in uno stato di ipossia. Inoltre, siccome la parete del graft si inspessisce, il suo fabbisogno di ossigeno aumenta e questo va ad aumentare sempre di più la gravità dell'ipossia del tessuto. La carenza di ossigeno e la

diminuzione dell'attività mitocondriale promuovono l'attivazione di numerosi geni tra cui quelli che codificano per il fattore di trascrizione HIF (*Hypoxia Inducible Factor*) e di numerose altre cascate di interazioni cellulari. Anche le cellule endoteliali vengono attivate e danno origine a una cascata di reazioni che coinvolge neutrofili e cellule muscolari lisce. Una prolungata ipossia fa sì che venga upregolata l'espressione di centinaia di altri geni, tra i quali quelli che codificano per alcune citochine (ad esempio IL-6 e IL-8), fattori di crescita (ad esempio bFGF) e altre proteine che possono indurre il VGD [39].

L'ipossia concorre quindi al rimodellamento tissutale, causando una proliferazione delle cellule muscolari lisce vascolari e di alcune proteine della matrice extracellulare, danneggiando l'endotelio, promuovendo i meccanismi di ossidazione lipidica e attivando le cellule del sangue [40] [41].

Il tessuto si adatta a questi cambiamenti rigenerando nuovi *vasa vasorum*; i vasi di piccole dimensioni possono rigenerarsi rapidamente e ristabilizzare la microcircolazione grazie ai processi di angiogenesi e arteriogenesi mediati dalla proliferazione, migrazione e riorganizzazione delle cellule endoteliali in nuovi capillari [39], processo che a sua volta è mediato dall'ipossia grazie all'attivazione del VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), un importante mitogeno delle cellule endoteliali [41].

## 1.9 CONCLUSIONI

Grazie ai numerosi vantaggi che la rendono ad oggi il *gold standard* per gli interventi di rivascularizzazione (facilità di asportazione, lunghezza adatta per bypass multipli, diametro simile a quello coronarico), la vena safena rappresenta il vaso di elezione utilizzato per il CABG, nonostante la grande incidenza di fallimenti dovuti allo sviluppo di VGD e conseguente occlusione del graft [17].

L'esposizione a stimoli meccanici tipicamente arteriosi è una delle cause che inducono la patologia [37], motivo per cui numerosi gruppi di ricerca hanno approfondito l'argomento grazie allo sviluppo di sistemi di coltura *ex-vivo* per mimare le condizioni fluidodinamiche e meccaniche cui è sottoposta la vena quando è collocata nella sede del bypass e quindi studiare le modifiche che esse inducono nel tessuto vascolare. Nel capitolo successivo verrà presentata una sintetica panoramica di alcuni di questi lavori e i risultati che sono stati ottenuti.

Un altro stimolo che induce il VGD e quindi il rimodellamento del graft è il nuovo ambiente biochimico cui la vena viene sottoposta: la rimozione dei *vasa vasorum*, al

momento dell'asportazione dalla gamba, provoca una condizione di ipossia verso il lato avventiziale, mentre lo strato luminale della vena viene esposto a una tensione di ossigeno tipicamente arteriosa [39][40][41]. Nel capitolo successivo si presenteranno alcuni studi svolti per indagare gli effetti dell'ipossia condotti su cellule provenienti da tessuto venoso. Il presente lavoro di tesi s'inserisce nella scia di un progetto più ampio sviluppato presso il Laboratorio di Micro e Biofluidodinamica Sperimentale ( $\mu$ BSLab) del DEIB (Dipartimento di Elettronica, Informazione e Bioingegneria) del Politecnico di Milano, in collaborazione con il gruppo di ricerca del Laboratorio di Ingegneria Tissutale Cardiovascolare (LIT) dell'IRCCS Centro Cardiologico Monzino, il cui obiettivo è analizzare quali meccanismi molecolari e cellulari siano indotti dalle nuove condizioni fluidodinamiche e biochimiche cui la vena è sottoposta. La finalità ultima del progetto, una volta compresi tali meccanismi, è quella di trovare un trattamento che aiuti a prevenire la riocclusione del graft; infatti anche se sono state già messe in atto alcune terapie sperimentali con buoni risultati sui modelli animali, nessuno di questi è stato trasferito all'impiego clinico sull'uomo.

L'obiettivo del presente lavoro di tesi è quello di caratterizzare e ottimizzare un sistema di coltura *ex-vivo* pre-esistente. Lo scopo di tale sistema di coltura è esporre i campioni di vena safena ad un gradiente di ossigeno tra compartimento avventiziale e luminale, riproducendo le condizioni che si verificano tipicamente nel graft venoso in seguito a CABG e successivamente indagare gli effetti indotti sul tessuto da una condizione di ipossia moderata oppure severa sul lato avventiziale della vena.

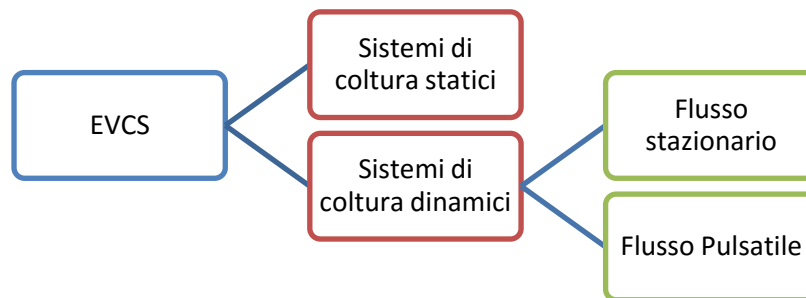
## 2. STATO DELL'ARTE

*Gli stimoli meccanici, fluidodinamici e biochimici cui viene sottoposto il graft venoso in seguito all'intervento di bypass hanno un grande impatto sul tessuto e sono responsabili del rimodellamento e del conseguente fallimento del graft. Per questo motivo numerosi gruppi di ricerca hanno sviluppato sistemi di coltura ex-vivo per indagare gli effetti indotti da questi stimoli. Nella prima parte di questo capitolo viene presentato un breve excursus su alcuni lavori significativi nei quali si mostra lo sviluppo di sistemi ex-vivo per lo studio della correlazione tra stimoli meccanici e fluidodinamici e il progredire del VGD e sui risultati ottenuti. Nella seconda parte si mostreranno alcuni studi nei quali sono stati indagati gli effetti indotti da condizioni di ipossia su cellule derivate da tessuto venoso.*

### 2.1 STATO DELL'ARTE SUI SISTEMI DI COLTURA EX-VIVO

I sistemi di coltura *ex-vivo* (*Ex Vivo Vessel Culture Systems- EVCSs*) sono dei dispositivi che permettono di mantenere intatte struttura e funzione di organi e tessuti e condizionarli in modo controllato. Il vantaggio rispetto agli esperimenti *in vivo*, condotti sugli animali, è quello di riuscire a controllare indipendentemente gli stimoli applicati e ragionare in termini di sovrapposizione degli effetti.

Gli EVCS possono essere suddivisi in due tipologie: sistemi di coltura statici, in cui i campioni non sono sottoposti a forze meccaniche, e sistemi di coltura dinamici, il cui obiettivo è il condizionamento dei campioni con flusso stazionario o pulsatile (Fig. 2.1).



*Fig. 2.1: Classificazione delle tipologie di sistemi di coltura ex-vivo. Gli EVCS possono essere statici, quando i campioni biologici non sono sottoposti a stimoli meccanici, oppure dinamici, nel caso in cui vengano stimolati in modo stazionario oppure pulsatile.*

### 2.1.1 SISTEMI DI COLTURA STATICI

I sistemi di coltura statici mutuano le tecniche di coltura tipiche delle colture cellulari per mantenere in coltura, per tempi variabili, piccoli segmenti di vena safena, generalmente anelli.

In uno studio del 2005 Déglise e colleghi [42] hanno dimostrato che i livelli delle connessine, glicoproteine transmembrana, vengono alterati quando si presenta il fenomeno di iperplasia dell'intima. Essi hanno sviluppato un setup *ex-vivo* nel quale si mantengono intatti segmenti di vena safena umana e si indaga lo sviluppo dell'iperplasia dell'intima dopo 14 giorni di coltura. L'obiettivo del lavoro era valutare se la comunicazione a livello delle gap-junctions fosse coinvolta nel processo di iperplasia dell'intima in quanto le proteine che le compongono, le connessine, possono coordinare la contrazione delle SMC. I segmenti di vena safena sono stati tagliati longitudinalmente con il lato luminale rivolto verso l'alto e quindi coltivati in atmosfera controllata in incubatore per 14 giorni. L'esperimento ha indotto iperplasia dell'intima, con un significativo incremento del rapporto tra lo spessore dell'intima e quello dell'avventizia rispetto ai campioni nativi, come evidenziato dalle colorazioni istologiche e dalle analisi immunostochimiche effettuate (Fig. 2.2).

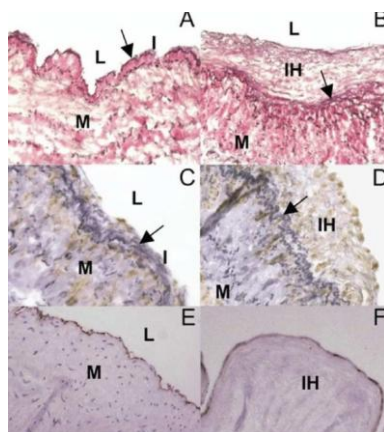


Fig. 2.2: Sviluppo di iperplasia dell'intima nei segmenti di vena safena umana dopo 14 giorni in coltura. **A e B**, lo spessore dello spazio intimale e subintimale, correlato allo sviluppo di iperplasia dell'intima (Intimal Hyperplasia, IH), è decisamente più grande nei segmenti di vena dopo 14 giorni in coltura (**B**) rispetto al controllo, (**A**). **C e D** In evidenza la proliferazione delle SMC nella neointima (grazie all'immunolabeling con anticorpi contro l' $\alpha$ -actina –colore marrone). In **A, B, C e D** le frecce indicano la lamina elastica interna. In **E e F** si nota la presenza di EC lungo il vaso (grazie all'immunolabeling con anticorpi contro il fattore VIII). L, lumen, I, intima, IH, iperplasia intima, M, media. Adattato da [42].

L'analisi quantitativa del contenuto della connessina 43 (Cx43), la connessina predominante nelle SMC, isolando l'RNA ed effettuando Polymerase Chain Reaction (PCR) e Western Blot, dimostra che l'iperplasia dell'intima è associata a un grande aumento dei livelli di Cx43 dopo 14 giorni di coltura.

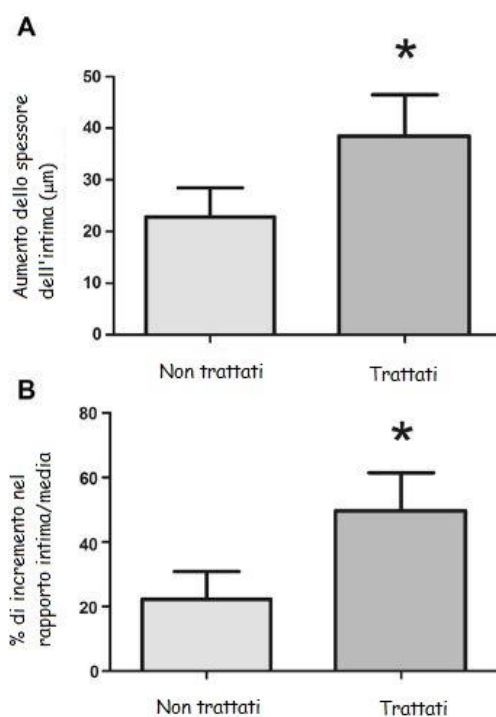
Il gruppo di ricerca ha dimostrato poi che l'utilizzo di fluvastatina, un composto della famiglia delle statine utilizzato per ridurre il colesterolo, a una concentrazione di 1  $\mu$ M non dannosa per le cellule, inibisce la formazione di neointima del 50%. Le analisi sui segmenti di vena coltivati per 14 giorni in presenza di fluvastatina mettono in evidenza anche una riduzione dei livelli di Cx43 del 50-70%. La Cx43 risulta perciò una proteina target e la somministrazione di fluvastatina si dimostra una strategia utile per ridurre lo sviluppo di neoplasia dell'intima.

Osgood e colleghi nel 2015 [43] hanno pubblicato uno studio nel quale hanno indagato gli effetti della preparazione chirurgica del graft sulla vitalità cellulare, sulla fisiologia delle vene safene umane e sullo sviluppo di iperplasia dell'intima *in vitro*. Nello studio sono stati analizzati e confrontati segmenti di vena prelevati immediatamente dopo l'asportazione chirurgica della safena, quindi non manipolati, con segmenti di vena manipolati dai chirurghi, che eseguono la distensione idrostatica della vena tramite una siringa e marcatura con un marcatore chirurgico.

I campioni di vena sono stati sezionati in anelli di 1 mm o di 3 mm di spessore e per quantificare la vitalità delle SMC e delle EC gli anelli sono stati sospesi in diverse soluzioni tampone *ad hoc* grazie alle quali è possibile correlare il vasorilassamento della vena alla vitalità delle due componenti cellulari. I risultati ottenuti suggeriscono che il trattamento chirurgico per la preparazione del graft provoca una riduzione della vitalità e un'alterazione della funzionalità sia delle SMC che delle EC. Per comprendere i meccanismi che provocano la diminuzione della vitalità delle EC sono state eseguite analisi immunostochimiche, che hanno evidenziato che la diminuzione della vitalità delle EC è imputabile in parte al denudamento endoteliale e in parte alla riduzione dell'enzima ossido nitrico sintasi endoteliale (*Endothelial Nitric Oxide Synthase - eNOS*). Un'ulteriore analisi eseguita analizzando tramite cromatografia liquida i picchi di 2-idrossietidio che si formano dalla reazione tra  $O_2^-$  e diidroetidio (DHE) mostra un aumento della produzione di radicali liberi in seguito alla manipolazione chirurgica del graft. Lo stesso gruppo di ricerca

ha voluto perciò indagare gli effetti indotti sul tessuto dai radicali liberi ed ha riscontrato che essi inducono un'alterata funzione endoteliale.

Alcuni campioni, infine, sono stati coltivati per 2 settimane in condizioni di coltura Standard e sono state poi preparate sezioni istologiche con colorazione di Verhoeff-Van Gieson. Il confronto tra campioni manipolati e campioni non sottoposti a preparazione chirurgica mostra che i primi sviluppano un incremento di spessore di intima pari al 69% rispetto all'incremento di spessore dell'intima nei campioni non manipolati e un incremento del rapporto tra intima e media pari al 122% rispetto ai campioni non manipolati (Fig. 2.3).



*Fig. 2.3: Confronto tra campioni non manipolati e campioni manipolati in termini di aumento di spessore dell'intima e percentuale di incremento nel rapporto intima/media. Il trattamento del graft promuove lo sviluppo di neointima. L'aumento di spessore dell'intima è superiore nei campioni ottenuti in seguito al trattamento rispetto a quelli non manipolati dopo due settimane di coltura. Allo stesso modo l'incremento del rapporto tra intima e media è superiore nei segmenti trattati rispetto a*

Questi risultati suggeriscono quindi che le manipolazioni chirurgiche sono sufficienti da soli a promuovere la crescita di neointima.

Dall'analisi dei sistemi statici si osserva che segmenti di vena safena mantenuti in coltura per tempi dell'ordine di 10-14 giorni, senza essere sottoposti a stimolazione, vanno rapidamente incontro a rimodellamento di tipo patologico, anche in assenza di segnali biochimici aterogenici; questo fenomeno può essere motivato, almeno in parte, dalla totale assenza di sollecitazioni meccaniche fisiologiche [44].

### 2.1.2 SISTEMI DI COLTURA DINAMICI

I sistemi di coltura dinamici permettono il condizionamento dei campioni di vena safena con stimoli fluidodinamici controllati, con il fine ultimo di riprodurre le condizioni fisiologiche cui è sottoposto il graft dopo CABG.

In generale un sistema di coltura dinamico prevede la presenza di una camera di coltura nel quale viene alloggiato il campione biologico, di un attuatore per generare lo stimolo (solitamente si tratta di una pompa roller collegata a valle con una camera di compliance per filtrare il disturbo generato dai rulli della pompa), di una camera di riserva per il mezzo di coltura (*reservoir*), di uno scambiatore di gas per garantire la corretta ossigenazione del campione e del mezzo e del circuito idraulico per connettere i vari elementi. Infine in molti casi trasduttori di pressione e flussimetri sono previsti in questo genere di sistemi, insieme a sistemi di monitoraggio e controllo gestiti da PC.

I sistemi dinamici possono generare una stimolazione stazionaria oppure pulsatile. Nei paragrafi successivi verranno presentati due esempi per ognuna di queste tipologie di sistemi, scelti tra i lavori più recenti presenti in letteratura.

#### 2.1.2.1. SISTEMI A STIMOLAZIONE STAZIONARIA

Dalla seconda metà degli anni '90 a oggi numerosi gruppi di ricerca hanno sviluppato sistemi a stimolazione stazionaria. Tra i primi lavori, significativo il sistema "flow ring" di Porter del 1996 [45] realizzato con lo scopo di esaminare gli effetti di diverse condizioni di flusso su piccoli segmenti di vena safena.

In un lavoro del 2014 Model e colleghi [46] hanno indagato gli effetti dell'esposizione di vene safene umane a valori di *shear stress* tipicamente arteriosi. Segmenti di vena safena

*ex vivo* sono stati posizionati in un bioreattore che permetteva di controllare in modo specifico l'entità dello *shear stress* (Fig. 2.4).

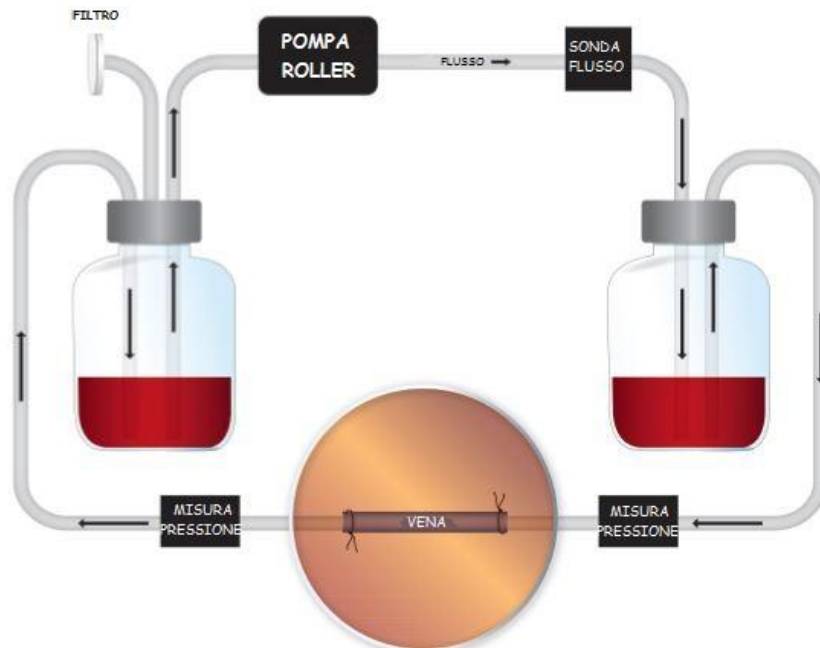
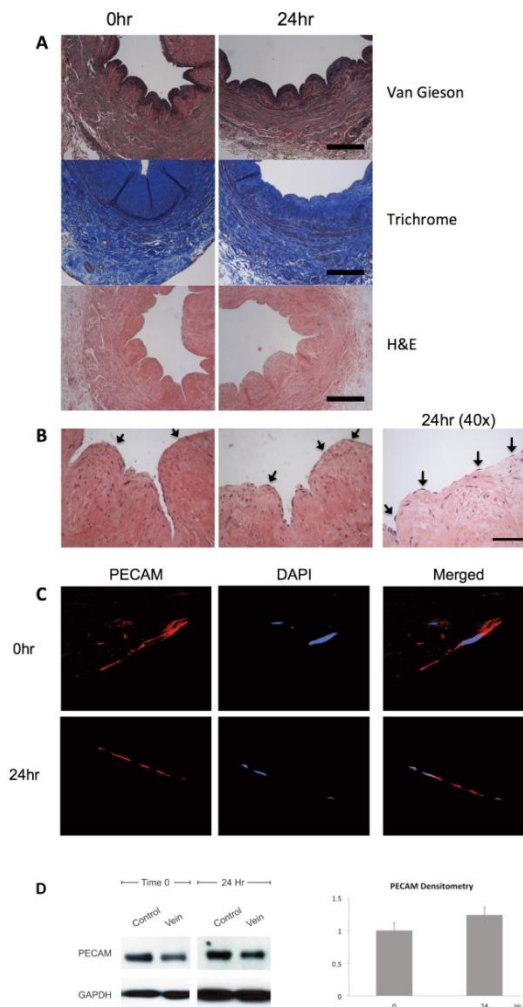


Fig. 2.4: Rappresentazione schematica del bioreattore. In evidenza un reservoir della capacità di 300 ml aperto in atmosfera attraverso un filtro, una pompa peristaltica programmabile e un circuito idraulico per connettere gli elementi composto da tubi in silicone trattato al platino. Lungo il circuito sono posizionati sensori e sonde per misurare i valori di portata, pressione e la caduta di pressione a cavallo della vena. Adattato da [46].

Le portate sono state calcolate per ottenere i valori di *shear stress* arterioso ( $20 \text{ dynes/cm}^2$ ) e venoso ( $3 \text{ dynes/cm}^2$ ) desiderati. Un ulteriore controllo è stato ottenuto da campioni condizionati in modo “statico”, cioè con una portata di ricircolo minima di  $1 \text{ ml/min}$  (per garantire flusso e ossigenazione nella regione luminale della vena e prevenire la deidratazione dei campioni). Le colorazioni istologiche effettuate (Ematossilina ed Eosina, Tricromia, Van Gieson) e i risultati ottenuti tramite saggio TUNEL mostrano che lo strato endoteliale all'interno del lume viene almeno in parte conservato e non va incontro ad apoptosi dopo l'esposizione a valori di *shear stress* arteriosi per 24 ore. Questo risultato è confermato anche dalle immagini derivate da immunofluorescenza e dal successivo Western Blot eseguito su un marcatore delle EC (PECAM) (Fig. 2.5). Il lavoro dimostra dunque che nonostante ci sia una parziale denudazione dell'endotelio in seguito alla preparazione chirurgica e l'impianto del graft *in vivo*, parte dell'endotelio può sopravvivere al prelievo della vena e all'esposizione a valori di *shear stress* tipicamente arteriosi.



*Fig. 2.5: Struttura della vena e integrità endoteliale dopo l'applicazione di shear stress arterioso. A Immagini dopo colorazione di van Gieson (mostra le fibre di collagene), Tricromia (mostra il tessuto connettivo) e Ematossilina e Eosina (mostra nuclei e citoplasma) dei campioni a tempo 0 o 24 ore dopo il condizionamento nel bioreattore. B Immagini dei campioni di vena safena colorati con la tecnica di Ematossilina ed Eosina, le frecce indicano le EC sul lume del vaso. C Immunofluorescenza a 0 o 24 ore dopo l'esposizione a shear stress arterioso. Rosso, PECAM, marker per le EC; Blu, DAPI, per i nuclei. D A sinistra Western Blot di PECAM e GAPDH (controllo) in campioni trattati a 0 o 24 ore, a destra densitometria media di PECAM normalizzato rispetto a GAPDH. Adattato da [46].*

Il gruppo di ricerca ha indagato anche le differenze indotte dello *shear stress* arterioso rispetto a quello venoso sui marcatori cellulari (in particolare le efrine EpH-B4 e EpH-B2) e sull'espressione di osteopontina, un marcatore dell'adattamento patologico del graft venoso. I risultati della Real-Time PCR (Fig. 2. 6) evidenziano che l'esposizione a *shear stress* arterioso per 24 ore è associato a una diminuzione dei trascritti di mRNA per EpH-

B4, a nessun cambiamento per quelli di EpH-B2 e a un aumento del numero di trascritti di mRNA di osteopontina. L'esposizione a *shear stress* venoso, invece, non provoca una diminuzione dei trascritti di mRNA di EpH-B4, ma produce un aumento di quelli di EpH-B2 e di osteopontina. Infine nei campioni sottoposti a condizioni "statiche" non si delinea alcun cambiamento significativo nei livelli di espressione di questi tre marcatori. Questi risultati confermano che lo *shear stress* svolge un ruolo fondamentale nell'arterializzazione del graft venoso.

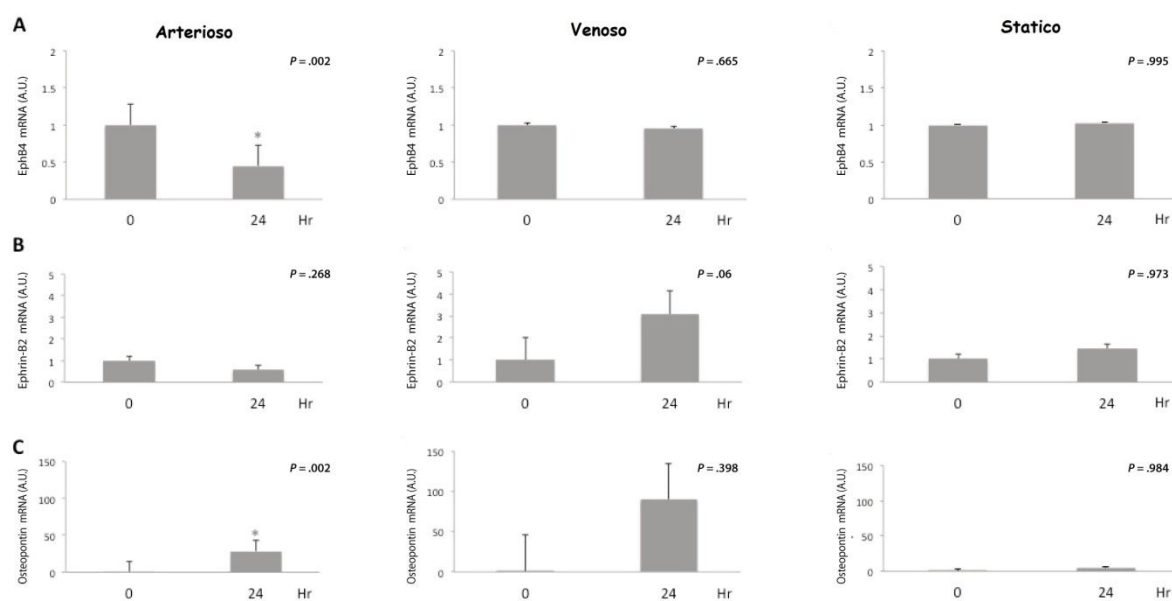


Fig. 2. 6: Diminuzione dell'espressione di Ep-B4 (A) EpH-B2 (B) e osteopontina (C) in condizioni arteriose, ma non in condizioni venose. Istogrammi che mostrano il numero di trascritti di mRNA di EpH-B4, EpH-B2 e osteopontina normalizzati rispetto a GAPDH a 0 e 24 ore di condizionamento con *shear stress* arterioso, venoso o in condizioni statiche. Adattato da [46].

In un lavoro del 2016 Chang e colleghi [47] hanno valutato l'entità del danno endoteliale sia con un modello *in vivo* che con uno *ex vivo* e hanno sviluppato un modello computazionale per simulare i fattori meccanici e comprenderne il ruolo nell'evoluzione temporale della patologia del graft venoso. In particolare hanno esaminato le conseguenze dovute all'autofagia, il processo conservativo grazie al quale le cellule degradano gli organelli danneggiati attraverso i lisosomi, e all'apoptosi delle EC e sul conseguente sviluppo di iperplasia della neointima.

Un modello murino è stato scelto come modello animale per lo studio *in vivo* della patologia. Per ricreare la transizione vena-arteria tipica del CABG, la vena giugulare è stata anastomizzata alla carotide, mentre un gruppo di controllo è stato creato tagliando la stessa carotide e suturando le due estremità tra loro. Per studiare l'avanzamento del grado di stenosi all'interno del lume dei graft impiantati è stata utilizzata una piattaforma per l'ecografia tramite ultrasuoni ad alta frequenza. Tre settimane dopo l'operazione, sono stati prelevati i campioni dei due gruppi e le colorazioni istologiche effettuate (Ematossilina ed Eosina, elastina e Verhoeff) evidenziano un ispessimento dell'intima nel gruppo con l'anastomosi venosa. Il saggio TUNEL mostra una maggiore induzione di apoptosi nelle EC del gruppo con anastomosi venosa e le colorazioni immunostochimiche evidenziano elevata attività autofagica nelle EC sempre solo nel gruppo con anastomosi venosa. Questi risultati documentano un peggioramento dell'omeostasi del tessuto con il progredire della patologia e della stenosi all'interno del graft venoso.

Un sistema di stimolazione *ex vivo* è stato poi utilizzato per applicare *shear stress* arterioso ( $12 \text{ dynes/cm}^2$ ) o venoso ( $1 \text{ dynes/cm}^2$ ) a segmenti di aorta e di vena cava inferiore espianati da altri ratti. L'ecografo è stato utilizzato anche in questo caso per monitorare i cambiamenti indotti nel vaso dall'applicazione di *shear stress* (Fig. 2.7).

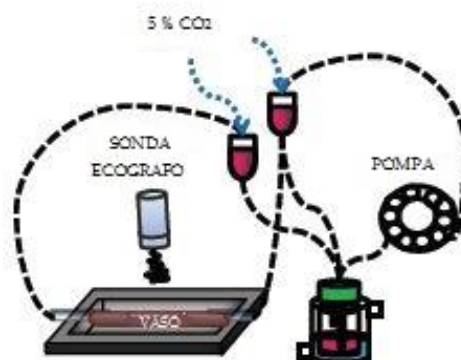


Fig. 2.7: Sistema per lo studio *ex vivo* delle conseguenze indotte dallo *shear stress* su campioni di vena e arteria. Il sistema prevede il posizionamento di un ecografo per studiare l'avanzamento del grado di stenosi nel vaso.

I cambiamenti sulla struttura del vaso sono stati valutati grazie a colorazioni istologiche (Ematossilina ed Eosina, elastina, Verhoeff's Van Gieson), l'integrità dell'endotelio grazie a colorazioni di specifici marcatori endoteliali presenti sulla superficie interna del vaso, in particolare CD31, mentre l'apoptosi cellulare tramite saggio TUNEL, l'autofagia grazie a

immunofluorescenza utilizzando LC3 e la risposta infiammatoria utilizzando specifici anticorpi contro marcatori infiammatori, ad esempio COX-2. Le immagini dell'ecografo mostrano che lo *shear stress* arterioso può indurre un aumento dell'ecogenicità del tessuto solo nelle vene e non nelle arterie. Allo stesso modo le tecniche di immunofluorescenza dimostrano che lo *shear stress* arterioso induce autofagia e apoptosi delle EC solo nelle vene (Fig. 2.8).

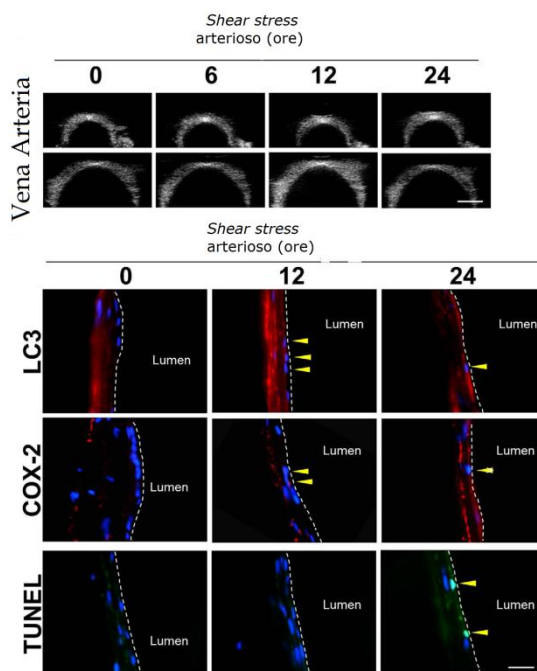


Fig. 2.8: Danno indotto dallo *shear stress* arterioso sull'endotelio. Nel pannello superiore immagini dell'ecografo che mostrano come la stimolazione venosa provochi differenze solo nelle vene e non nelle arterie. Nel pannello inferiore l'immunofluorescenza su sezioni trasversali di tessuto venoso dimostra che lo *shear stress* arterioso induce autofagia delle EC (colore rosso per l'espressione dei marcatori LC3 e COX-2) e apoptosi (le cellule positive al saggio tunel sono in verde). Adattato da [47].

In una fase successiva dello studio, i campioni sono stati trattati prima del condizionamento *ex vivo* con un inibitore di autofagia (3-MA) e i risultati ottenuti suggeriscono che in questo modo si può ridurre il danno endoteliale e il successivo sviluppo di iperplasia della neointima, a riprova del ruolo importante svolto da questo meccanismo cellulare.

### 2.1.2.2. SISTEMI A STIMOLAZIONE PULSATILE

La nascita dei sistemi di stimolazione pulsatile è contemporanea a quella dei sistemi a flusso stazionario. Il lavoro di Gollegde del 1997 [48], presenta un modello *ex vivo* per il condizionamento di segmenti di vena safena in condizioni arteriose con flusso pulsatile e valori di pressione tipicamente arteriosi. I sistemi con stimolazione pulsatile sono spesso sviluppati a partire da sistemi a stimolazione stazionaria già esistenti. Ad esempio il sistema pulsatile utilizzato da Conklin nel 2000 [49] per simulare l'emodinamica fisiologica pulsatile delle coronarie è stato progettato sulla base del sistema a flusso stazionario utilizzato da Surowiec [50] per stimolare tratti di vena safena di lunghezza pari a 5 cm circa con una portata costante di 100 ml/min.

In uno studio del 2014 Longchamp e collaboratori [51] hanno sviluppato un modello *ex vivo* per stimolare simultaneamente due segmenti di vena safena, di cui uno rinforzato con una rete di supporto. Le condizioni di stimolazione sono state impostate così da ottenere valori di *shear stress* compresi tra 9 e 12 dynes/cm<sup>2</sup> con una portata pulsatile e condizioni di pressione venosa (valore medio 7 mmHg, valore diastolico 6 mmHg, valore sistolico 8 mmHg) oppure arteriosa (valore medio 100 mmHg, valore diastolico 90 mmHg, valore sistolico 120 mmHg) per 3 o 7 giorni. Il sistema utilizza una pompa roller in grado di generare un segnale pulsatile controllato da un computer, che controlla anche pressione e portata del mezzo e controlla la pressione diastolica minima (Fig. 2.9).

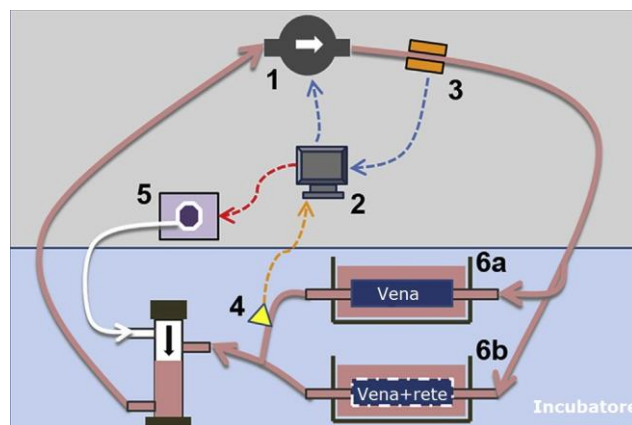


Fig. 2.9: Il sistema di stimolazione *ex vivo* usato da Longchamp e colleghi. La pompa roller (1) genera un segnale controllato dal PC (2), che monitora la pressione (3) e la portata (4) e controlla la pressione diastolica minima (5). I due segmenti di vena safena (6a e 6b) sono connessi in parallelo all'interno di due camere di stimolazione posizionate all'interno dell'incubatore. Adattato da [51].

Dall'analisi della morfologia dei campioni, ottenuta con Tricromia di Masson, risulta che nel gruppo di controllo le SMC sono distribuite uniformemente tra gli strati del vaso, a differenza di ciò che accade nei campioni senza rete di supporto condizionati con pressione arteriosa per 7 giorni, dove la tonaca media si assottiglia. Le colorazioni immunologiche (von Willebrand factor -vWF- per le endoteliali e  $\alpha$ -SMA per le SMC) mostrano una buona conservazione dello strato endoteliale e una riduzione del numero di SMC nella media e una loro redistribuzione nell'intima. Queste alterazioni patologiche non sono presenti nei campioni esposti a condizioni di pressione venosa e sono fortemente limitate nelle vene stimulate in condizioni arteriose, ma rinforzate dalla rete di supporto (Fig. 2.10).

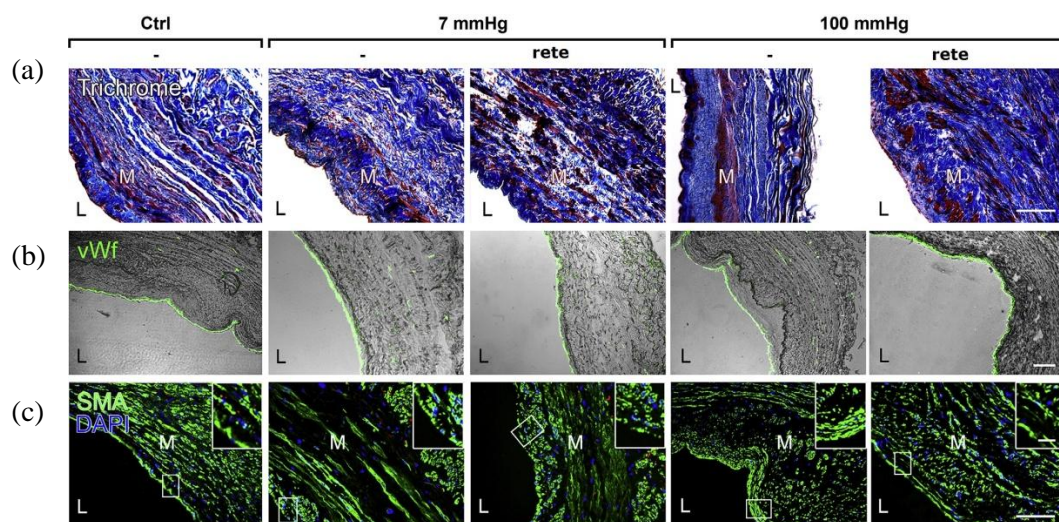


Fig. 2.10: Immagini istologiche e immunofluorescenze che mettono in evidenza le alterazioni indotte da valori elevati di pressione. (a) Tricromia di Masson differenzia le SMC (in rosso) e il tessuto connettivo (in blu). Nelle vene di controllo le SMC sono distribuite equamente nei tre strati, questi strati sono ridotti notevolmente nelle vene esposte a 100 mmHg di pressione per 7 giorni, ma non in quelle rinforzate dalla rete di supporto. (b) Gli anticorpi contro il fattore von Willebrand mostrano lo strato endoteliale sulla superficie del lume della vena. (c) La colorazione delle SMC tramite anticorpi contro  $\alpha$ -SMA insieme alla colorazione DAPI per i nuclei rivela un accumulo di SMC nello strato di intima delle vene esposte a una pressione di 100 mmHg. Questa alterazione è limitata nelle vene rinforzate dal supporto esterno. L, lume; M, media. Adattato da [51].

Lo stesso gruppo di ricerca ha indagato anche gli effetti indotti dalla stimolazione con condizioni arteriose (e pressione di 100 mmHg) su numerose proteine, marcatori cellulari e sulle metalloproteinasi (MMP-2, MMP-9) che svolgono un ruolo fondamentale nel rimodellamento della matrice extracellulare. I risultati ottenuti hanno mostrato che questo stimolo induce apoptosi all'interno della media (Caspase3 -ClvCasp3), degradazione della ECM (MMP), diminuzione della funzione endoteliale (eNOS) e del fenotipo venoso (Efrine). L'utilizzo della rete di supporto limita questi effetti negativi, ma non riesce a proteggere il vaso dalla perdita del fenotipo venoso, come dimostrato dalla diminuzione dell'espressione dei marcatori cellulari venosi (EpH-B4). Queste conclusioni tuttavia, insieme a quelle di precedenti studi su modelli animali [52] [53] [54], suggeriscono come possibile strategia terapeutica l'utilizzo di un supporto esterno per prevenire lo sviluppo di iperplasia della neointima.

Piola e collaboratori nel 2015 [55] hanno pubblicato uno studio nel quale hanno utilizzato un EVCS per stimolare i segmenti di vena safena con la pressione pulsatile (80-120 mmHg) tipica della circolazione coronarica. I campioni sono stati stimolati con bassa pressione (condizione venosa) oppure con pressione elevata, per riprodurre la condizione arteriosa. I risultati ottenuti dalle colorazioni istologiche (Ematossilina e Eosina e Tricromia di Masson) (Fig. 2.11) mostrano una riduzione del 45% dello spessore della parete e un contestuale aumento del perimetro luminale nei campioni soggetti a condizione arteriosa. L'area trasversale rimane invece costante, a riprova del fatto che si verifica una riorganizzazione dei componenti della ECM piuttosto che una perdita di massa nel tessuto dovuta allo *shear stress* arterioso. Inoltre la significativa diminuzione della densità totale dei nuclei, soprattutto negli strati di SMC circonferenziali (evidenziata dalle colorazioni immunostochimiche e in immunofluorescenza) suggerisce che il danno meccanico è predominante nello strato medio, nonostante non sia associato con un aumento di cellule apoptotiche, secondo i risultati ottenuti dal saggio TUNEL (Fig. 2.11 D e E).

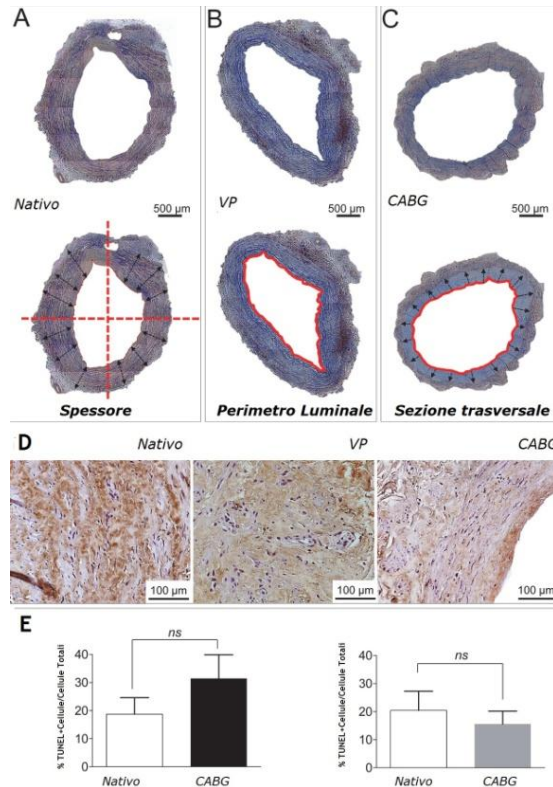


Fig. 2.11: Colorazioni istologiche e morfometria dei campioni nativi, stimolati con pressione venosa (Venous Pressure- VP) e con stimolazione tipica del CABG. **A-C** Basso ingrandimento delle immagini ottenute dalla Tricromia di Masson. Nelle immagini più in basso si mostrano i parametri morfometrici stimati: direzione del raggio usato per misurare lo spessore della parete (**A**), perimetro luminale (**B**) e regione considerata per calcolare l'area trasversale (**C**). **D** Risultati del saggio TUNEL nei campioni nativi, VP e CABG. **E** Quantificazione dei nuclei del saggio TUNEL nelle sezioni trasversali dei campioni di vena safena. Adattato da [55].

Inoltre il gruppo di ricerca ha valutato i cambiamenti indotti sui *vasa vasorum* dalla stimolazione arteriosa tramite accurate analisi istologiche per valutarne la densità lineare dei vasi e tramite tecniche di immunofluorescenza per stimare possibili modifiche nelle espressione di marcatori cellulari (CD31, vWF,  $\alpha$ -SMA). I risultati ottenuti suggeriscono una diminuzione dei marcatori delle SMC e delle EC; in particolare le SMC associate ai *vasa vasorum* sembrano perdere contatto con la lamina basale per andare ad invadere l'avventizia, a riprova del fatto che queste cellule cambiano fenotipo da contrattile a secretorio (Fig. 2.12).

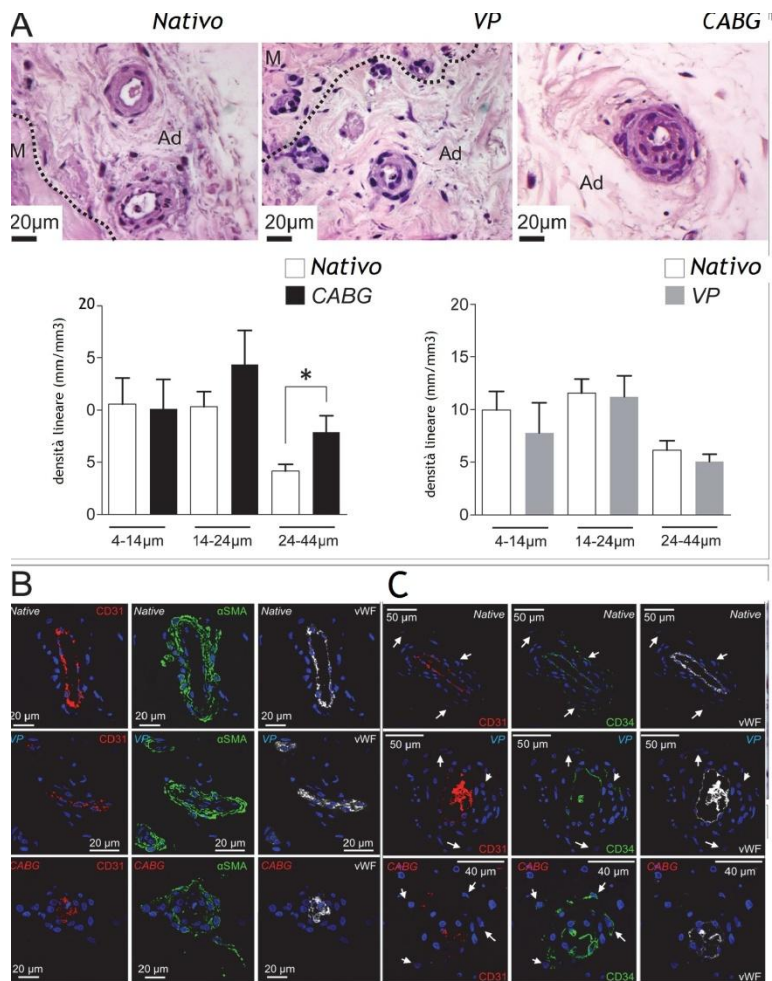


Fig. 2.12: Morfologia e analisi dei marcatori presenti nei vasa vasorum nei campioni di vena safena. Immagini rappresentative dello strato avventiziale in campioni nativi, VP e CABG colorate con Ematossilina ed Eosina **A**. Gli istogrammi quantificano la densità lineare dei vasa vasorum; i vasa vasorum di dimensione intermedia e grande (14-44 µm) sono fortemente incrementati nei campioni CABG. **B** Colorazione con CD31/α-SMA/vWF. **C** Colorazione con CD31/CD34/vWF per individuare SMC, EC e cellule progenitrici della vena safena nei vasa vasorum. Una netta diminuzione dell'espressione dei marcatori delle EC e delle SMC è evidente nei campioni CABG. Adattato da [55]

Nel 2016 questo gruppo di ricerca ha presentato una nuova versione di un EVCS [56] in grado di applicare uno stimolo che riproduca più fedelmente quello del CABG, andando ad aggiungere allo stimolo pressorio pulsatile una portata pulsatile (valore medio di 250 ml/min) e valori elevati di *shear stress* (10-70 dynes/cm<sup>2</sup>) grazie all'utilizzo di un duplicatore di impulso coronarico (Fig. 2.13).

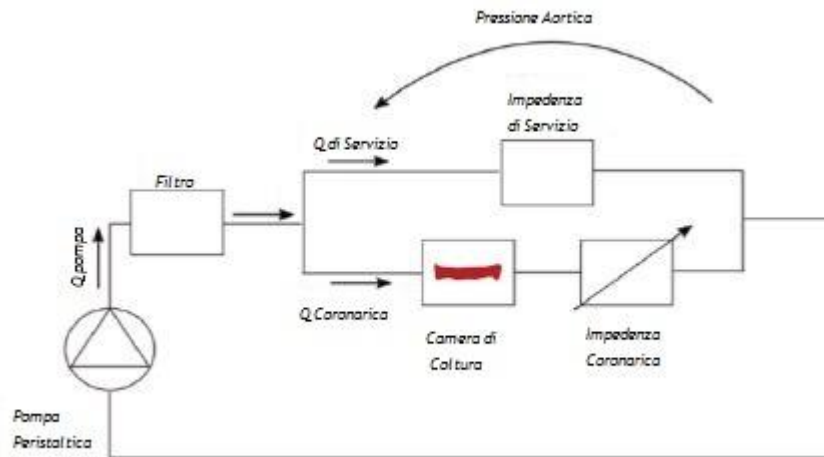


Fig. 2.13: Rappresentazione schematica della camera di coltura *ex vivo* integrata con il duplicatore di impulso coronarico. La piattaforma prevede la presenza di quattro sotto-sistemi: il filtro, la camera di coltura, l'impedenza di servizio e l'impedenza coronarica. Adattato da [56].

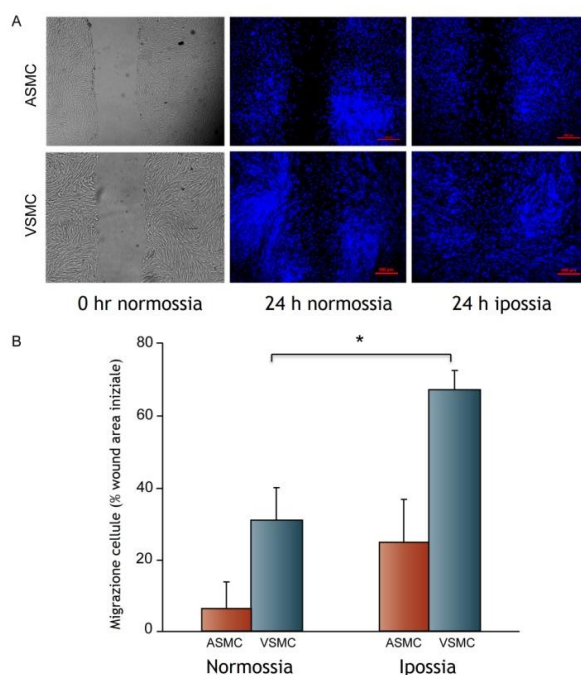
## 2.2 L'EFFETTO DELL'ESPOSIZIONE A CONDIZIONI DI OSSIGENAZIONE ANOMALA

In seguito all'operazione chirurgica di rivascularizzazione, il graft venoso è sottoposto a un ambiente biochimico completamente diverso rispetto a quello fisiologico. In condizioni fisiologiche, infatti, il lume della vena safena è perfuso da sangue venoso con una pressione parziale di ossigeno di circa 30-40 mmHg, mentre i *vasa vasorum* attraversano l'avventizia e circa due terzi della media e provvedono quindi a mantenere il tessuto a una pressione parziale di ossigeno di circa 100-150 mmHg [57]. Immediatamente dopo l'impianto, il lume della vena safena è esposto a valori di ossigeno arteriosi, mentre il lato avventiziale va incontro a un'improvvisa e drastica diminuzione di ossigenazione, per via della rimozione dei *vasa vasorum*. Questi cambiamenti determinano un'alterazione nel metabolismo dell'ossigeno del vaso e concorrono allo sviluppo del VGD [37][58]. In letteratura esistono pochi studi circa le conseguenze biologiche dovute a un'alterata disponibilità di ossigeno e sono quasi del tutto assenti esempi di EVCS sviluppati a tale scopo.

In un lavoro del 2016 Chanakira e colleghi [59] hanno studiato gli effetti dell'ipossia sulla migrazione cellulare e sui differenti meccanismi indotti nelle SMC derivanti da vene (V-SMC) e quelle derivanti da arterie (A-SMC).

Per creare una condizione di ipossia (3-5% pO<sub>2</sub>) le cellule sono state coltivate in una camera posizionata in un incubatore a 37°C e una miscela di gas (5% CO<sub>2</sub>, 95% N<sub>2</sub>) vi è stata fatta scorrere all'interno per 15 minuti a una portata di 10 ml/min e successivamente la camera è stata sigillata e posta nell'incubatore. Con questo metodo si è riusciti a ottenere un medium con una pressione parziale di ossigeno inferiore a 35 mmHg, mentre in una coltura in condizioni di normossia il mezzo di coltura raggiunge una pO<sub>2</sub> di circa 150-160 mmHg. Le cellule sono state lasciate in coltura per 24 ore.

I saggi per valutare gli effetti sulla migrazione (Scratch Wound assay e ECIS migration assay) sottolineano come la migrazione delle V-SMC, di gran lunga superiore a quella delle A-SMC, è stimolata da meccanismi autocrini indotti dall'ipossia in modo più marcato rispetto alle A-SMC (Fig. 2.14).



*Fig. 2.14: Migrazione delle V-SMC e A-SMC indotta dall'ipossia. Risultati dello Scratch wound assay utilizzato per determinare la migrazione relativa delle cellule in condizioni di normossia o ipossia. A a sinistra immagini a contrasto di fase a tempo 0, a destra fissaggio e colorazione delle cellule dopo 24 ore di normossia, al centro, o ipossia, a destra. B Analisi quantitativa della migrazione relativa delle cellule. Adattato da [59].*

Ulteriori risultati dello stesso lavoro mostrano che la migrazione delle SMC indotta dall'ipossia dipende sia da un meccanismo autocrino sia da uno paracrino ed è mediata da due diversi pathway molecolari nelle V-SMC e nelle A-SMC (pathway indotto dall'attivazione del fattore di crescita VEGF-A nelle prime e da Platelet Derived Growth Factor BB - *PDGF-BB* nelle seconde).

Pyla e i suoi collaboratori nel 2015 [60] hanno investigato gli effetti dell'ipossia sul contenuto di glicogeno e sulla contrazione delle SMC indotta dalla serotonina.

Le condizioni di ipossia sono state create gorgogliando una miscela di azoto e anidride carbonica nella soluzione in cui sono stati immersi anelli di vena safena procurati da campioni provenienti dalla sala operatoria. Successivamente i campioni sono stati ri-ossigenati e sono state fatte analisi per valutare la contrattilità. I risultati ottenuti hanno dimostrato una diminuzione della contrattilità delle SMC. La quantità di glicogeno è stata valutata tramite saggi *ad hoc* e successivamente è stata effettuata un'analisi delle proteine (tramite elettroforesi e estrazione, quantificazione e valutazione dell'RNA) che ha evidenziato un aumento della fosforilazione delle AMPK.

I risultati ottenuti suggeriscono che l'esposizione a una condizione di ipossia induce una diminuzione del contenuto endogeno di glicogeno (Fig. 2.15), con conseguente attivazione di altri meccanismi, ad esempio l'accentuazione della fosforilazione delle chinasi AMPK.

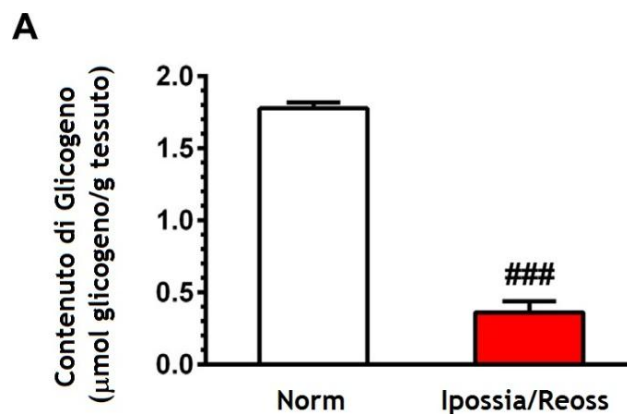


Fig. 2.15: Effetti dell'ipossia sulla quantità di glicogeno. Diminuzione della quantità di glicogeno nei campioni sottoposti a ipossia e quindi a re-ossigenazione. Adattato da [60]

Diverso l'obiettivo del lavoro pubblicato da Joddar nel 2015 [61] nel quale è stato indagato l'effetto dell'esposizione del lato luminale della vena a valori di  $pO_2$  arteriosi. In uno studio precedente [62] avevano dimostrato che tra diversi campioni di vene safene di origine porcina solo quelli perfusi con alti valori di tensione di ossigeno ( $pO_2$  pari 95 mmHg o superiore) e non quelli perfusi con bassa  $pO_2$  (75 mmHg) sviluppano iperplasia della neointima, con aumento della proliferazione cellulare e inspessimento dell'intima rispetto ai campioni di vena safena non esposti a questo trattamento.

In questo ultimo lavoro, invece, campioni di vena safena e campioni arteria mammaria interna sono stati coltivati in un'atmosfera di 40 mmHg ( $pO_2$  venosa), di 95 mmHg ( $pO_2$  arteriosa) o 140 mmHg (condizioni di coltura standard) per 14 giorni. I risultati mostrano un aumento dell'area dell'intima e un aumento dello spessore della media solo nei campioni di vena condizionati con 95 o 140 mmHg. Nessuno di questi cambiamenti è evidente nei campioni di arteria condizionati nello stesso modo (Fig. 2.16).

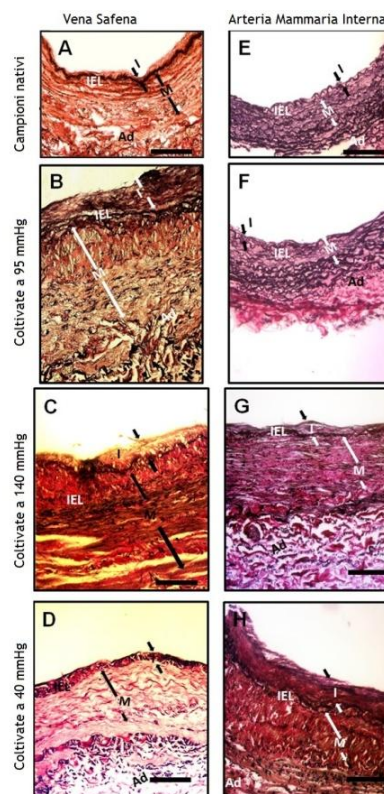


Fig. 2.16: Immagini istologiche dei campioni di vena safena (A-D) e di arteria mammaria interna (E-H) con  $pO_2$  arteriosa. I campioni sono stati colorati con colorazione Verhoeff Van Gieson nelle diverse condizioni (nativo, venosa, arteriosa, standard). I, intima; M, media; A, avventizia; IEL, lamina elastica interna. Adattato da [61]

Per verificare gli effetti di un'elevata tensione di ossigeno sulla componente cellulare è stata valutata la proliferazione delle SMC tramite isolamento e colorazione immunocitochimica utilizzando anticorpi anti-actina delle SMC (Dako). Nei campioni stimolati con  $pO_2$  venosa non si nota migrazione delle SMC, che viceversa è indotta da una  $pO_2$  elevata. Questi risultati, insieme a quelli derivati dalla precedente sperimentazione *in vivo*, dimostrano che l'esposizione a valori di ossigeno arteriosi ha effetti evidenti sullo sviluppo dell'iperplasia della neointima e sull'aumento della proliferazione delle SMC. Tale esposizione è un'inevitabile conseguenza dell'utilizzo di graft venosi negli interventi di rivascularizzazione, ma comprendere questi meccanismi può fornire un input importante nella ricerca di potenziali trattamenti farmacologici.

Nello studio di Piola e collaboratori pubblicato nel 2016 [63] si descrive lo sviluppo di un nuovo EVCS per riprodurre l'alterata distribuzione di ossigeno nella parete del graft venoso dopo CABG. Il nuovo profilo di ossigenazione è stato ottenuto grazie a una camera bicompartimentale in grado di separare ambiente interno ed esterno ed imporre un gradiente di  $pO_2$  tra il lato luminale (con  $pO_2$  arteriosa) e quello avventiziale (con  $pO_2$  venosa ottenuta per mezzo di un modulo de-ossigenante) (Fig. 2.17).

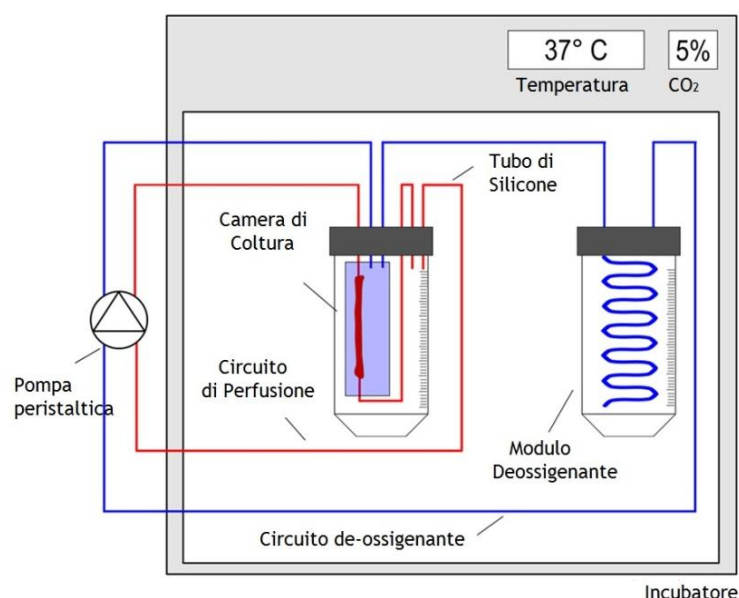
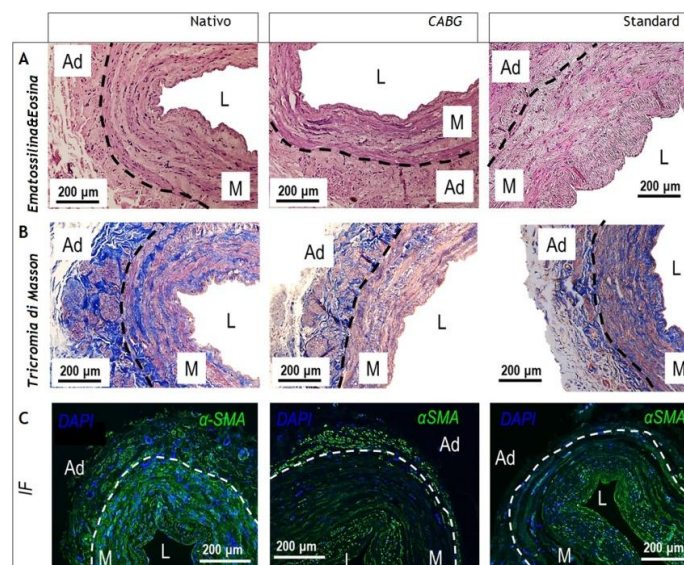


Fig. 2.17: Schema dell'EVCS. La linea rossa rappresenta il circuito idraulico connesso con il compartimento intra-luminale, quella blu il circuito extra-avventiziale connesso con il modulo de-ossigenante. Adattato da [63].

I campioni di vena safena sono stati condizionati per 7 giorni e sono stati confrontati i risultati ottenuti da due diverse condizioni:

- 1) compartimento luminale e compartimento avventiziale mantenuti entrambi a una  $pO_2$  del 21% (condizione standard)
- 2) compartimento luminale mantenuto al 21% di  $pO_2$  e quello avventiziale al 5% (condizione CABG).

Dalle colorazioni istologiche condotte su sezioni trasversali dei campioni risulta che la parete del vaso viene mantenuta intatta in entrambi i casi, ma le tecniche di immunofluorescenza evidenziano una riduzione delle SMC nei campioni sia in condizioni standard che in condizioni CABG rispetto ai campioni nativi (Fig. 2.18).



*Fig. 2.18: Sezioni di tessuto estratte dalle vene safene. A Colorazioni istologiche con Ematossilina e Eosina. B Colorazioni istologiche con Tricromia di Masson. C Immunofluorescenza con  $\alpha$ -SMA/DAPI. Immagini dei campioni ottenute dopo una settimana di esperimento. L, lumen; M, media; Ad, avventizia. Il confine tra media e avventizia è marcato dalla linea tratteggiata. Adattato da [63]*

Infine una valutazione della densità lineare dei *vasa vasorum*, effettuata grazie a immunofluorescenza e immunoistochimica, ha permesso di stabilire che il mantenimento di bassi livelli di ossigeno a livello dell'avventizia promuove il processo di neo-vascularizzazione sia di vasi di piccolo che di grande calibro.

## 2.3 CONCLUSIONI

L'analisi della letteratura sottolinea l'importanza di utilizzare EVCS per comprendere i meccanismi coinvolti nello sviluppo del VGD.

I sistemi di coltura statici sono utili per indagare le caratteristiche del tessuto [42] [43] e studiare l'effetto di alcuni farmaci [42], ma non permettono di analizzare il ruolo degli stimoli meccanici e di complessi stimoli biochimici.

Le analisi condotte sui campioni condizionati tramite sistemi dinamici di tipo stazionario mostrano le conseguenze dovute a uno *shear stress* tipicamente arterioso sul graft venoso. L'endotelio venoso viene conservato [46], seppure vada incontro a danneggiamento [47], ma si riscontra una perdita dell'identità venosa del tessuto [46][47].

La stimolazione pulsatile è più rappresentativa dell'ambiente fluidodinamico e meccanico presente nel graft venoso in seguito a CABG. Tali EVCS permettono di indagare in modo più approfondito i meccanismi indotti da pressione pulsatile e flusso tipicamente arterioso e i risultati ottenuti dai gruppi di ricerca che hanno svolto studi in questo ambito suggeriscono che questo genere di stimolo è fortemente responsabile dello sviluppo dell'iperplasia della neointima, dovuto a un forte danneggiamento a livello della media e a una riorganizzazione degli strati che compongono il vaso [51][55]. Anche la struttura dei *vasa vasorum* subisce importanti cambiamenti indotti dalla stimolazione arteriosa, con il conseguente verificarsi di fenomeni di angiogenesi [55].

In letteratura esistono invece pochi esempi di EVCS sviluppati per studiare il ruolo svolto dall'ambiente biochimico anomalo cui è sottoposto il graft venoso in seguito a CABG, cioè alti valori di ossigeno nel lato luminale e lato avventiziale esposto a una condizione di ipossia, seppure anche questo aspetto concorra in modo significativo al rimodellamento patologico del graft.

L'esposizione del lume a una  $pO_2$  elevata è responsabile da sola dello sviluppo di iperplasia dell'intima [61], mentre l'ipossia induce cambiamenti nel comportamento delle SMC di origine venosa in termini di migrazione e proliferazione [59] e provoca alterati meccanismi energetici all'interno dei tessuti [60].

Il presente lavoro di tesi nasce dall'esigenza di caratterizzare e ottimizzare le prestazioni dell'EVCS sviluppato da Piola e colleghi per studiare gli effetti indotti sul tessuto venoso dall'esposizione a un gradiente di ossigeno tra compartimento avventiziale e luminale [63]. L'obiettivo del presente lavoro di tesi è caratterizzare in modo sperimentale il modulo de-

ossigenante e ottimizzarlo in modo tale da ottenere un sistema in grado di generare nel compartimento avventiziale un'ipossia severa ( $pO_2$  pari a 2-3%).

Contestualmente nasce l'esigenza di sviluppare un modello analitico come strumento predittivo del comportamento del sistema.

Il fine ultimo è quello di applicare la condizione di ipossia severa al lato avventiziale dei campioni di vena safena e confrontare l'effetto di diverse condizioni di ipossia (ipossia moderata 5% e ipossia severa 3%) sul tessuto del graft venoso.

Nel capitolo seguente, sarà descritta l'attività di caratterizzazione e ottimizzazione del sistema de-ossigenante applicato al sistema bicompartimentale per la coltura *ex vivo* di segmenti di vena safena, lo sviluppo del modello analitico e la campagna sperimentale svolta con i campioni di vena safena.

### 3. MATERIALI E METODI

*In questo capitolo, dopo una breve descrizione del sistema di coltura ex vivo utilizzato per la campagna sperimentale, verrà descritto il percorso di caratterizzazione del modulo de-ossigenante, eseguito mediante prove senza ricircolo del mezzo e con ricircolo del mezzo. Quindi si presenterà la versione ottimizzata del de-ossigenatore, caratterizzata con prove senza ricircolo del mezzo, con ricircolo del mezzo e con prove idrauliche per valutare le perdite di carico introdotte. Successivamente verranno descritti i passaggi che hanno portato all'elaborazione del modello analitico predittivo del comportamento del sistema. Infine si mostrerà lo studio sperimentale condotto presso il LIT su campioni di vena safena umana mantenuti in coltura nel sistema ex vivo.*

#### 3.1 OBIETTIVO DEL LAVORO

Il presente lavoro di tesi svolto presso il Laboratorio di Micro e Biofluidodinamica Sperimentale ( $\mu$ BSLab) del DEIB (Dipartimento di Elettronica, Informazione e Bioingegneria) del Politecnico di Milano, si inserisce all'interno di un progetto più ampio, svolto in collaborazione con il gruppo di ricerca del Laboratorio di Ingegneria Tissutale Cardiovascolare (LIT) dell'IRCCS Centro Cardiologico Monzino.

Obiettivo del presente lavoro di tesi è quello di riprodurre le condizioni biochimiche cui è sottoposto il graft venoso in seguito all'operazione di bypass aorto-coronarico e valutare le conseguenze indotte sul tessuto. Il sistema di coltura *ex vivo* messo a punto in un precedente lavoro [63] permette infatti di separare i due ambienti luminale e avventiziale grazie a una camera bicompartimentale e condizionarli separatamente. Il lato luminale del vaso viene esposto a una pressione parziale di ossigeno tipicamente arteriosa mentre il lato avventiziale a una condizione di ipossia, tramite un modulo de-ossigenante progettato *ad hoc*.

Il contributo apportato al progetto nel presente lavoro di tesi è consistito inizialmente in un'approfondita caratterizzazione del modulo de-ossigenante pre-esistente, e alla sua ottimizzazione al fine di riuscire ad ottenere una condizione di ipossia severa.

In parallelo a questo lavoro di caratterizzazione è stato anche elaborato un modello in grado di predire l'andamento della pressione parziale di ossigeno all'interno del compartimento avventiziale in funzione delle caratteristiche del sistema e del modulo de-ossigenante e di suggerire su quali parametri agire per poter ottenere i valori di ipossia desiderati.

Infine è stata allestita una campagna sperimentale presso Laboratorio di Ingegneria Tissutale Cardiovascolare dell'IRCCS Centro Cardiologico Monzino con l'obiettivo di condizionare campioni di vena safena umana all'interno del nuovo sistema ottimizzato per valutare gli

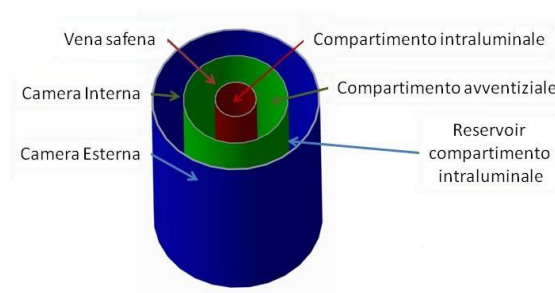
effetti indotti sul tessuto venoso da una condizione di ipossia severa, rispetto alle condizioni di ipossia moderata e di normossia.

### 3.2 CARATTERIZZAZIONE E OTTIMIZZAZIONE DEL MODULO DE-OSSIGENANTE

In questo paragrafo verrà descritto il sistema di coltura *ex-vivo*, ponendo particolare attenzione alla camera bicompartimentale e al de-ossigenatore. Si descrive sia il de-ossigenatore pre-esistente sia la soluzione messa in atto per raggiungere una de-ossigenazione più efficace. Quindi verrà presentato il setup sperimentale messo a punto per effettuare un primo gruppo di esperimenti finalizzati a caratterizzare il de-ossigenatore in termini di efficacia della de-ossigenazione a singolo passaggio, e il setup messo in opera per un secondo gruppo di esperimenti volti a valutare il valore di concentrazione di ossigeno raggiunta all'interno del lato avventiziale del sistema bicompartimentale in condizioni reali di esercizio del de-ossigenatore, caratterizzate dal continuo ricircolo del medium contenuto nella camera di coltura che ospita il graft vascolare.

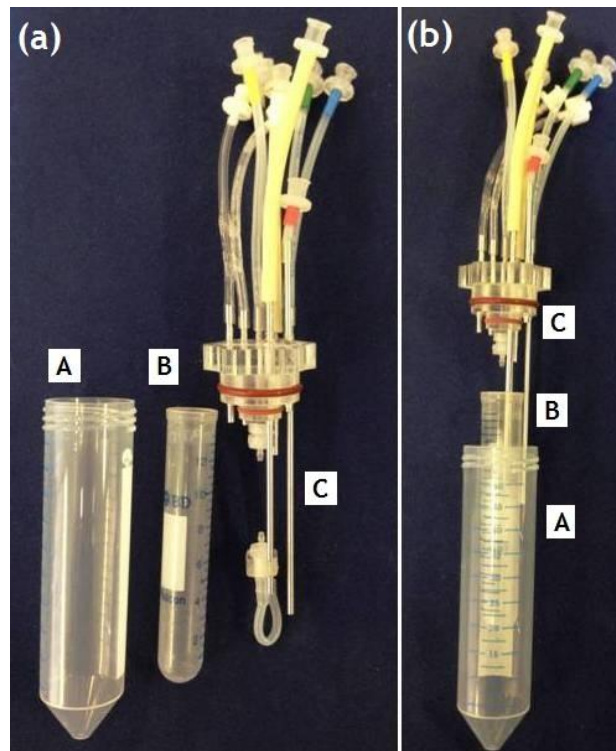
#### 3.2.1 SISTEMA DI COLTURA *EX-VIVO*

Il sistema di coltura *ex-vivo* utilizzato in questo studio sperimentale si basa sull'utilizzo di una camera bicompartimentale che permette di separare l'ambiente lumenale della vena da quello avventiziale, in modo tale da poterli condizionare in modo indipendente l'uno dall'altro (Fig. 3.1).



*Fig. 3.1: Rappresentazione schematica del sistema bicompartimentale. Il sistema è composto da due camere concentriche, camera interna (in verde) e camera esterna (in blu). La vena safena è posizionata nella camera interna tramite un apposito sistema di ancoraggio. In questa configurazione si delineano tre regioni: il lume della vena che definisce il compartimento intraluminale, l'interstizio tra parete della vena e camera interna che rappresenta il compartimento avventiziale e l'interstizio tra camera interna e camera esterna che funge da reservoir per il compartimento intraluminale.*

La camera di coltura bicompartimentale è stata realizzata utilizzando come camera esterna un tubo falcon da 50 ml (International PBI. Spa., Milano, Italia) e come camera interna un tubo falcon con fondo tondo da 14 ml (BD, Becton Dickinson International, NJ, USA). Le due camere sono tenute in sede e accoppiate all'*housing* della camera tramite degli O-ring, che garantiscono la tenuta idraulica del sistema (Fig. 3.2).



*Fig. 3.2: Immagine degli elementi che compongono la camera bicompartimentale. (a) Si mostrano tutti gli elementi che costituiscono la camera separati (b) Dimostrazione di come gli elementi vengono assemblati nella camera bicompartimentale. A camera esterna, B camera interna, C housing ed elementi connessi all'*housing*.*

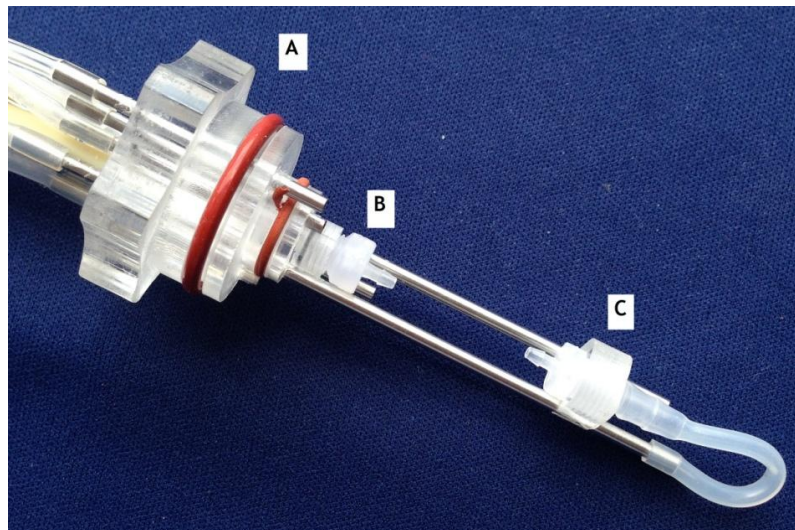
Oltre agli O-ring per il posizionamento delle due camere, l'*housing* presenta nove fori di cui:

- un foro per alloggiare un filtro HEPA (che permette di mantenere la pressione atmosferica nella camera esterna),
- due fori per collegare, tramite un tubo, il compartimento avventiziale e il reservoir luminale (serve sia come sistema di sicurezza per svuotare la camera avventiziale

in caso di eccessivo riempimento che come sistema per mantenere anche la camera interna a pressione atmosferica),

- due fori per l'ingresso e l'uscita del terreno di coltura che scorre all'interno del vaso e altri quattro per l'ingresso e l'uscita del terreno di coltura della camera interna e di quella esterna.

Gli ingressi e le uscite sono realizzati tramite cannule in acciaio inox di diametro pari a 2.2 mm incollate nei fori dell'housing. Le due estremità del vaso vengono ancorate a due connettori in polipropilene filettati, avvitati l'uno in un foro filettato ricavato nel tappo e l'altro all'interno di un carrellino progettato in modo tale da poter scorrere sulle cannule metalliche. Questa soluzione consente di alloggiare all'interno della camera segmenti di vena di lunghezza diversa (3-5 cm) (Fig. 3.3).



*Fig. 3.3: Immagine dell'housing e di tutti gli elementi connessi all'housing. A Housing della camera con le cannule metalliche per ingressi e uscite e gli O-ring per l'alloggiamento delle camere. B Connettore in polipropilene per ancorare un'estremità del vaso. C Carrellino scorrevole nel quale è avvitato il connettore in polipropilene filettato per ancorare l'altra estremità del vaso.*

Il sistema di coltura è costituito da due circuiti indipendenti che compongono il modulo ossigenante e il modulo de-ossigenante (Fig. 3.4).

Il modulo ossigenante è composto da tubi in silicone (Platinum Cured, Cole Parmer, IL, USA) permeabili all'ossigeno con diametro interno pari a 0.8 mm, spessore 0.8 mm e lunghezza sufficiente a garantire una completa ossigenazione del medium che scorre al loro interno, e da una pompa peristaltica per la movimentazione del medium ossigenato.

Il modulo de-ossigenante è composto dal de-ossigenatore, che verrà presentato in modo più approfondito nel paragrafo successivo, e da tubi con una bassa permeabilità all'ossigeno (Tygon ND-100-65 Medical Tubing, Saint Gobain Performance Plasting Corporation, Francia) di diametro interno 1.6 mm e spessore 1.6, la cui lunghezza è stata ottimizzata per ridurre le possibili fonti di ossigenazione, e da una pompa peristaltica per la movimentazione del mezzo.

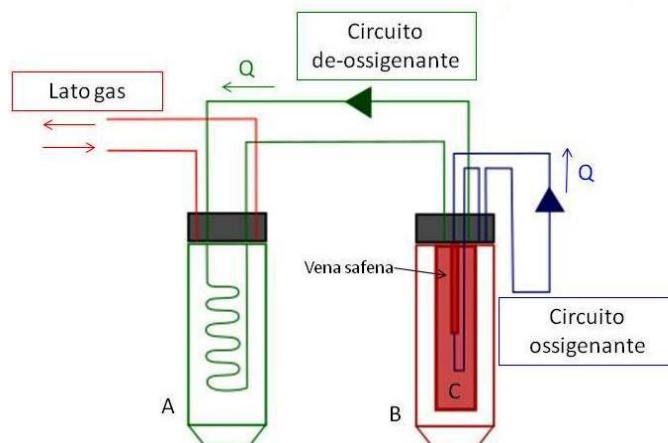


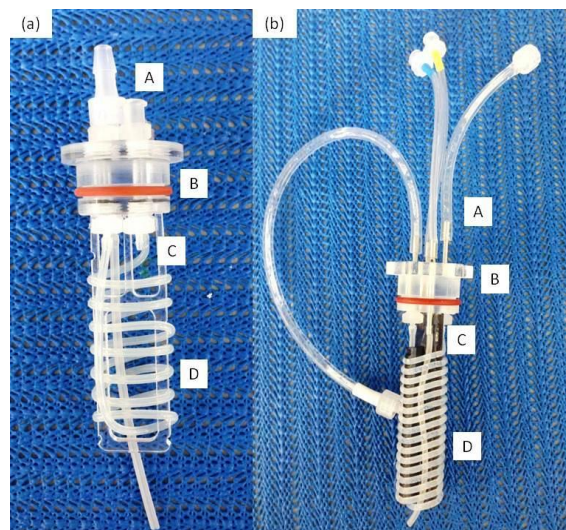
Fig. 3.4: Rappresentazione schematica del sistema di coltura ex-vivo con la camera bicompartimentale. In verde è rappresentato il circuito de-ossigenante, in blu quello ossigenante. In evidenza il de-ossigenatore (A) e la camera bicompartimentale composta da camera esterna (B) e camera interna (C), dove viene alloggiato il vaso. Nel de-ossigenatore sono previsti inoltre un ingresso e un'uscita per la miscela gassosa.

### 3.2.2 DE-OSSIGENATORE PER COLTURA EX-VIVO

Il de-ossigenatore svolge un ruolo chiave all'interno del sistema. Il suo scopo è quello di ridurre la concentrazione di ossigeno del mezzo di coltura che si trova nel compartimento avventiziale e che scorre nel circuito de-ossigenante. Per raggiungere questo obiettivo si sfrutta il fenomeno della diffusione dell'ossigeno attraverso un materiale permeabile, guidata dal gradiente di ossigeno generato tra il mezzo di coltura e l'ambiente circostante. Il de-ossigenatore (Fig. 3.5.a) è composto infatti da una camera perfusa da azoto, realizzata con un tubo falcon da 50 ml (International P.B.I. Spa, Milano, Italia), nel quale è alloggiato un supporto su cui è avvolto un tubo in silicone (Platinum Cured, Cole Parmer, IL, USA) dove scorre il mezzo di coltura. Il tubo in silicone ha diametro interno 0.8 mm, spessore 0.8 mm ed è lungo 40 cm; tale dimensionamento è stato ricavato in un precedente lavoro di tesi [1] e permette di raggiungere una pO<sub>2</sub> del 5% nel mezzo avventiziale. Un tappo in

PMMA (Plasting Srl., Segrate, Italia) permette infine l'ancoraggio del supporto e l'accoppiamento con il tubo falcon tramite O-ring.

Il de-ossigenatore pre-esistente (identificato con la sigla L40) è stato ottimizzato per poter raggiungere dei valori di ipossia più severa all'interno del modulo de-ossigenante. A partire dalle osservazioni fatte in precedenti lavori di tesi [1][2], per migliorare le prestazioni del de-ossigenatore si è scelto di aumentare la lunghezza del tubo in silicone in modo tale da aumentare l'area totale di scambio e rendere la diffusione dell'ossigeno più efficace. La necessità di ridurre gli spazi rappresenta però un limite importante in quanto i volumi di priming devono essere ridotti per avere un sistema compatibile con l'incubatore. È stato quindi progettato un nuovo supporto in PMMA (Plasting S.r.l., Segrate, Italia) con il software CAD per la modellazione solida parametrica Creo Parametric 3.0 (PTC), che è poi stato realizzato con il laser a CO<sub>2</sub> (VersaLaser VLS 2.30). Il nuovo supporto permette l'alloggiamento di un tubo in silicone lungo 100 cm e grazie ad esso è possibile realizzare la nuova versione del de-ossigenatore (Fig. 3.5.b). Il de-ossigenatore verrà identificato con la sigla L100. Il vantaggio di disporre di un de-ossigenatore in grado di raggiungere valori di ossigeno molto bassi è che in questo modo il sistema è controllabile e andando a regolare la composizione della miscela che si usa per de-ossigenare si possono riprodurre diverse condizioni di ossigeno.



*Fig. 3.5: Immagine delle due versioni di de-ossigenatore a confronto. (a) De-ossigenatore L40 (b) De-ossigenatore L100. In entrambe le versioni sono presenti gli stessi elementi: accesso e uscita del gas e del mezzo di coltura (A), il tappo in PMMA (B) e il supporto (C) su cui è avvolto il tubo in silicone (D). La differenza sostanziale sta nella lunghezza del tubo in silicone: nella versione ottimizzata il nuovo supporto permette l'alloggiamento di un tubo lungo 100 cm all'interno di un volume ridotto.*

### 3.2.3 VALUTAZIONE DELLE PERDITE DI CARICO

Una caratterizzazione idraulica è stata eseguita per valutare le perdite di carico indotte dal nuovo de-ossigenatore, così da valutare se il tubo in silicone di lunghezza considerevole utilizzato rappresenta un elemento eccessivamente resistivo all'interno del circuito.

Il setup allestito, mostrato nella figura seguente (Fig. 3.6), prevede che si muovimenti acqua demineralizzata con una pompa peristaltica Watson-Marlow (323 DU, WatsonMarlow Group) con testa pompante 314 D. Una siringa con 5 ml di aria viene utilizzata come elemento compliant dimensionato sperimentalmente per filtrare il disturbo introdotto dai rulli della pompa. Un sensore *flow-through* PendoTECH Press-S-000 (PendoTECH, Princeton, NJ, USA) connesso a un PC tramite scheda di acquisizione consente l'acquisizione del segnale di pressione, visualizzato grazie a un software LabView (National Instruments Corp) *custom made*.

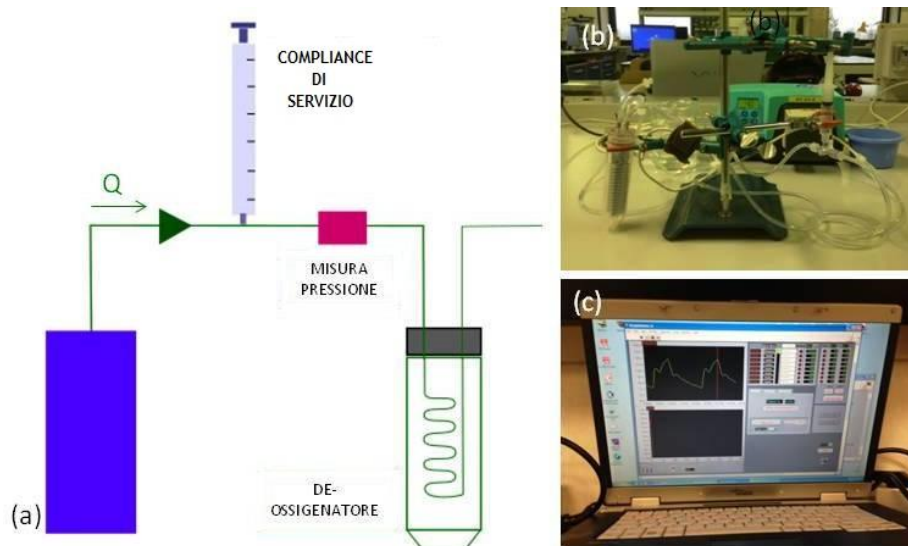


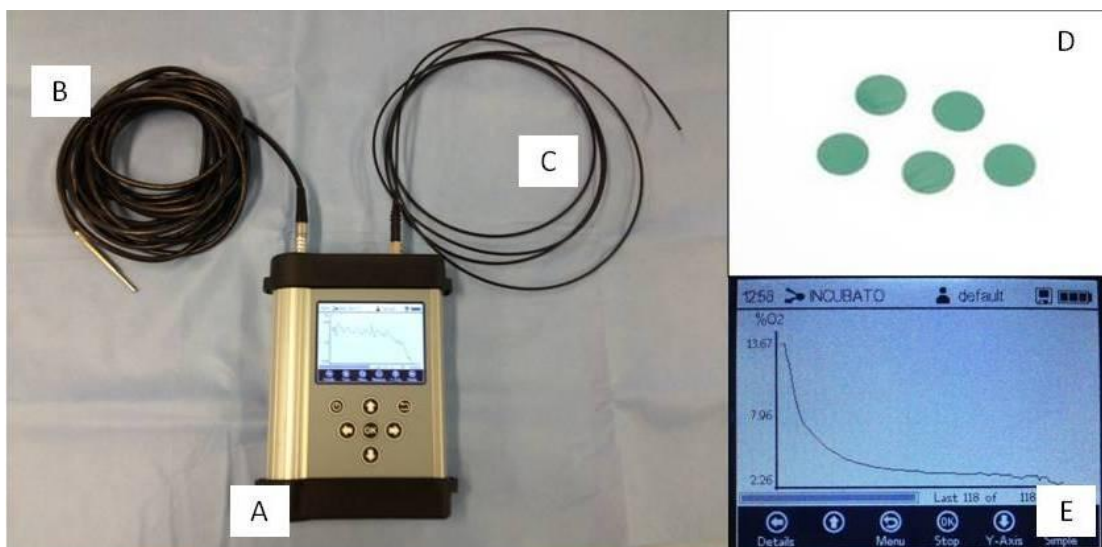
Fig. 3.6: Setup allestito per misurare la caduta di pressione introdotta dal nuovo de-ossigenatore. (a) Schematizzazione di tutti gli elementi utilizzati, tra cui la pompa per movimentare l'acqua demineralizzata utilizzata, una compliance per ridurre il disturbo introdotto dai rulli della pompa, il trasduttore di pressione e il de-ossigenatore. (b) Fotografia del setup di prova. (c) Schermata del software per monitorare i valori di pressione.

Il test è stato effettuato registrando i valori di caduta di pressione al variare delle portate di funzionamento (1.25, 2.5, 3.75, 5, 6.25, 7.5, 8.75, 10 ml/min) e i risultati ottenuti sono stati confrontati con i valori teorici di pressione.

### 3.2.4 SENSORE DI MISURA

La caratterizzazione del modulo de-ossigenante è stata eseguita in termini di valori di pressione parziale di ossigeno che si raggiungono nel mezzo di coltura.

Per misurare la pressione parziale di ossigeno è stato utilizzato un sensore ottico non invasivo, il cui funzionamento si basa sulla tecnologia degli optrodi. *Spot* sensibili all'ossigeno (PSt7, PreSens - Precision Sensing GmbH, Germania) vengono fissati su superfici vetrose o di plastica trasparente e la concentrazione di ossigeno viene misurata in modo non invasivo dall'esterno tramite una fibra ottica. L'intero sistema è controllato da una centralina (Microx4, PreSens - Precision Sensing GmbH, Germania) in grado di compensare in modo automatico il valore di temperatura e tramite la quale può essere eseguita la calibrazione dei sensori. I valori di  $pO_2$  vengono visualizzati *real time* sullo schermo della centralina e possono essere registrati all'interno di un foglio di calcolo per una successiva rielaborazione.



*Fig. 3. 7: Immagine degli elementi che costituiscono il sistema di misura. (A) La centralina è collegata alla sonda di temperatura (B) che permette di compensare la temperatura in modo automatico e alla fibra ottica (C). Gli spot sensibili all'ossigeno (D) sono dei dischi che vengono incollati a una superficie trasparente e permettono la misura della concentrazione di ossigeno tramite una fibra ottica posta a contatto con tale superficie. Il valore di  $pO_2$  viene letto real time sul monitor della centralina (E).*

Per poter utilizzare questo sistema di misura in questo setup sperimentale è stata realizzata una camera di misura *ad hoc* che viene integrata nel circuito. La camera di misura è stata

progettata in modo tale da avere un volume di *priming* ridotto, un ingresso e un'uscita per il mezzo di coltura e una superficie piana trasparente dove fissare lo *spot* sensibile all'ossigeno e sul cui lato esterno possa essere facilmente posizionata e fissata la fibra ottica, condizione necessaria per poter ottenere la misura della  $pO_2$ . La camera di misura deve garantire inoltre la tenuta idraulica e essere isolata da possibili sorgenti di ossigenazione e di luce poiché lo *spot* è foto-sensibile.

La camera di misura disegnata è di forma cilindrica, con lume interno ridotto e parete spessa e si ottiene da lamine di PMMA (Plasting Srl., Segrate, Italia) lavorate al laser a  $CO_2$  (VersaLaser VLS 2.30). Lo *spot* viene incollato su un dischetto di PMMA trasparente (Plasting S.r.l., Segrate, Italia) di diametro pari a 5.5 mm e spessore 1 mm realizzato sempre con il laser a  $CO_2$  (Fig. 3.8). La base del cilindro della camera di misura permette l'alloggiamento del dischetto con lo *spot*, tenuto in posizione da una vite con foro passante e la tenuta idraulica è garantita da un O-ring. La vite con foro passante permette inoltre di tenere la fibra ottica a contatto con lo *spot*. Ingresso e uscita del mezzo di coltura sono in direzione perpendicolare tra di loro, per garantire una buona perfusione dello *spot* e un sufficiente rimescolamento del mezzo all'interno della cameretta. Infine per impedire l'esposizione dello *spot* alla luce si è ricorsi a dei cappucci in gomma che vengono calzati sulla camera di misura senza interferire con il suo funzionamento (Fig. 3.8).

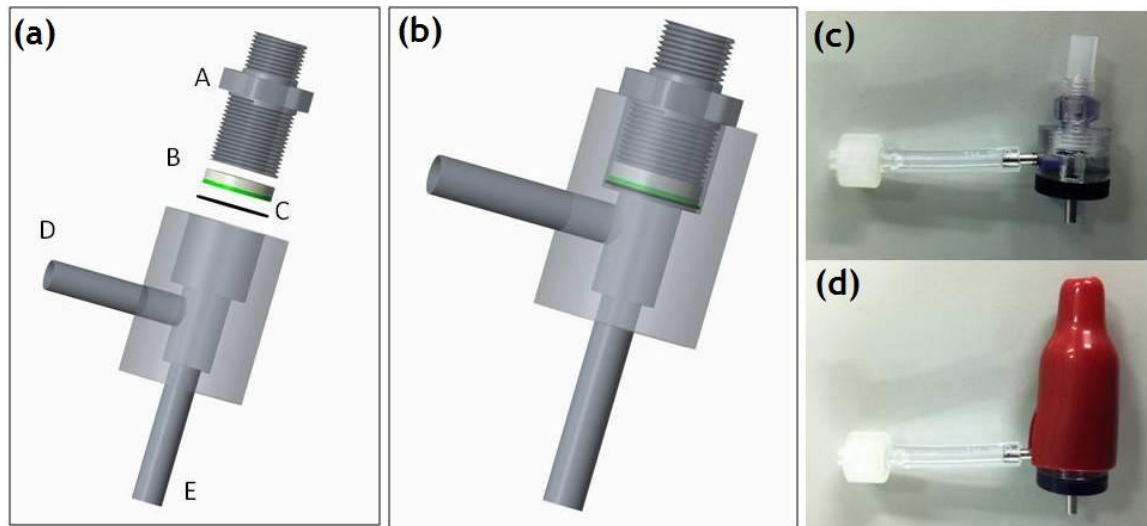


Fig. 3.8: La camera di misura. (a) Schematizzazione di tutti i componenti della camera: (A) la vite con foro passante che, oltre a mantenere in posizione il disco con lo *spot*, permette di posizionare la fibra ottica, (B) il disco in PMMA sul quale è incollato lo *spot*, (C) l'O-ring che garantisce la tenuta idraulica, (D) uscita e (E) ingresso del mezzo, disposti in direzione perpendicolare. (b) Rappresentazione della camera di coltura assemblata. (c) Immagine della camera di coltura realizzata. (d) Soluzione messa in atto per isolare lo *spot* da possibili fonti luminose.

### 3.2.5 CARATTERIZZAZIONE DEL DE-OSSIGENATORE IN ASSENZA DI RICIRCOLO

La caratterizzazione del de-ossigenatore senza ricircolo del mezzo permette di valutare le prestazioni del de-ossigenatore isolandolo dal sistema. Le prestazioni del de-ossigenatore vengono stimate in termini di scambio di massa specifico e totale.

Durante gli esperimenti senza ricircolo del mezzo svolti presso il  $\mu$ BSLab, il mezzo di coltura è stato sostituito da acqua demineralizzata, in equilibrio con l'atmosfera, e movimentata attraverso il de-ossigenatore con la pompa peristaltica Watson-Marlow (323 DU, WatsonMarlow Group) con testa pompante 314 D. Per mantenere il sistema a una temperatura di 37°C è stato utilizzato un bagno termostatico (F25-MD, Julabo) (Fig. 3.9). Una schematizzazione del setup allestito è mostrato nella Fig. 3.9:

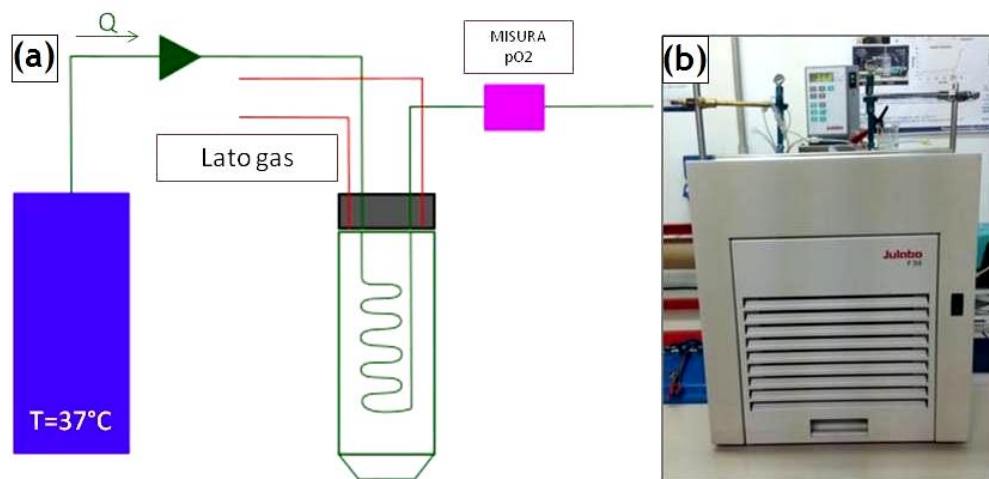


Fig. 3.9: La caratterizzazione a singolo passaggio. (a) Schematizzazione del setup allestito; l'acqua demineralizzata, in equilibrio con l'atmosfera, viene prelevata e circola nel circuito, composto da tubi poco permeabili all'ossigeno, e quindi nel de-ossigenatore, il cui lato gas può essere perfuso da aria o azoto. La camera di misura viene posta in uscita dal de-ossigenatore. (b) Bagno termostato utilizzato per mantenere la temperatura a 37°C durante tutti gli esperimenti di caratterizzazione svolti presso il  $\mu$ BSLab.

L'ingresso del lato gas del de-ossigenatore è collegato a due flussimetri, uno collegato alla bombola dell'azoto e l'altro all'aria compressa, l'uscita invece è lasciata in atmosfera. La camera di misura è posizionata a valle del de-ossigenatore.

Durante l'esperimento viene prima azionato il flussimetro dell'aria: l'acqua viene fatta circolare in questa condizione fino a quando non si raggiunge una pressione parziale

atmosferica, cioè circa il 21% di  $pO_2$ . Quindi viene chiuso il flussimetro dell'aria e si aziona il flussimetro dell'azoto con una portata di 300 ml/min e si aspetta fino a quando la misura della  $pO_2$  non raggiunge un valore di regime. In accordo con le disposizioni della casa costruttrice del sistema di misura, si stabilisce che il regime è esaurito quando la variazione dell'angolo di fase del segnale è inferiore a  $0.1^\circ$  in un intervallo di tempo di 3 minuti.

Il de-ossigenatore pre-esistente è stato caratterizzato alla portata di esercizio di 5 ml/min, mentre una più approfondita caratterizzazione della nuova versione del de-ossigenatore è stata ritenuta necessaria (esso è stato caratterizzato a diversi valori di portata, cioè 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 ml/min).

Lo scambio di massa specifico è stato stimato come la differenza tra la concentrazione di ossigeno nel fluido in ingresso, assunta pari al 21%, e quella in uscita dal de-ossigenatore. Infine, lo scambio totale è stato calcolato come il prodotto tra la portata di esercizio e lo scambio di massa specifico.

### 3.2.6 CARATTERIZZAZIONE DEL DE-OSSIGENATORE CON RICIRCOLO DEL MEZZO

Le prove con ricircolo del mezzo sono state effettuate per valutare le performance del de-ossigenatore nelle reali condizioni di utilizzo e il setup allestito rispecchia quindi il sistema descritto nel paragrafo 3.2.1. Durante le prove a banco eseguite presso il  $\mu$ BSLab il vaso sanguigno è stato sostituito da un tubo in silicone permeabile all'ossigeno per mimare la presenza della vena safena. Al posto del mezzo di coltura è stata utilizzata acqua demineralizzata movimentata nel modulo de-ossigenante con la pompa peristaltica Watson-Marlow (323 DU, WatsonMarlow Group) con testa pompante 314 D e nel modulo de-ossigenante con la pompa peristaltica Ismatec (IPC, Ismatec, Cole-Parmer GmbH).

Il sistema è stato mantenuto a una temperatura di  $37^\circ C$  utilizzando un bagno termostatico (F25-MD, Julabo), simulando così le condizioni di coltura all'interno dell'incubatore.

Il setup di prova utilizzato è riportato in Fig. 3. 10:

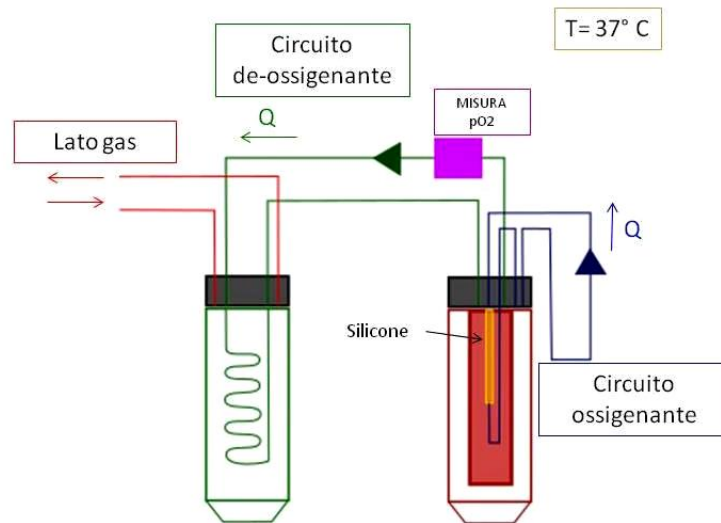


Fig. 3. 10: Schema del setup allestito per le prove con ricircolo del mezzo. Il setup ricalca il sistema di coltura descritto nel paragrafo 3.2.1; i due circuiti ossigenante e de-ossigenante sono indipendenti tra loro e movimentati entrambi da una pompa peristaltica. Il circuito ossigenante è composto da tubi in silicone, mentre quello de-ossigenante da tubi in Tygon con bassa permeabilità all'azoto e dal de-ossigenatore. Il lato gas del de-ossigenatore è collegato a due flussimetri, di cui uno è collegato alla bombola dell'azoto e l'altro all'aria compressa. La vena safena è sostituita da un tubo in silicone. La camera di misura è posta in uscita della camera avventiziale.

Il circuito ossigenante è composto da tubi in silicone, mentre quello de-ossigenante da tubi Tygon con bassa permeabilità all'azoto e dal de-ossigenatore. La camera di misura è posta in uscita della camera avventiziale per misurare il valore di  $pO_2$  con il quale si riesce a condizionare il lato avventiziale nelle reali condizioni di utilizzo del sistema. Tale caratterizzazione viene eseguita utilizzando nel lato gas del de-ossigenatore diverse miscele, ottenute combinando portate di azoto e aria in percentuali differenti.

Per eseguire la prova i due circuiti, ossigenante e de-ossigenante, vengono riempiti con acqua demineralizzata e viene fatto circolare il fluido con una portata pari a 5 ml/min in entrambi i circuiti. Quindi si aziona il flussimetro dell'aria collegato al de-ossigenatore fino a quando non si raggiunge una  $pO_2$  atmosferica. A quel punto, regolando con due flussimetri le portate di aria e azoto, viene impostata la miscela di gas nel de-ossigenatore e si aspetta che venga raggiunto il valore di regime di  $pO_2$ , secondo i criteri riportati nel paragrafo 3.2.5. Una volta raggiunto il regime viene impostata la nuova miscela e di nuovo si aspetta l'esaurimento del transitorio. Questo procedimento è ripetuto con tutte le miscele di gas che si desidera valutare, nella sequenza e con le composizioni indicate in Tabella 2:

*Tabella 2: Tabella riassuntiva della sequenza e della composizione delle miscele utilizzate nel lato gas del de-ossigenatore*

# MISCELA	Q_azoto (L/min)	Q_azoto (% miscela)	Q_aria (L/min)	Q_aria (% miscela)	Saturazione O <sub>2</sub> (%)
1	0.8	100	0	0	0
2	0.6	75	0.2	25	5.25
3	0.4	50	0.4	50	10.5
4	0.2	25	0.6	75	15.75
5	0	0	0.8	100	21

### 3.3 MODELLO ANALITICO E ANDAMENTO DELLA CONCENTRAZIONE DI OSSIGENO NEL TEMPO

La necessità di spiegare come i vari elementi del circuito influenzino l'andamento dei valori della  $pO_2$  nel tempo, ha portato allo sviluppo, durante il lavoro di caratterizzazione del modulo de-ossigenante, di un modello analitico. In particolare l'analisi dei risultati ottenuti dalle prove con ricircolo del mezzo descritte nel paragrafo 3.2.6 ha evidenziato un andamento nel tempo della concentrazione di ossigeno nel mezzo avventiziale caratterizzato dalla presenza di due diverse costanti di tempo. Il modello sviluppato ha permesso di attribuire questo comportamento alla presenza di due compartimenti, quello avventiziale e quello luminale, all'interno dei quali il mezzo si condiziona con due dinamiche distinte, ma influenzate reciprocamente per la presenza di un elemento permeabile all'ossigeno situato all'interfaccia tra i due, cioè la vena.

Lo sviluppo del modello è stato accompagnato da esperimenti specifici pianificati per verificare le previsioni del modello. Nel paragrafo seguente verranno presentati i vari passaggi che sono stati necessari per giungere all'ultima formulazione, ritenuta la più rappresentativa del comportamento reale del sistema.

#### 3.3.1 DESCRIZIONE DEL MODELLO

La modellizzazione del sistema di coltura con l'analogia elettrica permette di ottenere l'espressione analitica dell'andamento della concentrazione di ossigeno nel tempo.

È possibile utilizzare questa analogia elettrica ipotizzando che lo scambio di ossigeno lungo gli elementi permeabili all'ossigeno sia lineare. Questi elementi permeabili all'ossigeno vengono modellizzati come resistenze alla diffusione, corrette però con un fattore di correzione che permette di tenere conto degli aspetti convettivi dovuti alla presenza di un fluido che vi scorre all'interno.

Le resistenze alla diffusione sono calcolate come:

$$R_{diff} = \frac{1}{A \cdot U} \quad (1)$$

dove A è l'area di scambio totale di ogni elemento calcolata moltiplicando la circonferenza media logaritmica del condotto per la lunghezza e U è il coefficiente globale di scambio di massa. Tale coefficiente è costituito dall'inverso della somma delle resistenze che l'ossigeno incontra quando diffonde dall'interno verso l'esterno del tubo:

$$U = \frac{1}{R_{int} + R_{tubo} + R_{ext}} \quad (2)$$

Le tre resistenze sono cioè la resistenza convettiva data dal mezzo che scorre all'interno del tubo ( $R_{int}$ ), la resistenza diffusiva data dalla parete del tubo ( $R_{tubo}$ ) e la resistenza convettiva data dal mezzo, fluido o gas, che si trova all'esterno del tubo ( $R_{ext}$ ). Esse sono calcolate a partire dalle proprietà geometriche degli elementi<sup>1</sup>, dalla permeabilità all'ossigeno dei materiali che li compongono, dal tipo di mezzo nel quale l'ossigeno diffonde, dalla solubilità e dalla proprietà fluidodinamiche, sulla base del modello proposto da Orr e colleghi [64]. Nel dettaglio, per calcolare i valori delle resistenze diffusive ( $R_{diff\_oxy}$  per quanto riguarda i tubi del circuito ossigenante,  $R_{vena}$  per l'elemento in silicone situato nella camera interna, composto a sua volta da due tubi, uno per mimare le proprietà della vena e l'altro per collegare i connettori, e  $R_{diff\_deoxy}$  per quanto riguarda i tubi del circuito de-ossigenante) sono stati utilizzati i parametri e le formule indicate in Tabella 3:

Tabella 3: Formule e parametri per calcolare le resistenze diffusive, secondo la trattazione di Orr [64]<sup>2</sup>:

Resistenza	$R_{int}$	$R_{tubo}$	$R_{ext}$	Parametri
$R_{diff\_oxy} = \frac{1}{A \cdot U}$ $R_{diff\_deoxy} = \frac{1}{A \cdot U}$ $A = W \cdot L$ $U = \frac{1}{R_{int} + R_{tubo} + R_{ext}}$	$R_{int} = \frac{H}{k_i}$ $k_i = \frac{Shi \cdot D_m}{d_i}$	$R_{tubo} = \frac{t_m \cdot W_i}{\rho \cdot P_m \cdot W}$ $W_i = \pi \cdot d_i$ $W = \frac{\pi \cdot (d_e - d_i)}{\ln \frac{d_e}{d_i}}$	$R_{ext} = \frac{R \cdot T \cdot W_i}{k_e \cdot W_e}$ $W_i = \pi \cdot d_i$ $W_e = \pi \cdot d_e$ $k_e = \frac{She \cdot D_a}{d_e}$	$H = 7.40 \cdot 10^{-8} \frac{mmHg \cdot cm^3}{mol \cdot K}$ $Shi = 3.66$ $She = 0.43$ $D_m = 2.18 \cdot 10^{-5} \frac{cm^2}{s}$ $D_a = 0.21 \frac{cm^2}{s}$ $d_i = 0.08 \text{ cm}$ $d_e = 0.24 \text{ cm}$ $t_m = 0.08 \text{ cm}$ $\rho = 4.46 \cdot 10^{-5} \frac{mol}{cm^3}$ $P_m = 7.96 \cdot 10^{-9} \frac{cm^2}{s \cdot mmHg}$ $R = 62365.6 \frac{cm^3 \cdot mmHg}{mol \cdot K}$ $T = 310 \text{ K}$ $L = 100 \text{ cm}$

<sup>1</sup>Per la presente trattazione si fa riferimento alla versione del de-ossigenatore L100, ma le stesse considerazioni valgono anche per la versione precedente (cambiano solo le proprietà geometriche in quanto è diversa la lunghezza dei tubi).

<sup>2</sup> Dove non sono specificati formule e parametri, si deve fare riferimento alla riga precedente.

$R_{vena}$ $= \frac{R_{vena1} \cdot R_{vena2}}{R_{vena1} + R_{vena2}}$				
$R_{vena1} = \frac{1}{A \cdot U}$ $A = W \cdot L$ $U = \frac{1}{R_{int} + R_{tubo} + R_{ext}}$			$R_{ext} = \frac{H}{k_e}$ $k_e = \frac{She \cdot D_a}{d_e}$ $She = 0.43 + 0.53 \cdot \sqrt{2000} \cdot S_h^{0.31}$ $S_h = \frac{\mu}{\rho \cdot D_m}$	$d_i = 0.16 \text{ cm}$ $d_e = 0.32 \text{ cm}$ $t_m = 0.08 \text{ cm}$ $L = 5 \text{ cm}$
$R_{vena2} = \frac{1}{A \cdot U}$ $A = W \cdot L$ $U = \frac{1}{R_{int} + R_{tubo} + R_{ext}}$			$R_{ext} = \frac{H}{k_e}$ $k_e = \frac{She \cdot D_a}{d_e}$ $She = 0.43 + 0.53 \cdot \sqrt{2000} \cdot S_h^{0.31}$ $S_h = \frac{\mu}{\rho \cdot D_m}$	$d_i = 0.1 \text{ cm}$ $d_e = 0.26 \text{ cm}$ $t_m = 0.08 \text{ cm}$ $L = 3.8 \text{ cm}$

In tabella  $k_i$  e  $k_e$  rappresentano il coefficiente convettivo di scambio interno ed esterno,  $Sh_i$  e  $Sh_e$  numero di Sherwood interno ed esterno,  $D_m$  e  $D_a$  coefficiente di diffusione dell'ossigeno in acqua e in aria,  $d_i$ ,  $d_e$   $L$  e  $t_m$  sono diametro interno, esterno, lunghezza e lo spessore del tubo,  $W_i$ ,  $W_e$  e  $W$  sono la circonferenza interna, esterna e media logaritmica del tubo,  $R$  costante dei gas perfetti,  $T$  temperatura,  $H$  coefficiente di Henry,  $\rho$  la densità dell'acqua. Per una completa trattazione si rimanda all'articolo di Orr e colleghi [64].

Il fattore di correzione, che viene sommato ai valori delle resistenze diffusive per ottenere le resistenze equivalenti utilizzate nella risoluzione del modello, si ricava a partire dall'espressione dello scambio di ossigeno che avviene lungo tali elementi, sotto l'ipotesi di linearità:

$$V' = \frac{P_{in} + P_{out}}{2 \cdot R_{diff}} = \frac{P_{in} - \Delta P}{2} \cdot \frac{1}{R_{diff}} \quad (3)$$

$$\Delta P = P_{in} - P_{out} = \frac{V'}{\alpha \cdot Q} \quad (4)$$

dove  $V'$  indica lo scambio lungo l'elemento,  $P_{in}$  e  $P_{out}$  sono le pressioni parziali di ossigeno rispettivamente all'ingresso e all'uscita,  $Q$  è la portata con cui scorre il fluido e  $\alpha$  il coefficiente di solubilità dell'ossigeno all'interno del mezzo utilizzato, in questo caso pari a  $1.35 \cdot 10^{-9}$  mol/ml/mmHg.

Si ottiene quindi l'espressione della resistenza equivalente:

$$R = R_{diff} + \frac{1}{2 \cdot \alpha \cdot Q} \quad (5)$$

All'interno del circuito sono modellizzati come resistenze equivalenti i tubi ossigenanti in silicone ( $R_{oxy}$ ) e i tubi in silicone contenuti all'interno del de-ossigenatore ( $R_{deoxy}$ ).

Per quanto riguarda gli altri elementi, la pressione atmosferica viene modellizzata come un generatore ideale di tensione e i due compartimenti avventiziale e luminale come due elementi capacitivi composti da volumi di fluido che si "caricano" o si "scaricano" di moli di ossigeno nel tempo quando aumenta o diminuisce la concentrazione di ossigeno nel mezzo. I valori di capacità sono calcolati moltiplicando il volume di mezzo contenuto all'interno del compartimento per il coefficiente di solubilità dell'ossigeno nel mezzo:

$$C = V \cdot \alpha \quad (6)$$

I volumi di fluido dei due compartimenti, stimati sperimentalmente sono pari a:

$$V_{luminale} = 30.72 \text{ ml}$$

$$V_{avventiziale} = 12.75 \text{ ml}$$

I valori di resistenze e capacità finali risultano:

$$R_{oxy} = 2.34 \cdot 10^{10} \text{ mmHg} \cdot \text{s/mol},$$

$$R_{vena} = 2.56 \cdot 10^{11} \text{ mmHg} \cdot \text{s/mol},$$

$$R_{deoxy} = 2.34 \cdot 10^{10} \text{ mmHg} \cdot \text{s/mol},$$

$$C_{luminale} = 4.13 \cdot 10^{-8} \text{ mol/mmHg},$$

$$C_{avventiziale} = 1.72 \cdot 10^{-8} \text{ mol/mmHg}.$$

Nella figura seguente la schematizzazione del circuito elettrico con il quale è stato modellizzato il sistema (Fig. 3.11): il collegamento tra i due compartimenti avventiziale e luminale è l'elemento permeabile all'ossigeno situato all'interfaccia tra i due, cioè il tubo in silicone che simula la presenza della vena.

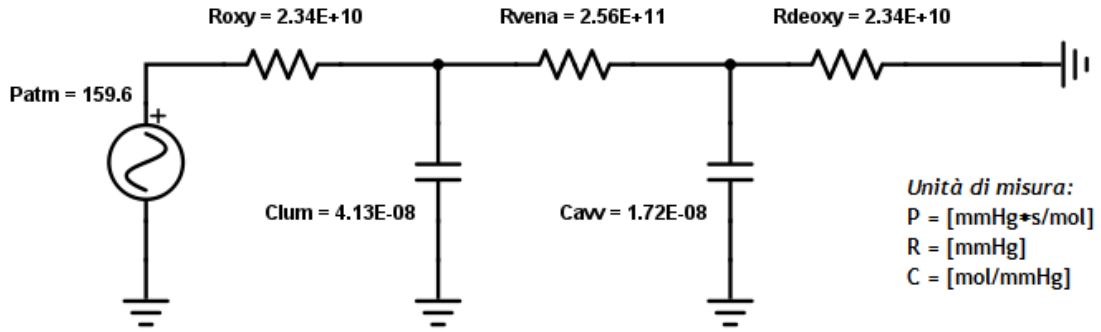


Fig. 3.11: Schematizzazione del circuito elettrico utilizzato per modellizzare il sistema di coltura bi compartmentale. La pressione atmosferica è modellizzata con un generatore ideale di tensione ( $P_{atm}$ ), le resistenze equivalenti modellizzano gli elementi permeabili all'ossigeno ( $R_{oxy}$  per i tubi in silicone nel circuito ossigenante,  $R_{vena}$  per il tubo in silicone utilizzato per mimare le proprietà della vena negli esperimenti svolti presso il  $\mu BsLab$  e  $R_{deoxy}$  per i tubi in silicone all'interno del de-ossigenatore) e i condensatori modellizzano i due compartimenti che si "caricano" o si "scaricano" di moli di ossigeno (luminale e avventiziale).

La soluzione analitica di questo circuito del secondo ordine, caratterizzato quindi da due costanti di tempo, fornisce l'andamento nel tempo della pressione parziale di ossigeno nei due compartimenti. I passaggi svolti per ricavare l'espressione analitica dell'andamento di pressione parziale di ossigeno nel tempo sono riportati nell'Appendice A. L'espressione della pressione parziale di ossigeno nel compartimento avventiziale è:

$$p_{avv}(t) = k_1 \cdot e^{\lambda_1 t} + k_2 \cdot e^{\lambda_2 t} + p_{atm} \cdot \frac{R_{deoxy}}{R_{deoxy} + R_{vena} + R_{oxy}} \quad (7)$$

Per le espressioni dei parametri  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $\lambda_1$  e  $\lambda_2$  si rimanda all'Appendice A nella sezione dedicata alla prima versione del modello.

A partire dalla soluzione analitica si ricavano le costanti di tempo del circuito:

$$\tau_1 = \frac{1}{\lambda_1},$$

$$\tau_2 = \frac{1}{\lambda_2}.$$

### 3.3.2 MODELLO ACCURATO

Le previsioni del modello sono state confrontate con i dati sperimentali ottenuti dalla misura dell'andamento della concentrazione di O<sub>2</sub> nel compartimento avventiziale durante le prove con ricircolo del mezzo e il lato gas del de-ossigenatore alimentato con azoto puro descritte nel paragrafo 3.2.6.

Tramite il software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software) è stato eseguito un algoritmo di *fitting* dei dati sperimentali con una funzione esponenziale con decadimento a due fasi. Sono quindi stati estrapolati i valori delle due costanti di tempo sperimentali e il valore a regime della concentrazione di ossigeno avventiziale.

Il confronto tra le costanti di tempo predette dal modello e quelle sperimentali ha rivelato una netta discordanza, che ha portato a riconsiderare il modello proposto. Infatti all'interno dei due compartimenti, parzialmente riempiti di fluido, sono presenti dei volumi di aria che non possono essere trascurati in quanto anch'essi si "caricano" e si "scaricano" di moli di ossigeno durante il funzionamento del sistema. Due nuove capacità, C'<sub>lum</sub> e C'<sub>avv</sub>, sono state perciò poste in parallelo rispettivamente a C<sub>lum</sub> e C<sub>avv</sub> e il loro valore è stato calcolato come:

$$C' = V_{aria} \cdot \frac{1}{R \cdot T} \quad (8)$$

Il volume d'aria residuo presente in ogni camera viene moltiplicato per l'inverso del prodotto tra la costante dei gas e la temperatura. Questo prodotto è ricavato a partire dall'equazione di stato dei gas perfetti e rappresenta la concentrazione molare di ossigeno in un determinato volume di aria a una determinata pressione.

I volumi di aria sono stati valutati sperimentalmente:

$$V_{aria_{luminale}} = 5 \text{ ml}$$

$$V_{aria_{avventiziale}} = 0.5 \text{ ml}$$

Gli altri parametri considerati sono R = 62363.7 ml· mmHg/mol/K costante dei gas e T = 310.15 K.

Le due nuove capacità calcolate risultano:

$$C'_{luminale} = 2.59 \cdot 10^{-7} \text{ mol/mmHg,}$$

$$C'_{avventiziale} = 2.59 \cdot 10^{-8} \text{ mol/mmHg.}$$

Anche il confronto tra i valori di concentrazione di ossigeno a regime ha rivelato una netta differenza tra dati sperimentali e previsioni analitiche. Non sono stati infatti tenuti in considerazione il tubo collegato al filtro HEPA che mette in relazione la camera luminale

con l'atmosfera e il tubo di collegamento tra camera avventiziale e camera luminale descritto al paragrafo 3.2.1, che d'ora in avanti verrà definito tubo del "troppo pieno". Il tubo del filtro HEPA è una fonte continua di ossigenazione del compartimento luminale perché lo collega direttamente all'atmosfera, mentre il "troppo pieno" rappresenta un secondo collegamento tra i due compartimenti. Entrambi sono stati modellizzati come resistenze, calcolate considerando la lunghezza e l'area del tubo, la costante dei gas, la temperatura e il coefficiente di diffusione dell'ossigeno in aria secondo la formula:

$$R = \frac{L \cdot R \cdot T}{A \cdot D} \quad (9)$$

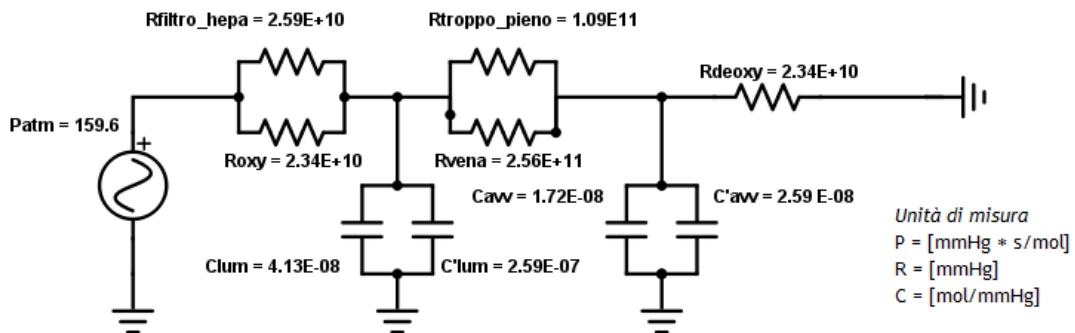
con L lunghezza del tubo (pari a 7.40 cm per il tubo del filtro HEPA e pari a 20 cm per il tubo del "troppo pieno"), A sezione del tubo (pari a 0.03 cm<sup>2</sup> per il filtro HEPA e 0.02 cm<sup>2</sup> per il "troppo pieno") e D coefficiente di diffusione dell'ossigeno in aria pari a 0.176 cm<sup>2</sup>/s.

Le due nuove resistenze calcolate sono R<sub>filtro\_HEPA</sub> posta in parallelo a R<sub>oxy</sub>, e R<sub>troppo\_pieno</sub>, in parallelo a R<sub>vena</sub>, risultano:

$$R_{\text{filtro\_HEPA}} = 2.59 \cdot 10^{10} \text{ mmHg} \cdot \text{s/mol},$$

$$R_{\text{troppo\_pieno}} = 1.09 \cdot 10^{11} \text{ mmHg} \cdot \text{s/mol},$$

Nella figura seguente è riportata la nuova schematizzazione del circuito (Fig. 3.12):



La soluzione analitica del circuito fornisce l'andamento nel tempo della pressione parziale di ossigeno nei due compartimenti. I passaggi svolti per ricavare l'espressione analitica sono riportati nell'Appendice A. L'espressione dell'andamento nel tempo della pressione parziale di ossigeno avventiziale è:

$$p_{avv}(t) = l_1 \cdot e^{\lambda_1 t} + l_2 \cdot e^{\lambda_2 t} + p_{atm} \cdot \frac{R_{deoxy}}{R_{deoxy} + R_{tv} + R_{ho}} \quad (10)$$

Le resistenze  $R_{tv}$  e  $R_{ho}$  sono il parallelo rispettivamente di  $R_{troppo\_pieno}$  e  $R_{vena}$  e di  $R_{filtro\_hepa}$  e  $R_{oxy}$ . Per le espressioni dei parametri  $l_1$ ,  $l_2$ ,  $\lambda_1$  e  $\lambda_2$  si rimanda all'Appendice A nella

*Fig. 3.12: Schematizzazione del modello accurato. Rispetto alla versione precedente sono state aggiunte in parallelo alle capacità luminale e avventiziale le due capacità  $C'$  dovute ai volumi residui di aria all'interno dei due compartimenti, la resistenza del tubo collegato al filtro HEPA ( $R_{filtro\_HEPA}$ ) in parallelo alla resistenza dei tubi ossigenanti e la resistenza del troppo pieno ( $R_{troppo\_pieno}$ ) in parallelo alla resistenza del tubo utilizzato al posto della vena.*

sezione dedicata alla versione accurata del modello.

È stata pianificata un'approfondita campagna sperimentale per verificare le previsioni del modello accurato: sono state eseguite prove con ricircolo del mezzo e solo azoto nel lato gas del de-ossigenatore in quattro configurazioni diverse, una configurazione di riferimento (cioè la configurazione reale di esercizio del sistema di coltura) e tre configurazioni in ognuna delle quali è stato eliminato uno alla volta il contributo delle resistenze che mettono in collegamento il compartimento avventiziale con le sorgenti di ossigeno. Sono stati esclusi singolarmente il tubo del “troppo pieno”, quello del filtro HEPA e il tubo in silicone utilizzato al posto della vena. Per eliminare il contributo del “troppo pieno” e del tubo dell'HEPA sono state utilizzate delle *clamp* vascolari (Fig. 3.13 a), per eliminare il contributo del tubo in silicone, esso è stato sostituito da tubi in PVC e cannule metalliche impermeabili all'ossigeno (Fig. 3.13 b).



Fig. 3.13: Setup sperimentale messo a punto per verificare le previsioni del modello (a) Utilizzo di clamp vascolari per eliminare sperimentalmente il contributo dei tubi del “troppo pieno” e del filtro HEPA; (b) sostituzione del silicone presente all’interno della camera avventiziale con cannule metalliche e tubi in PVC per estromettere ogni collegamento tra i due compartimenti ed escludere quindi tutte le possibili sorgenti di ossigenazione della camera avventiziale .

Le quattro configurazioni messe in atto sono riassunte in Tabella 4.

Tabella 4: Configurazioni per verificare sperimentalmente le previsioni del modello<sup>3</sup>

configurazione	Tube troppo pieno	Tube Filtro HEPA	Tube Vena
RIFERIMENTO	✓	✓	✓
1	✗	✓	✓
2	✗	✗	✓
3	✗	✗	✗

L’esclusione di un componente dal sistema è stata modellizzata aumentando di due ordini di grandezza il suo valore di resistenza del modello elettrico.

<sup>3</sup> Il simbolo ✓ indica che l’elemento indicato è in funzione nella configurazione in analisi, il simbolo ✗ indica che il componente viene escluso nella configurazione.

Tramite il software Graphpad Prism 5 (GraphPad Software) è stato eseguito un *fit* dei dati con esponenziale con decadimento a due fasi della concentrazione di ossigeno avventiziale misurata sperimentalmente in ognuna delle quattro configurazioni. I valori delle costanti di tempo e di concentrazione di ossigeno a regime sperimentali e analitici sono stati quindi confrontati con i dati sperimentali per verificare se il modello accurato fosse sufficientemente rappresentativo del comportamento reale.

### 3.3.3 MODELLO FINALE

Il confronto tra le costanti di tempo predette dal modello accurato e quelle sperimentali ha evidenziato una buona corrispondenza.

Al contrario i dati sperimentali della concentrazione di ossigeno avventiziale a regime ottenuti nella configurazione 3 (esclusione del tubo del “troppo pieno”, del tubo del filtro HEPA e della vena) hanno suggerito la presenza di un'altra fonte di ossigenazione che impedisce al lato avventiziale di raggiungere una pressione parziale di ossigeno prossima allo zero.

Questo ulteriore collegamento tra il compartimento avventiziale e atmosfera è stato attribuito a tutti gli elementi presenti nel circuito de-ossigenante, composti da materiali che non sono completamente impermeabili all'ossigeno. In particolare si tratta dei dieci connettori *luer* in polipropilene (Nordson Corporation, OH, USA) necessari per assemblare il circuito, della camera di misura in PMMA, del tubo Pharmed BPT (Saint Gobain Saint Gobain Performance Plasting Corporation, Francia) utilizzato come sottopompa e dei tubi Tygon che connettono la camera di coltura al modulo de-ossigenante. Questi elementi sono stati modellizzati come resistenze alla diffusione e il loro valore è stato calcolato basandosi sulla trattazione di Orr [64], come spiegato al paragrafo 3.3.1. I parametri e le formule necessarie per calcolare le resistenze diffusive di questi elementi ( $R_{diff\_luer}$ ,  $R_{diff\_camera}$ ,  $R_{diff\_Pharmed}$ ,  $R_{diff\_Tygon}$ ) sono riportati in Tabella 5.

Tabella 5: Formule e parametri per calcolare le resistenze diffusive, secondo la trattazione di Orr [64]<sup>4</sup>

$R$	$R_{int}$	$R_{tubo}$	$R_{ext}$	Parametri
$R_{diff\_1luer} = \frac{1}{A \cdot U}$ $A = W \cdot L$ $U = \frac{1}{R_{int} + R_{tubo} + R_{ext}}$ $R_{diff\_luer} = \left( \frac{5}{R_{diff\_1luer}} \right)^{-1}$	$R_{int} = \frac{H}{k_i}$ $k_i = \frac{Sh_i \cdot D_m}{d_i}$	$R_{tubo} = \frac{t_m \cdot W_i}{\rho \cdot P_m \cdot W}$ $W_i = \pi \cdot d_i$ $W = \frac{\pi \cdot (d_e - d_i)}{\ln \frac{d_e}{d_i}}$	$R_{ext} = \frac{R \cdot T \cdot W_i}{k_e \cdot W_e}$ $W_i = \pi \cdot d_i$ $W_e = \pi \cdot d_e$ $k_e = \frac{She \cdot D_a}{d_e}$	$H = 7.40 \cdot 10^{-8} \frac{mmHg \cdot cm^3}{mol \cdot K}$ $Sh_i = 3.66$ $She = 0.43$ $D_m = 2.18 \cdot 10^{-5} \frac{cm^2}{s}$ $D_a = 0.21 \frac{cm^2}{s}$ $d_i = 0.31 \text{ cm}$ $d_e = 0.4 \text{ cm}$ $t_m = 0.045 \text{ cm}$ $\rho = 4.46 \cdot 10^{-5} \frac{mol}{cm^3}$ $P_m = 1.52 \cdot 10^{-11} \frac{cm^2}{s \cdot mmHg}$ $R = 62365.6 \frac{cm^3 \cdot mmHg}{mol \cdot K}$ $T = 310 \text{ K}$ $L = 1.392 \text{ cm}$
$R_{diff\_camera} = \frac{1}{A \cdot U}$ $A = W \cdot L$ $U = \frac{1}{R_{int} + R_{tubo} + R_{ext}}$				$d_i = 0.25 \text{ cm}$ $d_e = 1.5 \text{ cm}$ $t_m = 0.625 \text{ cm}$ $P_m = 1.33 \cdot 10^{-12} \frac{cm^2}{s \cdot mmHg}$ $L = 0.9 \text{ cm}$
$R_{diff\_Pharmed} = \frac{1}{A \cdot U}$ $A = W \cdot L$ $U = \frac{1}{R_{int} + R_{tubo} + R_{ext}}$				$d_i = 0.24 \text{ cm}$ $d_e = 0.48 \text{ cm}$ $t_m = 0.12 \text{ cm}$ $P_m = 2 \cdot 10^{-10} \frac{cm^2}{s \cdot mmHg}$ $L = 18 \text{ cm}$

<sup>4</sup> Dove non sono specificati formule e parametri, fare riferimento alla riga precedente.

$R_{diff\_Tygon} = \frac{1}{A \cdot U}$ $A = W \cdot L$ $U = \frac{1}{R_{int} + R_{tubo} + R_{ext}}$				$d_i = 0.16 \text{ cm}$ $d_e = 0.48 \text{ cm}$ $t_m = 0.16 \text{ cm}$ $P_m = 6 \cdot 10^{-11} \frac{\text{cm}^2}{\text{s mmHg}}$ $L = 120 \text{ cm}$
--	--	--	--	---

I valori risultanti sono:

$$R_{luer} = 7.91 \cdot 10^{12} \text{ mmHg} \cdot \text{s/mol}$$

$$R_{camera} = 1.91 \cdot 10^{15} \text{ mmHg} \cdot \text{s/mol}$$

$$R_{Pharmed} = 2.53 \cdot 10^{12} \text{ mmHg} \cdot \text{s/mol}$$

$$R_{Tygon} = 3.13 \cdot 10^{11} \text{ mmHg} \cdot \text{s/mol}.$$

Queste resistenze sono collegate in parallelo e il valore della resistenza equivalente corretto con il fattore che tiene conto degli aspetti convettivi risulta:

$$R_{altro} = 2.73 \cdot 10^{11} \text{ mmHg} \cdot \text{s/mol}.$$

La versione finale dell'analogo elettrico del circuito è riportata in Fig. 3.13.

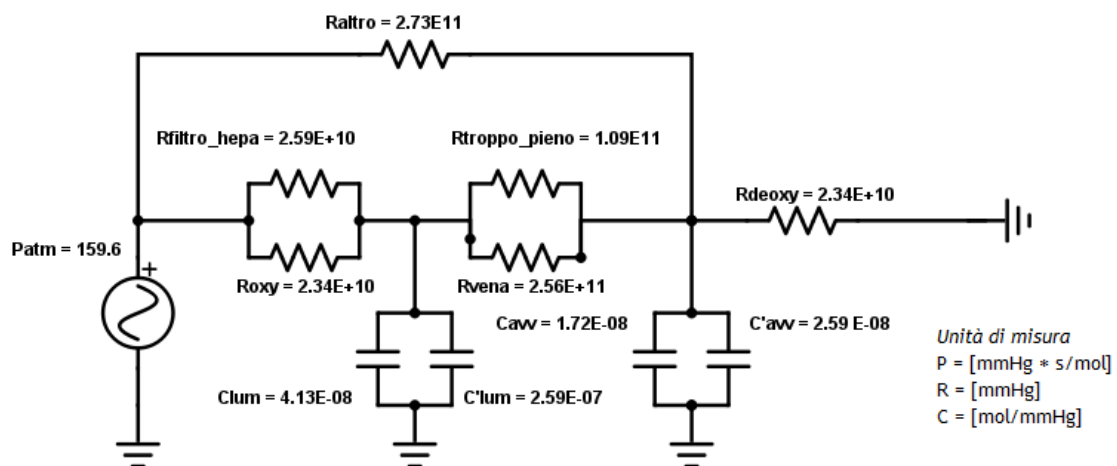


Fig. 3.14: Schematizzazione del modello finale. Il nuovo elemento resistivo " $R_{altro}$ " è dato dal parallelo di tutte le resistenze che rappresentano gli elementi distribuiti lungo il circuito de-ossigenante composti da materiali la cui permeabilità all'ossigeno, seppure bassa, non è totalmente nulla.

La soluzione analitica del circuito per quanto riguarda l'andamento della pressione parziale di ossigeno nel lato avventiziale, illustrata nel dettaglio in Appendice A, è:

$$pO_{2_{avv}}(t) = j_1 \cdot e^{\lambda_1 t} + j_2 \cdot e^{\lambda_2 t} + p_{atm} \cdot \frac{R_{deoxy}}{R_{deoxy} + \frac{(R_{ho} + R_{tv}) \cdot R_{altro}}{(R_{ho} + R_{tv}) + R_{altro}}} \quad (11)$$

Per le espressioni dei parametri  $j_1$ ,  $j_2$ ,  $\lambda_1$  e  $\lambda_2$  si rimanda all'Appendice A nella sezione dedicata alla versione finale del modello

Le previsioni del modello in termini di costanti di tempo e concentrazione di ossigeno a regime sono state confrontate con quelle sperimentali ottenute nelle quattro configurazioni come descritto al paragrafo 3.2.2.

Infine, per completezza della trattazione, sono stati ripetuti gli esperimenti nelle quattro configurazioni posizionando la camera di misura in uscita dal tubo in silicone che sostituisce la vena e misurando così l'andamento della concentrazione di ossigeno nel compartimento luminale. Il confronto grafico tra questi dati sperimentali e le previsioni del modello finale ha confermato la buona approssimazione della realtà realizzata dal modello finale.

### 3.4 CAMPAGNA SPERIMENTALE CON SEGMENTI DI VENA SAFENA

Ultimata la caratterizzazione del modulo de-ossigenante, è stata intrapresa una campagna sperimentale per condizionare *ex vivo* segmenti di vena safena, con l'obiettivo di verificare gli effetti indotti sul tessuto dal gradiente di ossigeno che si genera tra lato avventiziale e lato luminale in seguito a trasposizione del graft venoso in posizione coronarica e studiare se diversi livelli di ipossia nella regione avventiziale, cioè moderata o severa, producono conseguenze differenti sul tessuto.

In seguito al prelievo chirurgico della vena safena, i segmenti di vena che non vengono impiegati come graft nell'intervento di bypass aorto coronarico (CABG) vengono destinati alla ricerca, previa autorizzazione di un Comitato Etico e approvazione con consenso informato del paziente. Il chirurgo prepara i segmenti di vena rimuovendo il tessuto circostante il vaso, occludendo i vasi collaterali, mediante sutura o clip metalliche, e lo incannula. Il campione così preparato viene consegnato al personale del LIT all'interno di un contenitore sigillato riempito con terreno di coltura. Per essere conservato, il segmento venoso viene immerso in un terreno di coltura addizionato con 1% di penicillina-streptomina e quindi mantenuto in frigorifero a 4°C fino al momento dell'utilizzo, nel sistema di coltura *ex vivo*, solitamente entro il giorno successivo all'espianto.

Nel presente capitolo verranno mostrate le procedure, messe in opera presso il LIT del Centro Cardiologico Monzino, per assemblare il sistema sotto cappa biologica e verranno descritti i setup di prova allestiti per condizionare i campioni di vena safena umana all'interno di un incubatore per colture cellulari, utilizzando il sistema di coltura con il de-ossigenatore L40 oppure L100.

Successivamente si presenteranno le analisi biologiche svolte sui campioni, in particolare le colorazioni istologiche (Ematossilina ed Eosina e tricromica di Masson), le analisi di immunofluorescenza, svolte marcando con anticorpi specifici le SMC e le EC, e le analisi svolte con tecniche di immunoistochimica per valutare la proliferazione cellulare tramite il marcatore Ki67.

#### 3.4.1. ASSEMBLAGGIO E PREPARAZIONE DEL SISTEMA

L'assemblaggio del sistema deve avvenire in condizioni di sterilità; i componenti del sistema (circuiti ossigenante e de-ossigenante, camera bicompartimentale, camera di misura e de-ossigenatore) sono stati quindi precedentemente sterilizzati e l'assemblaggio

viene effettuato sotto cappa a flusso laminare in conformità con le norme di buona pratica di laboratorio.

La prima operazione che deve essere svolta è il prelievo di un segmento di lunghezza pari a 5 mm dal segmento venoso, che costituisce, per ogni esperimento, il campione di controllo al tempo zero e che viene immediatamente fissato in paraformaldeide al 4% per le successive analisi istologiche, in immunofluorescenza e in immunohistochimica.

La fase successiva prevede il posizionamento del segmento di vena safena sui connettori della camera bicompartimentale, ai quali la vena viene ancorata mediante *vessel loop*.

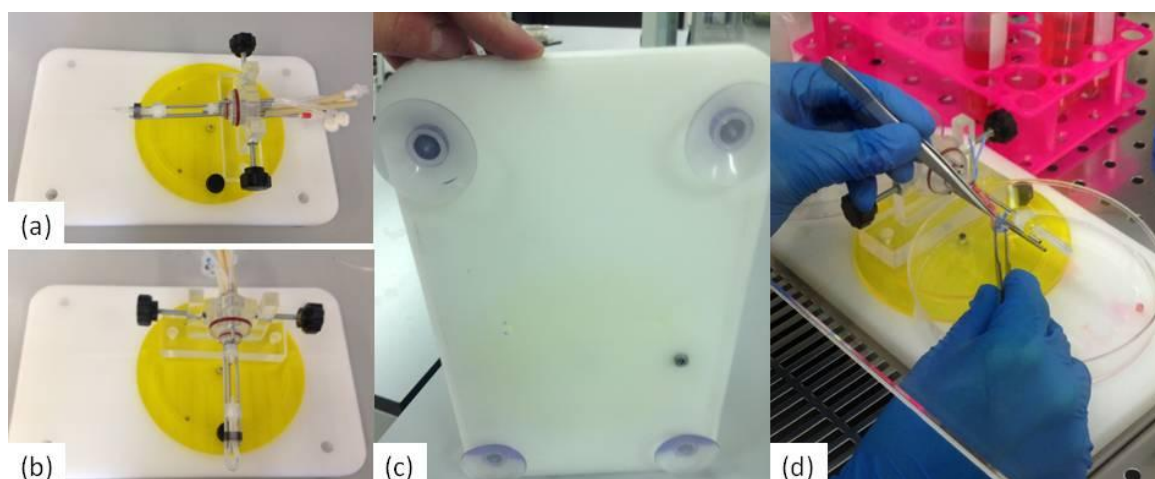
Questa operazione risulta critica per l'operatore a causa della scarsa rigidità del tessuto venoso, difficile da mantenere in posizione. Per facilitare questa manovra, durante il presente lavoro di tesi, è stato progettato un supporto mediante il software CAD per la modellazione solida parametrica Creo Parametric 3.0 (PTC).

Il supporto (Fig. 3.15) consente di bloccare la camera bicompartimentale, senza compromettere la sterilità, in modo tale che l'operatore abbia a disposizione entrambe le mani per posizionare la vena sui connettori e procedere con l'ancoraggio tramite *vessel loop* (Fig. 3.15 d). L'*housing* della camera, infatti, viene alloggiato all'interno di un supporto in PMMA di forma e dimensioni compatibili con quelle dell'*housing*. Il supporto è dotato di due fori filettati, utilizzati per avvitare una coppia di viti di serraggio con manopola che, esercitando una tenuta a morsa sull'*housing* della camera, mantiene la camera saldamente in posizione orizzontale (Fig. 3.15 a e b).

La stabilità del supporto è garantita dall'utilizzo di ventose (Essentra Components, UK), (Fig. 3.15 c) che, facendo presa sul piano della cappa, permettono all'operatore di esercitare la forza necessaria per chiudere i *vessel loop*.

Inoltre il sistema di bloccaggio a morsa della camera bicompartimentale è fissato su una piattaforma rotante dotata di blocco progettata in modo tale che l'operatore possa scegliere la posizione più adatta per facilitare l'ancoraggio della vena (Fig. 3.15 a e b).

La base del supporto, in POM, e la morsa, in PMMA (Plasting S.r.l., Segrate, Italia), sono stati realizzati utilizzando la fresa a controllo numerico (Roland, Modela MDX-40), mentre la piattaforma rotante è stata ricavata da due lastre in PMMA opportunamente tagliate con il laser a CO<sub>2</sub> (VersaLaser VLS 2.30).



*Fig. 3.15: Supporto realizzato per facilitare l'ancoraggio della vena ai connettori della camera bicompartimentale. (a) e (b) la camera bicompartimentale viene fissata in posizione orizzontale con una tenuta a morsa per facilitare l'ancoraggio della vena ai connettori da parte dell'operatore. La piattaforma rotante (in giallo nella foto) dotata di blocco permette di scegliere l'orientazione più comoda per eseguire questa operazione. (c) Per garantire la stabilità dell'intero supporto si è scelto di utilizzare delle ventose che, facendo presa sul piano della cappa, consentono all'operatore di esercitare la forza necessaria per chiudere i vessel loop senza che il supporto si muova. (d) Grazie a questo supporto il posizionamento e l'ancoraggio della vena sotto cappa sono facilitati perché l'operatore può disporre di entrambe le mani per posizionare la vena e fissare i vessel loop.*

Una volta posizionata la vena, gli elementi della camera bicompartimentale, dotata di camera di misura in uscita dal compartimento avventiziale, e quelli del circuito vengono collegati come descritto nel paragrafo 3.2.1 e si procede al riempimento di entrambi i moduli con terreno di coltura composto da DMEM arricchito con 10% di siero fetale bovino, 1% di L-glutammina, 1% streptomicina-penicillina.

È stato realizzato un ulteriore supporto per rendere il sistema compatto e maneggevole all'interno dell'incubatore. Il supporto, in PMMA (Plasting S.r.l., Segrate, Italia) è stato progettato con il software Creo Parametric 3.0 e realizzato con il laser a CO<sub>2</sub> VersaLaser e consente l'alloggiamento della camera di coltura bicompartimentale e del de-ossigenatore. Inoltre nella parte posteriore è presente una struttura grazie alla quale la camera di misura dell'ossigeno può essere vincolata in modo tale che l'uscita del mezzo di coltura sia rivolta verso l'alto così da evitare il ristagno di bolle al suo interno (Fig. 3.16).

Terminata la fase di assemblaggio il circuito viene posizionato all'interno di un incubatore (temperatura di 37°C, CO<sub>2</sub> 5% e umidità relativa del 95%) e collegato con gli elementi del circuito collocati all'esterno dell'incubatore (pompa peristaltica e flussimetro).

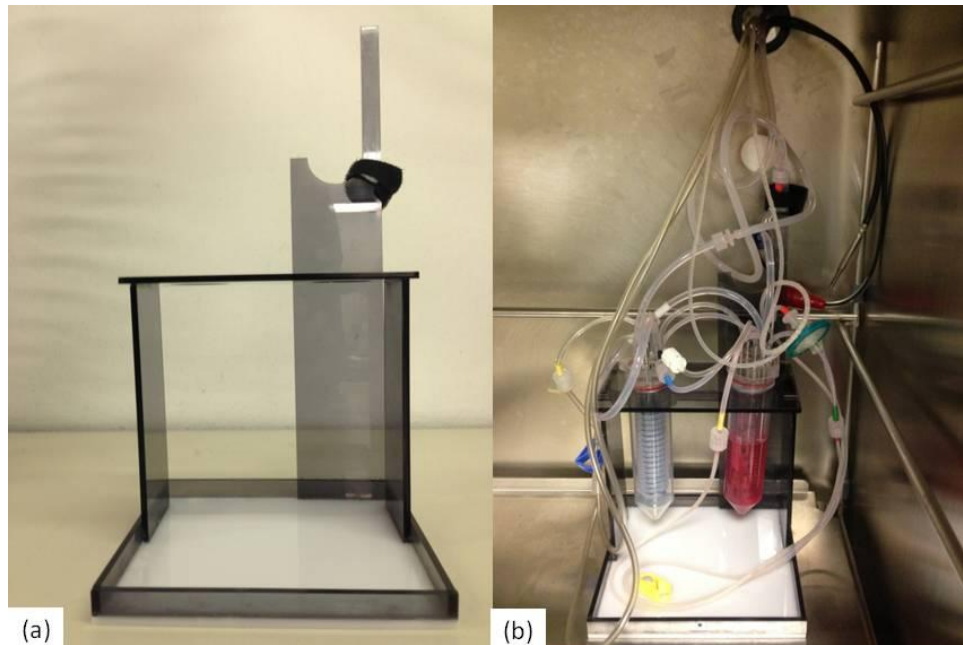


Fig. 3.16: *Supporto per ospitare l'intero sistema di coltura (a) Oltre all'alloggiamento della camera e del de-ossigenatore, il supporto è dotato di una struttura che permette di vincolare la camera di misura dell'ossigeno così che l'uscita del mezzo di coltura sia rivolta verso l'alto, per limitare il ristagno di bolle al suo interno. (b) Il sistema, posto all'interno dell'incubatore, risulta compatto e maneggevole.*

### 3.4.2. PROVE SPERIMENTALI

I segmenti di vena safena vengono condizionati all'interno del sistema di coltura *ex-vivo* per 7 giorni. Circa a metà esperimento si provvede a una parziale sostituzione del mezzo di coltura: il sistema viene trasferito sotto cappa, si prelevano circa 10 ml del mezzo di coltura avventiziale e 20 ml di quello luminale ed essi vengono sostituiti da volumi equivalenti di terreno di coltura fresco. Per il cambio del mezzo del comparto avventiziale si utilizza un mezzo di coltura fresco conservato all'interno di una camera contenente azoto così da ottenere un mezzo con un basso contenuto di ossigeno.

La campagna sperimentale è stata condotta su 9 campioni di vena safena divisi in tre gruppi, ognuno dei quali condizionato per 7 giorni in maniera diversa. Il lato luminale in tutti i campioni viene esposto a una pressione parziale di ossigeno del 21%, mentre, per

quanto riguarda il lato avventiziale, un gruppo sperimentale viene sottoposto a una pressione parziale del 21% (condizione standard), un secondo gruppo a una tensione parziale del 5% (condizione di ipossia moderata) e un terzo gruppo a una pO<sub>2</sub> pari circa a 2.5% (condizione di ipossia severa). In Tabella 6 è riassunta la suddivisione dei campioni nei tre gruppi sperimentali.

*Tabella 6: Suddivisione dei campioni nei tre gruppi sperimentali, ognuno dei quali condizionato con valori di ossigenazione diversi nel lato avventiziale.*

Gruppo	Numero di campioni	Condizioni pO <sub>2</sub>		Tipo di de-ossigenatore	Tipo di miscela
		Luminale	Avventiziale		
Standard	3	21%	21%	L40	100% N <sub>2</sub>
Ipossia moderata	2	21%	5%	L40	100% N <sub>2</sub>
	1	21%	5%	L100	90% N <sub>2</sub> , 10% aria
Ipossia severa	3	21%	2-3%	L100	100% N <sub>2</sub>

Per condizionare i campioni del gruppo standard il circuito avventiziale non è stato collegato al de-ossigenatore, ma a un tubo in silicone lungo 250 cm, cioè la lunghezza sufficiente a garantire l'ossigenazione completa [65].

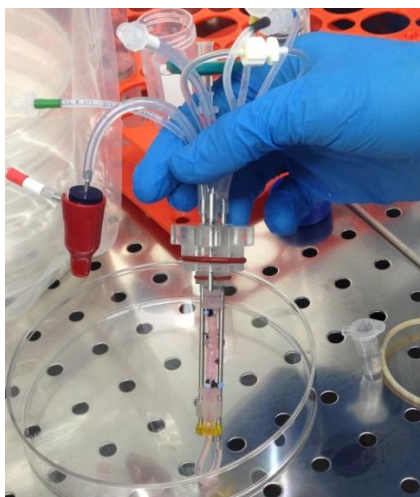
I campioni del gruppo con ipossia moderata (5%) sono stati condizionati in due modi diversi. Due campioni sono stati sottoposti a ipossia sul lato avventiziale utilizzando il de-ossigenatore L40 iniettando nel lato gas una portata di azoto puro pari a 30 ml/min, controllata tramite un flussimetro. Il valore di concentrazione di ossigeno, che in accordo con i risultati ottenuti in un lavoro di tesi precedente [2] deve raggiungere un valore di circa  $5 \cdot 10^{-8}$  mol/ml (pari al 5% di pO<sub>2</sub>), è stato monitorato con il sensore di misura durante i primi due giorni di prova e al termine dell'esperimento per confermare il valore raggiunto.

Un terzo campione è stato condizionato con il de-ossigenatore L100, impostando nel lato gas una miscela di azoto e aria che consente di riprodurre le condizioni di ossigeno ottenute con il de-ossigenatore L40. La composizione della miscela necessaria è stata ricavata a partire dalla curva percentuale di saturazione-concentrazione di ossigeno

ottenuta dagli esperimenti descritti al paragrafo 3.2.6, nei quali è stata eseguita la caratterizzazione del sistema di coltura con ricircolo del mezzo al variare della saturazione di O<sub>2</sub> nella miscela de-ossigenante. La miscela deve essere composta per il 90% da azoto e per il restante 10% da aria; la portata di azoto è stata mantenuta pari a 30 ml/min, mentre per realizzare la portata di aria richiesta per comporre la miscela, pari a 3 ml/min, è stata utilizzata una pompa peristaltica in grado di erogare basse portate (TL, Medorex, Germania), impostando un numero di giri pari al 10% del totale. In questo caso il valore di concentrazione di ossigeno è stato monitorato per tutta la durata dell'esperimento.

I campioni del gruppo con ipossia severa sono stati condizionati utilizzando il nuovo de-ossigenatore iniettando una portata di azoto pari a 30 ml/min nel lato gas. I valori di concentrazione di ossigeno nel lato gas sono stati monitorati per tutta la durata dell'esperimento.

Alla fine dei 7 giorni di esperimento il sistema viene scollegato, si controlla l'integrità del campione e se ne preleva un segmento di circa 5 mm di lunghezza, che viene fissato in paraformaldeide e formalina al 4% (Fig. 3.17). Gli elementi entrati in contatto con il campione e con il terreno di coltura vengono decontaminati e sterilizzati mentre i due tubi falcon della camera interna ed esterna vengono eliminati.



*Fig. 3.17: Aspetto del campione di vena safena a fine esperimento. Una volta scollegato il circuito il campione di vena safena viene ispezionato e si preleva un segmento di lunghezza pari a 5 mm che viene conservato e preparato per le analisi successive.*

### 3.4.3. ANALISI E CARATTERIZZAZIONE BIOLOGICA DEI CAMPIONI DI VENA

Tutti i campioni prelevati e conservati in formalina, sia quelli a tempo zero che dopo 7 giorni di esperimento, vengono inclusi in paraffina per le successive analisi. Il protocollo di inclusione, spiegato nel dettaglio in Appendice B, prevede l'immersione del campione in tampone fosfato e successivamente la disidratazione tramite passaggio in una scala crescente di alcool. Quindi il campione viene incubato in xilene e si procede con l'inclusione in paraffina.

Dai segmenti inclusi in blocchi di paraffina, si ottengono al microtomo (RM 2145 Leica) sezioni di spessore pari a 5  $\mu\text{m}$ , depositate poi su vetrini per microscopia. Queste sezioni sono utilizzate per le successive analisi morfologiche (istologiche e in immunofluorescenza) ed immunoistochimiche descritte nei paragrafi successivi.

#### 3.4.3.1. ANALISI MORFOLOGICHE: COLORAZIONI ISTOLOGICHE E IMMUNOFLUORESCENZA

Per le valutazioni morfologiche i campioni sono stati sottoposti ad analisi istologiche e ad analisi di immunofluorescenza.

Le colorazioni istologiche permettono di valutare l'integrità e i cambiamenti morfologici che avvengono a livello del tessuto. Tutti i campioni, sia quelli prelevati a tempo zero, che quelli a fine esperimento, sono stati colorati con ematossilina e eosina (*Hematoxilin and Eosin* –H&E) e con colorazione tricromica di Masson, applicando i protocolli descritti in Appendice B.

L'H&E è una colorazione istologica standard nella quale l'ematossilina colora di blu-violetto i componenti cellulari carichi negativamente, detti basofili e presenti prevalentemente a livello del nucleo, come acidi nucleici, proteine di membrana, membrane cellulari e elastina. L'eosina colora invece di rosa i componenti con carica positiva, detti eosinofili e presenti soprattutto nel citoplasma, come molte proteine cellulari, mitocondriali e le fibre di collagene. Brevemente, la colorazione prevede che venga rimossa la paraffina dalle sezioni tramite passaggio in xilene e in una scala di alcool decrescente, le sezioni vengono poi immerse prima in ematossilina e poi in eosina. Infine si procede con la deidratazione, con scala di alcool crescente, passaggio in xilene e montaggio dei vetrini con mezzo di montaggio Eukitt (Bio-Optica Milano Spa, Milano).

In seguito alla colorazione H&E i vetrini sono stati osservati al microscopio ottico Axioskop (Carl Zeiss Microscopy, NY, USA) e tramite il software AxioVision (Carl Zeiss Microscopy, NY, USA) per ogni sezione sono state realizzate ricostruzioni con ingrandimento 5X dell'intera sezione e sono state acquisite 8 immagini ad ingrandimento 20X e immagini a 40X dei *vasa vasorum* presenti nell'area avventiziale.

Le ricostruzioni con ingrandimento 5X sono state poi analizzate con il software GIMP (GNU Image Manipulation Program, versione 2.8.16) per separare la regione avventiziale, la cui area è stata calcolata con il supporto del software Image-J (Software for Java, National Institute of Health, USA, Versione 1.4.3.67).

Le acquisizioni con ingrandimento 20X sono state osservate per confrontare la distribuzione delle cellule nello spessore della vena in tutti i campioni stimolati rispetto ai campioni nativi in modo qualitativo.

Le immagini a 40X dei *vasa vasorum* sono state invece analizzate per misurare la *length density*, secondo la procedura descritta nel paragrafo successivo.

La colorazione tricromica di Masson viene scelta quando si vogliono riconoscere le cellule del tessuto connettivo. I coloranti utilizzati sono l'ematossilina, che conferisce ai nuclei una tonalità violacea, la fucsina, acida, che colora il citoplasma in rosso più o meno vivo e il blu di anilina, una sostanza basica, che dona alle fibre di collagene una colorazione azzurra. Brevemente, il protocollo prevede la rimozione della paraffina tramite passaggio in xilene e nella scala di alcool decrescente, e la colorazione con l'apposito kit (Bio-Optica Milano Spa, Milano). Infine si procede con la deidratazione e il montaggio dei vetrini.

I vetrini colorati con tricromia di Masson sono stati osservati al microscopio ottico Axioskop (Carl Zeiss Microscopy, NY, USA) e tramite il software AxioVision (Carl Zeiss Microscopy, NY, USA) per ogni sezione sono state realizzate ricostruzioni con ingrandimento 10X, che sono state utilizzate per valutare qualitativamente i cambiamenti indotti all'interno della struttura della parete vascolare in seguito alla stimolazione con diverse condizioni di ossigeno.

Le immunofluorescenze permettono di valutare qualitativamente gli effetti della coltura sulle componenti del tessuto di interesse, marcate con anticorpi specifici legati a un marcatore fluorocromo.

Le analisi in immunofluorescenze sono state svolte su tutti i campioni utilizzando il protocollo riportato in Appendice B. Brevemente, viene rimossa la paraffina dalle sezioni

tramite passaggio in xilene e in una scala di alcool decrescente, quindi si procede con recupero degli antigeni tramite esposizione a fonte di calore (*Heat Induced Epitode Retrieval* -HIER), seguito dal bloccaggio e infine l'incubazione con anticorpo primario e secondario. In particolare sono stati marcati con anticorpi l' $\alpha$ -actina delle SMC e il fattore di Von Willebrand e la proteina CD31 delle cellule endoteliali, mentre per la colorazione dei nuclei cellulari è stato utilizzato il DAPI, un agente intercalante del DNA.

Le sezioni così colorate sono state quindi osservate al microscopio confocale LSM-710 (Carl Zeiss, Germany) e sono state acquisite immagini con ingrandimento 10X per la valutare qualitativamente l'organizzazione delle componenti cellulari presenti nella parete del vaso.

#### 3.4.3.2. MISURA DELLA *LENGHT DENSITY* DEI VASA VASORUM

Le immagini dei *vasa vasorum* della regione avventiziale del campione, acquisite con ingrandimento a 40X sulle sezioni colorate con H&E, come spiegato al paragrafo precedente, sono state analizzate per valutare l'angiogenesi indotta nel tessuto venoso dall'esposizione a diversi livelli di ipossia avventiziale.

Tutti i *vasa vasorum* vengono classificati in tre categorie in base alla lunghezza del proprio asse minore, assunto come diametro del *vasum*. Si considerano solo i vasi il cui asse minore è compreso tra 4-14  $\mu\text{m}$ . I vasi vengono suddivisi in vasi di piccola (asse minore compreso tra 4-14  $\mu\text{m}$ ), media (14-24  $\mu\text{m}$ ) e grande dimensione (24-44  $\mu\text{m}$ ).

La *lenght density* si calcola applicando la formula:

$$\text{Lenght density} = \frac{\sum_{i=1}^n R_i}{A_d}$$

dove n è il numero totale di *vasa vasorum*,  $R_i$  è il rapporto tra la lunghezza dell'asse maggiore e dell'asse minore dell'i-esimo vaso e  $A_d$  è l'area avventiziale calcolata a partire dalle immagini H&E con ingrandimento 5X.

Confrontando per ogni campione la *lenght density* a tempo zero e a fine esperimento si ricavano informazioni sui fenomeni angiogenici; infatti lo sviluppo di *vasa vasorum* di piccola taglia è associato alla nascita di nuovi vasi durante il periodo di coltura, mentre l'aumento dei vasi di media e grande taglia indica un aumento delle dimensioni dei *vasa vasorum* presenti.

### 3.4.3.3. QUANTIFICAZIONE DELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE: ANALISI DI IMMUNOISTOCHEMICA

Per stimare la proliferazione cellulare su tutti i campioni sono state eseguite analisi immunohistochemiche per l'individuazione del marker di proliferazione Ki67. Il protocollo, (Appendice B) prevede come primo passaggio la rimozione della paraffina dalle sezioni, il recupero degli antigeni tramite esposizione a fonte di calore (*Heat Induced Epitode Retrieval* -HIER), seguito dall'incubazione con anticorpo primario e secondario, collegato a un enzima, e con l'aggiunta del substrato cromogenico DAB, che viene scisso dall'enzima. In questo modo si produce una colorazione marrone visibile al microscopio ottico.

Contestualmente alla colorazione per Ki67 le sezioni sono state colorate con ematossilina per permettere l'individuazione dei nuclei cellulari.

I preparati sono stati osservati al microscopio ottico Axioskop (Carl Zeiss Microscopy, NY, USA) e con il software AxioVision, sono state acquisite 5 immagini per ogni campione ad ingrandimento 20X prese a caso. Queste sono state utilizzate per una valutazione qualitativa delle cellule proliferanti rispetto alle cellule totali.

## 4. RISULTATI

*Nella prima parte del capitolo verranno presentati i risultati ottenuti durante la campagna sperimentale per la caratterizzazione del modulo de-ossigenante svolta presso il  $\mu$ BSLab del Politecnico di Milano. In particolare verranno confrontate le performance delle due versioni del de-ossigenatore, quello con tubo in silicone lungo 40 cm (L40) e quello con tubo da 100 cm (L100), sia nelle prove senza ricircolo del mezzo sia con ricircolo del mezzo.*

*Successivamente verranno confrontate le previsioni analitiche del modello e i risultati sperimentali ottenuti da una seconda campagna sperimentale eseguita per verificare se il modello sviluppato fosse rappresentativo di ciò che avviene durante la messa in circolo del sistema.*

*Infine verranno presentati i risultati ottenuti dalla campagna sperimentale con campioni di vena safena svolta presso il LIT del Centro Cardiologico Monzino, sia per quanto riguarda i valori di concentrazione di ossigeno avventiziale con il sistema di coltura in esercizio, sia per quanto riguarda le analisi biologiche eseguite sui dei campioni trattati in diverse condizioni di  $O_2$  (standard, ipossia moderata e ipossia severa).*

### 4.1 RISULTATI DELLA CARATTERIZZAZIONE DEL MODULO DE-OSSIGENANTE

Nei paragrafi successivi verranno mostrati tutti i risultati relativi alla campagna di caratterizzazione del modulo de-ossigenante.

#### 4.1.1. PERDITE DI CARICO INTRODOTTE DAL NUOVO DE-OSSIGENATORE

Per poter introdurre all'interno del sistema di coltura il de-ossigenatore L100, è stata ritenuta necessaria una verifica per stabilire se le perdite di carico distribuite introdotte da questo elemento fossero compatibili con il sistema, come descritto al paragrafo 3.2.3.

In Fig. 4.1 sono riportate le perdite di carico distribuite in funzione della portata ottenute sperimentalmente:

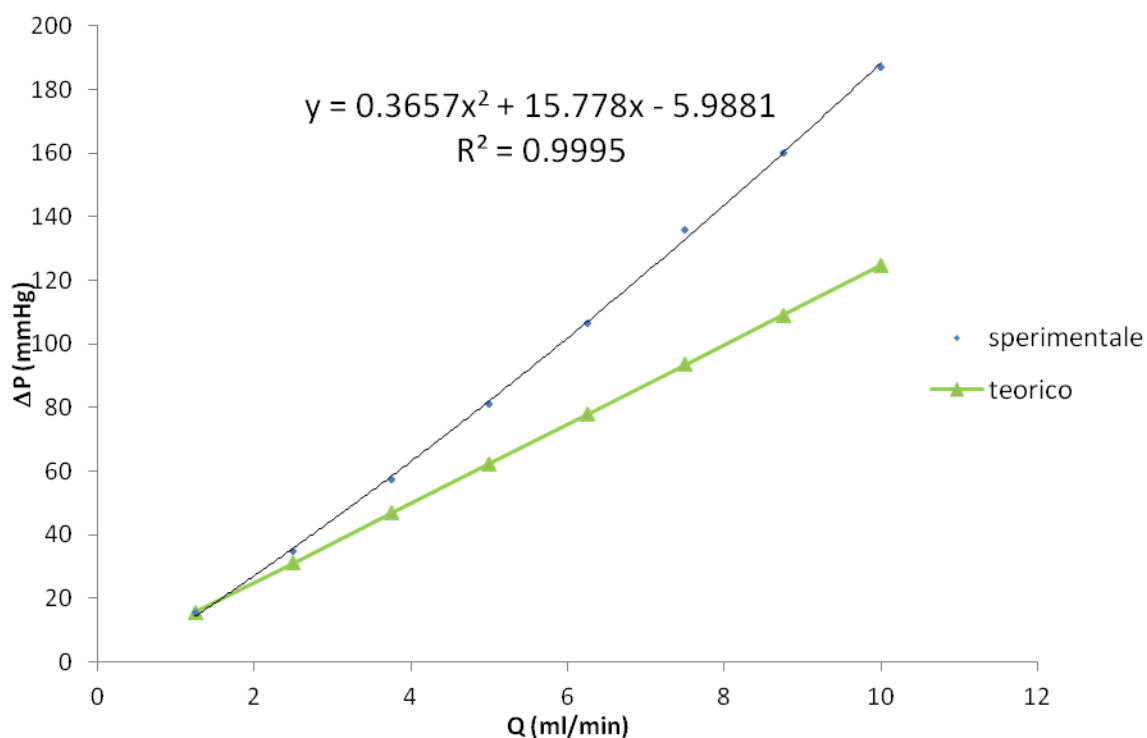


Fig. 4.1: Confronto tra le perdite di carico misurate sperimentalmente introdotte dal de-ossigenatore e il valore teorico calcolato con la legge di Poiseuille. La differenza tra le perdite di carico sperimentali e quelle teoriche si spiega perché avvolgendo il tubo in silicone sul supporto si creano delle perdite di carico concentrate, che vengono trascurate nell'approssimazione teorica. Nel grafico sono riportati media e deviazione standard ottenute da tre prove effettuate per ogni valore di portata d'interesse.

La differenza tra i valori di perdite di carico sperimentali e quelli teorici, calcolati con la formula di Poiseuille, si può attribuire agli avvolgimenti del tubo di silicone sul supporto del de-ossigenatore. Tali avvolgimenti creano delle perdite di carico concentrate che vengono trascurate nell'approssimazione teorica.

Le perdite di carico introdotte dal de-ossigenatore aumentano in modo quadratico al variare della portata e possono causare abbassamenti locali di pressione tali da indurre fenomeni di cavitazione, con conseguente produzione di bolle. Le bolle di aria provocano una re-ossigenazione del mezzo e vanno ad ostacolare l'abbassamento di concentrazione di ossigeno prodotto dal de-ossigenatore; inoltre se raggiungono il campione di vena safena umana possono danneggiarlo.

Per eludere questo problema la soluzione adottata consiste nel posizionare il de-ossigenatore sulla linea di mandata della pompa.

Dal punto di vista idraulico la nuova versione ottimizzata del de-ossigenatore può essere quindi integrata all'interno del sistema di coltura, senza introdurre zone a pressione elevata.

Per la successiva campagna sperimentale svolta presso il LIT del Centro Cardiologico Monzino è stato possibile utilizzare il de-ossigenatore L100.

#### 4.1.2. RISULTATI DELLA CARATTERIZZAZIONE DEL DE-OSSIGENATORE IN ASSENZA DI RICIRCOLO DEL MEZZO

Le prove senza ricircolo del mezzo descritte al paragrafo 3.2.5 permettono di valutare le performance del de-ossigenatore a singolo passaggio, quindi in condizioni semplificate rispetto alla configurazione reale. Il confronto delle performance del de-ossigenatore preesistente e della nuova versione sviluppata durante il presente lavoro di tesi è stato eseguito alla portata di esercizio di 5ml/min, ritenuta significativa perché durante la messa in esercizio del sistema il mezzo di coltura nel lato avventiziale viene movimentato con questo valore di portata, e iniettando azoto puro nel lato gas del de-ossigenatore. Dal confronto grafico (Fig. 4.2) risulta evidente che il de-ossigenatore con tubo in silicone da 100 cm presenta una maggiore efficacia nella de-ossigenazione, giustificata da una superficie di scambio di gran lunga superiore rispetto a quella della versione con tubo in silicone lungo 40 cm; infatti il valore minimo di concentrazione di O<sub>2</sub> che si riesce a raggiungere con la prima versione del de-ossigenatore è di circa  $1.6 \cdot 10^{-6}$  mol/ml (equivalente a circa 124 mmHg cioè una pO<sub>2</sub> del 16%), mentre con quella nuova si raggiunge una concentrazione di  $8.2 \cdot 10^{-8}$  mol/ml (cioè circa 66 mmHg, pari all' 8.7%).

Per chiarezza, nei grafici vengono riportati i valori di concentrazione di ossigeno, la relazione tra concentrazione di ossigeno nel mezzo di coltura e pressione parziale si ricava dalla legge di Henry<sup>5</sup>.

---

<sup>5</sup> La legge di Henry regola la solubilità di un gas in un liquido. L'espressione matematica della legge afferma che  $C = \alpha \cdot P$ , con C concentrazione del gas nella soluzione,  $\alpha$  coefficiente di solubilità del gas, dipendente dalla temperatura e P pressione parziale del gas sulla soluzione.

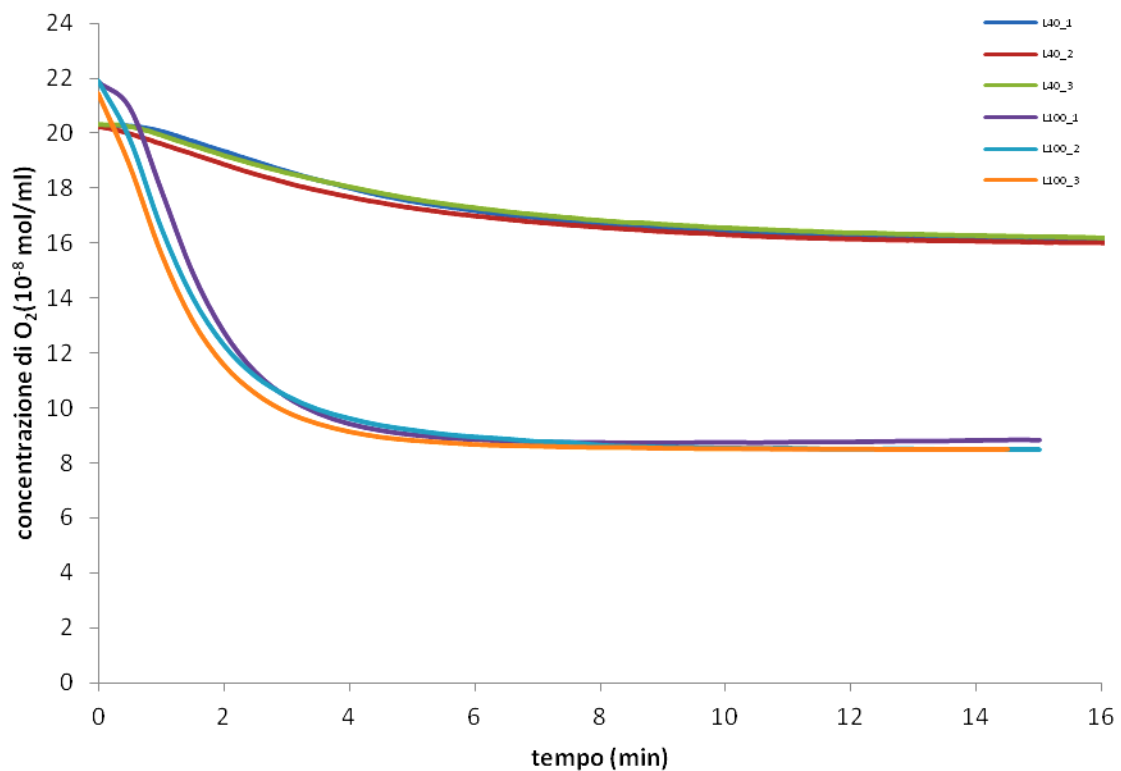


Fig. 4.2: Confronto tra i risultati ottenuti dalla caratterizzazione senza ricircolo del mezzo con i due tipi di de-ossigenatore, L40 e L100. Per ognuno dei due moduli de-ossigenanti sono state eseguite 3 prove alla portata di esercizio di 5 ml/min e iniettando azoto puro nel lato gas. Dal confronto grafico risulta evidente che il de-ossigenatore L100 presenta una maggiore efficacia nella de-ossigenazione.

I risultati ottenuti dimostrano che il de-ossigenatore ottimizzato L100 può essere utilizzato con successo per raggiungere nel lato avventiziale del sistema di coltura una condizione di ipossia più severa.

Il de-ossigenatore L100 è stato quindi caratterizzato in modo approfondito per valutare lo scambio di massa specifico, riportato in figura Fig. 4.3. a, e lo scambio totale, in figura Fig. 4.3 b, al variare della portata. Lo scambio di massa specifico diminuisce all'aumentare della portata poiché per portate crescenti, a parità di lunghezza del tubo lungo il quale avviene lo scambio, il tempo di permanenza del fluido nel de-ossigenatore diminuisce.

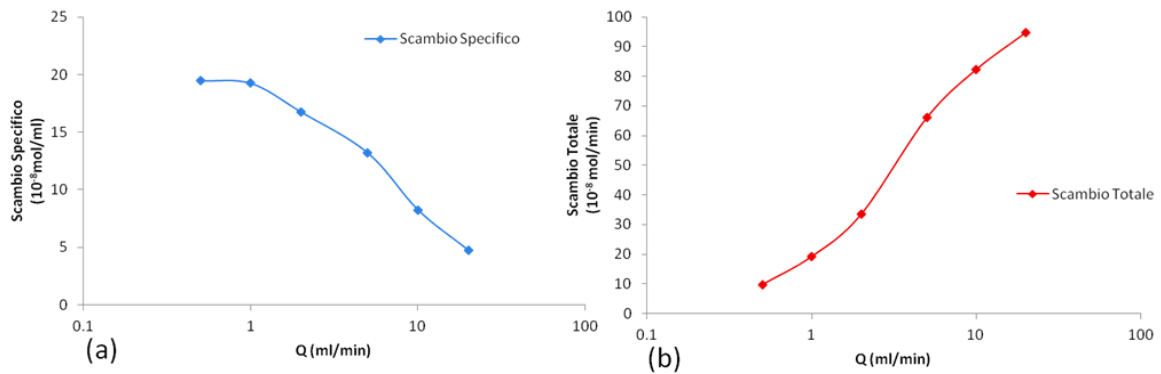


Fig. 4.3: Valori sperimentali di scambio di massa specifico e scambio totale di L100 ricavati al variare della portata dalla caratterizzazione senza ricircolo del mezzo. (a) Scambio di massa specifico (b) Scambio totale. Nei grafici sono riportati i valori di media e deviazione standard ottenuti da 3 prove di caratterizzazione a circuito aperto per ogni portata di esercizio. Asse orizzontale in scala logaritmica.

Confrontando i risultati ottenuti con quelli di un precedente lavoro di tesi [2], nel quale era stata eseguita la stessa caratterizzazione al variare della portata per la versione pre-esistente de-ossigenatore, si conferma la maggiore efficacia del de-ossigenatore L100. Infatti, a parità di portata, i valori di scambio di massa specifico sono sempre minori nel deoxy L40. A titolo esemplificativo lo scambio specifico alla portata di funzionamento di 5 ml/min per L40 è pari a  $6 \cdot 10^{-8}$  mol/ml, mentre per L100 è più del doppio, cioè  $13 \cdot 10^{-8}$  mol/ml.

I dati ottenuti hanno una bassa variabilità, quindi le prove sono ripetibili. Il sensore di misura utilizzato nel presente lavoro di tesi e la camera di misura realizzata *ad hoc* consentono una buona misura della concentrazione di ossigeno. Lo strumento si è rivelato stabile e adatto al monitoraggio nel tempo dei valori di tensione parziale di ossigeno nel mezzo circolante.

#### 4.1.3. RISULTATI DELLA CARATTERIZZAZIONE CON RICIRCOLO DEL MEZZO

Per caratterizzare il comportamento del modulo de-ossigenante, sono state pianificate una serie di prove nel quale viene misurato sperimentalmente il valore di concentrazione di ossigeno che si riesce a raggiungere nel lato avventiziale simulando le reali condizioni di esercizio del sistema, come descritto al paragrafo 3.2.6.

Le prove sono state condotte variando la saturazione dell'ossigeno nella miscela utilizzata nel lato gas del de-ossigenatore e i risultati ottenuti sono rappresentati in figura Fig. 4.4:

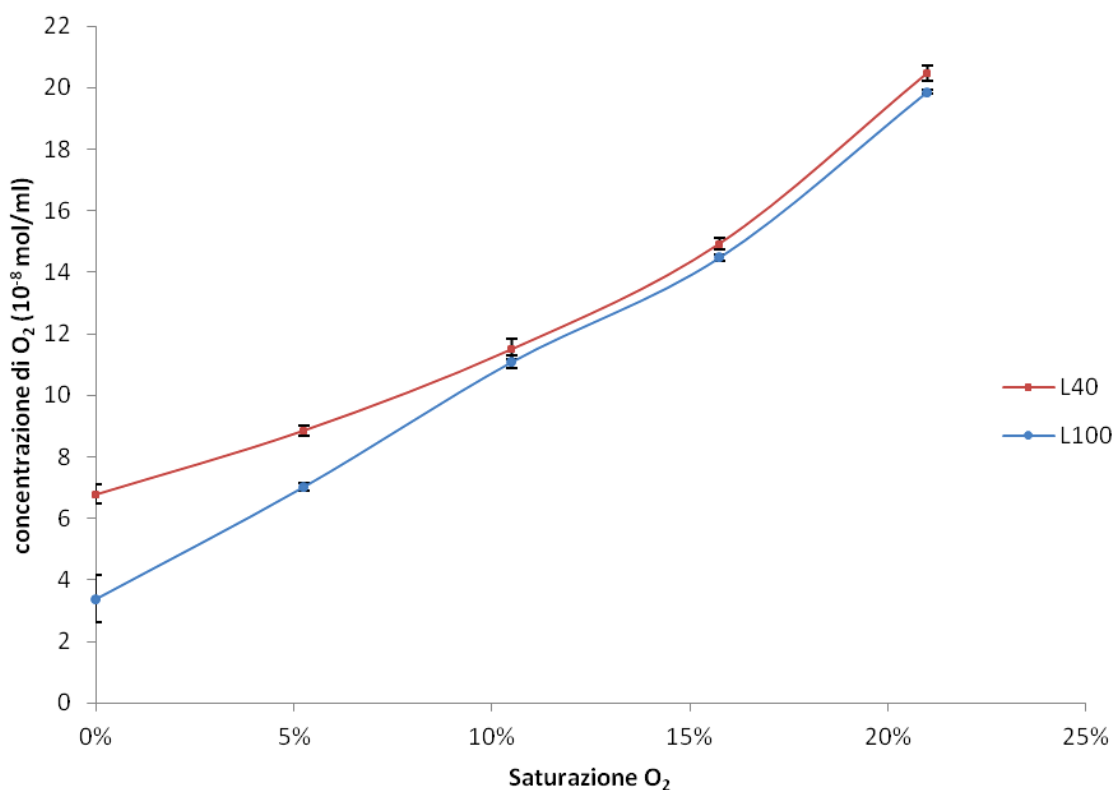


Fig. 4.4: Risultati ottenuti dalla caratterizzazione con ricircolo del mezzo. I risultati mostrano i valori di concentrazione di ossigeno nel lato avventiziale al variare della saturazione dell'ossigeno nella miscela utilizzata nel lato gas del de-ossigenatore. In rosso i risultati ottenuti con L40, in blu con L100. Quest'ultima permette di raggiungere concentrazioni più basse e quindi di condizionare il lato avventiziale con un'ipossia più severa. Nei grafici sono riportati i valori di media e deviazione standard ottenuti da 3 prove.

A parità di miscela di gas utilizzata per de-ossigenare il mezzo, il de-ossigenatore L100 permette di ottenere valori di concentrazione più bassi rispetto a quelli raggiunti con L40; in particolare usando azoto puro esso raggiunge una concentrazione di ossigeno media pari a  $3.38 \cdot 10^{-8}$  mol/ml (cioè circa 26 mmHg, pari al 3% di pO<sub>2</sub>) contro le  $6.78 \cdot 10^{-8}$  mol/ml (cioè circa 52 mmHg, pari al 6% di pO<sub>2</sub>) di L40. Osservando i valori di concentrazione ottenuti si nota una diminuzione della differenza di efficacia tra i due de-ossigenatori all'aumentare della saturazione di O<sub>2</sub> nella miscela de-ossigenante. Infatti, con la miscela caratterizzata da una saturazione di O<sub>2</sub> del 5.25%, L100 raggiunge una concentrazione di ossigeno di  $8.86 \cdot 10^{-8}$  mol/ml mentre L40 raggiunge  $7.03 \cdot 10^{-8}$  mol/ml. Questa differenza si riduce ulteriormente se si confrontano i dati ricavati dalle prove con miscele a saturazione di O<sub>2</sub> maggiore, dove le concentrazioni raggiungono valori del tutto simili (Fig.

4.4). Per sfruttare al massimo l'efficacia del de-ossigenatore L100 si devono utilizzare perciò miscele de-ossigenanti a basso contenuto di ossigeno.

La maggior efficacia del de-ossigenatore L100 rispetto a L40 rappresenta un enorme vantaggio perché, non solo permette di condizionare il lato avventiziale con un valore di ipossia più severa, ma consente di disporre di un sistema controllabile grazie al quale si possono riprodurre anche le condizioni di concentrazione raggiunte con il primo de-ossigenatore variando la composizione della miscela di gas.

Un'ulteriore considerazione riguarda la possibilità di spingersi oltre per raggiungere valori di  $pO_2$  nel lato avventiziale più bassi realizzando un de-ossigenatore con all'interno tubi in silicone di lunghezza maggiore. Questa soluzione, oltre che scontrarsi con evidenti difficoltà tecnologiche, non sembra essere ideale, perché la relazione tra lunghezza e efficacia nella de-ossigenazione non è lineare e all'aumentare della lunghezza si raggiunge un valore limite oltre il quale l'aumento di efficacia non giustifica più l'utilizzo di tubi più lunghi. Infatti lo scambio di ossigeno a cavallo della parete, che può essere ragionevolmente approssimato come lineare, nella realtà segue un andamento esponenziale.

## 4.2 RISULTATI SPERIMENTALI, PREVISIONI DEL MODELLO E SUA

### VERIFICA

Nel presente paragrafo viene riportato un confronto tra i dati sperimentali e le previsioni del modello facendo riferimento alle quattro configurazioni descritte al paragrafo 3.3.2, cioè la configurazione di riferimento (la configurazione reale di esercizio del sistema di coltura) e tre configurazioni nelle quali si eliminano uno alla volta gli elementi che mettono in comunicazione il lato avventiziale con l'ambiente, per capire in che modo essi influenzano l'andamento del valore di concentrazione di ossigeno.

Viene eseguito un confronto grafico tra l'andamento del modello analitico e le curve sperimentali della concentrazione di ossigeno nel compartimento avventiziale del sistema. Inoltre si confrontano i valori delle costanti di tempo e della concentrazione di ossigeno a regime predetti dalle tre versioni del modello con i valori delle costanti di tempo e della concentrazione di ossigeno a regime sperimentali, estrapolati grazie al *fitting* dei dati eseguito con il software GraphPad Prism 5.

Per facilitare la comprensione si riporta la tabella riassuntiva delle quattro configurazioni già mostrata nel paragrafo 3.2.2 (Tabella 7):

Tabella 7: Configurazioni per verificare sperimentalmente le previsioni del modello<sup>6</sup>

configurazione	Tubo troppo pieno	Tubo Filtro HEPA	Tubo Vena
RIFERIMENTO	✓	✓	✓
1	✗	✓	✓
2	✗	✗	✓
3	✗	✗	✗

In Fig. 4.5 è riportato sia il confronto grafico tra l'andamento sperimentale nella configurazione di riferimento e la previsione del modello, sia, nella tabella a destra, il confronto tra i valori delle costanti di tempo e la concentrazione a regime sperimentali, ricavati con il software GraphPad Prism 5, e quelli predetti dal modello.

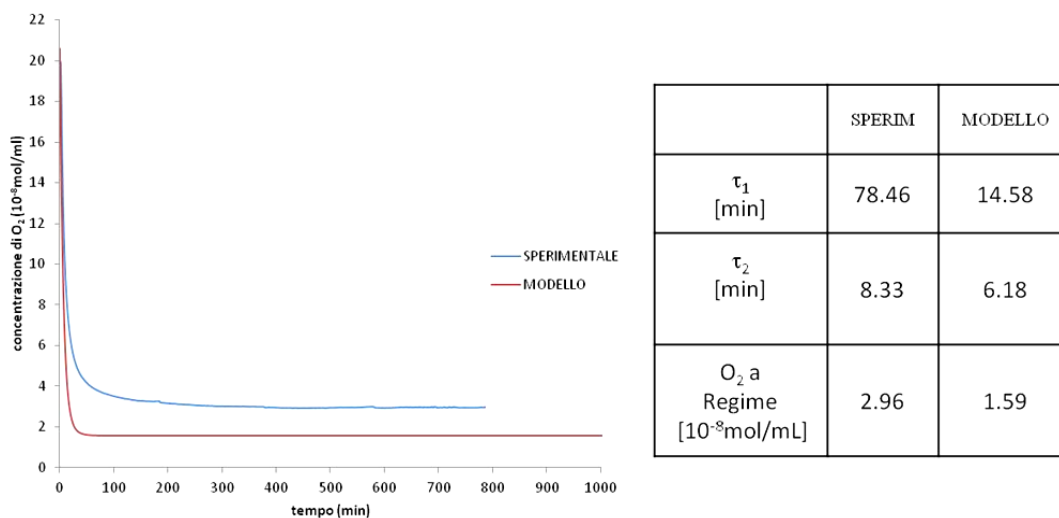


Fig. 4.5: Confronto grafico tra l'andamento sperimentale nella configurazione di riferimento e l'andamento previsto dal modello e confronto tra valori sperimentali e valori analitici delle costanti di tempo e concentrazioni di ossigeno a regime.

Il modello non risulta rappresentativo dell'andamento sperimentale; infatti esso sottostima sia le costanti di tempo che il valore di concentrazione a regime.

<sup>6</sup> Il simbolo ✓ indica che l'elemento indicato è in funzione nella configurazione in analisi, il simbolo ✗ indica che il componente viene escluso nella configurazione.

Per ottenere una migliore predizione del reale comportamento del sistema, è stato elaborato il modello accurato, il quale tiene in considerazione sia i volumi residui di aria presenti nei compartimenti luminale e avventiziale, introducendo due capacità ( $C'_{lum}$  e  $C'_{avv}$ ) in parallelo alle capacità che rappresentano i volumi di fluido nei due compartimenti, luminale e avventiziale, che si “caricano” o si “scaricano” di moli di ossigeno ( $C_{lum}$  e  $C_{avv}$ ), sia il contributo dei tubi del “troppo pieno” e del filtro HEPA, introducendo due resistenze ( $R_{troppo\_pieno}$  e  $R_{filtro\_hepa}$ ) poste in parallelo rispettivamente alla resistenza della vena ( $R_{vena}$ ) e a quella del modulo ossigenante ( $R_{oxy}$ ).

In Fig. 4.6 è mostrato il confronto tra le previsioni del modello accurato e i dati sperimentali nelle quattro configurazioni di prova.

In Fig. 4.6.a il modello accurato è messo a confronto con i dati sperimentali ottenuti dalla prove nella configurazione di riferimento. Le costanti di tempo predette dal modello accurato sono rappresentative di quelle reali, il modello, però, sovrastima il valore di concentrazione di  $O_2$  a regime.

Osservando le Fig. 4.6.b e Fig. 4.6.c si nota come il modello accurato sottostima il valore di concentrazione di ossigeno a regime sia nelle condizioni di prova in configurazione 1 (nelle quali si esclude solo il contributo del tubo del “troppo pieno”) sia nelle condizioni di prova in configurazione 2 (nelle quali si escludono i contributi sia del “troppo pieno” che del filtro HEPA).

Il modello accurato, inoltre, predice che, escludendo contemporaneamente il contributo del tubo del “troppo pieno”, quello del tubo del filtro HEPA e quello del tubo in silicone che mima la presenza della vena, il valore di concentrazione nel compartimento avventiziale raggiunge un valore prossimo allo zero ( $0.06 \cdot 10^{-8}$  mol/ml). Le evidenze sperimentali dimostrano invece che nella prova effettuata nella configurazione 3, cioè quella in cui si escludono tutti i contributi, il valore sperimentale di concentrazione di ossigeno a regime è pari a circa  $1.62 \cdot 10^{-8}$  mol/ml, che corrisponde all'1.6 % di  $pO_2$ (Fig. 4.6.d).

Questi risultati mettono in luce il fatto che il modello accurato trascura un elemento che mette in relazione l'atmosfera con il modulo de-ossigenante del sistema di coltura. Questo elemento è una fonte di ossigenazione, che, anche quando vengono esclusi tutti i punti di collegamento diretto tra il compartimento avventiziale, a bassa concentrazione di ossigeno, e il compartimento luminale, ad alta concentrazione di ossigeno, impedisce al compartimento avventiziale di raggiungere una tensione di ossigeno prossima a zero.

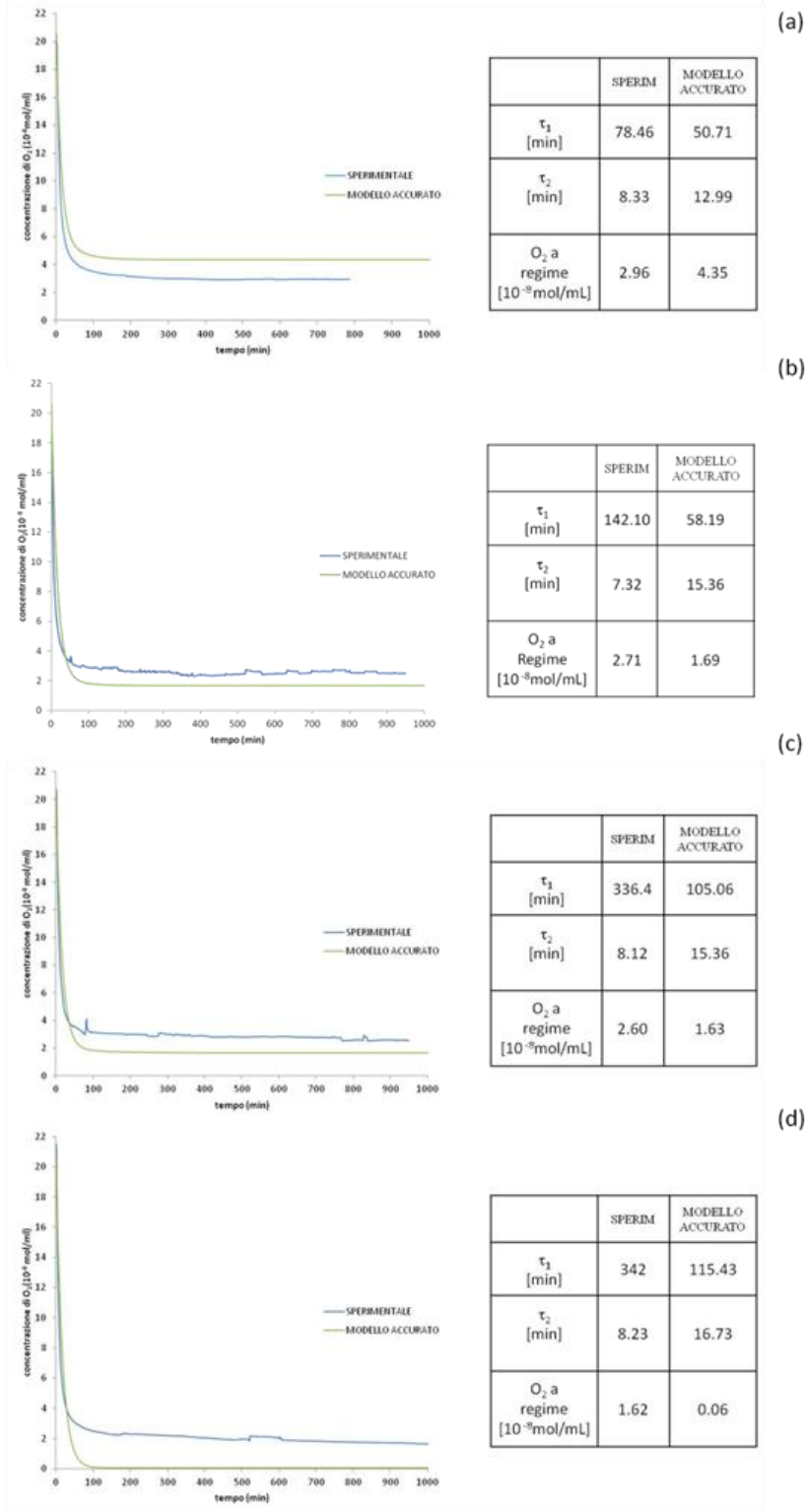


Fig. 4.6: Confronto grafico tra l'andamento previsto dal modello accurato e l'andamento sperimentale e confronto (nelle tabelle) tra i valori sperimentali e analitici delle costanti di tempo e dei valori di concentrazione a regime nelle configurazioni di riferimento (a), con solo "troppo pieno chiuso" (b), con troppo pieno e filtro HEPA chiusi (c) ed escludendo "troppo pieno", tubo HEPA e il tubo in silicone che simula la presenza della vena (d).

Ciò che impedisce al de-ossigenatore di raggiungere una concentrazione nulla di ossigeno nel compartimento avventiziale è stato individuato negli elementi distribuiti lungo il modulo de-ossigenante, realizzati con materiali non completamente impermeabili all'ossigeno. In particolare, si tratta dei connettori luer in polipropilene, della camera di misura di ossigeno realizzata in PMMA, del tubo Pharmed utilizzato come sottopompa e dei tubi Tygon che compongono il circuito di connessione al modulo de-ossigenante. Il modello finale tiene in considerazione questi elementi, che sono stati modellizzati come resistenze e collegati in parallelo per dare la resistenza equivalente  $R_{altro}$ .

In Fig. 4.7 è mostrato il confronto tra le previsioni del modello finale e i dati sperimentali nelle quattro configurazioni di prova.

In Fig. 4.7.a il modello finale è confrontato con i dati sperimentali ottenuti dalla prova nella configurazione di riferimento. Le costanti di tempo predette dal modello finale sono confrontabili con quelle reali e il valore di concentrazione di ossigeno a regime predetto dal modello, pari a  $2.98 \cdot 10^{-8}$  mol/ml, è molto vicino al valore sperimentale, pari a  $2.96 \cdot 10^{-8}$  mol/ml.

Osservando le Fig. 4.7.b e Fig. 4.7.c si nota che il modello finale stima correttamente i valori di concentrazione di ossigeno a regime, che sono confrontabili con i dati sperimentali sia nelle condizioni di prova in configurazione 1 (nelle quali si esclude solo il contributo del tubo del “troppo pieno”) sia in quelle in configurazione 2 (nelle quali si escludono i contributi sia del “troppo pieno” che del filtro HEPA).

Il modello finale è in grado quindi di giustificare anche il comportamento osservato sperimentalmente in configurazione 3. Infatti, pur escludendo contemporaneamente il contributo del tubo del “troppo pieno”, quello del tubo del filtro HEPA e quello del tubo in silicone che mima la presenza della vena, la presenza della resistenza  $R_{altro}$  impedisce al sistema di scendere al di sotto di una concentrazione di ossigeno pari a  $1.64 \cdot 10^{-8}$  mol/ml nel compartimento avventiziale, in accordo con quanto osservato sperimentalmente ( $1.62 \cdot 10^{-8}$  mol/ml) (Fig. 4.7.d). Il modello finale dimostra di essere un ottimo strumento predittivo, utile a comprendere come gli elementi che compongono il sistema di coltura influenzino l'andamento della concentrazione di ossigeno al suo interno. Esso può essere quindi utilizzato per riprogettare o ridimensionare il sistema di coltura in modo da ottenere diverse condizioni di ossigeno in modo controllato, ad esempio una condizione di ipossia più severa di quella ottenuta con l'attuale setup sperimentale.

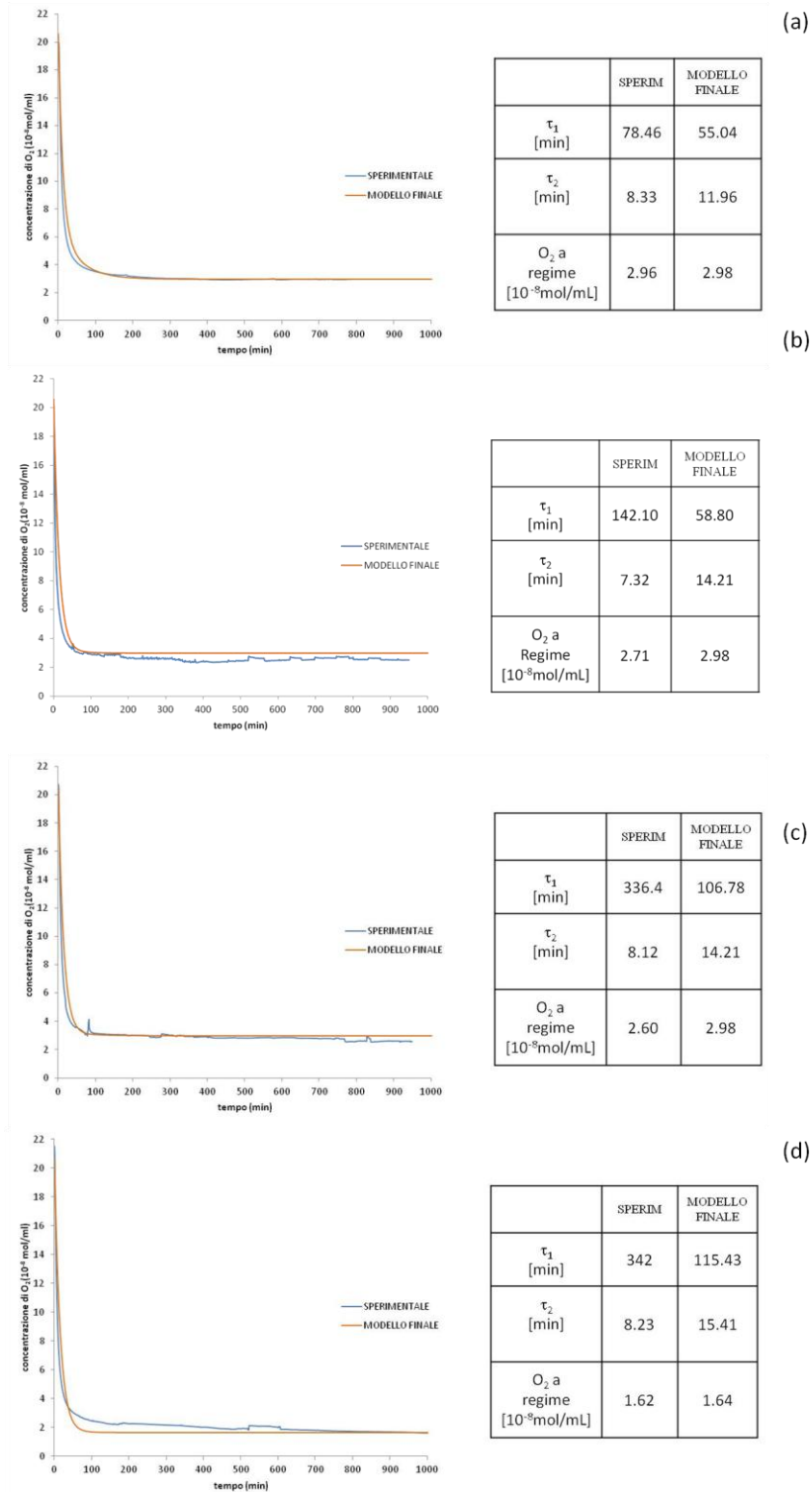


Fig. 4.7: Confronto grafico tra l'andamento previsto dal modello finale e l'andamento sperimentale e confronto (nelle tabelle) tra i valori sperimentali e analitici delle costanti di tempo e dei valori di concentrazione a regime nelle configurazioni di riferimento (a), con solo "troppo pieno chiuso" (b), con troppo pieno e filtro HEPA chiusi (c) ed escludendo "troppo pieno", tubo HEPA e il tubo in silicone che simula la presenza della vena (d).

Confrontando i dati sperimentali ottenuti nella configurazione di riferimento con quelli ottenuti nelle condizioni di prova condotte nelle altre tre configurazioni, si comprende l'influenza esercitata dagli elementi che vengono di volta in volta esclusi dal sistema di coltura sui valori di concentrazione di ossigeno a regime.

In Fig. 4.8 si osserva che l'esclusione del tubo del "troppo pieno" (configurazione 1) produce una diminuzione del valore di concentrazione di ossigeno a regime da  $2.9 \cdot 10^{-8}$  mol/ml fino a  $2.7 \cdot 10^{-8}$  mol/ml. L'esclusione contemporanea di tubo del "troppo pieno" e tubo del filtro HEPA (configurazione 2) ha come effetto un'ulteriore diminuzione del valore di ossigeno, ma di entità minore rispetto al caso precedente (raggiunge  $2.6 \cdot 10^{-8}$  mol/ml); infatti il tubo del filtro HEPA è situato nel compartimento luminale, quindi influenza in modo minore ciò che avviene nella camera avventiziale.

Infine, l'esclusione contemporanea del tubo del "troppo pieno", di quello del filtro dell'HEPA e di quello che mima la presenza della vena (configurazione 3) si traduce in una significativa riduzione della concentrazione di  $O_2$  nel compartimento avventiziale, perché grazie a queste modifiche esso viene isolato dal compartimento luminale e viene così rimossa una importante sorgente di ossigenazione.

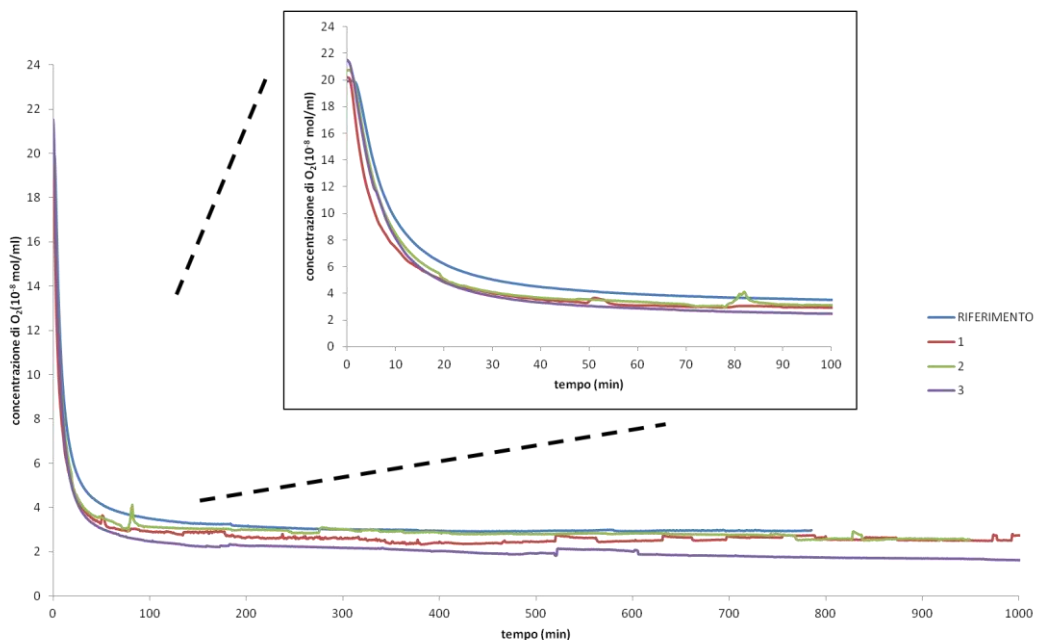


Fig. 4.8: Confronto tra i dati sperimentali ottenuti nelle condizioni di prove in configurazione di riferimento, cioè quella di funzionamento reale del sistema di coltura, e nelle tre configurazioni di prova che escludono il tubo del "troppo pieno", quello del filtro dell'HEPA e quello che mima la presenza della vena. Nel riquadro si mostra in dettaglio l'andamento delle curve nei primi 100 minuti, dove è apprezzabile la pendenza della curva rappresentativa delle costanti di tempo  $\tau_1$  e  $\tau_2$ .

Le curve sperimentali ottenute nelle quattro condizioni sono caratterizzate da costanti di tempo di ordini di grandezza paragonabili tra loro, come si può osservare nel dettaglio di Fig. 4.8. Infatti, i parametri che influenzano maggiormente le costanti di tempo sono le capacità, le quali rimangono invariate nelle quattro configurazioni di prova.

Infine, per completezza, sono state eseguite delle prove nelle quattro configurazioni per verificare se le previsioni del modello finale sono compatibili anche con il comportamento registrato nel compartimento luminale. Le prove sono state condotte riproducendo le stesse configurazioni, ma la camera di misura è stata posizionata in uscita dalla camera luminale. In Fig. 4.9 si mostrano gli andamenti sperimentali confrontati graficamente con le previsioni del modello nelle quattro configurazioni. I risultati confermano la capacità del modello di rappresentare, con una buona approssimazione, il comportamento reale del sistema, anche se il modello può essere ulteriormente raffinato.

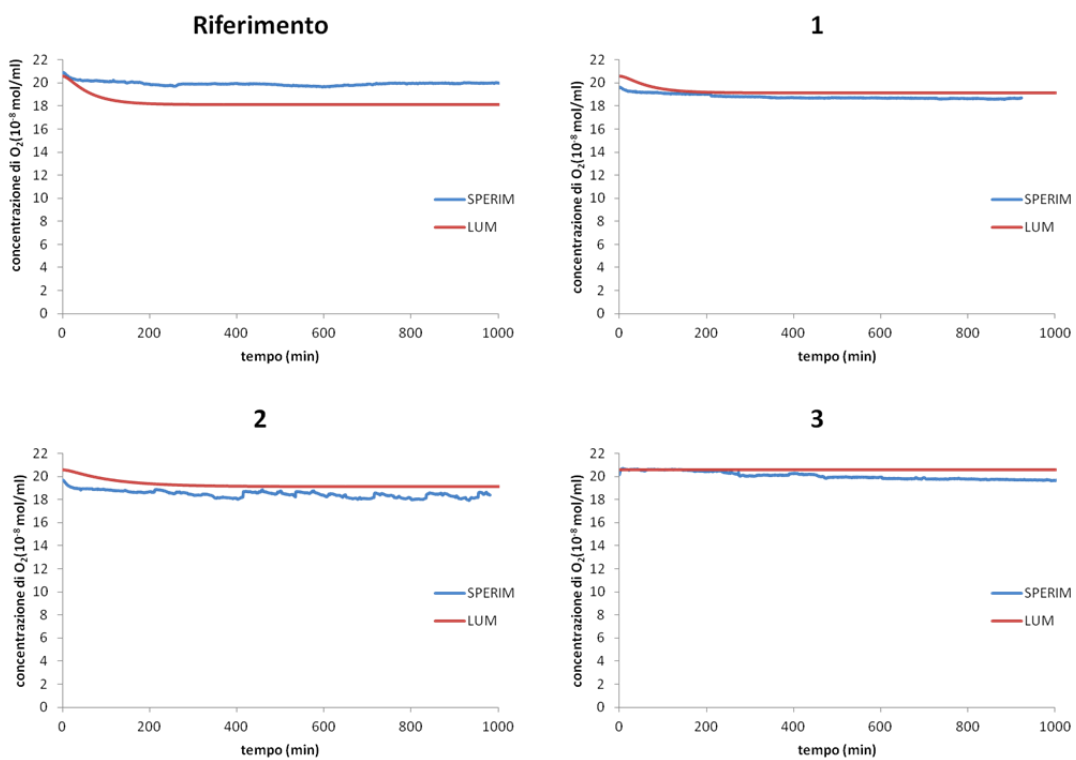


Fig. 4.9: Confronto grafico tra l'andamento sperimentale della concentrazione di ossigeno nel compartimento luminale e le previsioni analitiche del modello finale nelle quattro configurazioni (riferimento, 1, 2 e 3)

### 4.3 RISULTATI CAMPAGNA SPERIMENTALE SU SEGMENTI DI VENA SAFENA

La campagna sperimentale *ex-vivo* su segmenti di vena safena svolta presso il LIT dell'IRCCS Centro Cardiologico Monzino sotto la supervisione di uno staff di biologi ha permesso di caratterizzare il comportamento del de-ossigenatore in esercizio e monitorare il valore di concentrazione di ossigeno che si riesce a raggiungere nel compartimento avventiziale in presenza di campioni biologici. I campioni biologici sono stati condizionati con tre diversi valori di ossigeno nel compartimento avventiziale (condizioni standard di coltura, ipossia moderata e ipossia severa).

In seguito agli esperimenti, è stata eseguita una caratterizzazione biologica dei campioni per valutare gli effetti indotti nel tessuto dalle diverse condizioni di ossigeno sul lato avventiziale. Grazie a colorazioni istologiche (ematossilina ed eosina e tricromica di Masson) e immagini in immunofluorescenza sono stati valutati in modo qualitativo i cambiamenti morfologici indotti nel tessuto ed è stata eseguita la misura morfologica dei *vasa vasorum*. Infine immagini immunoistochimiche hanno fornito una stima qualitativa della proliferazione cellulare.

#### 4.3.1. MONITORAGGIO DELLE CONCENTRAZIONI DI OSSIGENO DURANTE GLI ESPERIMENTI CON SEGMENTI DI VENA SAFENA

I campioni del gruppo con ipossia moderata sono stati condizionati, come spiegato al paragrafo 3.4.2, in due modi diversi. Il valore di ipossia moderata nel lato avventiziale in due campioni è stato ottenuto utilizzando il de-ossigenatore L40 e iniettando azoto puro nel lato gas. Il sensore di ossigeno è stato utilizzato per monitorare la concentrazione di ossigeno durante i primi due giorni di prova e al termine dell'esperimento per controllare il valore raggiunto.

Il monitoraggio del valore di concentrazione di ossigeno ha permesso di confermare i risultati attesi sulla base di quanto presente nel lavoro di tesi utilizzato come riferimento [2]. Infatti nel comparto avventiziale è stato raggiunto un valore di concentrazione di ossigeno di circa  $5 \cdot 10^{-8}$  mol/ml (pari al 5% di  $pO_2$ ). In Fig. 4.10 sono riportati i dati sperimentali e viene proposto un possibile andamento dei valori di concentrazione di ossigeno nei giorni durante i quali essi non sono stati registrati.

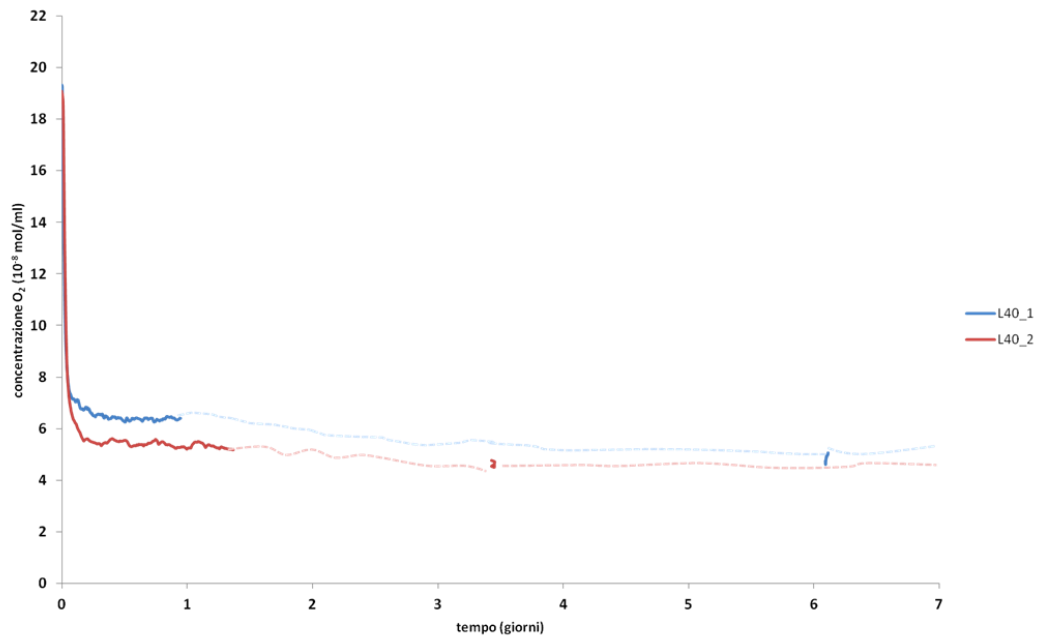


Fig. 4.10: Andamento della concentrazione di ossigeno nel compartimento avventiziale nei campioni del gruppo condizionato con ipossia moderata, ottenuta con il de-ossigenatore L40. In entrambi i casi il valore è stato monitorato durante i primi giorni dell'esperimento e dopo qualche giorno per confermare il valore raggiunto (linee continue). Le linee tratteggiate rappresentano una ricostruzione del possibile andamento nei giorni in cui il valore non è stato monitorato.

Un terzo campione del gruppo con ipossia moderata è stato condizionato con il de-ossigenatore L100, impostando nel lato gas una miscela composta per il 90% da azoto e per il restante 10% da aria, che consente di riprodurre le condizioni di ossigeno ottenute con il vecchio de-ossigenatore.

In questa configurazione è stato possibile raggiungere una concentrazione di ossigeno di  $5 \cdot 10^{-8}$  mol/ml (pari al 5% di  $pO_2$ ) (Fig. 4.11). Tali risultati confermano che il de-ossigenatore, è in grado di riprodurre condizioni di ipossia moderata controllando la composizione della miscela de-ossigenante. Rispetto al de-ossigenatore L40, che deve essere utilizzato al limite inferiore di funzionamento per raggiungere condizioni di ipossia moderata, il de-ossigenatore L100 esso può quindi essere utilizzato non solo per produrre una condizione di ipossia più severa, ma anche per riprodurre in modo controllato altre condizioni di ossigeno, ad esempio l'ipossia moderata.

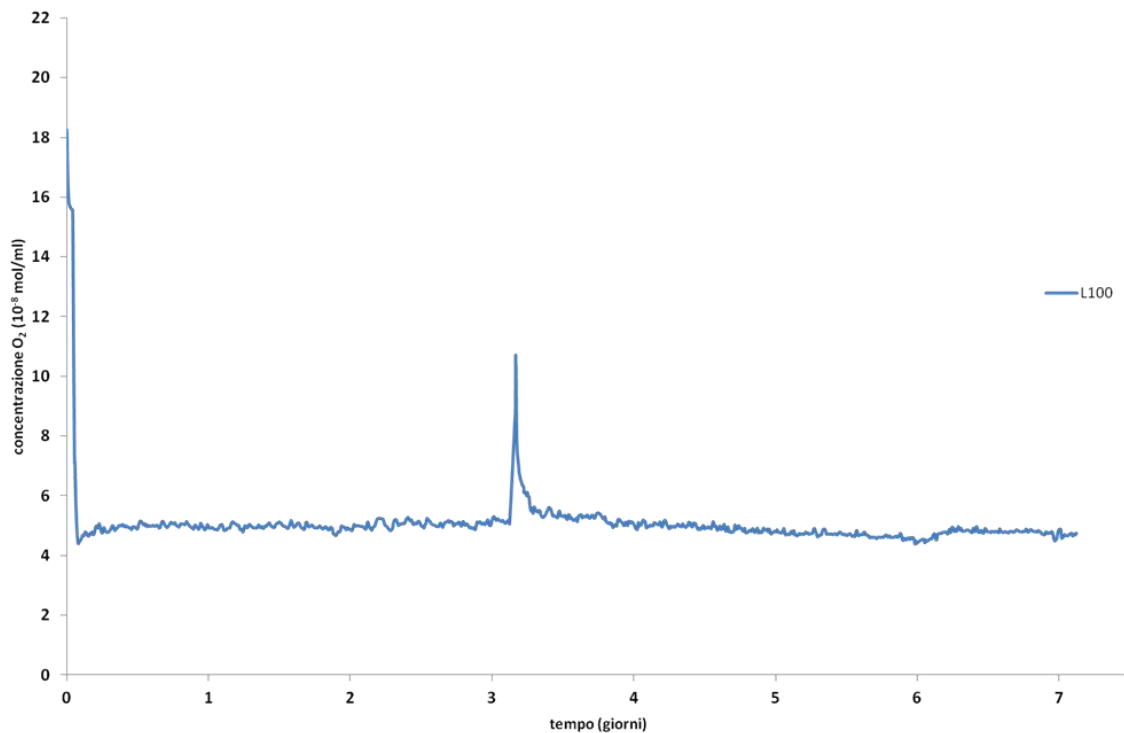


Fig. 4.11: Andamento della concentrazione di ossigeno nel compartimento avventiziale nel campione del gruppo condizionato con ipossia moderata, ottenuta con il de-ossigenatore L100, iniettando nel lato gas una miscela creata ad hoc. Il valore di concentrazione di ossigeno raggiunto, monitorato durante tutta la settimana di prova, è pari a circa  $5 \cdot 10^{-8}$  mol/ml (cioè 5% di  $pO_2$ ). In corrispondenza del terzo giorno di condizionamento, si registra un picco di concentrazione di  $O_2$  che coincide con il cambio del mezzo di coltura.

Osservando la curva del tracciato di concentrazione di ossigeno si nota un picco positivo al giorno 3; esso coincide con il cambio del mezzo di coltura effettuato circa a metà della durata dell'esperimento. Infatti, nonostante il terreno di coltura fresco sia conservato in una camera perfusa con azoto, come descritto al paragrafo 3.4.2, durante l'operazione sia il mezzo fresco che quello contenuto all'interno del circuito subiscono una parziale ossigenazione dovuta alla momentanea esposizione all'atmosfera causata dall'apertura del circuito sotto cappa biologica per procedere con l'operazione di ricambio del mezzo.

Per quanto riguarda i 3 campioni condizionati con il de-ossigenatore L100 iniettando nel lato gas azoto puro, il valore di concentrazione che si raggiunge è compreso tra  $1.96 \cdot 10^{-8}$  mol/ml e  $2.94 \cdot 10^{-8}$  mol/ml (ossia tra il 2 e il 3% di  $pO_2$ ) (Fig. 4.12), quindi, grazie al de-ossigenatore L100 è possibile condizionare i campioni con un grado di ipossia più severa.

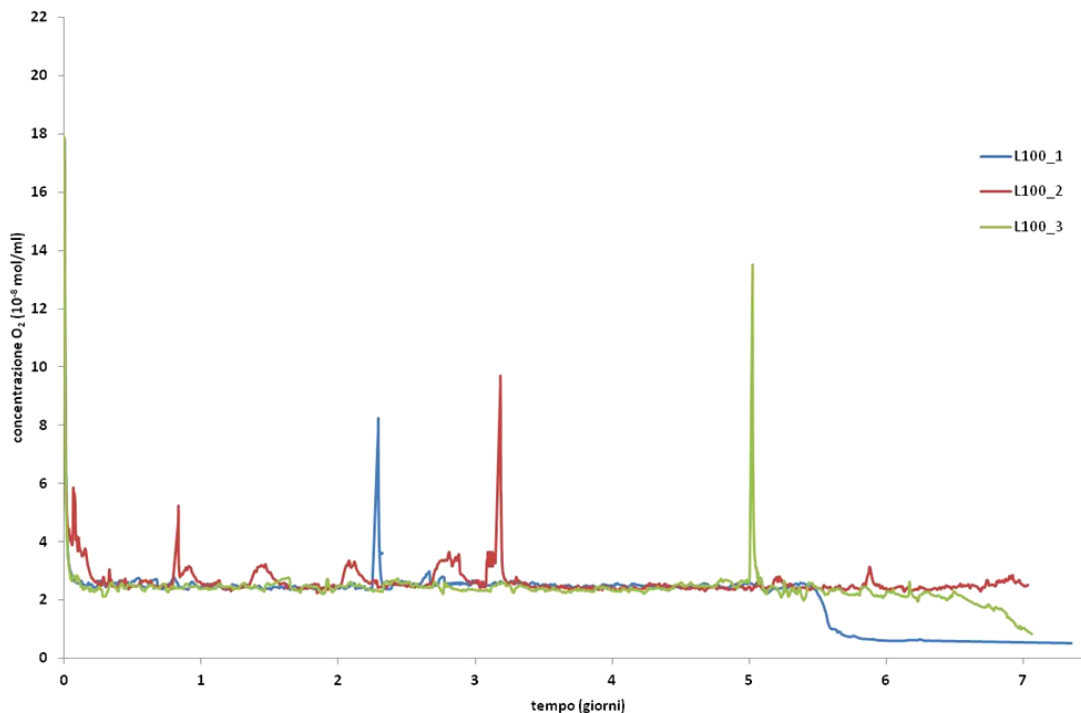


Fig. 4.12: Andamento della concentrazione di ossigeno nel compartimento avventiziale nei 3 campioni del gruppo condizionato con ipossia severa con il de-ossigenatore L100, iniettando nel lato gas azoto puro. Il valore di concentrazione di ossigeno è stato monitorato durante tutta la durata dell'esperimento. Si raggiungono valori di  $O_2$  compresi tra  $1.96 \cdot 10^{-8}$  e  $2.94 \cdot 10^{-8}$  mol/ml (cioè 2 – 3 % di  $pO_2$ ). Anche in questo caso si registrano i picchi di concentrazione che coincidono con il cambio del mezzo di coltura.

Osservando le curve si notano anche in questo caso i tre picchi corrispondenti al momento nel quale è stato effettuato il cambio del mezzo di coltura.

Se si analizza la curva della seconda vena, in rosso nella Fig. 4.12, si evidenziano altri picchi più piccoli dovuti al passaggio di bolle d'aria all'interno della camera di misura.

Infine, esaminando i tre andamenti nella Fig. 4.12, si può rilevare una seconda discesa nel valore di concentrazione di ossigeno sia nella curva blu, corrispondente alla prima vena di questo gruppo, sia in quella verde, corrispondente alla terza vena. Questa seconda discesa, in entrambi i casi avvenuta verso la fine dell'esperimento, può essere imputabile a un'infiltrazione batterica localizzata a livello della camera di misura oppure a una proliferazione cellulare, con conseguente aumento del consumo di ossigeno. Ulteriori analisi andrebbero svolte al riguardo; ad esempio, per verificare la presenza di una proliferazione batterica, dovrebbero essere svolte analisi microbiologiche. Approfondite analisi quantitative della proliferazione cellulare, dovrebbero essere condotte per

determinare se il comportamento osservato è dovuto a un significativo aumento della densità cellulare

#### 4.3.2. ANALISI DEI CAMPIONI BIOLOGICI

Nei paragrafi successivi verranno riportati i risultati ottenuti dalle analisi qualitative morfologiche eseguite con le colorazioni H&E e tricromica di Masson sui campioni stimolati in condizioni standard ( $pO_2$  pari al 21%), ipossia moderata ( $pO_2$  pari al 5%) o ipossia severa ( $pO_2$  pari al 2.5%) sul lato avventiziale.

Sui campioni è stata eseguita anche un'analisi qualitativa della proliferazione cellulare tramite analisi immunohistochemiche (Ki67).

Infine è stata calcolata la *length density* dei *vasa vasorum* presenti nella regione avventiziale di ogni campione, per ricavare informazioni circa i fenomeni di angiogenesi indotti dalle condizioni di ossigeno applicate.

##### 4.3.2.1. MANTENIMENTO DELL'INTEGRITÀ E DELLA STRUTTURA CARATTERISTICA DEL TESSUTO VASCOLARE

Le colorazioni con H&E hanno mostrato che i campioni stimolati per 7 giorni all'interno del sistema di coltura mantengono la struttura del tessuto caratteristica della parete del vaso sia quando il lato avventiziale è esposto a condizioni di ossigeno standard sia quando viene esposto a condizioni di ipossia moderata o severa. In Fig. 4.13 sono riportate quattro immagini istologiche rappresentative del comportamento osservato su tutti i campioni analizzati. Le immagini riportate sono ottenute da sezioni sottoposte a colorazione H&E acquisite al microscopio ottico, con ingrandimento 5X, di un campione di tessuto nativo, cioè a tempo zero (Fig. 4.13 A), di un campione sottoposto a condizioni standard di ossigenazione per 7 giorni (Fig. 4.13 B), di un campione sottoposto a ipossia moderata per 7 giorni (Fig. 4.13 C) e di uno sottoposto a ipossia severa per 7 giorni (Fig. 4.13 D). Osservando le immagini si nota che la parete vascolare si presenta integra, le cellule muscolari lisce (SMC) mostrano un allineamento circolare tipico della tonaca media (indicato dalle frecce nere) e che nel complesso la struttura caratteristica della parete vascolare si conserva in tutte le condizioni sperimentali.

In nessuna delle tre condizioni di stimolazione si osservano inoltre evidenti variazioni di spessore e di area luminale del campione stimolato rispetto al controllo nativo.

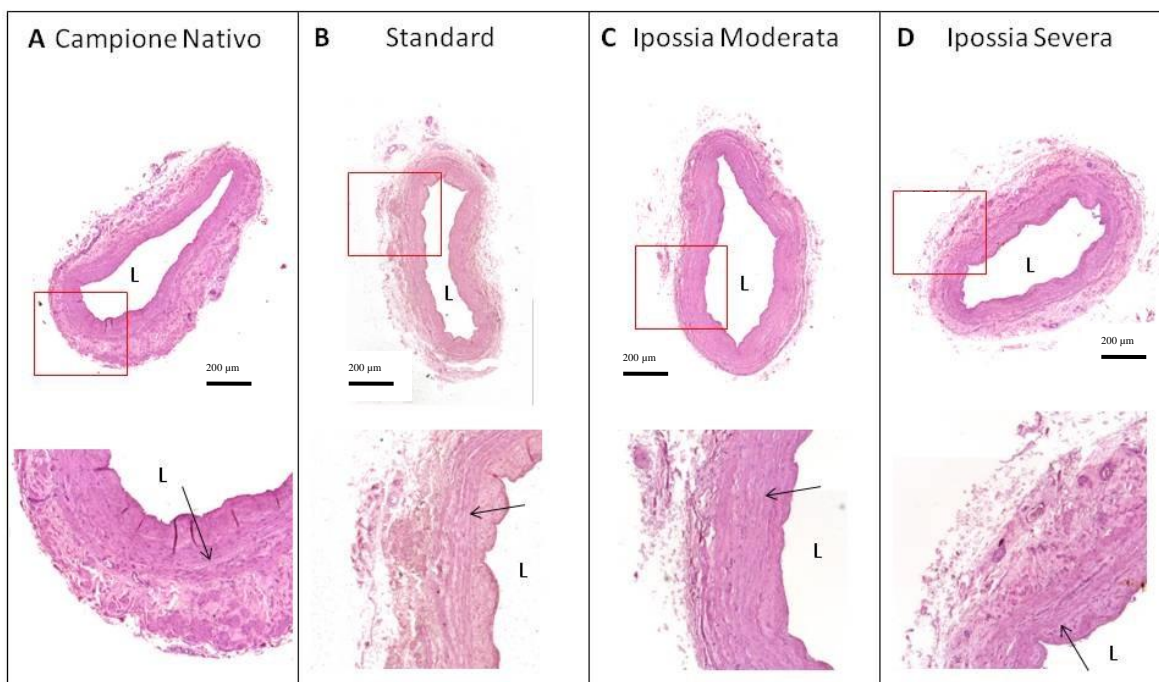


Fig. 4.13: Immagini ottenute al microscopio ottico ad ingrandimento 5X di sezioni, colorate con H&E, di segmenti di vena safena umana nativa (A), stimolata in condizioni standard (lato avventiziale con  $pO_2$  21%) (B), stimolata con ipossia moderata (lato avventiziale con  $pO_2$  5%) (C) e stimolata con ipossia severa (lato avventiziale con  $pO_2$  2.5%) (D). Nella parte inferiore dell'immagine sono riportati dettagli della parete, dove si riconoscono le fibre muscolari disposte in direzione circonferenziale indicate dalle frecce. L indica il lume del vaso. La barra corrisponde a 200  $\mu m$ .

L'analisi qualitativa delle immagini ottenute con colorazione H&E e acquisite al microscopio ottico a un ingrandimento 20X evidenzia una diminuzione del numero di cellule presenti a livello della tonaca media nei campioni stimolati con ipossia severa sul lato avventiziale. Le immagini riportate in Fig. 4.14, ritenute significative del comportamento osservato, sono ottenute da sezioni sottoposte a colorazione H&E acquisite al microscopio ottico, con ingrandimento 20x, di un campione nativo, cioè a tempo zero (Fig. 4.14 A), di un campione sottoposto a condizioni standard (Fig. 4.14 B), di un campione sottoposto a ipossia moderata (Fig. 4.14 C) e di uno sottoposto a ipossia severa (Fig. 4.14 D). Dal confronto qualitativo con il campione nativo risulta una diminuzione del numero di cellule nella tonaca media sia nei campioni trattati con ipossia moderata che in quelli trattati con ipossia severa. Tale diminuzione, in particolare, è molto marcata nei campioni stimolati con ipossia severa, nei quali la tonaca media risulta quasi completamente priva di cellule. Nelle immagini ottenute dai campioni del gruppo standard non si notano differenze significative rispetto al campione nativo.

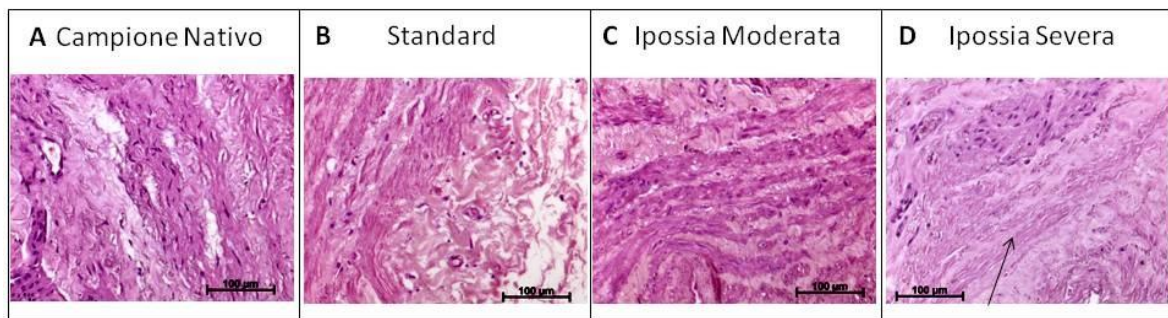


Fig. 4.14: Immagini ottenute al microscopio ottico ad ingrandimento 20X, per individuare le cellule, della tonaca media di sezioni colorate con H&E di segmenti di vena safena umana nativa (A), stimolata in condizioni standard (B), stimolata con ipossia moderata (C) e stimolata con ipossia severa (D). La freccia indica la regione della tonaca media priva di cellule. La barra corrisponde a 100 µm.

Le immagini ottenute con colorazione tricromica di Masson permettono di evidenziare in rosso le fibre muscolari, in blu il collagene e in nero i nuclei cellulari. Le immagini riportate in Fig. 4.15 sono ritenute rappresentative di quanto osservato in tutti i campioni. Esse sono ottenute da sezioni sottoposte a colorazione tricromica di Masson acquisite al microscopio ottico, con ingrandimento 10X, di un campione nativo, cioè a tempo zero (Fig. 4.15 A), di un campione sottoposto a condizioni standard (Fig. 4.15 B), di un campione sottoposto a ipossia moderata (Fig. 4.15 C) e di uno sottoposto a ipossia severa (Fig. 4.15 D). Rispetto al campione nativo si nota che le fibre muscolari sono ben conservate nei campioni stimolati in modo standard e con ipossia moderata, mentre i campioni stimolati con ipossia severa mostrano una forte diminuzione delle fibre muscolari, evidenziata da una minore colorazione rossa in direzione circonferenziale a livello della tonaca media.

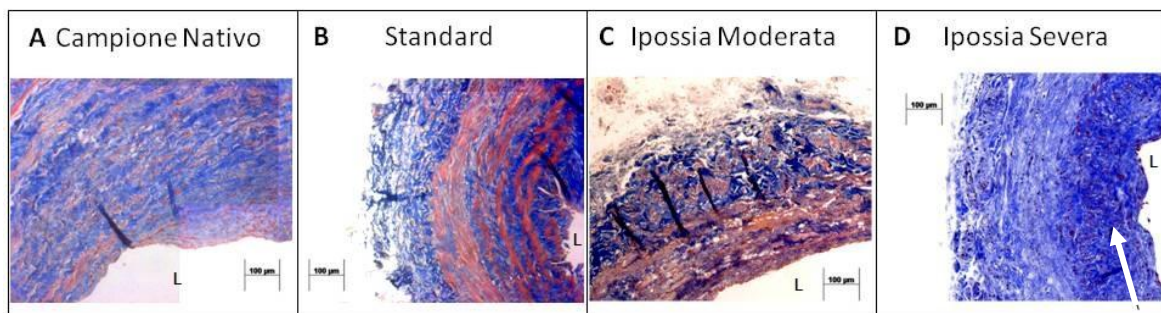


Fig. 4.15: Immagini ottenute al microscopio ottico ad ingrandimento 10X di sezioni, colorate con tricromica di Masson, di segmenti di vena safena umana nativa (A), stimolata in condizioni standard (B), stimolata con ipossia moderata (C) e stimolata con ipossia severa (D). Si evidenziano in rosso le fibre muscolari, in blu il collagene e in nero i nuclei cellulari. La freccia indica la regione nella quale si nota una diminuzione di colorazione rossa, rappresentativa di una riduzione del numero di fibre muscolari. Il lume è indicato con L.

I risultati ottenuti dalla colorazione tricromica di Masson confermano quindi quanto osservato nelle immagini ottenute con colorazione H&E: la struttura della parete viene complessivamente conservata, ma si verifica una diminuzione del contenuto cellulare nella tonaca media nei campioni stimolati con ipossia severa.

Sui campioni biologici, sono state condotte anche analisi in immunofluorescenza.

Le immagini ottenute con le tecniche di immunofluorescenza permettono una migliore valutazione dell'organizzazione delle componenti cellulari presenti nella parete del vaso sanguigno e consentono perciò di rafforzare le considerazioni derivate dall'osservazione delle immagini ricavate con le colorazioni istologiche. Le indagini sono state condotte utilizzando un anticorpo specifico per marcare l' $\alpha$ -actina delle cellule muscolari ( $\alpha$ -SMA), mentre le cellule endoteliali sono state marcate con un anticorpo specifico per il fattore CD31 e tramite un anticorpo per il fattore di von Willebrand; per la colorazione dei nuclei cellulari è stato utilizzato il DAPI (agente intercalante del DNA). Le colorazioni eseguite hanno consentito di colorare in verde le cellule muscolari, in rosso quelle endoteliali e in blu i nuclei cellulari. In Fig. 4.16 sono riportate delle immagini dei campioni nativi, cioè a tempo zero e dei campioni stimolati con ipossia severa per 7 giorni, acquisite con il microscopio confocale a ingrandimento 10X e ritenute rappresentative del comportamento osservato in tutti i campioni condizionati. Le immagini (Fig. 4.16 A e B) mostrano che, stimolando con diversi valori di ossigeno l'avventizia del vaso, non si induce un denudamento endoteliale; infatti dopo una settimana di condizionamento l'endotelio risulta ben conservato. Inoltre nelle immagini in fluorescenza (Fig. 4.16 C e D) si nota un aumento del numero di *vasa vasorum* nella tonaca avventizia dei campioni stimolati rispetto ai campioni nativi. Questo aspetto verrà analizzato in modo approfondito nel capitolo dei risultati dedicato alla misura della *length density* dei *vasa vasorum*.

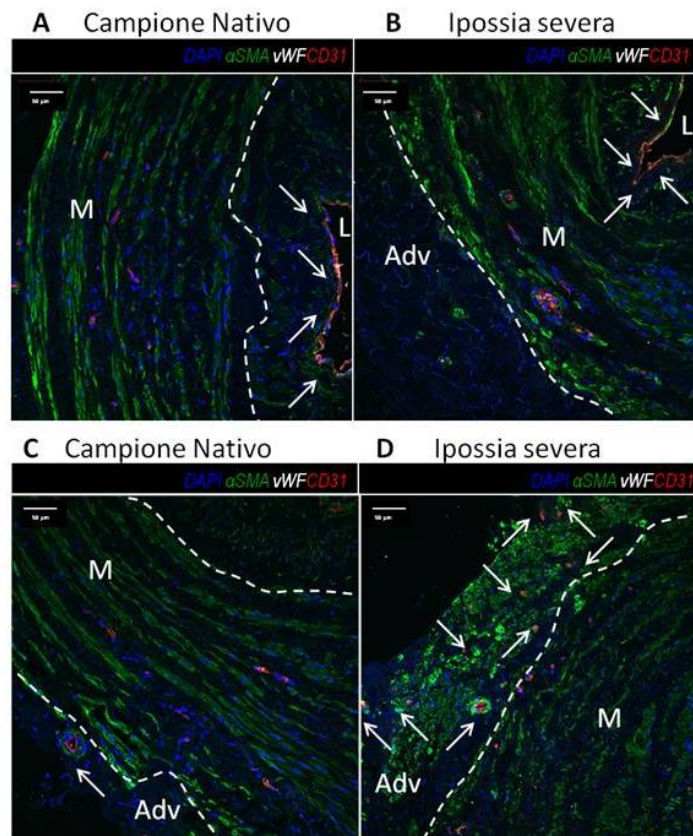


Fig. 4.16: Immagini ottenute al microscopio confocale ad ingrandimento 10X di sezioni di segmenti di vena colorate con tecniche di immunofluorescenza per marcare in blu i nuclei delle cellule con DAPI, in verde le SMC con  $\alpha$ -SMA, in bianco le EC tramite fattore di Von Willebran e in rosso le EC con anticorpo CD31. L, lume; M, media; Adv, avventizia. Le linee bianche tratteggiate demarcano le regioni della parete del vaso. Il confronto tra l'immagine del campione nativo (A) e quello stimolato con ipossia severa (B) mostra la conservazione del lume, con le cellule endoteliali colorate in rosso indicate dalle frecce. Per quanto riguarda la regione avventiziale, il confronto tra l'immagine nativa (C) e quella del campione stimolato con ipossia severa (D) mostra l'aumento del numero di vasa vasorum nella zona avventiziale, indicati dalle frecce. La barra corrisponde a 50  $\mu$ m.

Le immagini ottenute con tecniche di immunofluorescenza confermano quanto evidenziato dalle colorazioni istologiche circa la diminuzione del numero di cellule nella tonaca media. Infatti confrontando i campioni nativi con le immagini ottenute nelle tre condizioni di ossigeno nel lato avventiziale (standard, ipossia moderata e ipossia severa) si nota una perdita dell'organizzazione a livello della tonaca media dei campioni stimolati. In particolare questo effetto è evidente nei campioni del gruppo stimolato con ipossia severa, nei quali la tonaca media risulta spopolata di SMC e si perde la distribuzione ordinata delle cellule in direzione circonferenziale (Fig. 4.17).

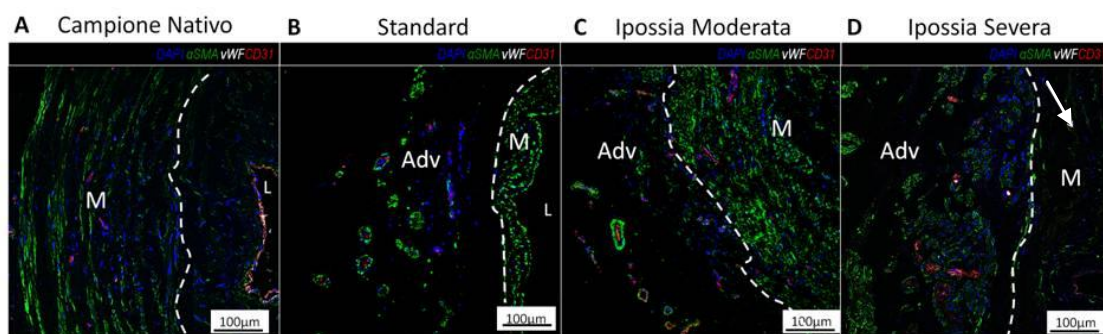


Fig. 4.17: Immagini ottenute al microscopio confocale ad ingrandimento 10X di sezioni di segmenti di vena colorate con tecniche di immunofluorescenza per marcare in blu i nuclei delle cellule con DAPI, in verde le SMC con  $\alpha$ -SMA, in bianco le EC tramite fattore di Von Willebran e in rosso le EC con anticorpo CD31. L, lume; M, media; Adv, avventizia. Le linee bianche tratteggiate demarcano le regioni della parete del vaso. Rispetto al campione nativo (A), i campioni del gruppo standard (B) conservano l'organizzazione delle SMC. Nei campioni stimolati con ipossia moderata (C) si nota una parziale perdita dell'organizzazione cellulare a livello della tonaca media. Nei campioni stimolati con ipossia severa è evidente la perdita di organizzazione cellulare e la diminuzione del numero di EC nella tonaca media, regione indicata dalla freccia. La barra corrisponde a 100  $\mu$ m.

Questo comportamento, riscontrato in tutte le immagini sia nelle colorazioni istologiche che in quelle a fluorescenza, può essere giustificato dal fatto che la tonaca media è la regione della parete con il più basso contenuto di ossigeno, secondo quanto predetto dal modello di consumo cellulare nello spessore della parete sviluppato in un precedente lavoro di tesi [2] e utilizzato per modellizzare la condizione di ipossia severa.

In Fig. 4.18 sono riportati i valori di ossigeno, calcolati a partire dal modello, nei tre strati del vaso (tonaca intima, media e avventizia) nelle tre condizioni di stimolazione (standard, ipossia moderata e ipossia severa).

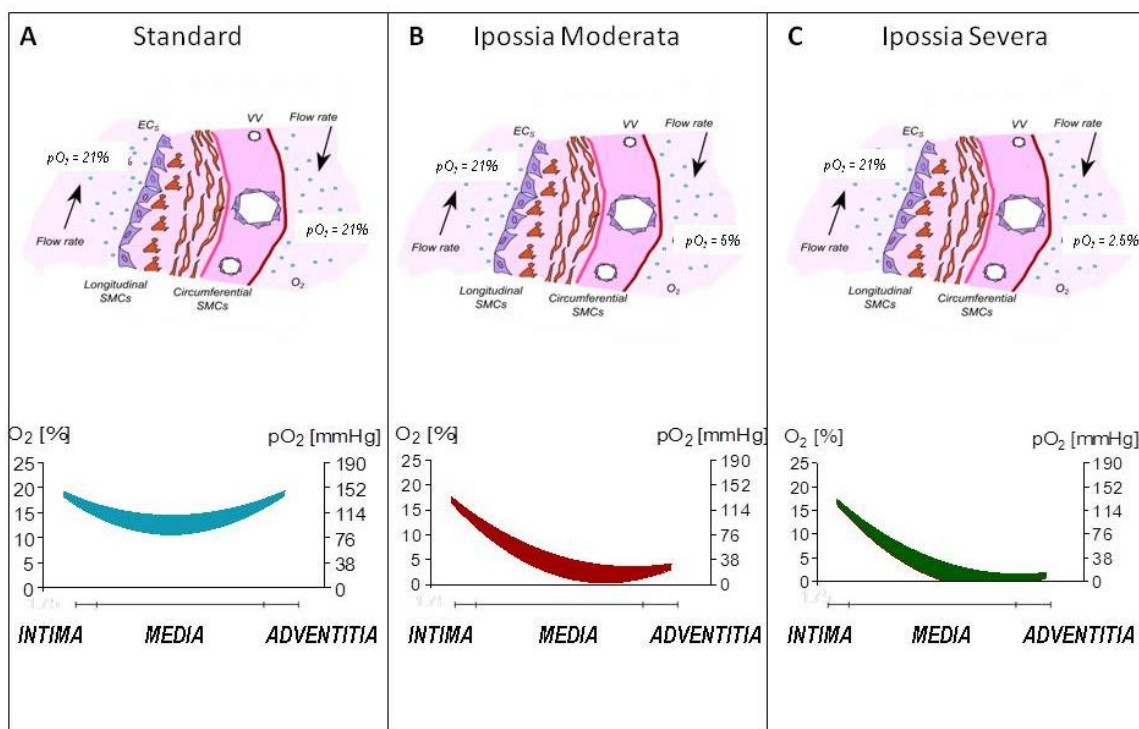


Fig. 4.18: Modello del consumo di ossigeno nello spessore della parete nelle tre condizioni di ossigenazione: standard (A), con ipossia moderata (B) e ipossia severa (C). In tutte e tre le condizioni la tonaca media rappresenta la regione della parete con valore di ossigeno più basso, in particolare nella stimolazione con ipossia severa a livello della tonaca media si raggiunge una concentrazione di ossigeno prossima a zero in un tratto considerevole della parete vascolare.

In particolare nella condizione con ipossia severa nel lato avventiziale, il modello predice un valore di ossigeno nella tonaca media prossimo a zero. Questa condizione è sicuramente sfavorevole per la sopravvivenza cellulare. Le cellule, di conseguenza, possono andare incontro a morte cellulare, colorazioni con saggio TUNEL sono in atto presso il Centro Cardiologico Monzino per verificare questa ipotesi, oppure migrare in una regione della parete con valori di ossigeno più favorevoli alla loro sopravvivenza, in accordo con quanto visto nelle immagini analizzate.

Nella regione avventiziale, esposta a una condizione di ipossia, non si assiste a uno spopolamento cellulare, ma, al contrario, si osservano fenomeni di angiogenesi. Per indagare questo comportamento è stata eseguita la quantificazione della *length density* dei *vasa vasorum* e una valutazione qualitativa della proliferazione cellulare, riportate nei paragrafi successivi.

#### 4.3.2.2. MISURA DELLA *LENGTH DENSITY* DEI VASA VASORUM

Per la stima della *length density* dei *vasa vasorum* sono state acquisite immagini con ingrandimento 40X dei vasi presenti nella tonaca avventizia di ogni campione di vena safena processato. In Fig. 4.19 sono riportate immagini rappresentative di tre *vasa vasorum* di piccolo (4-14  $\mu\text{m}$ ), medio (14-24  $\mu\text{m}$ ) e grande calibro (24-44  $\mu\text{m}$ ). Tutti i *vasa vasorum* appartenenti a queste tre famiglie, osservati nell'avventizia delle sezioni di vena safena colorate con H&E, sono stati acquisiti con ingrandimento 40X e, come illustrato al paragrafo 3.4.3.2, sono state calcolate le lunghezze dell'asse maggiore e dell'asse minore ed è stata calcolata la *length density*.

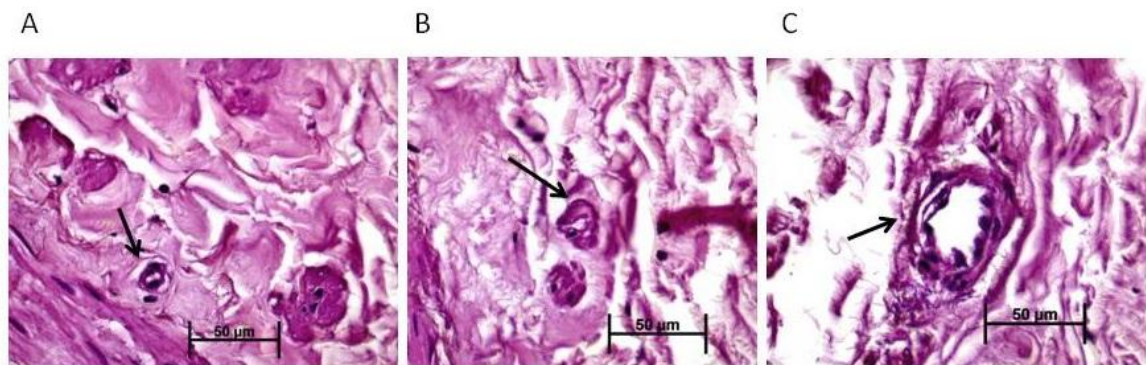


Fig. 4.19: Immagini ottenute al microscopio ottico ad ingrandimento 40X di sezioni di segmenti di vena safena umana colorate con H&E. I *vasa vasorum* acquisiti sono stati divisi in tre famiglie in base alla dimensione dell'asse minore. Nell'immagine A un vaso di piccolo calibro (4-14  $\mu\text{m}$ ), in B uno di medio calibro (14-24  $\mu\text{m}$ ) e in C uno di grande calibro (24-44  $\mu\text{m}$ ). Le frecce indicano i *vasa vasorum*. La barra corrisponde a 50  $\mu\text{m}$ .

I risultati ottenuti dalla misura della *length density* riportati in Fig. 4.20 mostrano un aumento dei *vasa vasorum* di piccolo calibro sia nei campioni condizionati con ipossia severa che in quelli con ipossia moderata, mentre non si evidenzia questo comportamento nei campioni con condizionamento standard. Un test statistico di tipo parametrico è stato applicato ai valori di *length density* per valutare se la differenza tra campione stimolato e campione nativo fosse statisticamente significativa (t-test significativo con P value < 0.05). Tale differenza è statisticamente significativa per i *vasa vasorum* di piccolo e grande calibro nei campioni condizionati con ipossia moderata.

Per ridurre la variabilità nei dati, è necessario aumentare la numerosità del campione statistico.

Questi risultati hanno permesso di confermare che, simulando le condizioni di ossigeno tipiche dell'ambiente aorto-coronarico, si induce sul vaso un rimodellamento adattivo delle cellule vascolari che, in condizioni di ipossia, attivano risposte angiogeniche. Infatti, in accordo con quanto detto nel Capitolo 1 al paragrafo 1.8, condizioni ipossiche attivano una serie di fattori di trascrizione (tra cui HIF-1 $\alpha$  e VEGF) che stimolano la migrazione delle EC e successivamente delle SMC e dei periciti (cellule che andranno a comporre il neo-vaso, insieme alle EC) verso la zona della parete vascolare dove viene generato un nuovo vaso [39].

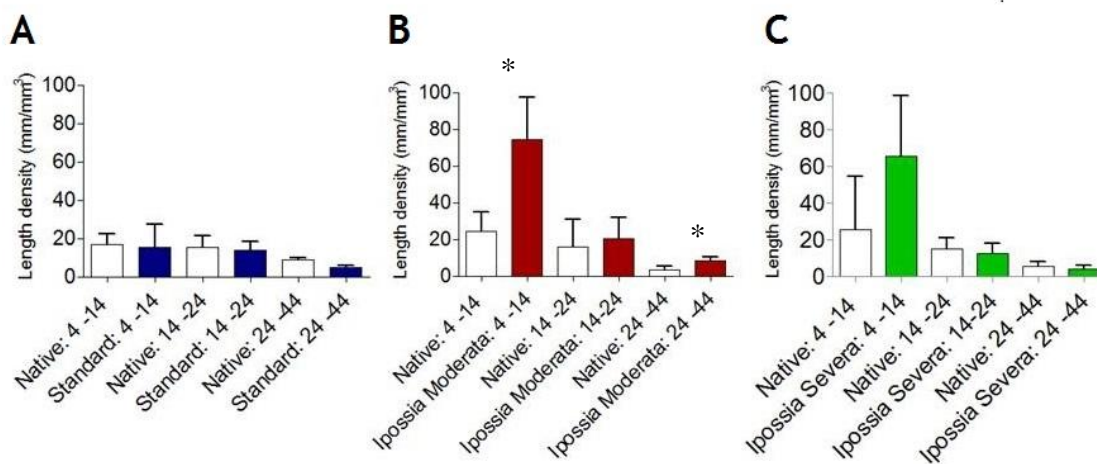


Fig. 4.20: Risultati della misura della length density dei vasa vasorum. **A** gruppo in condizioni standard, **B** gruppo in condizioni di ipossia moderata, **C** gruppo in condizioni di ipossia severa. Sia nei campioni con ipossia moderata che quelli con ipossia severa, si nota un evidente incremento della length density dei vasa vasorum di piccolo calibro. Nei campioni stimolati con ipossia moderata la differenza di length density si è dimostrata statisticamente significativa (\*= P value < 0.05) per quanto riguarda i vasa vasorum di piccolo e grande calibro.

#### 4.3.2.3. ANALISI DELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE

Un'ulteriore valutazione è stata effettuata sulla proliferazione delle cellule presenti nel tessuto in seguito alla stimolazione in diverse condizioni di ossigeno. Sono state condotte analisi istochimiche volte all'identificazione del marcatore Ki67 per la proliferazione cellulare nelle condizioni standard, con ipossia moderata e con ipossia severa rispetto al campione nativo.

Le sezioni sono state acquisite con il microscopio ottico ad un ingrandimento 20X e sulle immagini sono state svolte analisi qualitative. In Fig. 4.21 sono riportate immagini

rappresentative del comportamento ottenuto nelle tre condizioni di stimolazione rispetto al campione nativo. Ciò che si osserva è un aumento del numero di cellule proliferanti nelle condizioni con ipossia moderata (Fig. 4.21 C) e severa (Fig. 4.21 D), mentre nei campioni con stimolazione standard (Fig. 4.21 B) il numero di cellule proliferanti risulta simile a quello nei campioni nativi (Fig. 4.21 A). Questa evidenza è in accordo con quanto riscontrato in letteratura [63].

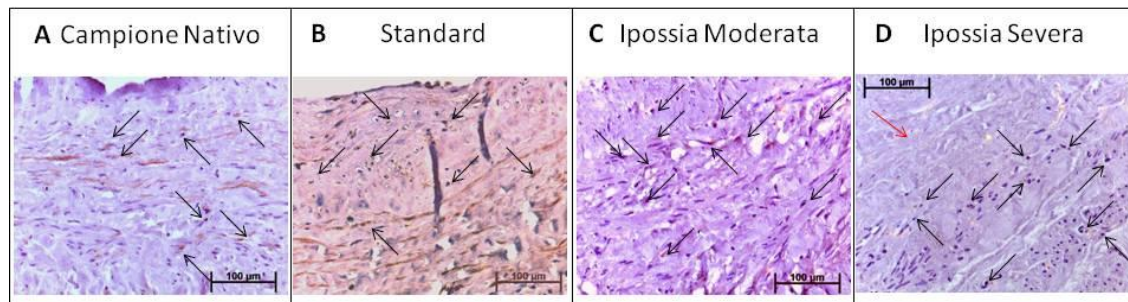


Fig. 4.21: Immagini ottenute al microscopio ottico ad ingrandimento 20X di sezioni di segmenti di vena safena umana nativa (A), stimolata in condizioni standard (B), stimolata con ipossia moderata (C) e stimolata con ipossia severa (D). Le frecce nere indicano le cellule proliferanti, distinguibili dalle altre in quanto il nucleo cellulare è più scuro (marrone) per la presenza del marcatore specifico Ki67. La freccia rossa nell'immagine D indica la zona a livello della tonaca media che risulta spopolata di cellule. La

La presenza di cellule proliferanti nelle condizioni di stimolazione con ipossia moderata e ipossia severa può essere giustificata dalla risposta adattativa del tessuto alle nuove condizioni di ossigeno; infatti la necessità di migliorare l'approvvigionamento di ossigeno da parte del tessuto innesca fenomeni di angiogenesi, come dimostrato anche dai valori di *length density* ottenuti al paragrafo 4.3.2.2, che possono spiegare l'aumento di cellule proliferanti riscontrato nelle immagini ottenute con tecniche di immunohistochimica. Ulteriori analisi quantitative della proliferazione cellulare devono essere condotte per verificare questa ipotesi.

## 5. CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

Il lavoro di tesi, svolto presso il Laboratorio di Micro e Biofluidica Sperimentale ( $\mu$ BSLab) del Dipartimento di Elettronica, Informazione e Bioingegneria (DEIB), s'inserisce all'interno di un progetto più ampio, svolto in collaborazione con il gruppo di ricerca del Laboratorio di Ingegneria Tissutale Cardiovascolare (LIT) dell'IRCCS Centro Cardiologico Monzino con il fine ultimo di comprendere i meccanismi cellulari che concorrono allo sviluppo delle patologie della vena safena, per consentire, in prospettiva, l'individuazione di un trattamento di prevenzione o cura del *vein graft disease* (VGD).

In una prima fase, il progetto di tesi ha previsto la caratterizzazione di sistema di coltura *ex vivo* bicompartimentale progettato in precedenti lavori di tesi [1][2]. Il sistema consente di esporre il lato luminale e quello avventiziale della vena a diverse condizioni di ossigeno, cioè la tensione luminale viene mantenuta a livelli tipicamente arteriosi (pari a 149.6 mmHg) mentre la presenza di un modulo de-ossigenante permette di esporre la tonaca avventizia a valori di ossigeno inferiori. Il de-ossigenatore è composto da un tubo in silicone lungo 40 cm (L40) alloggiato in una camera, realizzata con un tubo falcon, all'interno della quale viene iniettata una miscela di azoto. Per de-ossigenare il mezzo che scorre nel tubo, esso sfrutta il fenomeno di diffusione dell'ossigeno attraverso la parete, guidata da una differenza di concentrazione di ossigeno tra interno ed esterno. La caratterizzazione è stata eseguita utilizzando un sensore di ossigeno non invasivo in grado di rilevare la concentrazione di ossigeno, e quindi la pressione parziale, all'interno del mezzo di coltura. Le prove di caratterizzazione sono state svolte sia senza ricircolo del mezzo, per valutare le performance del modulo de-ossigenante isolato dal sistema di coltura, sia con ricircolo del mezzo per verificare i valori di concentrazione di ossigeno ottenuti nel compartimento avventiziale nelle reali condizioni di funzionamento. Grazie a questa campagna sperimentale è stato verificato che il valore minimo di concentrazione di ossigeno che si riesce a raggiungere nel lato avventiziale è in un range compreso tra 38 e 45 mmHg.

Il sistema di coltura, e in particolare il modulo de-ossigenante, è stato successivamente ottimizzato aumentando la lunghezza del tubo in silicone fino a 100 cm all'interno del de-ossigenatore (L100). La nuova versione del modulo de-ossigenante è stata caratterizzata

approfonditamente sia da un punto di vista idraulico, sia in termini di pressione parziale di ossigeno che si riesce a raggiungere. La versione ottimizzata del de-ossigenatore è risultata compatibile con il sistema in quanto non introduce nel circuito del modulo de-ossigenante zone a pressione troppo elevata. L'ottimizzazione ha permesso di disporre di un de-ossigenatore in grado di generare condizioni di ossigeno controllabili variando la composizione della miscela iniettata al suo interno. Il valore minimo che esso è in grado di produrre sul lato avventiziale del campione è in un range compreso tra 23 e 26 mmHg, che corrispondono al 2.5-3%. Il de-ossigenatore L100 è stato infatti utilizzato per prove sperimentali sia sfruttando il suo limite inferiore di funzionamento, sia regolando la composizione della miscela per controllare il valore di pressione parziale di ossigeno che impone al sistema.

In previsione futura, avere a disposizione un sistema controllabile risulta essere un grande vantaggio in quanto offre la possibilità di sviluppare un sistema retroazionato per stimolare i campioni in modo automatizzato con valori di ossigeno impostati dall'utente. Nel dettaglio, si potrebbe sviluppare un dispositivo (grazie alla piattaforma Arduino) in grado di acquisire il valore di  $pO_2$  registrato *real time* dal sensore di ossigeno e regolare di conseguenza il funzionamento di flussimetri, attualmente disponibili in commercio, per la misura e il controllo della portata di gas in modo tale da mantenere nel sistema bicompartimentale il valore di ossigeno stabilito dall'utente (Fig.5.1 a). In questo modo durante l'intera durata di un esperimento può essere mantenuta costante la condizione di stimolazione del campione biologico. In alternativa, un sistema retroazionato di questo tipo permetterebbe di stimolare il campione con condizioni di ossigeno specifiche durante la durata dell'esperimento. Ad esempio, sarebbe possibile simulare lo shock iniziale, dovuto alla rimozione dei *vasa vasorum*, applicando una condizione di ipossia severa, quindi in una seconda fase dell'esperimento si potrebbe impostare il dispositivo in modo tale da generare una stimolazione con valori di ossigeno crescenti. Un pattern di stimolazione di questo tipo consente di verificare la risposta indotta nel tessuto da un danno da riperfusione. In Fig.5.1 b è mostrato un esempio di un possibile pattern di stimolazione per simulare due diverse condizioni di ipossia durante l'esperimento.

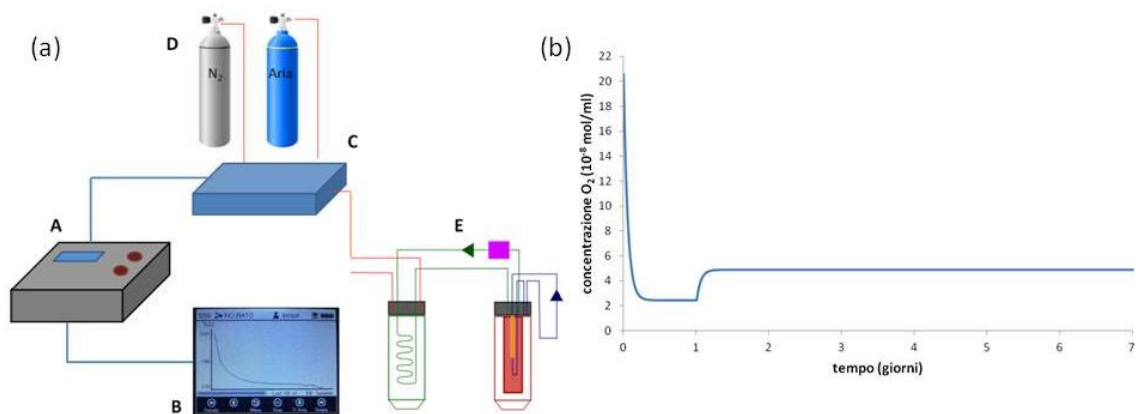


Fig.5.1: Immagine esemplificativa di un possibile sistema di regolazione automatica dei valori di ossigeno nel compartimento avventiziale (a) e di un possibile pattern di stimolazione che si può indurre con questa piattaforma (b). Il sistema automatizzato prevede la presenza di una centralina di controllo (A) in grado di acquisire i valori di  $pO_2$  registrati dal sensore di ossigeno (B) e gestire dei regolatori di portata di gas (C) collegati alle bombole dei gas (D). In questo modo la miscela di gas che viene iniettata nel de-ossigenatore consente di mantenere i valori di concentrazione di ossigeno nel sistema di coltura (E) a un livello impostato dall'utente.

Parallelamente al lavoro di caratterizzazione e ottimizzazione del sistema di coltura *ex vivo* è stato sviluppato un modello analitico in grado di predire l'andamento della pressione parziale di ossigeno nel compartimento avventiziale. Il modello ha permesso di stabilire come gli elementi del sistema influiscono sul valore minimo di ossigeno raggiunto nel mezzo di coltura avventiziale. In particolare, osservando le predizioni del modello, si evince che una possibile strategia per migliorare ulteriormente le performance del modulo de-ossigenante consiste nel sostituire gli elementi di cui è composto con elementi analoghi realizzati con materiali con una permeabilità all'ossigeno più bassa o con proprietà geometriche che sfavoriscano la diffusione dell'ossigeno attraverso essi. Ad esempio, i connettori luer, attualmente in polipropilene, possono essere sostituiti dai connettori luer disponibili in commercio in Kynar® polivinilidenefluoruro (PVDF), materiale a più bassa permeabilità all'ossigeno. Un'altra soluzione possibile consiste nell'aumentare lo spessore dei tubi che compongono il circuito de-ossigenante.

Nella fase finale del progetto di tesi, il sistema di coltura è stato utilizzato, presso il LIT del IRCCS Centro Cardiologico Monzino, per condizionare *ex vivo* segmenti di vena safena

umana. Utilizzando il de-ossigenatore L40 e il de-ossigenatore L100, i campioni sono stati sottoposti a tre diverse condizioni di ossigeno nel lato avventiziale:

- condizione standard: lato avventiziale esposto a una  $pO_2$  di circa 149.6 mmHg (21%)
- condizione di ipossia moderata: lato avventiziale esposto a una  $pO_2$  di circa 38 mmHg (5%)
- condizione di ipossia severa: lato avventiziale esposto a una  $pO_2$  di circa 19 mmHg (2.5%)

I valori di ossigeno sono stati monitorati durante l'esperimento e, osservando gli andamenti registrati, si nota un picco positivo di ossigeno in corrispondenza del cambio del mezzo di coltura, nonostante il mezzo fresco fosse stato precedentemente alloggiato all'interno di una camera contenente azoto per diminuire la concentrazione di ossigeno al suo interno. Il picco di ossigeno quasi istantaneo cui sono esposte le cellule in questa fase potrebbe indurre uno shock alla componente cellulare e instaurare nel tessuto meccanismi non desiderati; per evitare questa criticità, in futuro, si dovrebbe aggiungere un secondo circuito ausiliario, azionato solo nel momento in cui deve essere effettuato il ricambio parziale del mezzo, tramite il quale prima si de-ossigena il mezzo di coltura fresco fino a raggiungere una pressione parziale di ossigeno uguale a quella nel comparto avventiziale e successivamente si procede con il ricambio automatico del mezzo di coltura. Questa soluzione impone di sviluppare un sistema automatico di cambio mezzo, che rappresenterebbe un importante valore aggiunto per questo tipo di applicazione.

Inoltre, analizzando i tracciati di ossigeno ottenuti nei campioni stimolati con ipossia severa, si osserva in due casi una seconda discesa nel valore di tensione di ossigeno a fine esperimento. Per trovare una giustificazione a questo comportamento è necessario aumentare la numerosità dei campioni ed effettuare ulteriori analisi. Per comprendere se tale comportamento sia da attribuire ad una proliferazione batterica localizzata a livello della camera di misura sono in corso analisi microbiologiche sui campioni di medium prelevati durante la coltura, mentre per attribuire questo comportamento a un aumento significativo del numero di cellule nel tessuto è indispensabile un'approfondita analisi quantitativa della densità cellulare, tramite immunofluorescenza e marcatura delle EC e delle SMC con anticorpi specifici, e della proliferazione cellulare, tramite tecniche di immunistochemical (Ki67).

Per indagare gli eventi coinvolti nello sviluppo del VGD che s'instaurano a medio termine, si potrebbe estendere il tempo dell'esperimento con le vene safene umane. Infatti, in accordo con quanto visto in letteratura, i meccanismi coinvolti nel VGD progrediscono con una tempistica ben definita che si sviluppa a partire dall'impianto del vaso in sede di bypass aorto-coronarico fino al suo fallimento a distanza di anni [37]. Effettuando prove di 21 o 28 giorni con le vene, si possono valutare modifiche strutturali del tessuto che si innescano nel primo mese dopo l'impianto.

Infine i campioni biologici sono stati sottoposti a colorazioni istologiche (Ematossilina e Eosina e tricromica di Masson) e sono state effettuate analisi di immunofluorescenza con anticorpi per marcare le cellule target ( $\alpha$ -SMA per marcare le cellule muscolari lisce, CD31 e fattore di von Willebrand per marcare le cellule endoteliali) per analizzare i cambiamenti indotti nel tessuto dalle diverse condizioni di ossigeno nel lato avventiziale (standard, ipossia moderata e ipossia severa). I risultati hanno evidenziato una buona conservazione della struttura globale della parete venosa, ma nel caso di condizionamento con ipossia severa si è notato uno spopolamento e una perdita di organizzazione delle cellule a livello della tonaca media. Questa evidenza è giustificata dal modello di consumo di ossigeno cellulare sviluppato in un lavoro precedente [2], secondo il quale, imponendo nel lato avventiziale una pressione parziale di ossigeno pari a 19 mmHg, nella tonaca media si raggiunge un valore di ossigeno prossimo allo zero, che può provocare morte o migrazione cellulare. Questo aspetto deve essere approfondito con ulteriori indagini; per verificare la presenza di cellule apoptotiche i campioni possono essere sottoposti al saggio Tunel, mentre per verificare la migrazione cellulare possono essere applicate le tecniche di zimografia per verificare l'attivazione delle metalloproteasi (MMP2 e MMP9), responsabili della degradazione della matrice extracellulare, necessaria per consentire alle cellule di migrare verso le zone con una condizione di ossigeno più favorevole.

Le immagini ottenute con le tecniche di immunofluorescenza hanno rivelato un aumento del numero di *vasa vasorum* di piccola dimensione nell'avventizia dei campioni stimolati con ipossia moderata e severa. La misura quantitativa della *length density* ha confermato questo comportamento. Questa evidenza dimostra che l'ipossia è uno stimolo in grado di produrre fenomeni di angiogenesi ed è in accordo con quanto descritto in letteratura [41].

Studiare in modo più approfondito questi meccanismi e le possibili strategie per contrastarli, può suggerire delle possibili strategie per limitare, in previsione futura, gli eventi che portano al fallimento del graft venoso.

Infine sono state condotte analisi qualitative su immagini ottenute con tecniche di immunoistochimica con marcatore Ki67 per indagare la proliferazione cellulare. I risultati hanno suggerito un aumento della proliferazione cellulare nei campioni stimolati con ipossia moderata e severa, in accordo con quanto visto circa l'aumento dei fenomeni angiogenici, ma una quantificazione si rende necessaria per una stima più approfondita della proliferazione in ogni regione della parete vascolare. L'analisi quantitativa della proliferazione cellulare dovrebbe essere condotta nelle tre aree che compongono la parete del vaso, solo le cellule proliferanti presenti nella regione avventiziale concorrono infatti allo sviluppo di fenomeni angiogenici.

In conclusione, il sistema bicompartimentale di coltura oggetto del lavoro di tesi si è dimostrato uno strumento utile per lo studio dei fenomeni coinvolti nell'insorgenza del VGD della vena safena utilizzata come bypass aorto-coronarico.

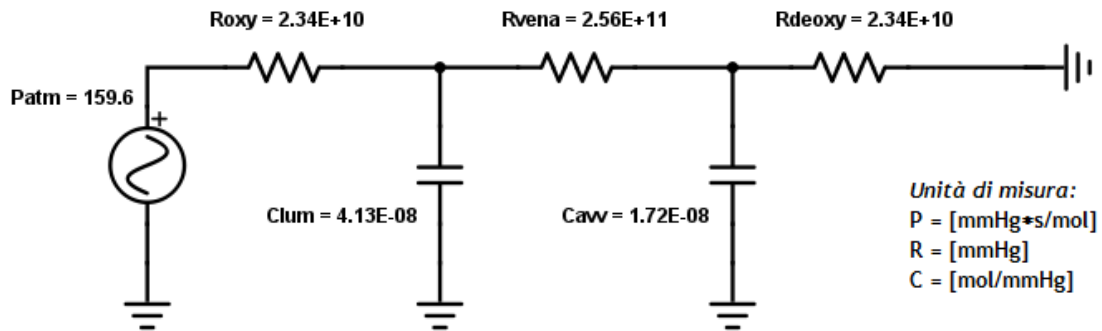
Questo sistema ha consentito di condizionare campioni di vena safena umana per almeno 7 giorni, con il fine di comprendere gli effetti indotti sul tessuto da diverse condizioni di ossigeno nel compartimento luminale e in quello avventiziale. Durante il presente lavoro di tesi, infatti, il sistema di coltura è stato ottimizzato in modo tale da stimolare la vena safena umana in condizioni controllate e regolabili di ossigeno. Il sistema di misura utilizzato durante le prove di caratterizzazione si è rivelato affidabile e adatto a valutare l'efficacia del modulo de-ossigenante presente all'interno del sistema di coltura. Inoltre, il modello analitico che è stato messo a punto, fornisce importanti indicazioni predittive del comportamento del sistema in termini di pressione parziale di ossigeno e suggerisce strategie per migliorare ulteriormente l'efficacia del sistema di coltura.

Dal punto di vista biologico, infine, l'approccio bioingegneristico impiegato durante il presente lavoro di tesi, ha permesso di dimostrare con evidenze sperimentali la presenza di una risposta adattativa della parete del vaso di tipo angiogenico in seguito a stimoli di ipossia. In previsione futura, questo approccio può essere utilizzato per esaminare le potenzialità di possibili terapie farmacologiche volte a limitare l'insorgenza della risposta patologica, con lo scopo finale di limitare lo sviluppo del VGD e il conseguente fallimento del graft.

# APPENDICE A

## Soluzioni analitiche modello

### Soluzione del modello



Il sistema di coltura è stato modellizzato con un circuito del secondo ordine con due capacità.

Inserendo le equazioni caratteristiche degli elementi che costituiscono il sistema (resistenze, capacità e generatore ideale di tensione) nelle equazioni alle maglie e ai nodi del circuito si ottiene:

$$\begin{cases} C_{lum} \cdot \frac{dp_{lum}}{dt} + p_{lum} \cdot \left( \frac{1}{R_{vena}} + \frac{1}{R_{oxy}} \right) = \frac{p_{avv}}{R_{vena}} - \frac{p_{atm}}{R_{oxy}} & (1) \\ C_{avv} \cdot \frac{dp_{avv}}{dt} + p_{avv} \cdot \left( \frac{1}{R_{deoxy}} + \frac{1}{R_{vena}} \right) = \frac{p_{lum}}{R_{vena}} & (2) \end{cases}$$

L'equazione di stato di un generico circuito in forma matriciale è:

$$\underline{D} \cdot \dot{x}(t) = -\underline{H} \cdot x(t) + \underline{g}(t), \quad t \geq 0 \quad (3)$$

Riordinando le equazioni del circuito da risolvere (1) e (2) si ottiene quindi:

$$\begin{cases} C_{lum} \cdot \frac{dp_{lum}}{dt} = -p_{lum} \cdot \left( \frac{R_{vena} + R_{oxy}}{R_{vena} \cdot R_{oxy}} \right) - p_{avv} \cdot \frac{1}{R_{vena}} - \frac{p_{atm}}{R_{oxy}} \\ C_{avv} \cdot \frac{dp_{avv}}{dt} = -p_{avv} \cdot \left( \frac{R_{vena} + R_{deoxy}}{R_{vena} \cdot R_{deoxy}} \right) + p_{lum} \cdot \frac{1}{R_{vena}} \end{cases} \quad (4)$$

$$\begin{cases} C_{lum} \cdot \frac{dp_{lum}}{dt} = -p_{lum} \cdot \left( \frac{R_{vena} + R_{oxy}}{R_{vena} \cdot R_{oxy}} \right) - p_{avv} \cdot \frac{1}{R_{vena}} - \frac{p_{atm}}{R_{oxy}} \\ C_{avv} \cdot \frac{dp_{avv}}{dt} = -p_{avv} \cdot \left( \frac{R_{vena} + R_{deoxy}}{R_{vena} \cdot R_{deoxy}} \right) + p_{lum} \cdot \frac{1}{R_{vena}} \end{cases} \quad (5)$$

Da qui si ricavano le matrici dell'equazione di stato del circuito:

$$\underline{D} = \begin{bmatrix} d_1 & 0 \\ 0 & d_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} C_{lum} & 0 \\ 0 & C_{avv} \end{bmatrix} \quad (6)$$

$$\underline{x} = \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} p_{lum} \\ p_{avv} \end{bmatrix} \quad (7)$$

$$\underline{H} = \begin{bmatrix} h_{11} & h_{12} \\ h_{21} & h_{22} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \frac{R_{vena} + R_{deoxy}}{R_{vena} \cdot R_{oxy}} & \frac{1}{R_{vena}} \\ \frac{1}{R_{vena}} & \frac{R_{vena} + R_{deoxy}}{R_{vena} \cdot R_{deoxy}} \end{bmatrix} \quad (8)$$

$$\underline{g} = \begin{bmatrix} g_1 \\ g_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} p_{atm} \\ 0 \end{bmatrix} \quad (9)$$

$$\underline{x}(t_0 = 0) = \begin{bmatrix} X_{10} \\ X_{20} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} p_{atm} \\ p_{atm} \end{bmatrix} \quad (10)$$

Esprimendo le equazioni del circuito in funzione delle matrici si ricava:

$$\begin{cases} \dot{x}_1 = -\frac{h_{11}}{d_1} \cdot x_1 - \frac{h_{12}}{d_1} \cdot x_2 + \frac{g_1}{d_1} \end{cases} \quad (11)$$

$$\begin{cases} \dot{x}_2 = \frac{h_{21}}{d_2} \cdot x_1 - \frac{h_{22}}{d_2} \cdot x_2 \end{cases} \quad (12)$$

Si sceglie di risolvere l'equazione di  $x_2$  in quanto è quella di interesse perché rappresenta l'andamento nel tempo della pressione parziale di ossigeno nel compartimento avventiziale; analogamente il circuito può essere risolto per ricavare l'andamento di  $x_1$  nel tempo (cioè l'andamento della tensione di ossigeno nel compartimento luminale).

Quindi si esprime  $x_1$  a partire dall'equazione (12):

$$x_1 = \frac{d_2}{h_{21}} \cdot \left( \dot{x}_2 + \frac{h_{22}}{d_2} \cdot x_2 \right), \quad h_{21} \neq 0 \quad (13)$$

Derivando  $\dot{x}_2$  nel tempo e inserendo le equazioni (11) e (13) si ottiene:

$$\ddot{x}_2 = \dot{x}_2 \cdot \left( \frac{d_2 \cdot h_{11} + d_1 \cdot h_{22}}{d_1 \cdot d_2} \right) - x_2 \cdot \left( \frac{h_{11} \cdot h_{22} + h_{21} \cdot h_{12}}{d_1 \cdot d_2} \right) + \frac{h_{21}}{d_1 \cdot d_2} \cdot g_1 \quad (14)$$

Per risolvere l'equazione si impostano dei coefficienti:

$$\alpha = \frac{1}{2} \cdot \left( \frac{h_{11}}{d_1} + \frac{h_{22}}{d_2} \right) \quad (15)$$

$$\omega^2 = \frac{h_{11} \cdot h_{22} + h_{21} \cdot h_{12}}{d_1 \cdot d_2} \quad (16)$$

$$G_1(t) = \frac{h_{21}}{d_1 \cdot d_2} \cdot g_1(t) \quad (17)$$

Si ricava così il problema di Cauchy, dato dall'equazione (14), sistemata con i coefficienti (15), (16) e (17), e dalle condizioni iniziali come espresso di seguito:

$$\begin{cases} \ddot{x}_2(t) + 2\alpha \cdot \dot{x}_2(t) + \omega^2 \cdot x_2(t) = G_1(t) & (18) \\ x_2(t_0) = X_{20} & (19) \\ \dot{x}_2(t = t_0^+) = \frac{h_{21}}{d_2} \cdot X_{10} - \frac{h_{22}}{d_2} \cdot X_{20} & (20) \end{cases}$$

La soluzione del problema di Cauchy è data da:

$$x_2(t) = x_{Lo}(t) + x_{Lp}(t) \quad (21)$$

cioè da un termine transitorio,  $x_{Lo}$ , dato dall'integrale dell'omogenea associata, e da un termine di regime dato dall'integrale particolare dell'equazione differenziale.

Nello specifico l'integrale dell'omogenea associata è:

$$\ddot{x}_2 + 2\alpha \dot{x}_2 + \omega^2 x_2 = 0 \quad (22)$$

Da cui si ottiene il polinomio caratteristico:

$$\lambda^2 + 2\alpha\lambda + \omega^2 = 0 \quad (23)$$

Risolto il polinomio caratteristico si ottiene la soluzione di  $x_{Lo}$ :

$$x_{Lo}(t) = k_1 \cdot e^{\lambda_1 t} + k_2 \cdot e^{\lambda_2 t} \quad (24)$$

La soluzione a regime si ricava trasformando i condensatori in circuiti aperti ed è pari a:

$$x_{Lp}(t) = p_{atm} \cdot \frac{R_{deoxy}}{R_{deoxy} + R_{vena} + R_{oxy}} \quad (25)$$

Inserendo le espressioni di  $x_{Lo}$  (24) e  $x_{Lp}$  (25) nell'equazione (21) si ottiene la soluzione:

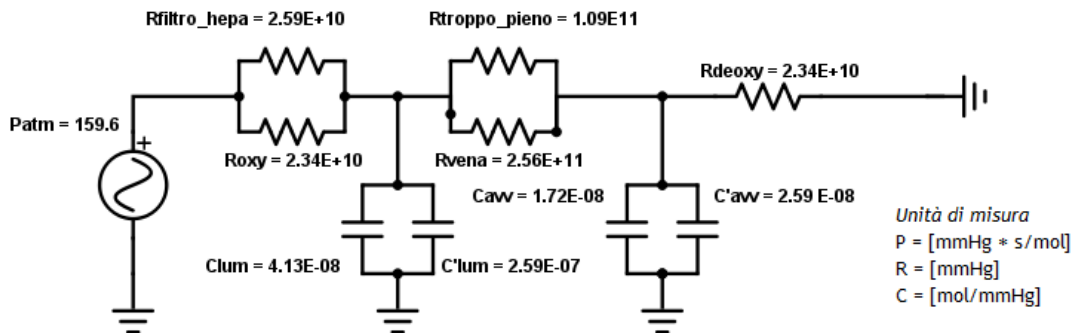
$$x_2(t) = k_1 \cdot e^{\lambda_1 t} + k_2 \cdot e^{\lambda_2 t} + p_{atm} \cdot \frac{R_{deoxy}}{R_{deoxy} + R_{vena} + R_{oxy}} \quad (26)$$

Le costanti  $k_1$  e  $k_2$  si ricavano dalle equazioni (19) e (20) e risultano:

$$\begin{cases} k_1 = X_{20} + \frac{\lambda_1}{\lambda_2 - \lambda_1} \cdot X_{20} - \frac{h_{21}}{d_2} \cdot \frac{1}{\lambda_2 - \lambda_1} \cdot X_{10} + \frac{h_{22}}{d_2} \cdot \frac{1}{\lambda_2 - \lambda_1} \cdot X_{20} - x_{Lp} \\ k_2 = -\frac{\lambda_1}{\lambda_2 - \lambda_1} \cdot X_{20} + \frac{h_{21}}{d_2} \cdot \frac{1}{\lambda_2 - \lambda_1} \cdot X_{10} - \frac{h_{22}}{d_2} \cdot \frac{1}{\lambda_2 - \lambda_1} \cdot X_{20} \end{cases} \quad (27)$$

$$\quad (28)$$

## Modello accurato



Il primo passaggio per la soluzione analitica della versione accurata del modello consiste nel sostituire le resistenze  $R_{\text{filtro\_hepa}}$  e  $R_{\text{oxy}}$  con la resistenza equivalente in parallelo ( $R_{\text{ho}}$ ), le resistenze  $R_{\text{troppo\_pieno}}$  e  $R_{\text{vena}}$  con la resistenza equivalente in parallelo ( $R_{\text{tv}}$ ), le capacità  $C_{\text{lum}}$  e  $C'_{\text{lum}}$  con l'equivalente capacità in parallelo ( $C_{\text{lum}}^*$ ) e le capacità  $C_{\text{avv}}$  e  $C'_{\text{avv}}$  con la capacità equivalente in parallelo ( $C_{\text{avv}}^*$ ).

Inserendo le equazioni caratteristiche degli elementi che costituiscono il sistema (resistenze, capacità e generatore ideale di tensione) nelle equazioni alle maglie e ai nodi del circuito si ottiene:

$$\left\{ \begin{array}{l} C_{\text{lum}}^* \cdot \frac{dp_{\text{lum}}}{dt} + p_{\text{lum}} \cdot \left( \frac{1}{R_{\text{tv}}} + \frac{1}{R_{\text{ho}}} \right) = \frac{p_{\text{avv}}}{R_{\text{tv}}} - \frac{p_{\text{atm}}}{R_{\text{ho}}} \end{array} \right. \quad (29)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} C_{\text{avv}}^* \cdot \frac{dp_{\text{avv}}}{dt} + p_{\text{avv}} \cdot \left( \frac{1}{R_{\text{deoxy}}} + \frac{1}{R_{\text{tv}}} \right) = \frac{p_{\text{lum}}}{R_{\text{tv}}} \end{array} \right. \quad (30)$$

Riordinando si ottiene:

$$\left\{ \begin{array}{l} C_{\text{lum}}^* \cdot \frac{dp_{\text{lum}}}{dt} = -p_{\text{lum}} \cdot \left( \frac{R_{\text{tv}} + R_{\text{ho}}}{R_{\text{tv}} \cdot R_{\text{ho}}} \right) - p_{\text{avv}} \cdot \frac{1}{R_{\text{tv}}} - \frac{p_{\text{atm}}}{R_{\text{ho}}} \end{array} \right. \quad (31)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} C_{\text{avv}}^* \cdot \frac{dp_{\text{avv}}}{dt} = -p_{\text{avv}} \cdot \left( \frac{R_{\text{tv}} + R_{\text{deoxy}}}{R_{\text{tv}} \cdot R_{\text{deoxy}}} \right) + p_{\text{lum}} \cdot \frac{1}{R_{\text{tv}}} \end{array} \right. \quad (32)$$

Da qui si ricavano le matrici presenti nell'equazione di stato del circuito:

$$\underline{D} = \begin{bmatrix} d_1 & 0 \\ 0 & d_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} C_{\text{lum}}^* & 0 \\ 0 & C_{\text{avv}}^* \end{bmatrix} \quad (33)$$

$$x = \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} p_{\text{lum}} \\ p_{\text{avv}} \end{bmatrix} \quad (34)$$

$$\underline{H} = \begin{bmatrix} h_{11} & h_{12} \\ h_{21} & h_{22} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \frac{R_{\text{tv}} + R_{\text{deoxy}}}{R_{\text{tv}} \cdot R_{\text{ho}}} & \frac{1}{R_{\text{tv}}} \\ \frac{1}{R_{\text{tv}}} & \frac{R_{\text{tv}} + R_{\text{deoxy}}}{R_{\text{tv}} \cdot R_{\text{deoxy}}} \end{bmatrix} \quad (35)$$

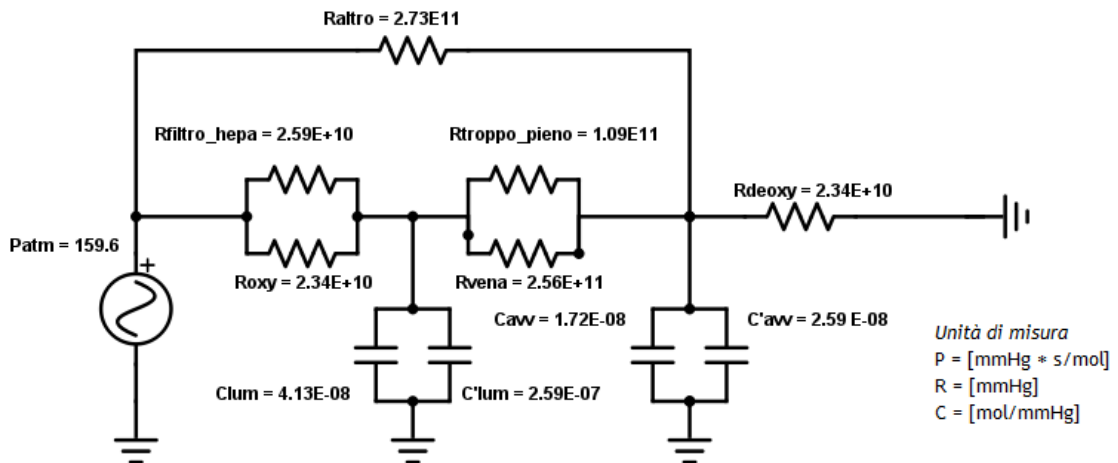
$$\underline{g} = \begin{bmatrix} g_1 \\ g_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} p_{atm} \\ 0 \end{bmatrix} \quad (36)$$

$$\underline{x}(t_0 = 0) = \begin{bmatrix} X_{10} \\ X_{20} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} p_{atm} \\ p_{atm} \end{bmatrix} \quad (37)$$

La soluzione ricalca esattamente quella della prima versione del modello e inserendo i valori tipici della versione accurata si ottiene la soluzione analitica:

$$x_2(t) = l_1 \cdot e^{\lambda_1 t} + l_2 \cdot e^{\lambda_2 t} + p_{atm} \cdot \frac{R_{deoxy}}{R_{deoxy} + R_{tv} + R_{ho}} \quad (38)$$

## Modello finale



Anche in questo caso per ottenere la soluzione analitica il primo passaggio consiste nel sostituire le resistenze  $R_{filtro\_hepa}$  e  $R_{oxy}$  con la resistenza equivalente in parallelo ( $R_{ho}$ ), le resistenze  $R_{troppo\_pieno}$  e  $R_{vena}$  con la resistenza equivalente in parallelo ( $R_{tv}$ ), le capacità  $C_{lum}$  e  $C'_{lum}$  con l'equivalente capacità in parallelo ( $C_{lum}^*$ ) e le capacità  $C_{avv}$  e  $C'_{avv}$  con la capacità equivalente in parallelo ( $C_{avv}^*$ ).

Inserendo le equazioni caratteristiche degli elementi che costituiscono il sistema (resistenze, capacità e generatore ideale di tensione) nelle equazioni alle maglie e ai nodi del circuito si ottiene:

$$\begin{cases} C_{lum}^* \cdot \frac{dp_{lum}}{dt} + p_{lum} \cdot \left( \frac{1}{R_{tv}} + \frac{1}{R_{ho}} \right) = \frac{p_{avv}}{R_{tv}} + \frac{p_{atm}}{R_{ho}} \\ C_{avv}^* \cdot \frac{dp_{avv}}{dt} + p_{avv} \cdot \left( \frac{1}{R_{deoxy}} + \frac{1}{R_{tv}} + \frac{1}{R_{altro}} \right) = \frac{p_{lum}}{R_{tv}} + \frac{p_{atm}}{R_{altro}} \end{cases} \quad (39)$$

$$\begin{cases} C_{lum}^* \cdot \frac{dp_{lum}}{dt} + p_{lum} \cdot \left( \frac{1}{R_{tv}} + \frac{1}{R_{ho}} \right) = \frac{p_{avv}}{R_{tv}} + \frac{p_{atm}}{R_{ho}} \\ C_{avv}^* \cdot \frac{dp_{avv}}{dt} + p_{avv} \cdot \left( \frac{1}{R_{deoxy}} + \frac{1}{R_{tv}} + \frac{1}{R_{altro}} \right) = \frac{p_{lum}}{R_{tv}} + \frac{p_{atm}}{R_{altro}} \end{cases} \quad (40)$$

Riordinando:

$$\begin{cases} C_{lum}^* \cdot \frac{dp_{lum}}{dt} = -p_{lum} \cdot \left( \frac{1}{R_{tv}} + \frac{1}{R_{ho}} \right) + \frac{p_{avv}}{R_{tv}} + \frac{p_{atm}}{R_{ho}} \\ C_{avv}^* \cdot \frac{dp_{avv}}{dt} = -p_{avv} \cdot \left( \frac{1}{R_{deoxy}} + \frac{1}{R_{tv}} + \frac{1}{R_{altro}} \right) + \frac{p_{lum}}{R_{tv}} + \frac{p_{atm}}{R_{altro}} \end{cases} \quad (41)$$

$$\begin{cases} C_{lum}^* \cdot \frac{dp_{lum}}{dt} = -p_{lum} \cdot \left( \frac{1}{R_{tv}} + \frac{1}{R_{ho}} \right) + \frac{p_{avv}}{R_{tv}} + \frac{p_{atm}}{R_{ho}} \\ C_{avv}^* \cdot \frac{dp_{avv}}{dt} = -p_{avv} \cdot \left( \frac{1}{R_{deoxy}} + \frac{1}{R_{tv}} + \frac{1}{R_{altro}} \right) + \frac{p_{lum}}{R_{tv}} + \frac{p_{atm}}{R_{altro}} \end{cases} \quad (42)$$

Da qui si ricavano le matrici dell'equazione di stato del circuito:

$$\underline{D} = \begin{bmatrix} d_1 & 0 \\ 0 & d_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} C_{lum}^* & 0 \\ 0 & C_{avv}^* \end{bmatrix} \quad (43)$$

$$\underline{x} = \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} p_{lum} \\ p_{avv} \end{bmatrix} \quad (44)$$

$$\underline{H} = \begin{bmatrix} h_{11} & h_{12} \\ h_{21} & h_{22} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \frac{1}{R_{tv}} + \frac{1}{R_{ho}} & \frac{1}{R_{tv}} \\ \frac{1}{R_{tv}} & \frac{1}{R_{deoxy}} + \frac{1}{R_{tv}} + \frac{1}{R_{altro}} \end{bmatrix} \quad (45)$$

$$\underline{g} = \begin{bmatrix} g_1 \\ g_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \frac{p_{atm}}{R_{ho}} \\ \frac{p_{atm}}{R_{ho}} \end{bmatrix} \quad (46)$$

$$\underline{x}(t_0 = 0) = \begin{bmatrix} X_{10} \\ X_{20} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} p_{atm} \\ p_{atm} \end{bmatrix} \quad (47)$$

Esprimendo le equazioni del circuito in funzione delle matrici si ricava:

$$\begin{cases} \dot{x}_1 = -\frac{h_{11}}{d_1} \cdot x_1 + \frac{h_{12}}{d_1} \cdot x_2 + \frac{g_1}{d_1} & (48) \end{cases}$$

$$\begin{cases} \dot{x}_2 = \frac{h_{21}}{d_2} \cdot x_1 - \frac{h_{22}}{d_2} \cdot x_2 + \frac{g_2}{d_2} & (49) \end{cases}$$

Di seguito si mostra la risoluzione rispetto a  $x_2$ , ma l'espressione analitica dell'andamento di  $x_1$  nel tempo viene ricavata in modo analogo.

Quindi si esprime  $x_1$  a partire dall'equazione (49):

$$x_1 = \frac{d_2}{h_{21}} \cdot \left( \dot{x}_2 + \frac{h_{22}}{d_2} \cdot x_2 - \frac{g_2}{d_2} \right), \quad h_{21} \neq 0 \quad (50)$$

Derivando  $\dot{x}_2$  nel tempo e inserendo le equazioni (48) e (50) si ottiene:

$$\ddot{x}_2 = -\dot{x}_2 \cdot \left( \frac{d_2 \cdot h_{11} + d_1 \cdot h_{22}}{d_1 \cdot d_2} \right) - x_2 \cdot \left( \frac{h_{11} \cdot h_{22} - h_{21} \cdot h_{12}}{d_1 \cdot d_2} \right) + \frac{h_{21}}{d_1 \cdot d_2} \cdot g_1 + \frac{h_{11}}{d_1 \cdot d_2} \cdot g_2 \quad (51)$$

Per risolvere l'equazione si impostano dei coefficienti:

$$\gamma = \frac{1}{2} \cdot \left( \frac{h_{11}}{d_1} + \frac{h_{22}}{d_2} \right) \quad (52)$$

$$\omega^2 = \frac{h_{11} \cdot h_{22} - h_{21} \cdot h_{12}}{d_1 \cdot d_2} \quad (53)$$

$$G_1(t) = -\frac{h_{21}}{d_1 \cdot d_2} \cdot g_1(t) - \frac{h_{11}}{d_1 \cdot d_2} \cdot g_2(t) \quad (54)$$

Si ottiene quindi il problema di Cauchy, dato dall'equazione (51), sistemata con i coefficienti (52), (53) e (54), e dalle condizioni iniziali così come espresso di seguito:

$$\begin{cases} \ddot{x}_2(t) + 2\gamma \cdot \dot{x}_2(t) + \omega^2 \cdot x_2(t) = G_1(t) & (55) \end{cases}$$

$$\begin{cases} x_2(t_0) = X_{20} & (56) \end{cases}$$

$$\begin{cases} \dot{x}_2(t = t_0^+) = \frac{h_{21}}{d_2} \cdot X_{10} - \frac{h_{22}}{d_2} \cdot X_{20} + \frac{g_2}{d_2} & (57) \end{cases}$$

La soluzione del problema di Cauchy è data da:

$$x_2(t) = x_{Lo}(t) + x_{Lp}(t) \quad (58)$$

cioè da un termine transitorio,  $x_{Lo}$ , dato dall'integrale dell'omogenea associata, e da un termine di regime dato dall'integrale particolare dell'equazione differenziale.

Nello specifico l'integrale dell'omogenea associata è:

$$\ddot{x}_2 + 2\gamma\dot{x}_2 + \omega^2 x_2 = 0 \quad (59)$$

Da cui si ottiene il polinomio caratteristico:

$$\lambda^2 + 2\gamma\lambda + \omega^2 = 0 \quad (60)$$

La soluzione diventa perciò:

$$x_{Lo}(t) = j_1 \cdot e^{\lambda_1 t} + j_2 \cdot e^{\lambda_2 t} \quad (61)$$

La soluzione a regime si ricava trasformando i condensatori in circuiti aperti ed è pari a:

$$x_{Lp}(t) = p_{atm} \cdot \frac{R_{deoxy}}{R_{deoxy} + \frac{(R_{ho} + R_{tv}) \cdot R_{altro}}{(R_{ho} + R_{tv}) + R_{altro}}} \quad (62)$$

Inserendo le espressioni di  $x_{Lo}$  (24) e  $x_{Lp}$  (25) nell'equazione (21) si ottiene la soluzione:

$$x_2(t) = j_1 \cdot e^{\lambda_1 t} + j_2 \cdot e^{\lambda_2 t} + p_{atm} \cdot \frac{R_{deoxy}}{R_{deoxy} + \frac{(R_{ho} + R_{tv}) \cdot R_{altro}}{(R_{ho} + R_{tv}) + R_{altro}}} \quad (63)$$

Le costanti  $j_1$  e  $j_2$  si ricavano dalle equazioni (56) e (57) e risultano:

$$\left\{ \begin{aligned} j_1 &= \left( \frac{\lambda_2}{\lambda_2 - \lambda_1} \right) \cdot \left( X_{20} - x_{Lp} - \frac{h_{21}}{d_2 \cdot \lambda_2} \cdot X_{10} + \frac{h_{22} \cdot X_{20}}{\lambda_2 \cdot d_2} - \frac{g_2}{d_2 \cdot \lambda_2} \right) \end{aligned} \right. \quad (64)$$

$$\left\{ \begin{aligned} j_2 &= \frac{h_{21} \cdot X_{10}}{d_2 \cdot \lambda_2} - \frac{h_{22} \cdot X_{20}}{\lambda_2 \cdot d_2} + \frac{g_2}{d_2 \cdot \lambda_2} - \frac{\lambda_1}{\lambda_2} \cdot j_1 \end{aligned} \right. \quad (65)$$

# APPENDICE B

## Protocolli biologici

### **Inclusione in paraffina**

- Fissare i campioni in formaldeide per 4 ore a temperatura ambiente oppure a 4° C durante la notte
- Immergere in tampone fosfato in un tubo falcon fino alla disidratazione
- Etichettare sia il tappo che il tubo
- Deidratare in una serie graduale di etanolo con prima un lavaggio veloce e successivamente passaggio di 1 ora in etanolo:
  - 75%
  - 95%
  - 100%
  - 100 % durante la notte a 4° C.
- Il giorno successivo accendere l'erogatore di paraffina
- Controllare che le etichette siano intatte
- Incubare il campione in xilene per 45'
- Includere in un vasetto contenente paraffina per 2 ore
- Accendere la piastra raffreddante 10' prima di montare il campione
- Riempire con uno strato di paraffina una cassetta metallica
- Montare il campione di vena in modo tale che rimanga dritto e al centro della cassetta
- Appoggiare brevemente sulla piastra raffreddante per solidificare la paraffina e confermare l'orientamento della vena
- Aggiungere il coperchio in plastica e riempire di paraffina
- Appoggiare sulla piastra raffreddante per più di 10' per indurire la paraffina
- Rimuovere la cassetta e tagliare la paraffina in eccesso
- Se la paraffina si rompe, montare di nuovo

## **Colorazione ematossilina/eosina**

- Procedere con la rimozione della paraffina:
  - In stufa, 15'
  - Xilene 1 e 2, 6'
  - Etanolo 100, 95, 75, 50, 3'
  - dH<sub>2</sub>O 2x
- Colorazione in ematossilina, 5'
- Sviluppo in acqua corrente per 5'
- Colorazione in eosina, 4'
- Lavaggio in dH<sub>2</sub>O 2x
- Deidratare rapidamente in una serie graduale di etanolo
- Lasciare in etanolo 100% per 1'
- Xilene 1 e 2, entrambi 3'
- Montare con mezzo di montaggio Eukitt e lasciare sotto cappa ad asciugare

## **Tricromia di Masson (kit Bio-Optica)**

- Procedere con la rimozione della paraffina:
  - In stufa, 15'
  - Xilene 1 e 2, 6'
  - Etanolo 100, 95, 75, 50, 3'
  - dH<sub>2</sub>O 2x
- Lasciare 10' in un contenitore contenente la soluzione A e B in parti uguali
- Senza lavare, sgocciolare i vetrini e immergerli nella soluzione C, 4'
- Lavare in acqua distillata 4-5 secondi
- Soluzione D, 4'
- Lavare in acqua corrente
- Soluzione E 10'
- Senza lavare, sgocciolare i vetrini e immergerli nella soluzione F, 5'
- Lavare in acqua corrente

- De-idratare velocemente e lasciare in EtOH 100% 1'
- Xilene 1 e 2, 3' ciascuno
- Montare con mezzo di montaggio Eukitt

## **Immunofluorescenza**

- Preparare il buffer HIER (Heat-Induced epitope retrieval) > TRIS/EDTA: 10 mM TRIS, 1mM EDTA in PBS
- Pre-riscaldare il tampone HIER in vasi porta-vefrino appoggiati in becher riempiti di d-H<sub>2</sub>O su una piastra riscaldante
- Nel frattempo procedere con la rimozione della paraffina:
  - In stufa, 15'
  - Xilene 1 e 2, 6'
  - Etanolo 100, 95, 75, 50, 3'
  - dH<sub>2</sub>O 2x
- Inserire i vetrini nel tampone caldo e far bollire per 10'
- Raffreddare le sezioni nel ghiaccio per almeno 30'
- Nel frattempo, scongelare il BSA
- Preparare il tampone per il bloccaggio > 3% BSA in PBS contenente tween e Triton (400-500 µL ogni 4 vetrini)
- Asciugare i vetrini e cerchiare le sezioni con la PAP-pen (2 sezioni positive e una per il controllo negativo)
- Bloccare per 1 ora in una scatola umida a temperatura ambiente
- Preparare la soluzione con gli anticorpi primari > PBS, BSA 1% e anticorpi (von Willebrand Factor 1: 500, CD31 1:200, α-SMA 1:500)
- Preparare la soluzione con PBS e BSA 1% senza anticorpi per il controllo negativo
- Asciugare le sezioni e senza lavare aggiungere la soluzione con gli anticorpi/ senza gli anticorpi
- Incubare durante la notte a 4°C in una scatola umida
- Il giorno successivo, scongelare il BSA

- Preparare la soluzione con gli anticorpi secondari > PBS, BSA 1% e anticorpi secondari ( $\alpha$ -rabbit 633 1:500,  $\alpha$ -goat 546 1: 500,  $\alpha$ -mouse 488 1:500).  
Mantenere al buio
- Lavare 4x con PBS
- Aggiungere la soluzione con anticorpi secondari e incubare per 1 ora a temperatura ambiente, in una scatola umida e mantenuta al buio
- Preparare DAPI 1:1000 in PBS
- Lavare 4x con PBS
- Incubare con DAPI per 15' a temperatura ambiente. mantenere al buio
- Lavare 4x con PBS
- Montare, asciugare e sigillare con smalto per unghie i vetrini
- Conservare a 4°C

### **Immunoistochimica con Ki67**

- Pre-riscaldare il tampone HIER (Citrato, pH 6) in vasi porta-vefrino appoggiati in becher riempiti di dH<sub>2</sub>O su una piastra riscaldante
- Nel frattempo procedere con la rimozione della paraffina:
  - In stufa, 15'
  - Xilene 1 e 2, 6'
  - Etanolo 100, 95, 75, 50, 3'
  - dH<sub>2</sub>O 2x
- Inserire i vetrini nel tampone caldo e far bollire per 10'
- Raffreddare le sezioni nel ghiaccio per almeno 30'
- Nel frattempo, scongelare il BSA
- Lavare i vetrini in PBS, 5'
- Immergere le sezioni in PBS+0.6% di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per 20'
- Lavare in PBS
- Asciugare i vetrini e cerchiare le sezioni con la PAP-pen (2 sezioni positive e una per il controllo negativo)
- Preparare il tampone per il bloccaggio > 3% BSA in PBS contenente tween e Triton (400-500  $\mu$ L ogni 4 vetrini)

- Eseguire il bloccaggio per 45' in una scatola umida a temperatura ambiente
- Preparare gli anticorpi contro Ki67 in PBS con BSA 1% (1:100) e preparare la soluzione senza anticorpi per il controllo negativo
- Sgocciolare le sezioni e senza lavare aggiungere la soluzione con gli anticorpi/controllo negativo
- Incubare durante la notte a 4°C in una scatola umida
- Il giorno successivo, scongelare BSA 3%
- Preparare gli anticorpi secondari (1:100) in PBS con BSA 1%
- Lavare 4x con PBS
- Aggiungere la soluzione con gli anticorpi secondari e incubare per 1 ora a temperatura ambiente in una scatola umida
- Preparare la soluzione con il DAB (Bio-Optica): 1mL soluzione A+ 1 goccia soluzione B ogni 10 sezioni
- Lavare 4x con PBS
- Colorare con DAB
- Sviluppare in acqua distillata 5'
- Colorare in Ematossilina 5''
- Sviluppare con acqua corrente 5'
- De-idratare velocemente in una serie graduale di etanolo
- Lasciare in etanolo 100% per 1'
- Xilene 1 e 2, entrambi 3'
- Montare con mezzo di montaggio Eukitt e asciugare sotto-cappa

## APPENDICE C

Nella tabella di seguito l'elenco delle caratteristiche legate ai fattori di rischio dei pazienti sottoposti a CABG da cui provengono i segmenti di vena safena utilizzati nel presente lavoro di tesi:

<i>VENA</i>	<i>GENERE</i>	<i>ETA'</i>	<i>BMI</i>	<i>IPERTESO</i>	<i>DIABETE</i>	<i>IPERLIPIDEMICO</i>	<i>FUMATORE</i>
101	M	56	26	Si	No	Si	Ex
113	M	58	31	Si	Si	Si	Si
115	F	71	24	Si	No	No	No
27	M	69	24	No	No	No	No
77	M	66	35	Si	No	No	Si
114	M	72	23	Si	No	No	No
125	F	75	30	Si	No	No	No
126	M	67	33	Si	Si	Si	Ex
127	M	72	25	No	No	Si	Ex

## BIBLIOGRAFIA

- [1] E. Bresciani, “Sviluppo di un sistema di coltura bicompartimentale per lo studio ex vivo del vein graft disease in segmenti di vena safena,” Politecnico di Milano, 2012.
- [2] M. Malvasi, “Studio ex vivo del rimodellamento di campioni di vena safena umana indotto da differenti condizioni di ossigenazione,” Politecnico di Milano, 2014.
- [3] J. A. E. Spaan, *Coronary Blood Flow*. AA Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publisher, 1991.
- [4] A. C. Burton, *Physiology and Biophysics of the Circulation*. Chicago: Yearbook Publishers, 1965.
- [5] R. E. Klabunde, *Cardiovascular Physiology Concepts*. Lippincott Williams & Wilkins, 2011.
- [6] G. Liuzzo, S. Brugaletta, and F. Crea, “Coronarica Rivascolarizzazione,” *Enciclopedia Medica Italiana*. Luciano Vella, pp. 838–886, 2007.
- [7] F. Ottani, “Il circolo collaterale nella cardiopatia ischemica migliora la prognosi?,” pp. 81–87, 2013.
- [8] Who, “The top 10 causes of death.” [Online]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>. [Accessed: 31-Mar-2016].
- [9] D. L. Longo, A. S. Fauci, D. L. Kasper, S. L. Hauser, L. J. Jameson, and J. Loscalzo, *Harrison. Principi di Medicina Interna*, 18th ed. 2012.
- [10] B. Donald S., *Grossman’s Cardiac Catheterization, Angiography, and Intervention*, 7th ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
- [11] D. L. Fischhman, M. B. Leon, D. S. Baim, R. A. Schatz, M. P. Savage, I. Penn, K. Detre, L. Veltri, D. Ricci, M. Nobuyoshi, M. Cleman, R. Heuse, D. Almond, P. S. Teirstein, D. Fish, A. Colombo, J. Brinker, J. Moses, A. Shaknovich, J. Hirshfeld, S. Bailey, S. Ellis, R. Rake, and S. Goldberg, “A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 331, no. 8, pp. 496–501, 1994.
- [12] RITA Trial Participants, “Coronary angioplasty versus coronary artery bypass surgery: the Randomised Intervention Treatment of Angina (RITA) trial,” *The Lancet*, 1993.
- [13] J. P. Pell, D. Walsh, J. Norrie, G. Berg, A. D. Colquhoun, K. Davidson, H. Eteiba, A. Faichney, A. Flapan, K. J. Hogg, R. R. V Je, K. Jennings, J. McArthur, P. Mankad, and K. Oldroyd, “Outcomes following coronary artery bypass grafting and percutaneous transluminal coronary angioplasty in the stent era : a prospective study of all 9890 consecutive patients operated on in Scotland over a two year period,” *Heart*, pp. 662–666, 2001.
- [14] D. Gunnell, I. Harvey, and L. Smith, “The invasive management of angina : issues for consumers and commissioners,” *J. Epidemiol. Community Health*, vol. 49, pp. 335–343, 1995.
- [15] K. Fatima, M. Yousuf-ul-islam, M. Ansari, F. I. Bawany, M. S. Khan, A. Khetpal, N. Khetpal, M. N. Lashari, M. H. Arshad, R. Bin Amir, H. R. Kakalia, Q. H. Zaidi, S. K. Mian, and B. Kazani, “Comparison of the Postprocedural Quality of Life between Coronary Artery Bypass Graft Surgery and Percutaneous Coronary Intervention : A Systematic Review,” *Cardiol. Res. Pract.*, vol. 2016, 2016.
- [16] S. D. Fihn, M. A. Grunwald, B. W. Lytle, R. A. O. Rourke, R. J. Gibbons, A. Garson, and T. J. Ryan, “ACC / AHA / ACP-ASIM PRACTICE GUIDELINES

- ACC / AHA / ACP-ASIM Guidelines for the Management of Patients With Chronic Stable Angina COMMITTEE MEMBERS TASK FORCE MEMBERS,” *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 33, no. 7, 1999.
- [17] K. L. Moore and A. F. Dalley, *Anatomia Umana Seconda Edizione*, Seconda. 2008.
- [18] A. C. Guyton and J. E. Hall, *Guyton e Hall. Fisiologia Medica*, 12th ed. 2012.
- [19] A. Redaelli and F. Montevicchi, *Biomeccanica. Analisi multiscala di tessuti biologici*. 2007.
- [20] M. Desai, A. M. Seifalian, and G. Hamilton, “Role of prosthetic conduits in coronary artery bypass grafting,” *Eur. J. Cardio Thorac. Surg.*, vol. 40, pp. 394–398, 2011.
- [21] D. Mehta, J. Y. Jeremy, M. B. Izzat, A. J. Bryan, and G. D. Angelini, “Towards A Solution For Saphenous Vein Graft Failure,” *Asia Pacific Hear.*, vol. 6, no. 2, pp. 107–120, 1997.
- [22] J. Golledge, “Vein Grafts: Haemodynamic Forces on the Endothelium -A Review,” *Eur J Vasc Endovasc Surg*, vol. 14, pp. 333–343, 1997.
- [23] R. Harskamp, R. Lopes, P. Md, C. Baisden, R. de Winter, J. Alexander, and M. H. S. Md, “Saphenous Vein Graft Failure After Coronary Artery Bypass Surgery: Pathophysiology, Management, and Future Directions.,” *Ann. Surg.*, vol. 257, no. 5, pp. 824–833, 2013.
- [24] O. E. Teebken and A. Haverich, “Tissue Engineering of Small Diameter Vascular Grafts,” *Eur. J. Vasc. Surg.*, vol. 23, pp. 475–485, 2002.
- [25] G. Silver, G. Katske, S. FL, and N. Wood, “Umbilical vein for aortocoronary bypass,” *Angiology*, vol. 33, no. 7, pp. 450–3, 1982.
- [26] M. Vrandecic, “New graft for the surgical-treatment of small vessel diseases,” *J Cardiovasc Surg*, vol. 28, no. 6, pp. 711–4, 1987.
- [27] M. Abbate, A. Lomeo, M. Gentile, I. Bianca, A. Bartoloni, and M. Pilato, “Our experience utilizing the bovine internal mammary artery in the myocardial revascularization.,” *J Cardiovasc Surg 1988*, vol. 29, p. 76, 1988.
- [28] H. Suma, Y. Wanibuchi, Y. Terada, S. Fukuda, T. Saito, T. Isshiki, and T. Yamaguchi, “Bovine internal thoracic artery graft. Successful use at urgent coronary bypass surgery,” *J. Cardiovasc Surg*, vol. 32, no. 2, pp. 268–270, 1991.
- [29] N. Mitchell IM, Essop AR, Scott PJ, Martin PG, Gupta NK, Saunders NR and W. G. RU, “Bovine internal mammary artery as a conduit for coronary revascularization: long-term results,” *Ann Thorac Surg*, vol. 90 (5 Pt 2, no. II, pp. 160–166, 1993.
- [30] C. Quint, Y. Kondo, R. J. Manson, J. H. Lawson, A. Dardik, and L. E. Niklason, “Decellularized tissue-engineered blood vessel as an arterial conduit,” *PNAS*, vol. 108, no. 22, pp. 9214–9219, 2011.
- [31] P. S. Mcfetrige, J. W. Daniel, T. Bodamyali, M. Horrocks, and J. B. Chaudhuri, “Preparation of porcine carotid arteries for vascular tissue engineering applications,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 70A, no. 2, pp. 224–234, 2004.
- [32] X. Wang, P. Lin, Q. Yao, and C. Chen, “Development of Small-Diameter Vascular Grafts,” *World J. Surg.*, vol. 31, pp. 682–689, 2007.
- [33] N. Heureux, S. Paquet, R. Labbé, L. Germain, and F. Auger, “A completely biological tissue-engineered human blood,” *FASEB*, vol. 12, pp. 47–56, 1998.
- [34] A. Caggiati and J. J. Bergan, “The saphenous vein: Derivation of its name and its relevant anatomy,” *J. Vasc. Surg.*, vol. 35, no. 1, pp. 172–175, 2002.
- [35] M. R. Dashwood and J. C. Tsui, “‘No-touch’ saphenous vein harvesting improves graft performance in patients undergoing coronary artery bypass surgery: A journey

- from bedside to bench,” *Vascul. Pharmacol.*, vol. 58, pp. 240–250, 2013.
- [36] D. S. R. Souza, M. Arbeus, B. Botelho Pinheiro, and D. Filbey, “The no-touch technique of harvesting the saphenous vein for coronary artery bypass grafting surgery.,” *Multimed. Man. Cardiothorac. Surg. / Eur. Assoc. Cardio-Thoracic Surg.*, vol. 2009, no. 731, p. mmcts.2008.003624, 2009.
- [37] A. Muto, L. Model, K. Ziegler, S. D. D. Eghbalieh, and A. Dardik, “Mechanisms of vein graft adaptation to the arterial circulation: insights into the neointimal algorithm and management strategies.,” *Circ. J.*, vol. 74, no. 8, pp. 1501–1512, 2010.
- [38] J. Motwani and E. J. Topol, “Aortocoronary Saphenous Vein Graft Disease,” *Circulation*, vol. 97, pp. 916–931, 1998.
- [39] J. Y. Jeremy, P. Gadsdon, N. Shukla, V. Vijayan, M. Wyatt, A. C. Newby, and G. D. Angelini, “On the biology of saphenous vein grafts fitted with external synthetic sheaths and stents,” *Biomaterials*, vol. 28, no. 6, pp. 895–908, 2007.
- [40] J. Y. Jeremy, N. Shukla, S. Muzaffar, A. Handley, and G. D. Angelini, “Reactive Oxygen Species, Vascular Disease and Cardiovascular Surgery,” *Curr. Vasc. Pharmacol.*, vol. 2, pp. 229–236, 2004.
- [41] C. Michiels, T. Arnould, and J. Remacle, “Endothelial cell responses to hypoxia: initiation of a cascade of cellular interactions,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1497, no. 1, pp. 1–10, 2000.
- [42] S. Déglise, D. Martin, H. Probst, F. Saucy, D. Hayoz, G. Waeber, P. Nicod, H. B. Ris, J. M. Corpataux, and J. A. Haefliger, “Increased connexin43 expression in human saphenous veins in culture is associated with intimal hyperplasia,” *J. Vasc. Surg.*, vol. 41, no. 6, pp. 1043–1052, 2005.
- [43] M. Osgood, K. Hocking, I. Voskresensky, F. D. Li, P. Komalavilas, J. Cheung-Flynn, and C. M. Brophy, “Surgical vein graft preparation promotes cellular dysfunction, oxidative stress, and intimal hyperplasia in human saphenous vein,” *J. Vasc. Surg.*, vol. 60, no. 1, pp. 202–211, 2014.
- [44] V. Clerin, R. J. Gusic, J. O’Brien, P. M. Kirshbom, R. J. Myung, J. W. Gaynor, and K. J. Gooch, “Mechanical environment, donor age, and presence of endothelium interact to modulate porcine artery viability ex vivo,” *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 30, no. 9, pp. 1117–1127, 2002.
- [45] K. E. Porter, S. Nydahl, P. Dunlop, K. Varty, a J. Thrush, and N. J. London, “The development of an in vitro flow model of human saphenous vein graft intimal hyperplasia.,” *Cardiovasc. Res.*, vol. 31, no. 4, pp. 607–614, 1996.
- [46] L. S. Model, M. R. Hall, and D. J. Wong, “Arterial Shear Stress Reduces Eph-B4 Expression in Adult Human Veins,” *Yale J. Biol. Med.*, vol. 87, no. 24390299, pp. 359–371, 2014.
- [47] Y.-J. Chang, H.-C. Huang, Y.-Y. Hsueh, S.-W. Wang, F.-C. Su, C.-H. Chang, M.-J. Tang, Y.-S. Li, S.-H. Wang, K. K. Shung, S. Chien, and C.-C. Wu, “Role of Excessive Autophagy Induced by Mechanical Overload in Vein Graft Neointima Formation: Prediction and Prevention.,” *Sci. Rep.*, vol. 6, no. November 2015, p. 22147, 2016.
- [48] Golledge, J, R. Tumer, S. Harley, S. DR, and J. Powell, “Development of an in vitro model to study the response of saphenous vein endothelium to pulsatile arterial flow and circumferential deformation,” *Eur. J. Vasc. Surg.*, vol. 13, no. 6, pp. 605–612, 1997.
- [49] B. S. Conklin, S. M. Surowiec, P. H. Lin, and C. Chen, “Conklin, A simple

- physiologic pulsatile perfusion system for the study of,” *Med. Eng. Phys.*, vol. 22, no. 6, pp. 441–449, 2000.
- [50] S. M. Surowiec, B. S. Conklin, J. S. Li, P. H. Lin, V. J. Weiss, A. B. Lumsden, and C. Chen, “A New Perfusion Culture System Used to Study Human Vein,” *J. Surg. Res.*, vol. 88, no. 1, pp. 34–41, 2000.
- [51] A. Longchamp, F. Alonso, C. Dubuis, F. Allagnat, X. Berard, P. Meda, F. Saucy, J. M. Corpataux, S. Bastien D. Glise, and J. A. Haefliger, “The use of external mesh reinforcement to reduce intimal hyperplasia and preserve the structure of human saphenous veins,” *Biomaterials*, vol. 35, no. 9, pp. 2588–2599, 2014.
- [52] P. Zilla, L. Moodley, M. F. Wolf, D. Bezuidenhout, M. S. Sirry, N. Rafiee, W. Lichtenberg, M. Black, and T. Franz, “Knitted nitinol represents a new generation of constrictive external vein graft meshes,” *J. Vasc. Surg.*, vol. 54, no. 5, pp. 1439–1450, 2011.
- [53] D. Mellièrè, P. Desgrange, E. Allaire, and J.-P. Becquemin, “Long-Term Results of Venous Bypass for Lower Extremity Arteries with Selective Short Segment Prosthetic Reinforcement of Varicose Dilatations,” *Ann. Vasc. Surg.*, vol. 21, no. 1, pp. 45–49, 2007.
- [54] F. Lundgren, “External Support of a Polytetrafluoroethylene Graft Improves Patency for Bypass to Below-Knee Arteries,” *Ann. Vasc. Surg.*, vol. 27, no. 8, pp. 1124–1133, 2013.
- [55] F. Prandi, M. Piola, M. Soncini, C. Colussi, Y. D’Alessandra, E. Penza, M. Agrifoglio, M. C. Vinci, G. Polvani, C. Gaetano, G. B. Fiore, and M. Pesce, “Adventitial vessel growth and progenitor cells activation in an ex vivo culture system mimicking human saphenous vein wall strain after coronary artery bypass grafting,” *PLoS One*, vol. 10, no. 2, pp. 1–20, 2015.
- [56] M. Piola, M. Soncini, M. Pesce, and G. B. Fiore, “A lumped-parameter approach for designing a novel pulsatile bioreactor for ex-vivo studies of human saphenous vein remodeling bioreactor for ex - vivo studies of human saphenous vein remodeling,” in *IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, 2015.
- [57] C. S. Lim, M. S. Gohel, A. C. Shepherd, E. Paleolog, and A. H. Davies, “Venous hypoxia: A poorly studied etiological factor of varicose veins,” *J. Vasc. Res.*, vol. 48, no. 3, pp. 185–194, 2011.
- [58] C. S. Lim, S. Kiriakidis, A. Sandison, E. M. Paleolog, and A. H. Davies, “Hypoxia-inducible factor pathway and diseases of the vascular wall,” *J. Vasc. Surg.*, vol. 58, no. 1, pp. 219–230, 2013.
- [59] A. Chanakira, D. Kir, R. A. Barke, S. M. Santilli, S. Ramakrishnan, and S. Roy, “Hypoxia differentially regulates arterial and venous smooth muscle cell migration,” *PLoS One*, vol. 10, no. 9, pp. 1–15, 2015.
- [60] R. Pyla, P. Pichavaram, A. Fairaq, M. A. Park, M. Kozak, V. Kamath, V. S. Patel, and L. Segar, “Altered energy state reversibly controls smooth muscle contractile function in human saphenous vein during acute hypoxia-reoxygenation: Role of glycogen, AMP-activated protein kinase, and insulin-independent glucose uptake,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 97, no. 1, pp. 77–88, 2015.
- [61] B. Joddar, M. S. Firstenberg, R. K. Reen, S. Varadharaj, M. Khan, R. C. Childers, J. L. Zweier, and K. J. Gooch, “Arterial levels of oxygen stimulate intimal hyperplasia in human saphenous veins via a ROS-dependent mechanism,” *PLoS One*, vol. 10, no. 3, pp. 1–16, 2015.
- [62] B. Joddar, R. J. G. Shaffer, R. K. Reen, and K. J. Gooch, “Arterial pO<sub>2</sub> stimulates

- intimal hyperplasia and serum stimulates inward eutrophic remodeling in porcine saphenous veins cultured Ex vivo,” *Biomech. Model. Mechanobiol.*, vol. 10, no. 2, pp. 161–175, 2011.
- [63] M. Piola, F. Prandi, G. B. Fiore, M. Agrifoglio, G. Polvani, M. Pesce, and M. Soncini, “Human Saphenous Vein Response to Trans-wall Oxygen Gradients in a Novel Ex Vivo Conditioning Platform,” *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 44, no. 5, pp. 1449–1461, 2016.
- [64] D. E. Orr and K. J. L. Burg, “Design of a modular bioreactor to incorporate both perfusion flow and hydrostatic compression for tissue engineering applications,” *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 36, no. 7, pp. 1228–1241, 2008.
- [65] M. Piola, F. Prandi, N. Bono, M. Soncini, E. Penza, M. Agrifoglio, G. Polvani, M. Pesce, and G. B. Fiore, “A compact and automated ex vivo vessel culture system for the pulsatile pressure conditioning of human saphenous veins,” *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 2013.