

# POLITECNICO DI MILANO

Scuola di Ingegneria dei Sistemi

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica



## **SVILUPPO DI UN SISTEMA DI COLTURA DI SEGMENTI DI VENA SAFENA PER LO STUDIO *EX VIVO* DEL *VEIN GRAFT DISEASE***

Relatori:

Prof. Ing. Gianfranco Beniamino Fiore

Prof. Ing. Monica Soncini

Correlatori:

Ing. Marco Piola

Dott. Maurizio Pesce

Tesi di Laurea di:

Nina BONO

Lorena CASADONTE

Anno Accademico 2010 - 2011

# INDICE

<b>Sommario.....</b>	<b>I</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>X</b>
<b>Introduzione .....</b>	<b>1</b>
<b>Capitolo 1: Vena safena: utilizzo nel bypass aorto-coronarico e problematiche.....</b>	<b>4</b>
1.1 Le coronarie .....	4
1.2 Coronaropatie e trattamenti chirurgici.....	7
1.3 Bypass aorto-coronarico .....	8
1.3.1 Graft utilizzati nel bypass aorto-coronarico.....	14
1.3.1.1 Arteria mammaria interna .....	14
1.3.1.2 Vena safena.....	14
1.3.1.2.1 Cellule progenitrici staminali della vena safena .....	19
<b>Capitolo 2: Stato dell'arte .....</b>	<b>21</b>
2.1 Analisi dello stato dell'arte .....	21
2.1.1 Sistemi statici .....	22
2.1.2 Sistemi a perfusione .....	26
2.1.2.1 Sistemi a perfusione stazionaria .....	27
2.1.2.2. Sistemi a perfusione pulsatile.....	42
2.2 Conclusioni .....	54
<b>Capitolo 3: Progetto e realizzazione del sistema di coltura.....</b>	<b>56</b>
3.1 Identificazione delle specifiche di progetto.....	58
3.2 Progetto di massima.....	59
3.3 Progettazione e realizzazione della camera di coltura.....	60
3.3.1 Scelta dei materiali.....	60
3.3.2 Prototipo 0.....	61
3.3.2.1 Realizzazione del prototipo 0 .....	64
3.3.2.2 Analisi del prototipo 0: rispondenza alle specifiche.....	66
3.3.3 Prototipo 1 .....	66

3.3.3.1	Realizzazione del prototipo 1 .....	69
3.3.3.2	Analisi del prototipo 1: rispondenza alle specifiche.....	70
3.4	Progettazione e realizzazione del circuito di stimolazione.....	70
3.4.1	Sottosistema idraulico.....	71
3.4.1.1	Dimensionamento del circuito idraulico .....	73
3.4.1.1.1	Modello dello scambio di ossigeno nel tubo in silicone .....	74
3.4.2	Sottosistema di monitoraggio e controllo .....	79
3.4.2.1	Realizzazione del controllo .....	83
3.4.3	Layout del sistema.....	88
3.5	Sistema di coltura: visione di insieme .....	91
	<b>Capitolo 4: Collaudo del sistema ed esperimenti correlati .....</b>	<b>92</b>
4.1	Protocollo di verifica della tenuta idraulica.....	92
4.2	Collaudo del circuito di stimolazione .....	93
4.2.1	Caratterizzazione meccanica di campioni di vena safena mediante misure di compliance .....	94
4.2.1.1	Risultati delle prove di misura di compliance di segmenti di vena safena.....	97
4.2.2	Collaudo del sistema di monitoraggio e controllo con sostituto artificiale.....	101
4.2.2.1	Dimensionamento della camera di compliance.....	104
4.2.3	Caratterizzazione idraulica del sistema di coltura in esercizio .....	105
4.2.4	Collaudo del sistema di monitoraggio e controllo con segmenti di vena safena.....	108
4.3	Verifica del mantenimento della sterilità .....	109
4.3.1	Protocollo di assemblaggio del sistema di coltura in ambiente sterile.....	110
4.3.2	Prove di verifica del mantenimento della sterilità.....	113
4.3.2.1	Risultati delle prove di verifica del mantenimento della sterilità.....	115
	<b>Capitolo 5: Utilizzo del sistema in campagne sperimentali preliminari con campioni di vena safena umana.....</b>	<b>116</b>
5.1	Messa in esercizio del sistema di coltura.....	116
5.1.1	Procedura di messa in esercizio del sistema di coltura .....	118

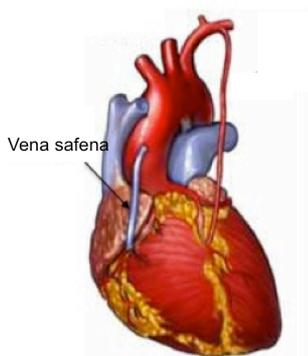
5.1.2 Risultati delle campagne sperimentali con campioni di vena safena umana .....	119
<b>Conclusioni e sviluppi futuri.....</b>	<b>127</b>
<b>APPENDICE A.....</b>	<b>132</b>
<b>APPENDICE B .....</b>	<b>139</b>
<b>APPENDICE C .....</b>	<b>142</b>
<b>APPENDICE D .....</b>	<b>146</b>
<b>APPENDICE E.....</b>	<b>149</b>
<b>APPENDICE F.....</b>	<b>152</b>
<b>APPENDICE G.....</b>	<b>159</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>162</b>

## Sommaro

### Introduzione

Il bypass aorto-coronarico (CABG) è la procedura standard per la rivascolarizzazione del tessuto miocardico ischemico. Durante le procedure di CABG, un segmento di vaso anastomizzato con una o più arterie coronarie occluse al fine di realizzare un ponte (bypass) e ripristinare il corretto afflusso sanguigno al tessuto cardiaco.

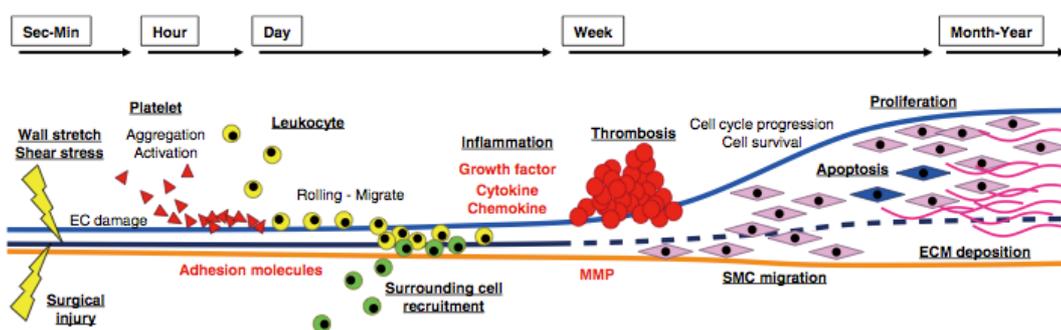
La vena safena (VS) rappresenta il *gold standard* nelle applicazioni di CABG in quanto la sua lunghezza ne permette l'utilizzo per innesti multipli e la sua posizione superficiale la rende facilmente accessibile [1] (Figura 1).



**Figura 1** Bypass aorto-coronarico effettuato mediante vena safena e arteria mammaria..

Tuttavia, la sua affidabilità a lungo termine è scarsa. In particolare, circa il 15% dei graft si occlude durante il primo anno dall'intervento e circa il 50% dei pazienti necessita di reintervento entro 10 anni [2].

Ciò è dovuto al fatto che la parete della VS nativa ha differenti caratteristiche strutturali e funzionali rispetto alle arterie coronarie. Infatti in condizioni fisiologiche la VS umana è soggetta a condizioni di bassa pressione ( $5\div 10$  mmHg), flusso non pulsatile e shear stress molto basso ( $0.1\div 0.6$  Pa), mentre, dopo l'innesto in sede coronarica, il graft deve sopportare condizioni di pressorie più elevate ( $60\div 140$  mmHg), flusso pulsatile e shear stress più elevato ( $1\div 7$  Pa) [3]. Le modificazioni biomeccaniche che avvengono in seguito alla tresposizione della VS in ambiente arterioso inducono un rimodellamento adattativo della parete della VS. Questo è caratterizzato da denudazione e danno endoteliale e dalla proliferazione e migrazione delle cellule muscolari lisce (SMCs - *Smooth Muscle Cells*) dalla media verso l'intima. Il rimodellamento è definito come un adattamento dinamico strutturale e biochimico del graft venoso che provoca dei cambiamenti a lungo termine in termini di calibro, spessore della parete e composizione della matrice extracellulare (ECM - *Extracellular Matrix*). L'insieme di questi eventi è chiamato Vein Graft Disease (VGD). Tre processi sono responsabili del fallimento del graft venoso: trombosi, iperplasia dell'intima (IH - *Intimal Hyperplasia*) e aterosclerosi, che contribuiscono al fallimento del graft nel periodo acuto, subacuto e tardo, rispettivamente (Figura 2).



**Figure 2** Time course of vein graft neointimal formation. EC: endothelial cell; SMC: smooth muscle cell; MMP: matrix metalloproteinase; ECM: extracellular matrix [4].

La principale causa di fallimento del graft venoso è l'IH. L'IH è caratterizzata dalla proliferazione delle SMCs e dalla loro migrazione dalla media verso l'intima all'interno della parete vascolare. Inoltre, le SMCs cambiano il loro fenotipo da contrattile a sintetico, producendo una abbondante quantità di ECM; ciò provoca fibrosi e irrigidimento del graft venoso, fenomeni che possono limitare la capacità del segmento venoso di adattarsi alla circolazione arteriosa.

Recentemente, sono stati sviluppati diversi sistemi di coltura *ex vivo* di segmenti venosi che hanno permesso di studiare i processi coinvolti nello sviluppo di IH. I segmenti vascolari possono essere posti in coltura per un determinato periodo di tempo in condizioni statiche o dinamiche.

Le colture statiche causano un rimodellamento patologico dei segmenti venosi, con conseguente sviluppo di IH, dovuto all'assenza di stimoli emodinamici fisiologici [5].

I sistemi di coltura a perfusione, che possono essere caratterizzati da un flusso stazionario o pulsatile, permettono di mimare l'ambiente fisiologico presente *in vivo*. Questi sistemi sono costituiti da un sistema pompante, regolatori di pressione e temperatura, una

camera di coltura per l'alloggiamento di tessuti vascolari biologici e un sistema compliant per assicurare la presenza di un flusso laminare all'interno del sistema [6].

Il progetto di tesi, svolto presso il  $\mu$ BSLab, si inserisce all'interno di un progetto svolto in collaborazione con l'I.R.C.C.S. Centro Cardiologico Monzino (in particolare con il laboratorio LIT). L'obiettivo progetto è quello realizzare un nuovo sistema di coltura *ex vivo* di segmenti venosi (EVCS) al fine di indagare i fenomeni responsabili del VGD. A tal fine l'obiettivo del lavoro di tesi è quello di ottenere un sistema di coltura funzionale e *user-friendly* che permetta di ricreare i pattern di stimolazione pressoria arteriosa a cui è sottoposto *in vivo* il graft venoso.

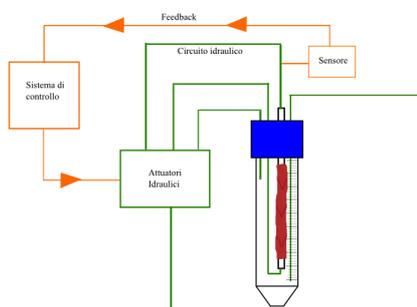
## Materiali e metodi

Al fine di realizzare un sistema di coltura *ex vivo* in grado di ricreare l'ambiente arterioso presente *in vivo*, durante la fase di progettazione sono state delineate alcune specifiche di progetto. Per un sistema di *organ culture*, le specifiche di progetto generali sono: sterilizzabilità e biocompatibilità dei componenti, facilità di assemblaggio sotto

cappa a flusso laminare e maneggevolezza, trasparenza, mantenimento in vita del campione biologico, possibilità di monitoraggio on line e off line del processo. In particolare, per l'applicazione in esame, altre specifiche, delineate in collaborazione con il personale del LIT, sono: ridotto volume di priming (inferiore ai 50 ml), facilità di posizionamento del campione biologico all'interno della camera di coltura e necessità di ricreare le condizioni pressorie arteriose ( $80 \div 120$  mmHg) presenti *in vivo*.

#### Architettura del sistema di coltura ex vivo

L'EVCS consta di una camera di coltura per l'alloggiamento di segmenti di VS e di un circuito di stimolazione. In Figura 3 è rappresentata una schematizzazione del principio di funzionamento del sistema.



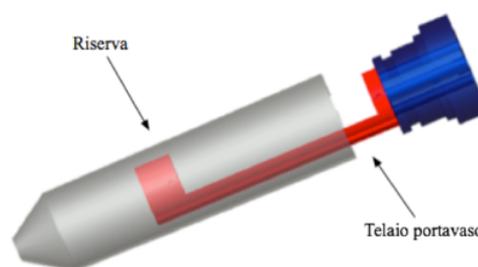
**Figura 3** Rappresentazione schematica dell'architettura del sistema di coltura ex vivo.

Il segmento di VS è alloggiato per mezzo di opportuni afferraggi all'interno della camera, la quale è connessa al circuito idraulico che permette di stimolare il vaso. Gli attuatori idraulici presenti all'interno del circuito consentono sia di imporre la stimolazione pressoria al segmento di VS umana che di far ricircolare il medium di coltura all'interno della camera. Entrambe le funzioni sono

gestite da un sistema di monitoraggio e controllo. Un sensore di pressione (Press-S-000, PendoTECH, NJ, USA) permette di misurare la pressione intraluminale del segmento di VS e di inviarlo al sistema di controllo.

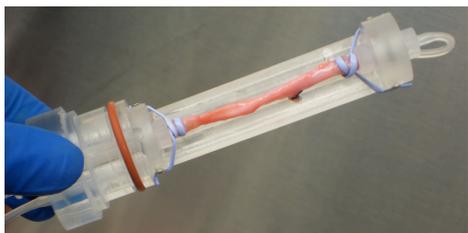
#### Progettazione della camera di coltura

La camera di coltura (Figura 4) comprende un telaio portavaso e una riserva.



**Figure 4** Disegno CAD del prototipo 1 assemblato in esso si distinguono il telaio portavaso e la riserva.

Il telaio è stato è stato disegnato con un software di modellazione CAD 3D (Proengineer, PTC, Needham, MA, USA) ed è stato realizzato alle macchine utensili in polimetilmetacrilato (PMMA), un materiale biocompatibile, trasparente e sterilizzabile in ossido di etilene (EtO). Il telaio portavaso consente di alloggiare segmenti di VS umana di lunghezza pari a circa 7 cm. I campioni di vaso sono calzati ad entrambe le estremità su connettori in polipropilene (PP) (S220-6, Cole Parmer, IL, USA), aventi diametro esterno (3.2mm) compatibile con il diametro interno del vaso. I campioni sono vincolati ai connettori in PP per mezzo di un laccio elasticamente estensibile, chiamato *vessel loop* (Figura 5).



**Figura 5** Campione di VS vincolato ai connettori in PP mediante il vessel loop.

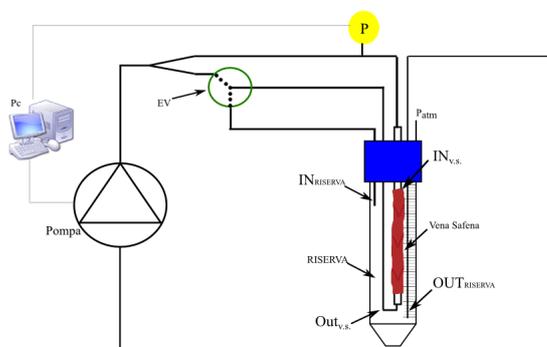
La riserva è una Falcon da 50 ml. L'accoppiamento tra riserva e telaio portavaso è realizzato mediante un O-ring in silicone; questo tipo di accoppiamento è pratico, immediato ed intuitivo per l'operatore (Figura 6).



**Figura 6** Accoppiamento tra riserva e telaio portavaso realizzato mediante un O-ring.

### Progettazione del circuito di stimolazione

Il circuito di stimolazione è costituito da attuatori idraulici (una pompa e un'elettrovalvola pinza-tubo), circuito idraulico e sistema di monitoraggio e controllo (Figura 7).



**Figura 7** Rappresentazione schematica del circuito di stimolazione.

La pompa è una Watson Marlow 323D (Watson Marlow Group, UK), con testa pompante 314D (Watson Marlow Group), mentre l'elettrovalvola pinza-tubo è una SIRAI S305-09 (SIRAI® Elettromeccanica, Italy).

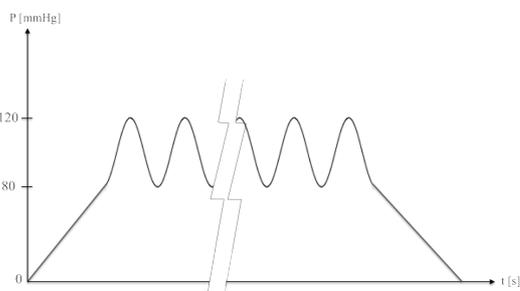
Il circuito idraulico è realizzato mediante tubi in silicone Platinum Cured (Cole Parmer) di differente diametro interno (0.8 mm e 1.6 mm) e medesimo spessore della parete pari a 0.8 mm. La lunghezza dei tubi aventi diametro interno pari a 0.8 mm è dimensionata in accordo con quanto riportato in letteratura [7] al fine di garantire un adeguato apporto di ossigeno al campione biologico. Da ciò deriva una lunghezza complessiva di circa 2.5 m. La lunghezza dei tubi aventi diametro interno pari a 1.6 mm è stata dimensionata al fine di minimizzare le perdite di carico lungo il circuito idraulico.

Un sistema di monitoraggio e controllo, già disponibile presso il  $\mu$ BSLab, è stato ottimizzato al fine di applicare al segmento di VS una pressione pulsatile (80÷120 mmHg) in maniera automatica e controllata o di ricircolare il medium di coltura. Gli attuatori sono gestiti mediante un software dedicato sviluppato in ambiente LabView (National Instruments Corp., TX, USA). Il processo di stimolazione pulsatile può essere suddiviso in tre fasi (Figura 8):

- Fase di carico: il medium di coltura fluisce all'interno del segmento vascolare finché la pressione al suo interno raggiunge il valore di set-point predefinito (ad esempio 80 mmHg);
- Fase di pulsazione ciclica: il segmento di vaso viene caricato e scaricato in volume al fine di ottenere una stimolazione pressoria

pulsatile nell'intervallo desiderato (ad esempio 80÷120 mmHg).

- Fase di scarico: la pressione intraluminale diminuisce fino al raggiungimento di una pressione nulla.



**Figura 8** Andamento schematico della pressione intraluminale durante la fase di stimolazione pulsatile

La fase di ricircolo del medium, interposta tra due fasi successive di stimolazione, ha una durata pari a 2 minuti e fornisce l'adeguato apporto metabolico al segmento di VS.

Il layout finale dell'EVCS è mostrato in Figura 9.



**Figura 9** Foto del layout finale dell'EVCS.

#### *Collaudo idraulico*

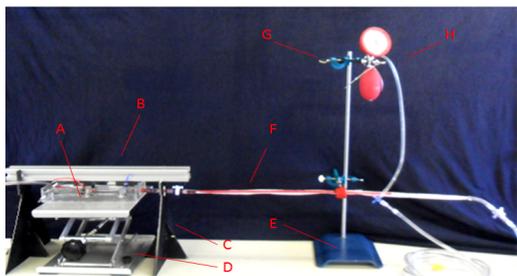
Al fine di testare la tenuta idraulica, l'EVCS è stato assemblato, riempito con acqua deionizzata e collegato alla pompa, la quale fornisce una portata di 5.4 ml/min. Il test ha durata pari a 2 ore.

#### *Collaudo del sistema di monitoraggio e controllo*

Per verificare l'adeguatezza del circuito di stimolazione sono stati condotti dei test preliminari: un test di collaudo del sistema di monitoraggio e controllo utilizzando un condotto in silicone in sostituzione del segmento di VS, finalizzato a valutare la risposta degli attuatori idraulici e l'affidabilità dell'intero sistema per tutta la durata della campagna sperimentale; una prova di caratterizzazione idraulica del sistema di coltura, al fine di verificare la correttezza della sollecitazione imposta al segmento di vaso e di assicurare l'assenza di perdite di carico significative all'interno del circuito idraulico.

#### *Misure di compliance di segmenti di VS*

La caratterizzazione meccanica di segmenti di VS in termini di compliance è stata condotta al fine di determinare i volumi di fluido, e quindi le portate, da imporre al vaso al fine di raggiungere i valori pressori intraluminari desiderati. Le misure sono state effettuate su segmenti di VS (n=6) provenienti da soggetti sottoposti a CABG. A tal fine è stato utilizzato un set-up sperimentale già disponibile presso il  $\mu$ BSLab (Figura 10). Tali prove sono state condotte imponendo al vaso pressioni nel range 0÷120 mmHg (ad intervalli pressori di 10 mmHg) e registrando la variazione di volume associata.



**Figura 10** Foto del set-up utilizzato per effettuare le misure di compliance di segmento di VS.

#### *Verifica del mantenimento della sterilità*

Al fine di verificare il mantenimento della sterilità del sistema, la camera di coltura e del circuito idraulico sono stati sterilizzati in ossido di etilene. Il sistema è stato assemblato all'interno di una cappa a flusso laminare e riempito con 40 ml di RPMI 1640 (Roosvelt Park Memorial Institute, Lonza Group LTD, Switzerland) senza l'aggiunta di antibiotici. Il sistema di coltura è stato connesso alla pompa peristaltica ed inserito all'interno di un incubatore (37°C e 5% di CO<sub>2</sub>) per 7 giorni con un ricambio parziale di medium ogni 3 giorni.

#### *Campagne sperimentali preliminari con segmenti di VS umana*

Segmenti di scarto di VS umana sono stati ottenuti da pazienti sottoposti a CABG. I campioni di vena sono stati divisi in due segmenti: uno è stato immediatamente fissato in paraformaldeide al 4% (campione di controllo); l'altro è stato posto in coltura all'interno dell'EVCS per 7 giorni. Il sistema è stato riempito con 40 ml di DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium) addizionato con 10% di FBS (Fetal Bovine Serum), 1% di L-glutamina, 1% di

streptomicina-penicillina e posto all'interno di un incubatore (37°C e 5% CO<sub>2</sub>).

Tre prove sono state condotte su tre differenti segmenti di VS:

- il campione SV65 è stato perfuso con una portata pari a 5ml/min;
- il campione SV69 è stato stimolato con una pressione pulsatile (80÷120 mmHg);
- il campione SV73 è stato diviso in due segmenti: uno è stato perfuso con una portata pari a 10 ml/min; l'altro è stato stimolato con una pressione pulsatile (80÷120 mmHg).

I segmenti ottenuti dal campione SV65 sono stati sottoposti ad analisi di immunofluorescenza al fine di verificare la vitalità del tessuto biologico in seguito alla perfusione. Per le analisi di immunofluorescenza, le sezioni sono state marcate con gli anticorpi monoclonali CD31, CD34, vWF (fattore di von Willebrand) e anti- $\alpha$ SMA (actina delle SMCs). Per la visualizzazione dei nuclei è stata condotta la colorazione con DAPI.

Dopo essere stati fissati in paraformaldeide al 4%, i segmenti di VS sono stati inclusi in paraffina e tagliati in sezioni di spessore pari a 5  $\mu$ m. I segmenti ottenuti dai campioni SV69 e SV73 sono stati sottoposti ad analisi istologiche e zimografiche al fine di valutare rispettivamente l'integrità della parete vascolare e l'attività proteolitica delle MMP-2 e MMP-9. Le MMPs sono enzimi coinvolti nel rimodellamento della parete vascolare che con la loro azione favoriscono la migrazione delle SMCs [3].

Le colorazioni con ematossilina-eosina (H/E) e tricromica di Masson sono state effettuate al

fine di condurre analisi istologiche e istomorfometriche, rispettivamente. Per le istomorfometrie sono state acquisite immagini digitali mediante il software AxioVision Bio (Carl Zeiss®, Germany).

### Risultati

Il collaudo idraulico ha mostrato assenza di trafiletti di fluido e un buon isolamento della camera di coltura dall'ambiente esterno.

Il collaudo del sistema di monitoraggio e controllo ha dimostrato l'affidabilità e la funzionalità degli attuatori idraulici. Tuttavia, durante questa fase preliminare, la risposta del sistema alla sollecitazione pressoria è risultata critica a causa delle forti oscillazione dovute ai rulli della pompa peristaltica. Per ovviare a questo inconveniente e smorzare tali pulsazioni, si è resa necessaria l'introduzione di una camera di compliance, opportunamente dimensionata e posta sulla linea di mandata della pompa. In queste condizioni, è stata effettuata un test di collaudo della durata di 7 giorni, in cui il sistema di monitoraggio e controllo si è dimostrato affidabile (Figura 11).

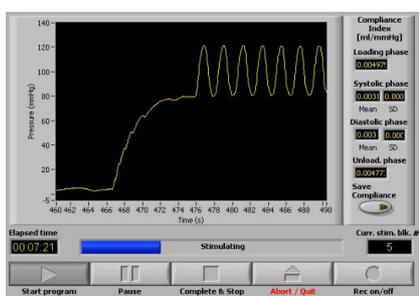


Figura 11 Andamento della pressione in fase di carico e pulsazione ciclica.

I risultati delle prove di compliance di segmenti di VS hanno mostrato una maggiore distensibilità del vaso in corrispondenza di bassi valori di pressione (10 mmHg), mentre una minore distensibilità, dimostrata da una minore pendenza della curva volume-pressione (Figura 12), attorno a valori pressori più elevati, testimoniando un irrigidimento del tessuto venoso.

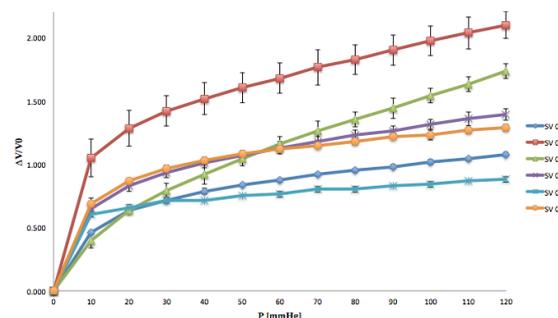
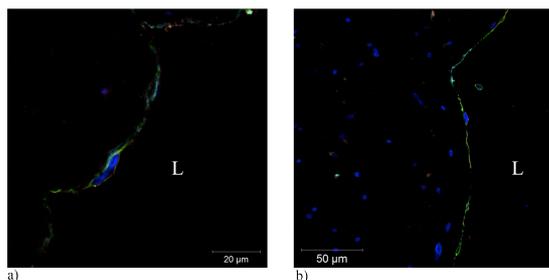


Figura 12 Andamento delle curve volume-pressione relative ai segmenti di VS.

Le prove di mantenimento della sterilità hanno mostrato l'assenza di contaminazione.

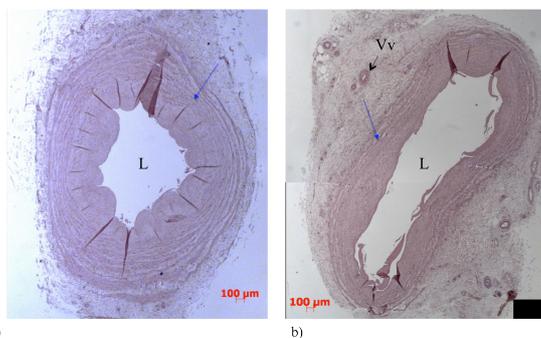
I risultati degli esperimenti preliminari con segmenti di VS hanno mostrato la mantenuta vitalità degli stessi e modificazioni morfologiche della parete vascolare in seguito a 7 giorni di coltura.

Per quanto riguarda le analisi di immunofluorescenza (Figura 13), la marcatura diretta alle cellule endoteliali ha mostrato la presenza di questo tipo cellulare in corrispondenza della superficie interna del vaso sia nel campione di controllo che in quello perfuso (Figura 13, a-b). La colorazione con DAPI (punti blu in Figura 13) ha confermato la mantenuta vitalità del tessuto biologico.



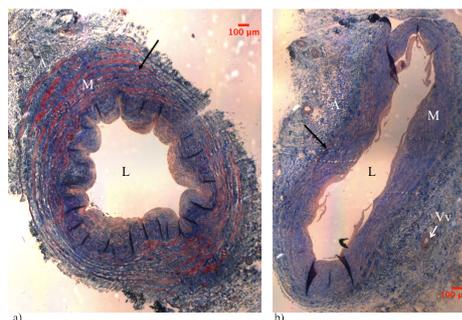
**Figura 13** Immagini di immunofluorescenza. a) campione di controllo; b) campione perfuso.

La colorazione con H/E (Figura 14) ha mostrato l'integrità della parete vascolare sia nel campione di controllo che in quello perfuso.



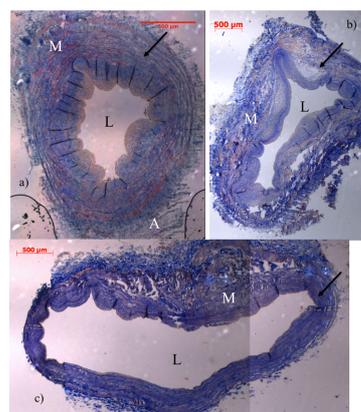
**Figura 14** Colorazione con H/E. a) campione di controllo; b) campione stimolato.

Analisi istomorfometriche, condotte misurando lo spessore della media in seguito alla colorazione tricromica di Masson (Figura 15), hanno mostrato un assottigliamento del 65% (da  $0.80 \pm 0.005$  mm a  $0.52 \pm 0.02$  mm) della media nel segmento stimolato (Figura 15, b) rispetto al campione di controllo (Figura 15, a). L'area luminale è risultata aumentata nel segmento stimolato, passando da  $0.89 \pm 0.09$  mm<sup>2</sup> a  $1.78 \pm 0.32$  mm<sup>2</sup>.



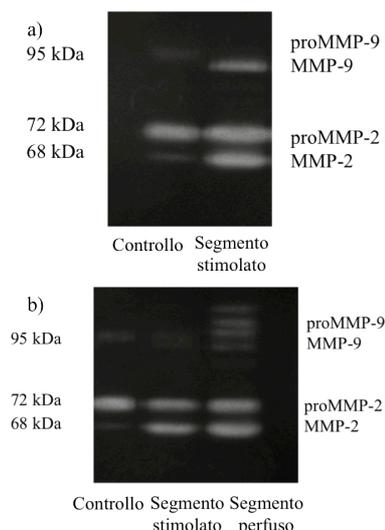
**Figura 15** Colorazione tricromica di Masson. a) campione di controllo; b) campione stimolato.

Esperimenti condotti sul segmento SV73 (colorazione tricromica di Masson, Figura 12), ha mostrato un incremento dello spessore della parete nel campione perfuso (Figura 16, b), un assottigliamento nel campione stimolato (Figura 16, c), in confronto al campione di controllo (Figura 16, a).



**Figura 16** Colorazione tricromica di Masson. a) campione di controllo; b) campione perfuso; c) campione stimolato.

Per entrambi gli esperimenti (SV69 e SV73), le analisi zimografiche (Figura 17) ha nno dimostrato un incremento dell'espressione MMP-2 e delle MMP-9 nei campioni stimolati e perfusi.



**Figura 17** Zimogramma rappresentativo dell'attività proteolitica delle MMPs nel campione di controllo e nei campioni posti in coltura. a) Segmento SV69; b) Segmento SV73.

## Discussioni

L'attività di progettazione ha portato alla realizzazione di un sistema di coltura *ex vivo* funzionale, user-friendly e affidabile.

Le specifiche di progetto relative alla facilità di assemblaggio sotto cappa e alla maneggevolezza sono state soddisfatte grazie ad una serie di scelte tecniche effettuate in collaborazione con il personale di laboratorio.

L'EVCS ha permesso di sottoporre segmenti di VS umana ad una stimolazione pressoria pulsatile in un ambiente sterile e controllato mantenendoli in vita per 7 giorni, come dimostrano le analisi di immunofluorescenza.

Analisi istologiche hanno dimostrato cambiamenti morfologici in termini di spessore della parete dei segmenti posti in coltura. L'aumento dell'area luminale in risposta ad un flusso arterioso potrebbe essere correlato alla proliferazione cellulare delle SMCs. Le elevate pressioni hanno provocato,

inoltre, la distensione di tutti i componenti della parete vascolare.

In conclusione, il nuovo EVCS sembra essere un valido strumento per lo studio dei meccanismi associati al VGD e allo sviluppo di IH.

## Bibliografia

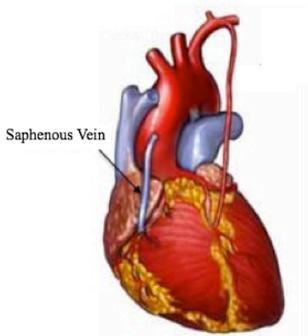
1. Dashwood, M.R. and A. Loesch, *The saphenous vein as a bypass conduit: the potential role of vascular nerves in graft performance*. *Curr Vasc Pharmacol*, 2009. **7**(1): p. 47-57.
2. Goldman, S., et al., *Long-term patency of saphenous vein and left internal mammary artery grafts after coronary artery bypass surgery: results from a Department of Veterans Affairs Cooperative Study*. *J Am Coll Cardiol*, 2004. **44**(11): p. 2149-56.
3. Dummler, S., et al., *Pulsatile ex vivo perfusion of human saphenous vein grafts under controlled pressure conditions increases MMP-2 expression*. *Biomed Eng Online*, 2011. **10**: p. 62.
4. Muto, A., et al., *Mechanisms of vein graft adaptation to the arterial circulation: insights into the neointimal algorithm and management strategies*. *Circ J*, 2010. **74**(8): p. 1501-12.
5. Clerin, V., et al., *Mechanical environment, donor age, and presence of endothelium interact to modulate porcine artery viability ex vivo*. *Annals of Biomedical Engineering*, 2002. **30**(9): p. 1117-1127.
6. Surowiec, SM., et al., *A new perfusion culture system to study human vein*. *Journal of Surgical Research*, 2000. **88**(1): p.34-41.
7. Orr, D.E. and K.J.L. Burg, *Design of a Modular Bioreactor to Incorporate Both Perfusion Flow and Hydrostatic Compression for Tissue Engineering Applications*. *Annals of Biomedical Engineering*, 2008. **36**(7): p. 1228-1241.

# Abstract

## Introduction

Coronary Artery Bypass Grafting (CABG) is the standard procedure for the revascularization of ischemic myocardium. During CABG one or more obstructed coronary arteries are bypassed using a graft in order to restore normal blood flow to the heart.

Saphenous vein (SV) is the gold standard in CABG since its long length and its superficial anatomical position. [1] (Figure 1).

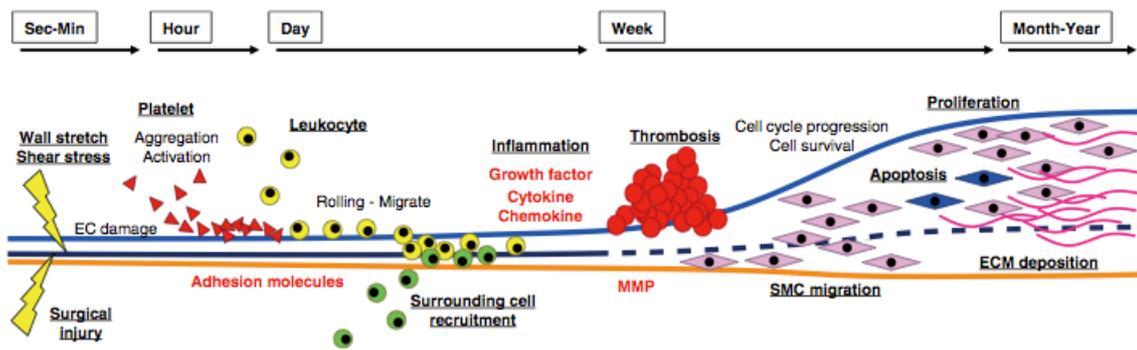


**Figure 1** CABG with saphenous vein and internal mammary artery.

However, SV long term patency decrease over time after CABG. In particular, approximately 15% of grafts occlude in the first year after surgery, and over 50% of patients requires new grafting after 10 years [2]. This is due to the fact that the normal SV wall has different structural and functional characteristics with respect to arterial wall. In fact, under physiological conditions human SVs are exposed to low pressure conditions (5÷10 mmHg), non-pulsatile flow and a very

low shear stress (0.1÷0.6 Pa), while, after grafting into the coronary artery system, the graft must support higher pressure conditions (60÷140 mmHg), pulsatile flow and higher shear stress (1÷7 Pa) [3]. The biomechanical changes occurring after transposition of the SV in the arterial system induce an adaptive remodeling of the SV wall. This is characterized by endothelium denudation and disruption, and smooth muscle cells (SMCs) proliferation and migration from the media into the intima. Remodeling is defined as a dynamic structural and biochemical adaptation of the vein wall that results in long-term changes in lumen caliber, wall thickness, and composition of extracellular matrix (ECM). The collection of these events is called Vein Graft Disease (VGD). Three processes are responsible of vein graft failure: thrombosis, intimal hyperplasia (IH) and atherosclerosis, that contribute to graft failure in the acute, subacute and late post operative periods, respectively (Figure 2).

The major cause of vein graft failure is IH. IH is characterized by SMCs proliferation and their migration from the medial to the intimal layer of the vessel wall. In addition the SMCs phenotype changes from contractile to synthetic, producing an increased amount of ECM and other constituents of the intimal layer.



**Figure 2** Time course of vein graft neointimal formation. EC: endothelial cell; SMC: smooth muscle cell; MMP: matrix metalloproteinase; ECM: extracellular matrix [4].

These phenomena lead to fibrosis and stiffening of the vein graft which may limit the vein's ability to properly remodel in the arterial circulation.

Recently, several *ex vivo* vessel culture systems have been devised in order to investigate the processes involved in the development of IH. Vessels can be cultured under static or dynamic conditions. Static cultures cause pathological remodeling of the veins, including IH, due to the absence of known physiological hemodynamic stimuli [5].

*Ex vivo* perfusion systems for the investigation of intact vascular tissue, which can provide steady or pulsatile flow, allow to mimic the physiological *in vivo* environment. These systems consist of a combination of a pumping system, pressure and temperature regulators, tissue housing chamber, and compliance system to allow for laminar flow within the system [6].

In the framework of an ongoing collaboration between  $\mu$ BSLab and I.R.C.C.S. Centro Cardiologico Monzino (LIT), aimed at elucidating the phenomena responsible for *in*

*in vivo* early arterialization of SV after CABG surgery, this thesis work was focused onto the design of an *ex vivo* vessel culture system (EVCS). Particularly, the aim is to obtain a functional, reliable and user-friendly device allowing to reproduce the pressure patterns of the physiological coronary environment.

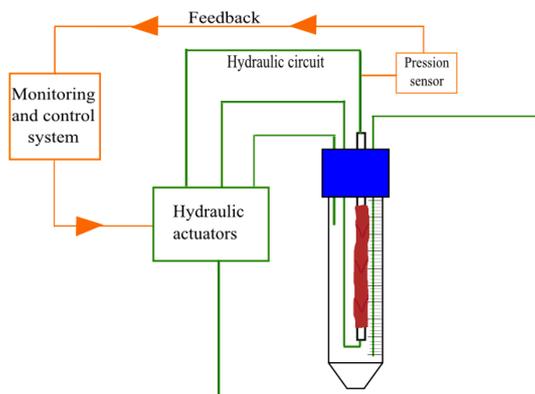
## Materials and methods

To reach the goal of achieving an *ex vivo* organ culture system that recreates the *in vivo* arterial environment, design specifications were delineated in collaboration with the personnel from the LIT. General design specifications for an organ culture system are: components sterilizability and biocompatibility, ease of assembly under the laminar flow hood and good manageability, transparency, ease of replacement of the medium, biological sample viability maintenance and the possibility to monitor the process on-line and off-line. Particularly, for the EVCS here presented other requirements were defined considering the specific application: small priming volume (lower than 50 ml), ease of vessel accommodation within

its housing and replication of the *in vivo* arterial pulsatile pressure stimulation (80÷120 mmHg).

#### *Architecture of the ex vivo vessel culture system*

The EVCS consists of a SV culture chamber and a stimulation circuit. A schematic representation of the system's working principle is shown in Figure 3.

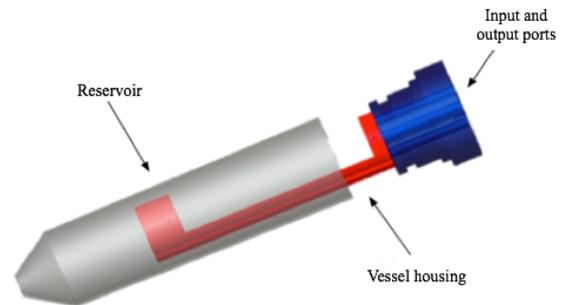


**Figure 3** Schematic representation of the architecture of the ex vivo vessel culture system.

The vessel culture is performed within a culture chamber that hosts the SV. An external hydraulic circuit is connected to the chamber to stimulate the vessel. Hydraulic actuators, which are located along the circuit line, are used to apply pressure stimulation to the human SV segment or to make the culture medium recirculate within the chamber. Both functions are managed by a monitoring and control system. A pressure sensor (Press-S-000, PendoTECH, NJ, USA) provides the intraluminal pressure signal to the control system.

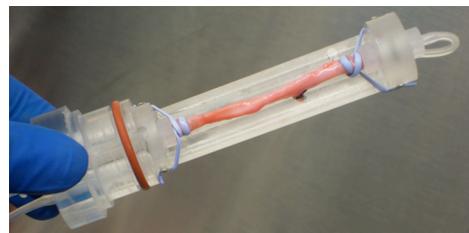
#### *Design of ex vivo vessel culture chamber*

The culture chamber (Figure 4) includes a SV housing and a reservoir.



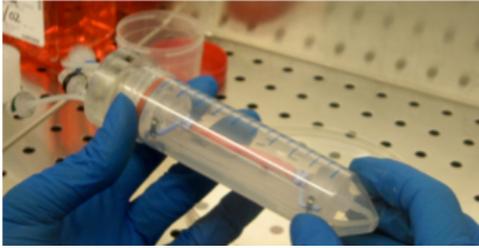
**Figure 4** CAD model of the ex vivo vessel culture system.

The vessel housing was designed with 3D-CAD software (Proengineer, PTC, Needham, MA, USA) and was manufactured by machining polymethylmethacrylate (PMMA) blocks. PMMA is biocompatible, ethylene-oxide (EtO) sterilizable and transparent. The housing allows hosting up to 7-cm-length human SV segments. The samples are cannulated on both ends with polypropylene (PP) barbed luer fittings (S220-6, Cole Parmer, IL, USA), with outside diameters (3.2 mm) that match the inside diameters of the vessel. The samples are fixed on the PP connectors using an elastic and extensible *vessel loop* (Figure 5).



**Figure 5** SV sample fixed on the PP connectors using the vessel loop.

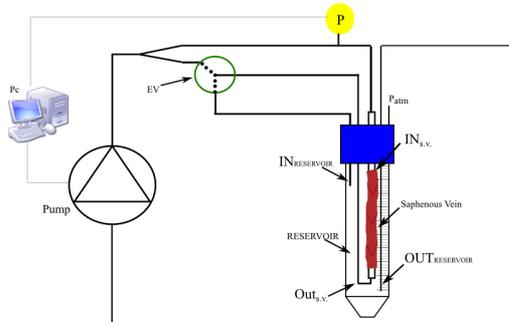
A 50 ml falcon tube acts as reservoir and contains the vessel housing. A silicone O-ring coupling connects the reservoir to the vessel housing (Figure 6).



**Figure 6** O-ring coupling that connects the reservoir to the vessel housing,

### *Design of the stimulation system*

The stimulation circuit consists of hydraulic actuators (a pump and a solenoid pinch valve), hydraulic circuit and monitoring and control system (Figure 7).



**Figure 7** Schematic representation of the stimulation circuit.

The pump is a Watson Marlow 323D (Watson Marlow Group, UK), with 314D pumping head (Watson Marlow Group), while the solenoid pinch-valve is a SIRAI S305-09 (SIRAI® Elettromeccanica, Italy).

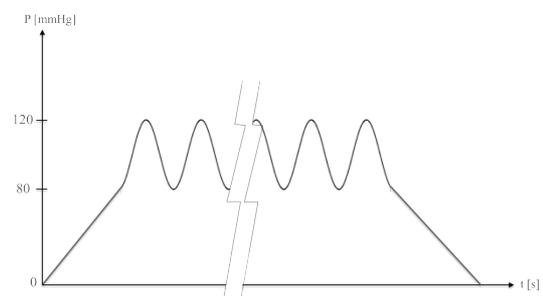
The hydraulic circuit consists of Platinum Cured silicone tubing (Cole Parmer) with different internal diameters (0.8 or 1.6 mm) and 0.8-mm wall thickness. The length of the 0.8-mm-inner diameter tubing was dimensioned according with the literature [7] in order to guarantee a oxygen supply to the biological sample. The resulting length is about 2.5 m. The length of the 1.6-mm-inner diameter tubing was dimensioned in order to

minimize the head loss along the hydraulic circuit during the stimulation phase.

The monitoring and control system was based upon previous experiences carried out at  $\mu$ BSLab and has been optimized in order to automatically apply a controlled, pulsatile pressure to the SV segments (80÷120 mmHg) or to recirculate the culture medium. Actuators are managed via a dedicated software developed in LabView (National Instruments Corp., TX, USA) running on a PC equipped with a I/O board.

The pulsatile stimulation period can be divided into three phases (Figure 8):

- Loading phase: the culture medium is delivered trough the vessel until the pressure reaches a pre-defined set-point (e.g. 80 mmHg);
- Pulsatile stimulation phase: a volume of the medium is reciprocated to and from the vessel segment in order to apply a controlled pulsed stimulation in a pre-defined range (e.g. 80÷120 mmHg).
- Unloading phase: the pressure inside the sample is made decrease to zero by inverting the medium flow direction.

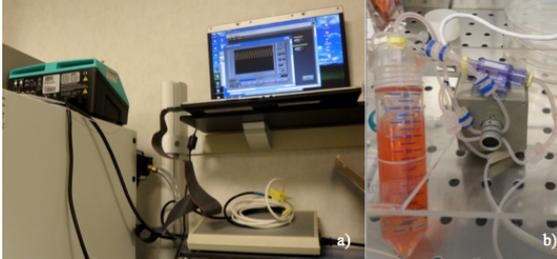


**Figure 8** Schematic representation of pulsatile stimulation.

A medium recirculation period is interposed between two subsequent pulsatile stimulation

periods and maintained for 2 minutes to allow a metabolic supply to the vessel.

The final layout of the *EVCS* is shown in Figure 9.



**Figure 9** Picture of the final layout of the ex vivo culture system.

#### *Hydraulic test*

To test the *EVCS* watertightness, the *EVCS* was assembled, filled with deionized water and connected to the pump for 2 hours, applying a 5.4 ml/min flow rate.

#### *Monitoring and control system test*

Several tests were performed in order to study the monitoring and control system performance.

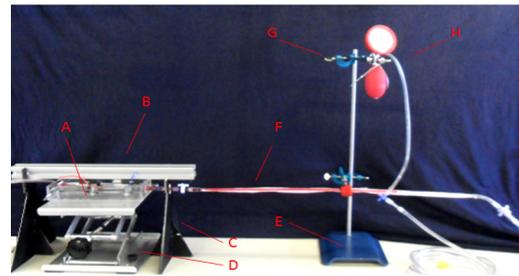
An artificial vessel substitute was used to verify the hydraulic actuators and the system reliability over time.

In order to prove the vessel simulation effectiveness and to ensure the absence of significant head loss along the hydraulic circuit, a preliminary test was performed by monitoring the pressure at relevant sites along the circuit.

#### *Compliance evaluation of SV segments*

For a better comprehension of the mechanism involved in pulsatile *SV* stimulation, preliminary compliance measurements of *SV* segments (n=6) retrieved from patients

undergoing CABG were carried out. To this aim, an already existing custom-made system (Figure 10) was used to measure the volume-to-pressure relationship during *SV* segments filling. Vessel lumens were exposed to incremental pressure (0÷120 mmHg, step 10 mmHg) and the associate volume increments were recorded.



**Figure 10** Picture of the custom-made system used to measure the *SV* compliance.

#### *Sterility test*

To test the *EVCS* sterility maintenance, the vessel culture chamber and the hydraulic circuit were sterilized via EtO. The system was assembled under laminar flow hood and filled with 40 ml of RPMI 1640 (Roosvelt Park Memorial Institute, Lonza Group LTD, Switzerland) without antibiotics. The culture system was connected to the peristaltic pump and placed in the incubator (37°C and 5% of CO<sub>2</sub>) for 7 days with a partial medium replacement every 3 days of culture.

#### *Preliminary experimental campaign with human SV segments*

Surplus segments of human *SV* were obtained from patients undergoing CABG. Vein samples were divided into two segments: one was immediately fixed in 4% formalin (as control sample), the other one was used for dynamic experiments with the *EVCS*. The

system was filled with 40 ml of DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium) additionated with 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 1% L-glutamine, 1% streptomycin-penicillin and placed in the incubator (37°C and 5% CO<sub>2</sub>).

Three tests were performed with three different SV segments for a period of 7 days:

- the SV65 sample was perfused with 5ml/min;
- the SV69 sample was stimulated with pulsatile pressure (80÷120 mmHg);
- the SV73 sample was divided into two segments: one was perfused at 10 ml/min; the other one was stimulated with pulsatile pressure (80÷120 mmHg).

SV65 segments underwent immunofluorescence analysis to check for the tissue viability. For immunofluorescence analysis, sections were stained with the monoclonal antibodies CD31, CD34, vWF (von Willebrand Factor) and anti- $\alpha$ SMA (Smooth Muscle Actin). DAPI staining was used to visualize nuclei.

After fixation in 4% formalin, vein segments were paraffin embedded and cutted in 5- $\mu$ m-thick sections. SV69 and SV73 segments underwent histological and zymographic analysis to check for vessel wall integrity and MMPs (MMP-2 and MMP-9) proteolytic activity, respectively. MMPs are enzymes directly involved in vascular remodeling facilitating the SMCs proliferation and migration [3].

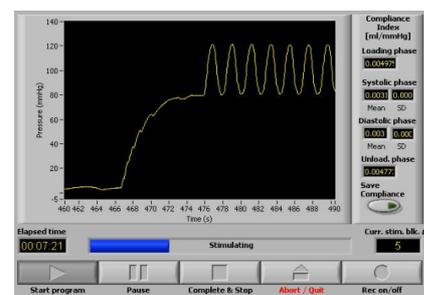
Hematoxylin-eosin (H/E) staining was used for histological analysis, Masson trichrome staining for hystomorphometric assessment. For hystomorphometry, digital pictures were

taken and measurement performed with AxioVision Bio Software (Carl Zeiss®, Germany).

## Results

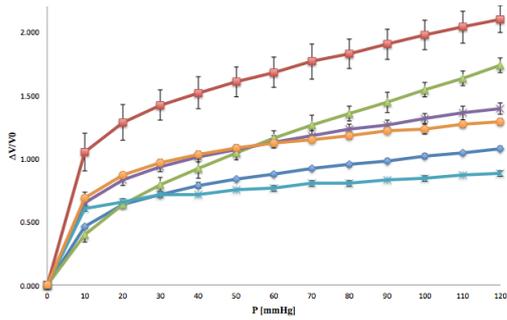
The hydraulic test showed no leakage of fluid and a good isolation of the inner chamber from the external environment.

Monitoring and control system tests demonstrated the proper functioning of hydraulic actuators. However, in early experiments, the effectiveness of the vessel stimulation process was invalidated by the pump rollers interaction with the pump tubing. To remove this disturbance, a properly dimensioned compliance chamber was placed within the circuit so as to dampen the pulsation of the pump to desired levels (Figure 11). In this conditions, a good reliability of the monitoring and control system was demonstrated with tests running up for 7 days.



**Figure 11** Pressure path of load and pulsatile stimulation phase.

SV compliance results showed an initial rapid volume rise with the first pressure increment step at 10 mmHg, then SV responds with a decreasing slope of the volume-to-pressure curve (Figure 12), indicating that a considerable hardening of the SV tissue occurs.

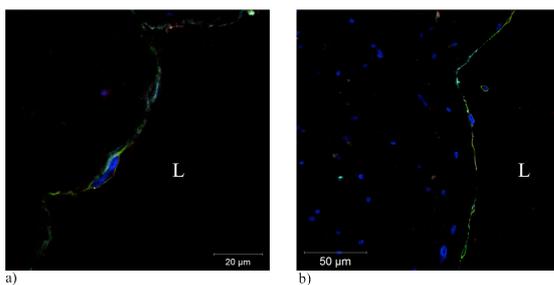


**Figure 12** SVs volume-to-pressure relationship.

Sterility tests performed on the system showed no contamination in the culture medium after 7 days of culture.

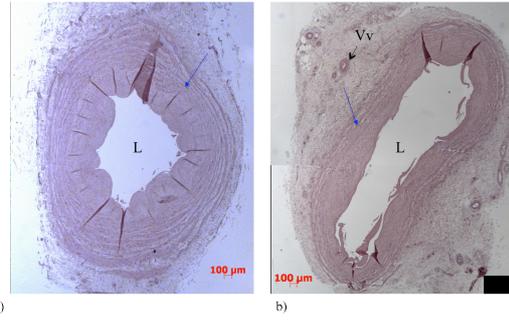
The results of the preliminary experimental campaign with human SV segments showed the viability of cultured veins and and morphological changes in the vessel wall.

Immunostaining assays (Figure 13) for endothelial markers CD31, CD34, vWF demonstrated the presence of endothelial cell layer along the vessel segment after 7 days of perfusion. DAPI staining (blue spots in Figure 13) confirmed the preserved viability of the biological tissue.



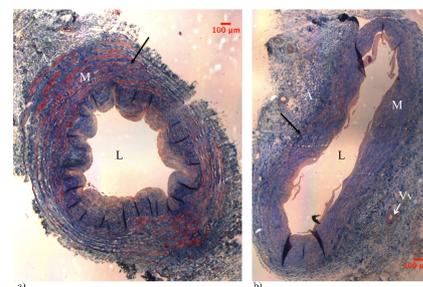
**Figure 13** Immunofluorescence images. a) control vein segment; b) perfused vein segment.

H/E staining (Figure 14) showed wall integrity of control and cultured veins.



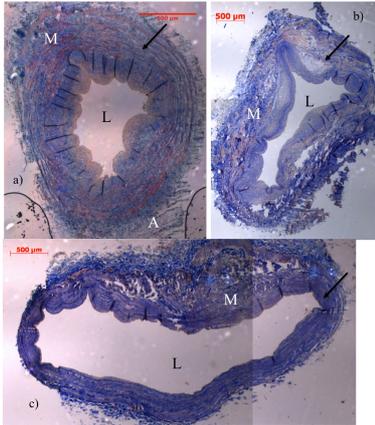
**Figure 14** H/E staining performed on SV69 sample. a) control vein segment; b) stimulated vein segment.

Hystomorphometric analysis, performed by measuring the medial layer thickness after Masson thricrome staining (Figure 15), showed that the stimulated vein segment (Figure 15, b) undergoes a decrease of 65% (from  $0.80 \pm 0.005$  mm to  $0.52 \pm 0.02$  mm ) of the media thickness with respect to the control vein (Figure 15, a). Instead, luminal area was increased (from  $0.89 \pm 0.09$  mm<sup>2</sup> to  $1.78 \pm 0.32$  mm<sup>2</sup>) in the stimulated vein compared to the control vein.



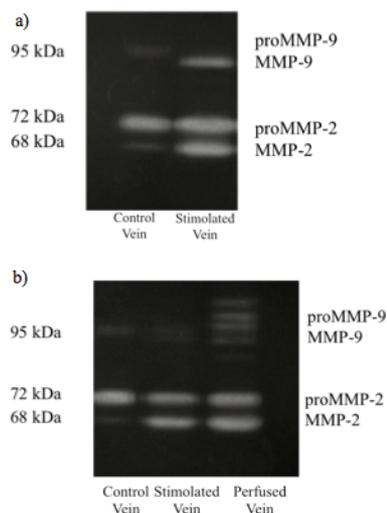
**Figure 15** Masson trichrome staining performed on SV69 sample. a) control vein segment; b) perfused vein segment;

Experiments performed on SV73 (Masson thricrome staining, Figure 16) showed that the perfused vein segment (Figure 16, b) undergoes an increase of wall thickness, while the stimulated vein segment (Figure 16, c) undergoes a decrease in wall thickness, compared to the control vein segment (Figure 16, a).



**Figure 16** Masson trichrome staining performed on SV73 sample. a) control vein segment; b) perfused vein segment; c) stimulated vein segment.

In both experiments (SV69 and SV73), zymographic analysis (Figure 17) demonstrated an increased expression of MMP-2 and MMP-9 in stimulated and perfused vein segment.



**Figure 17** Representative zymogram of proteolytic activity of MMPs for control and cultured vein segments. a) SV69 segment; b) SV73 segment.

## Discussion

Design activities led to create a functional, user-friendly and reliable organ culture system.

The project specifications of easy assembly and good manageability were satisfied thanks to a set of technical solutions chosen in collaboration with the laboratory personnel.

The EVCS allowed to subject human SV segments to a pulsatile pressure stimulation and to maintain vessels viability, assessed by immunofluorescence analysis, up to 7 days in a controlled and sterile environment.

Hystological analysis demonstrated morphological changes in vessel wall thickness of cultured vein segments. The enlargement of the venous wall in response to arterial flow conditions should be correlated with tissue proliferation. High pressures induced an increase of vein luminal area and the distension of all the vessel wall components.

In conclusion, the new EVCS appears to be a well-suited system that allows the investigation of the mechanisms involved in the VGD and the development of IH.

## References

1. Dashwood, M.R. and A. Loesch, *The saphenous vein as a bypass conduit: the potential role of vascular nerves in graft performance*. *Curr Vasc Pharmacol*, 2009. **7**(1): p. 47-57.
2. Goldman, S., et al., *Long-term patency of saphenous vein and left internal mammary artery grafts after coronary artery bypass surgery: results from a Department of Veterans Affairs Cooperative Study*. *J Am Coll Cardiol*, 2004. **44**(11): p. 2149-56.
3. Dümmler, S., et al., *Pulsatile ex vivo perfusion of human saphenous vein grafts under controlled pressure conditions increases MMP-2 expression*. *Biomed Eng Online*, 2011. **10**: p. 62.
4. Muto, A., et al., *Mechanisms of vein graft adaptation to the arterial circulation: insights into the neointimal algorithm and management strategies*. *Circ J*, 2010. **74**(8): p. 1501-12.
5. Clerin, V., et al., *Mechanical environment, donor age, and presence of endothelium interact to modulate porcine artery viability ex vivo*. *Annals*

- of Biomedical Engineering, 2002. **30**(9): p. 1117-1127.
6. Surowiec, SM., et al., *A new perfusion culture system to study human vein*. Journal of Surgical Research, 2000. **88**(1): p.34-41.
  7. Orr, D.E. and K.J.L. Burg, *Design of a Modular Bioreactor to Incorporate Both Perfusion Flow and Hydrostatic Compression for Tissue Engineering Applications*. Annals of Biomedical Engineering, 2008. **36**(7): p. 1228-1241.

## Introduzione

Il lavoro di tesi, svolto presso il Laboratorio di Micro e Biofluidodinamica ( $\mu$ BSLab) del Politecnico di Milano, si inserisce all'interno di un progetto che prevede la collaborazione con il Laboratorio di Ingegneria Tissutale cardiovascolare (LIT) dell'I.R.C.C.S Centro Cardiologico Monzino. L'obiettivo del progetto di tesi è quello di ricreare *ex vivo* i pattern di stimolazione pressoria arteriosa a cui è sottoposto *in vivo* il graft venoso quando utilizzato come sostituto negli interventi di bypass aorto-coronarico (CABG). A tal fine si rende necessario progettare un sistema che permetta l'alloggiamento e la coltura di campioni di vena safena umana in condizioni controllate, riproducibili e standardizzate.

Il CABG è la tecnica chirurgica più utilizzata nel trattamento delle patologie a carico delle coronarie. Esso permette di ripristinare l'adeguato apporto sanguigno al tessuto cardiaco in seguito a stenosi coronarica attraverso la realizzazione di un ponte (bypass).

La vena safena è il condotto più utilizzato negli interventi di CABG [1] in quanto il suo calibro è paragonabile a quello delle arterie coronarie, la sua lunghezza ne permette l'utilizzo per bypass multipli e la sua posizione anatomica la rende facilmente accessibile. Tuttavia, il suo utilizzo come graft aorto-coronarico ha delle controindicazioni legate alle differenze morfologiche, strutturali e funzionali tra vena e arteria nonché alle diverse condizioni emodinamiche a cui questi vasi sono sottoposti *in vivo*. Infatti, in seguito alla trasposizione nell'ambiente arterioso, la vena safena va incontro a delle modificazioni biomeccaniche che inducono il processo di arterializzazione del vaso o *Vein Graft Disease* (VGD). Tali fenomeni possono provocare delle alterazioni morfologiche e funzionali del vaso, tra le quali l'iperplasia dell'intima (IH), principale responsabile del fallimento del graft. L'IH consiste in un'abnorme deposizione di matrice extracellulare (ECM) da parte delle cellule muscolari lisce (SMCs) in seguito a migrazione e proliferazione delle stesse.

Diversi gruppi di ricerca hanno sviluppato sistemi di coltura *ex vivo*, definiti *organ culture*, di segmenti vascolari in grado di fornire un ambiente controllato che permettesse lo studio dei meccanismi coinvolti nello sviluppo dell'IH. Le colture *ex vivo* possono

essere realizzate seguendo sia un approccio statico che dinamico. In quest'ultimo caso si distinguono sistemi a perfusione stazionaria e sistemi a perfusione pulsatile. Essi suscitano maggiore interesse in quanto consentono di mimare l'ambiente arterioso presente *in vivo*. In questo contesto, l'obiettivo del lavoro di tesi è quello di sviluppare un sistema di coltura *ex vivo* al fine di ricreare i pattern di stimolazione pressoria arteriosa a cui è sottoposto *in vivo* il graft venoso. Si è focalizzata l'attenzione su questo tipo di stimolazione in quanto il differente range pressorio a cui è sottoposto il segmento venoso in seguito alla trasposizione in sede coronarica è ritenuto il principale responsabile del rimodellamento vascolare dello stesso.

Nel Capitolo 1, dopo un accenno alla fisiologia e alla fisiopatologia delle arterie coronarie, si focalizzerà l'attenzione sulla vena safena e sulle principali cause di fallimento del bypass venoso.

Il Capitolo 2 sarà incentrato sull'analisi dello stato dell'arte dei sistemi di coltura *ex vivo* di segmenti vascolari, rivolgendo particolare attenzione ai sistemi in grado di fornire un ambiente fluidodinamico simile a quello arterioso presente *in vivo*.

Nel Capitolo 3 saranno illustrate le fasi di progettazione e realizzazione del sistema di coltura *ex vivo*, a cui si è affiancato un lavoro di ottimizzazione dei pattern di stimolazione ottenibili per mezzo di un sistema di controllo già disponibile presso il  $\mu$ BSLab.

Nel Capitolo 4 saranno descritte le procedure di collaudo idraulico del sistema, di collaudo del circuito di stimolazione e i test preliminari di verifica del mantenimento della sterilità condotti sul dispositivo realizzato. Saranno inoltre illustrati i protocolli di prova adottati e i relativi risultati.

Nel Capitolo 5 saranno presentate le campagne sperimentali preliminari effettuate utilizzando il dispositivo realizzato con campioni di vena safena umana. Verranno discusse le evidenze riscontrate dalle analisi istomorfologiche effettuate sui campioni biologici prima e dopo il periodo di coltura.

Alla luce dei risultati ottenuti saranno infine trattate le osservazioni conclusive riguardo i punti di forza, i limiti e le possibili evoluzioni del sistema di coltura oggetto del lavoro di tesi.

## Capitolo 1

# Vena safena: utilizzo nel bypass aorto-coronarico e problematiche

La tecnica chirurgica più utilizzata nel trattamento delle patologie a carico delle arterie coronarie (CADs – Coronary Artery Diseases) è il bypass aorto-coronarico (CABG - *Coronary Artery Bypass Grafting*); infatti, l'*American Heart Association* stima che in tutto il mondo siano realizzati più di 800 mila interventi di CABG ogni anno.

Questo tipo di trattamento è impiegato al fine di ristabilire il corretto flusso di sangue al cuore in caso di stenosi delle arterie coronarie attraverso una nuova via; più frequentemente questa è realizzata utilizzando l'arteria mammaria o un tratto di vena safena. Il fallimento del bypass venoso è principalmente causato dallo sviluppo di iperplasia dell'intima (IH – *Intimal Hyperplasia*) dovuta ad una eccessiva proliferazione delle cellule muscolari lisce (SMCs – *Smooth Muscle Cells*).

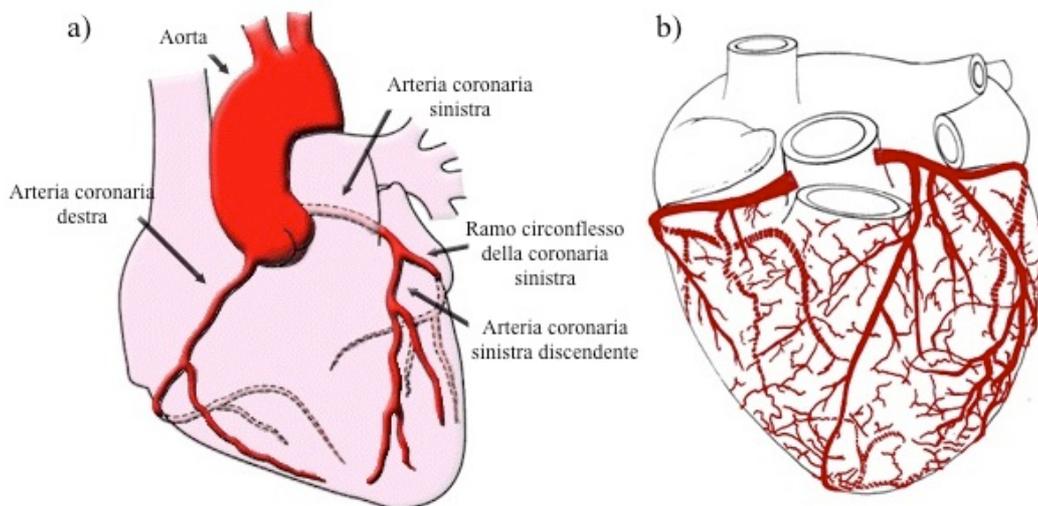
In questo capitolo, dopo un accenno alle arterie coronarie e alle coronaropatie, saranno descritti i principali tipi di graft impiantati nel CABG, focalizzando l'attenzione principalmente sulla vena safena. Nella parte finale del capitolo, per completezza, si farà riferimento alle cellule progenitrici (staminali) presenti nella vena safena (SVPs- *Saphenous Vein Progenitors*), che posseggono la capacità di neoangiogenesi e che possono differenziare in SMC, concorrendo allo sviluppo dell'IH, sebbene questo argomento non sia oggetto del lavoro di tesi.

### 1.1.Le coronarie

Il circolo coronarico è costituito da vasi di piccolo e medio calibro (caratterizzati da un diametro interno pari a 3-5 mm) deputati all'irrorazione e al nutrimento del tessuto cardiaco. Essi forniscono una portata di sangue, in media pari a 250 ml/min (4-5% della gittata cardiaca), adeguata alla richiesta metabolica del cuore che, in condizioni basali, consuma una quantità di ossigeno (O<sub>2</sub>) di circa 6,5-10 mlO<sub>2</sub>/min per 100 gr di tessuto [2].

Le due arterie coronarie principali, la sinistra e la destra, nascono dal seno di Valsalva (Figura 1.1, a), vicino all'anello valvolare aortico, decorrono sulla superficie del cuore e si distribuiscono nel miocardio. La circolazione coronarica è completata dalle vene coronarie che scaricano il loro sangue nel seno coronarico che, a sua volta, lo riversa nell'atrio destro. Questi vasi devono il nome al disegno del loro cammino: correndo nel solco atrio-ventricolare, o solco coronario, compongono una regolare corona arteriosa che si stringe sul cuore al limite tra gli atri e i ventricoli (Figura 1.1, b).

L'arteria coronaria sinistra irrora il ventricolo sinistro e la metà anteriore del setto; l'arteria coronaria destra, invece, il ventricolo destro e la metà posteriore del setto. All'apice del cuore esistono molte anastomosi tra i due sistemi, cosicché il ramo circonflesso dell'arteria coronaria sinistra possa irrorare anche l'apice del ventricolo destro. Le anastomosi costituiscono un elemento di sicurezza poiché permettono di ridurre l'area di ischemia qualora un ramo arterioso sia occluso [2].

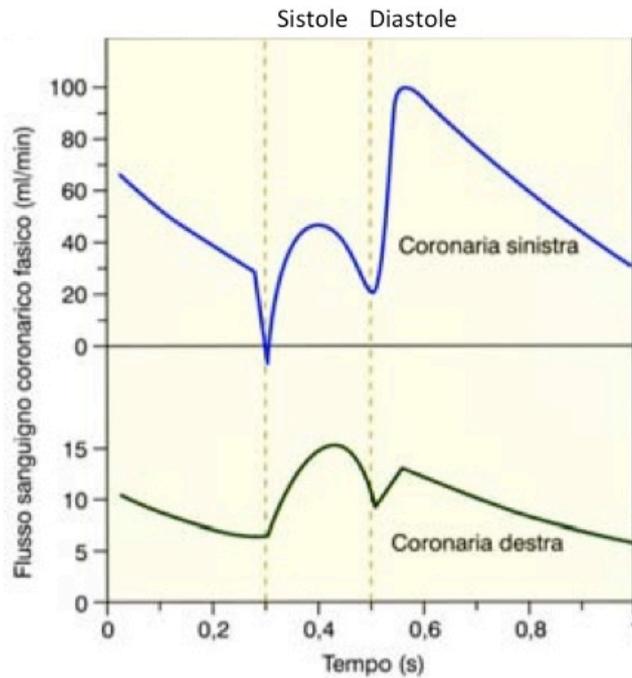


**Figura 1.1** Circolo coronarico: a) origine delle arterie coronarie destra e sinistra; b) cammino delle coronarie sulla superficie del miocardio.

La maggior parte del flusso coronarico (il 70-90%) ha luogo in diastole poiché in sistole i piccoli vasi coronarici, soprattutto quelli più profondi, vengono temporaneamente occlusi dalla contrazione ventricolare.

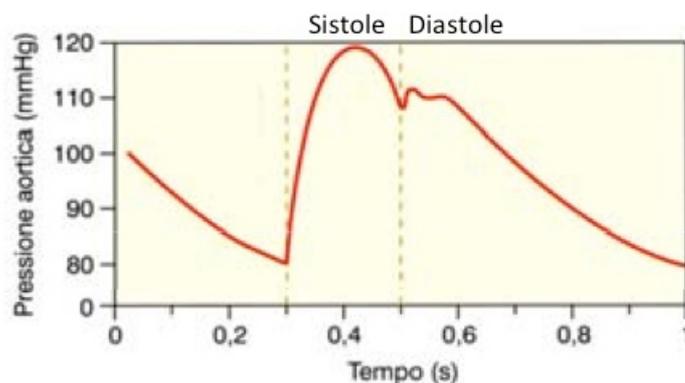
Come mostrato in Figura 1.2, il flusso nell'arteria coronaria sinistra diminuisce bruscamente non appena il muscolo ventricolare comincia a contrarsi o diviene addirittura retrogrado per un breve periodo di tempo, il che indica che la chiusura del letto capillare

respinge il sangue nelle arterie. Durante il periodo di eiezione il flusso coronarico aumenta, per poi diminuire nuovamente a causa della pressione ventricolare ancora in ascesa che sprema ulteriormente i vasi più piccoli. Questi effetti meccanici sono meno evidenti sul flusso dell'arteria coronaria destra poiché la pressione ventricolare destra è più bassa [2].



**Figura 1.2** Grafico del flusso nelle arterie coronarie destra e sinistra.

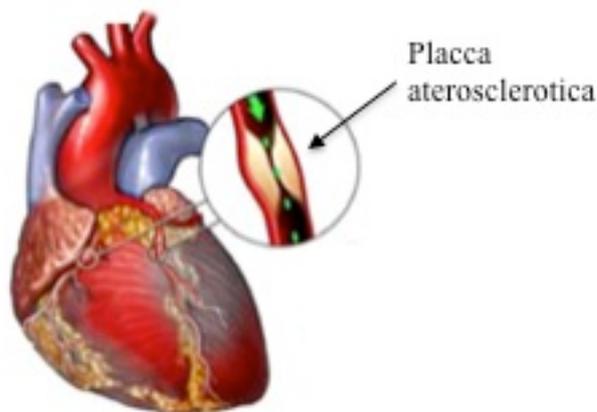
La pressione coronarica dipende dalla differenza di pressione tra aorta e atrio destro, ma poiché in quest'ultimo la pressione può essere considerata pressoché nulla, essa segue l'andamento pressorio aortico, tipicamente 80÷120 mmHg (Figura 1.3).



**Figura 1.3** Andamento della pressione aortica nel tempo.

## 1.2. Coronaropatie e trattamenti chirurgici

Si definisce *coronaropatia* una malattia del cuore responsabile di un apporto ematico insufficiente al muscolo cardiaco. Questa patologia è caratterizzata dall'ostruzione di uno o più rami dell'albero coronarico a causa della presenza di una placca aterosclerotica (Figura 1.4) o della formazione di un coagulo. In questa condizione l'arteria non è più in grado di trasportare efficacemente il sangue e, di conseguenza, il tessuto a valle diventa ischemico. L'ischemia grave, che si verifica quando il restringimento della coronaria raggiunge un valore superiore al 70% del lume del vaso, riduce o annulla l'apporto di ossigeno al tessuto provocandone la necrosi, ossia l'infarto miocardico, e quindi la parziale o totale perdita della funzione del tessuto stesso.



**Figura 1.4** Stenosi coronarica dovuta alla presenza di una placca aterosclerotica.

Per rendere pervi i vasi coronarici affetti da lesioni stenosanti su base soprattutto aterosclerotica a partire dal 1980 è stata utilizzata una tecnica chirurgica chiamata *angioplastica coronarica*. Essa consiste nell'introdurre attraverso l'arteria femorale (o, in alternativa, attraverso l'arteria radiale) un piccolo catetere di 1 mm di diametro con un palloncino in punta che permette di giungere fino al ramo coronarico di interesse. Il palloncino viene quindi gonfiato alla pressione di alcune atmosfere (fino ad un massimo di 20 atm nel caso di lesioni particolarmente rigide) e ciò fa distendere l'arteria in corrispondenza del punto di occlusione. Contestualmente al gonfiaggio del palloncino viene spesso posizionato uno *stent*, una struttura metallica cilindrica a maglie, che viene introdotto nel lume dell'arteria in modo da evitare che si ricrei una stenosi in quel punto.

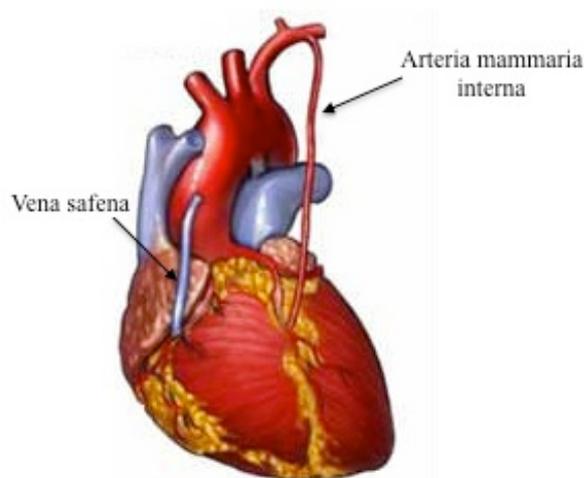
In alternativa all'angioplastica è stata sviluppata una tecnica chirurgica che prende il nome di CABG. Tale pratica è finalizzata a ripristinare il corretto apporto sanguigno al tessuto ischemico mediante la realizzazione di un ponte (bypass): un tratto di vaso sano viene anastomizzato con la coronaria stenotica a valle del restringimento in modo da creare un ramo pervio parallelo a quello originario.

### 1.3.Bypass aorto-coronarico

Il CABG è la tecnica chirurgica più utilizzata nella cura delle CAD. Una statistica dell'*American Heart Association* riporta che nel 2006 negli USA sono stati effettuati 448 mila interventi di CABG su 253 mila pazienti [3].

Questo trattamento viene eseguito in tutti quei casi in cui non è possibile intervenire mediante angioplastica, ovvero quando una o più arterie coronarie sono severamente occluse, quando il ramo ostruito non è raggiungibile mediante catetere o in seguito alla ristenosi di un tratto precedentemente sottoposto ad angioplastica.

Arterie e vene autologhe rappresentano il *gold standard* per la rivascularizzazione coronarica (Figura 1.5). Nella maggior parte dei casi vengono utilizzate l'*arteria toracica interna*, chiamata anche *mammaria interna* (IMA), che decorre all'interno della cassa toracica subito dietro lo sterno, e la *grande vena safena* (GSV), situata negli arti inferiori. Talvolta, nei casi in cui questi vasi non siano disponibili, si ricorre all'impiego dell'arteria radiale, sita nell'avambraccio.



**Figura 1.5** Bypass aorto-coronarico effettuato mediante vena safena e arteria mammaria.

La riuscita del CABG è fortemente influenzata dall'affidabilità a lungo termine del graft utilizzato. Durante il primo anno dall'intervento si occlude il 15% dei graft venosi, il 20% a tre anni, il 30% a sei anni e circa il 40-50% a dieci anni. Per quanto concerne i graft arteriosi, le percentuali sono 1%, 5%, 7% e 10% in corrispondenza degli stessi intervalli temporali [4]. La motivazione di ciò risiede nelle differenze strutturali e funzionali tra graft venoso e vaso nativo (arteria coronaria).

La parete vascolare è un tessuto connettivo dalla struttura particolarmente complessa e diversificata in relazione alla specifica funzione richiesta. Per ogni segmento vascolare essa è costituita da tre strati concentrici che, dall'interno verso l'esterno, sono: la tunica intima, la tunica media e la tunica avventizia (Figura 1.6).

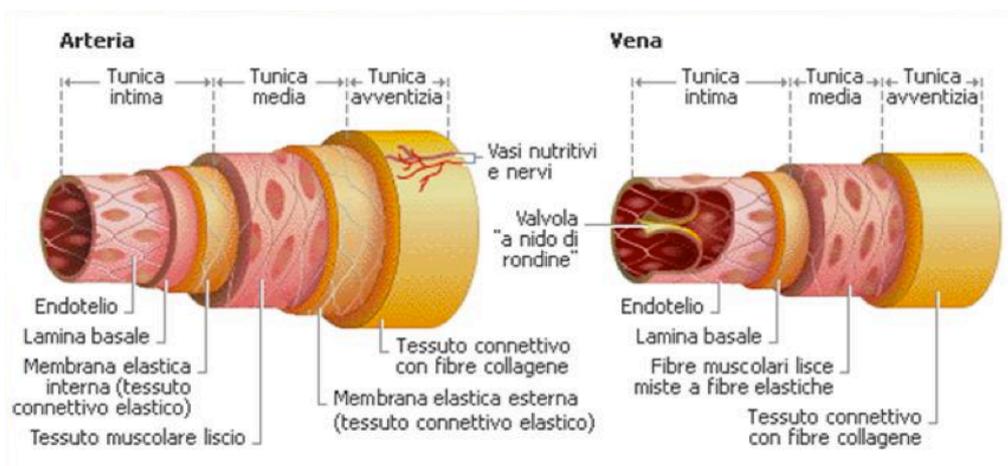


Figura 1.6 Struttura anatomica di un'arteria e di una vena a confronto.

La tunica intima è costituita da un singolo strato di cellule endoteliali, direttamente a contatto con il sangue che scorre all'interno del vaso, e dalla membrana basale contenente fibre di collagene. Tra l'intima e la media è interposta la lamina elastica interna costituita da lamine di elastina.

La media costituisce, generalmente, lo strato più spesso della parete ed è caratterizzata da strutture differenti nelle diverse parti del sistema vascolare: nelle grandi arterie più prossime al cuore essa è costituita da lamine elastiche fenestrate alternate a fibre di collagene e SMCs (da qui la definizione di arterie elastiche); nelle arterie più piccole e nelle vene, invece, è costituita soprattutto da SMCs e da una piccola parte di tessuto connettivo, collagene ed elastina.

Infine la tunica avventizia, separata dalla media da un'ulteriore lamina elastica, è composta prevalentemente da fasci di fibre di collagene non compatti in direzione longitudinale ed in minore misura da fibre di elastina e SMCs. Questo strato protegge il vaso e ne permette l'ancoraggio ad altre strutture, formando una sorta di continuità tra vaso e altri tessuti del corpo. La tunica avventizia è attraversata, inoltre, da fibre nervose e vasi linfatici. Nel caso di vasi di grandi dimensioni, essa è perfusa da un sistema di piccoli vasi, detti *vasa vasorum*, deputati al trasporto di ossigeno e sostanze nutritive ai tessuti della parete del vaso.

Un elemento distintivo tra arterie e vene è la presenza in queste ultime di valvole unidirezionali, dette a "nido di rondine" (per via della loro forma in cui si riconosce una concavità rivolta verso il cuore), che impediscono il flusso retrogrado di sangue [5] (Figura 1.7).



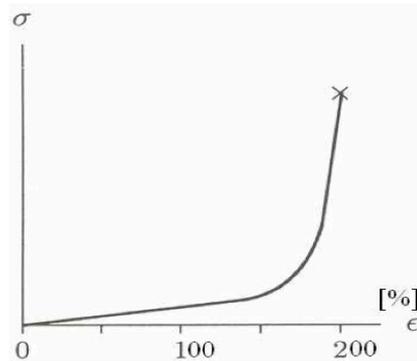
Figura 1.7 Valvole a "nido di rondine".

In Figura 1.8 è mostrata la composizione dei diversi tipi di vasi sanguigni in termini di elastina, collagene e muscolo liscio.

	aorta	arterie	arteriole	capillari	venule	vene	vena cava
diametro	2 cm	4 mm	30 $\mu\text{m}$	8 $\mu\text{m}$	40 $\mu\text{m}$	5 mm	3 cm
spessore della parete	2 mm	1 mm	20 $\mu\text{m}$	1 $\mu\text{m}$	2 $\mu\text{m}$	0,5 mm	1,5 mm
spessore della parete raggio	1/5	1/2	>1	1/4	1/10	1/5	1/10
endotelio	□	□	□	□	□	□	□
elastina	~~~~~	~~~~~	~~~~~			~~~~~	~~~~~
muscolo liscio	////	////	////			////	////
collagene	XXXX	XXXX	XXXX		XXXX	XXXX	XXXX

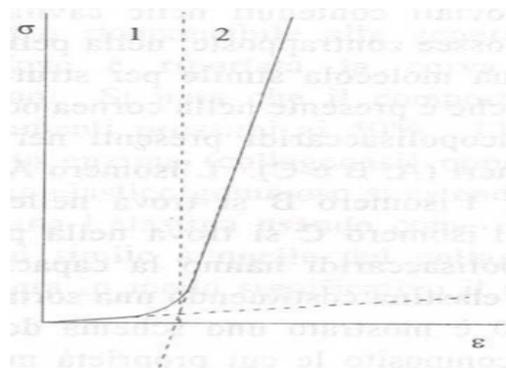
Figura 1.8 Caratteristiche morfologiche e strutturali dei vasi [5].

L'elastina è una proteina strutturale con elevate proprietà elastomeriche: ha basso modulo elastico ( $E \approx 0.6 \text{ MPa}$  [6]) e un comportamento meccanico in prima approssimazione elastico-lineare (Figura 1.9). Essa gioca un ruolo fondamentale durante il normale funzionamento pulsatile delle arterie: queste, infatti, accumulano un importante volume di sangue durante la sistole cardiaca per restituirlo verso la periferia durante la successiva fase di diastole.



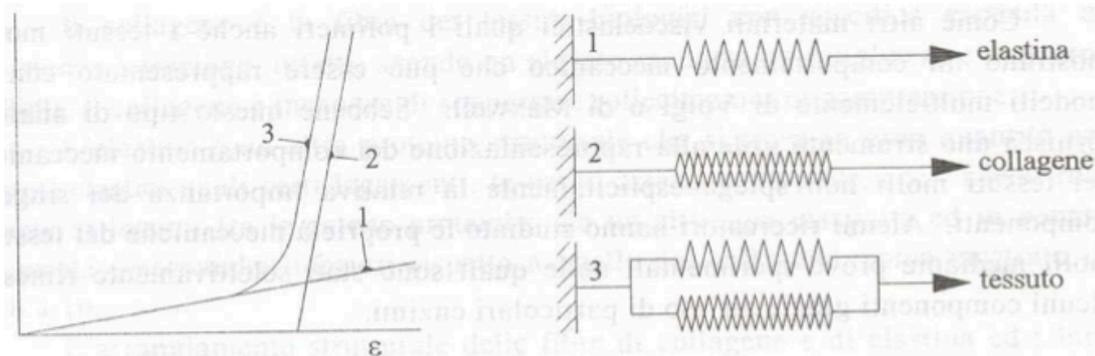
**Figura 1.9** Curva sforzo-deformazione dell'elastina.

Il collagene ( $E \approx 1 \text{ GPa}$  [6]) è una proteina con funzioni strutturali e meccaniche. Ha un comportamento marcatamente viscoelastico (Figura 1.10) e le sue fibre, reclutate successivamente all'elastina, entrano in azione progressivamente quando le sollecitazioni pressorie superano il range di funzionamento normale, ovvero all'incirca oltre i 130 mmHg.



**Figura 1.10** Curva sforzo-deformazione del collagene [7]. La regione 1 è caratterizzata da comportamento elastico con basso valore del modulo di Young (svolgimento delle catene da andamento elicoidale a rettilineo), mentre la regione 2 è caratterizzata da comportamento elastico con elevate proprietà meccaniche.

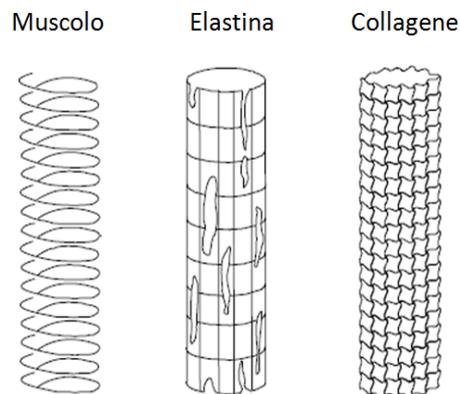
La funzione delle fibre di elastina e di collagene è quella di mantenere una tensione uniforme che equilibri la pressione esercitata dal flusso sanguigno tra l'interno e l'esterno del vaso. In Figura 1.11 è rappresentata la curva sforzo-deformazione di un tessuto le cui proprietà meccaniche sono dovute al collagene e all'elastina.



**Figura 1.11** Curva sforzo-deformazione di un tessuto le cui proprietà meccaniche sono dovute al collagene e all'elastina [7].

La muscolatura liscia svolge una funzione di vasoregolazione attiva che permette di variare il lume del vaso in funzione di fattori chimici rilasciati dalle cellule endoteliali vascolari, ad esempio ossido nitrico (NO), che favorisce la vasodilatazione, e le endoteline (ET), che inducono la vasocostrizione. Le cellule muscolari lisce sono orientate in direzione circonferenziale e il loro numero e distribuzione determinano un cambiamento della rigidità del tessuto.

Uno schema di massima dell'organizzazione delle sub-strutture che costituiscono la parete vascolare è quello proposto in Figura 1.12.



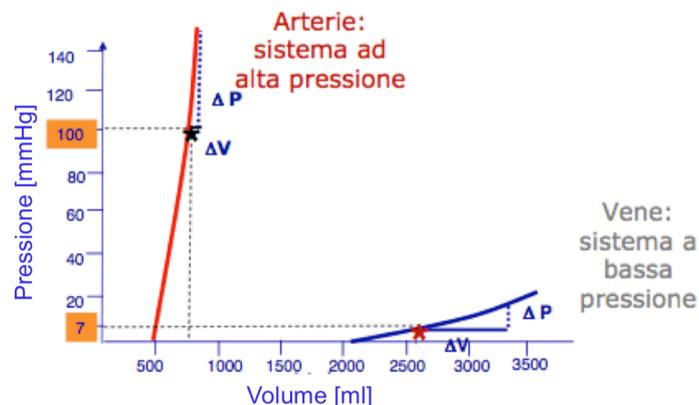
**Figura 1.12** Struttura e disposizione dei tessuti che compongono la parete dei vasi [2]. Le fibre muscolari sono avvolte ad elica a passo piccolo, l'elastina forma una lamina con fenestrate in direzione longitudinale e le fibre di collagene formano una rete disordinata e increspata in condizioni di basso stress che si ordina e si estende progressivamente all'aumentare delle sollecitazioni a carico del vaso.

La diversa composizione di vene e arterie si traduce in un differente comportamento biomeccanico: grazie all'abbondanza di elastina e di fibre di collagene le arterie risultano consistenti, comprimibili e presentano una grande deformabilità elastica; al contrario, le vene possono facilmente collassare per effetto di una pressione esercitata dall'esterno poiché le strutture fibrose e i fasci muscolari sono prevalenti rispetto al materiale elastico [5]. Queste differenze biomeccaniche possono essere descritte quantitativamente mediante l'indice di *compliance*. In fisiologia, la compliance è la grandezza che esprime la capacità che hanno i vasi sanguigni di dilatarsi elasticamente sotto l'effetto di una pressione crescente, per poi restringersi restituendo il volume di sangue accumulato sotto l'effetto di una pressione decrescente. La compliance di un vaso sanguigno costituisce, quindi, una misura dei rapporti tra le variazioni di pressione e le variazioni di volume; viene definita come segue:

$$C = \frac{\Delta V}{\Delta P}$$

in cui  $\Delta P$  rappresenta l'incremento pressorio dovuto all'aumento di volume  $\Delta V$  all'interno del vaso.

La diversa compliance delle pareti arteriose e venose dipende dalla differente quantità di fibre elastiche (elevata compliance) e di fibre di collagene (bassa compliance). Per basse pressioni la compliance di una vena è circa venti volte maggiore di quella di un'arteria equivalente in termini calibro e portata. In virtù di ciò le vene possono accogliere volumi di sangue maggiori con piccole variazioni di pressione al loro interno (Figura 1.13).



**Figura 1.13** Curve Pressione-Volume del sistema arterioso (caratterizzato da pressioni elevate) e del sistema venoso (caratterizzato da basse pressioni).

### **1.3.1.Graft utilizzati nel bypass aorto-coronarico**

#### **1.3.1.1.Arteria mammaria interna**

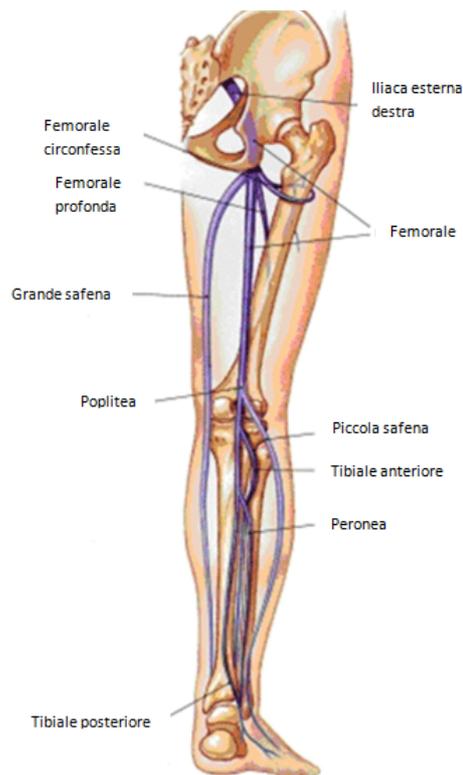
L'impegno dell'IMA per la realizzazione di un CABG è una soluzione molto interessante perché, essendo situata nelle vicinanze del cuore, è sufficiente tagliarla in una sezione distale e connetterla a valle della stenosi coronarica. Ciò ha il duplice vantaggio di richiedere una sola anastomosi e di mantenere il vaso connesso all'arteria da cui normalmente origina e, quindi, connesso anche alla rete di *vasa vasorum* che nutrono la parete arteriosa. Inoltre l'utilizzo di un'arteria costituisce un vantaggio in quanto si tratta di innestare un condotto con le stesse caratteristiche di quello originario, ossia un vaso la cui parete è sufficientemente spessa ed elastica per il flusso di sangue arterioso e quindi in grado di sopportare il carico emodinamico.

Esistono, però, dei problemi associati all'utilizzo di condotti arteriosi toracici: lo spasmo del graft e la progressione della malattia coronarica nella zona sottesa dal graft. Questi eventi possono essere più frequentemente causati dallo sviluppo dell'ateroma (placca formata da grassi, proteine e tessuto fibroso che si forma nella parete delle arterie e configura il quadro dell'aterosclerosi) distalmente al sito di anastomosi o a livello del graft stesso.

#### **1.3.1.2.Vena safena**

La GVS (o safena interna) è un vaso sanguigno superficiale (sottocutaneo) situato negli arti inferiori. Essa origina nel punto in cui la vena dorsale dell'alluce confluisce nell'arco venoso dorsale del piede e, dopo aver percorso anteriormente il malleolo mediale, corre lungo la parte mediale della gamba. All'altezza del ginocchio percorre il bordo posteriore dell'epicondilo mediale femorale; la vena corre poi lungo la superficie anteriore della prima di congiungersi con la vena femorale superficiale nella regione del triangolo femorale, alla giunzione safeno-femorale.

La vena safena (Figura 1.14) è il condotto più utilizzato per il CABG [1]: il suo diametro, compreso tra 4 e 6 mm, è paragonabile a quello delle coronarie; la sua lunghezza (fino a 30 cm) ne permette l'utilizzo per graft multipli e la sua posizione superficiale la rende facilmente accessibile [8].

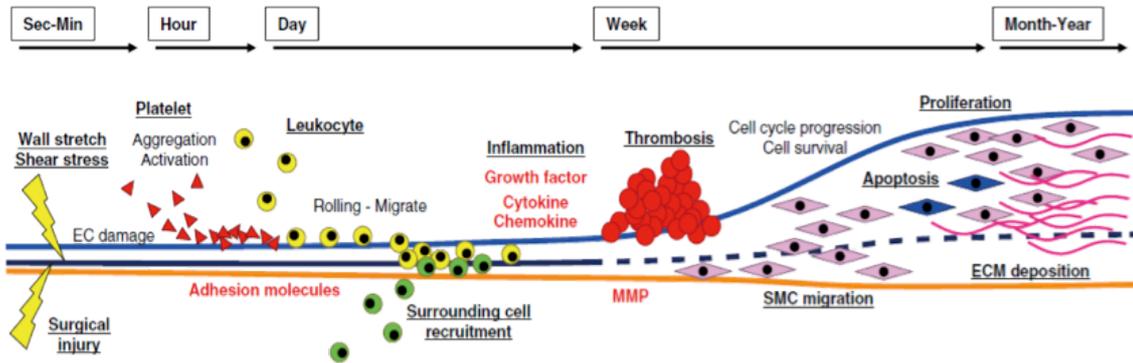


**Figura 1.14** *Sistema circolatorio degli arti inferiori.*

Nel 1967 Garret e colleghi hanno utilizzato per la prima volta la vena safena come graft aorto-coronarico sull'uomo [9].

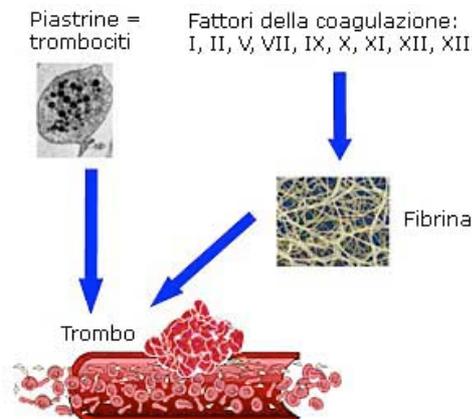
L'uso di una vena come sostituto di un'arteria coronaria ha delle controindicazioni a causa del diverso regime pressorio e della pulsatilità. In seguito alla trasposizione nell'ambiente arterioso, infatti, la vena passa da un sistema caratterizzato da bassa pressione (5-10 mmHg), basso flusso non pulsatile e basso *shear stress* (0.1-0.6 Pa) ad un ambiente ad alta pressione (60-140 mmHg), flusso pulsatile elevato e *shear stress* significativo (1-7 Pa) [10]. Ivi, essa va incontro ad un adattamento strutturale che si traduce in variazioni del calibro del vaso, cambiamenti dello spessore della parete e della composizione della matrice extracellulare (ECM). L'insieme di tali avvenimenti prende il nome di arterializzazione o *vein graft disease* (VGD). Queste modificazioni biomeccaniche sono, almeno in parte, responsabili del danno funzionale e morfologico a carico del graft nel breve e lungo periodo. I fenomeni che si osservano nel periodo post-operatorio sono, in ordine cronologico: trombosi, iperplasia dell'intima e aterosclerosi.

Come mostrato in Figura 1.15, questi avvenimenti hanno luogo in seguito alla trasposizione della vena a livello coronarico che provoca denudazione, ossia perdita dell'endotelio. Questo danno innesca una risposta infiammatoria che, a sua volta, può portare allo sviluppo dei processi sopra citati e, al limite, al fallimento del graft.



**Figura 1.15** Evoluzione temporale dei fenomeni coinvolti nel fallimento del graft venoso. (EC, cellule endoteliali; SMC, cellule muscolari lisce; MMP, metalloproteinase della matrice; ECM, matrice extracellulare) [11].

La trombosi (Figura 1.16), che consiste in una coagulazione intravascolare localizzata, si verifica entro il primo mese dall'intervento. È dovuta alla combinazione di lesione endoteliale, cambiamenti reologici nel sangue e variazione delle condizioni fluidodinamiche. La distruzione dell'endotelio, derivante dall'espianto (*harvesting*) del vaso, provoca l'accumulo di fibrina nella superficie luminale, l'adesione di piastrine e neutrofili e la riduzione della produzione dell'attivatore del plasminogeno. Ciò provoca la formazione del coagulo. Per questo motivo, l'incidenza della trombosi nel periodo post-operatorio può essere ridotta mediante l'utilizzo di una terapia anticoagulante [12].



**Figura 1.16** Schema dei fattori coinvolti nello sviluppo della trombosi.

L'aterosclerosi (Figura 1.17), che può verificarsi ad oltre un anno dall'intervento, è caratterizzata dalla formazione di placche di materiale lipidico (colesterolo, fosfolipidi, trigliceridi), proteico e fibroso all'interno del graft. Come per le coronarie native, il processo aterosclerotico può essere attenuato mediante l'adozione di un corretto regime alimentare e, eventualmente, attraverso un'adeguata terapia farmacologica [12].

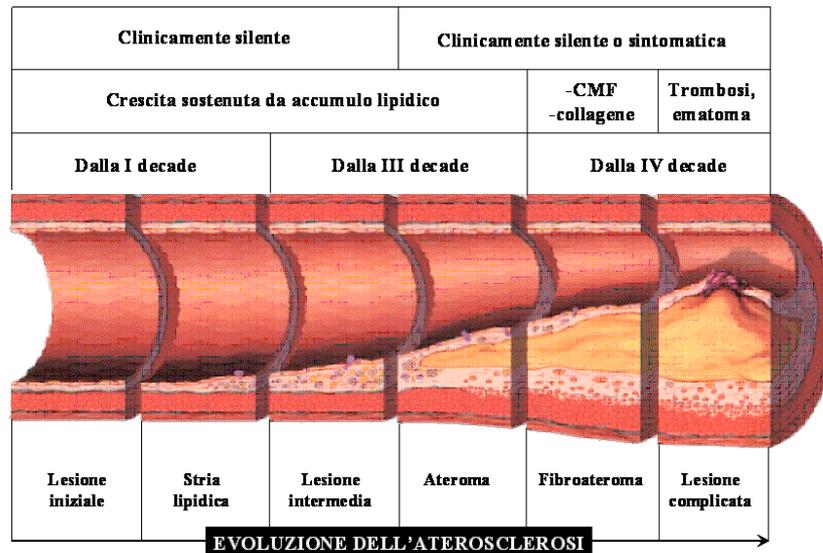
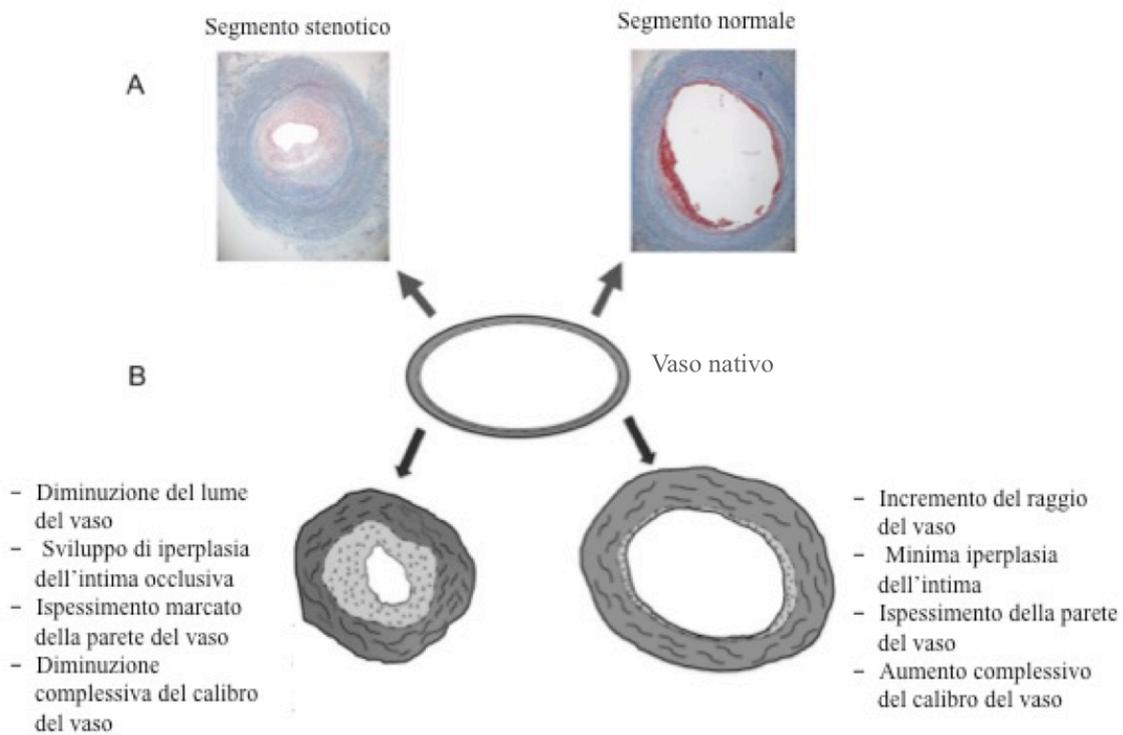


Figura 1.17 Evoluzione temporale dell'aterosclerosi.

L'iperplasia dell'intima, che può verificarsi entro un anno dall'intervento, consiste in un'abnorme proliferazione di SMCs e produzione di ECM ed è un processo la cui patogenesi non è ancora del tutto nota.

L'IH nelle vene è stata descritta per la prima volta nel 1906 dal vincitore del premio Nobel per la medicina Alex Carrel ed è definita come risposta al danno endoteliale da parte di un vaso sanguigno [13].

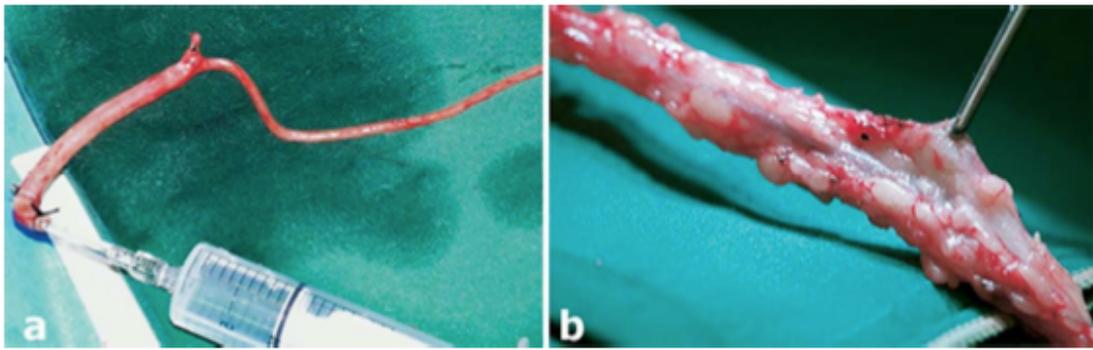
Come si può osservare in Figura 1.15, la risposta infiammatoria dovuta al danno induce una variazione del fenotipo delle SMCs da quiescente e contrattile a migratorio, proliferativo e sintetico. Esse, infatti, migrano dalla tunica media all'intima e producono ECM fibrosa, provocando l'ispessimento dell'intima, la fibrosi della media ed un complessivo irrigidimento del graft venoso, fattori che limitano la capacità della vena di adattarsi alla circolazione arteriosa (Figura 1.18) [13]. In questa situazione il graft può andare incontro a stenosi, rendendo quindi necessaria la sostituzione dello stesso.



**Figura 1.18** Sezione istologica di un graft venoso a otto mesi dall'impianto che ha sviluppato stenosi dovuta alla combinazione tra rimodellamento negativo e IH. Si nota un diametro complessivo del vaso inferiore rispetto al segmento adiacente non stenotico (Adattato da [13]).

Lo strato endoteliale della parete vascolare può essere danneggiato anche durante l'intervento chirurgico. Infatti, in fase di *harvesting*, la vena safena subisce un trauma dovuto allo strappo dalla sua sede e alla distensione manuale della stessa (corrispondente ad una pressione di 250-300 mmHg [14]) effettuata al fine di evitare spasmi. Inoltre, la perdita dei *vasa vasorum*, a causa della privazione dell'avventizia, può promuovere continui cicli di ischemia e fibrosi [9].

Una tecnica innovativa di prelievo che mira ad ovviare a questo inconveniente, definita "no touch" (Figura 1.19), evita la pratica di distensione manuale e prevede l'asportazione della safena con il tessuto circostante. Tale tessuto funge da supporto strutturale per il graft, prevenendo la formazione di inginocchiamenti e svolgendo un'azione analoga a quella di un eventuale stent.

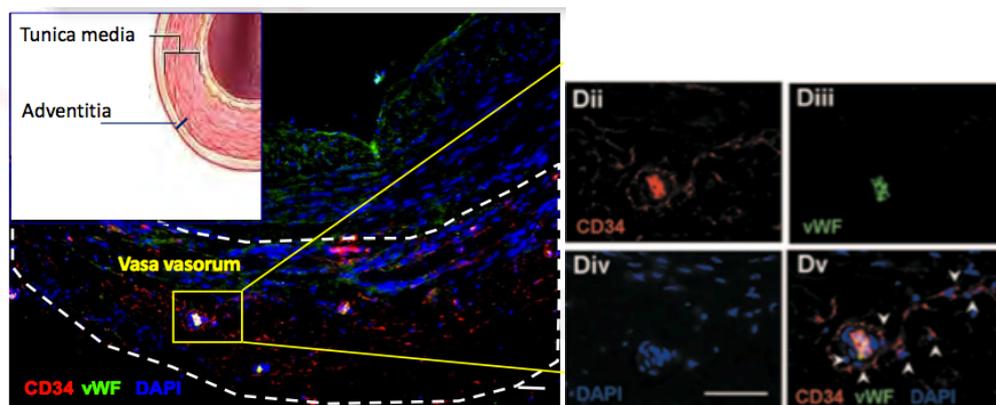


**Figura 1.19** a) Vena safena prelevata con la tecnica tradizionale; b) Vena safena prelevata con la tecnica "no touch" [15].

### 1.3.1.2.1. Cellule progenitrici staminali della vena safena

Un recente studio [16] ha dimostrato l'esistenza di cellule progenitrici staminali presenti nella vena safena (SVPs– *Saphenous Vein Progenitors*). Si ritiene che queste cellule siano in grado di differenziare in SMCs e, quindi, di partecipare al rimodellamento del vaso, concorrendo ulteriormente allo sviluppo dell'IH.

Analisi citometriche hanno evidenziato la presenza di una popolazione cellulare positiva al marker CD34 (marker di staminalità) e negativa al marker CD31 e al fattore di Von Willebrand (entrambi markers per le cellule endoteliali). Le SVPs sono state prevalentemente localizzate nell'avventizia, attorno o nelle strette vicinanze dei *vasa vasorum* (Figura 1.20).



**Figura 1.20** Identificazione delle cellule  $CD34^+$  nei tessuti della vena safena. L'immagine mostra la morfologia della vena safena e la distribuzione dei vasa vasorum nell'avventizia (limitata dalle linee tratteggiate). L'immagine al confocale (Dv) rivela la presenza delle cellule progenitrici  $CD34^{pos}vWF^{neg}$  localizzate nella zona perivascolare dei vasa vasorum (frecche bianche) [16].

In presenza di siero, queste cellule hanno dato origine ad una popolazione altamente proliferativa che ha espresso antigeni periciti/mesenchimali insieme a markers per la staminalità e hanno mostrato una capacità clonogenica e di differenziazione multipotente (osteoblasti, adipociti e miociti). L'applicazione su un modello preclinico di ischemia periferica ha dimostrato che queste cellule posseggono una potente azione riparativa e la capacità di promuovere la formazione di nuovi vasi (neoangiogenesi), stabilendo interazioni con le cellule endoteliali.

Risulta quindi di notevole interesse indagare l'interazione delle SVP con altri tipi cellulari in modelli di ischemia periferica e miocardica, nonché il potenziale ruolo delle SVPs nel VGD.

## Capitolo 2

### Stato dell'arte

Una rigorosa attività di progettazione di un nuovo dispositivo richiede un'approfondita analisi della letteratura in merito all'ambito di interesse per esaminare le soluzioni proposte da altri gruppi di ricerca e per capire quali possano essere le problematiche da affrontare.

La riuscita dell'intervento di ricostruzione aorto-coronarica ottenuto mediante l'innesto di vena safena è fortemente influenzata dall'eventuale sviluppo dell'IH nel sostituto venoso.

Diversi gruppi di ricerca hanno sviluppato sistemi di coltura (*organ culture systems*) di segmenti vascolari in grado di riprodurre le condizioni arteriose al fine di studiare i meccanismi biochimici coinvolti nello sviluppo della IH; questi studi hanno suggerito che la combinazione di fattori cellulari (migrazione e proliferazione delle SMCs e produzione di ECM), fisici (trasposizione in ambiente arterioso) e umorali (fattori rilasciati dalle cellule endoteliali, ECs) gioca un ruolo preponderante nell'induzione dell'iperplasia [17].

Questo capitolo sarà quindi incentrato sull'analisi dello stato dell'arte riguardante i sistemi definiti *organ culture* di vasi; particolare attenzione sarà rivolta ai sistemi in grado di mimare l'ambiente arterioso presente *in vivo*.

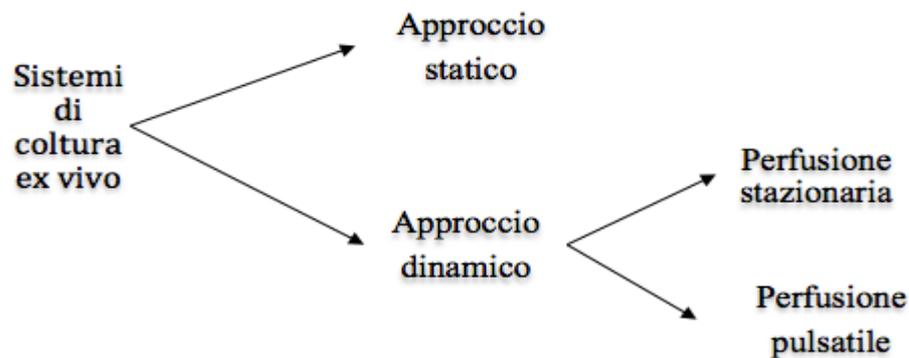
#### 2.1. Analisi dello stato dell'arte

I sistemi di *organ culture* permettono di coltivare *in vitro* organi o parti di esso mantenendo intatte sia la struttura che la funzionalità del tessuto. L'obiettivo è quello di preservare l'architettura del tessuto sano e indurre lo stesso verso il suo normale sviluppo.

Questa tecnica presenta diversi vantaggi: il tessuto coltivato *ex vivo* resta confrontabile con quello mantenuto *in vivo* in termini di struttura e funzionalità; si possono ottenere informazioni riguardo i patterns di crescita, differenziazione e sviluppo dell'organo; in alcuni casi, i risultati ottenuti sono di più facile interpretazione rispetto a

quelli ottenuti dagli esperimenti condotti *in vivo* su animali. Questi ultimi, infatti, nel caso di coltura di segmenti vascolari, sebbene siano utili a stabilire una relazione tra rimodellamento e forze meccaniche in gioco, non consentono la distinzione tra effetti neuro-ormonali e meccanici a causa del complesso ambiente fisiologico presente [18].

Le colture *ex vivo* possono essere realizzate sia attraverso sistemi statici che dinamici; questi, a loro volta, si classificano in sistemi a perfusione stazionaria e a perfusione pulsatile (Figura 2.1).



**Figura 2.1** Schematizzazione degli approcci utilizzati per sistemi di coltura *ex vivo*.

### 2.1.1. Sistemi statici

I sistemi di *organ culture* statici hanno lo svantaggio di causare un rimodellamento patologico del tessuto, con conseguente sviluppo di iperplasia, dovuto almeno in parte all'assenza di livelli rilevanti di forze meccaniche [19].

Qui di seguito sono riportati gli studi ritenuti più significativi nell'ambito della coltura statica di segmenti vascolari.

Lo scopo dello studio di Soyombo [20] è quello di valutare la vitalità del tessuto vascolare posto in coltura statica e di individuare, localizzare e indentificare cellule con capacità proliferativa. Segmenti di vena safena umana, prelevati da pazienti sottoposti a bypass aorto-coronarico, sono stati coltivati per 14 giorni su una struttura 2x1 cm in poliestere (P500, Henry Simon, Cheshire, UK) posizionata su uno strato di resina siliconica, immersi in 6 ml di medium. La coltura è stata condotta a 37°C in una camera

caratterizzata da un ambiente controllato (in termini di umidità e percentuale di CO<sub>2</sub> pari al 5%).

Per valutare l'integrità delle cellule dell'intima dei vasi sottoposti a coltura sono state effettuate colorazioni con il trypan blue e analisi SEM: le prime non hanno prodotto nessuna colorazione; le seconde hanno mostrato una superficie dell'intima simile a quella delle vene appena isolate, sebbene più spessa. La colorazione con lectina e ulteriori immagini SEM hanno dimostrato che la zona centrale del segmento coltivato conservava un endotelio intatto e confluyente. Per quantificare la vitalità delle SMCs è stata misurata la concentrazione di ATP e ADP dell'intero tessuto coltivato. I risultati hanno rivelato una diminuzione di SMCs durante i primi sette giorni di coltura; l'incremento della concentrazione di ATP e del DNA tra il settimo e l'ultimo giorno di coltura, invece, ha riflettuto la trasformazione fenotipica delle SMCs da contrattile a sintetica.

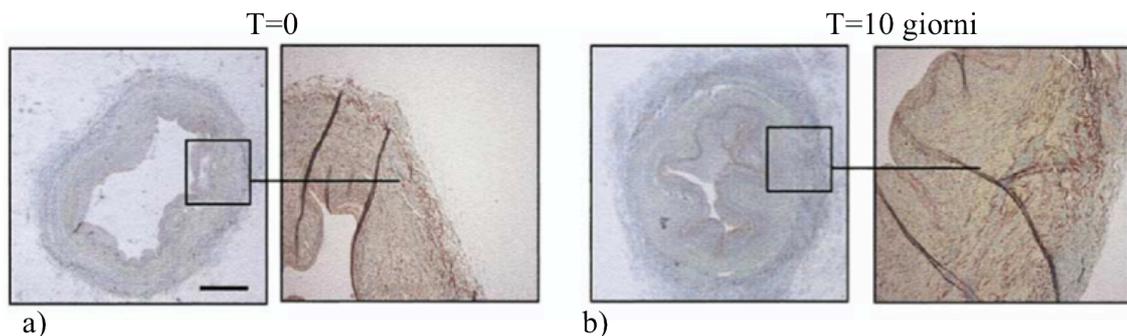
Le vene sottoposte a coltura e esposte a [<sup>3</sup>H]timidina per 24 ore hanno mostrato una tunica media simile a quella delle vene appena isolate. Durante la coltura, si è sviluppata neointima, rivelata anche attraverso le colorazioni con ematossilina/eosina (*H/E – Hematoxylin/Eosin*) e quelle di Miller e van Gieson (metodo combinato per la visualizzazione sul medesimo preparato delle fibre elastiche, del connettivo, del collagene e dei nuclei); l'ispessimento dell'intima è risultato uniforme su tutta la sezione del segmento venoso. La presenza di SMCs nella neointima è stata dimostrata mediante analisi immunocitochimiche eseguite usando anticorpi monoclonali diretti contro l'actina delle SMCs stesse. È stata inoltre verificata la presenza di tubuli endoteliali a testimonianza di una crescita capillare all'interno della neointima.

Nello studio di Mekontso-Dessap [21] è stato valutato l'ispessimento dell'intima in differenti segmenti vascolari umani (arteria mammaria interna, arteria radiale e vena safena), provenienti da soggetti sottoposti ad interventi di CABG e posti in coltura statica per dieci giorni.

Da ciascun segmento sono ricavati due campioni di lunghezza compresa tra 5 e 8 mm: il primo è immediatamente fissato e utilizzato successivamente come controllo; il secondo è collocato in una flask e incubato a 37°C in un'atmosfera caratterizzata dal 5% di

CO<sub>2</sub>. Al termine della coltura il campione è fissato in una soluzione di formaldeide al 4%, tagliato in sezioni di spessore pari a 5µm e sottoposto ad analisi istomorfologiche.

Le colorazioni ottenute con H/E e attraverso la tecnica orcein-picro-indigo-carmin (indirizzata alle fibre elastiche) hanno mostrato un significativo incremento dello strato intimale nei campioni di vena safena (Figura 2.2). Questa tunica è individuabile tra l'endotelio (strato rivolto verso il lume) e la media.



**Figura 2.2** Struttura e spessore della parete dei segmenti di vena safena soggetti a colorazione per le fibre elastica. a) campione di controllo; b) campione sottoposto a 10 giorni di coltura statica.

Per valutare la proliferazione e la sintesi di collagene da parte delle SMCs isolate dai campioni biologici, sono state effettuate analisi immunologiche rispettivamente attraverso incorporazione di [<sup>3</sup>H]timidina e [<sup>3</sup>H]prolina. La migrazione dello stesso tipo cellulare è stata valutata attraverso una tecnica che sfrutta la camera modificata di Boyden.

I risultati hanno mostrato come questi processi risultino più significativi nei campioni di vena safena umana.

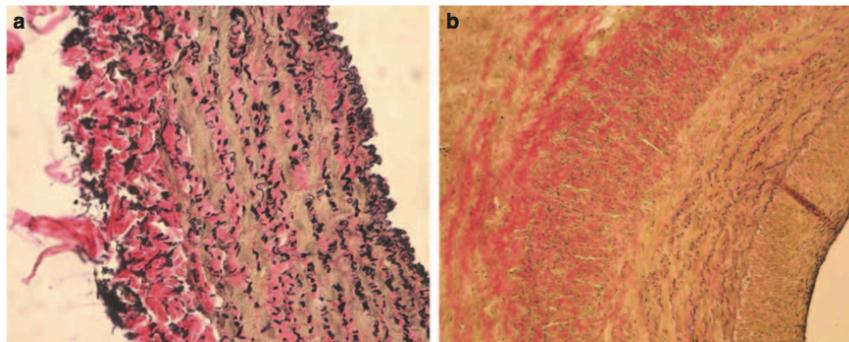
Steger [22] ha utilizzato il sistema di coltura descritto da Soyombo [20] al fine di descrivere e confrontare variazioni intimali e differenze strutturali in diversi modelli animali (*in vivo* e *in vitro*) di VGD.

A tal fine, alcuni maiali sono stati sottoposti ad interventi di CABG innestando segmenti di vena mammaria interna; da altri sono stati espantati i medesimi vasi successivamente sottoposti a coltura statica. In questo caso, ciascun campione è stato suddiviso in due tratti di lunghezza pari a 0.5 cm: un tratto è stato immediatamente fissato in una soluzione al 4% di formalina; l'altro è stato posto in una petri e inserito all'interno

di un incubatore (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Tutti gli esperimenti sono stati caratterizzati da una durata pari a 14 giorni, al termine dei quali ogni campione è stato fissato, incluso in paraffina e tagliato trasversalmente in sezioni di spessore pari a 4 µm.

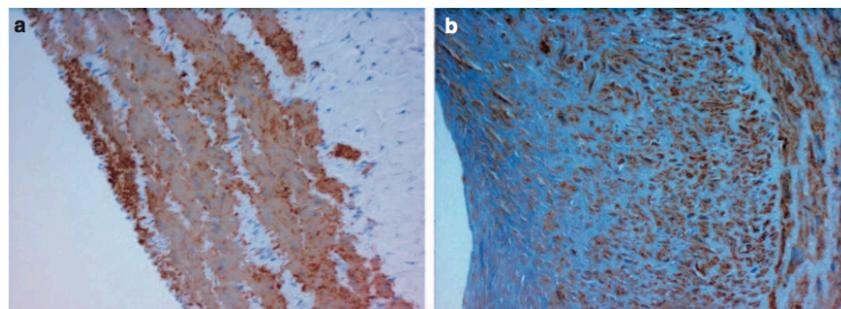
La colorazione con H/E ha mostrato la conservazione dello strato endoteliale nel tessuto di controllo e nel tratto di vena posto in coltura, mentre esso è risultato completamente assente nei segmenti utilizzati per il CABG.

La colorazione di van Gieson (Figura 2.3) ha mostrato nelle vene degli esperimenti condotti *in vivo* una significativa formazione di neointima rispetto agli altri segmenti.



**Figura 2.3** Sezioni istologiche ottenute mediante colorazione di van Gieson: a) vena mammaria interna porcinanativa in cui si identifica la lamina elastica interna (colorazione nera rivolta verso il lume), la media caratterizzata da SMCs (in rosso) e tessuto connettivo (in beige) interrotto da fibre elastiche (in nero). b) vena mammaria interna porcina in seguito a CABG; l'immagine mostra formazione di neointima e l'ispessimento della media.

Analisi immunohistochimiche indirizzate all' $\alpha$ -actina hanno evidenziato la presenza delle SMCs nella neointima (Figura 2.4).



**Figura 2.4** Analisi immunohistochimiche indirizzate all'  $\alpha$ -actina nei segmenti di vena nativa (a) e nei segmenti sottoposti a CABG (b). Quest'ultima mostra la formazione di neointima.

Dai risultati ottenuti si evince che la denudazione endoteliale ha un ruolo rilevante nella patogenesi del VGD.

Dall'analisi dei sistemi di *organ culture* statici si può concludere che essi hanno lo svantaggio di causare un rimodellamento patologico del tessuto, con conseguente sviluppo di iperplasia, dovuto almeno in parte all'assenza di livelli rilevanti di forze meccaniche fisiologiche [19].

In Tabella 2.1 sono riassunti i sistemi di coltura statica *ex vivo* descritti.

	<b>Campione biologico</b>	<b>Durata della coltura</b>	<b>Analisi istomorfologiche</b>	<b>Riferimento bibliografico</b>
1	Vena safena umana	14 giorni	- Colorazione trypan-blue - Colorazione lectina - Colorazione H/E - Colorazione van Gieson - Marcatura con [ <sup>3</sup> H]timidina	Soyombo (1990)
2	- Arteria mammaria interna umana - Arteria radiale umana - Vena safena umana	10 giorni	- Marcatura con [ <sup>3</sup> H]timidina e [ <sup>3</sup> H]prolina - Colorazione H/E - Colorazione orcein-	Mekontso-Dessap (2006)
3	Vena mammaria interna porcina	14 giorni	- Colorazione H/E - Colorazione van Gieson - Marcatura contro $\alpha$ -actina	Steger (2011)

**Tabella 2.1** *Tabella riassuntiva dei sistemi di coltura statica ex vivo di segmenti vascolari.*

### 2.1.2. Sistemi a perfusione

I sistemi a perfusione *ex vivo* permettono di valutare la risposta biologica dei vasi soggetti a condizioni fluidodinamiche ben definite e controllate, riproducibili e standardizzate, per un determinato periodo di tempo. Essi sono in genere costituiti da un sistema pompante, da regolatori di pressione e temperatura e da una camera per l'alloggiamento di tessuti [23]. Questa configurazione sperimentale combina molti dei vantaggi delle colture cellulari e dei modelli animali.

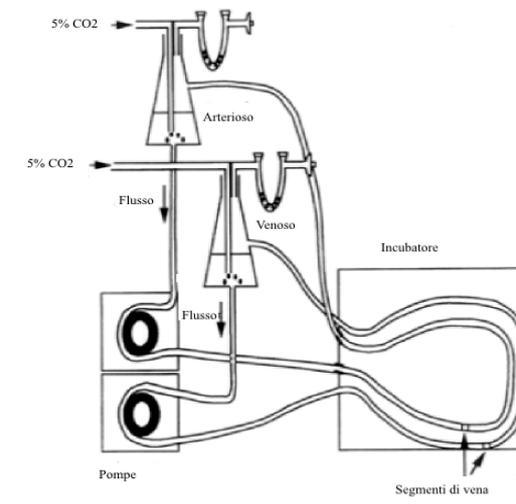
### 2.1.2.1. Sistemi a perfusione stazionaria

In questo paragrafo saranno descritti e analizzati gli studi ritenuti più significativi riguardo ai sistemi di coltura *ex vivo* a perfusione stazionaria di segmenti vascolari.

Nello studio di Porter [24] viene sviluppato un modello sperimentale, definito dall'autore stesso "flow rig", in grado di simulare le condizioni di flusso nel graft usato come bypass arterioso con lo scopo di riprodurre la situazione presente *in vivo* nell'uomo.

Un aspetto molto importante tenuto in conto nella progettazione del flow rig è stato quello di sviluppare un metodo capace di esaminare l'effetto di differenti condizioni di flusso (arterioso e venoso) su segmenti multipli provenienti dallo stesso paziente e confrontarli al fine di studiare i fattori coinvolti nello sviluppo dell'IH all'interno del graft.

Il sistema, come mostrato in Figura 2.5, è costituito da due sottocircuiti: uno è soggetto a condizioni venose e uno a condizioni arteriose (vedi Tabella 2.2). Ciascun canale consta di una flask in vetro (reservoir) contenente 500 ml di medium, movimentato mediante una pompa peristaltica (Watson Marlow 505-S, Falmouth, Cornwall, UK) all'interno di un circuito chiuso costituito da tubi in silicone con diametro pari a 1 cm.

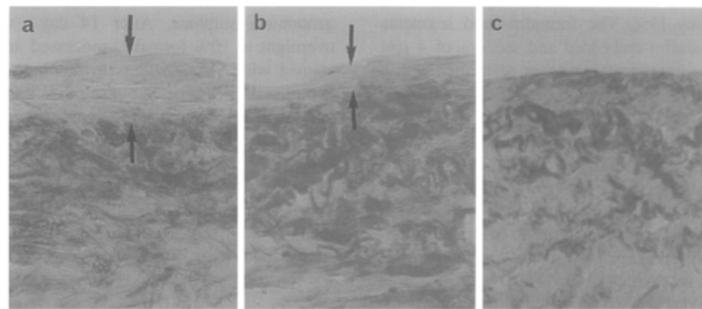


**Figura 2.5** Rappresentazione diagrammatica dei canali arterioso e venoso del sistema.

Coppie di segmenti di vena lunghi 0.5 cm sono ancorati all'interno di un tratto di tubo in silicone di lunghezza pari a 90 cm mediante degli appositi spilli (A1 minuten pin Watkins and Doncaster, Cranbrook, Kent). La durata dell'esperienza è pari a 13 giorni. I

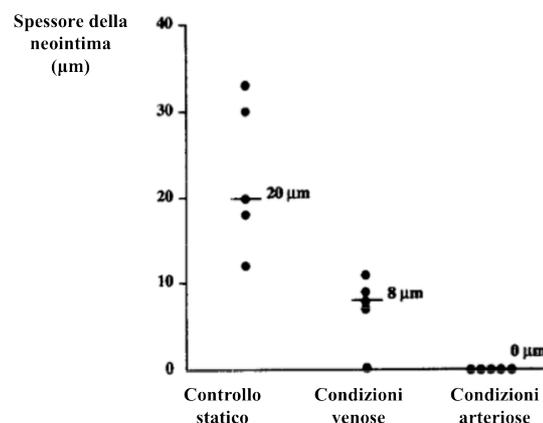
tratti di tubo contenenti i segmenti venosi vengono mantenuti all'interno di un incubatore ad una temperatura pari a 37 °C.

Esami istologici (Figura 2.6) effettuati in seguito a colorazione SMA/Miller (indirizzata all' $\alpha$ -actina delle SMCs e alle fibre elastiche) di segmenti di vena sottoposti a coltura statica hanno rivelato una presenza significativa di neointima al di sotto dello strato endoteliale; i segmenti sottoposti a condizioni venose hanno mostrato uno strato neointimale più sottile, che è risultato, invece, del tutto assente nei segmenti sottoposti a condizioni arteriose.



**Figura 2.6** Immagini al microscopio ottico di sezioni trasversali di vena safena umana sottoposte a colorazione SMA/Miller in seguito a 14 giorni di coltura a) statica, b)venosa, c)arteriosa. Le frecce indicano lo spessore di neointima sviluppata durante la coltura.

Più precisamente, lo spessore della neointima è risultato pari a 20  $\mu\text{m}$  e 8  $\mu\text{m}$ , rispettivamente per le vene coltivate in statica e quelle in condizioni di flusso venoso (Figura 2.7).

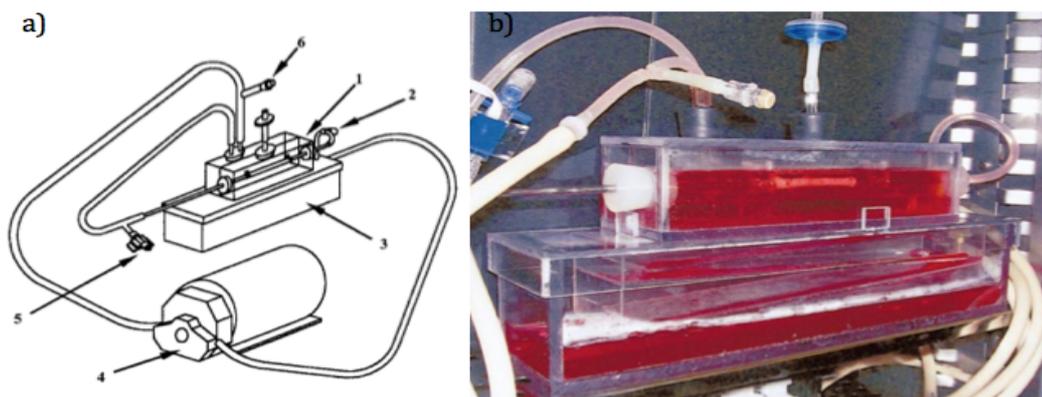


**Figura 2.7** Scatter plot dello spessore della neointima sviluppata nelle vene sottoposte a coltura statica e quelle sottoposte a perfusione venosa. Si nota come nel caso di flusso arterioso le vene non hanno sviluppato neointima (Adattato da [24]).

Da un confronto con la vena coltivata in statica è stato, inoltre, osservato che livelli fisiologici arteriosi di shear stress prevengono la proliferazione intimale nel vaso, mentre valori fisiologici venosi la inibiscono solo parzialmente. In definitiva, queste esperienze suggeriscono l'esistenza di un controllo sulla crescita delle SMCs in risposta alla variazione dello shear stress. Questo controllo pare sia dovuto alle ECs che fungono da mediatori degli effetti emodinamici influenzando la proliferazione delle SMCs.

Surowiec [23] ha realizzato un sistema di perfusione *ex vivo* in cui coltivare segmenti di vene safene umane provenienti da interventi di CABG.

Il sistema (Figura 2.8, a) è costituito da due camere in policarbonato, da una pompa peristaltica (L/S Modular Drive with Cartridge Pump Head, Cole Parmer) e dalla circuiteria (tubi in silicone). La camera superiore è, a sua volta, suddivisa in due camere: una permette di alloggiare vene safene umane di lunghezza media pari a 5 cm (range 3-10 cm); l'altra, la camera di compliance, serve a smorzare gli impulsi provenienti della pompa. La camera inferiore, invece, è uno scambiatore di gas. I segmenti di vena sono incannulati ad entrambe le estremità mediante portagomma in acciaio inossidabile (Small Parts Incorporated, Miami Lakes FL). Il volume di riempimento dell'intero sistema è pari a 500 ml. In Figura 2.8-b è mostrata una foto del sistema all'interno dell'incubatore.



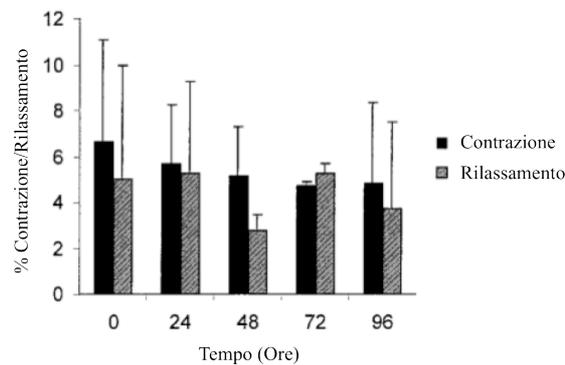
**Figura 2.8** a) Diagramma del sistema di coltura a perfusione che consiste di: 1) camera di alloggiamento del vaso, 2) valvola pinzatabo manuale per aumentare la pressione intraluminale del vaso, 3) scambiatore di gas, 4) pompa peristaltica, 5) port per la misurazione della pressione, 6) port per iniezione di farmaci. b) Foto del sistema contenente il vaso e il medium di coltura.

Durante l'esperimento la portata fornita dalla pompa è pari a 100 ml/min e la

pressione, misurata all'interno del vaso mediante un trasduttore di pressione (Abbott Critical Care Systems, North Chicago IL), è mantenuta al di sotto di 40 mmHg.

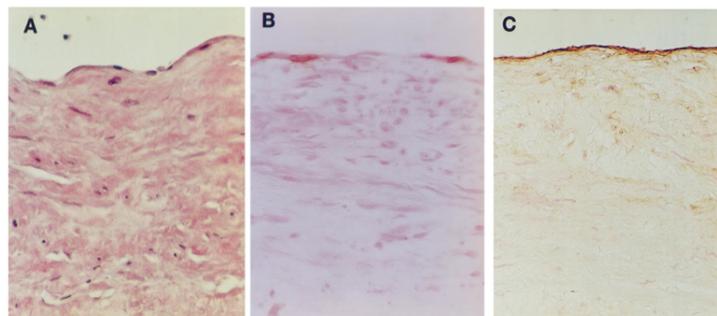
Gli esperimenti sono stati condotti su tratti di vene safene umane per tempi pari a 0 (controllo statico), 24, 48, 72 e 96 ore, al termine dei quali è stata valutata la vitalità del tessuto biologico.

Le proprietà meccaniche dei campioni utilizzati sono state caratterizzate mediante analisi di contrazione e rilassamento; i risultati sono mostrati in Figura 2.9.



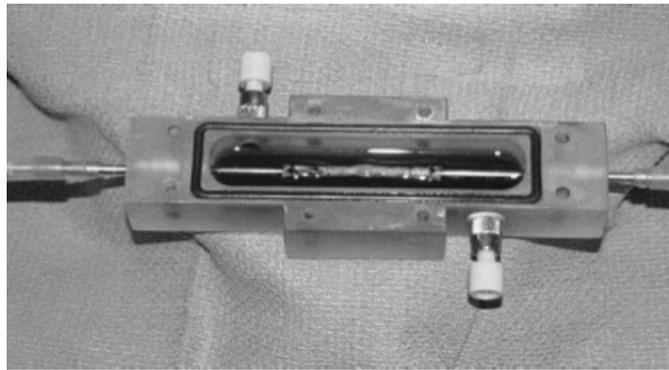
**Figura 2.9** Contrazione e rilassamento di segmenti di vena safena umana mantenuti in perfusione per 0, 24, 48, 72 e 96 ore. (Adattato da [23]).

Per valutare la vitalità delle ECs sono state effettuate analisi istologiche e immunoistologiche: il saggio Bromodeossiuridina (*BrdU* - *bromodeoxyuridine*)(Figura 2.10, B) mostra una proliferazione cellulare nello strato endoteliale; la colorazione con H/E (Figura 2.10, A) e la marcatura per il fattore VIII (fattore di von Willebrand) (Figura 2.10, C) mostrano un endotelio sano e continuo e un piccolo strato di SMCs.



**Figura 2.10** Risultati istologici e immunoistologici di sezioni di vena safena umana poste in coltura per 24 ore: A) colorazione H/E; B) colorazione *BrdU*; C) colorazione per il fattore VIII.

Patterson [25] ha esaminato l'effetto dello *shear stress* sull'attività delle metalloproteinasi (MMPs)<sup>1</sup> e sull'ispessimento dell'intima in segmenti di vena safena umana posti in coltura per 7 giorni in condizioni statiche e di perfusione. In quest'ultimo caso sono state realizzate due configurazioni: una a bassa portata, con conseguente basso valore di *shear stress* (dell'ordine di 0.2-0.4 Pa), e una a portata elevata, con conseguente *shear stress* elevato (circa 0.9-1.2 Pa). Il circuito di perfusione prevede l'impiego del sistema pompante Cellmax Quad (Cellco, Germantown, MD) e di una camera in policarbonato realizzata *ad hoc* per l'alloggiamento del vaso (Figura 2.11), il quale è assicurato ad una cannula metallica mediante suture in Nylon. Inoltre sono presenti una riserva in vetro contenente il medium di coltura e tubi in silicone a connettere il tutto.

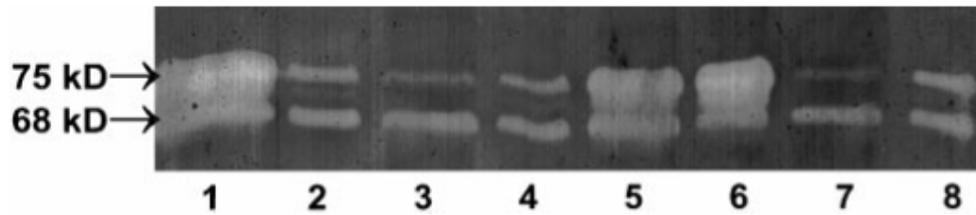


**Figura 2.11** Camera per la coltura di vene safene. Il segmento di vena è perfuso all'interno della camera, mentre è immerso nel mezzo di coltura.

La concentrazione e l'attività delle MMPs nel tessuto vascolare sottoposto a perfusione sono stati quantificati mediante saggio ELISA e zimografia, rispettivamente; i risultati ottenuti sono poi stati confrontati con il campione di controllo (mantenuto in coltura statica). E' stato dimostrato che lo *shear stress* influenza il grado di espressione e di attività delle MMPs: in particolare, per valori elevati, tipici della circolazione arteriosa, si è verificato un incremento dell'espressione della MMP-2 e MMP-9. Analisi zimografiche hanno, inoltre, dimostrato un incremento dell'attività proteolitica. Invece, i segmenti soggetti a basso flusso o addirittura in assenza di esso hanno mostrato un contenuto di

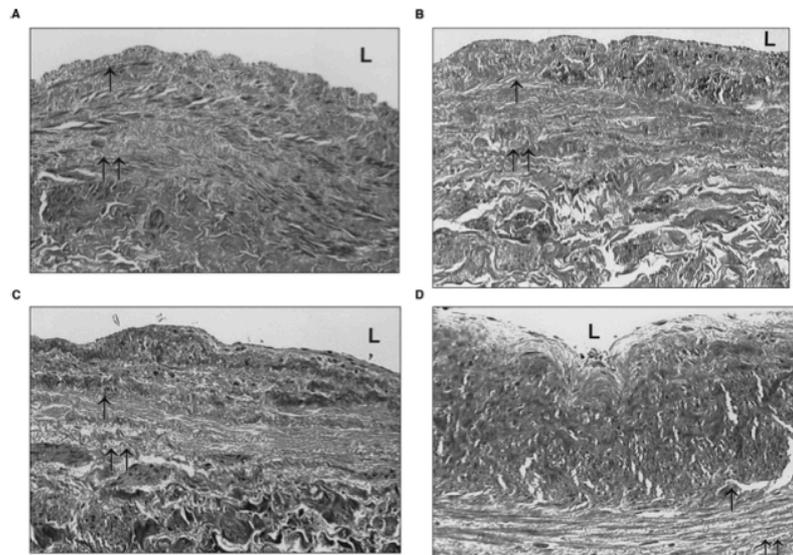
<sup>1</sup> Le metalloproteinasi (MMPs) sono una famiglia di enzimi proteolitici la cui funzione principale è la degradazione della ECM; questa loro capacità le colloca tra le proteinasi che regolano il rimodellamento del tessuto connettivo durante l'angiogenesi.

MMPs paragonabile a quello esposto dalle vene di controllo (Figura 2.12).



**Figura 2.12** Zimogramma delle proteine esposte dai campioni di vena: 1) Controllo positivo MMP-2; 2) campione di controllo; 3), 4) tessuto venoso sottoposto a basso flusso; 5), 6) tessuto venoso sottoposto a flusso elevato; 7), 8) tessuto venoso non soggetto a flusso. Si può notare l'incremento dell'attività proteolitica nel tessuto soggetto a flusso elevato.

Per quanto concerne l'ispessimento dell'intima, esso appare direttamente proporzionale allo shear stress: vene soggette ad elevati valori di flusso hanno sviluppato un significativo incremento dello spessore dell'intima. Ciò è stato osservato mediante analisi istologiche condotte su segmenti di vena safena umana in seguito a colorazione tricromica (Figura 2.13).



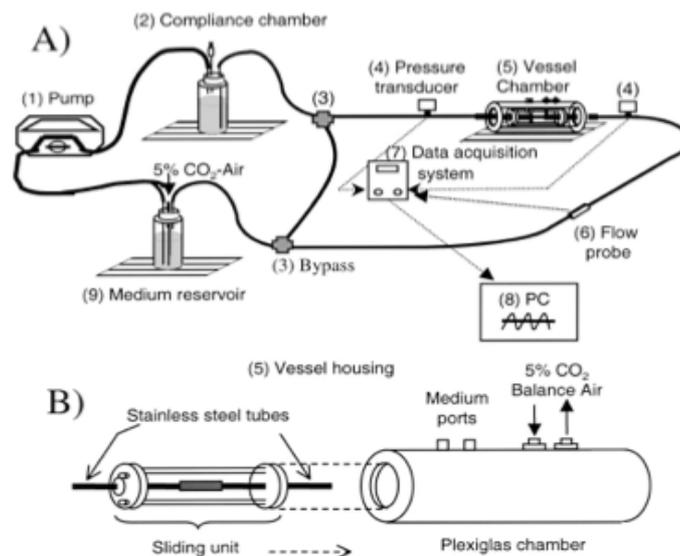
**Figura 2.13** Sezioni istologiche di segmenti di vena safena umana preparate con colorazione tricromica. La freccia singola indica la lamina elastica interna, mentre la doppia freccia indica quella esterna. A) Tessuto di controllo; B) Tessuto coltivato in condizioni statiche per 7 giorni; C) Tessuto sottoposto a coltura in condizioni di basso shear stress per 7 giorni; D) Tessuto sottoposto a coltura in condizioni di elevato shear stress per 7 giorni. Si può notare l'ispessimento dell'intima in relazione all'incremento dello shear stress.

Questo risultato appare in contrasto con altri dati presenti in letteratura, in cui è stato dimostrato che un flusso elevato inibisce la formazione di neointima. Una spiegazione di ciò consiste probabilmente nel fatto che l'*organ culture system* qui proposto permette di

raggiungere una pressione pari a 50 mmHg, ben inferiore ai valori pressori arteriosi.

Uno degli obiettivi del lavoro di Clerin [19] è quello di definire un ambiente emodinamico semplificato (flusso laminare stazionario e pressione costante) come punto di partenza per studi successivi riguardanti l'ingegnerizzazione [26] di vasi di piccolo calibro.

L'*organ culture* sviluppato (Figura 2.14) è caratterizzato da un reservoir, che ha anche la funzione di scambiatore di gas, da una camera per l'alloggiamento del vaso in polimetilmetacrilato (PMMA) (con volume di priming pari a 500 ml di medium di coltura) e da una camera di compliance in serie ad una pompa peristaltica Masterflex. Le connessioni tra i vari elementi del sistema sono realizzate con tubi in silicone Tygon. È presente inoltre un sistema laser in grado di misurare *real-time* il diametro esterno del vaso perfuso, in questo caso arterie carotidi porcine. Queste sono vincolate ad entrambe le estremità a due barrette in acciaio inossidabile in grado di slittare indipendentemente dal resto della camera, e quindi capaci di adattarsi alle deformazioni longitudinali a cui è soggetto il vaso stesso durante l'esperimento.



**Figura 2.14** (A) Schema del sistema di perfusione. Una pompa peristaltica (1) spinge il fluido in senso orario. La pulsatilità dei profili di pressione e flusso è smorzata dalla camera di compliance (2). In esercizio il flusso può essere deviato verso il bypass (3) oppure verso la camera di alloggiamento del vaso (5). I trasduttori di pressione (4) e il flussimetro (6) sono collegati ad un sistema di acquisizione dei dati (7). Un sistema laser è impiegato per misurare il diametro esterno del vaso perfuso (non mostrato in figura). Il segnale proveniente da questi moduli è controllato e registrato da un computer (8) dotato di una scheda di acquisizione A/D. Il medium è contenuto in un reservoir (9) che consente lo scambio di gas prima di tornare alla pompa. (B) I vasi sono incannulati a due cilindri in acciaio inossidabile e l'assemblato è inserito all'interno di una camera in plexiglass (PMMA). Gli afferraggi possono scorrere indipendentemente dal resto dell'unità. I port sulla camera in PMMA permettono lo scambio di gas e di medium.

Analisi morfometriche (colorazione H/E) condotte sui campioni provenienti da maiali appena nati (due settimane di vita) sottoposti a perfusione (portata pari a 50 ml/min) per 9 giorni hanno mostrato denudazione, diminuzione della cellularità (soprattutto nella regione mediale) e un elevato livello di morte cellulare. Per supportare l'ipotesi secondo la quale la portata influenza la perdita di endotelio e la morte delle SMCs, sono stati condotti esperimenti caratterizzati da portate pari a 1, 10, 50 e 100 ml/min. I risultati hanno dimostrato che all'aumentare della portata la proliferazione cellulare e la numerosità cellulare sono diminuite, mentre la morte cellulare è aumentata.

Per quanto riguarda i campioni biologici provenienti da maiali adulti (sei mesi di vita) sottoposti a perfusione, la coltura di 9 giorni ad una portata di 500 ml/min ha permesso di mantenere un endotelio intatto, sebbene si siano verificati eventi localizzati di morte cellulare e proliferazione; la coltura di 27 giorni caratterizzata da bassi valori di portata, invece, non ha mostrato alterazioni morfologiche. Anche in questo caso, all'aumentare della portata di perfusione si sono verificati gli eventi descritti nel caso delle arterie provenienti da maiali neonati.

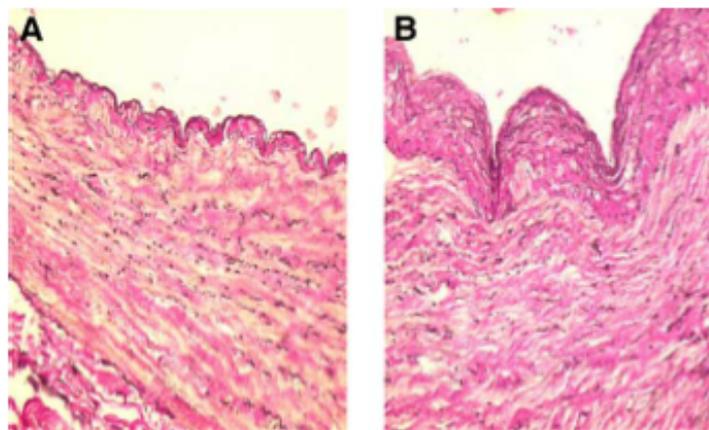
Il dispositivo realizzato da Clerin e colleghi è protetto da brevetto (No: US 7,011,623 B2 del 14 marzo 2006).

Nello studio di Rey [27] si è confrontata la risposta biologica, in termini di caratteristiche istomorfologiche e funzionali, da parte di segmenti di vene safene umane sottoposti a 14 giorni di perfusione (vedi Tabella 2.2) con campioni omologhi mantenuti in coltura statica. Il sistema *ex vivo* realizzato (Figura 2.15), definito dagli autori stessi EVVSS (*Ex Vivo Vein Support System*), si compone di: una riserva di medium, una camera di perfusione in cui è collocata la vena, una pompa peristaltica Masterflex e connessioni circuitali ottenute con tubi in silicone trattati.



**Figura 2.15** Foto del sistema. 1) Pompa, 2) sensore di pressione, 3) reservoir, 4) camera di perfusione, 5) segmento di vena, 6) flussimetro, 7) tubi in silicone.

A fine coltura, i campioni biologici sono stati sottoposti ad analisi immunohistochimiche utilizzando i seguenti anticorpi: CD31, CD34, fattore di von Willebrand,  $\alpha$ -actina; queste analisi hanno mostrato l'integrità dello strato endoteliale e delle SMCs. L'integrità della parete del vaso è stata dimostrata attraverso la colorazione H/E. Sono state effettuate delle misure dello strato intimale e sub-intimale del vaso, corrispondente alla neointima sviluppata dai campioni in coltura, che hanno rivelato un effettivo ispessimento del vaso perfuso rispetto alla condizione iniziale (Figura 2.16, a). I vasi posti nell'EVVSS hanno mostrato anche una tunica media più spessa a fine coltura.



**Figura 2.16** Sezioni istologiche del vaso prima (A) e dopo (B) 14 giorni di coltura ex vivo nell'EVVSS. Le immagini dimostrano l'effettiva sviluppo di neointima.

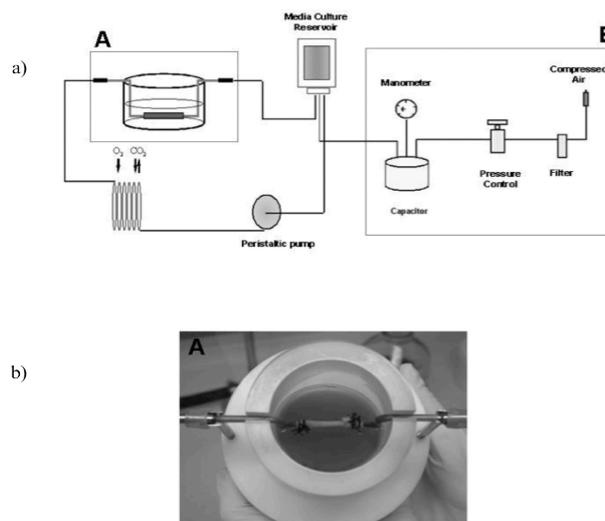
Al fine di valutare l'indice di proliferazione cellulare è stato utilizzato l'anticorpo

monoclonale MIB-1 (marker della proliferazione) per marcare sia i campioni coltivati in statica che quelli perfusi, mentre l'espressione del mRNA PAI-1 ha permesso di quantificare un indice di migrazione delle SMCs. Infatti, l'ispessimento della media può essere interpretato come una redistribuzione e una modificazione fenotipica delle SMCs che a sua volta induce la migrazione e la proliferazione delle stesse nello strato dell'intima.

In entrambe le configurazioni di coltura (statica e perfusione) i campioni hanno mostrato un paragonabile sviluppo di IH, sebbene i primi siano caratterizzati da un indice di proliferazione maggiore. Probabilmente la motivazione di ciò risiede nell'assenza di un flusso pulsatile in entrambi i casi. Inoltre, il valore di shear stress non era sufficiente alto da inibire lo sviluppo di IH nei campioni perfusi.

Miyakawa [28] ha sviluppato un sistema di perfusione *ex vivo* in grado di riprodurre le condizioni fisiologiche arteriose e venose (Tabella 2.2) a cui sottoporre tratti di vene safene umane per 1, 2 o 4 giorni.

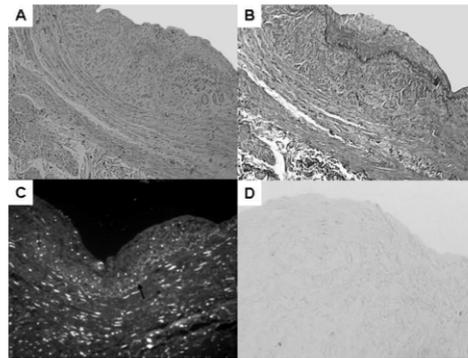
Il sistema è schematicamente rappresentato in Figura 2.17-a. La camera di alloggiamento del vaso (Figura 2.17, b), che ospita segmenti venosi di lunghezza pari a 2 cm, è connessa al sistema di perfusione, il cui circuito è stato adattato dal CELLMAX Artificial Capillary System (Spectrum Laboratories, Inc. Rancho Dominguez, CA).



**Figura 2.17** a) Il sistema di perfusione *ex vivo* consiste di: housing del vaso (A), pompa peristaltica, reservoir, apparato per il controllo della pressione (B.); b) Zoom dell'housing del vaso.

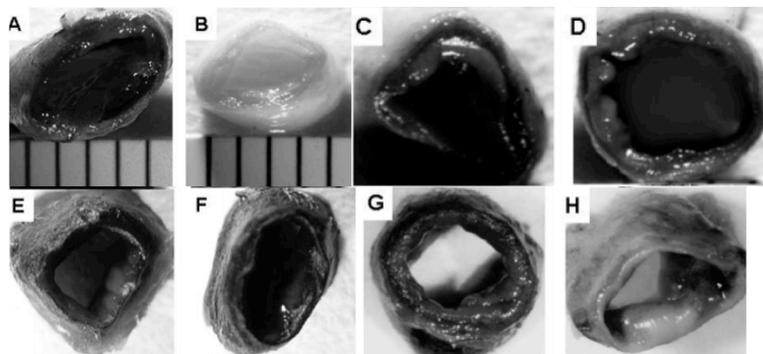
Analisi immunohistochimiche (Figura 2.18) sui campioni biologici prima e dopo il periodo di coltura sono servite per valutare il grado di vitalità cellulare, di densità cellulare e apoptosi.

Le colorazioni H/E e Verhoeff's-Van Gieson (VVG) sui tratti freschi di vena safena umana hanno mostrato la presenza di un tessuto integro; la marcatura dei nuclei con Hoechst 33258 e attraverso il saggio TUNEL hanno suggerito l'assenza di processi necrotici o apoptotici.



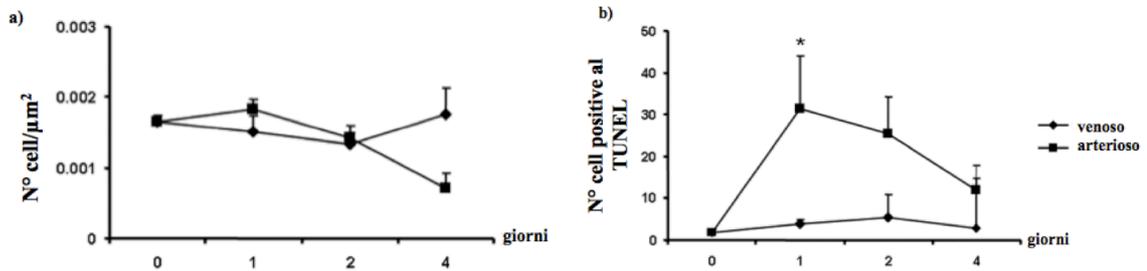
**Figura 2.18** Sezioni istologiche di vena safena umana appena espiantata e sottoposta a colorazione : A) H/E; B) VVG; C) Hoechst per i nuclei; D) TUNEL.

Per quanto riguarda i segmenti coltivati in condizioni arteriose si sono osservate: una diminuzione progressiva dei nuclei colorati con H/E; una densità cellulare diminuita grazie alla marcatura dei nuclei con Hoechst 33258; la presenza di una piccola percentuale di cellule vive mediante analisi MTT (Figura 2.19); la presenza di cellule positive al saggio TUNEL dopo appena due giorni di coltura (Figura 2.20).



**Figura 2.19** Colorazione MTT di tratti di vena safena umana sottoposti a perfusione nel sistema di coltura ex vivo. I segmenti sono stati coltivati in condizioni emodinamiche venose (C, E, G) e arteriose (D, F, H) per 1 (C,D), 2 (E,F) o 4 giorni (G,H). Porzioni di tessuto appena espiantato (A) e campioni di tessuto morto (B) sono stati utilizzati come controllo positivo e negativo per la visualizzazione della vitalità del tessuto.

I vasi soggetti a condizioni di coltura venose, invece, non hanno mostrato differenze significative rispetto ai vasi appena prelevati.

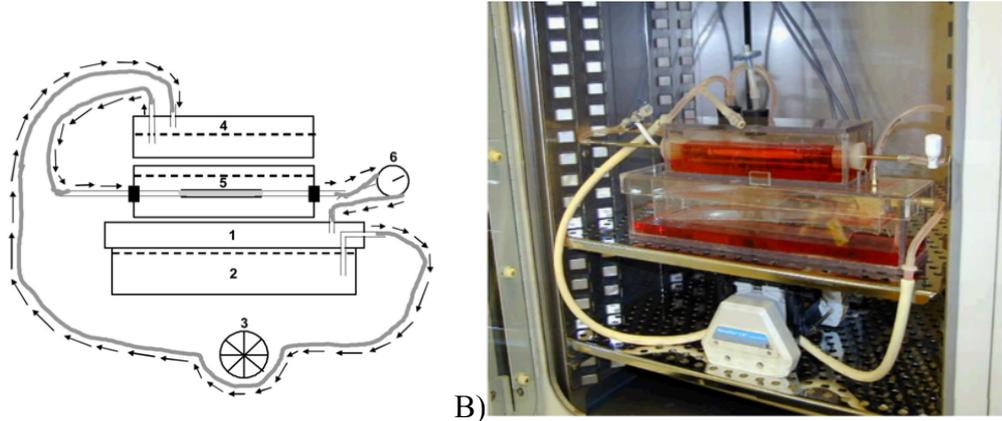


**Figura 2.20** a) Analisi della densità cellulare nei vasi coltivati nel sistema di organ culture *ex vivo*; b) Analisi del livello di apoptosi nei vasi coltivati nel sistema di organ culture *ex vivo*. (Adattato da [28]).

Non è stata trovata una spiegazione valida all'assenza di proliferazione nelle vene safene coltivate in condizioni arteriose, sebbene si pensi che sia dovuta a una mancanza di adeguati fattori di crescita nel medium di coltura. Un'altra spiegazione può essere individuata nella durata della coltura (4 giorni) probabilmente non adeguata allo sviluppo del fenomeno ricercato.

Liao [29] ha sviluppato un sistema di coltura a perfusione *ex vivo* che opera in condizioni di flusso stazionario. L'obiettivo del lavoro è analizzare la proliferazione delle SMCs in arterie carotidi porcine in risposta a danni endoteliali ed in presenza del fattore di crescita FGF2 (*fibroblast growth factor*), singolo o coniugato al SAP (*cytotoxin saporin*).

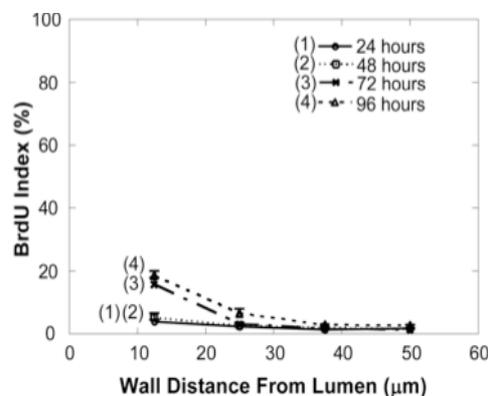
Il sistema di coltura (Figura 2.21, a) consiste in un reservoir di medium accoppiato ad uno scambiatore di gas, una pompa peristaltica (Cole Parmer, Vernon Hills, Illinois, USA), una camera di compliance e una camera di coltura per il vaso con volume di priming pari a 50 ml. In Figura 2.21-b è mostrata una foto del sistema posto all'interno dell'incubatore.



**Figura 2.21** A) Sistema di perfusione. 1) Scambiatore di gas, 2) camera di perfusione, 3) pompa roller, 4) camera di compliance, 5) housing del vaso, 6) flussimetro. Le frecce indicano la direzione del flusso. B) Foto dell'intero sistema posizionato all'interno di un incubatore.

Tratti di arterie carotidi porcine di lunghezza compresa tra 6 e 8 cm sono afferrati ad una cannula supportata da una struttura metallica che ne permette l'ancoraggio alla camera di coltura. Il sistema è stato posto in esercizio per un massimo di 96 ore ad una portata costante pari a 100 ml/min e ad una pressione intraluminale pari a 100 mmHg, mantenuta tale attraverso una clamp posta distalmente al vaso.

A fine coltura, i vasi hanno mantenuto la propria vitalità. La proliferazione cellulare è stata valutata rispetto all'incorporazione di BrdU e attraverso analisi immunostochimiche. I risultati ottenuti hanno dimostrato una percentuale di proliferazione delle SMCs nello strato più interno della tunica media pari a 10, 13, 18, e 19% dopo 24, 48, 72 e 96 ore di coltura, rispettivamente (Figura 2.22); la proliferazione è apparsa diminuita, invece, nello strato mediale in prossimità delle tunica avventizia.

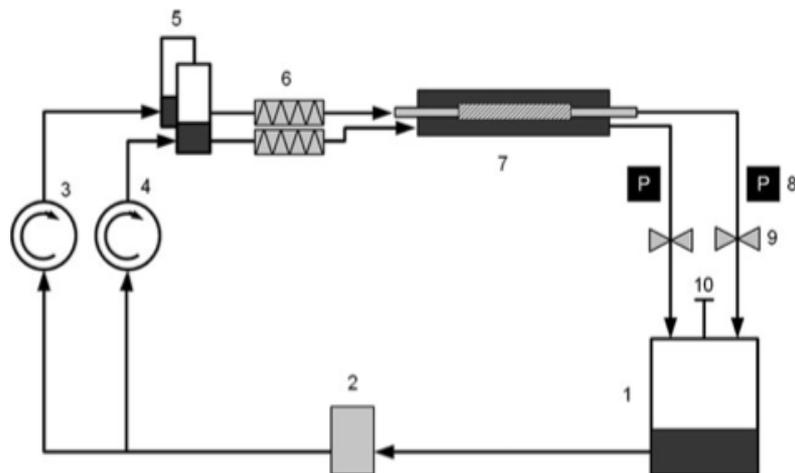


**Figura 2.22** Andamento della proliferazione delle SMCs nelle arterie carotidi porcine. Dopo 24, 48, 72 o 96 ore di coltura, le arterie sono state fissate e sottoposte a colorazione BrdU.

La proliferazione delle SMCs è inoltre influenzata dalla presenza del fattore di crescita FGF2, mentre risulta inibita in presenza di FGF2-SAP.

L'obiettivo dello studio di Hoenicka [30] è quello di valutare il consumo di ossigeno e di glucosio del tessuto vascolare in condizioni simili a quelle utilizzate nei protocolli di ingegneria dei tessuti in modo da migliorare le procedure di realizzazione di vasi di piccolo calibro (coronarie e arterie periferiche).

Campioni di vene safene bovine lunghi 8 cm sono inseriti all'interno della camera di perfusione del sistema *ex vivo*, comprendente inoltre due pompe peristaltiche (ISM444, Ismatec SA, Glattbrugg, Switzerland), un ossigenatore, uno scambiatore di calore, delle camere di compliance, dei trasduttori di pressione (DPT-6100; Codan, Forstinning, Germany), dei resistori di Starling. Tubi in silicone Tygon con diametro interno di 3 e 4 mm sono usati per connettere i vari elementi del sistema (Figura 2.23). Il volume di riempimento del circuito è di 300 ml.



**Figura 2.23** Rappresentazione schematica del bioreattore a perfusione. 1) Reservoir, 2) ossigenatore, 3-4) pompa peristaltica, 5) camere di compliance, 6) scambiatori di calore, 7) camera di coltura del vaso, 8) trasduttori di pressione, 9) resistori di Starling, 10) filtro HEPA.

La maggior parte degli esperimenti è stata condotta imponendo una portata di 40 ml/min, in altri, invece, la portata raggiungeva i 60 ml/min. La durata della prova è di 4 giorni, sebbene un gruppo di vene sia stato tenuto in coltura per 8 giorni.

Il sistema di perfusione è progettato al fine di fornire un livello fisiologico venoso di shear stress (compreso tra 0.05 e 0.22 Pa) in presenza di destrano (7÷12 %, MW 170000)

nel medium. Quest'ultimo è introdotto nel terreno di coltura con l'obiettivo di aumentarne la viscosità fino al valore caratteristico del sangue umano (da 1 a 4 mPa s)

Per valutare lo strato endoteliale è stata effettuata la colorazione con H/E e analisi immunoistochimiche con il marker VWF; i risultati non hanno mostrato nessuna variazione morfologica nelle tuniche media e avventizia, mentre in quella intima si è osservata una perdita di ECs. In presenza di destrano, i campioni biologici hanno mantenuto un endotelio intatto, sebbene con una densità cellulare diminuita; in questi vasi è stata individuata l' E-selectina, una molecola proteica di adesione shear stress-dipendente. Il gruppo tenuto in coltura per 8 giorni ha, invece, mostrato segni di disintegrazione dello strato sub-endoteliale in aggiunta a una completa perdita di ECs. Analisi TUNEL effettuate su quest'ultimo gruppo hanno rivelato segni di apoptosi.

È stata anche misurata la concentrazione di glucosio e di lattato per valutarne il consumo e la produzione, rispettivamente. I dati ottenuti dimostrano l'avvenuta fermentazione del lattato; ciò indica un consumo alterato di glucosio nei campioni biologici.

I dati ottenuti mostrano, pertanto, che lo shear stress non influenza il metabolismo del glucosio, ma ne incrementa il consumo.

La Tabella 2.2 riassume i sistemi di coltura *ex vivo* a perfusione stazionaria descritti ed analizzati, indicando il campione biologico utilizzato, le condizioni fluidodinamiche imposte, la durata della coltura e il tipo di analisi istomorfologiche eseguite.

	<b>Campione biologico</b>	<b>Condizioni fluidodinamiche e durata della coltura</b>	<b>Analisi istomorfologiche</b>	<b>Riferimento bibliografico</b>
1	Vena safena umana	- Arteriose: Q=500 ml/min P= 85 mmHg $\tau = 0.9$ Pa - Venose: Q=70 ml/min P=15 mmHg $\tau = 0.1$ Pa Durata: 13 giorni	Colorazione SMA/Miller	Porter (1996)

2	Vena safena umana	Q= 100 ml/min P= 40 mmHg Durata: 24, 48, 72, 96 ore	- Saggio BrdU - Colorazione H/E - Marcatura per il fattore VIII	Surowiec (2000)
3	Vena safena umana	- Basso shear stress: $\tau = 0.2-0.4$ Pa - Alto shear stress: $\tau = 0.9-1.2$ Pa Durata: 7 giorni	- Colorazione tricromica - ELISA - Zimografia	Patterson (2001)
4	Arterie carotidi porcine	- Arteriose neonatali: Q=50 ml/min P= 80 mmHg - Arteriose adulte: Q=500 ml/min P= 120 mmHg	Colorazione H/E	Clerin (2002)
5	Vena safena umana	$\tau = 0.2-0.65$ Pa Durata: 14 giorni	- Colorazione H/E - Marcatura con CD31, CD34, per il fattore VIII e l' $\alpha$ -actina	Rey (2004)
6	Vena safena umana	- Arteriose: Q=50 ml/min P= 80 mmHg - Venose: Q=5 ml/min Durata: 1, 2, 4 giorni	- Colorazione H/E - Colorazione VVG - Saggio TUNEL - Marcatura Hoechst 33258 - MTT	Miyakawa (2008)
7	Arterie carotidi porcine	Q= 100 ml/min P= 100 mmHg Durata: 96 ore	Saggio BrdU	Liao (2008)
8	Vena safena bovina	Q= 40 ml/min (in alcuni casi Q= 60 ml/min) $\tau = 0.05\div 0.22$ Pa Durata: 4, 8 giorni	- Colorazione H/E - Marcatura per il fattore VIII - Saggio TUNEL	Hoeniccka (2010)

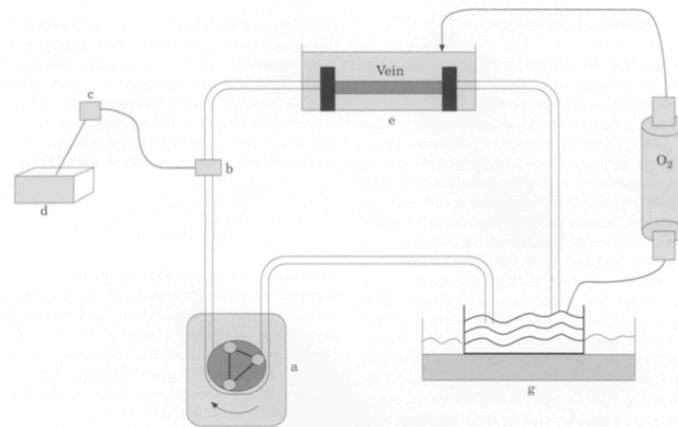
**Tabella 2.2** Tabella riassuntiva dei sistemi di coltura a perfusione stazionaria ex vivo di segmenti vascolari.

### 2.1.2.2. Sistemi a perfusione pulsatile

In questo paragrafo saranno descritti e analizzati gli studi ritenuti più significativi riguardo ai sistemi di coltura *ex vivo* a perfusione pulsatile di segmenti vascolari.

Golledge [31] ha sviluppato un modello *ex vivo* del CABG realizzato mediante vena safena con lo scopo di studiare la risposta adattativa dell'endotelio venoso alle condizioni di flusso arterioso.

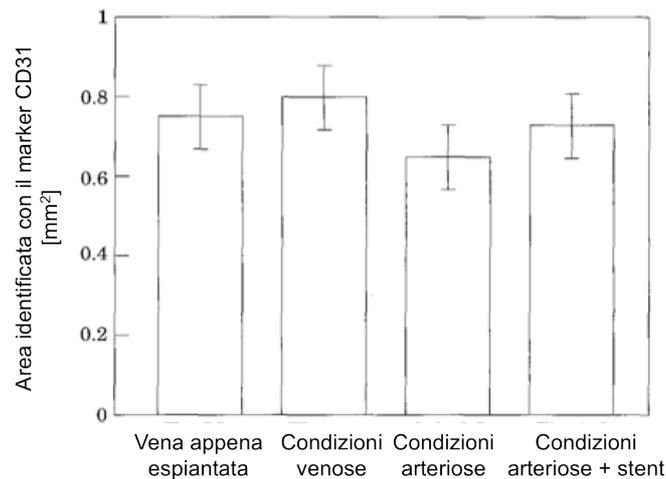
Il circuito, come mostrato in Figura 2.24 consiste in una pompa (Stockert, Stöckert Instrumente GmbH, Monaco, Germania), un trasduttore di pressione (Simonsen&Weel Medico Teknik A/S, Vallensbæk Strand, Danimarca), una riserva di medium e una camera di alloggiamento del campione di vena safena umana (lunghezza 3-4 cm), montata su una struttura di supporto.



**Figura 2.24** Diagramma del circuito costituito da: a) pompa, b) rubinetto a tre vie, c) trasduttore di pressione, d) lettura del trasduttore, e) camera di alloggiamento della vena, f) ossigenatore, g) reservoir.

Il campione è sottoposto ad un flusso pulsatile, definito arterioso, e ad un flusso non pulsatile, definito venoso (vedi Tabella 2.3); entrambi gli esperimenti hanno durata pari a 90 minuti. In alcuni casi, i segmenti di vena sono montati su uno stent in politetrafluoroetilene (PTFE) al fine di limitare le deformazioni circonferenziali e radiali.

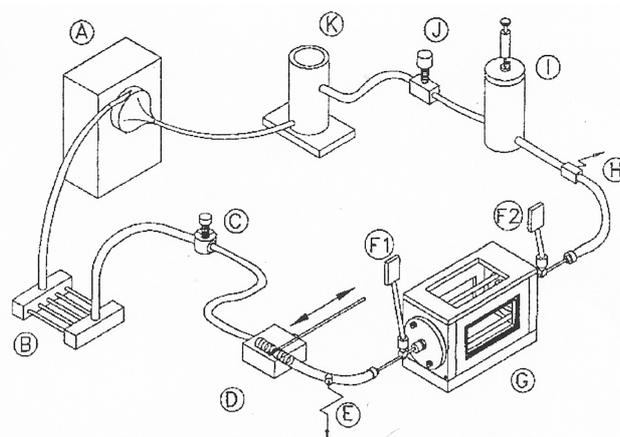
Al termine dell'esperimento, la concentrazione di ATP ha confermato la vitalità del tessuto biologico; test immunostochimici basati sulla detezione del marker CD31 hanno mostrato l'integrità dell'endotelio; l'esposizione delle vene al flusso arterioso per 90 minuti ha provocato perdita endoteliale (5-10%) sebbene non si sia verificata una riduzione significativa nell'espressione del CD31 (Figura 2.25).



**Figura 2.25** Espressione del marker endoteliale CD31 nei campioni esposti a diverse condizioni di coltura: venoso, arterioso e arterioso con stent. È presente anche il campione di controllo (Adattata da [31]).

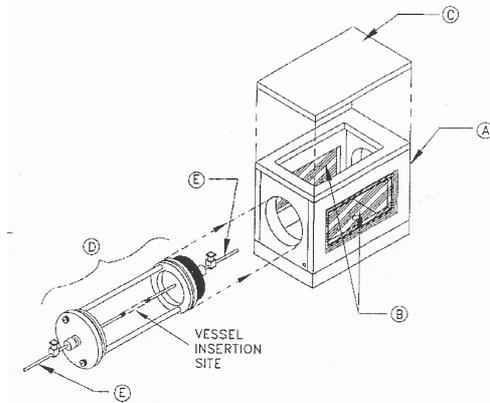
Labadie [32] ha sviluppato un sistema di perfusione *ex vivo*, definito Hemodynamic Replication System (HRS), in grado di sottoporre segmenti vascolari intatti a condizioni emodinamiche fisiologiche e controllabili.

In Figura 2.26 è presente una schematizzazione dell'HRS. Una pompa centrifuga (modello D, Biomecus, Minneapolis, MN), in serie ad un regolatore di pressione (model P50, Watts Regulator, Anhover, MA), fornisce una pressione costante; l'*housing* del segmento vascolare è costituito da una camera in PMMA che comprende un sistema mobile per il montaggio del vaso.



**Figura 2.26** Schema del circuito di perfusione. L'HRS consiste dei seguenti elementi connessi in serie: A) pompa centrifuga, B) scambiatore di calore, C) regolatore di pressione, D) valvola a saracinesca, E) sensore di temperatura, F1-F2) trasduttori di pressione, G) housing del vaso, H) flussimetro, I) camera di compliance, J) valvola a valle, K) reservoir.

Qui tratti di vaso di diametro (compreso tra 3 e 12 mm) e di lunghezza (compresa tra 2 e 15 cm) variabili possono essere vincolati per mezzo di cannule in acciaio inossidabile (Figura 2.27).



**Figura 2.27** Il tessuto vascolare è suturato su cannule in acciaio inossidabile (E) che sono integrate nella camera mobile per il montaggio del vaso (Adattato da [32]).

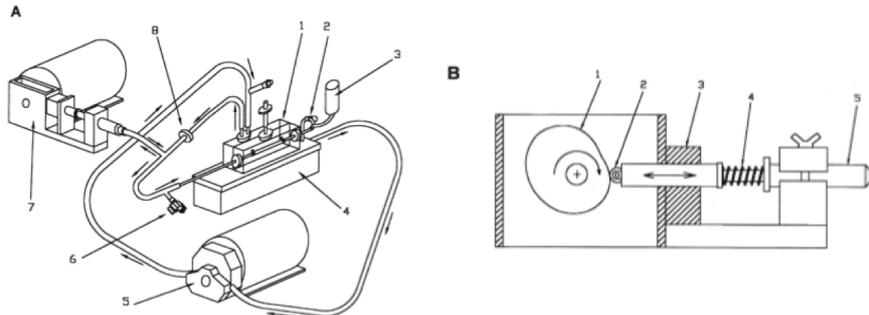
Il volume di priming del sistema è di 270 ml. Tra la camera e il regolatore è collocata una valvola a saracinesca controllata da un software che permette di ottenere un'onda pressoria simile a quella arteriosa *in vivo*.

Nel sistema sono state perfuse vene safene umane per un periodo di 24 ore in condizioni emodinamiche arteriose (Tabella 2.3).

La colorazione con falloidina legata a rodamina (proteina marcata con un fluorocromo che permette di visualizzare l'actina filamentosa) ha reso visibili le ECs; immagini ottenute al microscopio confocale hanno mostrato un endotelio vascolare intatto e continuo, un tessuto connettivo conservato ed una normale distribuzione di eucromatina ed eterocromatina nei nuclei delle SMCs ad indicare la vitalità di tali cellule.

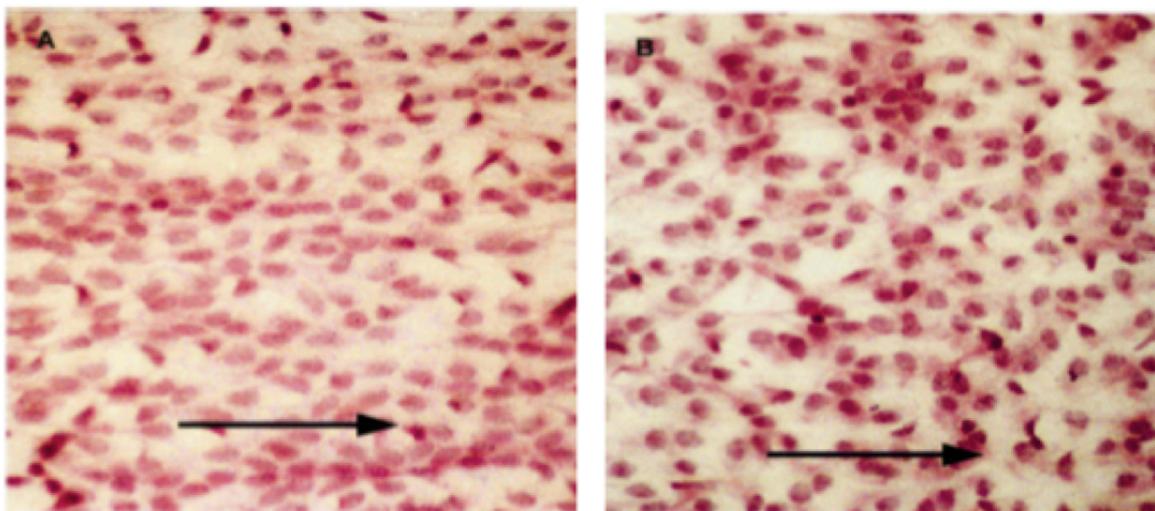
Conklin [33] ha realizzato un sistema che rappresenta l'evoluzione dell'*organ culture* sviluppata da Surowiec [34]. Il sistema permette di simulare l'emodinamica fisiologica e di effettuare un controllo preciso e indipendente di pressione e flusso con lo scopo di studiare l'effetto della perfusione pulsatile sul tessuto vascolare intatto. Un'innovazione rispetto alla versione precedente è la possibilità di alloggiare vasi di differente calibro e lunghezza. Durante l'esperimento sono stati messi in coltura campioni di arterie carotidi porcine per 48 ore.

In questa nuova configurazione è presente un PFS (Physiological Flow Simulator) (Figura 2.28), un dispositivo che aggiunge una componente pulsatile (portata media di 170 ml/min) al flusso continuo (portata di 140 ml/min) generato dalla pompa peristaltica. È inoltre presente un'ulteriore camera di compliance posta distalmente rispetto al vaso al fine di controllare la differenza di pressione tra le fasi corrispondenti ai valori di minimo e massimo flusso imposto.



**Figura 2.28** Schema del sistema di coltura. (A) Le frecce corte indicano la direzione del flusso nei tubi. I componenti sono: 1) camera di compliance e camera del vaso, 2) valvola, 3) camera di compliance distale, 4) scambiatore di gas, 5) pompa roller, 6) trasduttore di pressione, 7) PFS (Physiologic Flow Simulator), 8) valvola di non ritorno. (B) Rappresentazione schematica del PFS.

Esami istologici (colorazione con H/E) dei vasi sottoposti a coltura hanno mostrato uno strato endoteliale sano e confluyente; le SMCs hanno mantenuto la propria morfologia e la ECM non ha presentato modificazioni significative (Figura 2.29).

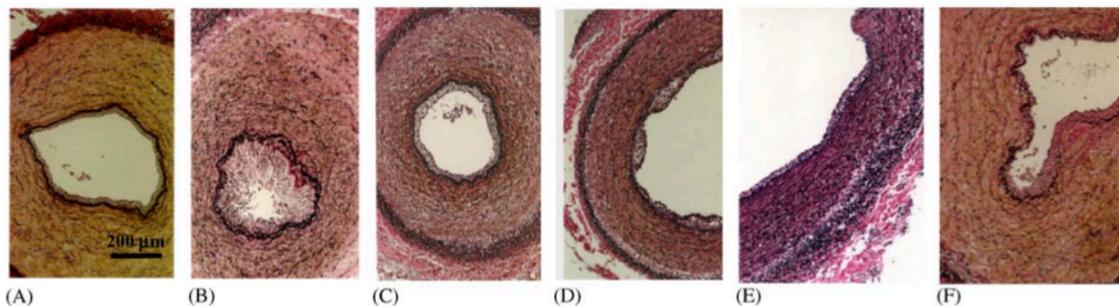


**Figura 2.29** Risultati ottenuti dalla colorazione con H/E. A) campione di controllo; B) campione dopo 48 ore di coltura. Le frecce indicano l'asse longitudinale del vaso. I nuclei appaiono ovali e orientati in direzione del flusso; lo strato endoteliale appare quiescente e a confluenza.

Gusic [35] ha riproposto il sistema di perfusione *ex vivo* sviluppato da Clerin [19]. In questo caso si sottopongono tratti di vene safene porcine a differenti condizioni fluidodinamiche al fine di stabilire gli effetti dello shear stress e della pressione sul rimodellamento venoso. Per le varie condizioni sperimentali investigate si rimanda alla Tabella 2.3.

Tutti i campioni posti in coltura sono rimasti intatti e pervi e hanno mostrato un elevato livello di proliferazione cellulare nelle tuniche avventizia, media e intima e un basso livello di necrosi cellulare (valutato mediante saggio TUNEL). Un risultato molto interessante è stato riscontrato nelle vene sottoposte a portata elevata, le quali hanno mostrato, mediante espressione del fattore di von Willebrand, una presenza significativa di ECs.

La colorazione indirizzata alle fibre elastiche (Figura 2.30) dei campioni perfusi ha rivelato una tunica media confrontabile con quella dei tessuti di controllo e la presenza di neointima.



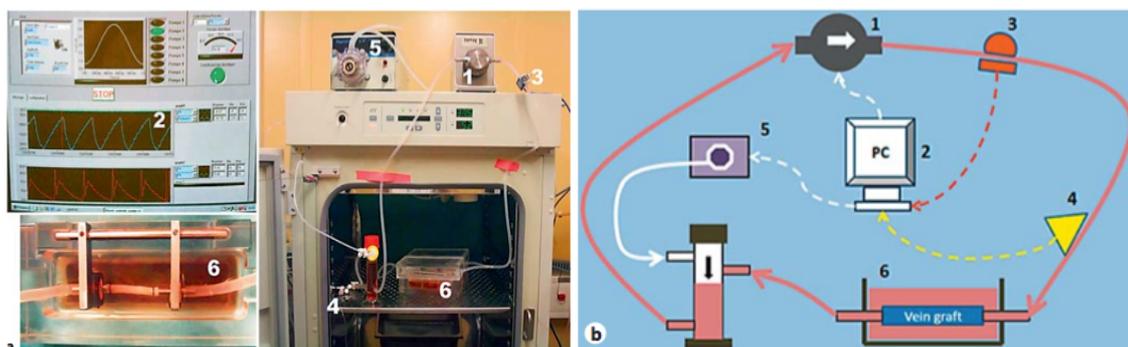
**Figura 2.30** Sezioni di vene in seguito colorazione indirizzata alle fibre elastiche: A) campione appena espantato; B) campione sottoposto a condizioni venose; C) campione sottoposto a flusso elevato; D) campione sottoposto ad un incremento pressorio a rampa; E) campione sottoposto a condizioni di shear stress controllato; F) campione sottoposto a coltura statica.

Essa è risultata morfologicamente differente nei vari gruppi sperimentali: i campioni coltivati in statica (Figura 2.30, F) hanno mostrato distruzione dell'intima; i campioni sottoposti a condizioni venose (Figura 2.30, B) sono risultati positivi al marker  $\alpha$ -actina per le SMCs; l'intima delle vene coltivate in condizioni di bypass è risultata variabile, con zone simili a quelle del vaso appena espantato (Figura 2.30, A), zone in cui la lamina elastica appariva distrutta, zone caratterizzate da IH o denudazione endoteliale. Le vene coltivate in condizioni di basso shear stress presentavano un'estesa area intimale.

Tuttavia, la pulsatilità non è stato uno stimolo necessario per la crescita della media: un incremento in questa tunica è stato mostrato anche in quei campioni soggetti a condizioni di flusso e pressione stazionarie.

In definitiva, è stato dimostrato la pressione e lo shear stress agiscono indipendentemente sul rimodellamento vascolare, provocando variazioni del calibro del vaso.

Nel lavoro di Saucy [1] è stato riproposto l'EVVSS (Figura 2.31, a/b) descritto da Rey [27] con lo scopo di perfondere per una o due settimane segmenti di vene safene umane in presenza di un flusso pulsatile che riproducesse le condizioni arteriose in termini di shear stress, portata e pressione (Tabella 2.3).

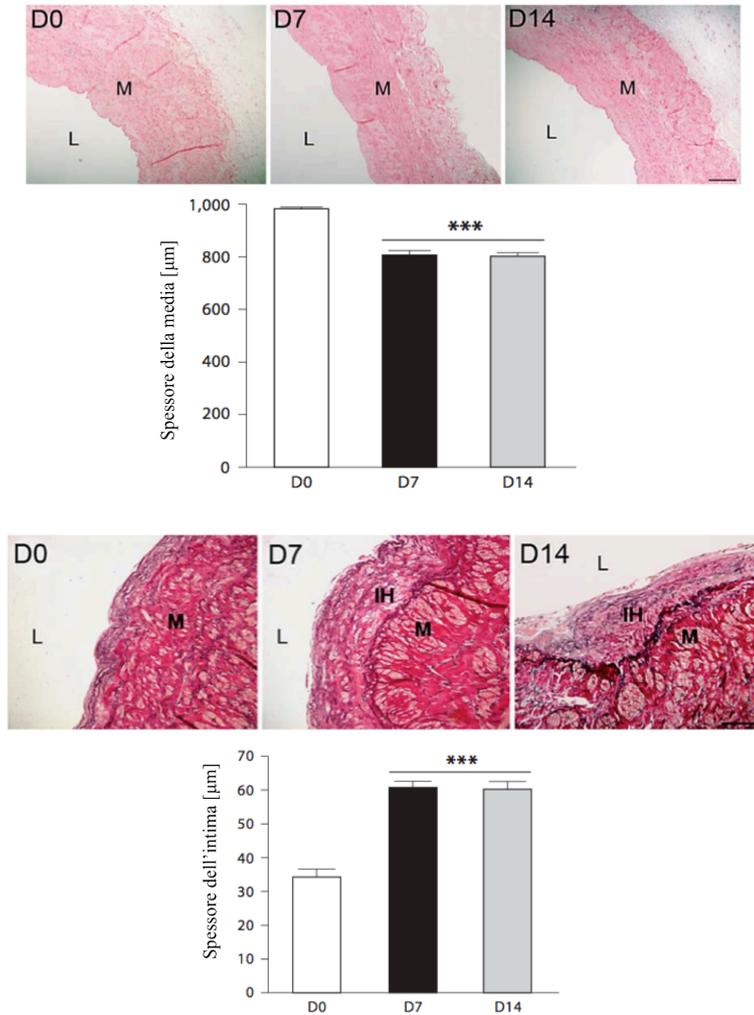


**Figura 2.31** (a,b) EVVSS: 1) pompa, 2) computer, 3) sensore di pressione, 4) flussimetro, 5) controllore di pressione, 6) camera di perfusione.

Al termine della coltura, l'integrità dei segmenti venosi è stata valutata attraverso la convenzionale colorazione H/E. I tessuti perfusi hanno conservato la contrattilità delle SMCs e la presenza di questo tipo cellulare è stata confermata attraverso analisi immunostologiche ottenute con il marker  $\alpha$ -actina. L'espressione del marker endoteliale CD31 ha dimostrato la presenza di un endotelio intatto fino all'ultimo giorno di coltura; per quanto concerne la proliferazione cellulare, questa è stata valutata attraverso l'antigene KI-67: nelle vene perfuse è stato osservato un indice di proliferazione pari all'8.2%.

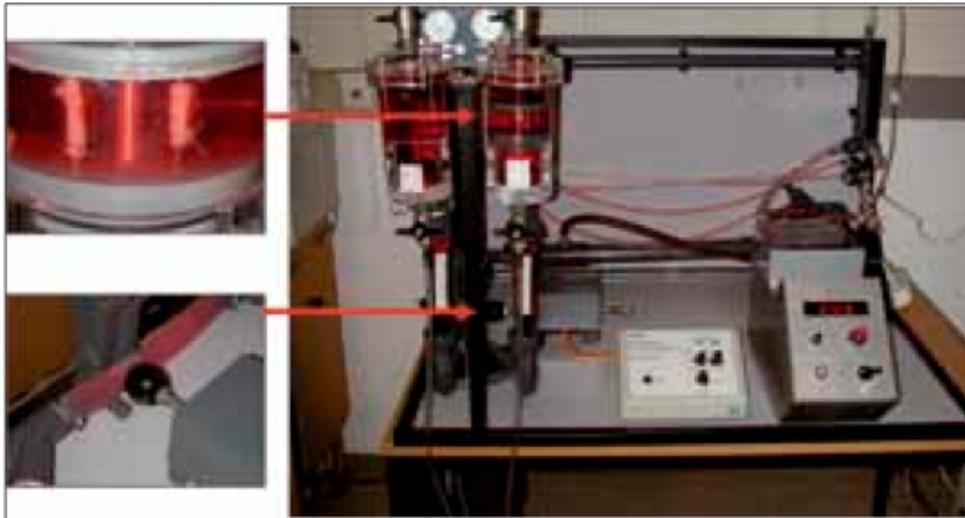
Durante la coltura, i vasi hanno aumentato il loro diametro, passando dal valore iniziale pari  $3.2 \pm 0.1$  mm, al valore di  $3.8 \pm 0.1$  mm al settimo giorno fino a raggiungere il valore di  $4.3 \pm 0.1$  mm misurato al giorno 14. Analisi morfometriche hanno mostrato un

spessore della tunica media diminuito rispetto al tessuto di controllo (Figura 2.32, a) e la formazione di neointima (Figura 2.32, b).



**Figura 2.32** a) Sopra: sezioni del vaso (colorazione con H/E) al giorno 0, 7 e 14 di coltura che mostrano una diminuzione dello spessore della media; Sotto: misura dello spessore della media. b) Sopra: sezioni del vaso (colorazione di van Gieson per le fibre elastiche) al giorno 0, 7 e 14 di coltura mostrano la presenza di IH sviluppata; Sotto: misura dello spessore dell'intima. (Adattato da [1]).

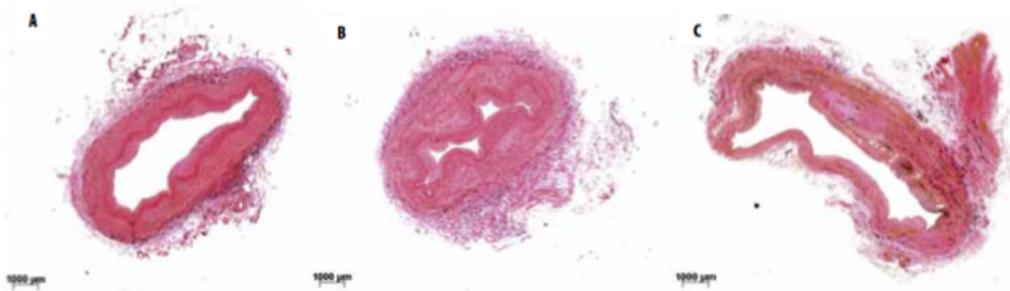
Il dispositivo di *organ culture* sviluppato da Voisard [36] costituisce un modello per lo studio dell'arterializzazione delle vene safene umane e favorisce una migliore comprensione degli eventi che si sviluppano nella parete del vaso esposto a condizioni di pulsazione arteriosa (Figura 2.33).



**Figura 2.33** Organ culture a perfusione con funzione Windkessel. La pressione pulsatile è ottenuta attraverso una pompa e un generatore di impulsi connessi in serie. Fino a quattro segmenti di vena sono fissati in parallelo e collegati al sistema di perfusione in anello chiuso costituito da tubi elastici.

Tratti di safena umana sono fissati in parallelo all'interno della camera di perfusione e collegati ad un sistema ad anello chiuso costituito da tubi elastici di diametri differenti atti a mimare l'azione Windkessel dell'albero arterioso. La pressione pulsatile è generata da una pompa e da un generatore di impulsi connesso in serie; il volume di priming dell'intero circuito è di 5 litri. I parametri in gioco durante i sette giorni dell'esperimento sono la pressione, pari a 130/80 mmHg, e la frequenza di pulsazione, pari a 80 bpm.

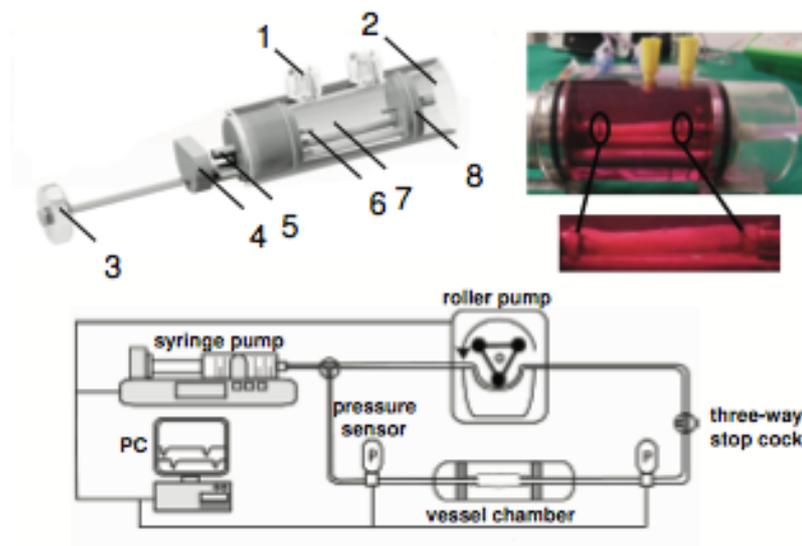
I risultati ottenuti mostrano che già a partire dal quarto giorno di esposizione all'ambiente arterioso sono stati rilevati segni di proliferazione cellulare, identificati attraverso l'anticorpo monoclonale anti-PCNA, e una diminuzione dello spessore della media, ottenuta mediante analisi morfometriche. Le SMCs e le ECs sono state identificate mediante anticorpi primari per l' $\alpha$ -actina e il fattore di von Willebrand, rispettivamente. La morfologia del tessuto a fine coltura è stata identificata attraverso la colorazione modificata di van Gieson (Figura 2.34).



**Figura 2.34** Sezioni istologiche di segmenti di vena safena umana ottenute in seguito alla colorazione modificata di van Gieson per le fibre elastiche. A) segmento al giorno 0 della coltura; B) segmento al giorno 7 della coltura in assenza di pulsatilità; C) segmento al giorno 7 della coltura con pressione pulsatile.

Più recentemente, Dummler [10] ha proposto un sistema di perfusione *ex vivo* che testasse la vitalità di campioni di vene safene umane esposti a condizioni fluidodinamiche arteriose e venose (Tabella 2.3) strettamente controllate. Inoltre, il sistema realizzato è adatto a identificare alterazioni nell'espressione genica e proteica indotte da differenti condizioni di perfusione.

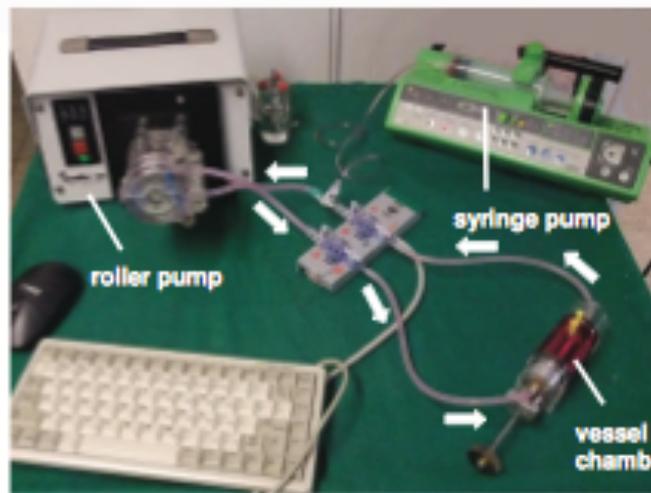
Il circuito (Figura 2.35, a) è costituito da una pompa peristaltica ISMATEC S2 (Wertheim, Germany), responsabile di un flusso pulsatile non stazionario, una pompa a siringa (MC Medizintechnik GmbH, Alzenau, Germany), in grado di mantenere le condizioni pressorie costanti, una camera di coltura in vetro, il tutto connesso mediante tubi in silicone.



**Figura 2.35** Componenti del sistema di perfusione *ex vivo*. 1) Port di ingresso del medium, 2) camera di coltura esterna in vetro, 3) unità che consente di regolare le unità mobili, 4) unità mobili, 5) connettore luer, 6) afferraggi per il vaso, 7) camera di coltura interna, 8) tappo della camera interna.

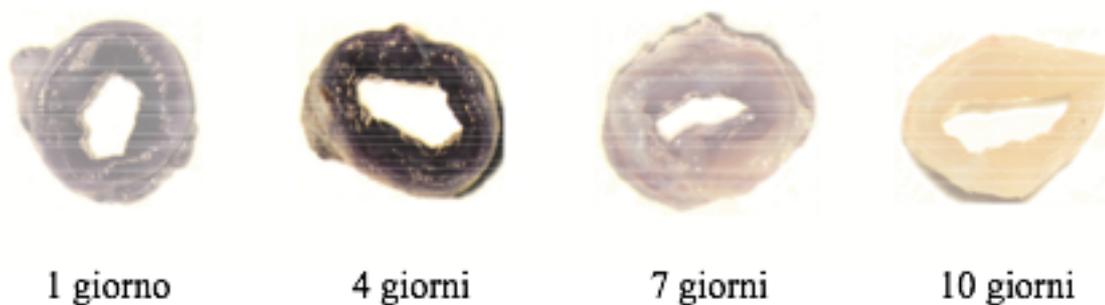
Le vene sono fissate su dei supporti conici in acciaio inossidabile AISI 316L mediante delle suture (Ethibond Vicryl 3-0, Ethicon GmbH, Norderstedt, Germany); è possibile alloggiare vasi di differente lunghezza e diametro per mezzo di unità mobili che, inoltre, mantengono il graft nelle medesime condizioni di lunghezza e tensione per l'intera durata dell'esperimento, pari a 7 giorni.

In Figura 2.36 è mostrata una foto del sistema assemblato.



**Figura 2.36** Foto del sistema assemblato.

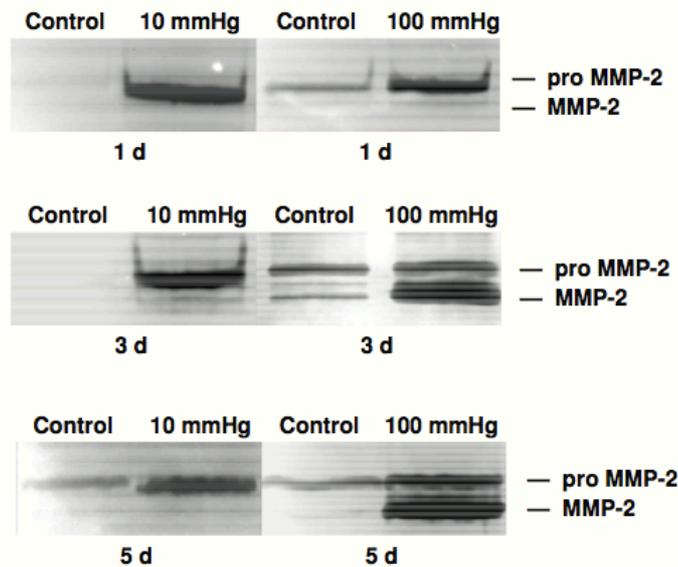
La vitalità dei campioni di vena safena è stata valutata mediante saggio MTT (Figura 2.37): quelli esposti a condizioni venose sono risultati vitali anche oltre 12 giorni di coltura; quelli sottoposti a condizioni arteriose non hanno resistito in vita per più di una settimana.



**Figura 2.37** Colorazione MTT di tratti di vena safena umana sottoposte a condizioni arteriose per diversi intervalli di tempo (Adattato da [10]).

La colorazione delle sezioni istologiche con H/E ha permesso di osservare un ispessimento a livello dello strato intimale del vaso già dopo tre giorni di perfusione arteriosa; in condizioni venose, invece, non sono stati riscontrati cambiamenti significativi a livello istologico.

Analisi zimografiche (Figura 2.38) hanno suggerito che l'attività della MMP-2 è significativamente aumentata in seguito all'esposizione all'ambiente arterioso.



**Figura 2.38** Analisi zimografica dell'attività della MMP-2 di tratti di vena safena umana sottoposti a coltura in condizioni venose (10 mmHg) e arteriose (100 mmHg). Il controllo rappresenta l'attività della MMP-2 in graft non perfusi. 1d, 3d, e 5d rappresentano rispettivamente i tempi di coltura pari a uno, tre e cinque giorni .

La Tabella 2.3 riassume i sistemi di coltura *ex vivo* a perfusione pulsatile descritti ed analizzati, indicando il campione biologico utilizzato, le condizioni fluidodinamiche imposte, la durata della coltura e il tipo di analisi istomorfologiche eseguite.

	Campione biologico	Condizioni fluidodinamiche e durata della coltura	Analisi istomorfologiche	Riferimento bibliografico
1	Vena safena umana	- Arteriose: Q=200 ml/min P= 100 mmHg Freq.pulsazione= 80 cps - Venose: Q=40 ml/min P= 20 mmHg Durata: 90 minuti	Marcatura con CD31	Golledge (1996)

2	Vena safena umana	Q= 100 ml/min P= 120/80 mmHg Durata: 24 ore	Marcatura con falloidina legata a rodamina	Labadie (1996)
3	Arteria carotide porcina	Q= 140 ml/min (stazionaria) Q= 170 ml/min (pulsatile) Durata: 48 ore	Colorazione H/E	Conklin (2000)
4	Vena safena porcina	- Venosa: Q= 10 ml/min P= 25 mmHg - Flusso elevato: Q= 40 ml/min P= 25 mmHg - Incremento pressorio a rampa: P=25→75 mmHg - Controllo in shear stress: $\tau = 1$ Pa - Bypass (pulsatile): Q= 85 ml/min P= 80 mmHg	- Saggio TUNEL - Marcatura per fattore VIII - Colorazione indirizzata alle fibre elastiche	Gusic (2005)
5	Vena safena umana	Q= 120 ml/min P= 80/40 mmHg $\tau = 0.9-1.5$ Pa Durata: 7, 14 giorni	- Colorazione H/E - Marcatura con CD31 e per l' $\alpha$ -actina	Saucy (2010)
6	Vena safena umana	P= 130/80 mmHg Frequenza di pulsazione= 80 bpm	- Colorazione modificata di van Gieson - Marcatura per l' $\alpha$ -actina e il fattore VIII	Voisard (2010)
8	Vena safena umana	- Arteriose: Q=50 ml/min P= 100 mmHg - Venose: Q=5 ml/min P= 10 mmHg Durata: 7, 12 giorni	- Colorazione H/E - Saggio MTT - Zimografia	Dummler (2011)

**Tabella 2.3** Tabella riassuntiva dei sistemi di coltura *ex vivo* a perfusione pulsatile di segmenti vascolari.

## 2.2. Conclusioni

L'analisi della letteratura ha mostrato l'esistenza di diversi sistemi di coltura *ex vivo* di segmenti vascolari che operano in differenti condizioni di esercizio.

I sistemi di *organ culture* statici hanno mostrato notevoli limitazioni in quanto non riproducono fedelmente l'ambiente fisiologico e causano pertanto un rimodellamento patologico dei campioni.

I setup che prevedono la perfusione di segmenti di vasi consentono di ottenere

risultati istomorfologici confrontabili con quanto riscontrato *in vivo* nel tratto vascolare venoso impiegato nel CABG. In particolare, condizioni di coltura caratterizzate da valori di portata, pressioni e shear stress elevati (tipici della circolazione arteriosa) inducono la formazione di neointima e il conseguente sviluppo di IH. I vasi sottoposti a condizioni di coltura tipiche dell'ambiente venoso (valori di portata, pressione e shear stress bassi), invece, non mostrano il verificarsi di questo fenomeno.

Pertanto, risulta evidente la necessità di indagare il ruolo della pulsatilità nel VGD.

A tal fine la progettazione di un nuovo sistema di *organ culture ex vivo* dovrà prevedere la possibilità di variare e controllare i parametri fluidodinamici in gioco al fine di riprodurre i *pattern* di stimolazione arteriosi a cui è soggetto il graft nelle applicazioni di CABG.

## Capitolo 3

### Progetto e realizzazione del sistema di coltura

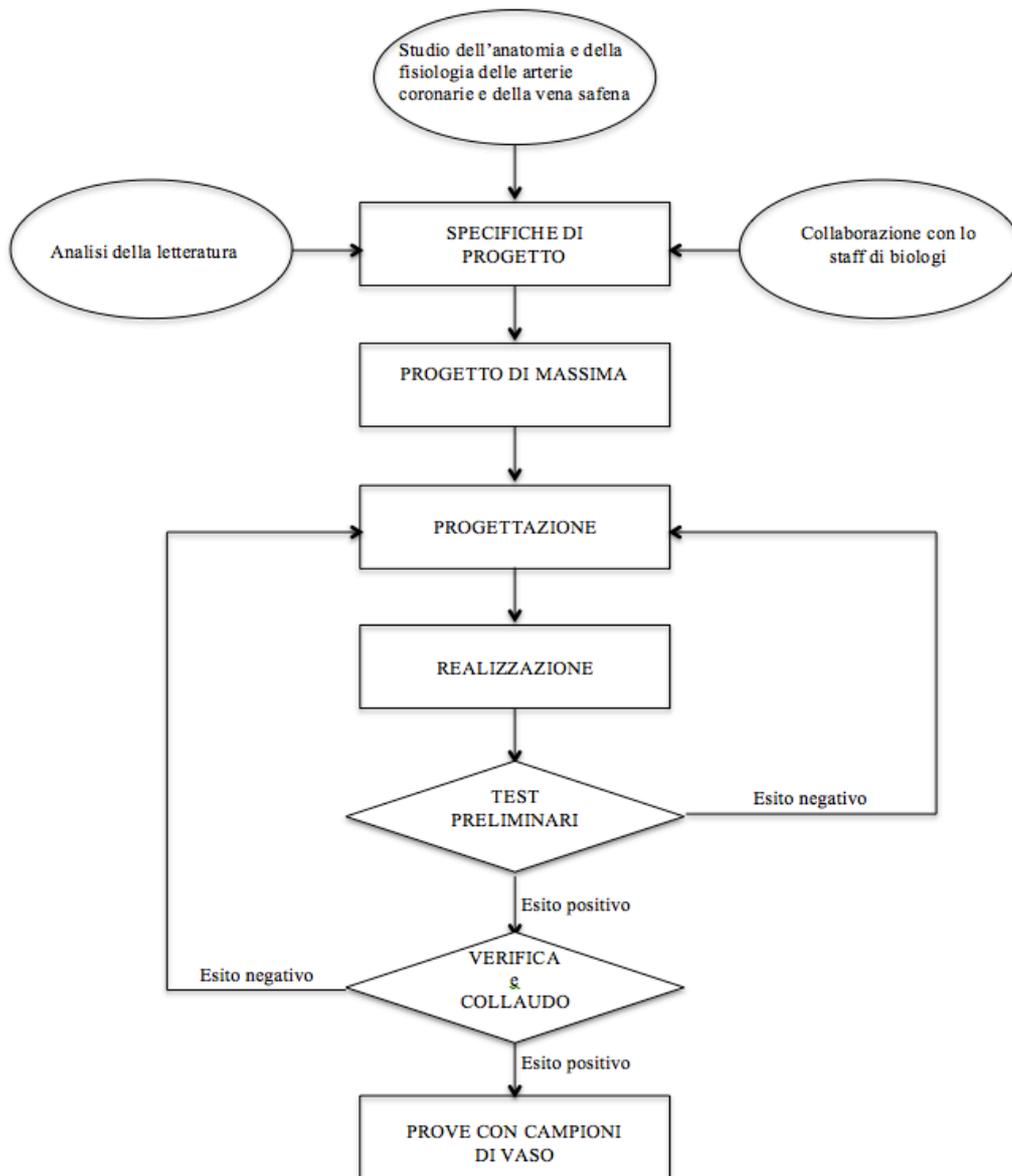
Il lavoro di tesi, svolto presso il Laboratorio di Micro e Biofluidodinamica Sperimentale ( $\mu$ BSLab) del Dipartimento di Bioingegneria del Politecnico di Milano, si inserisce all'interno di un progetto svolto in collaborazione con l'I.R.C.C.S. Centro Cardiologico Monzino, in particolare con il gruppo di ricerca del Laboratorio di Ingegneria Tissutale Cardiovascolare (LIT). L'obiettivo del progetto è quello di indagare il ruolo delle cellule staminali progenitrici della vena safena nel VGD. L'approccio metodologico seguito prevede di ricreare *ex vivo* i pattern di stimolazione pressoria arteriosa a cui è sottoposto *in vivo* il graft venoso. Si è focalizzata l'attenzione su questo tipo di stimolazione in quanto il differente range pressorio a cui è sottoposto il segmento venoso in seguito alla sua trasposizione in sede coronarica è ritenuto il principale responsabile del rimodellamento vascolare dello stesso.

A tal fine il contributo apportato con questo lavoro è consistito nella progettazione e nella realizzazione di un sistema per l'alloggiamento e la coltura di campioni di vena safena umana provenienti da soggetti sottoposti ad intervento di CABG. A questo è stato affiancato un lavoro di ottimizzazione dei pattern di stimolazione ottenibili per mezzo di componenti hardware e software già disponibili presso il  $\mu$ BSLab e finalizzati al controllo automatico del sistema.

Nel presente capitolo sarà illustrata la fase di progettazione e la successiva realizzazione del sistema di coltura *ex vivo*. Lo scopo è quello di ottenere un dispositivo funzionale e *user-friendly*.

Lo schema in Figura 3.1 mostra le fasi in cui si è articolata l'attività di progettazione e realizzazione del dispositivo. Il primo passo è stato quello di raccogliere informazioni sullo stato dell'arte dei sistemi di *organ culture* per vasi e studiare l'anatomia, la fisiologia e la fisiopatologia, nonché il comportamento biomeccanico delle arterie coronarie e della vena safena. Si è passati, poi, alla definizione dei parametri di progetto generali e specifici per l'applicazione in esame, a cui è seguito un progetto di massima in cui sono state delineate le caratteristiche più significative della soluzione progettuale. Il

passo successivo consiste nella vera e propria progettazione, quindi realizzazione dei prototipi. La verifica del dispositivo è stata effettuata in termini di collaudo idraulico e mantenimento della sterilità. Infine sono state condotte campagne sperimentali preliminari di stimolazione del vaso, utilizzando segmenti di vene safene umane provenienti dalla sala operatoria e destinati alla ricerca in quanto ritenuti prodotto di scarto, quindi non utilizzabili nelle applicazioni di CABG.



**Figura 3.1** Diagramma a blocchi che sintetizza le attività di progettazione e di sviluppo del sistema oggetto del presente lavoro di tesi.

### 3.1. Identificazione delle specifiche di progetto

L'analisi della letteratura ha permesso di delineare le specifiche generali tipiche di un sistema di coltura dinamica *ex vivo*. Esse sono:

- sterilizzabilità e biocompatibilità dei componenti; esse rappresentano dei requisiti fondamentali nelle applicazioni che prevedono la presenza di materiale biologico;
- mantenimento della pervietà del circuito e tenuta idraulica verso l'ambiente esterno al fine di evitare contaminazioni batteriche;
- facilità di montaggio sotto cappa e maneggevolezza;
- trasparenza del dispositivo per un controllo visivo delle alterazioni macroscopiche a livello del medium di coltura dovute ad eventuali contaminazioni;
- ingombro ridotto; compatibile con le esigenze di un laboratorio biologico e con l'utilizzo del sistema all'interno di un incubatore;
- facilità di ricambio del medium di coltura;
- facilità di verifica della funzionalità del sistema.

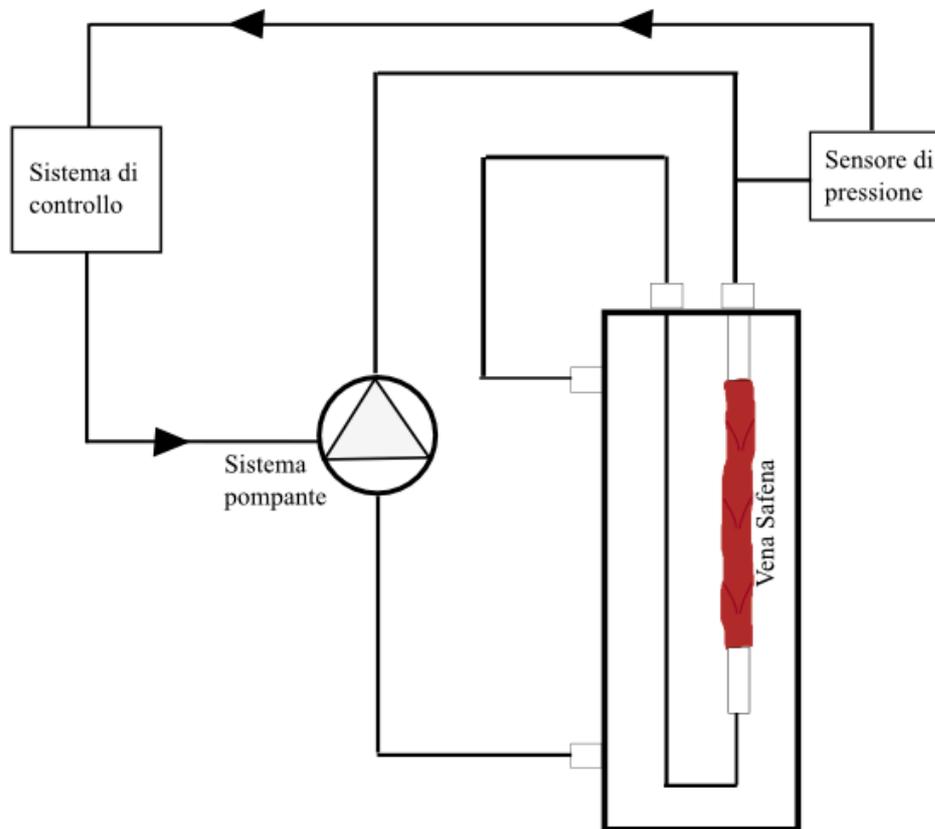
La stretta collaborazione con lo staff di biologi ha portato alla definizione di parametri di progetto specifici per l'applicazione in esame:

- ridotto volume di priming; in particolare è stato fissato un valore limite di 50 ml in modo da raggiungere un compromesso tra le esigenze progettuali e la necessità da parte del laboratorio di colture cellulari di contenere i costi relativi alle quantità di componenti e sostanze disciolte nel medium di coltura;
- versatilità del sistema; questa specifica prevede la possibilità di alloggiare segmenti di vena safena di lunghezza variabile entro un massimo di 7 cm e di diametro compreso tra i 2 e i 4 mm;
- facilità di posizionamento del campione biologico all'interno della camera di coltura;
- stabilità del campione biologico nel tempo e mantenimento in vita dello stesso; a tal fine è necessario garantire un adeguato trasporto di massa al tessuto ( $O_2$  e nutrienti) attraverso il ricircolo del medium di coltura;
- ricreare le condizioni tipiche dell'ambiente arterioso coronarico *in vivo* con particolare riferimento allo stimolo pressorio imposto al segmento di vena safena (80÷120

mmHg). Esso infatti risulta avere un ruolo dominante rispetto al complesso di sollecitazioni presenti.

### 3.2. Progetto di massima

A partire dalle specifiche sopra esaminate, è stato sviluppato un progetto di massima come schema di principio. Il set-up è composto da una camera di coltura e da un circuito per la stimolazione del vaso. La Figura 3.2 mostra una rappresentazione schematica dell'intero sistema.



**Figura 3.2** Schema rappresentativo della camera di coltura e del circuito di stimolazione. La camera di coltura alloggia al suo interno un segmento di vena safena umana e presenta degli accessi che la mettono in comunicazione con il circuito di stimolazione. Quest'ultimo è costituito da un sistema idraulico (sistema pompante circuito di movimentazione del medium) e da un sottosistema di controllo.

La camera di coltura è costituita da una camera esterna e da un telaio portavaso. La camera esterna delimita il volume in cui avviene la coltura vera e propria e contiene al suo interno il telaio portavaso. Essa svolge anche la funzione di riserva di medium per l'intero circuito e presenta due accessi per il passaggio in ingresso e in uscita del medium.

In questa fase sono state considerate due alternative progettuali: una che prevedesse una riserva chiusa, garantendo l'isolamento della camera di coltura dall'ambiente esterno; l'altra, caratterizzata dalla presenza di un canale di comunicazione con l'esterno, dotato di un filtro antibatterico, così da imporre la pressione atmosferica all'interno della riserva, che evitasse la presenza di pressioni indesiderate all'interno del sistema.

Il telaio portavaso ha la funzione di alloggiare i segmenti venosi calzandoli su appositi connettori. Questi ultimi devono anche consentire la perfusione del vaso.

Il circuito di stimolazione è costituito da un sottosistema idraulico (sistema pompante e circuiteria di raccordo) e da un sottosistema di controllo.

Il sistema pompante deve essere in grado di fornire una sollecitazione pressoria al campione vascolare alloggiato nel sistema di coltura ed essere controllato, tramite l'apposito sottosistema di controllo, in base alla pressione sviluppata nel campione stesso. Tale pressione è monitorata da un sensore collocato a monte del vaso, in un punto del circuito sufficientemente vicino al vaso stesso.

Le connessioni tra i vari elementi del sistema sono realizzate con tubi in silicone, permeabili ai gas, le cui caratteristiche geometriche sono oggetto di dimensionamento.

### **3.3. Progettazione e realizzazione della camera di coltura**

L'attività di progettazione, svolta interamente utilizzando per la modellazione 3D il software CAD 3D Pro/ENGINEER Wildfire 4.0 (Parametric Technology Corporation, PTC), ha portato alla realizzazione di due prototipi a diverso grado di ottimizzazione. Questi sono stati testati e valutati insieme ai biologi, collaboratori nella stesura delle specifiche, utilizzatori finali del dispositivo.

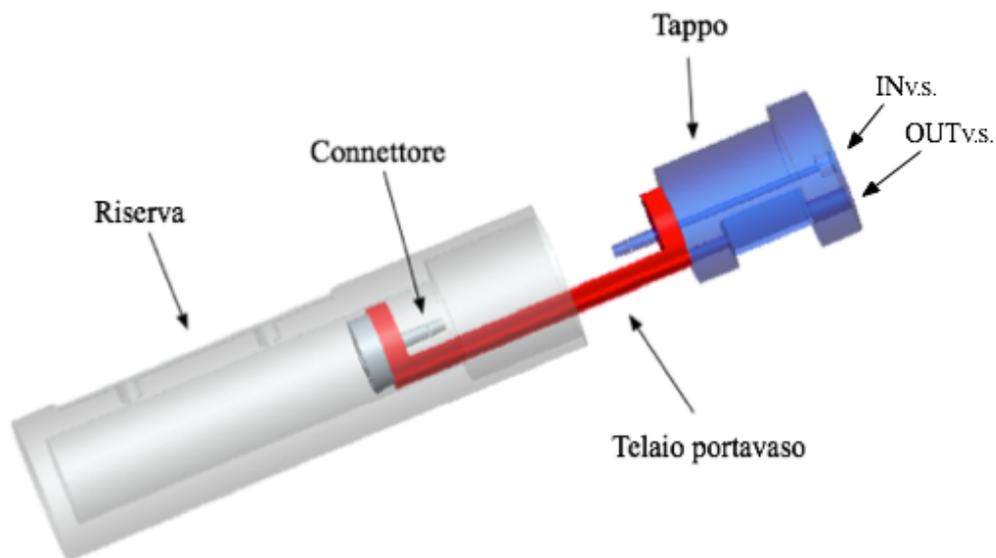
#### **3.3.1. Scelta dei materiali**

Per soddisfare le specifiche di progetto il materiale da utilizzare per la realizzazione della camera di coltura deve essere biocompatibile e sterilizzabile, deve possedere una buona trasparenza e deve essere facilmente lavorabile alle macchine utensili. Pertanto la scelta è ricaduta sul polimetilmetacrilato (PMMA, Plasting S.r.l., Segrate, Italia) in quanto esso:

- permette di essere sottoposto a diversi cicli di sterilizzazione in ossido di etilene (EtO) senza rilasciare residui tossici per i tessuti biologici, mantenendo inalterate le proprie caratteristiche meccaniche;
- presenta un ottimo grado di trasparenza, consentendo un'ispezione visiva della coltura all'interno della camera;
- ha un costo relativamente contenuto;
- risulta facilmente lavorabile alle macchine utensili disponibili presso il Laboratorio di Prototipazione del  $\mu$ BSLab.

### 3.3.2. Prototipo 0

In accordo con il progetto di massima sopra descritto, è stato possibile definire la prima soluzione progettuale. In Figura 3.3 è riportato il disegno CAD di insieme del prototipo 0 parzialmente assemblato.

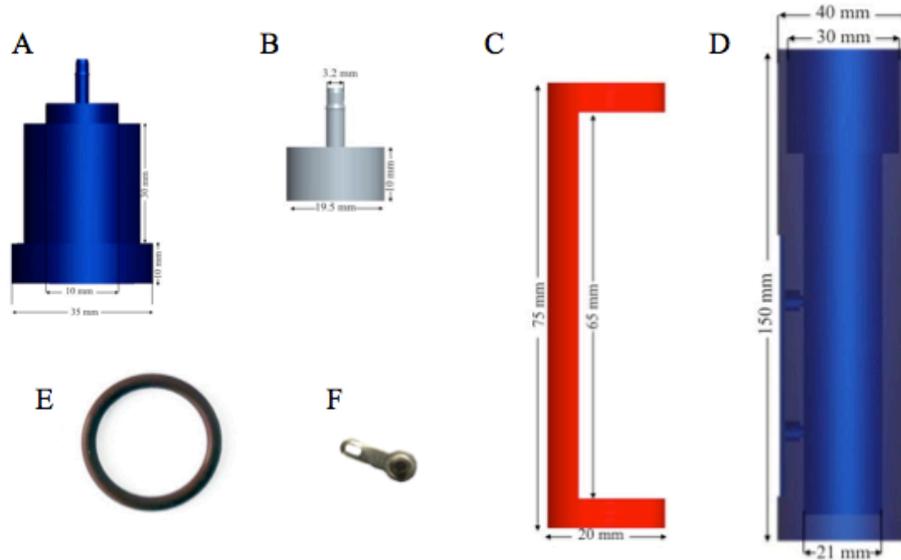


**Figura 3.3** Disegno CAD del prototipo 0 parzialmente assemblato. In esso si distinguono: il tappo, il telaio portavaso, il connettore e la riserva. Sono inoltre indicati gli accessi per l'ingresso ( $IN_{v.s.}$ ) e l'uscita ( $OUT_{v.s.}$ ) del medium dal segmento di vena safena presenti sul tappo.

Come mostrato in Figura 3.3, il prototipo 0 consta di una riserva, un telaio portavaso e un tappo predisposto ad accoppiarsi a quest'ultimo; tutti gli elementi possiedono geometria cilindrica. Sono inoltre presenti due connettori progettati al fine di ancorare il segmento di

vena safena all'interno del telaio: il primo è integrato nel tappo (Figura 3.4, A), il secondo è un elemento a sè stante (Figura 3.4, B).

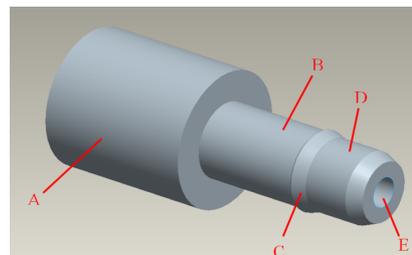
In Figura 3.4 sono rappresentati i componenti del prototipo 0. Per i disegni tecnici si faccia riferimento all'APPENDICE A.



**Figura 3.4** Rappresentazione dei componenti del prototipo 0: A) tappo con connettore integrato; B) connettore; C) telaio portavaso; D) riserva; E) O-ring in gomma nitrilica; F) aletta metallica.

Il telaio portavaso (Figura 3.4, C) presenta un intaglio con profilo rettangolare dimensionato *ad hoc* per permettere l'alloggiamento del vaso al suo interno. Sul telaio è inoltre presente una sede all'interno della quale è posizionato il connettore B.

Come mostrato in Figura 3.5, ogni connettore è composto da una serie di cilindri concentrici di diametri esterni differenti, attraversati da un foro passante che permette la circolazione del medium all'interno del segmento di vena safena. La sporgenza centrale (C, in Figura 3.5) evita lo scivolamento del vaso.



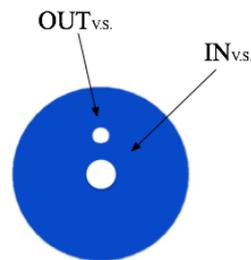
**Figura 3.5** Disegno CAD di un connettore per l'ancoraggio dei vasi di diametro interno pari a 3.2 mm. Esso è composto da una serie di cilindri concentrici di diametro esterno ( $D_e$ ) e lunghezze ( $L$ ) differenti: (A)  $D_e=19.5$  mm,  $L=10$  mm; (B)  $D_e=3.4$  mm,  $L=6$  mm; (C)  $D_e=3.8$  mm,  $L=1$  mm; (D)  $D_e=3.2$  mm,  $L=2$  mm. Il foro passante (E) ha diametro pari a 1.5 mm.

Il connettore B (Figura 3.4, B) presenta nel cilindro A un foro filettato di diametro 5.5 mm nel quale è avvitato un connettore luer connesso ad portagomma, entrambi in polipropilene (Cole Parmer Instrument Company, Vernon Hills, IL, USA) (Figura 3.6).



**Figura 3.6** Particolare del portavaso in cui è mostrato il connettore B su cui è avvitato un connettore luer connesso ad un portagomma, entrambi in polipropilene. Su di esso è calzato il tubo in silicone che connette l'uscita del vaso al resto del circuito.

Sul portagomma è calzato un tubo in silicone (di diametro interno pari a 1.6 mm e spessore pari a 0.8 mm), vincolato a passare all'interno di una scanalatura longitudinale presente nel telaio portavaso. In particolare, il tubo è incollato nella scanalatura e fatto passare attraverso il foro apposito ricavato sul tappo (foro  $OUT_{vs.}$  in Figura 3.7). L'apposizione di silicone Sylgard 184 (Dow Corning S.A., Belgio) nell'intercapedine presente tra il foro e il tubo permettere a quest'ultimo di rimanere in sede e, inoltre, evita eventuali trafiletti di fluido.

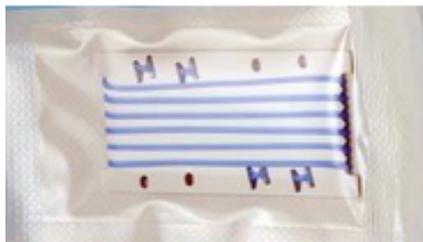


**Figura 3.7** Vista frontale del tappo. Rappresentazione dei fori presenti sulla superficie esterna del tappo e all'interno dei quali sono fatti passare i tubi in silicone.  $IN_{vs.}$  indica il foro in cui è avvitato il connettore luer che consente l'ingresso del medium all'interno del vaso;  $OUT_{vs.}$  indica il foro in cui è fatto passare il tubo connesso all'uscita del vaso.

Il tappo (Figura 3.4, A) è incollato al portavaso mediante colla acrilica liquida (Plasting). Su di esso sono presenti due fori: uno, filettato, di diametro 5.5 mm, in cui è avvitato un connettore luer per consentire l'ingresso del medium nel vaso (indicato in

Figura 3.7 con  $IN_{V,S}$ ); l'altro, di diametro pari a 3.5 mm, attraverso il quale è fatto passare il tubo connesso all'uscita del vaso (indicato in Figura 3.7 con  $OUT_{V,S}$ ).

Il segmento di vena safena, calzato sui connettori, è fissato su di essi mediante un *vessel loop* (Tecnokit S.r.l., Milano, Italia) (Figura 3.8), ovvero un filo in silicone flessibile ed estensibile elasticamente. Esso permette di vincolare il segmento vascolare in maniera non rigida grazie alle sue proprietà meccaniche che gli permettono di adattarsi alle imperfezioni e ai cambiamenti morfologici del tessuto. Due alette metalliche, inserite all'interno di fori ricavati sulla superficie laterale del telaio portavaso in corrispondenza di ciascun connettore, consentono l'aggancio stabile del *vessel loop*.



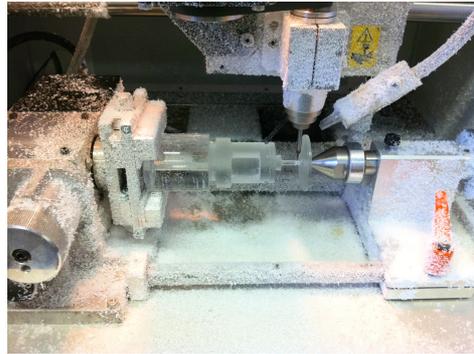
**Figura 3.8** *Vessel loop*. È un prodotto già sterile utilizzato in chirurgia per eseguire il clampaggio temporaneo o lo spostamento di vene e arterie senza danneggiarle. In commercio sono presenti diverse taglie.

La riserva (Figura 3.4, D) presenta internamente una cavità cilindrica tale da permettere l'accoppiamento con il complesso tappo/telaio portavaso realizzato per mezzo di un O-ring NORMATEC® in gomma nitrilica (NBR) (Angst+Pfister, Zurigo, Svizzera), posto in un'apposita cava ricavata sul tappo. La riserva è caratterizzata da un volume di riempimento pari a 50 ml; sulla sua superficie esterna sono presenti due fori (diametro pari a 5.5 mm) per alloggiare i connettori luer che mettono in comunicazione la camera di coltura con il resto del circuito. In questa soluzione progettuale la riserva non è stata prevista a pressione atmosferica in quanto si è voluto privilegiare l'aspetto dell'isolamento della stessa dall'ambiente esterno.

### 3.3.2.1. Realizzazione del prototipo 0

I componenti del prototipo 0 sono stati interamente realizzati presso il Laboratorio di Prototipazione del  $\mu$ BSLab.

Il tappo, il telaio portavaso e i connettori per l'alloggiamento del vaso sono stati realizzati utilizzando una fresa a controllo numerico (Modela MDX-40, Roland DG Corporation, Giappone) (Figura 3.9), mentre per la riserva è stato utilizzato un tornio parallelo (OPTI D 240x500 G-Vario, Optimum, Germania).



**Figura 3.9** Realizzazione dei componenti della camera di coltura; la lavorazione alla fresatrice avviene per asportazione di materiale a partire da una barra cilindrica di diametro pari a 35 mm. Questa fase prevede l'utilizzo del "quarto asse" rotatorio che consente di ottenere una fresatura, non solo lungo gli assi X, Y e Z, ma anche in rotazione.

In questa fase sono stati ottenuti tre esemplari della camera di coltura. La Figura 3.10 mostra uno dei dispositivi realizzati.



**Figura 3.10** Foto in cui sono mostrati i componenti del prototipo 0. In alto è possibile osservare la riserva con i due connettori luer avvitati. In basso è mostrato l'insieme tappo/telaio portavaso; è possibile individuare il circuito in uscita dal vaso vincolato a passare attraverso la scanalatura ricavata nel telaio portavaso e il foro presente sul tappo.

### 3.3.2.2. Analisi del prototipo 0: rispondenza alle specifiche

Il prototipo 0 soddisfa le specifiche di progetto delineate precedentemente soprattutto in termini di lavorabilità, trasparenza e sterilizzabilità.

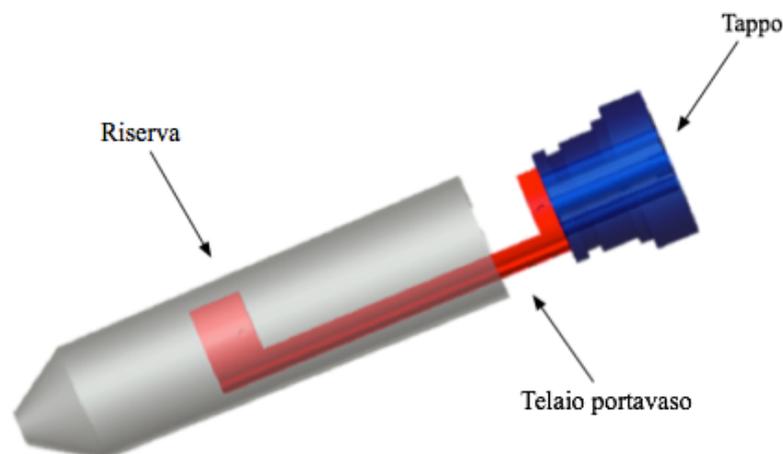
Sono state riscontrate, tuttavia, delle difficoltà in fase di assemblaggio del dispositivo in quanto esso è risultato eccessivamente condizionato dall'univocità di accoppiamento tra un esemplare di telaio portavaso e la corrispondente riserva. Ciò è dovuto all'utilizzo di macchine utensili non di precisione per la realizzazione dei pezzi che pertanto sono caratterizzati da una certa variabilità tra un esemplare e l'altro.

La fase di ricambio del medium inoltre è stata resa critica dall'assenza di un pelo libero all'interno della riserva. Infatti, le operazioni di prelievo possono generare una depressione all'interno della riserva provocando degli effetti indesiderati all'eventuale segmento di vena safena alloggiato al suo interno e possibile perdita della tenuta stagna e conseguente ingresso di batteri dall'ambiente esterno.

Sono stati, inoltre, riscontrati dei trafileamenti di liquido attraverso i connettori presenti sulla riserva dovuti ad un errato avvvitamento degli stessi nelle apposite sedi.

### 3.3.3. Prototipo 1

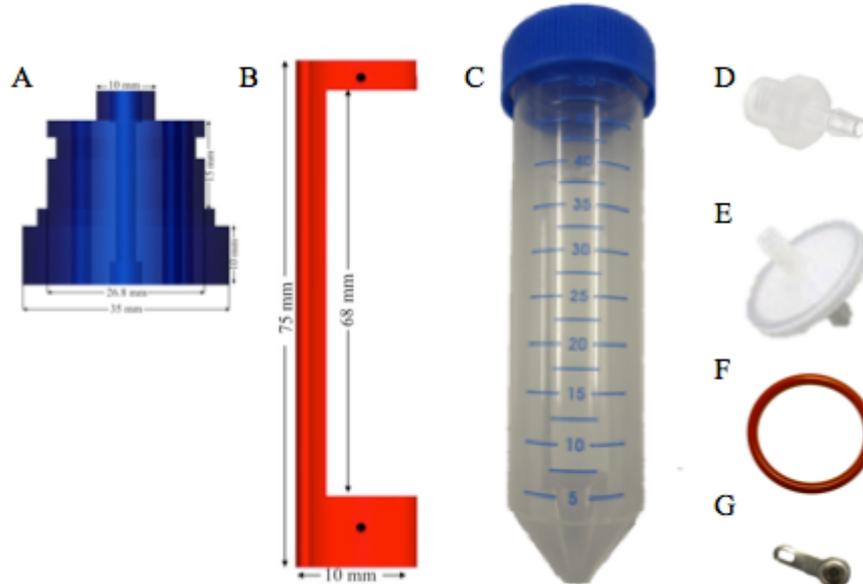
Per ovviare alle limitazioni riscontrate nel collaudo del prototipo 0, si è resa necessaria la progettazione di un nuovo dispositivo. In Figura 3.11 è riportato il disegno CAD di insieme del prototipo 1 parzialmente assemblato.



**Figura 3.11** Disegno CAD del prototipo 1 parzialmente assemblato. In esso si distinguono: il tappo, il telaio portavaso e la riserva.

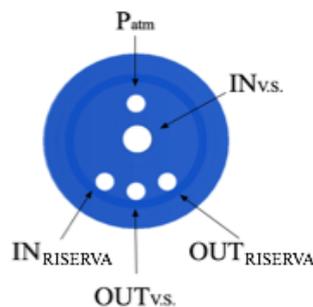
Il nuovo prototipo prevede l'utilizzo di una diversa riserva al fine di evitare i problemi di trafileamento di liquido sopra descritti. In questa versione la riserva è costituita da una Falcon da 50 ml (International P.B.I. S.P.A, Milano, Italia) privata del suo tappo convenzionale. In virtù di questa scelta, si è reso necessario spostare gli accessi per l'ingresso e l'uscita del medium dalla riserva, presenti sulla superficie della stessa ne precedente prototipo, e collocarli in una nuova sede. Da ciò è derivata la necessità di riprogettare il tappo al fine di adattarlo alle nuove esigenze. In questa nuova soluzione progettuale si è deciso inoltre di imporre la pressione atmosferica all'interno della riserva attraverso un ulteriore accesso presente sul tappo.

Rispetto al prototipo precedente sono stati conservati, in quanto risultati funzionali, l'accoppiamento tappo/telaio portavaso realizzato mediante incollaggio e l'accoppiamento telaio portavaso/riserva. Quest'ultimo, nel prototipo 1, è ottenuto mediante un O-ring in silicone (Angst+Pfister). In Figura 3.12 sono rappresentati i componenti della nuova soluzione progettuale. Per i disegni tecnici si faccia riferimento all'APPENDICE A.



**Figura 3.12** Rappresentazione dei componenti del prototipo 1. A) tappo; B) telaio portavaso; C) Falcon da 50 ml; D) connettore commerciale; E) filtro HEPA; F) O-ring in silicone; G) aletta metallica.

Le dimensioni del nuovo tappo e del telaio portavaso sono state adattate alla nuova riserva. Il tappo, come mostrato in Figura 3.13, presenta sulla sua superficie esterna cinque fori: due per l'ingresso e l'uscita del medium dal vaso, indicati rispettivamente con  $IN_{V.S.}$  e  $OUT_{V.S.}$ ; due per l'ingresso e l'uscita del medium dalla riserva, indicati con  $IN_{RISERVA}$  e  $OUT_{RISERVA}$ ; uno che garantisce la presenza di un pelo libero (a pressione atmosferica) all'interno della riserva (indicato in Figura 3.13 con  $P_{atm}$ ). In corrispondenza del port  $P_{atm}$  è previsto il montaggio di un filtro HEPA che ha la funzione di bloccare l'ingresso di agenti contaminanti pur permettendo il passaggio di gas (ossigeno e anidride carbonica) attraverso i pori della membrana filtrante di dimensioni pari a  $0.2 \mu m$ .

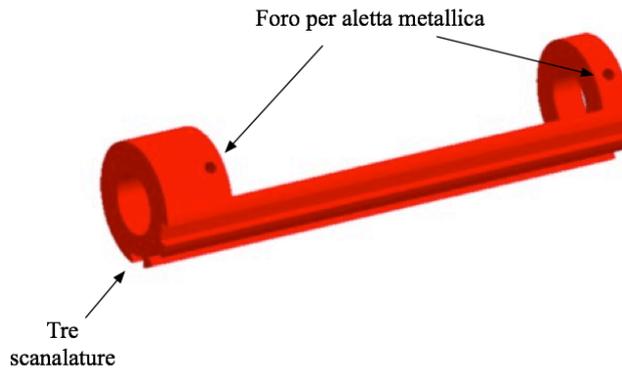


**Figura 3.13** Vista frontale del tappo. Rappresentazione schematica dei fori presenti sulla superficie esterna del tappo e all'interno dei quali sono fatti passare i tubi in silicone.  $P_{atm}$  rappresenta il port a pressione atmosferica;  $IN_{V.S.}$  e  $OUT_{V.S.}$  rappresentano rispettivamente i fori per l'ingresso e l'uscita del medium dal vaso;  $IN_{RISERVA}$  e  $OUT_{RISERVA}$  indicano l'ingresso e l'uscita del medium dalla riserva.

L'alloggiamento del vaso nel telaio portavaso è ottenuto mediante due connettori in polipropilene reperibili commercialmente e intercambiabili (codice S220-6, diametro interno pari 2.2 mm, Cole Parmer) (Figura 3.12, D). L'inserimento del segmento di vena è facilitato dalla presenza di un profilo tronco-conico su un'estremità del connettore. L'altra estremità presenta un attacco filettato che ne permette l'avvitamento su appositi fori (diametro pari a 5.5 mm) ricavati sul tappo e sul telaio.

Analogamente al prototipo 0, il vaso è alloggiato nell'intaglio ricavato nel telaio e il circuito in uscita da esso si realizza mediante un tubo in silicone calzato su un portagomma in polipropilene (Cole Parmer) avvitato sul telaio stesso. Su di esso, inoltre, in corrispondenza dei fori presenti sul tappo, sono ricavate tre scanalature longitudinali con sezione rettangolare che ospitano i due tubi di ingresso e uscita di medium dalla riserva e il

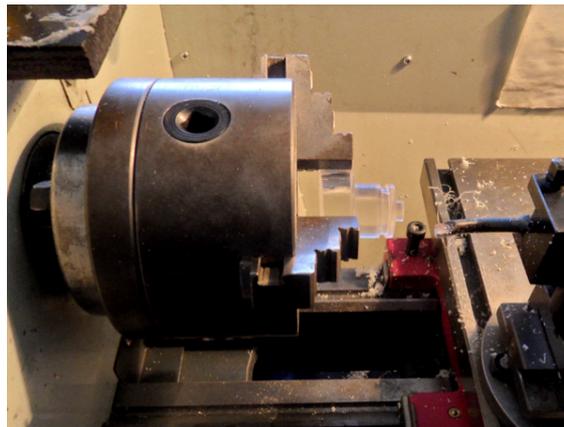
tubo in uscita dal vaso (Figura 3.14). Anche in questo caso, i tubi sono incollati nelle scanalature e nelle intercapedini tra i fori presenti sul tappo e i tubi è apposto del silicone Sylgard 184 (Dow Corning).



**Figura 3.14** Disegno CAD del telaio portavaso. Si possono notare le tre scanalature a sezione rettangolare in cui sono incollati i tubi di ingresso e uscita di medium dalla riserva e il tubo in uscita del vaso. Sono visibili anche i fori che ospitano le alette metalliche per il bloccaggio del vessel loop.

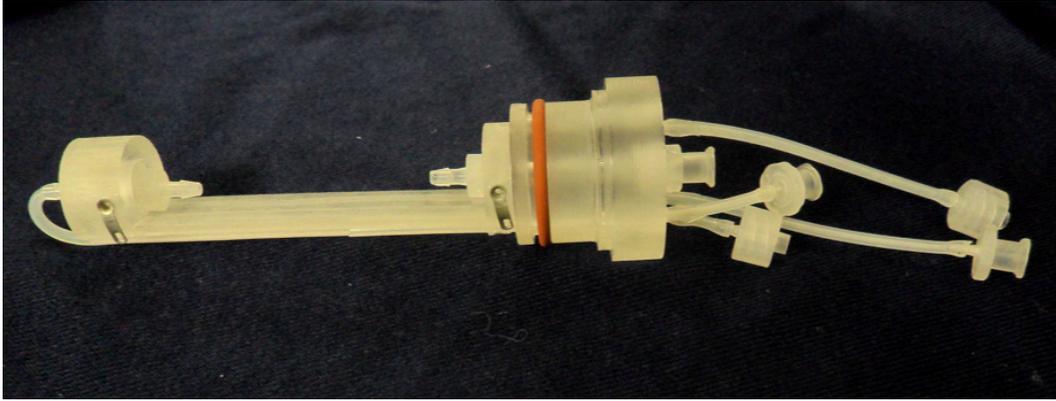
### 3.3.3.1. Realizzazione del prototipo 1

Analogamente al prototipo 0, il telaio portavaso è stato realizzato mediante la fresa a controllo numerico Modela MDX-40. Il tappo è stato lavorato al tornio parallelo (Figura 3.15) ad eccezione dei fori anch'essi realizzati con la fresatrice.



**Figura 3.15** Realizzazione dei componenti della camera di coltura; la lavorazione effettuata al tornio parallelo prevede l'asportazione di materiale a partire da una barra cilindrica di diametro pari a 30 mm.

Questa fase ha portato alla realizzazione di quattro esemplari del sistema; la Figura 3.16 mostra un componente ottenuto dall'accoppiamento tappo/telaio portavaso.



**Figura 3.16** Foto di un componente ottenuto dall'accoppiamento tappo/telaio portavaso del prototipo 1.

### **3.3.3.2. Analisi del prototipo 1: rispondenza alle specifiche**

Il prototipo 1 ha superato le limitazioni riscontrate nel prototipo precedente. La lavorazione è risultata più semplice e ha richiesto un minore tempo macchina in quanto i connettori e la riserva sono prodotti commerciali. Inoltre la Falcon ha il vantaggio di avere dimensioni standard, essere un prodotto già sterile e già disponibile presso il laboratorio LIT del Monzino.

Infine, le operazioni di montaggio sotto cappa sono risultate più semplici e più rapide grazie alla maneggevolezza della Falcon rispetto alla riserva in PMMA. La nuova riserva infatti è risultata essere più agevole in quanto più leggera, di dimensioni più contenute e priva di connettori di ingresso/uscita del medium sulla sua superficie.

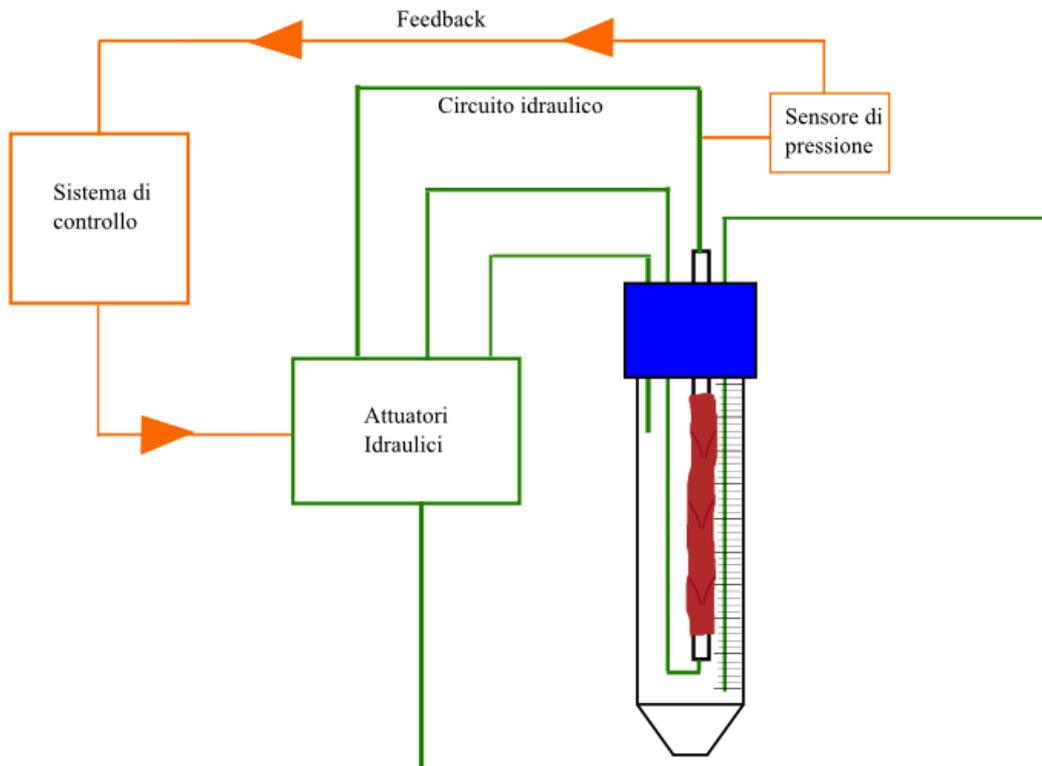
## **3.4. Progettazione e realizzazione del circuito di stimolazione**

La progettazione e la realizzazione del circuito di stimolazione sono necessarie al fine di riprodurre i pattern di stimolazione pressoria arteriosa a cui è sottoposto *in vivo* il segmento di vena safena quando utilizzato come sostituto coronarico negli interventi di CABG. In particolare, occorre stimolare opportunamente il segmento di vena safena alloggiato all'interno della camera di coltura. Nell'applicazione in esame ci si propone di fornire al vaso una pulsazione ciclica tale da produrre un andamento di pressione oscillante (ad esempio fra 80 e 120 mmHg) e di garantire ad esso un sufficiente apporto di nutrienti e ossigeno mediante una fase di ricircolo del medium da alternare alla fase di stimolazione.

Il circuito di stimolazione, che si dovrà interfacciare con la camera di coltura (descritta nel paragrafo 3.3.3), consta di:

- un sottosistema idraulico (descritto nel paragrafo 3.4.1), in grado di applicare al segmento di vena safena una sollecitazione pressoria e di permettere la circolazione del medium per mezzo di attuatori idraulici opportunamente scelti;
- un sottosistema di monitoraggio e controllo (descritto nel paragrafo 3.4.2), comprendente la componentistica hardware e software, in grado di controllare opportunamente gli attuatori idraulici, in modo da fornire gli stimoli pressori adeguati al segmento di vaso ed effettuare il ricircolo del medium.

In Figura 3.17 è mostrata una schematizzazione del circuito di stimolazione che si intende realizzare.

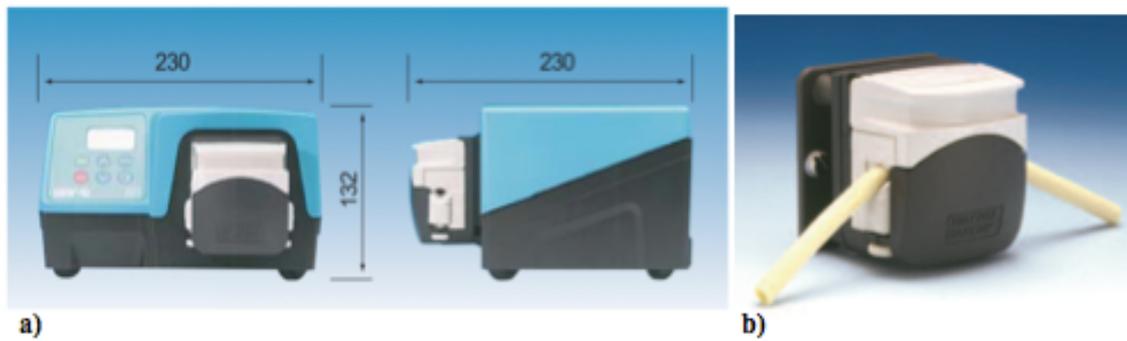


**Figura 3.17** Schematizzazione del sistema. Si distinguono la camera di coltura, contenente il segmento di vena safena, il circuito idraulico e il sistema di controllo.

### 3.4.1. Sottosistema idraulico

Il sottosistema idraulico è costituito da un sistema pompante e dalla circuiteria di raccordo in silicone.

Il sistema pompante è rappresentato da una pompa peristaltica; per l'applicazione è stata scelta la pompa Watson-Marlow 323Du (Watson Marlow Group, UK) (Figura 3.18, a) con testa pompante 314D a quattro rulli (Watson Marlow) (Figura 3.18, b) che soddisfa la necessità di preservare la sterilità all'interno del sistema di coltura. Il tubo sottopompa utilizzato è in PharMed BPT<sup>®</sup> (Carlo Erba Reagenti) con diametro interno di 1.6 mm e spessore della parete pari a 0.8 mm. La scelta è ricaduta su questo materiale in quanto risulta essere più resistente e durevole rispetto ai tubi sottopompa in silicone nei confronti delle sollecitazioni meccaniche esercitate dai rulli della pompa, evitando quindi il verificarsi del fenomeno della spallazione.



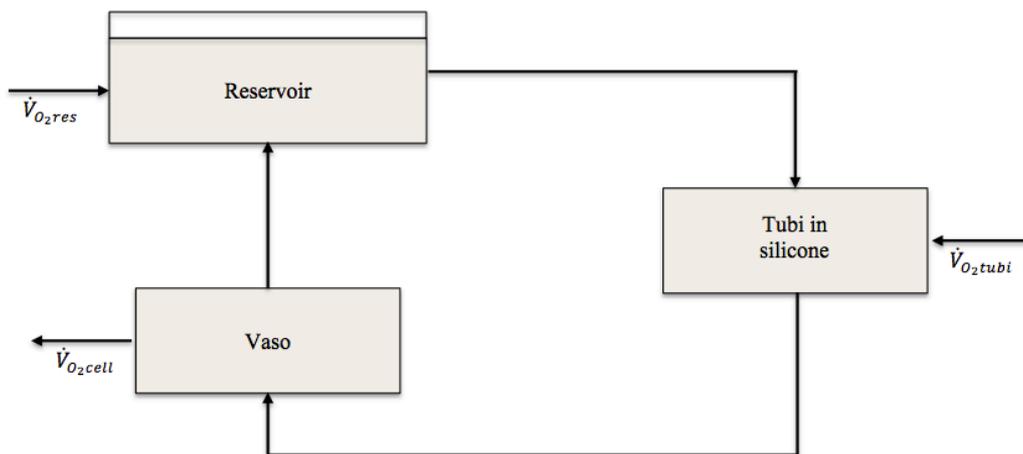
**Figura 3.18** a) Fotografia della pompa peristaltica 323Du della Watson Marlow con le dimensioni espresse in [mm]; b) Particolare della testa pompante 314D a quattro rulli.

La circuiteria è realizzata mediante tubi in silicone Platinum Cured (Cole Parmer) con diametro interno di 1.6 mm e spessore pari a 0.8 mm (Cole Parmer). Sono inoltre presenti due tratti con un diametro interno di 0.8 mm ed uno spessore della parete di 0.8 mm necessari a garantire l'apporto di ossigeno al segmento di vaso (come verrà descritto nel paragrafo 3.4.1.1). La scelta di utilizzare tubi di diametri differenti risiede nella necessità di contenere le perdite di carico e sarà ampiamente discussa nel paragrafo 3.4.2.1. I tubi in silicone e il sottopompa sono autoclavabili oppure sterilizzabili in ossido di etilene (EtO). Le connessioni tra le varie parti del circuito sono realizzate per mezzo di connettori di tipo luer autoclavabili o sterilizzabili in EtO (Cole Parmer) con diametro interno di 1.6 mm in polipropilene.

### 3.4.1.1. Dimensionamento del circuito idraulico

Al fine di fornire il corretto apporto di ossigeno al tessuto vascolare, di soddisfare la specifica di progetto di ingombro ridotto del dispositivo e di contenere le perdite di carico (vedi paragrafo 3.4.2.1) è stato necessario definire un opportuno dimensionamento del circuito idraulico. L'obiettivo è quello di determinare la lunghezza minima della circuiteria in silicone che garantisca livelli di ossigeno disciolto nel medium adeguati per la sopravvivenza delle cellule del segmento di vena safena alloggiato nel sistema di coltura. Bisogna tenere presente che l'intero sistema di coltura è posizionato all'interno di un incubatore il quale è caratterizzato da un'atmosfera controllata in termini di temperatura, pari a 37 °C, umidità e pressione parziale di CO<sub>2</sub>, pari al 5%. Tale valore comporta una concentrazione di ossigeno pari al 18.6% corrispondente ad una pressione parziale di 141 mmHg.

La Figura 3.19 mostra una rappresentazione schematica del circuito in cui fluisce il medium di coltura; è possibile individuare tre zone in cui avvengono gli scambi: il tratto di vaso, il reservoir e i tubi in silicone permeabili al gas.



**Figura 3.19** Rappresentazione schematica delle tre zone del circuito in cui avvengono gli scambi di O<sub>2</sub>.  $\dot{V}_{O_2 cell}$  indica il consumo di ossigeno da parte delle cellule vascolari,  $\dot{V}_{O_2 res}$  indica lo scambio di ossigeno attraverso il pelo libero del reservoir e  $\dot{V}_{O_2 tubi}$  rappresenta lo scambio attraverso i tubi in silicone.

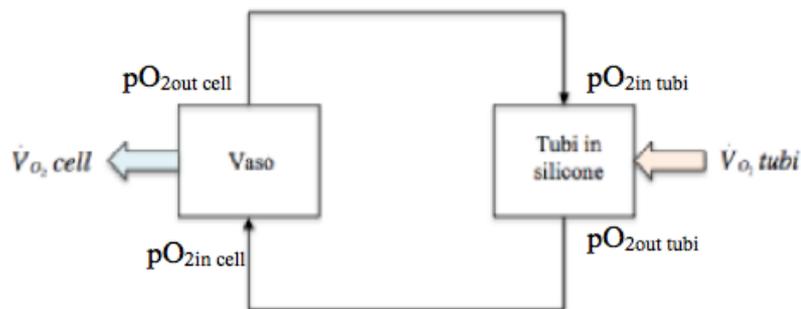
Le cellule del vaso consumano O<sub>2</sub> (consumo indicato con  $\dot{V}_{O_2 cell}$ , freccia uscente in Figura 3.18); al contrario, nel reservoir e nei tubi il medium si arricchisce di O<sub>2</sub> (indicati

rispettivamente con  $\dot{V}_{O_2 \text{ res}}$  e  $\dot{V}_{O_2 \text{ tubi}}$ , frecce entranti in Figura 3.18). In particolare, lo scambio di ossigeno nella riserva avviene attraverso il pelo libero.

Il dimensionamento del circuito sarà effettuato in modo da soddisfare la condizione per la quale lo scambio di ossigeno attraverso i tubi in silicone bilanci il consumo legato al metabolismo cellulare. In quest'ottica, il pelo libero della riserva rappresenta un ulteriore eventuale elemento ossigenante, quindi un fattore di sicurezza per il mantenimento in vita del segmento di vena safena.

### 3.4.1.1.1. Modello dello scambio di ossigeno nel tubo in silicone

Il modello prevede la presenza di due compartimenti in cui avviene lo scambio di ossigeno: il vaso e i tubi in silicone (Figura 3.20). Si ipotizza di essere in condizioni di regime stazionario e che la pressione parziale di ossigeno all'interno dell'incubatore sia costante e pari a 141 mmHg.



**Figura 3.20** Schema semplificato degli scambi di ossigeno che hanno luogo nel sistema.  $pO_{2 \text{ in cell}}$  e  $pO_{2 \text{ out cell}}$  sono rispettivamente la pressione parziale dell'ossigeno in ingresso ed in uscita dal vaso;  $pO_{2 \text{ in tubi}}$  e  $pO_{2 \text{ out tubi}}$  sono la pressione parziale dell'ossigeno in ingresso e in uscita dai tubi in silicone.

Come si evince dalla Figura 3.20, il "compartimento vaso" rappresenta l'elemento che consuma ossigeno, pertanto la pressione parziale di  $O_2$  nel medium in uscita ( $pO_{2out \text{ cell}}$ ) da esso risulta minore rispetto a quella in ingresso ( $pO_{2 \text{ in cell}}$ ).

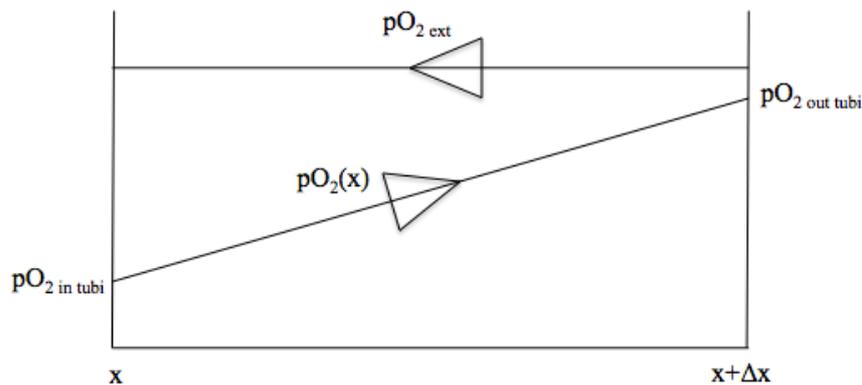
La quantità di  $O_2$  consumata nell'unità di tempo dalle cellule del vaso, espressa in [mmol/s], può essere ricavata dalla seguente relazione:

$$\dot{V}_{O_2 \text{ cell}} = \alpha Q (pO_{2in} - pO_{2out}) \quad (1)$$

in cui  $\alpha$  rappresenta il coefficiente di solubilità dell'O<sub>2</sub> nel medium pari a  $9.8 \times 10^{-6}$  [mmol/ml kPa] (ipotizzandolo uguale al coefficiente di solubilità in acqua); Q è la portata di medium espressa in [ml/s];  $pO_{2in}$  e  $pO_{2out}$  sono espresse in [kPa].

Ricerche bibliografiche non hanno fornito nessuna informazione specifica riguardo il consumo di ossigeno da parte delle cellule dei tessuti vascolari nativi inseriti all'interno di sistemi a perfusione. Si è pertanto stimato questo valore assumendo che il tessuto vascolare abbia un consumo per unità di massa pari a quello medio dei tessuti dell'organismo: se un soggetto di 70 kg consuma in media 250 [mlO<sub>2</sub>/min], allora 1 grammo di tessuto (peso medio stimato per il tratto vascolare da alloggiare nel sistema in esame [30]) consuma  $3.57 \times 10^{-3}$  [mlO<sub>2</sub>/min] (che corrispondono a  $2.65 \times 10^{-6}$  [mmolO<sub>2</sub>/s]).

I tubi in silicone rappresentano l'elemento ossigenante. Nell'ipotesi che essi si comportino come scambiatori di ossigeno ideali, la pressione parziale di O<sub>2</sub> nel medium in uscita dal "compartimento tubi" ( $pO_{2out\ tubi}$ ) dovrebbe uguagliare la  $pO_2$  presente nell'incubatore ( $pO_{2\ ext}$ ), pari a 141 mmHg. Tuttavia, nel modello sviluppato, i tubi sono considerati degli scambiatori reali, per cui la  $pO_{2out\ tubi}$  non raggiungerà il valore di 141 mmHg, ma si avvicinerà ad esso (Figura 3.21).



**Figura 3.21** Andamento della pressione parziale di ossigeno nell'incubatore (costante,  $pO_{2ext}$ ) e nel medium,  $pO_2(x)$ , in funzione della coordinata misurata lungo l'asse dei tubi in silicone che costituiscono il circuito.

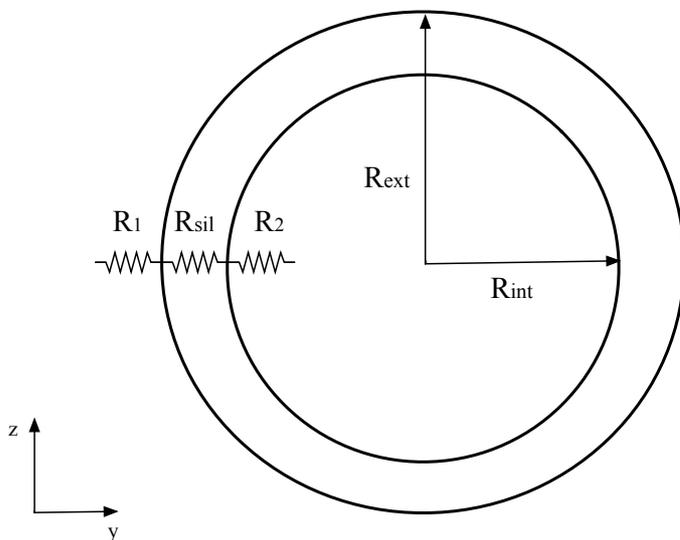
La  $pO_{2out\ tubi}$  sarà pertanto considerata come una variabile di progetto e il suo valore dipenderà dalla portata di medium (Q) che fluisce all'interno dei tubi e dalla lunghezza dei tubi stessi (x). Infatti, come si evince dalla Figura 3.21, la quantità di O<sub>2</sub> disciolta nel medium aumenta progressivamente lungo la coordinata x misurata lungo l'asse del tubo.

Lo scambio volumetrico di ossigeno ( $\dot{V}_{O_2 \text{ tubi}}$ ) attraverso la superficie di scambio, costituita dalla parete dei tubi in silicone, è guidato dalla differenza di  $pO_2$  tra l'incubatore ( $pO_{2\text{ext}}$ ) e il medium ( $pO_2(x)$ ). La superficie di scambio è definita come il prodotto tra la lunghezza dei tubi  $x$  e la circonferenza media logaritmica  $W$  [37]. Quest'ultima risulta essere:

$$W = \frac{\pi(D_{\text{ext}} - D_{\text{int}})}{\ln \frac{D_{\text{ext}}}{D_{\text{int}}}} \quad (2)$$

dove  $D_{\text{ext}}$  e  $D_{\text{int}}$  sono rispettivamente il diametro esterno (2.4 mm) e il diametro interno (0.8 mm) del tubo in silicone.

$\dot{V}_{O_2 \text{ tubi}}$  dipende, inoltre, dal coefficiente globale di scambio di massa  $U$  definito come l'inverso della somma delle resistenze che l'ossigeno incontra nel passaggio dall'esterno verso l'interno del tubo:  $R_1$  è la resistenza convettiva dovuta al fluido esterno (aria);  $R_{\text{sil}}$  è la resistenza diffusiva legata alla parete del tubo;  $R_2$  è la resistenza convettiva determinata dalla presenza del medium all'interno del tubo (Figura 3.22).



$$U = \frac{1}{R_1 + R_{\text{sil}} + R_2} \quad (3)$$

$$R_1 = \frac{W}{k_i \alpha W_i} \quad (4)$$

$$R_{\text{sil}} = \frac{t_m}{k_{\text{sil}}} \quad (5)$$

$$R_2 = \frac{W}{k_e W_e} \quad (6)$$

**Figura 3.22** Rappresentazione schematica delle resistenze allo scambio di  $O_2$ .  $R_1$  è la resistenza convettiva dovuta al fluido esterno (aria);  $R_{\text{sil}}$  è la resistenza diffusiva legata alla parete del tubo;  $R_2$  è la resistenza convettiva determinata dalla presenza del medium all'interno del tubo.  $R_{\text{ext}}$  e  $R_{\text{int}}$  sono, rispettivamente, il raggio esterno e il raggio interno del tubo in silicone.

Nelle formule compaiono  $W_i$  e  $W_e$  che sono, rispettivamente, le circonferenze interna ed esterna;  $t_m$  che è lo spessore della parete del tubo;  $k_{sil}$  che è il coefficiente di permeabilità dell' $O_2$  attraverso il silicone, pari a  $2.08 \times 10^{-10}$  [mmol/s mm kPa];  $k_i$  e  $k_e$  che sono i coefficienti di scambio locale interno ed esterno (per il calcolo di questi coefficienti si rimanda alla trattazione di Orr [38]);  $R$  che è la costante dei gas, pari a 8.314 [J/mol K];  $T$  che è la temperatura all'interno dell'incubatore, pari a 310 [K].

Possiamo, quindi, ottenere  $\dot{V}_{O_2 \text{ tubi}}$  effettuando un bilancio di massa per il “compartimento tubi”:

$$\dot{V}_{O_2 \text{ tubi}} = UW \Delta x (pO_{2 \text{ ext}} - pO_2(x)) \quad (7)$$

Dividendo per  $\Delta x$ , ponendosi al limite per  $\Delta x \rightarrow 0$  e operando una serie di passaggi si ottiene:

$$pO_2(x) = pO_{2 \text{ ext}} - (pO_{2 \text{ ext}} - pO_{2 \text{ in}}^{\text{tubi}}) \exp\left(-\frac{UW}{\alpha Q} x\right) \quad (8)$$

Mettendo a sistema le equazioni (1) e (8) e nell'ipotesi di stazionarietà:

$$\begin{cases} \dot{V}_{O_2 \text{ cell}} = \alpha Q (pO_{2 \text{ in}}^{\text{cell}} - pO_{2 \text{ out}}^{\text{cell}}) & (1 \text{ ripetuta}) \\ pO_2(x) = pO_{2 \text{ ext}} - (pO_{2 \text{ ext}} - pO_{2 \text{ in}}^{\text{tubi}}) \exp\left(-\frac{UW}{\alpha Q} x\right) & (8 \text{ ripetuta}) \\ pO_{2 \text{ out}}^{\text{cell}} = pO_{2 \text{ in}}^{\text{tubi}} & (9) \\ pO_{2 \text{ out}}^{\text{tubi}} = pO_{2 \text{ in}}^{\text{cell}} & (10) \end{cases}$$

e risolvendo in funzione di  $x$  si ottiene:

$$x = -\frac{\alpha Q}{UW} \ln \frac{pO_{2 \text{ ext}} - pO_2(x)}{pO_{2 \text{ ext}} - pO_2(x) + \left(\frac{\dot{V}_{O_2 \text{ cell}}}{\alpha Q}\right)} \quad (11)$$

Detta  $L$  la lunghezza cercata dei tubi in silicone, si avrà che  $pO_2(L) = pO_{2 \text{ out tubi}}$  e pertanto si potrà utilizzare la (11) per determinare il dimensionamento necessario in base alla portata  $Q$  e al valore desiderato della variabile di progetto  $pO_{2 \text{ out tubi}}$ :

$$L = -\frac{\alpha Q}{UW} \ln \frac{pO_{2ext} - pO_{2out}^{tubi}}{pO_{2ext} - pO_{2out}^{tubi} + \left( \frac{\dot{V}_{O_2cell}}{\alpha Q} \right)} \quad (11 \text{ bis})$$

In Figura 3.23 è mostrato l'andamento della L in funzione di Q per un tubo con diametro interno pari a 0.8 mm e spessore della parete pari a 0.8 mm. Esso è parametrizzato per diversi valori di  $pO_{2out\ tubi}$ , compresi tra 125 e 140 mmHg.

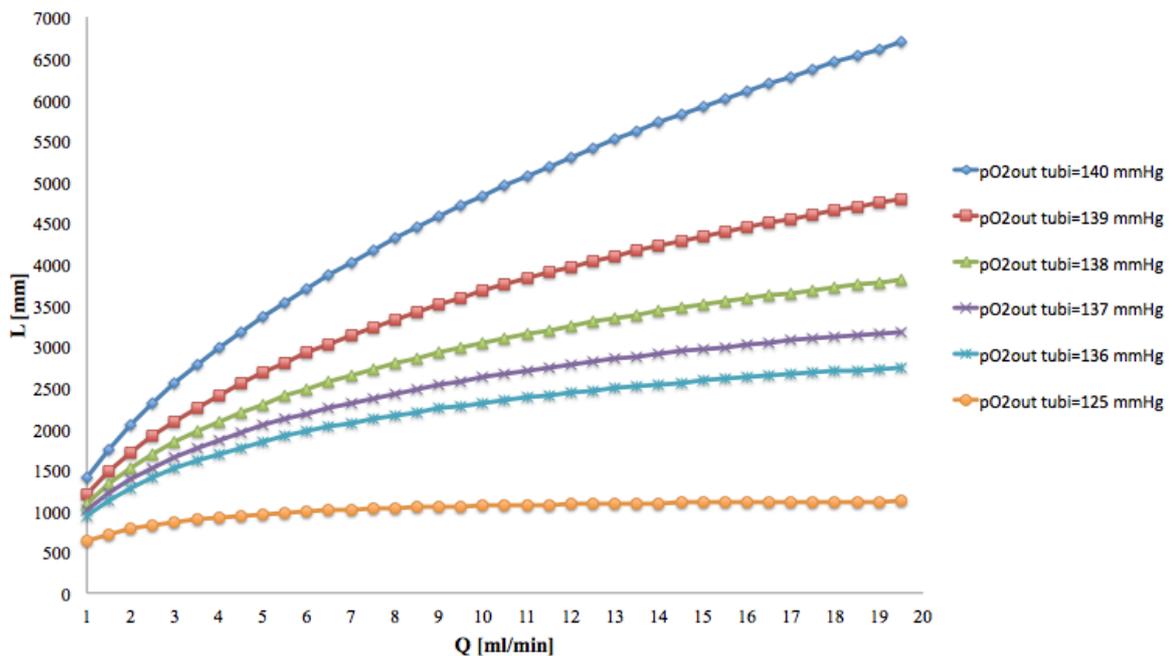


Figura 3.23 Andamento della lunghezza della circuiteria in silicone in funzione della portata di medium.

Come si può notare dal grafico in Figura 3.23, la condizione di scambio migliore si ottiene in corrispondenza di lunghezze dei tubi elevate (al limite  $x \rightarrow \infty$ ) oppure per valori bassi di portata. L'esigenza di soddisfare la specifica di progetto di ingombro ridotto del sistema e la necessità di contenere le perdite di carico pongono una limitazione alla lunghezza massima della circuiteria in silicone. Ciò si traduce nella necessità di raggiungere un compromesso tra i valori di portata da imporre e la lunghezza complessiva del circuito tali da garantire l'adeguato scambio di ossigeno attraverso la parete dei tubi in silicone. Ad esempio, ipotizzando una condizione di scambio tale da determinare una  $pO_{2out\ tubi}$  nel range 136÷139 mmHg, le migliori condizioni di lavoro si ottengono per portate non

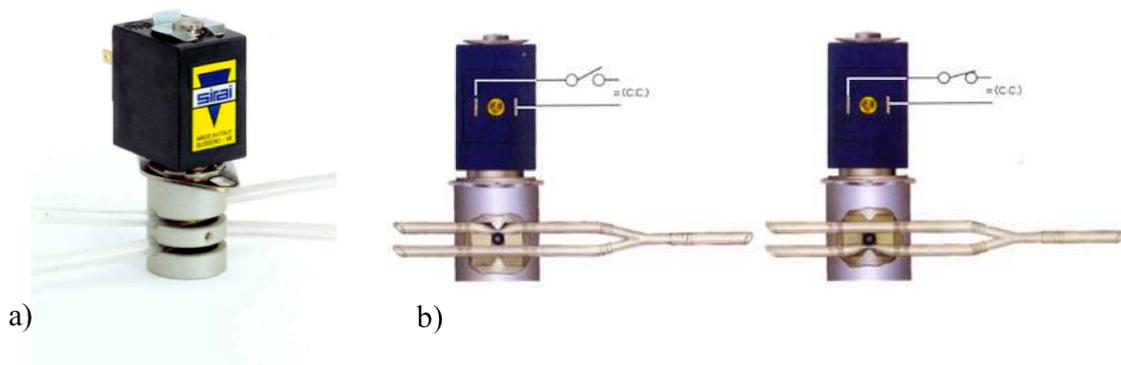
superiori a 10 ml/min che consentono inoltre l'utilizzo di una circuiteria di lunghezza contenuta pari a circa 3 m.

### 3.4.2. Sottosistema di monitoraggio e controllo

Il sottosistema di monitoraggio e controllo, come detto precedentemente, deve essere in grado di fornire gli stimoli pressori adeguati al segmento di vaso ed effettuare il ricircolo del medium controllando opportunamente gli attuatori idraulici (sistema pompante ed organi di direzionamento). Tale sistema è realizzato per mezzo di componenti hardware e software, già disponibili presso il  $\mu$ BSLab, descritti di seguito.

Il primo elemento attivo relativo alla parte idraulica dell'hardware è la pompa Watson-Marlow 323Du descritta nel paragrafo 3.4.1. Tra le caratteristiche di questa pompa ci sono: l'inversione del moto, comandata mediante un input digitale, la possibilità da parte della testa pompante di alloggiare sette differenti dimensioni di tubo, che consente l'erogazione di un ampio range di portate, e la possibilità di essere controllata, in termini di portata erogata, sia attraverso una porta seriale, che attraverso un controllo analogico.

Il secondo elemento attivo è un'elettrovalvola pinza-tubo S305-09 (Sirai® Elettromeccanica, Bussero, Italia) (Figura 3.24, a). Un organo di occlusione azionato da un attuttore elettromagnetico regola il passaggio del fluido ocludendo e rilasciando il tubo (Figura 3.24, b). Questa elettrovalvola necessita di un'alimentazione a 24V, presenta due vie e consente quindi la funzione di interruttore/deviatore. Essa permette di mantenere la sterilità in quanto nessun organo meccanico che la compone entra in contatto con il fluido.



**Figura 3.24** Elettrovalvola pinza-tubo S305-09 (Sirai® Elettromeccanica). a) foto; b) principio di funzionamento dell'elettrovalvola pinzatubo che svolge la funzione di interruttore/deviatore ocludendo e rilasciando il tubo.

Per quanto concerne la componente elettronica dell'hardware, essa consta di una scheda di acquisizione Analogico-Digitale (Figura 3.25) DAQCard NI 6036E ad interfaccia PCMCIA (National Instruments®, Austin, TX, USA) che permette di interfacciare la pompa, le elettrovalvole e il sensore di pressione al PC per mezzo di una centralina di cablaggio (già a disposizione del personale del  $\mu$ BSLab). Quest'ultima permette, inoltre, di alimentare l'elettrovalvola e il sensore di pressione.



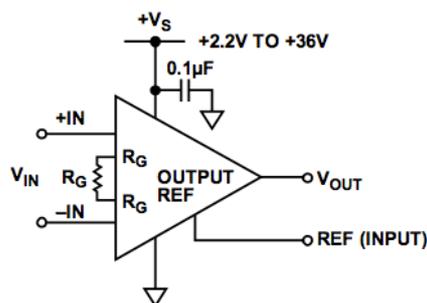
**Figura 3.25** DAQCard NI 6036E ad interfaccia PCMCIA (National Instruments®).

Per l'acquisizione del segnale di pressione si è scelto il sensore flow-through Pendotech Press-S-000 (PendoTECH, Princeton, NJ, USA) (Figura 3.26), commercialmente disponibile in formula monouso e già sterile.



**Figura 3.26** Sensore Pendotech Press-S-000 (PendoTECH, Princeton, NJ, USA).

Tale dispositivo risulta già calibrato e compensato, ma non presenta un'amplificazione del segnale in uscita. Pertanto, per interfacciare il sensore alla centralina di cablaggio, si è resa necessaria la realizzazione di un circuito di amplificazione (Figura 3.27).



**Figura 3.27** Circuito di amplificazione del sensore di pressione.

Come mostrato in Figura 3.27, il segnale di tensione proveniente dal sensore ( $V_{IN}$ ), dell'ordine dei mV, è amplificato al fine di ottenere una tensione in uscita ( $V_{OUT}$ ) nel range 0-8V. Per fare ciò è stato utilizzato l'amplificatore integrato AD627 (Analog Devices, MA, USA) connesso ad una resistenza  $R_G$  (pari a 260  $\Omega$ ) opportunamente dimensionata in funzione del guadagno desiderato ( $V_{OUT}/V_{IN}=774$ ).

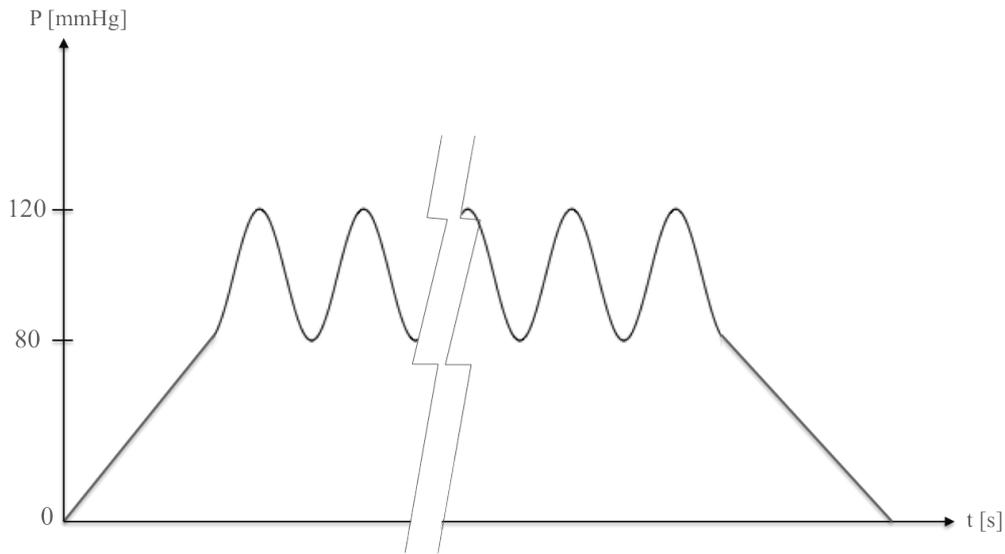
Per quanto riguarda il software di controllo, la strategia utilizzata è stata quella di adattare e ottimizzare un programma già a disposizione del  $\mu$ BSLab e sviluppato in ambiente di programmazione LabView® (National Instruments®). Il suo scopo principale è quello di controllare gli attuatori idraulici al fine di fornire una stimolazione pressoria pulsatile programmabile e un ricircolo del medium di coltura. Esso consente inoltre un comando diretto manuale degli attuatori per facilitare le operazioni ausiliarie (debollamento, riempimento e ricambio del medium).

La programmazione degli attuatori prevede due fasi di funzionamento del dispositivo, temporalmente distinte e regolarmente alternate: la fase di stimolazione del segmento di vena safena e la fase di ricircolo.

La fase di stimolazione è caratterizzata da tre sottofasi (Figura 3.28):

- Carico: il medium, spinto dalla pompa, fluisce all'interno del segmento di vaso, inducendo una variazione di pressione intraluminale fino ad un valore desiderato ad esempio pari a 80 mmHg (set-point della fase di carico).
- Pulsazione ciclica: il segmento di vaso viene caricato e scaricato in volume tramite la pompa, producendo un andamento di pressione oscillante fra due valori limite pre-impostati, ad esempio 80/120 mmHg.
- Scarico: il segmento di vaso viene svuotato fino al raggiungimento di una pressione intraluminale nulla (pressione atmosferica) (set-point della fase di scarico).

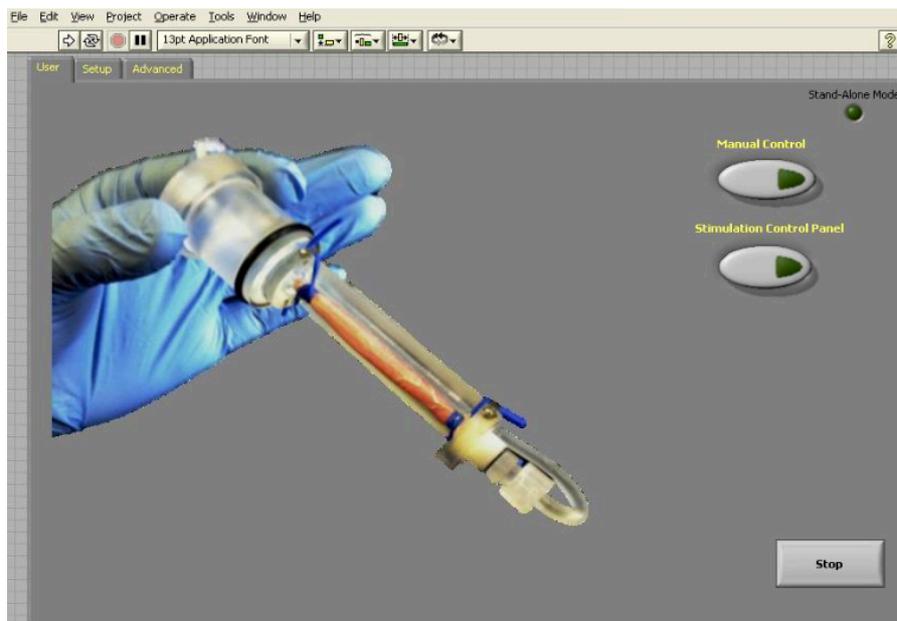
La fase di ricircolo del medium ha lo scopo di garantire un sufficiente apporto di nutrienti e ossigeno al vaso in coltura. L'efficacia del ricambio del medium dipenderà dalla portata di ricircolo e dalla durata della fase stessa.



**Figura 3.28** Andamento schematico della pressione all'interno del segmento di vaso in fase di sollecitazione meccanica. Si distinguono le tre sottofasi di carico, pulsazione ciclica e scarico.

In Figura 3.29 è mostrata l'interfaccia utente del software denominato PINE (*Pulsatile IN vitro Emulator*) (sezione *User*) dalla quale è possibile richiamare il controllo manuale (tramite il pulsante *Manual control*) oppure la stimolazione pulsatile (tramite il pulsante *Stimulation Control Panel*).

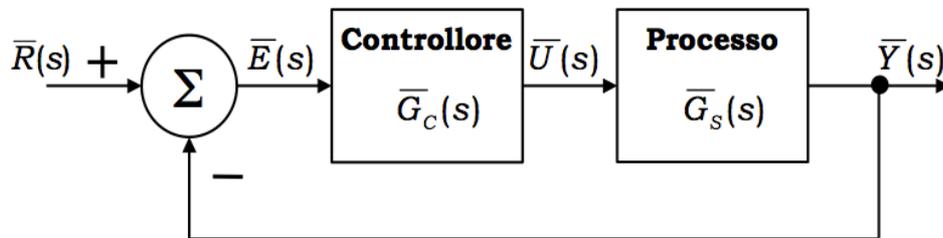
Le sezioni *Setup* e *Advanced* consentono di impostare rispettivamente i parametri della stimolazione e del ricambio del medium e quelli del controllore PID.



**Figura 3.29** Sezione *User* dell'interfaccia principale del software PINE.

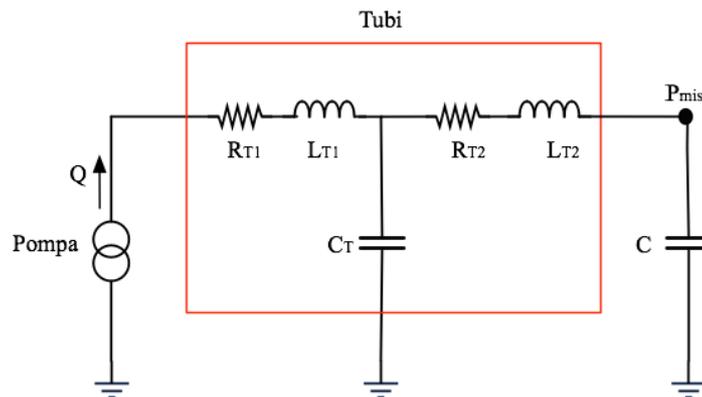
### 3.4.2.1. Realizzazione del controllo

Il controllo che si vuole realizzare è un sistema a retroazione negativa ad anello chiuso come mostrato in Figura 3.30:



**Figura 3.30** Struttura schematica di un controllo a retroazione negativa in anello chiuso.  $E(s)$  rappresenta l'errore tra la pressione desiderata  $R(s)$  e l'uscita effettiva del sistema  $Y(s)$ . Il segnale  $U(s)$  all'uscita del controllore è dato dalla somma dei tre termini: proporzionale, integrativo e derivativo.  $G_c(s)$  è la funzione di trasferimento del controllore,  $G_s(s)$  è la funzione di trasferimento del processo.

Il sistema controllato è costituito dalla pompa peristaltica, dal circuito idraulico (modello RCL a T in Figura 3.31) e da un elemento compliant che rappresenta il segmento di vena safena ed eventuali altri elementi complianti collocati all'interno del circuito. In Figura 3.31 è mostrato il modello a parametri concentrati del sistema.



**Figura 3.31** Schema analogo elettrico del sistema in cui sono presenti una pompa, i tubi in silicone (modello RCL a T) e un elemento compliant che rappresenta il segmento di vena safena ed eventuali altri elementi complianti collocati all'interno del circuito (C).  $Q$  è la portata erogata dalla pompa. Il nodo  $P_{mis}$  rappresenta il punto in cui avviene la misura di pressione ad opera del sensore apposito.

La pompa peristaltica è modellizzata come un generatore ideale di corrente. Infatti essa è una pompa continua in grado di fornire una portata costante  $Q$  indipendentemente dalle

resistenze a valle della stessa (postcarico). In questo schema si ignorano i disturbi ciclici dovuti all'interazione dei rulli della pompa con il tubo sottopompa, rimandando l'analisi delle problematiche correlate fino alla fase di collaudo sperimentale.

Il circuito idraulico è descritto mediante un modello RLC a T (Figura 3.31), in cui R, L e C rappresentano rispettivamente la resistenza, l'inertanza e la compliance dei condotti:

$$R = \frac{128\mu L}{\pi D^4} \quad (12)$$

$$L = \frac{4\rho L}{\pi D^2} \quad (13)$$

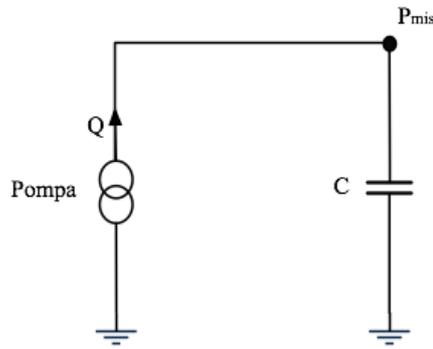
$$C = \frac{\pi D^3 L}{4Es} \quad (14)$$

dove D è il diametro, L la lunghezza, s lo spessore ed E il modulo di Young del materiale del condotto;  $\rho$  e  $\mu$  sono rispettivamente densità e viscosità del fluido.

Il segmento di vena safena, invece, è modellizzato come una compliance. Questo vale almeno in prima approssimazione date le sue caratteristiche biomeccaniche discusse nel capitolo 1. Nel modello in Figura 3.31 la compliance C tiene anche in considerazione eventuali altri elementi complianti collocati all'interno del circuito. Il nodo  $P_{\text{mis}}$  in Figura 3.31 rappresenta il punto per la misurazione della pressione all'interno del vaso ottenuta mediante il sensore di pressione, che non è modellizzato poiché considerato ideale.

Il modello a parametri concentrati mostrato in Figura 3.31 può essere semplificato trascurando l'effetto relativo al blocco RCL a T: infatti per la realizzazione del circuito si usa l'accortezza di utilizzare tubi corti in silicone con diametro interno pari a 1.6 mm e spessore della parete 0.8 mm che in prima approssimazione forniscono una R, una L e una C trascurabili.

La nuova configurazione, mostrata in Figura 3.32, risulta pertanto:

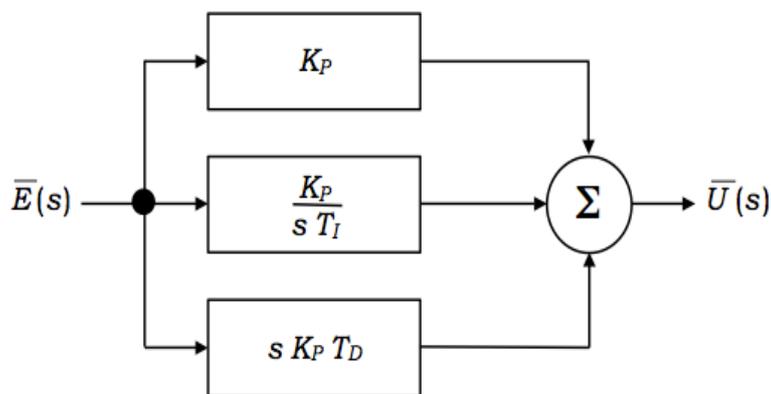


**Figura 3.32** Rappresentazione del modello a parametri concentrati semplificato del sistema di coltura.

la cui funzione di trasferimento è:

$$G_s(s) = \frac{1}{sC} \quad (15)$$

Il controllore utilizzato nel software è un PID (controllore ad azione Proporzionale (P), Integrata (I) e Derivativa (D)). Esso riceve in ingresso la differenza tra la pressione misurata dal sensore all'interno del vaso e il valore di pressione desiderato ( $P_{set}$ ), mentre fornisce in uscita (variabile di controllo) la portata da imporre alla pompa per raggiungere la pressione desiderata (Figura 3.33).



**Figura 3.33** Rappresentazione a blocchi della funzione di trasferimento del controllore PID. Il segnale  $U(s)$  all'uscita è dato dalla somma dei tre termini: proporzionale, integrale e derivativo.  $K_P$  è il guadagno proporzionale,  $K_i$  integrativo,  $K_d$  derivativo.  $T_i$  e  $T_d$  sono rispettivamente i tempi caratteristici di integrazione e derivazione.

La sua funzione di trasferimento  $G_C(s)$  è:

$$G_C = K_P + \frac{K_i}{s} + K_d * s = K_P \left( 1 + \frac{1}{T_i * s} + T_d + s \right) \quad (16)$$

dove  $K_p$  è il guadagno proporzionale,  $K_i$  è il guadagno integrativo,  $K_d$  è il guadagno derivativo,  $T_i$  il tempo caratteristico d'integrazione e  $T_d$  il tempo caratteristico di derivazione.

Come si evince dall'equazione (16),  $K_p$  lega algebricamente l'ingresso con l'uscita del controllore. Il contributo proporzionale dipende solo dal valore istantaneo dell'errore.

L'azione integrale, definita dalla costante  $K_i$ , garantisce errore  $E(s)$  nullo a transitorio esaurito; risulta quindi utile per eliminare l'errore a regime per ingressi a scalino. L'integratore non tiene conto solo del valore istantaneo dell'errore, bensì anche della sua storia. Tuttavia un forte contributo di tale termine può aumentare le oscillazioni, gli overshoots e il tempo di salita e di discesa della variabile controllata, fino ad arrivare all'instabilità.

Il termine derivativo, dato dalla costante  $K_d$ , opera come smorzatore nei confronti di oscillazioni in corrispondenza di brusche variazioni dell'errore. L'azione derivativa, pertanto, serve a far dipendere il controllo dalla stima del futuro dell'errore, operando come un predittore.

La realizzazione del controllore PID, nel caso in esame, si riduce alla scelta dei valori più opportuni per i parametri  $K_p$ ,  $T_i$  e  $T_d$ . Tale scelta non è banale perché richiede la conoscenza dettagliata delle proprietà del processo che si vuole controllare. Esistono vari metodi per effettuare la scelta dei coefficienti più opportuni, come ad esempio il Metodo di Cohen-Coon o di Ziegler-Nicholls. Questi, però, in quanto metodi semi-empirici, forniscono una ottimizzazione solo parziale del controllore. Il risultato finale dipende strettamente dal comportamento dinamico del processo sotto controllo.

Rispetto al software pre-esistente, per realizzare un controllo efficace del processo in esame, i parametri caratteristici del PID sono stati modificati ed impostati *ad hoc*.

Per valutare il  $K_p$  si è considerato inizialmente un controllore puramente proporzionale. Esso riceve in ingresso la differenza tra  $P_{set}$  e la pressione istantanea acquisita dal sensore  $P(t)$  e fornisce in uscita la portata da imporre alla pompa  $Q(t)$ :

$$Q(t) = [P_{set} - P(t)] * K_p = K_p * \Delta P(t) \quad (17)$$

da cui deriva che:

$$K_p = \frac{Q(t)}{\Delta P(t)} \quad (18)$$

In particolare, per  $t=0$  la pressione istantanea misurata dal sensore risulta essere nulla ( $P(t)=0$  mmHg), pertanto si avrà:

$$Q(0) = K_p * P_{set} \quad (19)$$

Poiché la portata è uguale a:  $Q(t) = dV/dt$  e la compliance è  $C = dV/dP$ , possiamo scrivere:

$$Q(t) = C * \frac{dP}{dt} = K_p * P_{set} \quad (20)$$

Linearizzando nell'intorno di  $t=0$ :

$$C * \frac{\Delta P(0)}{\Delta T} = K_p * P_{set} \quad (21)$$

ed essendo  $\Delta P(0) = P_{set}$ , risulta:

$$K_p = \frac{C}{\Delta T} \quad (22)$$

Ciò significa che, assumendo che la pressione vari linearmente nel tempo per effetto del controllore, per raggiungere il set-point in un tempo caratteristico  $\Delta T$  occorre scegliere un valore del guadagno proporzionale che dipende dalla compliance del sistema. Considerando in prima approssimazione il solo contributo offerto dalla compliance del segmento di vena safena, che dalla letteratura e dal modello che sarà descritto nel capitolo successivo (paragrafo 4.2.3) risulta dell'ordine di  $10^{-3}$  [ml/mmHg], e scegliendo un  $\Delta T$  pari a 3 s, il  $K_{p \text{ teorico}}$  risulta essere 0.003 [ml/(mmHg s)].

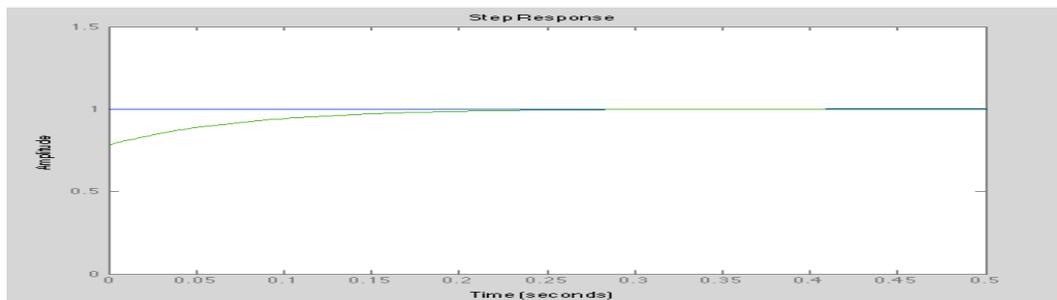
Tuttavia, la funzione PID implementata nel software utilizza come segnale relativo alla variabile controllata la tensione elettrica proveniente dal sensore di pressione e valuta la tensione di controllo da inviare alla pompa. Considerando rispettivamente il guadagno della pompa  $k_{pompa} = 0.167$  [(ml/s)/V] (con l'inserito sottopompa da 1.6 mm ricavato dalla calibrazione della stessa) e la sensibilità del sensore  $k_{sens} = 0.031$  [V/mmHg] (valore ottenuto anch'esso mediante calibrazione), il guadagno da impostare nel software risulta essere:

$$K_p' = \frac{K_{p \text{ teorico}}}{k_{pompa} * k_{sens}} = 0.06 \frac{V}{V} \quad (23)$$

Per quanto riguarda il  $T_i$  e il  $T_d$ , la scelta è inizialmente ricaduta sui valori impostati di default nel software, rispettivamente pari a 0.1 minuti (6 s) e 0.001 minuti (0.06 s).

Pertanto, per valutare teoricamente il controllo con i nuovi parametri si è scelto di implementare la funzione di trasferimento del sistema retroazionato  $G_s(s)$  in MATLAB (Matrix Laboratory, MathWorks®, Natick, Massachusetts, USA) utilizzando il *Toolbox Control System* e analizzare la risposta allo scalino del sistema.

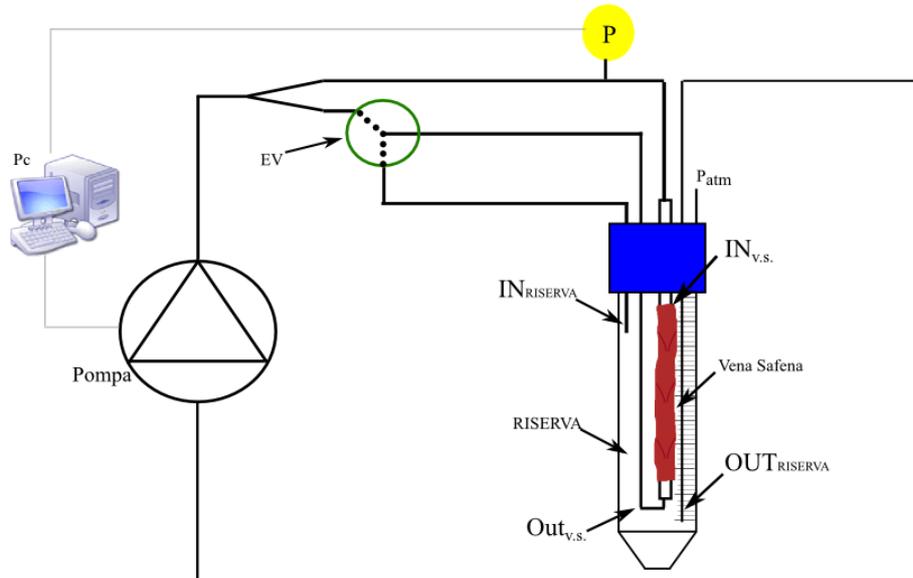
La risposta allo scalino ottenuta è mostrata in Figura 3.34. L'andamento riportato indica che la risposta allo scalino del sistema mediante controllo PID è accettabile. Tuttavia, i parametri trovati sono soltanto indicativi e dovranno essere verificati in fase sperimentale. In tale fase verranno inoltre prese in considerazione le problematiche ignorate in questa sede, quali l'effetto dei disturbi ciclici dovuti all'interazione dei rulli della pompa con il tubo sottopompa.



**Figura 3.34** Andamento della risposta allo scalino del sistema per  $K_p=0.06$ ,  $T_i=6s$  e  $T_d=0.06s$ .

### 3.4.3. Layout del sistema

La Figura 3.35 mostra la configurazione circuitale dell'intero sistema in esercizio, che prevede: la pompa, l'elettrovalvola, la camera di coltura contenente il vaso e il sensore di pressione. È inoltre presente il sistema di monitoraggio e controllo (rappresentato dal PC nella figura) che riceve in ingresso segnali dalla camera di coltura tramite il sensore di pressione e regola opportunamente la portata erogata dalla pompa mediante un controllo in retroazione.

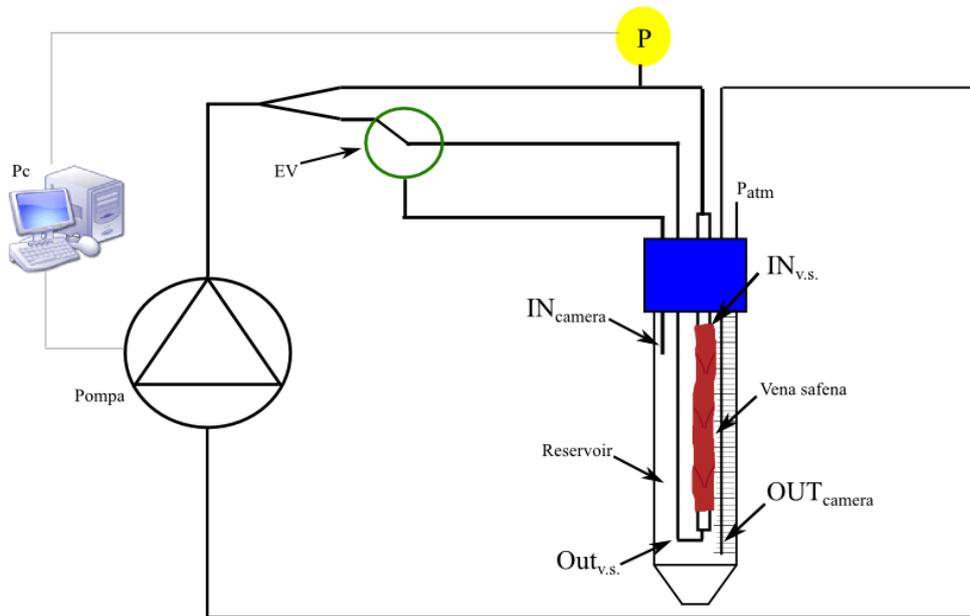


**Figura 3.35** Layout del sistema. Si distinguono: il PC, la pompa, l'elettrovalvola pinza-tubo (EV), il sensore di pressione (P), il port in atmosfera ( $P_{atm}$ ), i port di ingresso e di uscita del reservoir (rispettivamente  $IN_{RISERVA}$  e  $OUT_{RISERVA}$ ), i port di ingresso e di uscita del segmento di vena safena (rispettivamente  $IN_{v.s.}$  e  $OUT_{v.s.}$ ).

In Figura 3.36 è rappresentata la configurazione del sistema in fase di stimolazione. Durante la fase di stimolazione, l'elettrovalvola è in una configurazione tale da abilitare il ramo collegato all'uscita del vaso, quindi da permettere il carico di quest'ultimo. Lo switch dell'elettrovalvola è gestito dal software stesso.

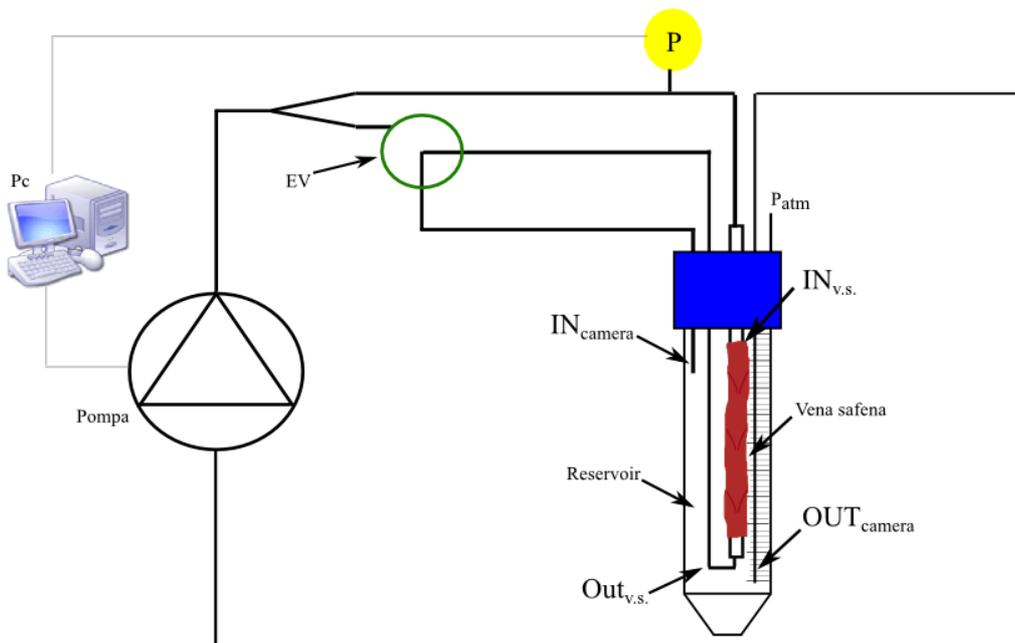
Il medium, prelevato dalla camera, può fluire all'interno del vaso da entrambe le estremità, il che garantisce la funzionalità anche in presenza di eventuali valvole a "nido di rondine" al suo interno. Il controllore, che riceve il segnale di pressione dal sensore, comanda la pompa imponendo ad essa la portata da erogare.

Nel momento in cui la pressione intraluminale raggiunge il valore di 80 mmHg inizia la sottofase di pulsazione ciclica (la cui durata è impostata dall'utente) al termine della quale il vaso verrà scaricato (sottofase di scarico). Ciò avviene grazie all'inversione del senso di rotazione della pompa, anch'esso gestito dal software.



**Figura 3.36** Configurazione circuitale in fase di stimolazione.

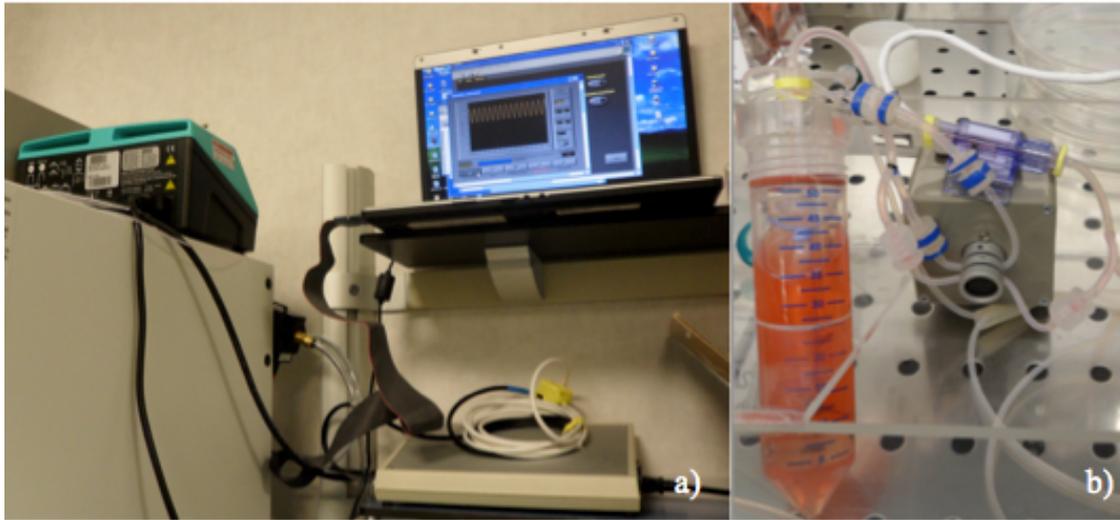
In Figura 3.37 è rappresentata la configurazione del sistema in fase di ricircolo. Il medium, prelevato dal port OUT<sub>RISERVA</sub>, fluisce all'interno del vaso e rientra nella riserva attraverso il port IN<sub>RISERVA</sub>. La durata di questa fase e la portata imposta dipendono fortemente dalla necessità di apportare l'adeguata quantità di ossigeno e nutrienti al graft.



**Figura 3.37** Configurazione circuitale in fase di ricircolo del medium.

### 3.5.Sistema di coltura: visione di insieme

In Figura 3.38-b è mostrato il sistema di coltura assemblato nella sua versione definitiva. In Figura 3.38-a sono mostrati il PC e la pompa peristaltica, entrambi collegati alla centralina di cablaggio e collocati all'esterno dell'incubatore.



**Figura 3.38** Fotografia del sistema di coltura assemblato. a) Foto dei componenti collocati all'esterno dell'incubatore: PC, centralina di cablaggio e pompa peristaltica, b) Foto del sistema di coltura assemblato in cui si distinguono la camera di coltura, l'elettrovalvola pinza-tubo.

## Capitolo 4

### Collaudo del sistema ed esperimenti correlati

Il collaudo è una fase fondamentale dell'attività di progettazione e realizzazione di un sistema. Esso consiste nel verificare il corretto funzionamento del dispositivo in condizioni paragonabili a quelle cui sarà sottoposto durante l'esercizio. Questa fase è stata svolta presso il  $\mu$ BSLab ed il Centro Cardiologico Monzino in condizioni di non sterilità. A tal fine si sono verificati la tenuta idraulica (paragrafo 4.1) dell'intero sistema assemblato e il corretto funzionamento del circuito di stimolazione (paragrafo 4.2). In questa fase, si è reso necessario caratterizzare meccanicamente i campioni di vena safena mediante misure di compliance (paragrafo 4.2.1).

La verifica del sistema di coltura realizzato è stata inoltre effettuata in termini di mantenimento della sterilità (paragrafo 4.3).

#### 4.1. Protocollo di verifica della tenuta idraulica

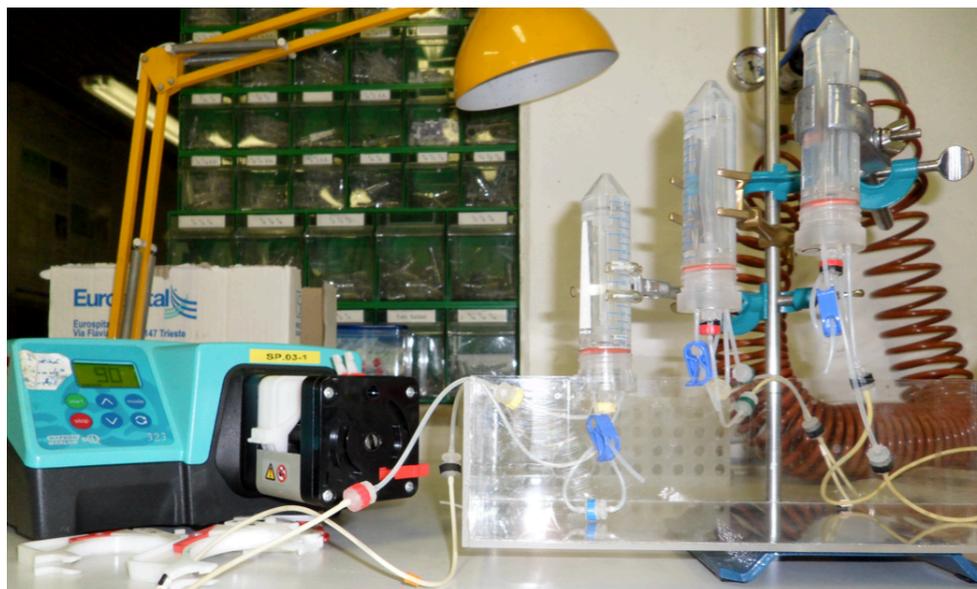
La verifica del mantenimento della tenuta idraulica della camera di coltura è stata effettuata focalizzando l'attenzione sui punti critici del sistema: l'O-ring, mediante il quale si realizza l'accoppiamento meccanico tra telaio portavaso e riserva, le connessioni presenti all'interno del circuito, i connettori luer e gli accessi (tubo collegato al filtro HEPA e tubo in uscita dal vaso) presenti sul tappo.

Qui di seguito è riportato il protocollo adottato:

- Montaggio: si assemblano i componenti come sarà descritto nel paragrafo 4.3.1. Le uniche differenze sono l'utilizzo di un sostituto artificiale del segmento di vena safena, costituito da un tubo in silicone di dimensioni paragonabili ad esso, ed il fatto di non lavorare in ambiente sterile.
- Riempimento e messa in opera: si procede come sarà descritto nel paragrafo 4.3.1 e si utilizza acqua deionizzata. Una volta effettuato il riempimento, il tubo sottopompa viene inserito nell'apposita sede della testa pompante. Le camere sono posizionate in configurazione capovolta.
- Verifica: la tenuta idraulica viene testata mantenendo in perfusione il sistema di coltura

per due ore e imponendo ai rulli della pompa peristaltica Watson&Marlow con testa multicanale 318MC una velocità di 90 rpm. Si valuta visivamente la presenza di eventuali trafiletti di fluido dai punti critici sopra citati.

In Figura 4.1 è mostrata una foto del set-up allestito per la verifica della tenuta idraulica del sistema.



**Figura 4.1** Set-up per la verifica della tenuta idraulica.

I risultati dei test di tenuta idraulica non hanno evidenziato perdite e trafiletti di liquido dalle connessioni, dagli accessi sul tappo del telaio portavaso e dall'accoppiamento realizzato con l'O-ring.

## **4.2. Collaudo del circuito di stimolazione**

Per verificare l'adeguatezza del circuito di stimolazione realizzato sono stati condotti dei test preliminari: una caratterizzazione meccanica di campioni di vena safena mediante misure di compliance, un test di collaudo del sistema di monitoraggio e controllo condotto presso il  $\mu$ BSLab utilizzando un condotto in silicone in sostituzione del segmento di vena safena, una caratterizzazione idraulica del sistema di coltura in esercizio ed un collaudo del sistema di monitoraggio e controllo effettuato alloggiando all'interno del sistema di coltura un campione biologico e svolto presso il Centro Cardiologico Monzino.

### 4.2.1. Caratterizzazione meccanica di campioni di vena safena mediante misure di compliance

Al fine di definire i parametri caratteristici per un'adeguata stimolazione pressoria del segmento di vena safena e determinare i volumi di fluido e quindi le portate da imporre al vaso al fine di raggiungere i valori pressori intraluminali desiderati (80÷120 mmHg), si è reso necessario caratterizzare meccanicamente il tessuto biologico in esame in termini di compliance.

In fisiologia, la compliance esprime la capacità dei vasi sanguigni di dilatarsi elasticamente sotto l'effetto di una pressione sanguigna crescente, per poi restringersi restituendo il volume di sangue accumulato sotto l'effetto di una pressione decrescente. La compliance di un vaso è funzione dell'elasticità delle sue pareti e costituisce una misura del rapporto tra le variazioni di volume e le variazioni di pressione a cui è soggetto. Viene infatti definita come segue:

$$C = \frac{\Delta V}{\Delta P} \quad (1)$$

in cui  $\Delta P$  è l'incremento di pressione esercitata sulle pareti del vaso da un certo volume  $\Delta V$  introdotto all'interno di esso.

Il primo passo nella determinazione della compliance è stato stimare dei valori a partire dalla letteratura. Wesly [39] ha ricavato sperimentalmente, in seguito a test effettuati su vene safene umane sottoposte a sforzi biassiali, valori di modulo elastico sia circonferenziale che longitudinale in funzione della pressione applicata (Figura 4.2).

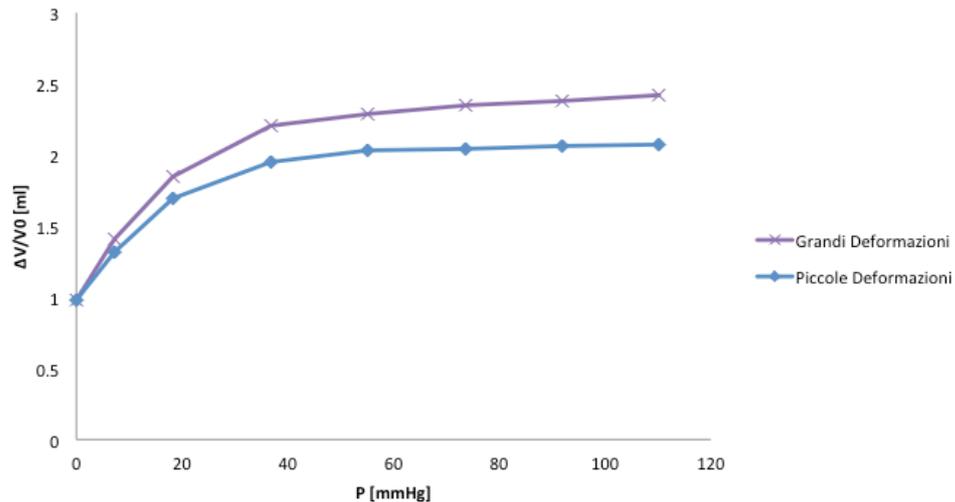
A partire da questi valori e dalla deformazione (ingegneristica)  $\epsilon_\theta$ , attraverso la legge di Hooke (assumendo l'ipotesi di materiale elastico e isotropo), si sono ottenuti i valori di sforzo circonferenziale  $\sigma_\theta$ .

Pressione [mmHg]	$\lambda_{\theta^2}$	$\lambda_z$	$E_{\theta}$	$E_z$
			[N/m <sup>2</sup> x10 <sup>5</sup> ]	[N/m <sup>2</sup> x10 <sup>5</sup> ]
7.36	1.357	1.169	0.27 ± 0.12	1.61 ± 0.32
18.39	1.417	1.206	0.65 ± 0.13	2.03 ± 0.39
36.78	1.500	1.266	1.89 ± 0.41	2.75 ± 0.78
55.17	1.561	1.325	9.85 ± 1.6	3.18 ± 0.76
73.55	1.602	1.381	15 ± 2.6	3.56 ± 0.58
91.95	1.621	1.430	20.4 ± 1.6	3.98 ± 0.96
110.33	1.621	1.470	25.1 ± 7.5	4.75 ± 1.2

**Figura 4.2** Risultati sperimentali di Wesley et al. effettuati su vene safene umane e arterie carotidee sottoposte a sforzi biassiali (tabella riadattata [39]). Si indica con  $\theta$  la direzione circonferenziale e con  $z$  quella longitudinale.  $\lambda_{\theta}$ ,  $\lambda_z$  sono i rapporti di deformazione registrati alla pressione indicata,  $E_{\theta}$ ,  $E_z$  [N/m<sup>2</sup>x10<sup>5</sup>] sono i valori stimati di modulo elastico. Il rapporto di deformazione  $\lambda_{\theta}$  è definito come:  $\lambda_{\theta} = d / d_0$  dove  $d$  indica il diametro allo stato deformato e  $d_0$  il diametro iniziale. La trattazione è analoga per  $\lambda_z$ . Il legame tra  $\lambda$  e la deformazione ingegneristica  $\varepsilon$  è:  $\varepsilon = (d - d_0) / d_0$  da cui  $\varepsilon = \lambda - 1$ .

Applicando la legge di Mariotte - Laplace al vaso sotto l'ipotesi di geometria cilindrica a parete sottile, è stata ricavata la relazione che lega pressione e volume (Figura 4.3), e di conseguenza anche la compliance, in funzione dei parametri geometrici e biomeccanici sopracitati. La trattazione è stata condotta applicando la teoria sia delle piccole che delle grandi deformazioni.

Per un approfondimento si faccia riferimento all'APPENDICE B.



**Figura 4.3** Grafico pressione-volume nell'ipotesi di piccole e grandi deformazioni.

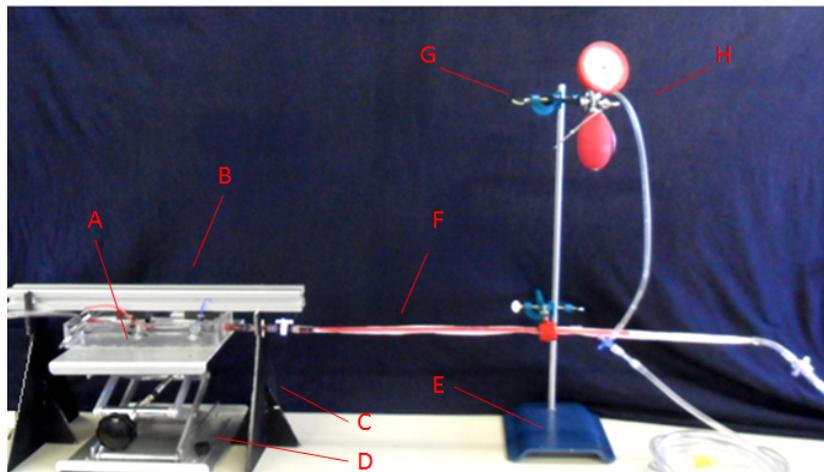
In Tabella 4.1 sono riportati i valori di compliance ricavati. Essi sono stati definiti come rapporto tra la variazione di volume normalizzata per il volume a riposo del vaso (ossia quello in corrispondenza di  $P=0$  mmHg) e la variazione pressoria all'interno di esso.

P	Grandi deformazioni		Piccole deformazioni	
	V	C	V	C
[mmHg]	[ml]	[mmHg <sup>-1</sup> ]	[ml]	[mmHg <sup>-1</sup> ]
0	0.98	-	0.98	-
7.36	1.41	0.06	1.32	0.05
18.39	1.85	0.04	1.70	0.03
36.78	2.20	0.02	1.95	0.01
55.17	2.29	0.05	2.03	0.004
73.55	2.34	0.003	2.05	0.001
91.95	2.38	0.002	2.06	0.0007
110.33	2.42	0.002	2.07	0.0005

**Tabella 4.1** Risultati teorici di compliance nel caso di piccole e grandi deformazioni.

I valori di compliance ricavati sono stati utilizzati per la validazione dei risultati sperimentali di misura della compliance di tratti di vena safena umana.

A tal fine sono state condotte delle campagne sperimentali utilizzando un set-up<sup>2</sup> disponibile presso il  $\mu$ BSLab e mostrato in Figura 4.4.



**Figura 4.4** Set-up assemblato sul banco di lavoro. Partendo da sinistra si notano: la camera per il mantenimento a bagno del campione (A) e il sistema di alloggiamento del vaso (B). Il sistema di alloggiamento poggia su dei sostegni in legno (C) mentre la camera è posta su un pantografo (D) in modo da regolarne la posizione. Alla camera è connessa la cannula graduata (F) sostenuta da una pinza montata su un piedistallo in acciaio (E). Un'altra pinza (G) sostiene il manometro (H), anch'esso connesso alla cannula.

In APPENDICE D è descritto nel dettaglio il protocollo di prova seguito.

<sup>2</sup> Set-up realizzato da A. Cambiaghi e M. De Santo nell'ambito di un progetto di Bioingegneria Chimica, a.a. 2010/2011.

#### 4.2.1.1. Risultati delle prove di misura di compliance di segmenti di vena safena

Le prove di misura della compliance, effettuate su sei tratti di vena safena umana provenienti da soggetti differenti, sono state eseguite utilizzando il set-up sperimentale sopra mostrato.

In Tabella 4.2 sono riportate le caratteristiche geometriche dei campioni in esame.

<b>Campione</b>	<b>Diametro interno [mm]</b>	<b>Spessore parete [mm]</b>	<b>Lunghezza utile [mm]</b>	<b>Volume a riposo [ml]</b>
SV01	3.2	0.4	5.9	0.47
SV02	3.1	0.35	3.5	0.26
SV03	3.8	0.4	6	0.68
SV04	3.4	0.4	3	0.27
SV05	3.2	0.3	3.5	0.28
SV06	3.8	0.3	6	0.68
<b>Media</b>	<b>3.4</b>	<b>0.36</b>	<b>4.65</b>	<b>0.44</b>

**Tabella 4.2** Caratteristiche geometriche dei campioni biologici sottoposti a misure di compliance.

La lunghezza utile riportata in Tabella 4.2 si riferisce al tratto di vaso (precedentemente pre-tensionato del 10% rispetto alla sua lunghezza a riposo) compreso tra i due afferraggi. Il volume a riposo ( $V_0$ ) è stato calcolato assumendo una geometria cilindrica per il condotto vascolare.

Come da protocollo (descritto nell'APPENDICE D), per ogni campione sono state effettuate tre misure di compliance, ciascuna delle quali è stata preceduta da una fase di pre-condizionamento (cinque cicli di carico e scarico del vaso). La misura della compliance è ottenuta imponendo con un manometro incrementi pressori ( $\Delta P$ ) di 10 mmHg nel range 0÷120 mmHg e leggendo istantaneamente lo spostamento del menisco d'acqua sulla cannula graduata. Questo valore è correlato alla variazione di volume all'interno della cannula mediante un fattore di conversione derivante dalla calibrazione della stessa

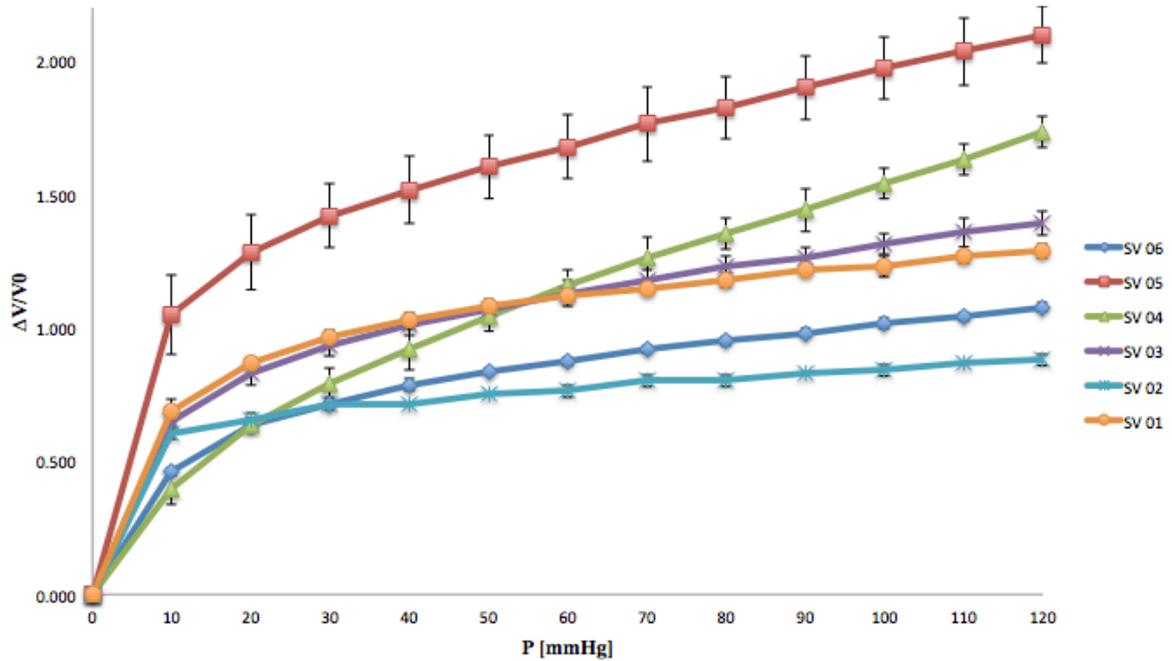
$$\Delta V = \frac{\Delta x}{96} \quad (2)$$

in cui  $\Delta x$  è lo spostamento del menisco d'acqua (espresso in mm), mentre  $\Delta V$  è la variazione di volume all'interno della cannula (espresso in ml). Tale valore corrisponde, in definitiva, all'accumulo volumetrico all'interno del vaso. Al termine dell'esperimento è calcolata la media dei  $\Delta V$  misurati in ogni prova. In Tabella 4.3 sono riportati a titolo di esempio i risultati relativi alla prova effettuata sul vaso SV06, mentre in APPENDICE D sono riportati i risultati relativi ai restanti campioni.

P [mmHg]	$\Delta V$ [ml]
0	0
10	0.31
20	0.43
30	0.49
40	0.53
50	0.57
60	0.59
70	0.62
80	0.65
90	0.67
100	0.69
110	0.71
120	0.73

**Tabella 4.3** Valori delle variazioni di volume relative al campione SV06.

Al fine di ottenere informazioni indipendenti dalla geometria del vaso, le variazioni di volume sono state normalizzate rispetto al volume a riposo del vaso  $V_0$  e graficate in funzione della variazione di pressione imposta al campione (Figura 4.5).



**Figura 4.5** Grafico che rappresenta l'andamento della variazione di volume normalizzato in funzione della variazione di pressione. La compliance è calcolata come rapporto incrementale tra le variazioni di volume normalizzate e gli incrementi pressori.

Come mostrato in Figura 4.5, la vena safena presenta delle caratteristiche meccaniche non lineari. Infatti, per bassi valori di pressione si può notare una maggiore distensibilità del vaso (maggiore pendenza della curva) attribuibile alle fibre di elastina, mentre per alti valori pressori il contributo predominante è quello delle fibre di collagene responsabili di una minore distensibilità (minore pendenza della curva). Questa transizione è osservabile attorno a valori pressori di 10-15 mmHg in corrispondenza dei quali avviene il reclutamento delle fibre di collagene che intervengono in condizioni limite di esercizio per preservare l'integrità della parete del vaso. Da queste considerazioni si può concludere che in corrispondenza di range pressori arteriosi (80÷120 mmHg) il tessuto venoso si irrigidisce.

Per descrivere quantitativamente il comportamento biomeccanico del segmento di vena safena è stato calcolato l'indice di compliance del vaso come:

$$C = \frac{\Delta V / V_0}{\Delta P} \quad (3)$$

In Tabella 4.4 sono riportati a titolo di esempio i valori di compliance calcolati per il campione SV06. Analogamente a quanto detto in precedenza, i risultati relativi ai restanti campioni sono riportati in APPENDICE D.

$\Delta P$ [mmHg]	C [mmHg <sup>-1</sup> ]
0 ÷ 10	0.046
10 ÷ 20	0.018
20 ÷ 30	0.008
30 ÷ 40	0.007
40 ÷ 50	0.005
50 ÷ 60	0.004
60 ÷ 70	0.005
70 ÷ 80	0.003
80 ÷ 90	0.003
90 ÷ 100	0.004
100 ÷ 110	0.003
110 ÷ 120	0.004

**Tabella 4.4** Valori di compliance ricavati per il campione SV06.

Ai fini del progetto di tesi, si è voluta focalizzare l'attenzione sui valori di compliance relativi al range pressorio 80÷120 mmHg caratteristico dell'ambiente arterioso.

In Tabella 4.5 sono riportati i valori di compliance ottenuti relativi a tutti i campioni esaminati. Dalla media di questi valori si ottiene una compliance pari a 0.005 [mmHg<sup>-1</sup>].

	SV01	SV02	SV03	SV04	SV05	SV06	MEDIA
C <sub>80-120</sub> [mmHg <sup>-1</sup> ]	0.0039	0.0020	0.0041	0.0096	0.0068	0.0035	0.005

**Tabella 4.5** Valori di compliance ottenuti nell'intervallo 80-120 mmHg relativi a tutti i campioni esaminati.

I valori di compliance ottenuti risultano confrontabili (stesso ordine di grandezza) con i valori risultanti dal modello descritto nel paragrafo 4.2.3 nell'ipotesi di grandi deformazioni.

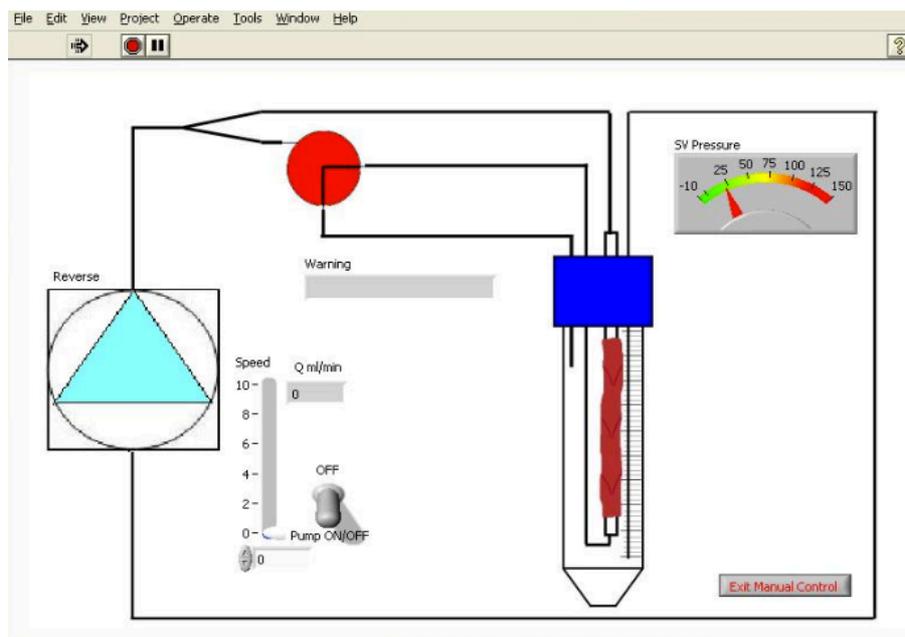
### 4.2.2. Collaudo del sistema di monitoraggio e controllo con sostituto artificiale

In questa fase, svolta presso il  $\mu$ BSLab, si sono volute verificare:

- La risposta degli attuatori sia in modalità di comando manuale che in fase di stimolazione ciclica;
- L'effettiva esecuzione da parte del sistema di controllo delle funzioni richieste.
- L'affidabilità del sistema per l'intera durata della campagna sperimentale.

Il test è stato eseguito alloggiando, al posto del segmento di vena safena, un tratto di tubo in silicone.

Il seguente protocollo descrive le procedure effettuate per la verifica del sistema in modalità manuale (Sub-VI Manual Control del software PINE (Figura 4.6)):



**Figura 4.6** Interfaccia grafica del Sub-VI Manual control.

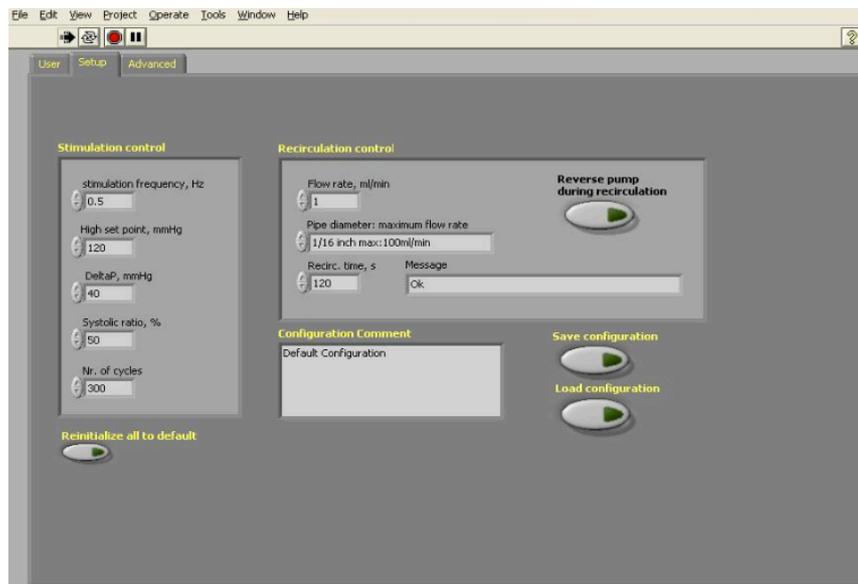
- Riempimento del sistema con acqua deionizzata come da protocollo riportato nel paragrafo 4.3.1.
- Verifica della risposta della pompa e dell'elettrovalvola ai comandi imposti dall'utente tramite l'interfaccia del software.
- Debollamento del circuito dall'aria presente nei tubi: mettendo il sistema in

configurazione di ricircolo e aumentando gradualmente la portata erogata della pompa si favorisce il movimento delle bolle verso il pelo libero della riserva.

- Verifica della risposta dell'indicatore della pressione istantanea presente nell'interfaccia del Sub-VI Manual Control: mettendo il sistema in configurazione di stimolazione e collegando al circuito uno sfigmomanometro, si verifica la correttezza del valore pressorio indicato dal software imponendo valori di pressione noti.
- Verifica dell'effettivo aumento di pressione all'interno del sostituto del vaso in configurazione di stimolazione attivando la pompa.

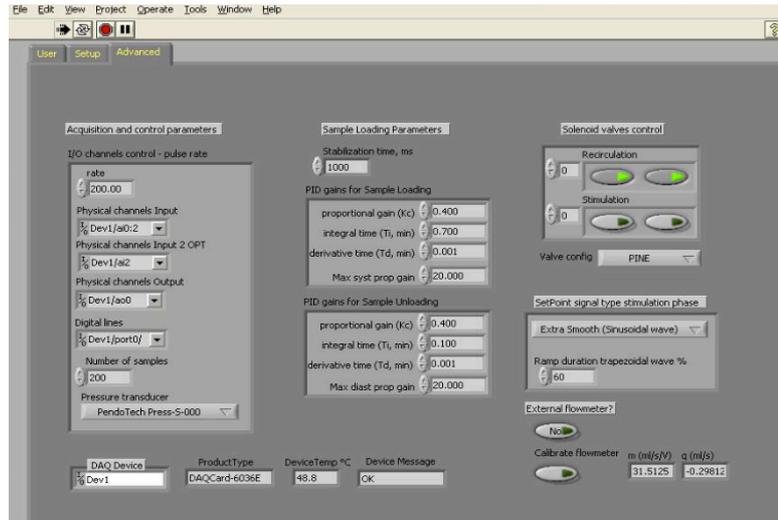
Successivamente si è passati a verificare il funzionamento del sistema in modalità automatica:

- Dal pannello Setup (Figura 4.7) sono stati impostati i parametri della stimolazione in modo da effettuare la pulsazione ciclica con una frequenza di 0.5 Hz, imponendo una pressione massima pari a 120 mmHg e un  $\Delta P$  pari a 40 mmHg.



**Figura 4.7** Sezione Setup dell'interfaccia del software PINE.

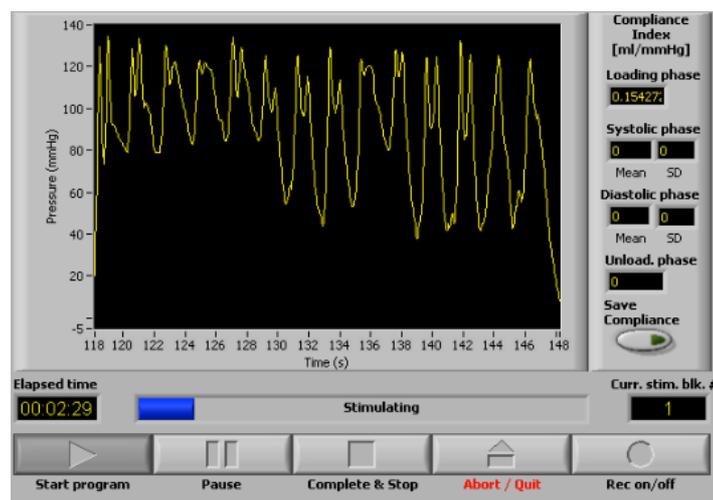
- Dal pannello Advanced (Figura 4.8) sono stati impostati i valori relativi al controllore PID in accordo con quelli ricavati teoricamente nel paragrafo 3.4.2.1 del capitolo precedente.



**Figura 4.8** Sezione Advanced dell'interfaccia del software PINE.

- Si è avviata la fase di stimolazione automatica vera e propria accedendo al Sub-VI Stimulation Control Panel del software PINE.

Avviando la stimolazione attraverso il pulsante Start Program, si è valutata la risposta del sistema alla sollecitazione pressoria. Gli andamenti pressori visualizzati hanno mostrato una fase di carico prolungata nel tempo e caratterizzata da fenomeni di overshoot che inficiavano il raggiungimento del set-point; la sottofase di pulsazione ciclica, invece, è risultata critica a causa delle forti oscillazioni provocate dal disturbo dovuto ai rulli della pompa peristaltica che non consentivano l'ottenimento del pattern  $80 \div 120$  mmHg (Figura 4.9).



**Figura 4.9** Interfaccia grafica del Sub-VI Stimulation Control Panel durante la sottofase di pulsazione ciclica risultata critica a causa delle forti oscillazioni provocate dai rulli della pompa peristaltica.

Per ovviare a questo inconveniente si è resa necessaria l'introduzione di uno smorzatore di pulsazioni, ovvero una camera di compliance, posta sulla linea di mandata della pompa, il cui dimensionamento è dettato dall'esigenza di ottenere l'andamento pressorio desiderato.

#### 4.2.2.1. Dimensionamento della camera di compliance

Dalla caratterizzazione meccanica dei campioni di vena safena (paragrafo 4.2.1), il valore medio di compliance normalizzata del segmento di vaso nel range pressorio 80÷120 mmHg risulta essere pari a circa  $3 \times 10^{-3}$  [mmHg<sup>-1</sup>]. A partire da questo valore, invertendo l'equazione (3) e considerando un valore medio del volume a riposo  $V_0$  pari a 0.44 ml (vedi Tabella 4.2), il volume  $\Delta V$  che la pompa deve fornire per generare all'interno del vaso un  $\Delta P$  pari a 40 mmHg risulta essere pari a circa 0.05 ml.

Considerando che la pompa peristaltica 323D con testa pompante 314D e tubo sottopompa di diametro interno pari a 1.6 mm e spessore 0.8 mm è in grado di erogare una portata massima pari a 100 ml/min in corrispondenza della velocità massima raggiungibile pari a 400 rpm (valori riportati nel datasheet), risulta che il guadagno della pompa per l'inserto sottopompa utilizzato è pari a 0.25 ml/giro. Poichè la testa pompante è dotata di 4 rulli, il volume di fluido compreso tra due rulli successivi risulta essere pari a 0.06 ml. Questo valore è confrontabile con quello necessario ad imporre il  $\Delta P$  desiderato al segmento di vaso, rendendo pertanto inevitabili i disturbi provocati dall'interazione dei rulli con il tubo sottopompa in fase di stimolazione. Da questa considerazione, risulta necessario incrementare il  $\Delta V$ , rendendolo, in misura significativa, maggiore rispetto al volume di fluido compreso tra due rulli successivi. Per fare ciò, si rende indispensabile inserire un elemento compliant aggiuntivo sulla linea di mandata della pompa.

Assumendo un valore di  $\Delta V$  pari a 0.1 ml, dato il  $\Delta P$  pari a 40 mmHg, la compliance complessiva del sistema, che tiene conto del contributo offerto dal segmento di vena safena e dall'elemento compliant aggiuntivo, deve essere almeno pari a 0.0025 ml/mmHg.

Se l'elemento compliant si realizza con una cassa d'aria, allora in base all'equazione (4):

$$\bar{C} = \frac{1}{k} \frac{V_0 P_0}{P_e^2} \quad (4)$$

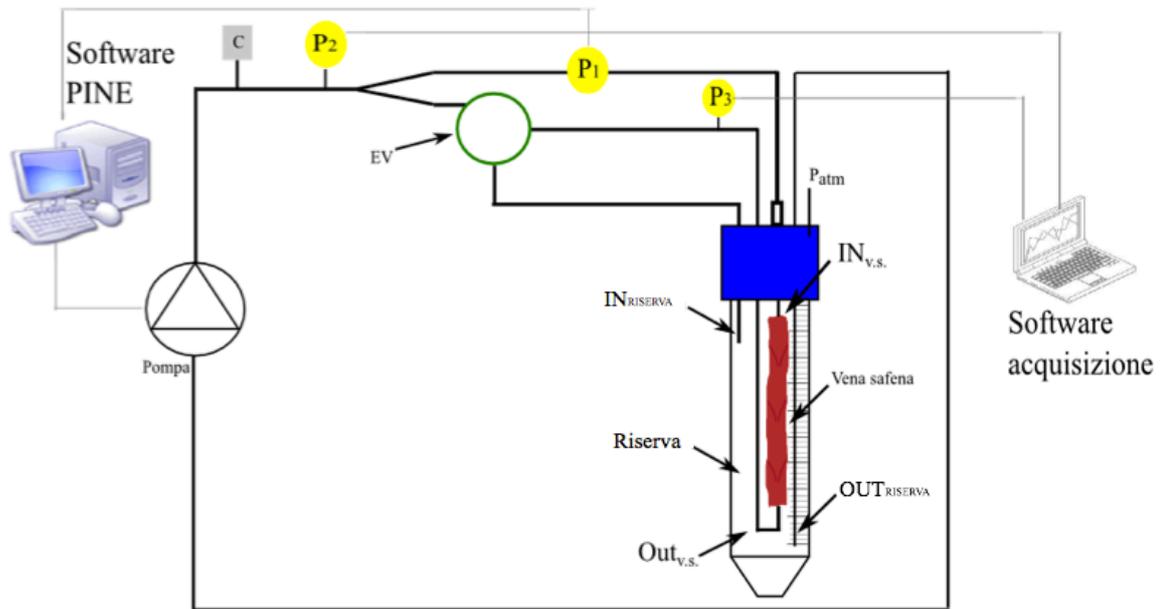
è possibile ricavare un valore di volume iniziale della camera d'aria necessario pari a 3.4 ml. (Per la trattazione completa si faccia riferimento all' APPENDICE E).

A partire da questo dimensionamento di massima, si è passati alla realizzazione dell'elemento compliant. Questo è stato ottenuto con una cassa d'aria realizzata mediante una siringa da 5 ml, in cui il volume ottimale di aria di riempimento è stato determinato in maniera sperimentale andando a valutare la risposta del sistema in fase di carico e di pulsazione ciclica (80÷120 mmHg) in termini di stabilità e ripetibilità delle curve pressorie. Dall'esperienza sperimentale, la migliore condizione si è ottenuta con un volume iniziale di aria pari a 3.8 ml. Questo volume corrisponde ad una compliance pari a 0.0028 [ml/mmHg] in esercizio. La configurazione ottimizzata sperimentalmente risulta pertanto confrontabile con quella ottenuta dal dimensionamento di massima sopra riportato.

#### **4.2.3. Caratterizzazione idraulica del sistema di coltura in esercizio**

La caratterizzazione idraulica del circuito di stimolazione è stata effettuata al fine di verificare la correttezza della sollecitazione imposta al segmento di vena safena (80÷120 mmHg) e, al contempo, di assicurare l'assenza di perdite di carico significative dovute alla geometria dei condotti in silicone.

A tal fine, sono stati individuati dei punti significativi lungo il circuito in corrispondenza dei quali compiere le misure di pressione. In Figura 4.10 è schematizzato il set-up allestito in cui  $P_1$  indica il sensore flow through (Press-S-000, PendoTech) integrato nel circuito idraulico,  $P_2$  e  $P_3$  i sensori di pressione (143PC05D, Honeywell, IL, USA) collocati negli appositi port rispettivamente a valle della camera di compliance (C) e in corrispondenza dell'uscita del vaso.



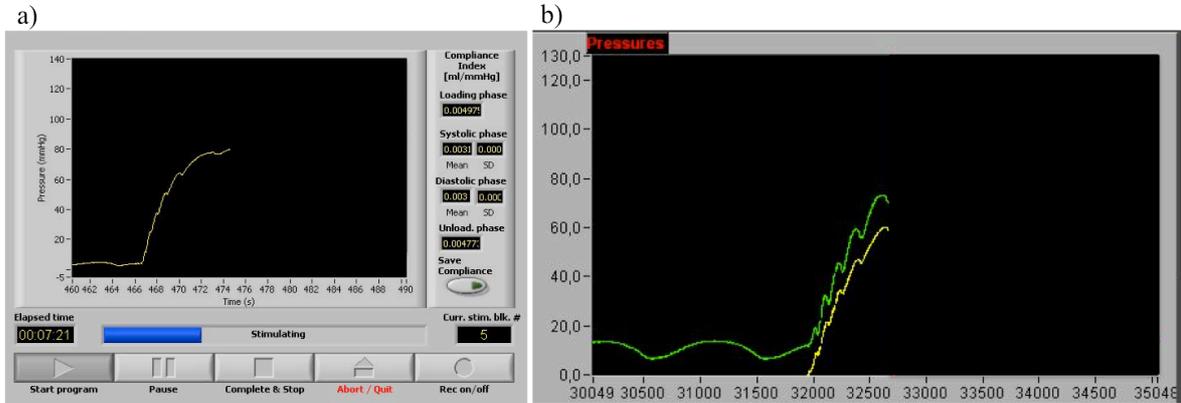
**Figura 4.10** Configurazione circuitale del set-up allestito per la caratterizzazione delle pressioni in gioco nel sistema di coltura.  $P_1$  indica il sensore flow through (Press-S-000, PendoTech) integrato nel circuito idraulico,  $P_2$  e  $P_3$  i sensori di pressione (143PC05D, Honeywell, IL, USA) collocati negli appositi port rispettivamente a valle della camera di compliance (C) e in corrispondenza dell'uscita del vaso.

Il segnale proveniente dal sensore  $P_1$  è stato registrato, come di consueto, dal software di stimolazione PINE. I segnali pressori provenienti dai sensori  $P_2$  e  $P_3$ , invece, sono stati acquisiti mediante una centralina che si interfaccia ad un PC attraverso una DAQCard (Figura 4.10); il software di acquisizione è sviluppato in ambiente LabView. Tutti gli elementi sopra elencati sono disponibili presso il  $\mu$ BSLab.

Dopo aver calibrato i sensori  $P_2$  e  $P_3$ , assemblato il sistema di coltura e riempito lo stesso con acqua deionizzata (come descritto nel paragrafo 4.3.1), la prova di caratterizzazione è stata condotta avviando la fase di stimolazione automatica mediante il Sub-VI Stimulation Control Panel del software PINE (come descritto nel paragrafo 4.2.1) e acquisendo contemporaneamente i tre segnali pressori. Qui di seguito sono riportati gli andamenti registrati durante la stimolazione pulsatile. Sono mostrate le immagini più significative.

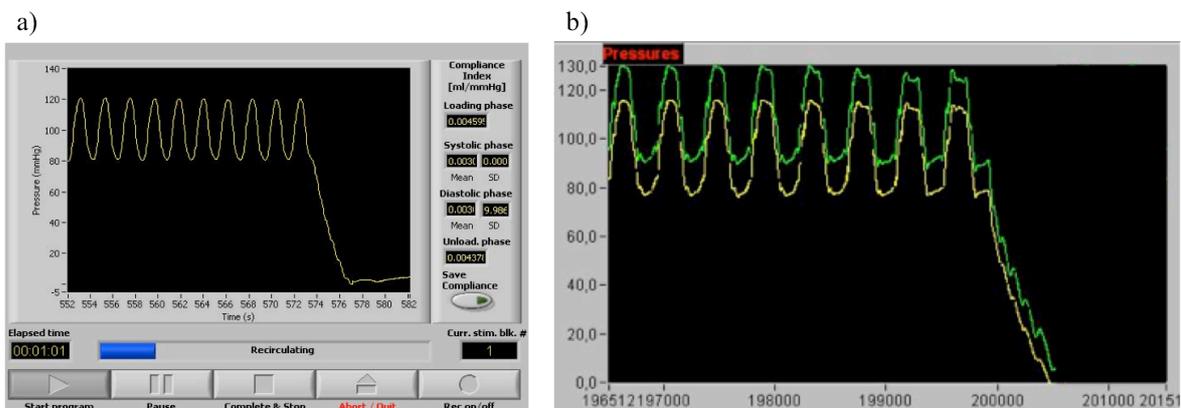
L'andamento del segnale relativo al sensore  $P_1$  è messo a confronto con i segnali provenienti dai sensori  $P_2$  e  $P_3$ .

In Figura 4.11 è mostrata la sottofase di carico (0÷80 mmHg). In particolare in Figura 4.11-a è riportato il segnale pressorio proveniente dal sensore P<sub>1</sub>, mentre in Figura 4.11-b, sono riportate le pressioni rilevate dai sensori P<sub>2</sub> (verde) e P<sub>3</sub> (giallo).



**Figura 4.11** Sottofase di carico: a) Segnale pressorio proveniente dal sensore P<sub>1</sub>; b) pressioni rilevate dai sensori P<sub>2</sub> (verde) e P<sub>3</sub> (giallo).

Analogamente, in Figura 4.12 (a e b) sono mostrate le sottofasi di pulsazione ciclica (80÷120 mmHg) e di scarico registrate dai tre sensori.



**Figura 4.12** Sottofasi di pulsazione ciclica e scarico: a) Segnale pressorio proveniente dal sensore P<sub>1</sub>; b) pressioni rilevate dai sensori P<sub>2</sub> (verde) e P<sub>3</sub> (giallo).

Come si evince dalle figure sopra riportate, la camera di compliance svolge correttamente la sua funzione di smorzatore delle oscillazioni causate dai rulli della pompa, permettendo di ottenere l'andamento pressorio desiderato durante l'intero ciclo di stimolazione. Questo è dimostrato dalla regolarità delle curve pressorie riportate in verde nelle figure. In fase di carico (Figura 4.12), confrontando la pressione rilevata dal sensore P<sub>2</sub> con quelle rilevate dai sensori P<sub>1</sub> e P<sub>3</sub>, rispettivamente in ingresso e in uscita dal vaso, si

può dedurre che non sono presenti perdite di carico indesiderate in corrispondenza delle biforcazioni all'interno del circuito.

Infine, è possibile osservare che le cadute di pressione a cavallo del sostituto del vaso risultano trascurabili in quanto le pressioni registrate a monte e a valle dello stesso sono confrontabili. Pertanto, poiché le perdite di carico sono funzione della geometria del condotto ed essendo il sostituto di dimensioni paragonabili al segmento di vena safena umana, si può ipotizzare un comportamento simile anche in fase di esercizio in presenza del campione biologico.

#### **4.2.4. Collaudo del sistema di monitoraggio e controllo con un segmento di vena safena**

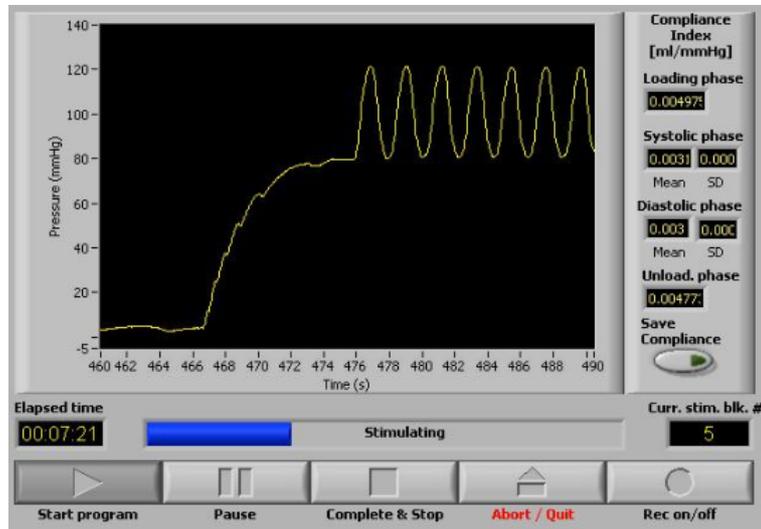
Questa fase si è svolta presso il Centro Cardiologico Monzino ed è stata finalizzata alla validazione del dimensionamento della camera di compliance necessaria per smorzare le oscillazioni dovute ai rulli della pompa peristaltica (paragrafo 4.2.2) e alla definizione dei parametri del controllore PID. In questo caso, il sistema è stato allestito in modo da replicare le condizioni di coltura e, a tal fine, è stato alloggiato un tratto di vena safena all'interno della camera di coltura; il sistema è stato riempito con acqua deionizzata.

L'esperienza ha dimostrato che, anche in presenza del segmento di vena safena alloggiato all'interno del sistema di coltura, la camera di compliance svolge la sua funzione di smorzatore delle oscillazioni causate dai rulli della pompa, confermando il corretto dimensionamento della compliance stessa.

Per quanto riguarda la definizione dei parametri del controllore PID, questi sono stati settati tenendo in considerazione non solo la compliance relativa al segmento di vaso, ma anche il contributo della compliance addizionale. Da ciò deriva un  $K_p$  di un ordine di grandezza maggiore rispetto a quello ottenuto nel capitolo precedente (paragrafo 3.4.2.1). In fase di carico si è reso necessario, inoltre, di impostare un valore di  $T_i$  maggiore rispetto a quello presente di default nel software al fine di ottenere una maggiore stabilità del sistema in termini di raggiungimento del valore pressorio di set-point minimizzando gli overshoot, anche se in tempi più lunghi.

In Figura 4.13 è riportata l'interfaccia grafica del Sub-VI di stimolazione in configurazione

di esercizio che mostra un andamento regolare delle curve pressorie in fase di carico e di pulsazione ciclica.



**Figura 4.13** *Interfaccia grafica del Sub-VI Stimulation Control Panel in fase di carico e di pulsazione ciclica.*

### 4.3.Verifica del mantenimento della sterilità

Tutti i sistemi di coltura che prevedono l'utilizzo di materiali biologici devono soddisfare il requisito della sterilità e del mantenimento della stessa durante tutta la coltura. Questo perché la presenza di eventuali microrganismi è potenzialmente dannosa per la vitalità e funzionalità del campione biologico inserito all'interno del dispositivo.

Il processo di sterilizzazione prevede i seguenti passaggi:

- Lavaggio dei componenti: questa operazione consiste nel lavare le parti del sistema di coltura in PMMA e il circuito idraulico utilizzando acqua deionizzata addizionata di soluzione detergente.
- Decontaminazione dei componenti: durante questa fase si effettua la disinfezione del telaio portavaso e del circuito idraulico; il primo viene immerso in una miscela di acqua deionizzata e Anyosime DD1 (Laboratoires Anios, Lille-Hellemmes, Francia), un detergente tri-enzimatico; il secondo è disinfettato facendo fluire al suo interno etanolo al 70% (alcool isopropilico al 70% in soluzione acquosa). In entrambi i casi si effettua un risciacquo finale con acqua deionizzata.

Lo scopo di queste due fasi è diminuire la carica batterica iniziale presente in tutti i componenti. Al loro termine i pezzi vengono consegnati al reparto di sterilizzazione del Centro Cardiologico Monzino, dove vengono imbustati e spediti alla centrale di sterilizzazione in EtO di competenza.

- Sterilizzazione in EtO: è un processo che avviene a temperature relativamente basse (50-60 °C), pertanto adatto al trattamento di materiali polimerici, e inattiva tutti i tipi di microrganismi incluse le spore di batteri e i virus.

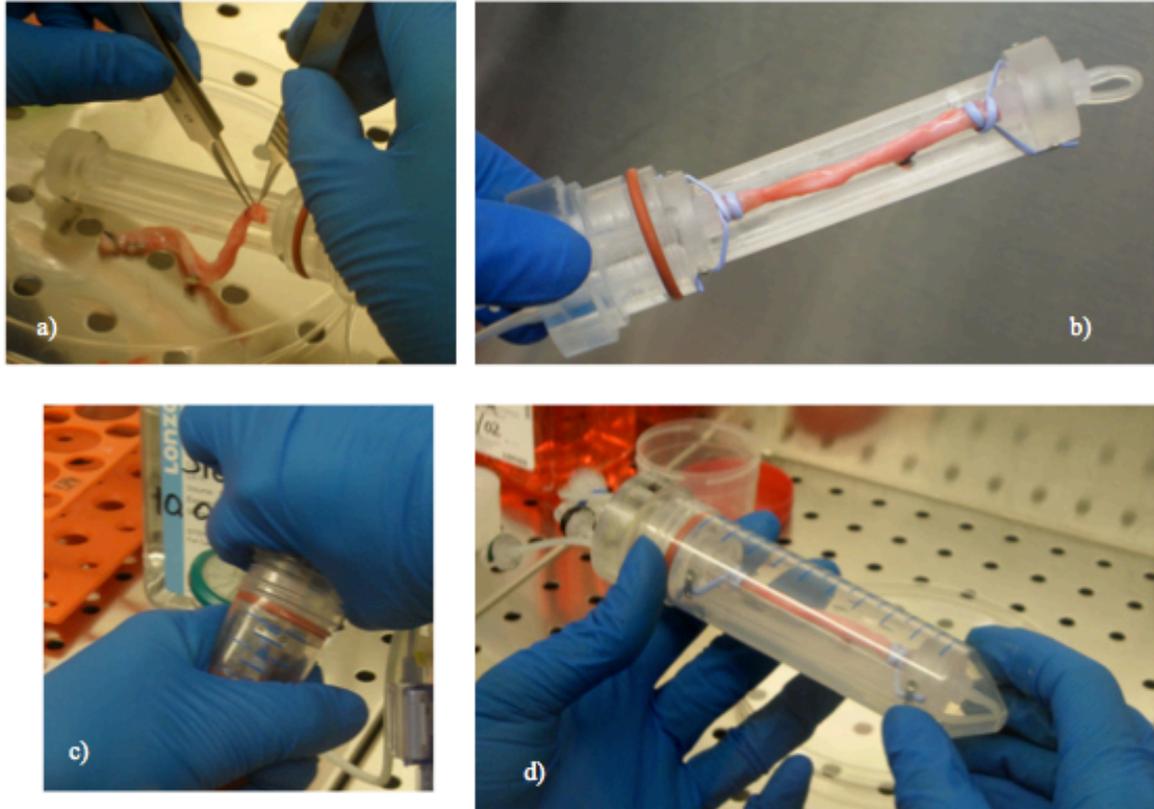
#### **4.3.1. Protocollo di assemblaggio del sistema di coltura in ambiente sterile**

Prima di essere messo in esercizio, il sistema richiede l'assemblaggio sotto cappa a flusso laminare. Tutte le operazioni necessarie devono essere svolte secondo le norme di buona pratica di laboratorio al fine di garantire il mantenimento della sterilità.

I componenti da assemblare sono: il telaio portavaso, la riserva e la circuiteria in silicone. Ad eccezione della riserva, reperibile già sterile, gli altri due elementi del sistema sono sterilizzati in EtO e imbustati separatamente. Per favorire le operazioni di montaggio sotto cappa si è scelto di sterilizzare i tubi in silicone già assemblati tra di loro così da dover soltanto connettere le estremità della circuiteria con i connettori presenti sul tappo della camera di coltura.

Una volta trasferito tutto il materiale sterile sotto cappa, si procede con l'assemblaggio del sistema: si apre la busta 1 contenente il telaio portavaso e lo si posiziona su una piastra di Petri sterile; successivamente si prende il segmento vena safena, proveniente dalla sala operatoria e mantenuta a 4°C in terreno base DMEM addizionato a 1% L-glutamina, 1% penicillina-streptomicina e 10% siero fetale bovino (FBS), la si calza sui connettori e la si assicura ad essi mediante il vessel loop (Figura 4.14, a-b). Il passo successivo consiste nell'introdurre il telaio portavaso nella riserva, costituita dalla Falcon da 50 ml (Figura 4.14, c-d) e di connettere la circuiteria sterile, contenuta nella busta 3, alla riserva mediante i port presenti sul tappo del telaio portavaso; inoltre si posiziona il filtro HEPA in corrispondenza del port ad esso dedicato. A questo punto si procede con il riempimento del sistema con 40 ml di medium utilizzando una siringa connessa ad un'estremità libera del circuito ottenuta disaccoppiando il tubo sottopompa dal

resto del circuito. Il terreno di coltura è costituito da DMEM addizionato a 1% L-glutammina, 2% penicillina-streptomina e 10% siero fetale bovino (FBS).



**Figura 4.14** Foto di alcune delle operazioni effettuate sotto cappa a flusso laminare durante le operazioni di assemblaggio del sistema in ambiente sterile.

Il protocollo di assemblaggio, definito e ottimizzato in collaborazione con lo staff di biologi, è riportato in APPENDICE C.

In Figura 4.15 si riporta una rappresentazione schematica a blocchi delle operazioni effettuate sotto cappa.

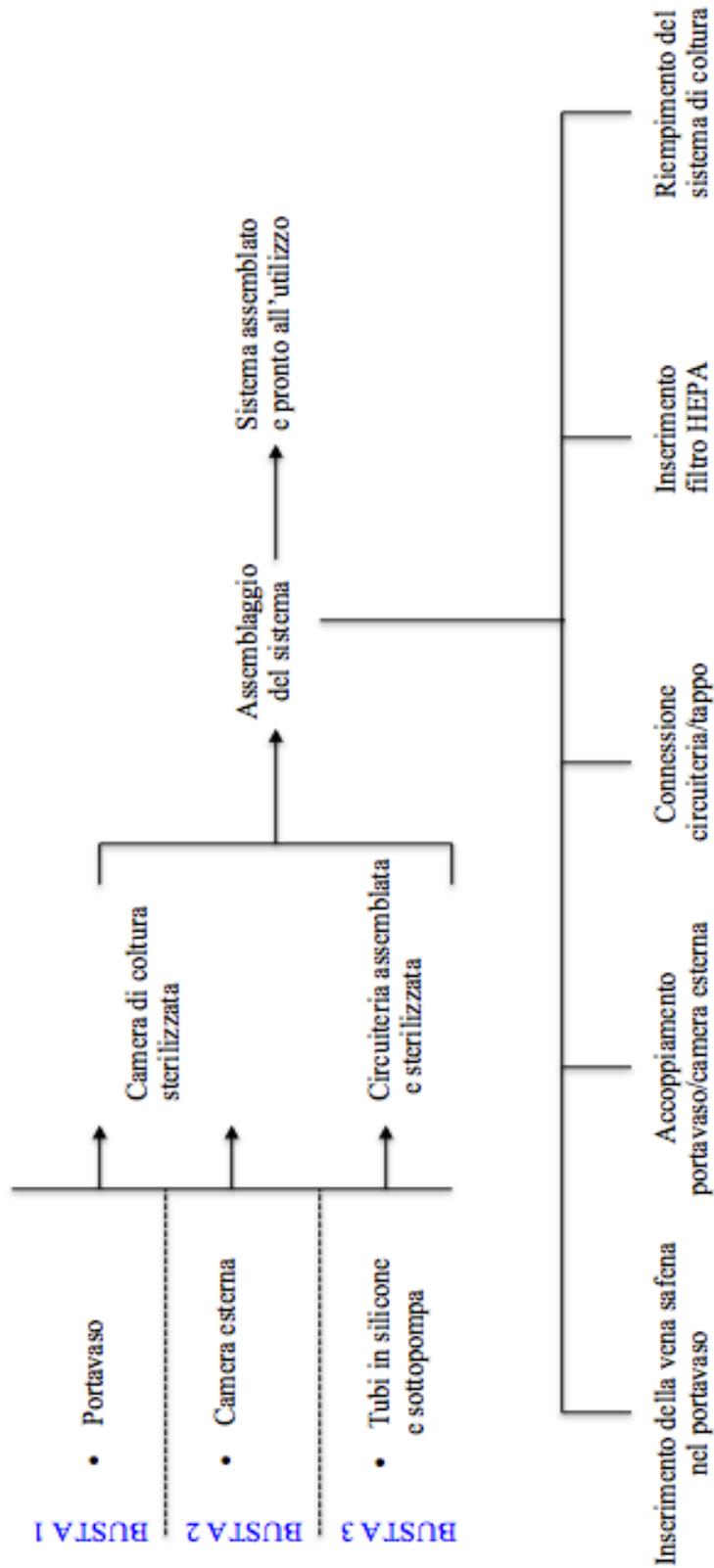
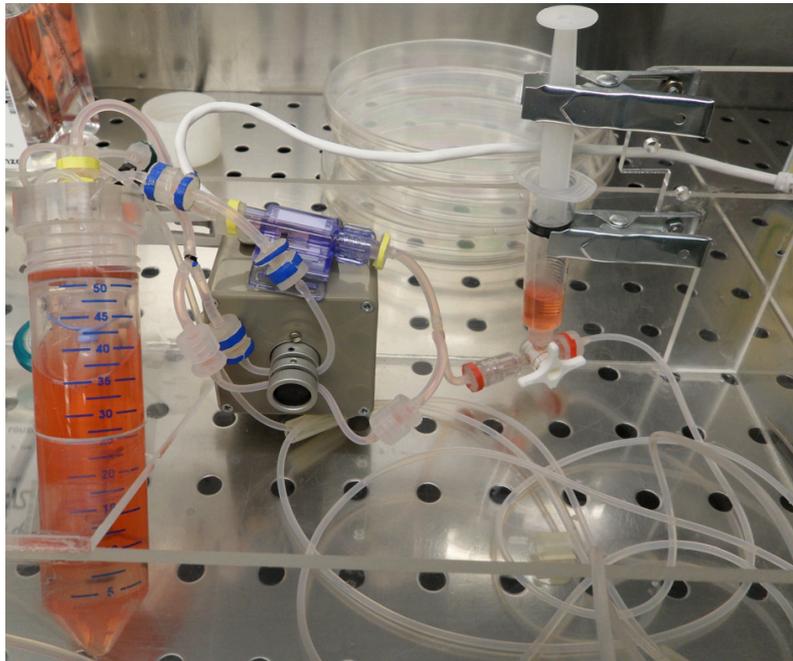


Figura 4.15 Schematizzazione delle operazioni effettuate per assemblare il dispositivo.

Il sistema di coltura assemblato sotto cappa è mostrato in Figura 4.16:



**Figura 4.16** Sistema assemblato sotto cappa a flusso laminare.

### 4.3.2. Prove di verifica del mantenimento della sterilità

I test preliminari di verifica del mantenimento della sterilità del dispositivo di coltura realizzato sono stati effettuati al fine di accertare l'assenza di microorganismi e agenti contaminanti potenzialmente dannosi per la vitalità del campione biologico in esame.

Le prove sono state condotte seguendo i protocolli di sterilizzazione e assemblaggio in ambiente sterile descritti nei paragrafi 4.3 e 4.3.1. Il riempimento del sistema è stato effettuato con il terreno base RPMI 1640 (Roosvelt Park Memorial Institute, Lonza Group LTD, Basilea, Svizzera) non addizionato con antibiotici. Il tutto è stato posto all'interno di un incubatore ( $T=37^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{CO}_2=5\%$ , umidità=95%) per un tempo pari a sette giorni durante i quali è previsto un ricambio parziale di medium (a tre giorni dall'inizio della prova). Per verificare l'assenza di contaminazione sono state condotte analisi microbiologiche su aliquote di medium (2 ml) prelevate dalla bottiglia contenente il terreno di coltura e dalla riserva (all'inizio, in fase di ricambio del medium e al termine

della prova) e mantenute in un terreno tioglicolato fluido BBL<sup>3</sup> (BD, Becton, Dickinson and Company, Maryland, USA).

Le prime prove sono state eseguite alloggiando all'interno del sistema di *organ culture* un sostituto artificiale del campione biologico, costituito da un tubo in silicone sterile di dimensioni paragonabili a quelle del segmento di vena safena. In questo modo si è potuto valutare in modo indipendente l'effetto dei componenti (camera di coltura, circuiteria e vaso) sul mantenimento della sterilità.

In Tabella 4.6 è presente uno schema riassuntivo delle prove volte a testare il mantenimento della sterilità da parte del sistema di coltura. Queste sono state condotte in parallelo sui quattro dispositivi realizzati.

	<b>Tratto alloggiato</b>	<b>Condizioni di prova</b>
Prototipo 1	Tubo in silicone (sostituto artificiale)	Statica Perfusione
	Vena safena umana	Statica Perfusione

**Tabella 4.6** Schema riassuntivo delle prove di mantenimento della sterilità condotte sulle quattro camere di coltura realizzate.

Le prove in configurazione di perfusione prevedono che il medium prelevato dalla camera fluisca all'interno del vaso (o del suo sostituto) e rientri nella riserva attraverso la circuiteria in silicone. La movimentazione del medium è realizzata mediante una pompa peristaltica Watson&Marlow con testa pompante multicanale 318MC al fine di ottenere una portata pari a 5 ml/min. Il tubo sottopompa utilizzato durante la prova ha diametro interno pari a 1.02 mm. Nelle prove che prevedono la presenza del campione biologico il terreno di coltura è stato addizionato con 1% di antibiotici (penicillina-streptomicina).

<sup>3</sup> Il terreno tioglicolato fluido BBL è un terreno universale per la coltivazione di anaerobi, microaerofili e aerobi ed è raccomandato come terreno per i test di sterilità per i prodotti biologici.

#### **4.3.2.1. Risultati delle prove di verifica del mantenimento della sterilità**

Le analisi microbiologiche effettuate sui campioni di medium prelevati durante le prove di mantenimento della sterilità eseguite sui prototipi realizzati hanno fornito esito negativo per la presenza di germi aerobi, anaerobi e miceti.

In APPENDICE F sono riportati i referti delle analisi microbiologiche che attestano l'assenza di contaminazione.

## Capitolo 5

### Utilizzo del sistema in campagne sperimentali preliminari con campioni di vena safena umana

In questo capitolo sono descritti i risultati relativi alle campagne sperimentali preliminari condotte utilizzando il dispositivo progettato con campioni di vena safena umana. Tutte le prove sono state condotte presso l'I.R.C.C.S. Centro Cardiologico Monzino. I campioni impiegati durante questi test preliminari e provenienti dalla sala operatoria erano destinati alla ricerca in quanto segmenti non utilizzabili negli interventi di CABG.

#### 5.1. Messa in esercizio del sistema di coltura

Dopo aver collaudato e verificato il mantenimento della sterilità da parte del sistema, esso è stato trasferito presso il LIT del Centro Cardiologico Monzino dove sono state condotte alcune campagne sperimentali preliminari sul dispositivo realizzato.

Il sistema di coltura prevede l'alloggiamento al suo interno di segmenti di vena safena di lunghezza pari a 7cm. Per ogni campione di vena safena, un tratto lungo 0.5 cm è immediatamente fissato in paraformaldeide e costituisce il campione di controllo.

Le campagne sperimentali si distinguono in prove di perfusione e prove di stimolazione. In Tabella 5.1 sono riassunte le prove eseguite.

Prove	Campione	Condizioni di prova	Analisi istomorfologiche
Perfusione	SV65	Q=5 ml/min P=15 mmHg Durata: 7 giorni	Immunofluorescenza
	SV73	Q=10 ml/min P=30 mmHg Durata: 7 giorni	Colorazione di Masson Zimografia

Prove	Campione	Condizioni di prova	Analisi istomorfologiche
Stimolazione	SV69 SV73	P=80÷120 mmHg (pulsatile) Freq di pulsazione: 0.5 Hz N° cicli=300 T <sub>stimolazione</sub> =10 min Q <sub>ricircolo</sub> =1ml/min T <sub>ricircolo</sub> = 2 min Durata: 7 giorni	Colorazione di Masson Zimografia

**Tabella 5.1** Schema riassuntivo delle prove condotte sul prototipo 1.

In particolare, le prove di perfusione sono state eseguite al fine di valutare la vitalità del tessuto biologico sottoposto ad una condizione di flusso e pressione costante: per la prima prova è stata imposta una portata pari a 5 ml/min che determina una pressione intraluminale pari a 15 mmHg; la seconda prova è caratterizzata da una portata di 10 ml/min responsabile di una pressione di 30 mmHg all'interno del vaso.

Le prove di stimolazione, invece, sono state condotte imponendo al segmento di vena safena una pressione pulsatile 80÷120 mmHg al fine di riprodurre la sollecitazione pressoria dell'ambiente arterioso e valutarne l'effetto sul vaso posto in coltura. Sono stati effettuati due test di questo tipo. Uno di essi è stato condotto in parallelo ad una prova di perfusione (quella caratterizzata da una portata più elevata) utilizzando per entrambe le prove tratti vascolari provenienti dallo stesso paziente.

Analisi istomorfologiche sono state condotte da parte del personale biologico su porzioni di tessuto nativo e sui campioni sottoposti a coltura dinamica al fine di ottenere un confronto tra di essi. In particolare, i campioni di safena fissati in paraformaldeide al 4%, inclusi in paraffina e tagliati in sezioni di spessore pari a 5 µm sono stati sottoposti a colorazione tricromica di Masson (vedi APPENDICE F), un metodo di elezione per il tessuto connettivo, particolarmente indicato per nuclei, collagene e fibrille intracellulari. In seguito, le sezioni sono state esaminate mediante microscopia ottica. Alcune sezioni sono state colorate anche con ematossilina/eosina (H/E), che colora in blu (grazie all'ematossilina) i componenti cellulari carichi negativamente e in rosso/rosato (grazie all'eosina) i componenti carichi positivamente. Su ciascun campione sottoposto a coltura sono state effettuate anche analisi zimografiche. La zimografia è una tecnica elettroforetica

che permette di quantificare l'attività proteolitica di specifici enzimi quali, ad esempio, le metalloproteinasi MMP-2 e MMP-9.

Fa eccezione il segmento di safena proveniente dalla prima prova di perfusione, il quale è stato sezionato, analizzato mediante tecniche di immunofluorescenza e osservato al microscopio confocale.

### **5.1.1.Procedura di messa in esercizio del sistema di coltura**

La seguente procedura descrive le operazioni da eseguire per la messa in esercizio del dispositivo:

- Sterilizzazione dei componenti: si faccia riferimento al precedente capitolo (paragrafo 4.3) per il protocollo dettagliato.
- Assemblaggio in ambiente sterile del sistema: si faccia riferimento al capitolo precedente (paragrafo 4.3.1) per il protocollo dettagliato.
- Realizzazione delle connessioni tra circuito idraulico e componenti hardware del sistema di monitoraggio e controllo: il tubo sottopompa viene collocato nella sua sede all'interno della testa pompante; i tubi destinati all'elettrovalvola vengono inseriti negli appositi organi di occlusione; il sensore di pressione, la pompa e l'elettrovalvola vengono collegati alla centralina di cablaggio, la quale, a sua volta, è interfacciata al PC mediante la DAQCard. Tutti i componenti hardware, eccetto l'elettrovalvola e il sensore di pressione già integrato nel circuito idraulico, vengono collocati all'esterno dell'incubatore e in prossimità di esso. Tutte le connessioni idrauliche ed elettriche tra i componenti all'interno e quelli all'esterno dell'incubatore vengono fatte passare attraverso un foro presente sulla parete posteriore dell'incubatore stesso.
- Verifica del sistema di monitoraggio e controllo: una volta effettuate tutte le connessioni tra circuito idraulico e componenti hardware, si effettua una verifica preliminare del sistema di monitoraggio e controllo, come descritto nel paragrafo 4.2.2 del precedente capitolo.
- Incubazione: il sistema di coltura assemblato viene posto all'interno dell'incubatore ( $T=37^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{CO}_2=5\%$ , umidità=95%) insieme all'elettrovalvole. La durata

## Capitolo 5: Utilizzo del sistema in campagne sperimentali preliminari con campioni di vena safena umana

dell'incubazione è di 7 giorni, durante i quali è previsto un ricambio parziale di medium.

- Avviamento del sistema di monitoraggio e controllo: si avvia la fase di stimolazione pulsatile mediante il Sub-VI Stimulation Control Panel del software PINE.
- Ricambio medium: viene effettuato dopo 3 o 4 giorni dall'inizio dell'incubazione; consiste nel prelievo di 20 ml di medium di coltura e nell'introduzione della stessa aliquota di medium fresco.
- Svuotamento e decontaminazione finale: al termine dei 7 giorni di coltura, il sistema viene disassemblato e, se presente, il campione biologico viene fissato in paraformaldeide dal biologo per essere sottoposto in seguito ad analisi istomorfologiche. Si esegue, quindi, una decontaminazione finale del sistema di coltura analoga a quella descritta per la fase di sterilizzazione.
- Analisi istomorfologiche (condotte dal biologo).

Allo stato attuale, il sistema richiede un controllo da parte dell'operatore ogni 6/8 ore di funzionamento (escluso l'*overnight*) con lo scopo di verificare il corretto svolgimento delle fasi di stimolazione pulsatile e di ricircolo del medium.

### **5.1.2. Risultati delle campagne sperimentali con campioni di vena safena umana**

Di seguito sono riportati i risultati preliminari relativi alle prove di messa in esercizio del dispositivo con tratti di vena safena umana. I risultati saranno classificati in base alle condizioni di prova e al campione utilizzato.

#### **- Prova di perfusione con campione SV65**

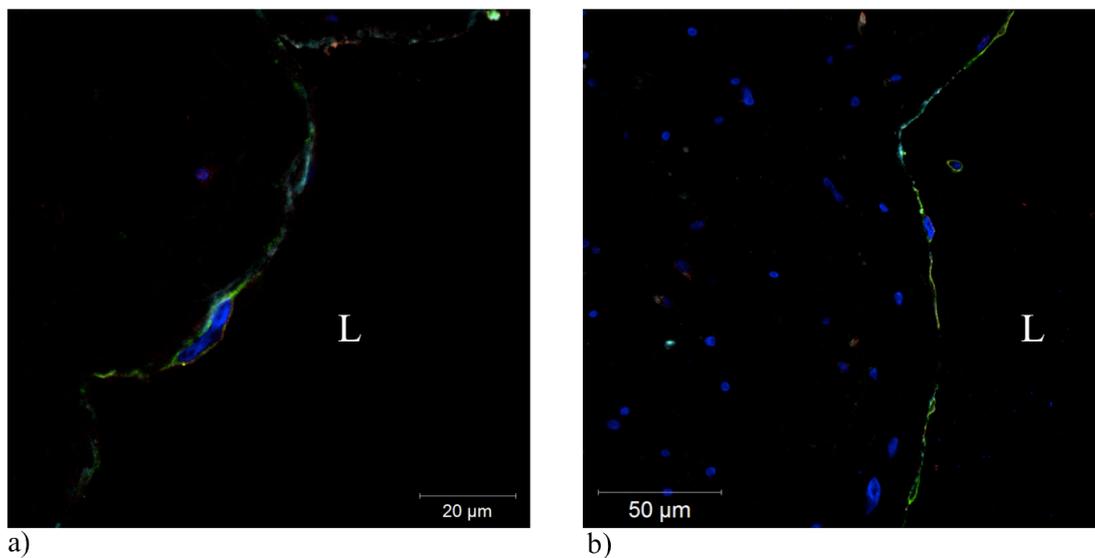
Il campione di vena safena umana SV65 è stato sottoposto ad una prova di sola perfusione della durata di 7 giorni imponendo una portata tipica venosa e pari a 5 ml/min [28].

Dopo il fissaggio in paraformaldeide e l'inclusione in paraffina, sono state eseguite analisi di immunofluorescenza su sezioni di spessore pari a 5  $\mu\text{m}$  ottenute sezionando il

## Capitolo 5: Utilizzo del sistema in campagne sperimentali preliminari con campioni di vena safena umana

campione di controllo e la vena sottoposta a perfusione. A tal fine sono stati utilizzati specifici anticorpi per marcare le proteine CD31 e CD34, l' $\alpha$ -actina delle SMCs (*SMA - Smooth Muscle Actin*) e il fattore di von Willebrand (vWF), come riportato in letteratura [1, 36]. Per la visualizzazione dei nuclei delle cellule è stata effettuata la colorazione con DAPI, un agente intercalante del DNA che si lega in corrispondenza delle basi adenina-timina. Infine, le sezioni sono state visualizzate al microscopio confocale e le immagini digitali sono state acquisite attraverso il software ZEN 2008 (Carl Zeiss®, Germania).

In Figura 5.1 sono riportate le immagini ottenute con il microscopio confocale relative al campione di controllo (Figura 5.1, a) e al campione perfuso per 7 giorni (Figura 5.1, b). In blu sono indicati i nuclei delle cellule (DAPI), in rosso, in celeste e in verde sono visualizzati i markers endoteliali CD31, vWF e CD34, rispettivamente. La lettera L sta ad indicare il lume del vaso.



**Figura 5.1** Immagini a fluorescenza ottenute al microscopio confocale: a) campione di controllo, b) campione perfuso per 7 giorni. Le marcature con gli anticorpi contro i markers di endothelialità CD31, vWF e CD34, dimostrano la presenza di uno strato endoteliale sulla superficie interna del vaso in entrambi i campioni. La lettera L indica il lume del vaso.

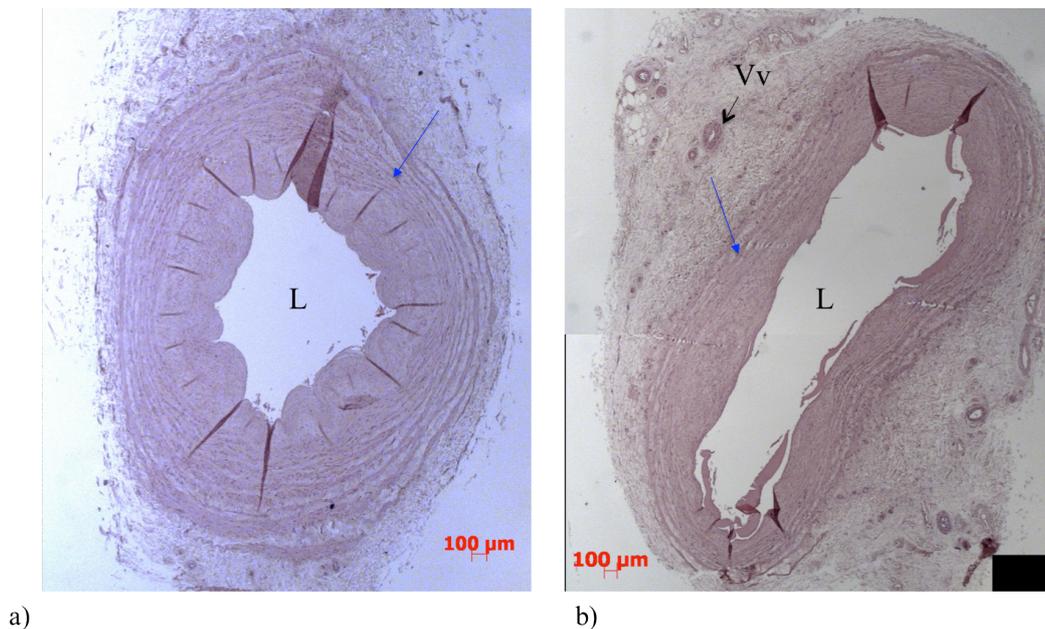
Come si può evincere dalla Figura 5.1 (a e b), la marcatura diretta alle cellule endoteliali dimostra la presenza di questo tipo cellulare in corrispondenza della superficie interna del vaso sia nel campione di controllo che nel campione perfuso, a conferma della mantenuta vitalità del tessuto vascolare. L'aumentata numerosità cellulare presente in

Figura 5.1-b (colorazione con DAPI, blu) potrebbe essere correlata alla migrazione delle SMCs dalla media verso l'intima.

- Prova di stimolazione con campione SV69

Il campione di vena safena umana SV69 è stato sottoposto ad una prova di stimolazione pulsatile della durata di 7 giorni ed in condizioni riportate in Tabella 5.1.

I preparati istologici sono stati sottoposti alle colorazioni H/E e tricromica di Masson e sono stati osservati al microscopio ottico con ingrandimento 2.5x. La Figura 5.2 mostra due immagini ottenute al microscopio ottico relative a segmenti di vena safena umana colorate con H/E. L'ematossilina colora in blu/violaceo i componenti cellulari carichi negativamente come acidi nucleici, proteine di membrana, membrane cellulari, elastina, mentre l'eosina colora in rosso/rosato i componenti carichi positivamente come ad esempio fibre di collagene.

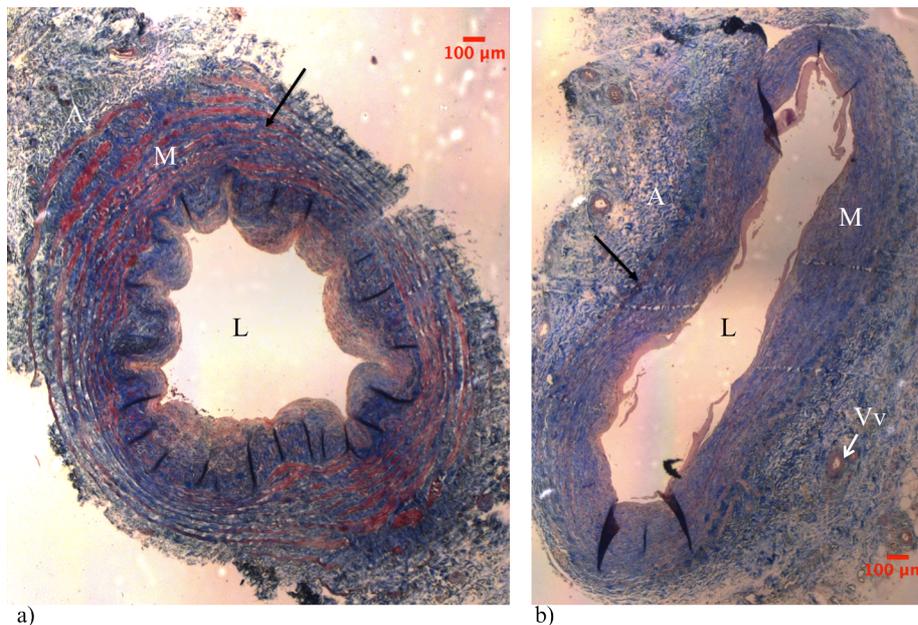


**Figura 5.2** Immagini ottenute al microscopio ottico di sezioni di segmenti di vena safena umana sottoposte alla colorazione H/E. a) campione di controllo; b) campione posto in coltura in condizioni di perfusione pulsatile per 7 giorni. Le frecce blu indicano l'allineamento circonferenziale delle SMCs, L il lume del vaso e Vv i vasa vasorum.

In Figura 5.2-a è rappresentato il campione di controllo, mentre in Figura 5.2-b il campione sottoposto a 7 giorni di stimolazione pulsatile. Dalle foto è possibile osservare l'integrità della parete vascolare ed inoltre in entrambi i campioni si può notare un allineamento

circonferenziale delle SMCs e una normale ECM a conferma della mantenuta vitalità del campione in seguito alla coltura *ex vivo*.

In Figura 5.3 sono riportate le immagini relative alla colorazione tricromica di Masson delle sezioni del campione di controllo (Figura 5.3, a) e del campione stimolato per 7 giorni (Figura 5.3, b). La colorazione tricromica di Masson permette di visualizzare in nero i nuclei, in rosso le fibre muscolari e in blu il collagene.



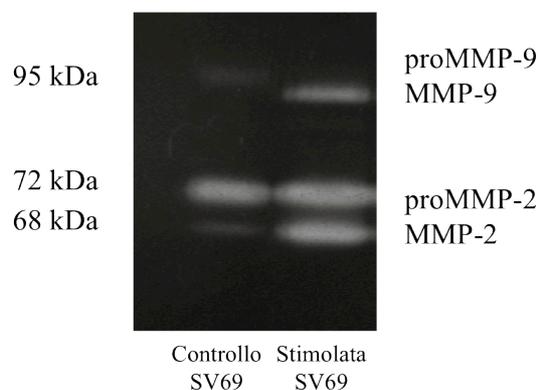
**Figura 5.3** Immagini ottenute al microscopio ottico di sezioni di segmenti di vena safena umana sottoposte alla colorazione tricromica di Masson. a) campione di controllo; b) campione posto in coltura in condizioni di perfusione pulsatile per 7 giorni. L indica il lume del vaso, M la tunica media, A la tunica avventizia e Vv i vasa vasorum. È possibile visualizzare in nero i nuclei, in rosso le fibre muscolari e in blu il collagene. Le frecce nere indicano l'allineamento circonferenziale delle SMCs.

In particolare, in Figura 5.3-a sono evidenti (in rosso) le fibre muscolari disposte in direzione circonferenziale (indicato con la freccia nera) tipiche della tunica media delle vene. La tunica più esterna, l'avventizia, ha contorni poco definiti e in Figura 5.3-b sono individuabili al suo interno i vasa vasorum. Inoltre, su queste sezioni sono state effettuate analisi morfometriche utilizzando il software AxioVision Bio (Carl Zeiss®). Esse hanno mostrato che il campione sottoposto a coltura in condizioni di stimolazione pressoria arteriosa va incontro ad una diminuzione dello spessore della tunica media e ad un aumento dell'area luminale, se paragonato con le sezioni ottenute dal campione di controllo. Infatti, lo spessore medio passa da un valore pari a  $0.80 \pm 0.005$  mm del tessuto

nativo a  $0.52 \pm 0.02$  mm del campione sottoposto a coltura dimostrando un decremento pari a circa il 65%; l'area luminale, invece, passa da un valore medio di  $0.89 \pm 0.09$  mm<sup>2</sup> a  $1.78 \pm 0.32$  mm<sup>2</sup>. Questa misura è stata effettuata delimitando i contorni del lume attraverso un apposito *tool* del software, il quale, a sua volta, restituisce la misura dell'area delimitata. Come riportato in letteratura [1], l'incremento dell'area luminale in risposta ad un flusso arterioso potrebbe essere correlato alla proliferazione cellulare delle SMCs che comporta una riorganizzazione della parete vascolare.

Con lo scopo di valutare l'attività proteolitica delle MMPs sono state eseguite analisi zimografiche. Brevemente, si ricorda che le MMPs sono delle proteasi che, se attivate, con la loro azione favoriscono la migrazione e la proliferazione delle SMCs, eventi che contribuiscono alla formazione di neointima nel VGD [10].

Le analisi zimografiche hanno mostrato un incremento dell'attività proteolitica dell'MMP-2 e dell'MMP-9 nel campione stimolato. In Figura 5.4 è riportato lo zimogramma relativo alle prove effettuate. Tale zimogramma mostra tre zone in corrispondenza del peso molecolare caratteristico della MMP-2, pari a 68 kDa, della proMMP-2 (forma inattiva della MMP-2), pari a 72 kDa, e delle proMMP-9 e MMP-9, per entrambe attorno ai 95 kDa.



**Figura 5.4** Zimogramma rappresentativo dell'attività proteolitica delle MMP nel campione di controllo e in quello stimolato per 7 giorni. La banda a 95 kDa indica il peso molecolare delle proMMP-9 e delle MMP-9; le zone a 72 kDa e a 68 kDa indicano, rispettivamente, il peso molecolare della proMMP-2 e della MMP-2 nella forma attiva.

Come si evince dalla Figura 5.4, il campione sottoposto a stimolazione pulsatile per 7 giorni è caratterizzato da una maggiore espressione della MMP-9, da un incremento dell'espressione della MMP-2. Questi risultati sono in totale accordo con quanto riportato in letteratura [10, 25].

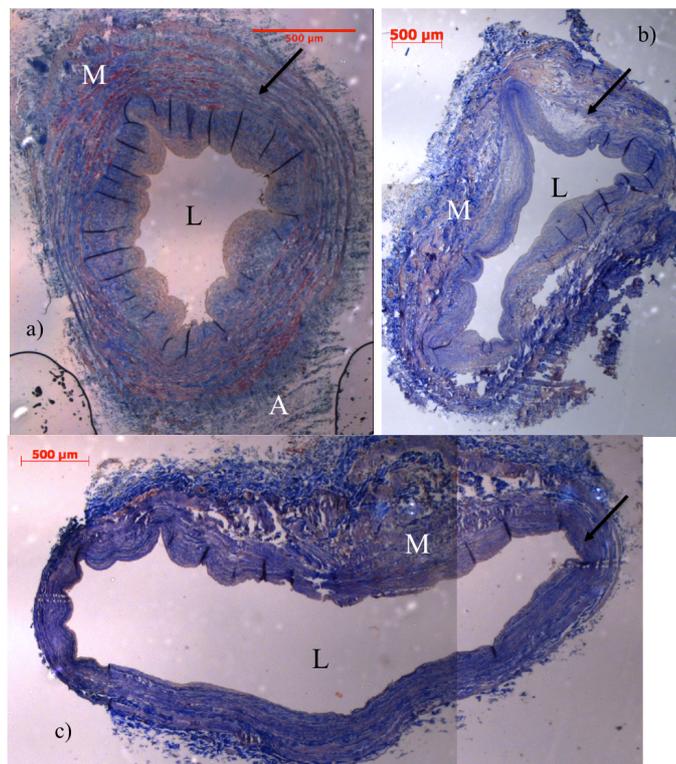
## Capitolo 5: Utilizzo del sistema in campagne sperimentali preliminari con campioni di vena safena umana

Allo stato attuale sono in corso ulteriori analisi di carattere immunohistochimico da parte dei biologi atte a caratterizzare specificatamente il tessuto della parete vascolare e a rivelare l'eventuale sviluppo di neointima in seguito a coltura.

### - Prova di stimolazione e perfusione con campione SV73

Sul campione di vena safena umana SV73 sono state condotte in parallelo una prova di stimolazione pulsatile ed una di perfusione, entrambe di durata pari a 7 giorni. Per le condizioni di prova si faccia riferimento alla Tabella 5.1. Questa campagna sperimentale è stata condotta al fine di valutare il differente effetto della pulsatilità rispetto alla sola perfusione sullo stesso campione biologico.

Sezioni istologiche di spessore pari a 5µm ottenute dal campione di controllo e dai due campioni sottoposti a coltura (perfusione e stimolazione pulsatile) sono state osservate al microscopio ottico con ingrandimento 2.5x in seguito a colorazione tricromica di Masson (Figura 5.5).



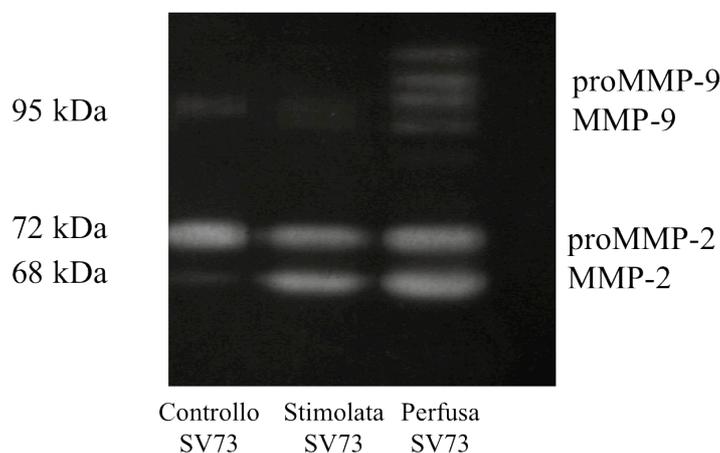
**Figura 5.5** Immagini ottenute al microscopio ottico di sezioni di segmenti di vena safena umana in seguito a colorazione tricromica di Masson. a) campione di controllo; b) campione sottoposto a 7 giorni di perfusione; c) campione sottoposto a 7 giorni di stimolazione pulsatile. L indica il lume del vaso, M la tunica media, A la tunica avventizia e la freccia nera l'allineamento circonfenziale delle SMCs.

## Capitolo 5: Utilizzo del sistema in campagne sperimentali preliminari con campioni di vena safena umana

In Figura 5.5-a è rappresentato il campione di controllo, in Figura 5.5-b il campione sottoposto a 7 giorni di perfusione ed in Figura 5.5-c il campione sottoposto a 7 giorni di perfusione pulsatile. Sebbene queste prime colorazioni effettuate dal personale del laboratorio biologico non permettano una distinzione puntuale delle strutture caratterizzanti il vaso (fibre muscolari soprattutto nel caso dei campioni posti in coltura), si possono comunque osservare delle modifiche a livello morfologico della parete del vaso in seguito a coltura. Infatti si può notare come lo spessore della parete del campione stimolato risulti diminuito rispetto al campione di controllo, mentre per quanto riguarda il campione sottoposto a perfusione la parete vascolare risulta ispessita.

Tuttavia, presso il Centro Cardiologico Monzino sono in fase di svolgimento ulteriori analisi istologiche e immunistochemiche sulle sezioni relative al campione SV73 mirate a evidenziare le modificazioni morfologiche della parete dei tratti di vaso sottoposti alle diverse condizioni di coltura.

Con lo scopo di valutare l'attività proteolitica delle MMPs sono state eseguite analisi zimografiche sui campioni di vena safena oggetto di questa prova. In Figura 5.6 è mostrato lo zimogramma corrispondente.



**Figura 5.6** Zimogramma rappresentativo dell'attività proteolitica delle MMP nel campione di controllo, in quello stimolato e in quello perfuso. La banda a 95 kDa indica il peso molecolare delle proMMP-9 e delle MMP-9; le zone a 72 kDa e a 68 kDa indicano, rispettivamente, il peso molecolare della proMMP-2 e della MMP-2 nella forma attiva.

Anche in questo caso, l'analisi zimografica effettuata dal personale biologico (Figura 5.6) ha mostrato l'incremento della secrezione delle proMMP-2 e un'attivazione significativa

## Capitolo 5: Utilizzo del sistema in campagne sperimentali preliminari con campioni di vena safena umana

delle MMP-2 nei due campioni posti in coltura rispetto al campione di controllo. Per quanto riguarda l'attività delle MMP-9 (sia nella forma attiva che in quella inattiva), non è possibile estrarre delle informazioni utili dallo zimogramma in quanto le bande ad esse relative risultano non definite, bensì degradate. I risultati sono comunque in accordo con quanto riscontrato nella prova effettuata con il campione SV69, confermando quindi il ruolo delle MMPs nella proliferazione e migrazione delle SMCs.

## Conclusioni e sviluppi futuri

Il lavoro di tesi, svolto presso il  $\mu$ BSLab del Dipartimento di Bioingegneria del Politecnico di Milano ed in collaborazione con il gruppo di ricerca del Laboratorio di Ingegneria Tissutale Cardiovascolare dell'I.R.C.C.S. Centro Cardiologico Monzino, si proponeva l'obiettivo di progettare e realizzare un sistema di coltura *ex vivo* di segmenti di vena safena umana in grado di ricreare i pattern di stimolazione pressoria arteriosa a cui è sottoposto *in vivo* il graft venoso. Il fine ultimo del progetto è quello di indagare il ruolo delle cellule staminali progenitrici della vena safena nel VGD e nell'accumulo di neointima, anche se, nell'arco temporale di questa tesi, le attività sperimentali si sono limitate ad alcuni studi preliminari.

L'attività di progettazione ha portato alla realizzazione di un sistema di coltura che risponde in maniera esaustiva alle specifiche definite durante le fasi iniziali del lavoro di tesi. Esso si colloca tra i sistemi di *organ culture* in grado di ricreare *ex vivo* le condizioni fisiologiche del distretto coronarico. Rispetto a studi riportati in letteratura [10], il sistema è in grado non solo di garantire la perfusione del tratto di vaso alloggiato al suo interno, ma anche di applicare una vera e propria stimolazione pressoria pulsatile al campione biologico. Il software utilizzato a tal fine risulta essere versatile in quanto fornisce all'operatore la possibilità di impostare diversi pattern di stimolazione agendo sui range pressori, il numero di cicli, la frequenza e la durata complessiva delle fasi di stimolazione pulsatile e di ricircolo del medium. Tuttavia, il sistema sviluppato difetta della possibilità di alloggiare segmenti di vaso di lunghezza e diametro variabili, come invece osservato in altri sistemi descritti in letteratura [19, 32].

La tipologia di accoppiamento realizzata tra riserva e telaio portavaso ha permesso di soddisfare l'esigenza di maneggevolezza e facilità di assemblaggio sotto cappa a flusso laminare, in accordo con le norme di buona pratica di laboratorio.

La compattezza dell'intero sistema di coltura determina un ingombro ridotto all'interno dell'incubatore e quindi ne rende possibile l'utilizzo all'interno di un laboratorio biologico senza interferire con le consuete attività lavorative.

La fase di collaudo idraulico del dispositivo non ha evidenziato perdite e trafileamenti di fluido a livello delle connessioni e degli accessi presenti sulla camera di coltura, garantendo un ottimo isolamento dell'intero sistema dall'ambiente esterno. Inoltre, il test di verifica del sistema di monitoraggio e controllo ha dimostrato l'adeguatezza dello stesso in termini di sollecitazione pressoria imposta al segmento di vena safena e di affidabilità per l'intera durata della prova.

Il mantenimento della sterilità della camera di coltura testata in diverse condizioni di esercizio rappresenta un punto di forza del dispositivo in quanto ha permesso di condurre test dinamici per almeno 7 giorni garantendo l'assenza di microrganismi potenzialmente dannosi per il tessuto biologico alloggiato all'interno del sistema di coltura progettato.

Le campagne sperimentali preliminari di messa in esercizio del dispositivo realizzato hanno permesso di osservare delle modificazioni morfologiche sui campioni di vena safena umana posti in coltura. In particolare, analisi morfometriche hanno mostrato un assottigliamento della parete del vaso sottoposto a 7 giorni di perfusione pulsatile di circa il 65% (dati relativi al campione SV69), mentre, per quanto riguarda il campione perfuso, osservazioni preliminari mostrano un ispessimento della parete. Questi risultati preliminari sono in accordo con quanto riportato in letteratura [34].

La colorazione con H/E ha dimostrato l'integrità del tessuto biologico prima e dopo la coltura, testimoniando la funzionalità del sistema di coltura realizzato.

Le analisi zimografiche condotte sui campioni di controllo e su quelli posti in coltura hanno mostrato nei secondi un incremento nell'espressione delle MMP-9 e nell'attivazione delle MMP-2. Questi enzimi, coinvolti nella digestione di alcuni componenti proteici della ECM, una volta attivi, facilitano la migrazione e proliferazione delle SMCs, fenomeni che contribuiscono allo sviluppo di neointima.

Attualmente, presso il Centro Cardiologico Monzino, sono in corso delle analisi immunoistochimiche finalizzate alla caratterizzazione della parete vascolare dei campioni biologici sottoposti a coltura. Questi test dovrebbero consentire una più accurata identificazione dei tipi cellulari e delle strutture della parete vascolare presenti nelle diverse tuniche del vaso e, in ultima analisi, di valutare l'eventuale formazione di

neointima. Successivamente si porrà l'attenzione sulle SVPs, sulla loro collocazione all'interno dei tessuti sottoposti a coltura e sul ruolo che esse svolgono nel VGD.

Sebbene il sistema realizzato sia risultato complessivamente funzionale, in futuro potrebbero essere adottate alcune migliorie di tipo strettamente tecnico. Per quanto riguarda la facilità di assemblaggio del sistema, un primo miglioramento potrebbe essere apportato alle modalità di afferraggio del vaso nel telaio portavaso. Infatti, sebbene il vessel loop sia risultato valido in termini di funzionalità e affidabilità, il suo utilizzo in fase di montaggio è fortemente influenzato dalla manualità dell'operatore. Si potrebbe pertanto pensare ad un elemento ausiliario che vincoli temporaneamente il vaso e ne eviti lo sfilamento dagli afferraggi in fase di inserimento del vessel loop.

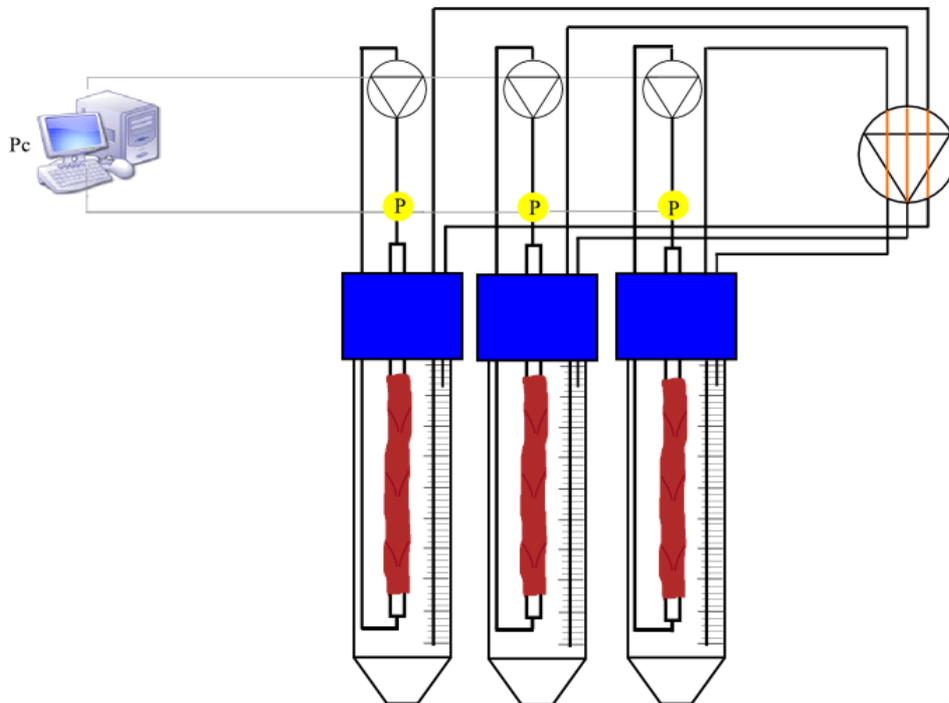
Un ulteriore miglioramento potrebbe essere apportato al sistema di monitoraggio e controllo integrando al suo interno un flussimetro e dei sensori di ossigeno che permettano di valutare in fase di pulsazione ciclica, rispettivamente, la portata erogata dalla pompa e il consumo delle cellule del vaso sottoposto a sollecitazione meccanica. In questo modo sarà possibile realizzare un controllo più efficace del sistema di coltura.

Per quanto riguarda la misura dell'ossigeno disciolto nel medium, una ricerca di mercato ha permesso di individuare nei sensori Micro Flow Through  $O_2$  and  $pO_2$  Electrodes (Lazar Research Laboratories, Inc., CA, USA) (Figura 6.1) una possibile soluzione in quanto permettono di monitorare in tempo reale la  $pO_2$  all'interno di una piccola riserva (volume pari a 80  $\mu$ l) posta sulla linea del sistema di coltura e di testare differenti condizioni ambientali (ad esempio ipossia) alle quali sottoporre il vaso al fine di ricreare diverse condizioni ematochimiche.



**Figura 6.1** Sensori Micro Flow Through  $O_2$  and  $pO_2$  Electrodes (Lazar Research Laboratories, Inc., CA, USA) e relativa centralina di controllo.

Dal punto di vista delle procedure sperimentali, al fine di valutare l'evoluzione temporale dell'IH nei segmenti di vena safena soggetti ai pattern di stimolazione pressoria arteriosa sarebbe utile condurre delle campagne sperimentali su tratti di vaso provenienti dallo stesso paziente sottoposto a CABG. Ciò renderebbe necessaria la messa in esercizio di più moduli in parallelo, come rappresentato in Figura 6.2, che sottopongano i campioni alle stesse condizioni di coltura per periodi di tempo differenti. Da qui deriverebbe l'esigenza di apportare modifiche al sistema di controllo esistente, ad oggi in grado di gestire un sistema singolo, al fine di adeguarlo alla nuova configurazione modulare.



**Figura 6.2** Schema di una possibile evoluzione del sistema con tre camere in parallelo.

Inoltre, per rendere il sistema più compatto e quindi facilitare le operazioni di assemblaggio in ambiente sterile e di messa in esercizio dello stesso, potrebbe essere utile integrare i circuiti idraulici all'interno di un unico componente.

Per quel che riguarda l'emulazione *in vitro* delle condizioni arteriose, sarebbe inoltre interessante prevedere, in una versione futura del sistema di *organ culture*, la possibilità di isolare e disaccoppiare il circuito relativo alla perfusione del vaso dalla

riserva e realizzare un controllo delle condizioni extra/intraluminale in termini di concentrazioni di O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> e di pH. In questa configurazione si renderebbe necessario l'utilizzo di due sistemi pompanti: uno per la movimentazione del medium nella riserva e un altro, regolato dal sistema di controllo, per realizzare la perfusione e la sollecitazione pressoria ciclica del vaso. In questa configurazione, si potrebbe utilizzare il sistema anche per indagini rivolte alla terapia, o meglio alla prevenzione, del VGD. In particolare, sarebbe possibile aggiungere il terreno di coltura del solo circuito relativo al vaso con farmaci per studiare la capacità di minimizzare se non addirittura bloccare l'accumulo di SMCs nella tunica intima, impedendo quindi lo sviluppo dell'IH. Tutto ciò non può prescindere naturalmente da uno studio della permeabilità del tessuto biologico in esame al fine di verificare l'effettiva realizzabilità della compartimentalizzazione.

Da ultimo, ma non meno importante, in futuro, sarebbe interessante investigare l'effetto della stimolazione meccanica, in termini di shear stress e sollecitazioni di tipo torsionale, da fornire al segmento di vena safena posto in coltura, in aggiunta a quella pressoria già messa in atto nel sistema realizzato. In questo modo si riuscirebbe a riprodurre più fedelmente il complesso ambiente arterioso presente *in vivo* in sede coronarica.

In conclusione, il sistema di coltura realizzato durante il lavoro di tesi si è dimostrato un promettente strumento per lo studio dei fenomeni coinvolti nell'arterializzazione del graft venoso utilizzato durante gli interventi di CABG, in quanto ha permesso di mantenere in vita il segmento di vena safena per almeno 7 giorni, di garantire un ambiente privo di contaminazione batterica per tutta la durata della coltura e di sottoporre il campione biologico a condizioni di coltura tipiche del compartimento arterioso in modo controllato, standardizzato e riproducibile.

Ad oggi, l'*organ culture ex vivo* sviluppato è in utilizzo presso il Centro Cardiologico Monzino, dove sarà utilizzato per lo svolgimento di campagne sperimentali mirate allo studio del ruolo delle SVPs nel VGD.

# APPENDICE A

## Disegni tecnici

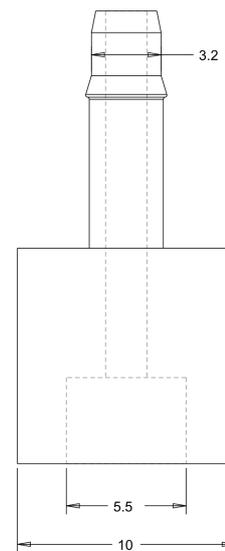
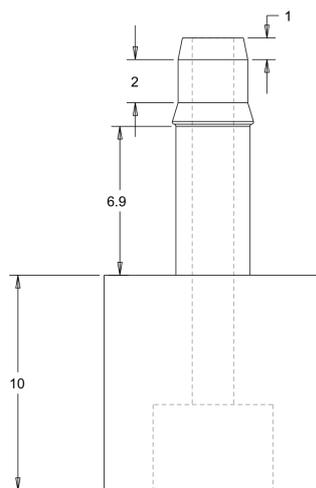
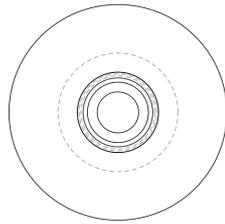
Qui di seguito sono riportati i disegni tecnici dei componenti relativi ai prototipi realizzati.

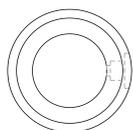
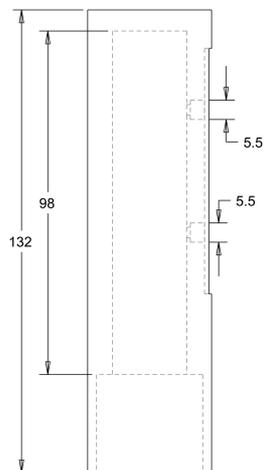
### **Prototipo 0:**

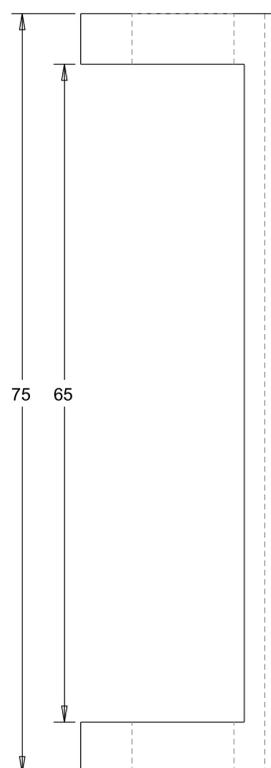
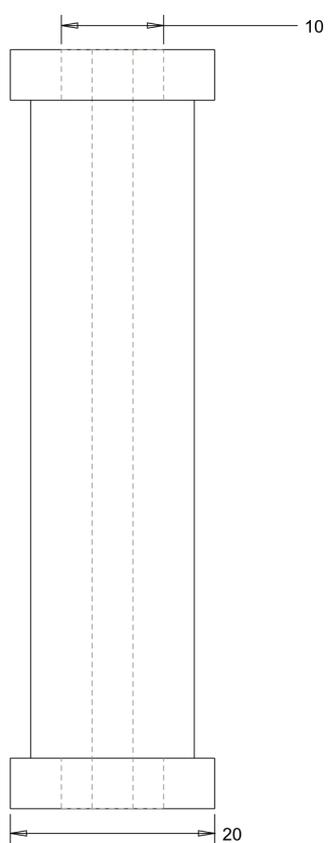
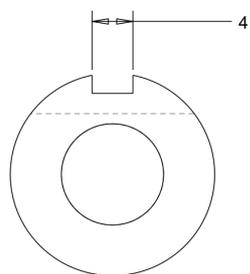
1. Connettore
2. Camera esterna
3. Portavaso
4. Tappo

### **Prototipo 1:**

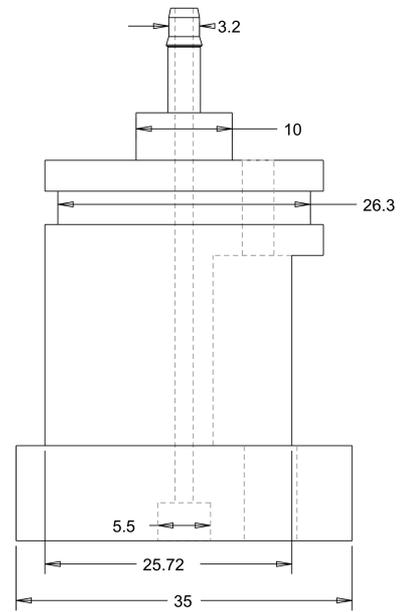
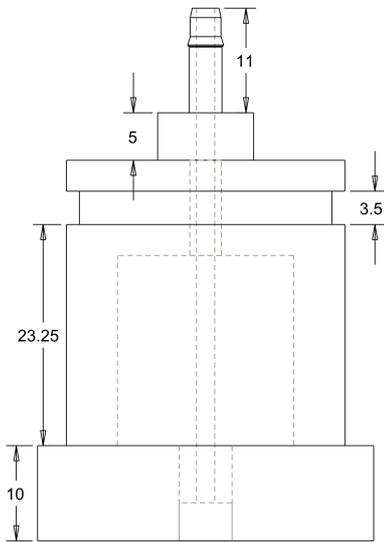
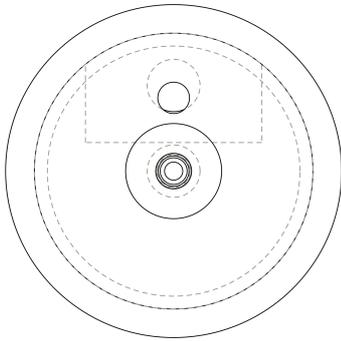
1. Tappo
2. Portavaso

**Prototipo 0**1. Connettore

2. Camera esterna

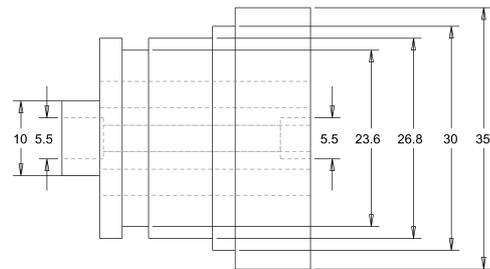
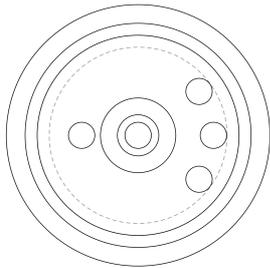
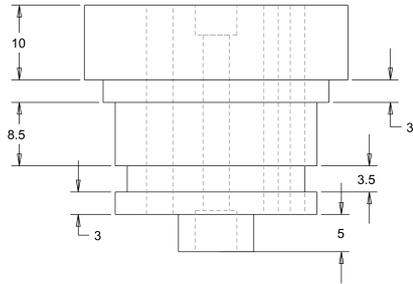
3. Portavaso

4. Tappo

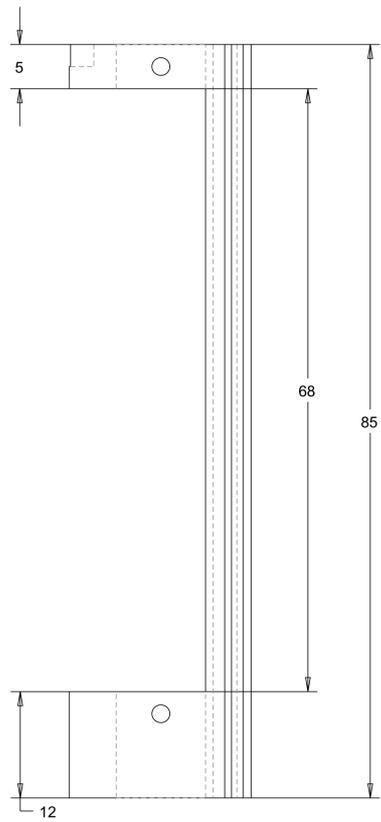
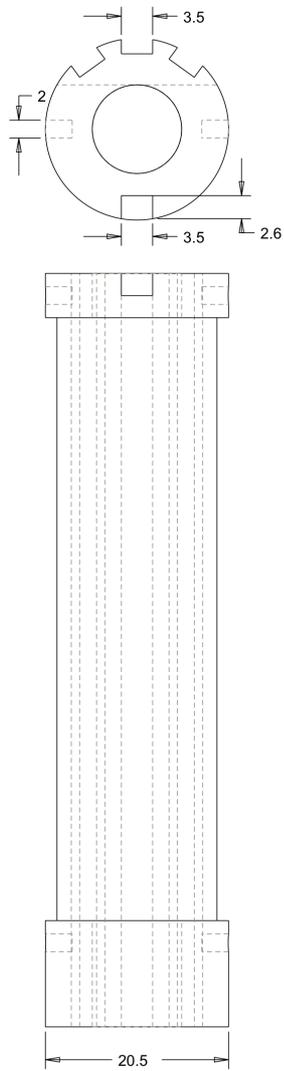


**Prototipo 1**

1. Tappo



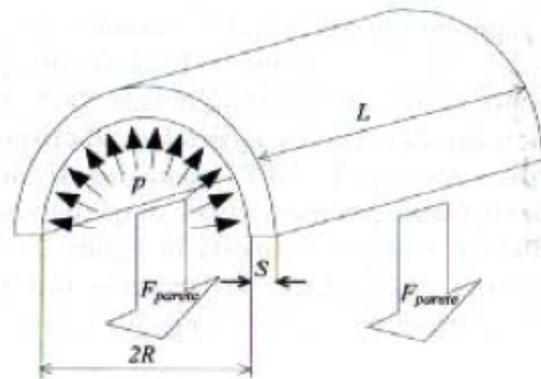
2. Portavaso



## APPENDICE B

### Legge di Mariotte

Si consideri un vaso (geometria cilindrica) caratterizzato da un rapporto spessore/diametro molto minore di 1 ( $s/d < 0.1$ ); vale pertanto l'ipotesi di vaso a pareti sottili. Con riferimento alla Figura A.1, si consideri una sezione longitudinale del vaso su cui agiscono la pressione del fluido  $p$  (diretta sulla parete interna) e la forza che le pareti tagliate si trasmettono (data dal prodotto tra lo sforzo circonferenziale e l'area su cui agisce:  $F_{\text{parete}} = \sigma_{\vartheta\vartheta} A$ , in cui  $A = sL$ ).



**Figura A.1** Forze agenti sul vaso sezionato in direzione longitudinale.

Dall'equilibrio delle forze si ottiene

$$2pLR = 2\sigma_{\vartheta\vartheta}sL \quad (1)$$

da cui deriva la Legge di Mariotte:

$$\sigma_{\vartheta\vartheta} = \frac{pD}{2s} \quad (2)$$

in cui  $D_0$  ( $D_0 = 2R$ ) e  $s$  sono rispettivamente il diametro a riposo, la lunghezza e lo spessore del vaso,  $p$  la pressione idrostatica e  $\sigma_{\vartheta\vartheta}$  lo sforzo circonferenziale agente sulla parete del vaso.

Attraverso la Legge di Hooke si può scrivere lo sforzo in funzione della deformazione:  $\sigma = E\varepsilon$ , da cui si ricava:

$$E\varepsilon = \frac{pD}{2s} \quad (3)$$

A partire dalla formula del volume a riposo del vaso:

$$V_0 = \frac{\pi}{4} D_0^2 L \quad (4)$$

è possibile ricavare la variazione del volume in seguito alla deformazione nell'ipotesi di grandi deformazioni:

$$\Delta V = \frac{\pi}{4} (D^2 - D_0^2) L \quad (5)$$

in cui  $D$  è il diametro del vaso deformato. Normalizzando la variazione di volume per il volume a riposo del vaso si ottiene:

$$\frac{\Delta V}{V_0} = \frac{\frac{\pi}{4} (D^2 - D_0^2) L}{\frac{\pi}{4} D_0^2 L} \quad (6)$$

da cui:

$$\frac{D - D_0}{D_0} = \frac{\Delta V}{V_0} \frac{D_0}{D + D_0} \quad (7)$$

Poiché la deformazione altro non è che:

$$\varepsilon = \frac{D - D_0}{D_0} \quad (8)$$

è possibile riscrivere (1) come segue:

$$pD = 2Es \frac{D - D_0}{D_0} \quad (9)$$

da cui deriva che:

$$p = 2 \frac{Es}{D} \frac{\Delta V}{V_0} \frac{D_0}{D + D_0} \quad (10)$$

La compliance del vaso è definita come:

$$C = \frac{\Delta V}{\Delta P} \quad (11)$$

A partire dall'equazione (10), è possibile scrivere la compliance del vaso come segue:

$$C = \frac{\Delta V}{\Delta P} = \frac{V_0 D(D + D_0)}{2EsD_0} = \frac{\pi}{4} D_0^2 DL \frac{(D + D_0)}{2EsD_0} \quad (12)$$

da cui si otterrà la compliance secondo la Teoria delle grandi Deformazioni:

$$C = \frac{\pi}{8} \frac{D_0 DL}{Es} (D + D_0) \quad (13)$$

Nel caso di piccole deformazioni, invece, è possibile ricavare la variazione di volume derivando il volume a riposo del vaso:

$$dV = 2 \frac{\pi}{4} DLdD = \frac{\pi}{2} DLdD \quad (14)$$

Dividendo per il volume a riposo si ottiene:

$$\frac{dV}{V} = \frac{\frac{\pi}{2} DLdD}{\frac{\pi}{4} DL^2} = 2 \frac{dD}{D} \quad (15)$$

È possibile scrivere la deformazione  $\varepsilon$  come:

$$\varepsilon = \frac{dD}{D_0} \quad (16)$$

Sostituendo nella (3) si ottiene:

$$\frac{pD}{2E} = E\varepsilon = E \frac{dD}{D} \quad (17)$$

Sostituendo la (15) nella (17) si avrà:

$$\frac{dV}{V} = 2\varepsilon = 2 \frac{pD}{2Es} = \frac{pD}{Es} \quad (18)$$

È possibile, quindi, definire la compliance del vaso secondo la Teoria delle Piccole deformazioni come segue:

$$C = \frac{dV}{dP} = \frac{VD}{Es} = \frac{\pi}{4} D^2 L \frac{D}{Es} = \frac{\pi}{4} \frac{D^3 L}{Es} \quad (19)$$

## APPENDICE C

Di seguito è riportato il protocollo di assemblaggio della camera di coltura in ambiente sterile.

### Protocollo di assemblaggio della camera di coltura in ambiente sterile

#### **Materiale necessario:**

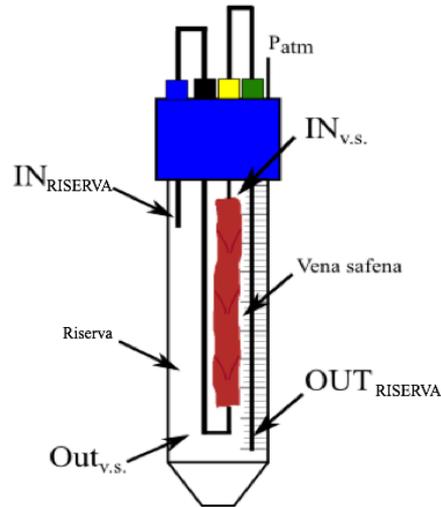
- busta contenente il telaio portavaso (busta 1)
- Falcon da 50 ml sterile
- campione biologico (o in alternativa busta contenente il tubo sostituto)
- vessel loop sterile
- 2 pinze
- 1 forbice
- bottiglia da 500 ml con medium DMEM addizionato con antibiotici
- filtro HEPA (diametro pori 0.2  $\mu\text{m}$ )
- siringa da 50 ml
- 2 siringhe da 5 ml
- 4 petri
- provette con tioglicolato
- guanti da sterilizzare con Et-OH 70%

#### **Montaggio del sistema**

1. indossare guanti e sterilizzarli con Et-OH 70% (ripetere l'operazione più volte durante il montaggio)
2. aprire la busta 1, far scivolare il telaio portavaso in una petri
3. prendere il segmento di vena safena (o il sostituto artificiale) e posizionarlo in una petri

4. verificare la presenza di valvole “a nido di rondine” all’interno del segmento di vena safena iniettando al suo interno qualche ml di medium di coltura attraverso una siringa da 5 ml sterile
5. calzare il segmento di vena safena (o il sostituto artificiale) su uno dei connettori presenti sul telaio portavaso assicurando che il montaggio del segmento di vena safena sia realizzato in direzione compatibile con l’eventuale presenza di valvole “a nido di rondine”
6. assicurare manualmente il segmento di vena safena (o il sostituto artificiale) agli afferraggi utilizzando il vessel loop e vincolare quest’ultimo alle alette metalliche presenti sul telaio portavaso
7. tagliare il segmento di vena safena (o il sostituto artificiale) ad una lunghezza tale da permettere il posizionamento sull’altro connettore presente sul telaio portavaso
8. procedere come al punto 6
9. afferrare la Falcon privata del suo tappo convenzionale e accoppiarla al telaio portavaso (esercitando una leggera pressione al fine di portare in battuta l’o-ring; se necessario aiutarsi con un movimento semi-rotatorio) prestando attenzione al tubicino del circuito relativo al vaso
10. inserire in filtro HEPA nell’apposito port presente sul tappo del telaio portavaso
11. aprire la bottiglia contenente il medium e prelevare 40 ml di medium con la siringa da 50 ml; prendere una siringa da 5 ml, prelevare 2 ml di medium dalla bottiglia e introdurla in una provetta di tioglicolato
12. introdurre il medium contenuto nella siringa da 50 ml all’interno della riserva attraverso il port OUT<sub>RISERVA</sub> presente sul tappo del telaio portavaso
13. prendere una siringa da 5 ml, prelevare 2 ml di medium dalla riserva e introdurla in una provetta di tioglicolato
14. prelevare 5 ml di medium dalla bottiglia con una siringa da 5 ml e introdurla all’interno del vaso mediante il port IN<sub>V.S.</sub> presente sul tappo del telaio portavaso

15. avvitare tra loro rispettivamente i connettori luer  $OUT_{RISERVA}-IN_{V.S.}$  e  $OUT_{V.S.}-IN_{RISERVA}$  seguendo il codice colore (come mostrato in Figura C.1)
16. collocare la camera di coltura all'interno dell'incubatore per 7 giorni.



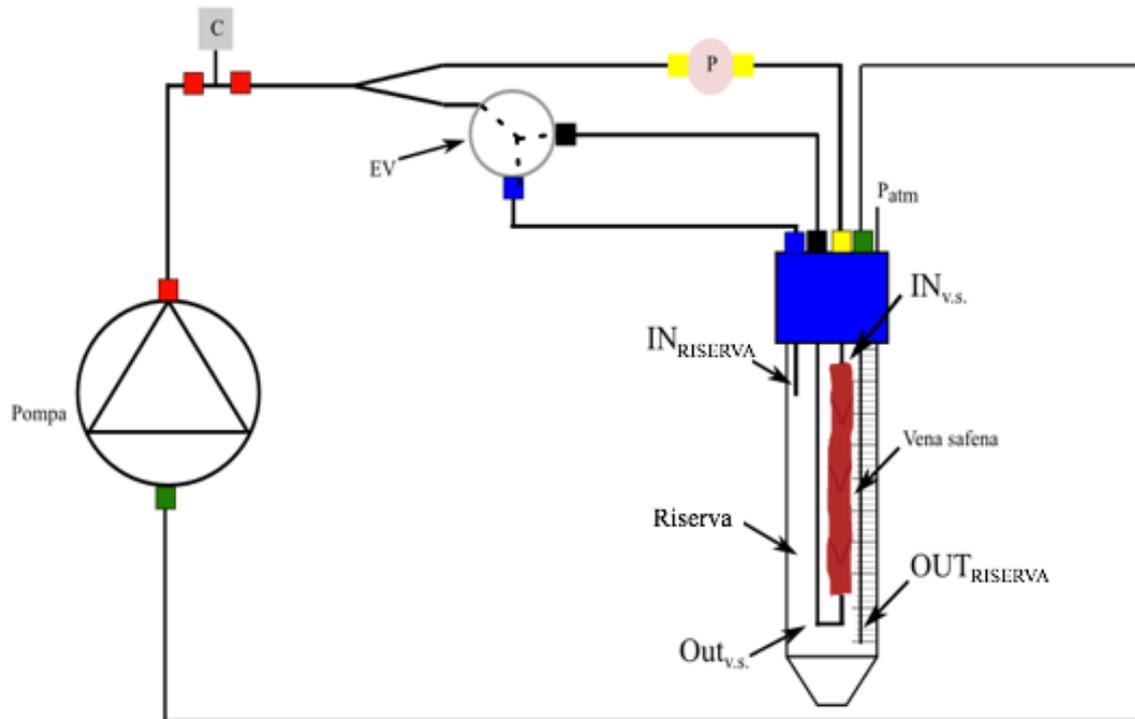
**Figura C.1** Schema grafico delle connessioni tra i vari accessi della camera di coltura (codice colore).

Nel caso di assemblaggio del sistema con circuiteria in silicone (prove di stimolazione), si procede seguendo il protocollo sopra descritto fino al punto 10, poi si agisce come segue:

11. (bis) collegare i due connettori verdi liberi (uno presente ad un'estremità della circuiteria in silicone e uno presente sul tappo del telaio portavaso)
12. (bis) collegare i due connettori blu liberi (uno presente ad un'estremità della circuiteria in silicone e uno presente sul tappo del telaio portavaso)
13. (bis) collegare i due connettori neri liberi (uno presente ad un'estremità della circuiteria in silicone e uno presente sul tappo del telaio portavaso)
14. (bis) collegare i due connettori gialli liberi (uno presente ad un'estremità della circuiteria in silicone e uno presente sul tappo del telaio portavaso)
15. (bis) aprire la connessione tra i due connettori rossi presenti nel tratto di tubo in silicone, inserire tra essi un rubinetto a tre vie a cui collegare una siringa (agente come camera di compliance) da 5 ml (riempita con 1.6 ml di medium e 3.4 ml di aria filtrata)

16. (bis) aprire la connessione tra i due connettori gialli presenti nel tratto di tubo in silicone e inserire tra essi il sensore di pressione “flow-through” (per maggiore chiarezza si faccia riferimento alla Figura C.2).

Continuare come da protocollo a partire dal punto 11.



**Figura C.2** Schema grafico delle connessioni tra la circuiteria in silicone e i vari accessi della camera (codice colore).

## APPENDICE D

### Risultati prove di compliance su campioni di vena safena umana

In questa appendice sono riportati i risultati relativi alle prove di compliance, effettuate su campioni di vena safena umana, in termini di  $\Delta V_{medio}$  e compliance.

#### 1. Campione SV01

P [mmHg]	$\Delta V_{medio}$ [ml]
0	0
10	0.326
20	0.413
30	0.458
40	0.490
50	0.514
60	0.531
70	0.545
80	0.559
90	0.576
100	0.583
110	0.601
120	0.611

P [mmHg]	C [mmHg <sup>-1</sup> ]
0 - 10	0.2064
10 - 20	0.0549
20 - 30	0.0285
30 - 40	0.0198
40 - 50	0.0154
50 - 60	0.0110
60 - 70	0.0088
70 - 80	0.0088
80 - 90	0.0110
90 - 100	0.0044
100 - 110	0.0110
110 - 120	0.0066

#### 2. Campione SV02

P [mmHg]	$\Delta V_{medio}$ [ml]
0	0
10	0.160
20	0.174
30	0.188
40	0.188
50	0.198
60	0.201
70	0.212
80	0.212
90	0.219
100	0.222
110	0.229
120	0.233

P [mmHg]	C [mmHg <sup>-1</sup> ]
0 - 10	0.0605
10 - 20	0.0053
20 - 30	0.0053
30 - 40	0.0000
40 - 50	0.0039
50 - 60	0.0013
60 - 70	0.0039
70 - 80	0.0000
80 - 90	0.0026
90 - 100	0.0013
100 - 110	0.0026
110 - 120	0.0013

3. Campione SV03

P [mmHg]	$\Delta V_{medio}$ [ml]
0	0
10	0.441
20	0.566
30	0.635
40	0.688
50	0.726
60	0.767
70	0.802
80	0.837
90	0.861
100	0.892
110	0.924
120	0.948

P [mmHg]	C [mmHg <sup>-1</sup> ]
0 - 10	0.0648
10 - 20	0.0184
20 - 30	0.0102
30 - 40	0.0077
40 - 50	0.0056
50 - 60	0.0061
60 - 70	0.0051
70 - 80	0.0051
80 - 90	0.0036
90 - 100	0.0046
100 - 110	0.0046
110 - 120	0.0036

4. Campione SV04

P [mmHg]	$\Delta V_{medio}$ [ml]
0	0
10	0.108
20	0.174
30	0.215
40	0.250
50	0.285
60	0.316
70	0.344
80	0.368
90	0.392
100	0.420
110	0.444
120	0.472

P [mmHg]	C [mmHg <sup>-1</sup> ]
0 - 10	0.0395
10 - 20	0.0242
20 - 30	0.0153
30 - 40	0.0127
40 - 50	0.0127
50 - 60	0.0115
60 - 70	0.0102
70 - 80	0.0089
80 - 90	0.0089
90 - 100	0.0102
100 - 110	0.0089
110 - 120	0.0102

5. Campione SV05

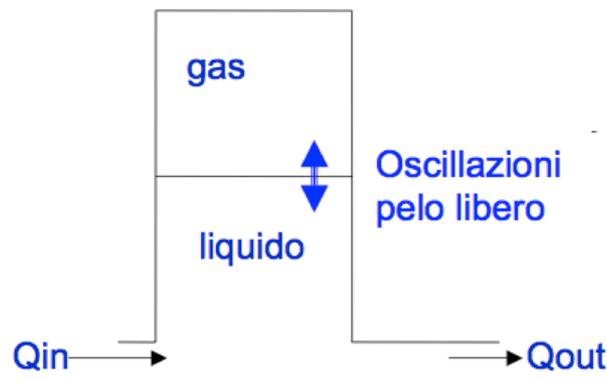
P [mmHg]	$\Delta V_{medio}$ [ml]
0	0
10	0.295
20	0.361
30	0.399
40	0.427
50	0.451
60	0.472
70	0.497
80	0.514
90	0.535
100	0.556
110	0.573
120	0.590

P [mmHg]	C [mmHg <sup>-1</sup> ]
0 - 10	0.1049
10 - 20	0.0234
20 - 30	0.0136
30 - 40	0.0099
40 - 50	0.0086
50 - 60	0.0074
60 - 70	0.0086
70 - 80	0.0062
80 - 90	0.0074
90 - 100	0.0074
100 - 110	0.0062
110 - 120	0.0062

## APPENDICE E

### Dimensionamento della cassa d'aria

La realizzazione di un elemento compliant mediante una cassa d'aria si basa sulla compressione ed espansione di un opportuno volume di gas (Figura E.1).



**Figura E.1** Cassa d'aria

Nell'applicazione in esame, ciò è stato ottenuto mediante una siringa da 5 ml opportunamente riempita. Il dimensionamento della cassa d'aria, in termini di definizione dei volumi di liquido e di aria di riempimento, è stato effettuato in maniera sperimentale. Ciò ha permesso di definire i volumi in base alla risposta del sistema in fase di pulsazione ciclica, ossia valutando la condizione in cui la compliance ottenuta meglio smorzava le oscillazioni dovute ai rulli della pompa permettendo di ottenere delle curve di pressione 80÷120 mmHg ben definite. Tale condizione è rappresentata da volume di medium di coltura pari a 1.6 ml e un volume di aria pari a 3.4 ml all'interno della siringa.

Per il calcolo della compliance si considerano due condizioni:

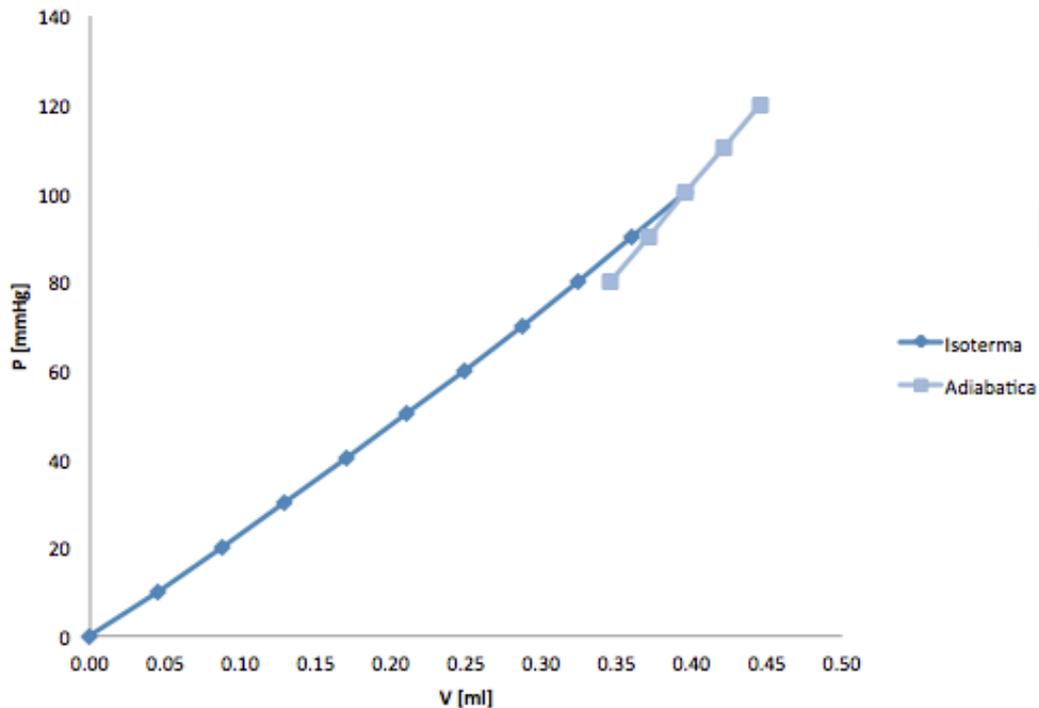
1. Riempimento lento fino alla pressione di esercizio ( $P_e=100$  mmHg): Trasformazione isoterma

$$PV=P_eV_e \quad (1)$$

2. Oscillazione rapida attorno a  $P_e$ : Trasformazione adiabatica

$$PV^k = P_e V_e^k \quad (2)$$

dove l'esponente  $k$  è il rapporto tra il calore specifico a pressione costante  $C_p$  e il calore specifico a volume costante  $C_v$  ed è pari a 1.4. Si tenga presente che per i gas il valore del calore specifico dipende dal fatto che la pressione o il volume siano mantenuti costanti mentre si fornisce o si sottrae a una sostanza energia sotto forma di calore.



**Figura E.2** Grafico Pressione-Volume in cui sono rappresentate le curve delle trasformazioni isoterma e adiabatica

È possibile ricavare la compliance dalla seguente equazione:

$$\bar{C} = \frac{dV}{dP} = -\frac{P_e}{P^2} V_e^k \frac{1}{k} \left( \frac{P_e}{P} V_e^k \right)^{\left(\frac{1-k}{k}\right)} \quad (3)$$

È possibile semplificare la (3) assumendo che in esercizio  $P$  uguagli  $P_e$  e Si avrà pertanto:

$$\bar{C} = -\frac{1}{P_e} V_e^k \frac{1}{k} V_e^{1-k} = \frac{1}{k} \frac{V_e}{P_e} \quad (4)$$

Ricordando la relazione (1), si avrà infine:

$$\bar{C} = -\frac{1}{k} \frac{P_0 V_e}{P_e^2} \quad (5)$$

In condizioni di esercizio (80÷120 mmHg,  $P_e=100$  mmHg), il pelo libero all'interno della siringa oscilla di circa 0.2 ml. Ricordando che il volume di aria iniziale all'interno della siringa ( $V_0$ ) è pari a 3.8 ml, deriva una compliance dell'elemento pari a circa  $2.8 \times 10^{-3}$  [ml/mmHg].

## APPENDICE F

### **Referti delle analisi microbiologiche**

Di seguito sono riportati i referti relativi alle analisi microbiologiche effettuate sui campioni di medium prelevati durante le prove di mantenimento della sterilità eseguite sui prototipi realizzati.

Centro CARDIOLOGICO Monzino - IRCCS  
Servizio di Medicina di Laboratorio

Responsabile Dr.ssa Annalisa Cavallero

Tel. 02-58002590 Fax 02-58002320

Indirizzo

Tel.

Referto stampato il 05-12-2011

Pagina 1 di 3

Richiesta n. 00945274

SIG. BIOREATTORE SAFENA

NATO 28-11-2011 Sesso M

Data accettazione 28-11-2011

BIO

Analisi	Risultato	Unita' di misura	Valori di riferimento	Metodica
---------	-----------	------------------	-----------------------	----------

Gli esami contrassegnati con # sono eseguiti presso "Diagnostica e Ricerca San Raffaele"

#### MICROBIOLOGIA

Esame colturale da tessuto 80105035

Esame microscopico Non eseguito

Esame colturale Negativo per la ricerca di germi aerobi anaerobi e miceti

Bottiglia T0

Esame colturale da tessuto 80105036

Esame microscopico Non eseguito

Esame colturale Negativo per la ricerca di germi aerobi anaerobi e miceti

Statica C tempo 0

Esame colturale da tessuto 80105037

Esame microscopico Non eseguito

Esame colturale Negativo per la ricerca di germi aerobi anaerobi e miceti

Bottiglia vaso tempo 0

Esame colturale da tessuto 80105038

Esame microscopico Non eseguito

Esame colturale Negativo per la ricerca di germi aerobi anaerobi e miceti

Bottiglia vena 1 tempo 0

Centro CARDIOLOGICO Monzino - IRCCS  
Servizio di Medicina di Laboratorio

Responsabile Dr.ssa Annalisa Cavallero

Tel. 02-58002590 Fax 02-58002320

Indirizzo

Tel.

Referto stampato il 05-12-2011

Pagina 2 di 3

Richiesta n. 00945274

SIG. BIOREATTORE SAFENA

NATO 28-11-2011 Sesso M

Data accettazione 28-11-2011

BIO

Analisi	Risultato	Unita' di misura	Valori di riferimento	Metodica
Gli esami contrassegnati con # sono eseguiti presso "Diagnostica e Ricerca San Raffaele"				
<b>Esame colturale da tessuto</b>				80105039
Esame microscopico	Non eseguito			
Esame colturale	Negativo per la ricerca di germi aerobi anaerobi e miceti			
Statica A tempo 0				
<b>Esame colturale da tessuto</b>				80105040
Esame microscopico	Non eseguito			
Esame colturale	Negativo per la ricerca di germi aerobi anaerobi e miceti			
Dinamica B vena 1 tempo 0				
<b>Esame colturale da tessuto</b>				80105041
Esame microscopico	Non eseguito			
Esame colturale	Negativo per la ricerca di germi aerobi anaerobi e miceti			
Statica C tempo 4				
<b>Esame colturale da tessuto</b>				80105042
Esame microscopico	Non eseguito			
Esame colturale	Negativo per la ricerca di germi aerobi anaerobi e miceti			
Dinamica B tempo 4				
<b>Esame colturale da tessuto</b>				80105043
Esame microscopico	Non eseguito			
Esame colturale	Negativo per la ricerca di germi aerobi anaerobi e miceti			
Bottiglia medium tempo 4				

Centro CARDIOLOGICO Monzino - IRCCS  
Servizio di Medicina di Laboratorio

Responsabile Dr.ssa Annalisa Cavallero

Tel. 02-58002590 Fax 02-58002320

Indirizzo

Tel.

Referto stampato il 05-12-2011

Pagina 3 di 3

Richiesta n. 00945274

SIG. BIOREATTORE SAFENA

NATO 28-11-2011 Sesso M

Data accettazione 28-11-2011

BIO

Analisi	Risultato	Unita' di misura	Valori di riferimento	Metodica
---------	-----------	------------------	-----------------------	----------

Gli esami contrassegnati con # sono eseguiti presso "Diagnostica e Ricerca San Raffaele"

Esame colturale da tessuto

80105044

Esame microscopico Non eseguito

Esame colturale Negativo per la ricerca di germi aerobi anaerobi e miceti

Stativa A tempo 3



**Centro Cardiologico  
Monzino**

Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico  
Via Parea 4 20138 Milano  
T +39 02.58002.1 W www.cardiologicomonzino.it

**Centro CARDIOLOGICO Monzino - IRCCS  
Servizio di Medicina di Laboratorio**

Responsabile Dr.ssa Annalisa Cavallero

Tel. 02-58002590 Fax 02-58002320

Indirizzo

Tel.

Referto stampato il 09-12-2011

Pagina 1 di 1

Richiesta n. 00946110  
SIG. BIOREATTORE SAFENA  
NATO 28-11-2011 Sesso M  
Data accettazione 02-12-2011  
BIO

Analisi	Risultato	Unita' di misura	Valori di riferimento	Metodica
---------	-----------	------------------	-----------------------	----------

Gli esami contrassegnati con # sono eseguiti presso "Diagnostica e Ricerca San Raffaele"

**MICROBIOLOGIA**

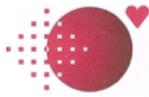
Esame colturale da tessuto

80105266

Esame microscopico Non eseguito

Esame colturale **Negativo**

dinamica b vena 1 tempo 8.



**Centro Cardiologico  
Monzino**

Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico  
Via Parea 4 20138 Milano  
T +39 02.58002.1 W www.cardiologicomonzino.it

**Centro CARDIOLOGICO Monzino - IRCCS  
Servizio di Medicina di Laboratorio**

Responsabile Dr.ssa Annalisa Cavallero

Tel. 02-58002590 Fax 02-58002320

Indirizzo

Tel.

Referto stampato il 09-12-2011

Pagina 1 di 1

Richiesta n. 00946111  
SIG. BIOREATTORE SAFENA  
NATO 28-11-2011 Sesso M  
Data accettazione 02-12-2011  
BIO

Analisi	Risultato	Unita' di misura	Valori di riferimento	Metodica
---------	-----------	------------------	-----------------------	----------

Gli esami contrassegnati con # sono eseguiti presso "Diagnostica e Ricerca San Raffaele"

**MICROBIOLOGIA**

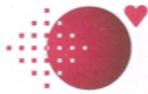
Esame colturale da tessuto

80105267

Esame microscopico Non eseguito

Esame colturale **Negativo**

statica A vena 2 tempo 7.



## Centro Cardiologico Monzino

Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico  
Via Parea 4 20138 Milano  
T +39 02-58002.1 W www.cardiologicomonzino.it

Centro **CARDIOLOGICO** Monzino - IRCCS  
Servizio di Medicina di Laboratorio

Responsabile Dr.ssa Annalisa Cavallero

Tel. 02-58002590 Fax 02-58002320

Indirizzo

Tel.

Referto stampato il 09-12-2011

Pagina 1 di 1

Richiesta n. **00946112**  
SIG. **BIOREATTORE SAFENA**  
NATO **28-11-2011** Sesso **M**  
Data accettazione **02-12-2011**  
BIO

Analisi	Risultato	Unita' di misura	Valori di riferimento	Metodica
---------	-----------	------------------	-----------------------	----------

Gli esami contrassegnati con # sono eseguiti presso "Diagnostica e Ricerca San Raffaele"

### MICROBIOLOGIA

Esame colturale da tessuto

80105268

Esame microscopico Non eseguito

Esame colturale **Negativo**

statica C tubo tempo 8.

## **APPENDICE G**

Di seguito è riportata la scheda tecnica del kit per la colorazione tricromica di Masson.

## MASSON TRICROMICA con blu di anilina 04 – 010802/L

**IVD** Dispositivo medico-diagnostico in vitro  
**Codice CND: W01030799**

numero di test eseguibili ..... /  
tempo di realizzazione ..... 35 minuti  
validità del prodotto ..... 2 anni  
temperatura di stoccaggio ..... 15 – 25 °C  
temperatura di trasporto ..... t.a.  
attrezzatura complementare ..... non richiesta

<b>Scopo previsto</b>	Preparato per allestimento di campioni istologici da esaminarsi in microscopia ottica.
<b>Applicazione</b>	Metodo di elezione per il tessuto connettivo, particolarmente indicato per gameti, nuclei, neurofibrille, neuroglia, collagene, cheratina, fibrille intracellulari e immagini in negativo dell' apparato di Golgi.
<b>Principio</b>	Il metodo associa una colorazione nucleare ottenuta con ematosilina ferrica di Weigert, una colorazione delle emazie con acido picrico e una colorazione del connettivo con due differenti coloranti acidi.
<b>Metodo</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Portare le sezioni all'acqua distillata.</li> <li>2) Porre in una vaschetta la stessa quantità del reattivo A e del reattivo B, introdurre i vetrini, lasciare agire 10 minuti.</li> <li>3) Senza lavare, sgocciolare e porre i vetrini nella soluzione C: lasciare agire 4 minuti.</li> <li>4) Lavare rapidamente (3-4 secondi) in acqua distillata lasciando le sezioni di colore giallo e porre i vetrini nella soluzione D: lasciare agire 4 minuti.</li> <li>5) Lavare in acqua distillata e porre le sezioni nella soluzione E: lasciare agire 10 minuti.</li> <li>6) Senza sciacquare, sgocciolare e porre i vetrini nella soluzione F: lasciare agire 5 minuti.</li> <li>7) Lavare in acqua distillata e disidratare rapidamente attraverso la serie ascendente degli alcol sostando 1 minuto nell'ultimo assoluto: xilene e balsamo.</li> </ol>
<b>Risultati</b>	<p>Nuclei e gameti ..... nero            Citoplasma, cheratina, fibre muscolari, granuli acidofili ..... rosso            Collagene, muco, granuli basofili dell'ipofisi ..... blu            Granuli cellule delta dell'ipofisi ..... blu            Eritrociti ..... giallo</p>
<b>Reattivi</b>	<p>A) Ematosilina ferrica sec. Weigert, sol. B ..... 1000 ml            B) Ematosilina ferrica sec. Weigert, sol. A ..... 1000 ml            C) Acido picrico soluzione alcolica ..... 1000 ml            D) Ponceau B soluzione ..... 1000 ml            E) Acido fosfomolibdico soluzione ..... 1000 ml            F) Blu di anilina sec. Masson ..... 1000 ml</p>
<b>Avvertenze e precauzioni</b>	<p>Il prodotto è destinato all'utilizzo di personale tecnico specializzato.            Il prodotto è classificato come pericoloso.            Leggere attentamente le informazioni riportate in etichetta (simboli di pericolo, frasi di rischio e di sicurezza) e consultare sempre la scheda di sicurezza dove sono reperibili le informazioni relative ai rischi presentati dal preparato, misure precauzionali da adottare durante l'uso e misure di primo soccorso.            Riferimento Scheda Sicurezza: 010802</p>
<b>Conservazione</b>	Conservare il preparato a temperatura ambiente. Mantenere i contenitori ben chiusi.
<b>Stabilità</b>	Dopo la prima apertura, il reattivo deve ritenersi valido fino alla data di scadenza indicata purché correttamente conservato.

Società produttrice: Bio-Optica Milano s.p.a.

Pagina 1 di 2



Bio Optica Milano s.p.a.  
via San Faustino 58 • I - 20134 Milano  
tel. +39 02212713.1 • fax +39 022153000  
www.bio-optica.it



**Smaltimento**

Rifiuto pericoloso; conferire ad aziende specializzate ed autorizzate, secondo legislazione vigente.

**Bibliografia**

- Masson P.J. Some histological methods: trichrome stainings and their preliminary technique. 1929 J. Tech. Methods, 12: 75-90.
- Lillie R.D. Staining of connective tissue . Arch Pat 1951; 54:220-223.
- Lillie R.D. Studies on selective staining of collagen with acid anilin dyes. J Tech Methods 1945; 25: 1-47.
- Lillie R.D. Further experiments with the Masson trichrome modification of Mallory's connective tissue stain. Stain Technol 1940; 15: 82.
- Armed Forces Institute of Pathology: Laboratory Methods in histotechnology. Washington D.C., A.F.I.P., 1994.

Data di emissione: novembre 2009 **CE**

## BIBLIOGRAFIA

1. Saucy, F., et al., *Ex vivo Pulsatile Perfusion of Human Saphenous Veins Induces Intimal Hyperplasia and Increased Levels of the Plasminogen Activator Inhibitor 1*. European Surgical Research, 2010. **45**(1): p. 50-59.
2. Burton, A.C., *Physiology and Biophysics of the Circulation* 1965.
3. Lloyd-Jones, D., et al., *Heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association*. Circulation, 2010. **121**(7): p. e46-e215.
4. Goldman, S., et al., *Long-term patency of saphenous vein and left internal mammary artery grafts after coronary artery bypass surgery*. Journal of the American College of Cardiology, 2004. **44**(11): p. 2149-2156.
5. Redaelli, A., Montevocchi, M., *Biomeccanica. Analisi multiscala di tessuti biologici*, ed. Patròn2007.
6. Fung, Y.C., *Biomechanics: Mechanical properties of living tissues*1993.
7. Pietrabissa, R., *Biomateriali per protesi e organi artificiali*, ed. Patròn1996.
8. Dashwood, M.R. and A. Loesch, *The saphenous vein as a bypass conduit: the potential role of vascular nerves in graft performance*. Curr Vasc Pharmacol, 2009. **7**(1): p. 47-57.
9. Motwani, J.G. and E.J. Topol, *Aortocoronary saphenous vein graft disease: pathogenesis, predisposition, and prevention*. Circulation, 1998. **97**(9): p. 916-31.
10. Dummler, S., et al., *Pulsatile ex vivo perfusion of human saphenous vein grafts under controlled pressure conditions increases MMP-2 expression*. BioMedical Engineering OnLine, 2011. **10**(1): p. 62.
11. Muto, A., et al., *Mechanisms of vein graft adaptation to the arterial circulation: insights into the neointimal algorithm and management strategies*. Circ J, 2010. **74**(8): p. 1501-12.
12. Parang, P. and R. Arora, *Coronary vein graft disease: pathogenesis and prevention*. Can J Cardiol, 2009. **25**(2): p. e57-62.
13. Owens, C.D., *Adaptive changes in autogenous vein grafts for arterial reconstruction: clinical implications*. J Vasc Surg, 2010. **51**(3): p. 736-46.

14. Zhao, J., et al., *Manual pressure distension of the human saphenous vein changes its biomechanical properties-implication for coronary artery bypass grafting*. J Biomech, 2007. **40**(10): p. 2268-76.
15. Souza, D.S., et al., *Harvesting the saphenous vein with surrounding tissue for CABG provides long-term graft patency comparable to the left internal thoracic artery: results of a randomized longitudinal trial*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2006. **132**(2): p. 373-8.
16. Campagnolo, P., et al., *Human adult vena saphena contains perivascular progenitor cells endowed with clonogenic and proangiogenic potential*. Circulation, 2010. **121**(15): p. 1735-45.
17. Paroz, A., et al., *Comparison of morphological and functional alterations of human saphenous veins after seven and fourteen days of ex vivo perfusion*. Eur Surg Res, 2004. **36**(5): p. 274-81.
18. Newby, L.K., et al., *Troponin measurements during drug development--considerations for monitoring and management of potential cardiotoxicity: an educational collaboration among the Cardiac Safety Research Consortium, the Duke Clinical Research Institute, and the US Food and Drug Administration*. Am Heart J, 2011. **162**(1): p. 64-73.
19. Clerin, V., et al., *Mechanical Environment, Donor Age, and Presence of Endothelium Interact to Modulate Porcine Artery Viability Ex Vivo*. Annals of Biomedical Engineering, 2002. **30**(9): p. 1117-1127.
20. Soyombo, A.A., et al., *Intimal proliferation in an organ culture of human saphenous vein*. Am J Pathol, 1990. **137**(6): p. 1401-10.
21. Mekontso-Dessap, A., et al., *Vascular-wall remodeling of 3 human bypass vessels: organ culture and smooth muscle cell properties*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2006. **131**(3): p. 651-8.
22. Steger, C.M., et al., *Neointimal hyperplasia in a porcine model of vein graft disease: comparison between organ culture and coronary artery bypass grafting*. European Surgery, 2011. **43**(3): p. 174-180.

23. Surowiec, S.M., et al., *A new perfusion culture system used to study human vein*. J Surg Res, 2000. **88**(1): p. 34-41.
24. Porter KE, N.S., Dunlop P, Varty K, Thrush AJ, London NJ., *The development of an in vitro flow model of human saphenous vein graft intimal hyperplasia*. 1996.
25. Patterson, M.A., et al., *Shear Force Regulates Matrix Metalloproteinase Activity in Human Saphenous Vein Organ Culture*. Journal of Surgical Research, 2001. **95**(1): p. 67-72.
26. Clerin, *Tissue Engineering of Arteries by Directed Remodeling of Intact Arterial Segments*. Tissue Eng, 2003. **9**(3).
27. Rey, J., et al., *Comparative assessment of intimal hyperplasia development after 14 days in two different experimental settings: Tissue culture versus ex vivo continuous perfusion of human saphenous vein*. Journal of Surgical Research, 2004. **121**(1): p. 42-49.
28. Miyakawa, A.A., et al., *Human saphenous vein organ culture under controlled hemodynamic conditions*. Clinics, 2008. **63**(5): p. 683-688.
29. Liao, D., et al., *Vascular smooth cell proliferation in perfusion culture of porcine carotid arteries*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008. **372**(4): p. 668-673.
30. Hoenicka, M., et al., *Effects of Shear Forces and Pressure on Blood Vessel Function and Metabolism in a Perfusion Bioreactor*. Annals of Biomedical Engineering, 2010. **38**(12): p. 3706-3723.
31. Golledge, J., 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 Endovasc Surg, 1997. **13**(6): p. 605-12.
32. Labadie, R.F., et al., *Pulsatile perfusion system for ex vivo investigation of biochemical pathways in intact vascular tissue*. Am J Physiol, 1996. **270**(2 Pt 2): p. H760-8.
33. Conklin, *A simple physiologic pulsatile perfusion system for the study of*. 2000.
34. Surowiec, *A New Perfusion Culture System Used to Study Human Vein*. 2000.

35. Gusic, R.J., et al., *Shear stress and pressure modulate saphenous vein remodeling ex vivo*. Journal of Biomechanics, 2005. **38**(9): p. 1760-1769.
36. Voisard, *Pulsed perfusion in a venous human organ culture model with a Windkessel function (pulsed perfusion venous HOC-model)*", . Med Sci Monit, 2010. **16**.
37. Basmadjian, D., *Mass Transfer: Principles and Applications*2004: CRC. Press.
38. Orr, D.E. and K.J.L. Burg, *Design of a Modular Bioreactor to Incorporate Both Perfusion Flow and Hydrostatic Compression for Tissue Engineering Applications*. Annals of Biomedical Engineering, 2008. **36**(7): p. 1228-1241.
39. Wesly, R.L., et al., *Static linear and nonlinear elastic properties of normal and arterialized venous tissue in dog and man*. Circ Res, 1975. **37**(4): p. 509-20.

*Al termine del nostro lavoro di tesi vorremmo ringraziare tutti coloro che ci hanno aiutato e supportato durante questo lungo percorso.*

*Per primo, un sentito e sincero ringraziamento va al Prof. Beniamino Fiore che ci ha sapientemente guidato nella nostra crescita professionale, stimolando costantemente la nostra curiosità scientifica ed insegnandoci che affrontare la frustrazione è un passaggio fondamentale nel raggiungimento di un obiettivo, qualunque esso sia.*

*Un doveroso e sentito ringraziamento va all'Ing. Marco Piola, per la pazienza dimostrata nel supportarci (ma anche e soprattutto sopportarci) e affiancarci quotidianamente nelle nostre attività.*

*Grazie anche alla Prof. Monica Soncini e a tutti i ragazzi del  $\mu$ BSLab.*

*Un ringraziamento va al Dott. Maurizio Pesce, che ci ha permesso di collaborare e di frequentare il Laboratorio LIT.*

*Un sincero grazie va anche alla dottoranda Francesca Prandi per la sua simpatia, disponibilità e professionalità dimostrate durante la nostra permanenza e attività presso il Centro Cardiologico Monzino.*

*Grazie a tutti*

*Nina e Lorena.*