

POLITECNICO DI MILANO

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



Studio *ex vivo* del rimodellamento di campioni di vena safena umana indotto
da differenti condizioni di ossigenazione

Relatore

Prof.ssa Ing. Monica Soncini

Correlatori

Prof. Ing. Gianfranco Beniamino Fiore

Ing. Marco Piola

Tesi di laurea di:

Martina MALAVASI 770600

Anno Accademico 2013-2014

Indice

Sommario	I
Summary	XI
Introduzione.....	1
1. Le coronaropatie, i trattamenti terapeutici ed i motivi dei fallimenti terapeutici	5
1.1 Le coronarie: struttura, funzione ed emodinamica coronarica.....	5
1.2 Cardiopatia ischemica: aterosclerosi delle coronarie e la loro elevata incidenza nel mondo	8
1.3 Trattamento delle coronaropatie: angioplastica e bypass aorto-coronarico.....	10
1.3.1 Angioplastica coronarica	11
1.3.2 Il bypass aorto-coronarico e le possibili tipologie di impianto.....	12
1.4 Struttura e proprietà meccaniche dei vasi sanguigni: arteria e vena a confronto	17
1.5 Condotti arteriosi	23
1.6 La grande vena safena.....	24
1.6.1 Vein graft disease	24
1.7 Conclusioni	30
2. Rimodellamento vascolare indotto dall'ambiente emodinamico e biochimico del bypass: stato dell'arte.	31
2.1 Stato dell'arte dei sistemi di cultura <i>ex vivo</i>	31
2.1.1 Sistemi statici di cultura <i>ex vivo</i>	33
2.1.2 Sistemi dinamici a perfusione stazionaria e pulsatile.....	40
2.2. Effetto dell'ipossia sul tessuto vascolare	52
2.3 Conclusioni	59

3. Materiali e metodi: prove su banco del sistema di coltura e campagna sperimentale con segmenti di vena safena umana.	61
3.1 Obbiettivi del lavoro	61
3.2 Sistema di cultura <i>ex vivo</i>	62
3.3 Deossigenatore per colture <i>ex vivo</i>	65
3.3.1 Messa a punto del modulo deossigenante	66
3.3.1.1 Prova in assenza di ricircolo.....	67
3.3.1.2 Prova con ricircolo del mezzo	69
3.4 Campagna sperimentale su campioni di vena safena	71
3.4.1 Definizione dei gruppi sperimentali	72
3.4.2 Protocollo sperimentale della campagna sperimentale	73
3.4.3 Analisi e caratterizzazione biologica dei campioni di vena safena.....	80
3.4.3.1 Analisi della vitalità tessutale: saggio MTT.....	82
3.4.3.2 Analisi qualitative morfologiche: colorazioni H&E, Tricromia di Masson, immunofluorescenza.	82
3.4.3.3. Stima della densità cellulare.....	84
3.4.3.4 Analisi istologica dell'apoptosi cellulare	86
3.4.3.5 Analisi immunostochimiche per la stima della proliferazione cellulare.....	87
3.4.3.6 Misura della <i>length density</i>	88
4. Risultati	90
4.1 Risultati della messa a punto del modulo deossigenante	90
4.2 Risultati della campagna sperimentale con i campioni di vena safena umana in diverse condizioni di ossigenazione	94
4.2.1 Analisi della vitalità cellulare dei vasi: saggio MTT	95
4.2.2 Analisi morfologiche qualitative: colorazione H&E, tricromica di Masson e immunofluorescenza	97
4.2.3 Stima della densità cellulare	102

4.2.4 Analisi dell'apoptosi cellulare	105
4.2.5 Analisi della proliferazione cellulare	107
4.2.6 Misura della <i>length density</i>	109
4.3 Modello teorico della diffusione dell'ossigeno attraverso la parete vascolare	111
5. Conclusioni e sviluppi futuri	119
APPENDICE -Protocolli biologici	131
Bibliografia.....	135

Sommario

Introduzione

Negli ultimi anni il numero di pazienti affetti da coronopatie che richiedono un intervento di bypass aorto-coronarico è in continuo aumento. Le coronaropatie infatti, rappresentano la principale causa di mortalità a livello mondiale (circa il 70% della mortalità complessiva) [5]. Il bypass aorto-coronarico è un trattamento chirurgico nel quale segmenti di arteria o vena autologa vengono suturati a monte e a valle del tratto di arteria ostruita, bypassando, in questo modo, il tratto di coronaria stenotica e ripristinando così il corretto apporto di ossigeno al miocardio. La grande vena safena (SV), dopo l'arteria mammaria, rappresenta il sostituto d'elezione poiché presenta numerosi vantaggi tra cui: una lunghezza che la rende adatta anche alla realizzazione di graft multipli e un diametro paragonabile a quello delle coronarie. Nonostante il suo largo impiego, si stima che circa il 50% degli interventi chirurgici mediante l'impiego di SV fallisce dopo 2 anni [21]. Una delle maggiori complicazioni è l'occlusione del graft, a causa dello sviluppo di iperplasia dell'intima. Il primo elemento scatenante dell'intero processo è la procedura

chirurgica che comporta la perdita del tessuto perivascolare e la rimozione dei *vasa vasorum* (VV) della SV che vengono scollegati dall'arteria femorale [23]. La manipolazione chirurgica del vaso provoca un danneggiamento endoteliale, un danno da ri-perfusione ed un conseguente stress ossidativo [28, 29]. La perdita dei VV, deputati agli scambi gassosi e ai nutrienti della parete vascolare, è una delle conseguenze più gravi dell'intervento chirurgico poiché, una distruzione della microcircolazione si traduce, in sede di bypass, in un minore apporto di ossigeno alla parete esterna del vaso.

Esistono evidenze sperimentali che testimoniano che condizioni di ipossia provocano rimodellamento vascolare, caratterizzato da ispessimento della parete del vaso, apoptosi cellulare e sviluppo di neointima [24, 52, 56,]. Uno dei primi meccanismi di auto-difesa, che si instaurano nel tessuto vascolare quando si trova in una condizione di ipossia, è lo sviluppo di una nuova rete di microcircolazione deputata a supplire la carenza di ossigeno. Oltre a questo, è da considerare che in sede di intervento di bypass la vena viene utilizzata come condotto coronarico per trasportare sangue arterioso che presenta una

pressione parziale di ossigeno (pO_2) maggiore rispetto a quella del sangue venoso (100 mmHg vs 38 mmHg). L'elevata presenza di ossigeno può generare sulla parete vascolare stress ossidativo con produzione delle ROS (specie reattive dell'ossigeno) e conseguente danno tissutale [45, 32]. Malgrado questi elementi possano incidere sulla durata a lungo termine del graft venoso, in letteratura non esistono lavori che utilizzano modelli *ex vivo* volti a studiare gli effetti dell'ambiente biochimico del bypass (livelli di ossigeno) sul rimodellamento vascolare della SV. Quello che è noto, da studi effettuati su modelli *ex vivo* che simulano l'ambiente emodinamico coronarico, è che il fallimento del graft è imputabile alla diversa struttura anatomica della vena safena, rispetto a quella coronarica, che la rende difficilmente adattabile alle condizioni emodinamiche arteriose (caratterizzate da un ambiente con pressioni e portate elevate pulsatili) [50]. Questa nuova condizione, infatti, scatena il fenomeno dell'arterizzazione del graft, che si traduce in un rimodellamento della parete del vaso, all'interno del quale si scatenano una serie di meccanismi biologici che nel tempo provocano un accelerato processo aterosclerotico che

culmina con la stenosi del vaso e quindi il fallimento del graft stesso. Fenomeno noto come il *Vein Graft Disease* (VGD) [30]. Il presente lavoro di tesi è volto allo studio dei fenomeni cellulari alla base del rimodellamento vascolare a cui va incontro la vena safena quando viene impiegata come bypass aorto-coronarico, e ha come scopo la comprensione degli effetti degli stimoli biochimici (intesi come minore apporto di O_2 alla parete vascolare ed un elevata pO_2 intraluminal) a cui il vaso è soggetto in ambiente coronarico. In questo contesto, l'obiettivo è quello di studiare il rimodellamento vascolare di segmenti di vena safena umana mantenuti in coltura, per 7 giorni, all'interno di un sistema *ex vivo* in grado di simulare differenti condizioni biochimiche di coltura. Il progetto è stato suddiviso in tre parti: la prima parte del lavoro è stata realizzata presso il Laboratorio di Micro e Biofluidodinamica Sperimentale (μ BSLab) del DEIB (Dipartimento di Elettronica, Informazione e Bioingegneria) del Politecnico di Milano dove sono state condotte prove su banco per la messa a punto del modulo deossigenante del sistema di coltura *ex vivo*. La seconda parte del lavoro, invece, è stata svolta in collaborazione con il

gruppo di ricerca del Laboratorio di Ingegneria Tissutale Cardiovascolare (LIT) dell'I.R.C.C.S. Centro Cardiologico Monzino e si è incentrata sullo studio del rimodellamento vascolare di segmenti di SV umana coltivati all'interno del sistema *ex vivo* (Figura1). Infine, per interpretare e supportare i dati ottenuti dalle analisi biologiche, è stato sviluppato un modello matematico in grado di fornire una stima della diffusione dell'ossigeno attraverso la parete di un vaso mantenuto in coltura in differenti condizioni di ossigenazione.

Materiali e Metodi

Per questo studio è stato utilizzato un sistema *ex vivo* in grado di sottoporre i segmenti di SV ad un flusso stazionario mantenendo l'ambiente intra-luminale ed extra-avventiziale del vaso in differenti condizioni di pO_2 .

Questo sistema consta di 3 componenti principali: una camera di coltura bi-compartimentale (costituita da due camere concentriche di cui la prima, più interna, contiene il vaso e costituisce il reservoir per il compartimento extra-avventiziale, mentre la più esterna funge da reservoir per il compartimento intra-luminale); un modulo ossigenante (costituito da un circuito ossigenante, realizzato con tubi in silicone permeabili

all'ossigeno e una pompa peristaltica Watson-Marlow (Du, Watson Marlow Group) per la movimentazione del medium ossigenato); ed infine, da un modulo deossigenante, costituito da un circuito realizzato con tubi in silicone rivestiti di PVC ed una seconda pompa peristaltica per la movimentazione del medium deossigenato (Figura 1).

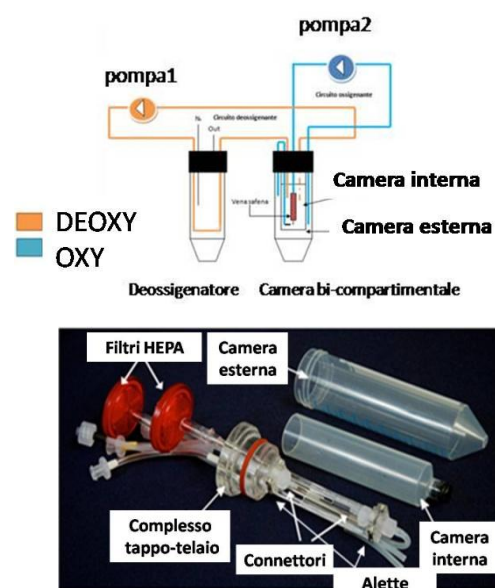


Figura 1: *Sopra: Sistema di coltura ex vivo: si individua la camera bi-compartimentale (camera interna ed esterna), il modulo deossigenante (arancione) e modulo ossigenante (azzurro). Sotto: dettaglio della camera bi-compartimentale, composta da camera interna e camera esterna.*

Il deossigenatore è costituito da una camera chiusa mediante un tappo che presenta quattro accessi: due dediti all'ingresso e all'uscita del fluido deossigenato e, due dedicati all'ingresso e all'uscita del gas deossigenante. Il tubo in silicone, all'interno del quale scorre il fluido, è l'elemento attraverso il quale si

realizza lo scambio gassoso. Il suo dimensionamento è basato su un modello teorico, adattato da un modello precedentemente sviluppato da Orr e Colleghi [58].

Prove su banco per la caratterizzazione del modulo de-ossigenante.

Il modello matematico sviluppato per il dimensionamento del deossigenatore prevede che la pO_2 del fluido in uscita dal deossigenatore sia funzione del livello di ossigeno presente nel medium, della pO_2 presente della camera del deossigenatore e della lunghezza del tubo in silicone dentro cui scorre il fluido:

Al fine di validare il modello matematico di dimensionamento del sistema sono state condotte due tipologie di esperimenti. Nel primo gruppo di esperimenti sono state fatte prove caratterizzate dall'assenza di ricircolo del fluido (prove a circuito aperto) e nel secondo prove che replicano le condizioni reali di esercizio del deossigenatore (prove a circuito chiuso).

Nelle prove a circuito aperto l'obiettivo è stato quello di determinare l'efficacia della deossigenazione in un singolo passaggio del fluido all'interno del deossigenatore. Gli esperimenti sono stati condotti applicando diversi valori di portata di esercizio e iniettando nel lato

gas del deossigenatore azoto puro con una portata pari a 0.3 l/min. Lo scambio di massa specifico è stato stimato come la differenza tra la pO_2 del fluido in ingresso e in uscita dal deossigenatore. Infine, lo scambio di massa totale è stato calcolato come il prodotto tra la portata di esercizio e lo scambio di massa specifico. I risultati sono stati poi confrontati con i valori teorici.

Le prove a circuito chiuso sono state condotte con lo scopo di valutare il comportamento nel transitorio e a regime del sistema deossigenante durante le normali condizioni di esercizio. In questa prova è stata misurata la pO_2 del fluido in uscita dal deossigenatore avendo imposto diversi valori di saturazione dell' O_2 ed impostando una portata di ricircolo del fluido pari a 5 ml/min. Per ogni livello di saturazione di O_2 , la prova è stata ripetuta tre volte.

Campagna sperimentale con campioni di vena safena umana.

Presso il laboratorio LIT è stato condotto lo studio del rimodellamento vascolare di segmenti di SV mantenuti in coltura nel sistema *ex vivo* (Figura1). All'interno di questo studio sono stati delineati 3 gruppi sperimentali (n=4 per ogni gruppo): il gruppo sperimentale bypass, dove i campioni sono stati sottoposti a

condizioni di coltura che simulano le condizioni di ossigenazione simili al bypass aorto-coronarico, ovvero un valore di pO_2 intra-luminale pari al 21% (pO_2 sangue arterioso) e una pO_2 extra-avventiziale pari al 5% (pO_2 generata a causa della perdita dei VV), il gruppo standard, dove sono state simulate le condizioni di coltura che sono normalmente utilizzate nei modelli *ex vivo* per lo studio del VGD (pO_2 intra-luminale ed extra-avventiziale pari al 21%) ed infine, il gruppo venoso che simula le condizioni biochimiche tipiche dell'ambiente venoso (pO_2 intra-luminale pari al 5% ed extra-avventiziale pari al 21%). Tutti i campioni sono stati mantenuti in coltura, per 7 giorni, applicando una portata stazionaria ($Q=5$ ml/min) ed una pressione intra-luminale pari a 5 mmHg. Ogni prova è stata svolta seguendo un unico protocollo che prevede 4 fasi successive: *i*) preparazione del campione, *ii*) assemblaggio della camera bi-compartimentale, *iii*) integrazione della camera bi-compartimentale con il circuito ossigenante, il circuito deossigenante e il deossigenatore *iv*) messa in esercizio del sistema. Al termine della coltura, tutti i campioni del gruppo standard e bypass sono stati sottoposti a saggio MTT per

una valutazione della vitalità cellulare. Da tutti i campioni sono state poi ottenute sezioni di spessore pari $5\mu m$, sulle quali sono state condotte analisi istologiche. Dalle sezioni istologiche dei campioni di vena safena sono state effettuate colorazione H&E e Tricromia di Masson per valutare la morfologia della parete vascolare. Per i campioni del gruppo bypass e standard, inoltre, sono state effettuate analisi in immunofluorescenza (con un anticorpo specifico per marcare l' α -actina delle cellule muscolari lisce, un anticorpo specifico per marcare il fattore CD31 delle cellule endoteliali e con DAPI per individuare i nuclei cellulari). Dalle immagini in immunofluorescenza è stata calcolata la densità cellulare nelle 3 diverse tuniche della parete vascolare di ogni campione del gruppo bypass e standard ed inoltre è stata stimata la densità cellulare totale su tutta la parete vascolare degli stessi campioni SV. Per i campioni del gruppo venoso invece la densità cellulare è stata calcolata su tutta la parete vascolare a partire da immagini istologiche con colorazione H&E. Inoltre, per i campioni del gruppo bypass e standard, sono state eseguite analisi per valutare l'apoptosi cellulare (saggio TUNEL) ed indagini immunistochemiche per stimare la

proliferazione cellulare (Ki67). Infine, per tutti i campioni, a partire dalle immagini ottenute dalle sezioni di SV sottoposte a colorazione H&E è stata effettuata la misura della *length density* dei VV (Tabella1).

Campioni	MTT	H&E	Masson	IF	Densità cellulare	TUNEL	Ki67	Length density
Bypass	X	X	X	X	X	X	X	X
Standard	X	X	X	X	X	X	X	X
Venoso		X	X		X			X

Tabella 1 Tabella riassuntiva delle analisi svolte.

Risultati

Risultati della caratterizzazione del modulo de-ossigenante

La prima serie di esperimenti (configurazione a circuito aperto), ha mostrato che all'aumentare della portata di esercizio lo scambio di massa specifico decresce, in quanto, per portate crescenti, a parità di lunghezza del tubo lungo il quale avviene lo scambio, il tempo di permanenza del liquido nello scambiatore diminuisce, consentendo quindi un minore scambio. In figura 2 sono riportati i risultati ottenuti.

Dal confronto dei dati sperimentali dello scambio di massa specifico (Figura 3) e dello scambio di massa totale con i dati teorici, è emerso che, all'aumentare della portata di esercizio lo scambio di massa specifico diminuisce mentre, lo scambio di massa totale aumenta. Inoltre in Figura

3 si può osservare che i dati sperimentali seguono lo stesso andamento dei dati teorici. Tuttavia, per valori di Q minori di 2 ml/min, l'efficienza del deossigenatore è minore rispetto a quanto predetto dal modello teorico. Questo risultato può essere imputabile alla non idealità del sistema dovuta all'impossibilità di ottenere a valle del deossigenatore un circuito totalmente impermeabile all'O₂.

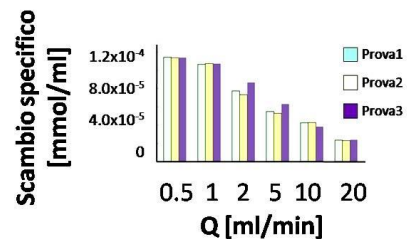


Figura 2: Risultati prove a circuito aperto: valori sperimentali dello scambio di massa specifico

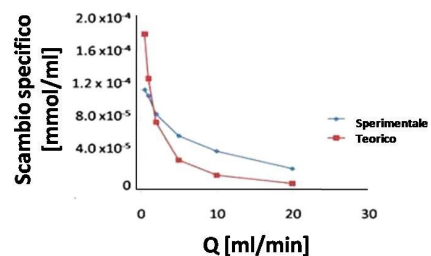


Figura 3: Risultati della prova a circuito aperto, dello scambio di massa specifico a confronto con i dati teorici

I risultati delle prove condotte a circuito chiuso hanno mostrato che, diminuendo la saturazione dell'O₂ all'interno della camera deossigenante, la concentrazione di O₂ del fluido, misurata in uscita dal deossigenatore, diminuisce e si stabilizza ad un valore pari a 5x10⁻⁵ mmol/ml (38 mmHg) (Figura 4).

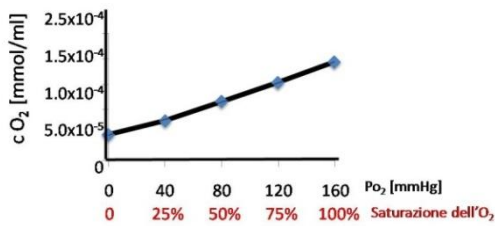


Figura 4: Andamento della concentrazione di O₂ al variare del livello di saturazione dell'ossigeno, espresso in % (rosso) ed in pO₂ (blu).

Risultati della campagna sperimentale con campioni di vena safena umana

I risultati del saggio MTT mostrano, nei campioni del gruppo bypass e in parte anche nei campioni del gruppo standard, che ci sono zone dove la vitalità cellulare è mantenuta e invece zone dove non si ha vitalità cellulare. Le immagini istologiche ottenute con colorazione H&E e tricromica di Masson mostrano che tutti i campioni mantengono la struttura caratteristica della parete vascolare, non esistono segni di degenerazione cellulare e l'avventizia risulta preservata (Figura 5). Per i campioni bypass è stato osservato un aumento di VV in numero e dimensione nell'avventizia ed una diminuzione della SMC della media (Figura 5-E). Le immagini ottenute con indagini in immunofluorescenza mostrano una diminuzione del numero di cellule nella tunica media per i campioni del gruppo bypass e nella media e nell'avventizia per i campioni del gruppo

standard con anche una diminuzione dello strato endoteliale (Figura 6).

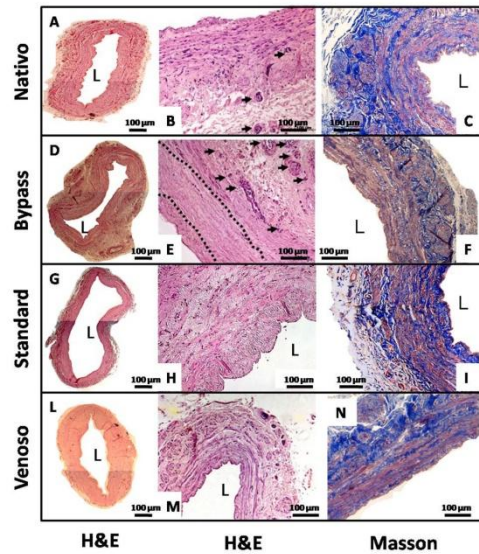


Figura 5: Immagini di sezioni di SV sottoposte a colorazione H&E (prime 2 colonne) e tricromica di Masson (ultima colonna). (A-B-C) Nativa, (D-E-F) bypass, (G-H-I) standard e (L-M-N) venoso.

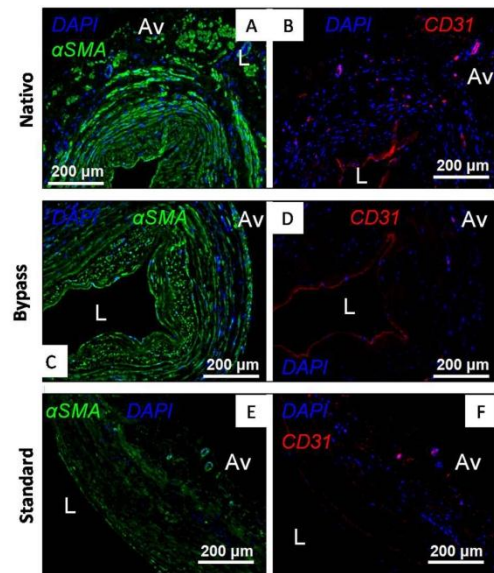


Figura 6: Immagini, in immunofluorescenza (α -SMA/DAPI e CD31/DAPI) di sezioni SV, (A-B-C) nativi, (D-E-F) bypass, (G-H-I) standard.

Dalle analisi della stima della densità cellulare, calcolata per ogni singola

tunica appartenente alla parete del vaso è emerso che per i campioni del gruppo bypass vi è una diminuzione statisticamente significativa della densità cellulare relativa alla tunica media del vaso, mentre per i campioni del gruppo standard è emersa una diminuzione statisticamente significativa della densità cellulare relativa alla tunica media e avventizia (Figura 7).

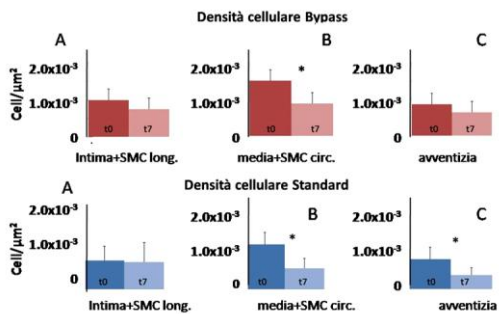


Figura 7: Stima della densità cellulare per i campioni bypass e standard. (* = $p < 0.05$).

Infine, dalla stima della densità cellulare, calcolata su tutta la parete vascolare, è stata evidenziata una diminuzione statisticamente significativa della densità cellulare totale per i soli campioni del gruppo bypass e standard (Figura 8),

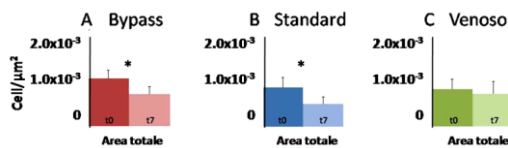


Figura 8: Risultati della densità cellulare per i campioni (A) bypass, (B) standard e (C) venosi.

Le indagini dell'apoptosi cellulare hanno mostrato un aumento delle cellule apoptotiche dei campioni del gruppo

bypass (Figura 9 D) in particolare a livello della tunica media (cerchio rosso in Figura 9 B).

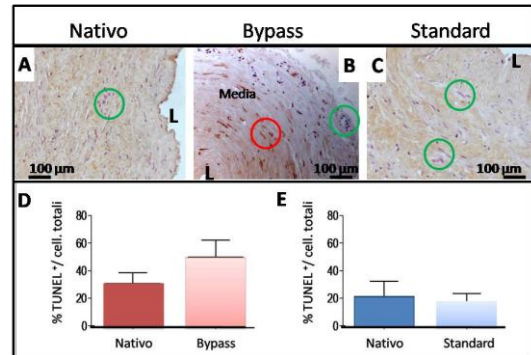


Figura 9: Sopra: a saggio TUNEL. (A) Nativo, (B), bypass. e (C) standard Sotto: risultati della conta del n. cellule apoptotiche rispetto al n. totale di cellule.

Le indagini relative alla proliferazione cellulare hanno mostrato la presenza di cellule proliferanti in tutta la parete del vaso (Figura 10) ed un aumento significativo della proliferazione delle cellule dei VV nei campioni del gruppo bypass (Figura 10 D).

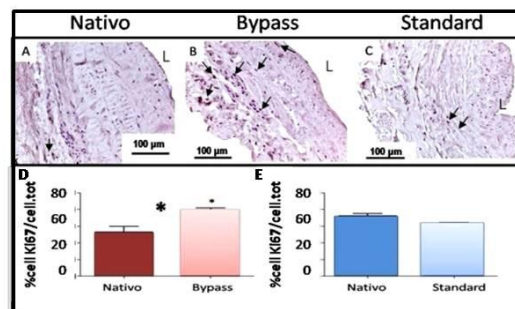


Figura 10: Sopra: colorazione immunohistochimica (Ki67, frecce nere) (A) Nativo, (B) bypass, (C) standard. Sotto: risultati della conta del numero di cellule proliferanti rispetto il numero totale di cellule.

Infine, dalla misura della *length density* è emerso un aumento statisticamente

significativo dei VV di piccolo e grande calibro nei soli campioni del gruppo bypass (Figura 11).

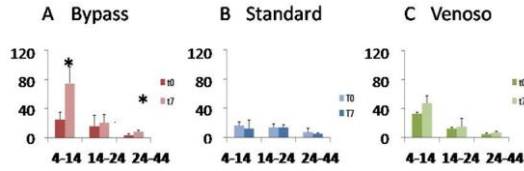


Figura 11: Misura della Length density (A) Bypass, (B) standard (C) venoso. VV piccoli (4-14 μm), medi (14-24 μm) e grandi (14-24 μm). (* = $P < 0.05$). Si osserva un aumento significativo dei VV piccoli e medi per i campioni bypass.

Modello matematico per la diffusione dell'O₂ attraverso la parete vascolare

Il modello matematico, realizzato per lo studio della diffusione dell'O₂ attraverso la parete vascolare, è basato sull'utilizzo del modello di Krogh [62] e, per la sua realizzazione sono state fatte le seguenti ipotesi: *i*) il vaso è stato assunto come un costrutto cilindrico di spessore pari alla differenza tra il raggio esterno (R_{ext}) e raggio interno (R_{int}) e) del vaso, *ii*) il profilo di concentrazione dell'O₂ dipende dal consumo cellulare e dal coefficiente di diffusione dell'O₂ nel tessuto vascolare, *iii*) la diffusione dell'O₂ in direzione assiale è stata ipotizzata pari a 0 ed infine *iv*) la distribuzione cellulare all'interno del tessuto è stata ipotizzata omogenea su tutta la parete vascolare. Partendo da queste ipotesi, il profilo di concentrazione dell'O₂ si può stimare applicando l'equazione della diffusione-

reazione, a regime, ipotizzando una simmetria cilindrica del profilo e un consumo cellulare di ordine zero:

$$D \nabla^2 c = V \quad (1)$$

dove D è il coefficiente di diffusione dell'O₂ attraverso la parete vascolare, c la concentrazione di O₂ e V il consumo cellulare volumetrico. Ponendo come condizioni al contorno: pO_2 intraluminali pari al 21% e pO_2 extravascolari pari al 5%, si ottiene il seguente profilo di concentrazione:

$$c(r) = c_{EXT} - \frac{V(R_2^2 - r^2)}{4D} - (\ln R_2 - \ln r) \left[\frac{c_{INT} - c_{EXT} + \frac{V}{4D}(R_2^2 - R_1^2)}{\ln \frac{R_1}{R_2}} \right]$$

dove $c(r)$ è la concentrazione di O₂ in funzione della coordinata radiale r . Il modello consente di ricavare il profilo di concentrazione dell'O₂ in un vaso posto nelle condizioni di ossigenazione simili al bypass aorto-coronarico. Inoltre, ponendo come condizioni al contorno le condizioni di coltura del gruppo standard e venoso è possibile ottenere anche il profilo di concentrazione riferito a queste condizioni. Il presente modello è utile per valutare la pO_2 presente nella parete vascolare nelle diverse tuniche. I risultati hanno mostrato che per i campioni del gruppo bypass la pO_2 , a livello della tunica media, raggiunge un valore minimo pari a 0 mmHg (Figura 12). Infine la condizione standard ha mostrato che la pO_2 si mantiene in un intervallo

compreso tra il 10 e 15%, mentre nelle condizioni venose la pO_2 non raggiunge mai lo 0%.

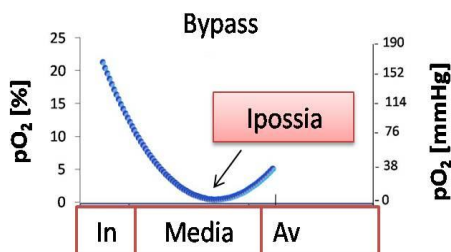


Figura 12: Diffusione dell' O_2 attraverso la parete vascolare. in:intima; Media: media; Av:avventizia.

Discussione

Nel presente lavoro di tesi è stato osservato che le condizioni biochimiche, a cui è esposta la vena safena nel bypass aorto-coronarico, provocano un marcato rimodellamento vascolare caratterizzato da fenomeni apoptotici, angiogenici e proliferativi. In accordo con quanto presente in letteratura [56] e sulla base dei risultati ottenuti dal modello teorico, l'apoptosi cellulare, riscontrata nella tunica media dei campioni del gruppo bypass, sembra essere stata indotta da una condizione di ipossia presente a livello della media del vaso. Le analisi condotte per la misura della *length density* hanno riportato un aumento statisticamente significativo dei VV nei campioni del gruppo bypass. Questo tipo di fenomeno è riconducibile ad un adattamento delle cellule vascolari che, in condizioni di ipossia, attivano risposte angiogeniche

atte a ristabilizzare il corretto apporto di ossigeno e nutrienti alla parete del vaso [36]. Inoltre, l'aumento del numero di cellule proliferanti in prossimità della parete dei VV, conferma questa ipotesi. È interessante notare che tali processi potrebbero avere effetti sia positivi che negativi sull'impianto vascolare. In particolare, l'angiogenesi può favorire il ripristino della microcircolazione, mentre l'iper-proliferazione può risultare dannosa, favorendo l'ispessimento della parete vasale ed la formazione della placca aterosclerotica. L'apoptosi può da una parte controbilanciando la tendenza iper-proliferativa, dall'altra esacerbando il danno con conseguenze anche gravi. La diminuita densità cellulare osservata nei campioni del gruppo standard permette di ipotizzare che, in accordo con quanto presente in letteratura [45], l'elevata pO_2 arteriosa genera uno stress ossidativo con produzione delle specie reattive dell'ossigeno che danneggiano il tessuto provocandone necrosi. I dati presentati in questo lavoro, seppur preliminari, rappresentano un punto di partenza per una comprensione migliore del VGD che si sviluppa nel periodo post operatorio ed è causato da una co-partecipazione degli stimoli emodinamici e biochimici tipici dell'ambiente coronarico.

Summary

Introduction

In the last years, the number of patients affected by coronary arteries diseases is increasing. Coronary artery bypass grafting (CABG) is a standard surgical treatment for coronary artery disease. During this surgical procedure, the clogged artery is bypassed with a segment of autologous artery or vein, thus restoring the proper amount of oxygen to the myocardium.

The great saphenous vein (SV) is the graft of choice, due to its length, which makes it suitable for multiple grafting, and its diameter which is comparable to the one of the coronary arteries.

Despite its widespread use, it is estimated that approximately 50% of SV-based surgical interventions, fails after 2 years. The main drawback is the SV graft occlusion, due to intimal hyperplasia (IH). The primary cause of IH is the surgical procedure involving the loss of perivascular tissue and the removal of the vasa vasorum (VV) of the SV, that are disconnected from the femoral artery [23]. The surgical manipulation of the vessel leads to endothelial damages by reperfusion and consequent oxidative stress. The loss of VV, which deliver

nutrients and oxygen to the vascular wall, is one of the most serious consequences of surgery because a destruction of the microcirculation results in a lower contribution of O₂(hypoxia) to the outer venous bypass wall.

Some experimental evidences show that hypoxia conditions cause vascular remodeling, characterized by vascular wall thickening, cell apoptosis and neo-intima formation [51, 52, 56]. The vascular tissue, when affected by hypoxia, could react by developing a new microcirculation network in order to counterbalance the oxygen lack.

In addition, it must be observed that the SV graft is employed as coronary vessel in order to transport arteriosus blood, characterized by a pO₂ greater than the venous one, 100 mmHg and 38 mmHg respectively. High oxygen concentration could generate oxidative stress into the vascular wall, resulting in ROS (Reactive Oxygen Species) development and tissue damage [45]. Although these factors affect the long-term patency of the SV graft, it is hard to find in literature *ex vivo* models about the effects of the biochemical bypass environment on the SV vascular remodeling, in terms of different environmental pO₂.

The SV graft failure is due to the different anatomical structure of the wall, with respect to the coronary one, which makes SV hardly adaptive to arterial hemodynamic conditions. This phenomenon leads to the well known “graft arterization”, which implies vessel wall remodeling, accelerating the atherosclerotic process, and finally leading to vessel stenosis and graft failure. All biological processes are called “Vein Graft Disease (VGD) [29].

In this context, this work firstly aims at studying cellular phenomena responsible of the SV vascular remodeling, occurring when the SV is employed for coronary-artery bypass.

Secondly, the effect caused by the biochemical cues on the wall remodeling, such as low oxygen level in the vascular wall while high level in the lumen, are investigated. In particular, the evolution of SV remodeling caused by CABG-like biochemical condition (intra-luminal $pO_2=21\%$ and extra-adventitial $pO_2=5\%$) is studied using an *ex vivo* vessel culture system. This project is divided in three main parts: the first activity has been performed at the Laboratory of Experimental Micro and Biofluidodynamics (μ BSLab) of the Dipartimento di Elettronica,

Informazione e Bioingegneria where two sets of experiments have been carried out in order to characterize the de-oxygenator. The second part of the work was performed at, and in strict collaboration with, the Laboratory of Cardiovascular Tissue Engineering of Centro Cardiologico Monzino and it was focused on the *ex vivo* study of vascular remodeling of human SV segments. Finally, in order to understand the biological results, it was developed a mathematical model to study the oxygen diffusion through the vessel wall cultured in different biochemical conditions.

Material and methods

An *ex vivo* culture system has been used in order to maintain the intra-luminal and the extra-adventitial compartment at different oxygen partial pressure (pO_2). This system consists of three parts: one double-compartment chamber (made of two concentric chambers: the inner chamber used as vessel housing and the external chamber used as a reservoir for the intra-luminal culture media), one oxygenation module, made of oxygen-permeable silicon tubing and one peristaltic pump Watson-Marlow (323 Du, Watson Marlow Group), and finally one de-oxygenation module system,

composed of a de-oxygenation component, a low-oxygen permeable hydraulic system, (PVC tubing) and a second peristaltic pump for the deoxygenated culture media (Figure 1).

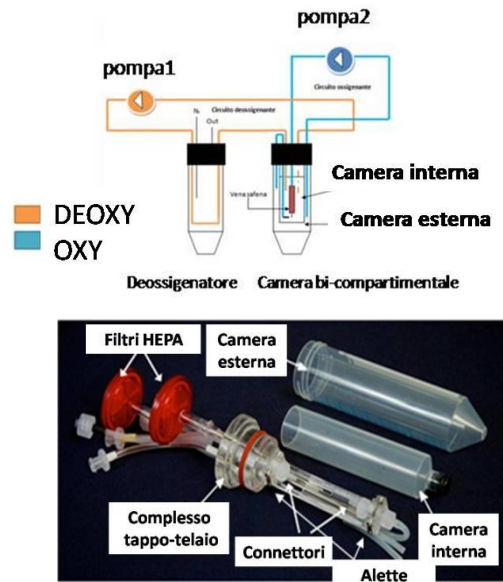


Figure 1 Top: automated vessel culture system contains bi-compartmental chamber (internal and external), de-oxygenator module (orange) and oxygenator module (blue). Below: the bi-compartmental chamber composed by the inner and the external chamber.

The de-oxygenator is composed by a closed chamber with four ports ensuring the hydraulic connection. Two ports provide connection for the recirculation of the medium and two other ports ensure injection/removal of the deoxygenating gas mixture. The gas exchange between the culture media and the de-oxygenator chamber occurs via the oxygen-permeable silicon tube. The de-oxygenator silicone tubing dimensioning is carried out through a mathematical

model, that will be used to compare the experimental results of the characterization trial.

De-oxygenation test

Two experimental campaigns were carried out in order to characterize the de-oxygenator module. In the first experimental campaign (open loop configuration) the dimensioning of the de-oxygenator was verified imposing different flow rates. The gaseous mixture in the de-oxygenator chamber was pure nitrogen (oxygen concentration equal to 0 mmol/ml) and the gas flow rate was set equal to 0.3 l/min. three experiments were performed for each flow rate.

The specific mass transfer, was estimated as the difference between the outlet and the inlet of the oxygen partial pressure of the fluid and the mass transfer was estimated as the product of the applied flow rate and the specific mass. Finally, the experimental results was compared with the theoretical one.

The close loop configuration was carried out to test the de-oxygenator behavior in the transient and steady states condition. A recirculating flow rate of 5ml/min was applied. Different O₂ saturation levels within the gas side of the de-oxygenator module were imposed. Three experiments

were performed for each O₂ saturation levels. The partial oxygen pressure at the outlet of the de-oxygenator module was recorded.

Experimental campaign with human saphenous vein segments

Three experimental groups were designed (n=4 for each group): i) in the bypass group the vein segments were cultured in bypass conditions (intra-luminal pO₂=21% (equal to the arterial pO₂) and extra-adventitial pO₂=5% (in order to simulate the deficiency of O₂ due to the VV loss)); ii) in the standard group the vein segments were cultured in intra-luminal and extra-adventitial pO₂=21, and finally iii), in the venous group, the physiological vein conditions were tested (intra-luminal pO₂=5% and extra-adventitial 5%=21%).

All the vein segments were perfused, for 7 days, under steady flow condition with luminal pressure equal to 5 mmHg and flow rate equal to 5 ml/min. Each experiment was carried out using the same protocol i) SV sample preparation ii) bi-compatimental chamber assembly, iii) bi-compatimental chamber integration with the oxygen hydraulic circuit and the de-oxygenator module iv) the *ex vivo* system start up.

At the end of the experiment, to assess tissue viability, MTT staining were used. All cultured SV samples were cut into 5µm-thick sections using a microtome. For the morphological evaluation, all the sample sections were stained with H&E and Masson's trichrome. Furthermore bypass and standard sample were stained with immunofluorescence analysis (with mouse anti-human α-SMA for labeling SMCs, with goat anti-human CD31 to label the endothelial cells and finally nuclei were counterstained with DAPI). For bypass and standard samples, the cell density evaluation was performed on immunofluorescence-stained sections and it was computed on native and SV cultured samples, for each vessel layers and for the whole vessel wall. The venous sample cell density was performed on H&E-stained sections. Afterwards, for the evaluation of the apoptotic cells the TUNEL staining, was carried out on 3 samples of each bypass and standard groups. To quantify the cellular proliferation, Ki67 immunolabeling analysis was performed. Finally the *vasa vasorum* length density was evaluated in all the H&E stained SV samples (Table 1)

Campioni	MITT	H&E	Masson	IF	Densità cellulare	TUNEL	Ki67	Lenght density
Bypass	X	X	X	X	X	X	X	X
Standard	X	X	X	X	X	X	X	X
Venoso		X	X		X			X

Table 1 Summary of the analysis.

Results

De-oxygenator module performances results

The results of the first experimental campaign (open loop configuration) are reported in Figure 2. As expected, by increasing the flow rate the specific mass transfer decreases, because, by keeping the same exchange gas tube length, the de-oxygenation timing is reduced.

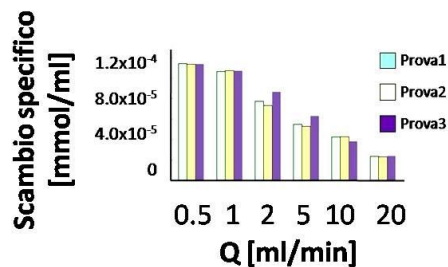


Figure 2 Results of open-loop tests: experimental values of the specific mass transfer.

Theoretical and measured changes in oxygen concentration under various flow rate conditions are compared (Figure 3). As expected, by increasing the recirculating flow rate, the specific mass transfer decreases (Figure 3), while the mass transfer rate increases. In Figure 3 the comparison shows that the

experimental data undertake the same trend of the mathematical model. However, for flow rate lower than 2 ml/min, the de-oxygenator become less efficient than predicted theoretically. This is a reasonable behavior considering the possible O₂ infiltration from the outside environment.

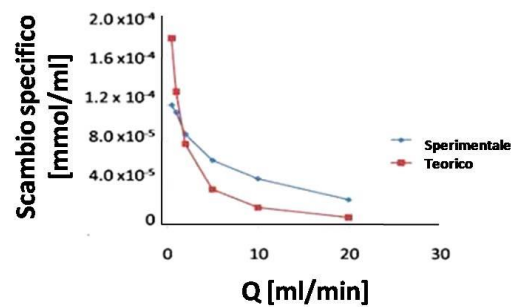


Figure 3 Results of open-loop tests: specific mass transfer values for experimental (blue) and theoretical (red), related to different flow-rates.

The results of the de-oxygenator validation, in the closed loop configuration are reported in Figure 4. By decreasing the oxygen saturation of the gaseous mixture in the de-oxygenator module, the resulting oxygen concentration decreased monotonically. At the limit condition, i.e. at 0% oxygen saturation (95% N₂ and 5% of CO₂), the oxygen concentration in the extra-adventitial region fell to a stable value close to 4.9x10⁻⁵ mmol/ml (~ 38 mmHg). Taken together, these results showed that, although affected by some unavoidable oxygen infiltration, the de-oxygenator

module permits imposing controlled low-oxygen conditions in the extra-adventitial region of the SV sample, using the oxygen saturation of the gaseous mixture as a control parameter.

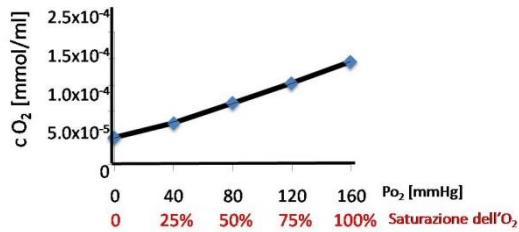


Figure 4 O₂ concentration trend for varying oxygen saturation level, expressed in % (red) and in pO₂ (blue)

Results of the experimental campaign with human saphenous vein segments

The MTT staining showed that under bypass and standard condition the vessel viability was not completely maintained similarly to freshly harvested SV ring, used as positive control. In all the treated samples, the Masson's trichrome and H&E staining results demonstrated a relatively good integrity of the vessel structure, with a good preservation of adventitial layer, without signs of tissue degeneration and swelling. Moreover, a lack of medial SMC layers and an increase in number and dimension of VV were observed (Figure 5).

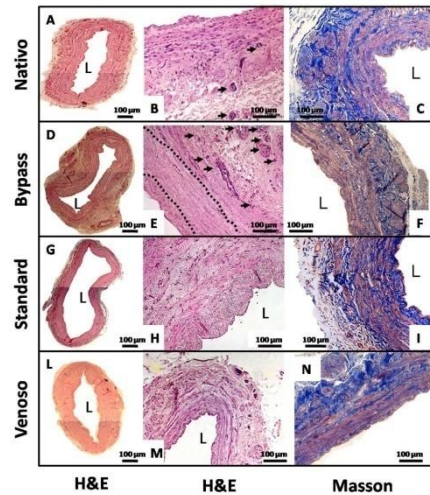


Figure 5 Images from optical microscope with magnification of 2.5X and 10X, of SV sections stained with H&E and Masson's trichrome. (A-B-C) Native, (D-E-F) bypass, (G-H-I) standard and (L-M-N) venous, L:lumen. An increase of the VV bypass and SMC medial vessel reduction can be observed (dotted lines).

Immunofluorescence analysis showed a possible reduction of the cells number in the medial layers of the bypass samples and in the medial and adventitial layer of the standard samples, with a reduction of the endothelial cells just in the standard samples (Figure 6).

The cell density analysis showed a statistically significant decrease of the cell density in the medial layers of the bypass sample and a statistical reduction in the medial and adventitia layers of the standard samples (Figure 7).

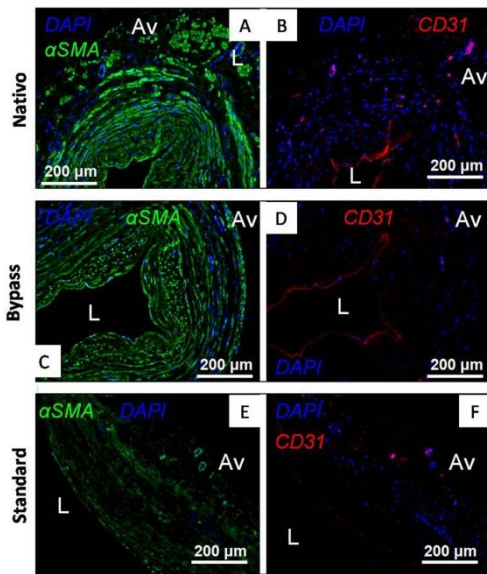


Figure 6 Images obtained by fluorescence microscope, with magnification 10X, of SV sections, stained with SMA/DAPI (green/blue) and CD31/DAPI (red/blue). L:lumen; AV: adventitia (A-B-C) Native, (D-E-F) bypass, (G-H-I) standard.

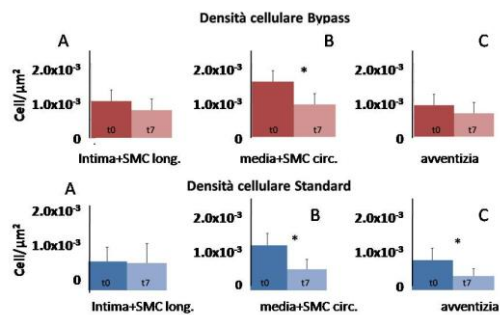


Figure 7 Results from cellular density estimation for bypass and standard samples (* = $p < 0.05$).

Finally, the cell density calculated in whole the vessel wall exhibited a statistically significant drop of the cell concerning the bypass and standard groups (Figure 8).

The quantitative data of the apoptotic analysis showed an increase level of the apoptotic cells in the bypass group.

Moreover, Figure 9 B shows that the apoptotic cells are mostly located in the medial layer of the bypass vessel.

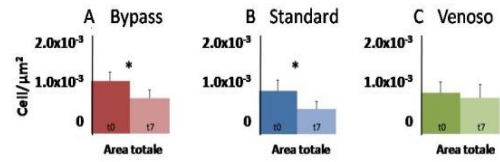


Figure 8 Results of the cellular density for bypass (A), standard (B) and venous (C) samples.

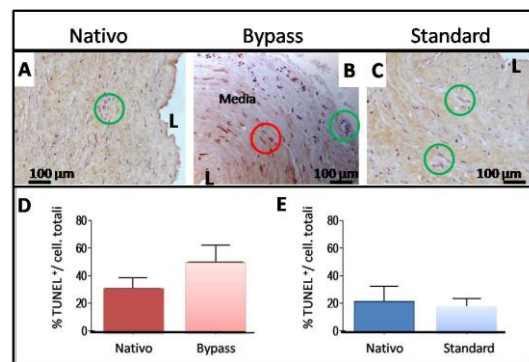


Figure 9 At the top of the image: TUNEL stained SV sections (A) Native, (B), bypass. and (C) Standard. L: lumen. The red circle is an example of apoptotic cell and the green circle stands for alive cell. At the bottom of the image: apoptotic cell density results against the entire set of cells.

The proliferative analysis revealed a statistically significant increase of proliferating VV cells in the adventitia of bypass samples (Figure 10).

Finally, the measurement of the VV length density showed a statistically significant increase of the length density of the small and medium VV (Figure 11).

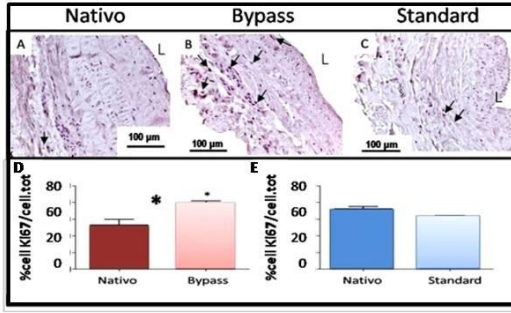


Figure 10 At the top of the image: SV immunohistochemical (ki67, black arrows) staining sections for the cellular proliferation evaluation (A), Native, (B) bypass, (C) standard. Black arrows indicate proliferative cells. At the bottom of the image: proliferative cell density against the entire set of cells.

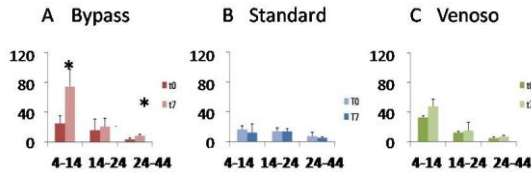


Figure 11 VV length density (A) bypass, (B) standard (C) venous. Data are referred to the three following VV subsets: small (4-14 µm), medium (14-24 µm), large (24-44 µm). (* = $P < 0.05$).

Mathematical model for the O_2 diffusion through the vascular wall

The theoretical oxygen concentration within the SV sample wall, in both tested conditions, was calculated adapting the Krogh model [62]. The following assumptions were introduced: *i*) the SV tissue was modeled as a hollow, thick-walled cylinder, and symmetry about the cylinder axis was assumed, *ii*) oxygen transfer through the tissue wall occurs by diffusion, and oxygen consumption rate

is due to cell metabolism, *iii*) axial diffusion was neglected, and *iv*) cell distribution within the SV wall was assumed to be uniform. Under these hypotheses, the steady state of the system is described as follows:

$$D \nabla^2 c = V \quad (1)$$

where D is the diffusion O_2 coefficient through the vascular wall, c represents the O_2 concentration and V is the oxygen consumption per unit tissue volume.

The boundary conditions were: *i*) oxygen concentration at the inner radius (R_{INT}), corresponding to the interface with the vessel lumen, equals to 21%, and *ii*) oxygen concentration at the outer radius (R_{EXT}) equals to 5%. Imposing the above-mentioned hypothesis, and adopting cylindrical coordinates, solving equation (1) yields:

$$c(r) = c_{EXT} - \frac{V(R_2^2 - r^2)}{4D} - (\ln R_2 - \ln r) \left[\frac{c_{INT} - c_{EXT} + \frac{V}{4D}(R_2^2 - R_1^2)}{\ln \frac{R_1}{R_2}} \right]$$

where $c(r)$ is the oxygen concentration in function of the radial coordinate r .

The model provides the oxygen concentration in a vessel, under bypass-like biochemical conditions. By changing the boundary conditions and imposing the ones related to standard and venous cases, it was possible to obtain the corresponding concentration profiles.

When bypass conditions were imposed, a minimum pO_2 value, equal to 0 mmHg,

was reached in the medium layer (Figure 12). Finally, for standard cases, pO_2 results to belong to a range of [13-15%],

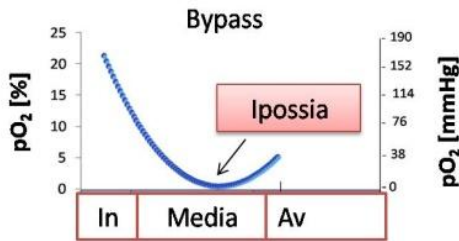


Figure 12 O_2 diffusion in function of r , through the vascular wall, for bypass (A) and standard (B) conditions.

Discussion

In this work, an *ex-vivo* approach was used in order to study the effects caused by CABG-like biochemical conditions on the pathological remodeling of human SV. Regarding the *ex-vivo* campaigns, the preliminary low-oxygen conditioning experiments gave the proof of the functionality of the *ex-vivo* culture platform. The ability of the system to maintain the tissue viability was confirmed by histological and IF analysis, demonstrating that all the vein samples treated remained intact and patent. The results obtained imposing the bypass mimicking oxygen gradients showed remodeling events related with oxidative stress and neovascularization, such as enhanced cell proliferation around *vasa vasorum*, and increased of

the small-caliber an large *vasa vasorum* length density. Interestingly, a significant decrease of circumferential medial cell density in both the explored conditions was found.

The results of the oxygen diffusion modelling suggest that in both the simulated condition, the lower oxygen level is reached in the medial layer, possible affecting the viability of the cells, and thus envisaging experimental results related to medial cell density. Surprisingly, our results were also indicative of a higher susceptibility of the adventitial cells to standard *in vitro* normoxia, suggesting that low pO_2 (bypass) favors cell survival in the external vascular wall.

The quantification of the length density revealed a statistically significant VV increase in 7 days culture-samples, showing a possible adaptation of the vascular cells aimed at recovering the oxygen and nutrients to venous wall [56]. Moreover, proliferative cells increase confirms this hypothesis.

It is interesting to observe that such processes can both negatively and positively affect the bypass vessel.

In particular, angiogenesis can contribute to a microcirculation recovery, while hyper-proliferation can be harmful

because it can lead to vessel wall thickening and stenosis leading to atherosclerotic plaque formation.

Apoptosis could counterbalance the hyper-proliferative trend of the cells. The reduced cellular density in standard samples allows to assume that, coherently with literature, high arterial pO_2 determines an oxidative stress, resulting in ROS development, which hurts the tissue by causing necrosis [45].

In conclusion, the results obtained in this thesis, even if preliminary, are of great importance for a complete understanding of the VGD phenomena, occurring during the postoperative period, and caused by coronary hemodynamic stimuli and biochemical cues.

Introduzione

Il presente lavoro di tesi, svolto in parallelo presso il Laboratorio di Micro Biofluidodinamica Sperimentale (μ BSLab) del DEIB (Dipartimento di Elettronica, Informazione e Bioingegneria) del Politecnico di Milano e il Laboratorio di Ingegneria Tissutale Cardiovascolare (LIT) dell'I.R.C.C.S. Centro Cardiologico Monzino, si pone come obiettivo finale la comprensione dei meccanismi presenti alla base del rimodellamento vascolare della grande vena safena quando utilizzata come *graft* negli interventi di bypass aorto-coronarico (CABG- Coronary Artery Bypass Grafting).

Il CABG è l'intervento chirurgico maggiormente praticato per il trattamento delle coronaropatie: consiste in una strategia chirurgica atta a ristabilire il flusso di sangue al cuore. Questa forma di trattamento si rende necessaria nel caso in cui le arterie coronarie, deputate all'irroramento del miocardio, siano ostruite a causa dell'aterosclerosi. La riperfusione del miocardio è ottenuta per mezzo di un sostituto vascolare autologo che viene suturato a monte e a valle dell'ostruzione della coronaria stessa, così da garantire il corretto apporto di ossigeno e nutrimenti al tessuto cardiaco.

Il sostituto vascolare d'elezione, dopo l'arteria mammaria, è la grande vena safena (SV) in quanto il suo utilizzo presenta numerosi vantaggi, tra cui: un diametro paragonabile a quello delle coronarie e una lunghezza che la rende adatta anche ai bypass multipli.

Si stima che nel 30-50% dei casi i graft venosi falliscono nei primi 18 mesi dall'intervento [13]. Questo accade perché il graft può andare incontro al fenomeno dell'arterizzazione, che comporta modifiche strutturali del vaso come variazione del calibro, cambiamenti nello spessore della parete e nella composizione della matrice extracellulare; queste alterazioni della struttura possono degenerare e portare alla stenosi del vaso e quindi al fallimento del graft, fenomeno noto come *Vein Graft Disease* (VGD) [30].

La causa principale del VGD sembra essere riconducibile allo sviluppo di iperplasia dell'intima indotto a seguito della trasposizione della SV da un ambiente emodinamico venoso ad un ambiente emodinamico arterioso [49, 50].

In aggiunta, alcuni studi hanno ipotizzato che un ulteriore fattore che possa indurre il VGD sia correlato al nuovo ambiente biochimico. Infatti, in questo contesto, la vena safena passa da trasportare sangue deossigenato (pO_2 venosa pari circa al 5%) a trasportare sangue ossigenato (pO_2 arteriosa pari circa al 21%). Alcuni lavori di letteratura hanno dimostrato

che queste nuove condizioni provocano sulla vena stress ossidativo [45] e un rimodellamento vascolare caratterizzato da sviluppo di iperplasia dell'intima [32]. In secondo luogo, da un'analisi accurata della letteratura, è emerso che un'ultima causa del VGD potrebbe essere la rimozione del tessuto perivascolare e dei *vasa vasorum* (deputati all'irrorazione della parete vascolare) che avviene durante la procedura chirurgica, quando la vena viene sfilata dalla gamba del paziente.

E' interessante notare che sia le nuove condizioni biochimiche (di pO_2 intraluminale arteriosa), che la carenza di ossigeno in cui si trova il vaso dopo l'intervento (a causa della perdita dei *vasa vasorum*), provocano un rimodellamento vascolare caratterizzato da fenomeni angiogenici e di morte cellulare [36, 56].

L'obbiettivo del presente lavoro di tesi è quello di studiare l'evoluzione temporale di questo rimodellamento vascolare su segmenti di vena safena umana, dopo averli mantenuti in coltura all'interno di un sistema *ex vivo* in grado di simulare le condizioni biochimiche a cui è esposto *in vivo* il graft venoso a seguito del bypass aorto-coronarico. Lo scopo, inoltre, è stato quello di valutare quale sia l'impatto delle diverse condizioni biochimiche di coltura sulla struttura del vaso.

Il presente lavoro si è articolato come segue: la prima parte è stata dedicata alle prove su banco per il collaudo e la messa a punto del modulo deossigenante appartenente al modello *ex vivo*. A seguito di questo, per lo studio del rimodellamento vascolare indotto dalle diverse condizioni di ossigenazione, è stata condotta, presso il LIT, la campagna sperimentale su campioni di vena safena umana coltivati all'interno del sistema di coltura *ex vivo*, i cui risultati sono stati ottenuti mediante tecniche istologiche, immunoistologiche e in immunofluorescenza. Infine, per interpretare e supportare i dati ottenuti dall'analisi sperimentali, è stato sviluppato un modello matematico in grado di fornire una stima della diffusione dell'ossigeno attraverso la parete di un vaso mantenuto in coltura in differenti condizioni biochimiche.

Nel Capitolo 1, ad una breve introduzione della fisiologia e della fisiopatologia delle coronarie, segue una trattazione sulle diverse tecniche chirurgiche di rivascularizzazione attualmente in uso, con particolare attenzione al bypass coronarico realizzato mediante l'utilizzo della grande vena safena. Da ultimo, vengono descritte le principali implicazioni dell'intervento di bypass relative all'impiego della vena safena come sostituto autologo.

Nel Capitolo 2, è in primis descritto lo stato dell'arte relativo ai sistemi di coltura *ex vivo* di segmenti di vena safena; successivamente, è svolta una analisi dei principali meccanismi cellulari/molecolari responsabili del rimodellamento vascolare, di condotti arteriosi e venosi, indotto da una carenza di ossigeno.

Nel Capitolo 3, viene descritto il percorso di ottimizzazione e messa a punto del modulo de-ossigenante e i materiali e metodi della campagna sperimentale condotta presso il LIT su campioni di vena safena umana.

Nel Capitolo 4, sono presentati e discussi i risultati delle prove condotte per la messa a punto del modulo deossigenante e della campagna sperimentale condotta presso il LIT per lo studio del rimodellamento vascolare indotto da diverse condizioni di ossigenazione. E' inoltre riportato lo sviluppo di un modello matematico in grado di fornire una stima della diffusione dell'ossigeno attraverso la parete di un vaso mantenuto in coltura in differenti condizioni di ossigenazione.

Nel Capitolo 5, alla luce dei risultati ottenuti e del supporto dell'analisi dello stato dell'arte, sono, infine, tratte le considerazioni conclusive e introdotti alcuni possibili sviluppi futuri del presente lavoro di tesi.

1. Le coronaropatie, i trattamenti terapeutici ed i motivi dei fallimenti terapeutici

In questo capitolo verranno descritte le coronarie, l'elevata incidenza delle coronopatie nel mondo e le terapie chirurgiche ad oggi in uso: l'angioplastica ed il bypass aorto-coronarico realizzato mediante l'utilizzo di diverse tipologie di graft, focalizzando l'attenzione sulla grande vena safena. Infine, verranno descritte le principali implicazioni dell'intervento del bypass relative all'impiego della vena safena come sostituto autologo.

1.1 Le coronarie: struttura, funzione ed emodinamica coronarica

Le arterie coronarie e le loro diramazioni sono deputate all'irrorazione e al nutrimento del cuore e nel contempo a rimuovere i cataboliti delle reazioni cellulari (Figura 1.1)

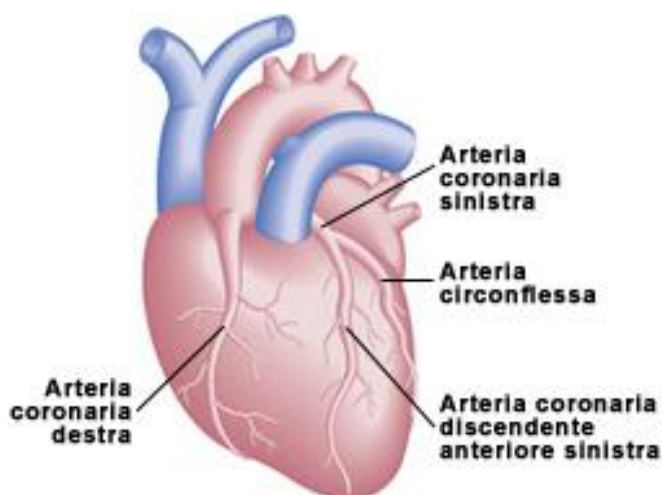


Figura 2.1 Circolo coronarico. Si nota l'origine dell'arteria coronaria destra e sinistra in prossimità dell'anello valvolare aortico. L'arteria coronaria di sinistra si divide, dopo un breve tratto, in due rami detti arteria coronaria discendente sinistra e arteria coronaria circonflessa sinistra. Le arterie principali giacciono sulla superficie del cuore mentre quelle di piccolo calibro penetrano la parete del muscolo cardiaco.

Le arterie coronarie sono vasi di piccolo/medio calibro (3.5 mm di diametro medio) e le principali sono l'arteria coronaria sinistra e l'arteria coronaria destra. Entrambe hanno origine dall'aorta ascendente e decorrono sulla superficie esterna del cuore. Le arterie coronarie intramuscolari sono più piccole e penetrano la superficie del cuore correndo fino in profondità [1].

I vasi coronarici decorrono all'interno dell'epicardio (o pericardio viscerale) che costituisce uno dei due strati del pericardio, ed è un rivestimento sieroso intimamente aderente alla superficie esterna del cuore per mezzo di tessuto connettivo (sottoepicardio) (Figura 1.2).

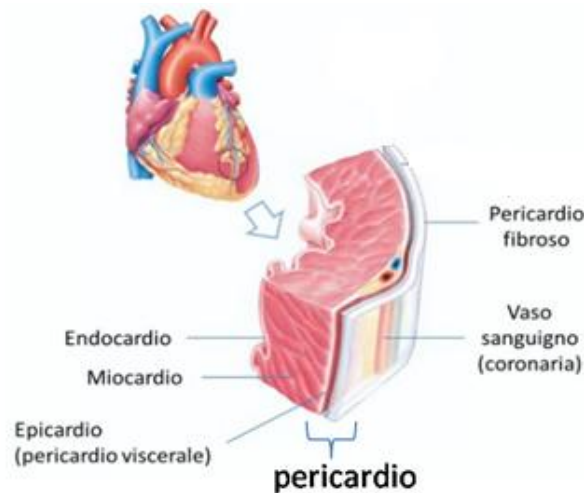


Figura 1.2 Sezione trasversale del cuore: si individuano i tre strati principali del cuore. Dall'esterno verso l'interno: il pericardio, il miocardio e l'endocardio. Il pericardio è costituito da due strati: il pericardio fibroso che costituisce la parete esterna del cuore e, il pericardio viscerale o epicardio strettamente a contatto con il muscolo cardiaco. Le arterie coronarie decorrono sotto lo strato viscerale (epicardio).

L'omeostasi dell'ambiente coronarico è mantenuta dal continuo rilascio, da parte del pericardio, di biomolecole attive che hanno un effetto diretto sull'attività delle coronarie e sul cuore stesso. Queste biomolecole svolgono un effetto tampone poiché sono in grado di neutralizzare la tossicità generate dagli acidi grassi presenti tra il tessuto del miocardio e il letto vascolare [2].

Alcuni studi hanno evidenziato che, in condizioni di bypass aorto-coronarico, questo meccanismo di autoregolazione viene interrotto e che l'aumento incontrollato degli acidi grassi provoca un innalzamento dell'acidità ambientale e un conseguente rilascio di molecole infiammatorie note come adipochine [3].

Tornando ora alla funzione delle coronarie, va tenuto in considerazione che il muscolo cardiaco, a differenza dei muscoli scheletrici, presenta un consumo di O_2 molto elevato. Si stima, infatti, che il consumo di O_2 per il miocardio sia nell'ordine di 7-9 ml di O_2 ogni 100g di tessuto, rispetto ai 0.15 ml di O_2 ogni 100 g del muscolo scheletrico [1]. Il così alto fabbisogno di ossigeno spiega perché il cuore si serva dalla circolazione coronarica e non

possa fornirsi di O₂ solo per diffusione dalle camere cardiache. L'apporto di O₂ è garantito dalla modulazione del flusso coronarico (portata pari a 225 ml/min) che varia in relazione all'attività del muscolo cardiaco e che, in condizioni di massimo lavoro, può aumentare fino a 5-6 volte. Il flusso coronarico aumenta in modo quasi proporzionale al consumo metabolico di ossigeno da parte del cuore. Durante l'attività miocardica, il muscolo utilizza così rapidamente ossigeno da provocare una riduzione della sua concentrazione nei liquidi tissutali del miocardio. La diminuzione di ossigeno induce un rilascio di sostanze vasodilatatrici che agendo sulle coronarie fanno in modo che queste, per l'appunto dilatandosi, possano accogliere una quantità di sangue sufficiente a soddisfare le necessità nutritive del muscolo cardiaco.

La sostanza con maggiori proprietà vasodilatatrici, è l'adenosina che, in presenza di una concentrazione molto bassa di ossigeno nelle cellule muscolari, viene prodotta per degradazione dell'ATP (adenosin trifosfato) e rilasciata nel liquido tissutale del muscolo cardiaco. Oltre a questa, vi sono anche altre sostanze che si liberano durante l'attività muscolare. Tra queste gli ioni potassio, l'acetilcolina, l'acido lattico e l'anidride carbonica. Tuttavia, non sono ancora del tutto chiari i meccanismi con i quali l'aumento del consumo di ossigeno possa provocare vasodilatazione delle coronarie e non si conosce in termini quantitativi l'efficacia di ciascuna di queste sostanze nell'incrementare il flusso sanguigno durante l'attività muscolare.

Il flusso coronarico, responsabile dell'irrorazione del miocardio, è caratterizzato da una portata di circa 250 ml/min che in condizioni di esercizio intenso può aumentare fino a 5-6 volte rispetto alle condizioni basali. Il flusso coronarico presenta un andamento opposto rispetto al flusso sistemico; durante la fase di sistole, in cui il flusso sistemico è massimo, il flusso coronarico è quasi nullo mentre, durante la fase di diastole, è massimo. Questo fenomeno è dovuto all'aumento della pressione intramiocardica del ventricolo sinistro che contraendosi occlude i vasi coronarici, inseriti tra le fasce muscolari, bloccandone momentaneamente il flusso, mentre, in fase di diastole, a seguito del fatto che il muscolo cardiaco si rilassa, le coronarie si distendono accogliendo, in questo modo la quasi totalità del volume di sangue (Figura 1.3). Nella coronaria destra questo fenomeno è meno evidente in quanto la compressione esercitata dal ventricolo destro è molto inferiore rispetto a quella esercitata del ventricolo sinistro.

A fronte del fatto che il flusso coronarico si attua soprattutto in diastole, si spiega perché persone tachicardiche sono più predisposte allo sviluppo di ischemia; infatti la tachicardia corrisponde ad un aumento della frequenza cardiaca con una conseguente diminuzione del tempo di diastole; ciò comporta una diminuzione del tempo disponibile alla reale perfusione del miocardio [1].

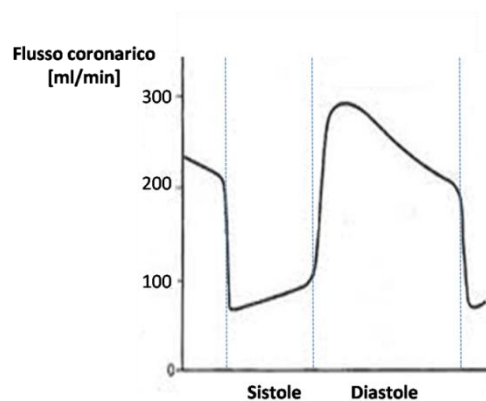


Figura 1.3 Andamento del flusso coronarico durante il ciclo cardiaco. In fase di sistole, il flusso coronarico è minimo perché il ventricolo è contratto e occlude parzialmente le coronarie. In fase di diastole invece vediamo un picco del flusso ematico coronarico dovuto al fatto che le coronarie possono accogliere il sangue perché non sono più occluse.

1.2 Cardiopatia ischemica: aterosclerosi delle coronarie e la loro elevata incidenza nel mondo

La causa più comune di morte nei paesi occidentali è la cardiomiopatia ischemica da flusso coronarico insufficiente. Il determinante più frequente della diminuzione del flusso coronarico è l'aterosclerosi. L'aterosclerosi è una malattia dell'arterie caratterizzata da lesioni infiltrate di lipidi, definite placche ateromatose, che si sviluppano nella superficie interna dei vasi arteriosi [1]. Queste placche originano dalla deposizione, sulla tunica intima vasale, di piccolissimi cristalli di colesterolo che, nel tempo, aumentano di dimensioni ed insieme alla formazione di tessuti fibrotici possono ridurre drasticamente il flusso sanguigno. Spesso può accadere che venga depositata una quantità talmente densa di tessuto connettivo da determinare una situazione di sclerosi (fibrosi) molto grave, in cui le coronarie perdono quasi del tutto distensibilità, compromettendo così la loro funzione. Inoltre, queste placche presentano una superficie rugosa e possono promuovere la formazione di coaguli di sangue che danno origine a trombi ed emboli che bloccano il flusso sanguigno delle arterie (Figura 1.4).



Figura 1.4 A sinistra una rappresentazione schematica di una coronaria non patologica avente completamente il lume pervio, a destra, di una coronaria aterosclerotica, con presenza di coagulo e placca aterosclerotica che provocano un'occlusione del vaso maggiore del 75%.

L'entità del danno ischemico al miocardio dipende, oltre che dal grado di occlusione della coronaria, anche dalla formazione di una rete di capillari collaterale che può svilupparsi nel periodo immediatamente successivo all'occlusione del vaso coronarico. Infatti, dal momento in cui si forma una stenosi coronarica, si innesca nel cuore un meccanismo ripartivo che porta allo sviluppo di una nuova rete di vasi (circolo collaterale) volta a prevenire o ridurre l'entità del danno [4]. In particolare, quando l'aterosclerosi restringe le arterie coronariche gradualmente (in un periodo di tempo di molti anni), il circolo collaterale si sviluppa insieme al processo aterosclerotico e garantisce un apporto di sangue sufficiente a mantenere il tessuto cardiaco vitale [1]. In questo modo, il soggetto potrebbe non incorrere mai in episodi acuti di occlusione cardiaca.

Tuttavia, anche all'interno del circolo collaterale possono svilupparsi processi aterosclerotici rendendo il flusso cardiaco nuovamente insufficiente; questa è una delle cause più comuni di insufficienza cardiaca che si verifica negli anziani [1]. Se, invece, l'occlusione della coronaria avviene improvvisamente [1] e l'area infartuata è molto estesa, il flusso sanguigno che passa all'interno di questa nuova rete di capillari è meno della metà di quello necessario a mantenere in vita il tessuto ed è quindi necessario un intervento immediato, di bypass o angioplastica, per ripristinare la perfusione del miocardio.

Le malattie cardiovascolari rappresentano la principale causa di morbilità, disabilità e mortalità a livello mondiale. Le indagini dell'Istituto Nazionale Statistico Italiano relative all'anno 2013, dichiarano che circa il 70% della mortalità complessiva è imputabile principalmente alle malattie del sistema circolatorio ed inoltre, al crescere dell'età, i decessi riconducibili a malattie del sistema circolatorio aumentano notevolmente

(Figura 1.5) [5]. Gli Stati Uniti presentano dati ancora più drammatici: dalle analisi dell'*American heart disease and stroke statistics* relativi all'anno 2010, emerge che mediamente muore una persona ogni 40 secondi per malattie cardiovascolari e che approssimativamente circa il 35% della popolazione è affetto da un disturbo cardiovascolare [6].

Si ritiene che i fattori di maggiore rischio siano rappresentati dall'ipercolesterolemia, dall'ipertensione arteriosa e dall'abitudine al fumo, mentre fattori di minore rischio sono considerati il diabete, l'obesità, lo stress e l'ipertrigliceridemia [7]; è importante notare che la maggior parte di questi fattori sono modificabili con un'adeguata prevenzione, o se necessario con adeguate terapie farmacologiche. A questi fattori di rischio se ne aggiungono altri non modificabili: i più importanti sono: l'età, la familiarità ed il sesso (con un'incidenza della coronaropatia due volte più frequente negli uomini).

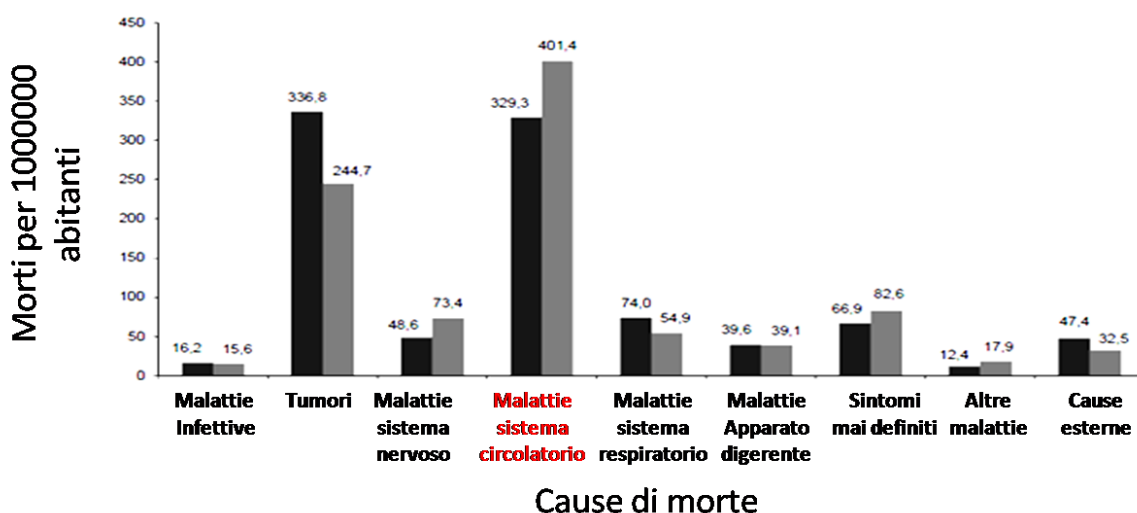


Figura 1.5 Mortalità per gruppi di cause di morte e sesso in Italia. In grigio chiaro i dati relativi al sesso maschile e in grigio scuro i dati relativi al sesso femminile. Si osserva che le malattie cardiovascolari, nel caso del sesso maschile arrivano addirittura a raggiungere il primo posto per incidenza di mortalità mentre, per il sesso femminile, si osserva che tale incidenza è relativamente più bassa; al secondo posto dopo i tumori. Adattato da [5].

1.3 Trattamento delle coronaropatie: angioplastica e bypass aorto-coronarico.

Le tecniche di rivascularizzazione rappresentano la soluzione ottimale all'aterosclerosi coronarica. Tra queste, i trattamenti chirurgici attualmente in uso, sono l'angioplastica ed il bypass aortocoronarico (Coronary Artery Bypass Grafting, CABG). Entrambi, con tecniche differenti, si propongono di ripristinare la perfusione del miocardio che risulta

insufficiente per via di una o più occlusioni delle arterie coronarie. Nell'angioplastica il vaso ostruito viene dilatato mediante l'utilizzo di un palloncino che rompe la placca aterosclerotica dell'arteria occlusa. Nel bypass, invece, la riperfusione del miocardio è ottenuta per mezzo di un sostituto vascolare che viene suturato a monte e a valle dell'ostruzione della coronaria stessa. L'angioplastica è un trattamento che viene generalmente utilizzato per i soggetti in fase acuta mentre, in caso contrario o in caso di un'elevata estensione della coronaropatia del paziente si ricorre ad interventi più invasivi come la realizzazione di un bypass [8]. Qui di seguito verranno descritte più in dettaglio queste due tipologie d'intervento.

1.3.1 Angioplastica coronarica

L'intervento di angioplastica coronarica viene effettuato in anestesia locale, inserendo un catetere guidato radiograficamente nell'arteria femorale (o in alternativa attraverso l'arteria radiale) fino a giungere all'arteria coronaria. La dilatazione del vaso interessato viene effettuata mediante l'espansione di un palloncino al suo interno e, nel caso in cui il chirurgo lo ritenga opportuno, contestualmente al palloncino viene introdotto anche uno stent nel lume dell'arteria consentendo di mantenere la dilatazione precedentemente ottenuta (Figura 1.6). Il palloncino, e qualche volta il catetere, possono causare un danno a carico dell'intima, detto dissezione, caratterizzato dallo scollamento di lembi di tessuto dalla parete vasale che possono ostacolare gravemente il flusso ematico. Il danneggiamento della parete arteriosa scatena, inoltre, la deposizione sulla lesione di trombi, favorendo l'insorgere di una trombosi. Oltre a questo, esistono anche complicanze legate all'occlusione acuta del vaso, che può essere determinata dalla contrazione istantanea della muscolatura liscia delle arterie, detto vasospasmo, o dallo sviluppo di iperplasia dell'intima (IH) [9]. Metà dei casi di fallimento di questo intervento sono risolvibili con una angioplastica ripetuta, ma la restante metà richiede un intervento CABG d'emergenza. In generale, la frequenza di restenosi, della coronaria interessata, varia tra il 30% e il 50% dopo 6-12 mesi dalla procedura [10]. A tale proposito sono da anni in atto ricerche che renderanno l'angioplastica più sicura e più efficace. Per esempio, sono stati realizzati degli stent medicati, chiamati stent a rilascio di farmaci, nei quali il polimero di rivestimento rilascia, per osmosi, farmaci che, agendo per circa due mesi, riducono la crescita endoteliale all'interno del dispositivo, riducendo l'iperplasia dell'intima [10].

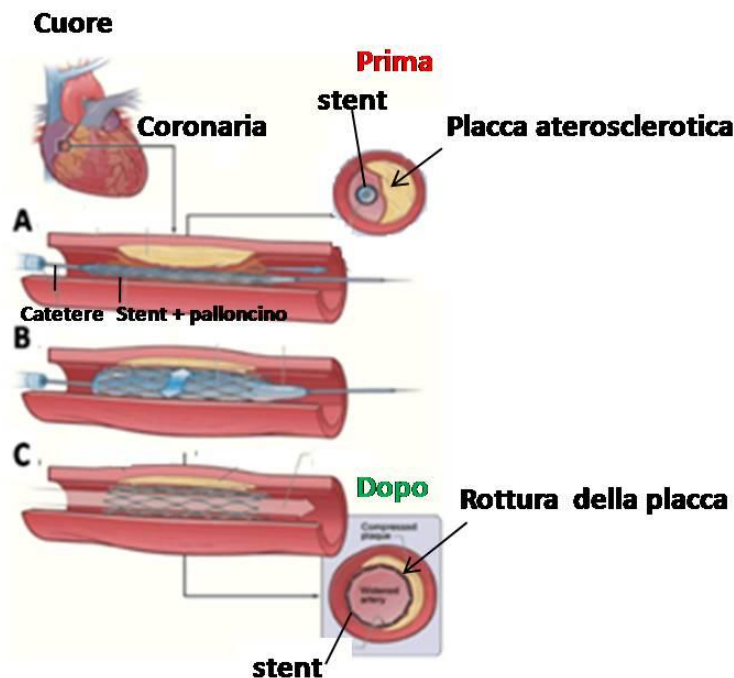


Figura 1.6 Angioplastica con palloncino e stent. (A) Inserimento dello stent all'interno del vaso coronarico, mediante l'utilizzo di un catetere, (B) dilatazione dello stent per effetto della pressione esercitata dal palloncino e conseguente rottura della placca aterosclerotica, (C) mantenimento della pervietà del vaso con lo stent e rilascio del catetere.

1.3.2 Il bypass aorto-coronarico e le possibili tipologie di impianto

Il bypass aorto-coronarico è una procedura chirurgica, nella quale segmenti di arteria o vena (autologhe) possono essere collegati, tramite suture, a monte e a valle del tratto di arteria ostruita, bypassando il tratto di coronaria stenotica e ripristinando così il flusso ematico. Spesso, se l'occlusione del vaso è presente su più rami coronarici, si interviene con bypass multipli (Figura 1.7).

La tecnica chirurgica del bypass viene effettuata in anestesia generale e con il supporto della circolazione extracorporea. È un intervento invasivo, che non sempre rappresenta una soluzione definitiva del problema; i segmenti di vaso utilizzati, infatti, possono essere anche essi soggetti a stenosi, costringendo i pazienti, dopo qualche anno, a un nuovo intervento associato a maggiori percentuali di rischio.

L'arteria mammaria e la grande vena safena restano ad oggi i sostituti autologhi più utilizzati nell'intervento di bypass aorto-coronarico.

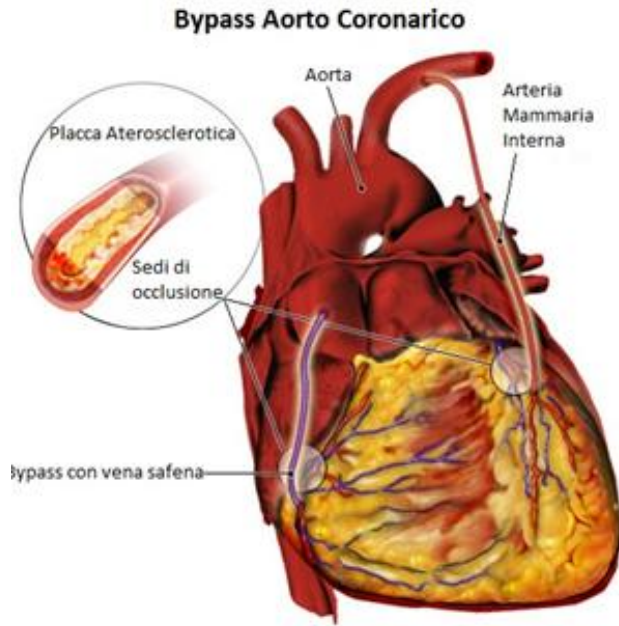


Figura 1.7 *Bypass aorto-coronarico multiplo. E' possibile osservare un bypass effettuato con arteria mammaria interna e un bypass realizzato con la grande vena safena.*

Negli ultimi anni, per ovviare al problema della reperibilità del vaso autologo (poiché il vaso può essere già stato utilizzato in altri bypass oppure per esempio può essere danneggiato a causa di patologie vascolari, tra cui le vene varicose [11]), sono stati presi in considerazione altri tipi di sostituti vascolari. Tra questi, le protesi vascolari di origine sintetica o bioartificiali, che, tuttavia, non mancano di imperfezioni. Le protesi sintetiche (in polietilenterefalato, comunemente detto DACRON e politetrafluoretilene espanso o GoreTex), specialmente per vasi che hanno un diametro inferiore ai 5 mm, hanno una bassa durata nel tempo ed un elevato grado di infezione [12]. Le due principali cause che compromettono la funzionalità di questi sostituti sono le inadeguate proprietà meccaniche [12] (diversa compliance tra il vaso naturale viscoelastico e la protesi sintetica rigida) e l'elevata trombocità. Sono molte le strategie in atto per rendere le protesi di piccolo calibro maggiormente prestanti, ad esempio sono state realizzate protesi in Gore-Tex con diversi tipologie di rivestimenti interni tra cui: rivestimenti costituiti da uno strato di cellule endoteliali (per rendere la superficie della protesi maggiormente biomimetica); oppure in carbonio (al fine di garantire una minore trombocità della superficie a contatto con il sangue) [12]. Inoltre, si è sviluppato un filone di ricerca per lo studio di protesi non più in Dacron e teflon espanso ma in poliuretano poiché è stato dimostrato che presenta delle proprietà meccaniche che si adattano meglio a quelle del vaso. [12].

Parallelamente, in questi anni, altri ricercatori si sono focalizzati sulla realizzazione di condotti di piccolo calibro mediante la combinazione di materiali bioartificiali e cellule vascolari, al fine di ottenere vasi che abbiano proprietà meccaniche e biologiche simili ai vasi nativi.

Per l'ingegnerizzazione del tessuto vascolare sono necessari tre elementi base: le cellule, una matrice tubolare temporanea (*scaffold*) su cui vengono seminate le cellule e un sistema *ex vivo* per la coltura del vaso, in grado di fornire il corretto condizionamento biochimico e fisico al vaso in coltura. A tale proposito, le ricerche in corso si articolano in tre principali filoni. Il primo è quello della ricerca di una fonte cellulare adeguata alla ricostruzione del vaso, tra cui cellule autologhe già differenziate, che però presentano il grande svantaggio di possedere una scarsa capacità proliferativa che le rende in generale poco adatte per la rigenerazioni di tessuti; a queste si aggiungono le cellule staminali embrionali che tuttavia sono ancora lontane da una possibile applicazione clinica, sia a causa della loro tendenza a formare teratomi *in vivo*, sia a causa dei problemi etici legati al loro reperimento; ed infine cellule staminali adulte, tra cui le più studiate: le cellule progenitrici dell'endotelio e le cellule mesenchimali del midollo osseo [14].

Il secondo filone riguarda, invece, lo sviluppo di nuovi materiali di supporto biodegradabili per i quali sono stati tentati diversi approcci, tra cui: il tessuto vascolare decellularizzato, biomateriali a base di proteine naturali e di materiali sintetici biodegradabili [14].

Infine, l'ultimo filone di ricerca è relativo all'ottimizzazione delle condizioni di coltura del tessuto ingegnerizzato [14], un fattore decisivo nello sviluppo di sostituti vascolari è, infatti, l'ambiente di coltura *in vitro* [13]. E' stata ampiamente dimostrata l'inadeguatezza delle tradizionali metodiche di coltura cellulare statica, sia per le limitazioni nel trasporto di ossigeno e nutrimenti alle cellule contenute nel tessuto ingegnerizzato, sia per l'assenza di stimoli meccanici applicati alle cellule stesse [14]. Infatti, le cellule vascolari, in particolare, nell'ambiente fisiologico, sono soggette ad una serie complessa di sollecitazioni meccaniche che vanno dalla pressione radiale, allo sforzo di taglio applicato/i alla parete del vaso. Allo scopo di replicare tali sollecitazioni, sono stati realizzati sistemi di coltura *ex vivo* appositi [15-16]: Weinberg e Bell [17] nel 1986 aprirono la strada a questo innovativo ramo di ricerca che è ancora oggi in continua evoluzione.

In California, l'azienda leader della medicina rigenerativa per disturbi cardiovascolari, ha realizzato e commercializzato Cytograft, un vaso ingegnerizzato, di piccolo/medio

diametro (4.2 mm), composto solo da cellule autologhe e realizzato in sistemi di coltura di stimolazione di costrutti vascolari. Cytograft è formato da tre strati: uno strato endoteliale, una membrana interna decellularizzata e uno strato avventiziale (Figura 1.8). Il metodo utilizzato per la realizzazione di Cytograft è riportato qui di seguito.

I fibroblasti sono mantenuti in coltura statica a formare uno strato unico costituito da cellule e matrice extracellulare. Dopo circa otto settimane, lo strato di fibroblasti viene avvolto attorno ad un cilindro d'acciaio rivestito di teflon. Decorso un tempo di maturazione di circa 10 settimane, il tessuto ottenuto viene decellularizzato e costituisce la membrana interna del vaso. La stessa procedura è utilizzata per la realizzazione dell'avventizia: un altro foglio di fibroblasti viene avvolto attorno alla matrice decellularizzata; lasciato trascorre il tempo di maturazione viene tolto il supporto cilindrico e, per evitare fenomeni trombotici, il vaso viene internamente ricoperto da cellule endoteliali, che andranno a costituire lo strato endoteliale a livello del lume di Cytograft. Il costrutto vascolare così formato viene mantenuto per tre giorni in coltura dinamica con un flusso pulsatile crescente (da 3 ml/min a 150 ml/min). In Figura 1.8 è mostrata l'immagine di Cytograft dopo la sua realizzazione e un'immagine istologica di una sezione di Cytograft, ottenuta mediante colorazione di H&E.

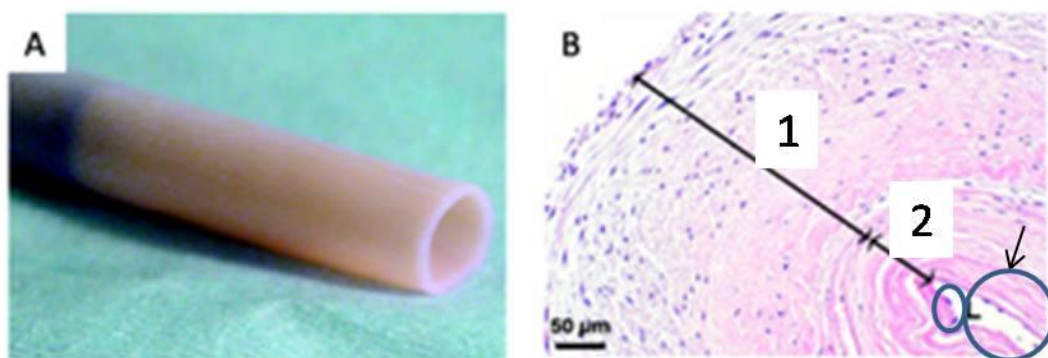


Figura 1.8 (A) Immagine ottenuta al microscopio elettronico di Cytograft, (B) Immagine istologica di una sezione di cytograft sottoposta a colorazione H&E, prima dell'impianto. Si osservano i tre strati di cui è costituito: dall'esterno verso il lume rispettivamente l'avventizia (1), la membrana decellularizzata (2) e le cellule endoteliali a livello del lume (freccia e cerchi). Adattato da [18].

Il costrutto è stato poi impiantato come graft a livello addominale di un ratto immunodepresso. Le analisi istologiche, condotte sul tessuto vascolare, a 90 e 180 giorni dall'impianto su ratto, hanno mostrato una completa integrazione del tessuto, nascita di

vasa vasorum ed un accumulo di cellule nella parte luminale della membrana decellularizzata. Inoltre, è stato osservato uno sviluppo di neomedia costituita da cellule muscolari e fibre di collagene [18].

Cytograft è stato già sperimentato sull'uomo come accesso vascolare per l'emodialisi in sostituzione della fistola artero-venosa. I fibroblasti e le cellule endoteliali autologhe sono state ottenute da una biopsia mini-invasiva della pelle e della parete del vaso del paziente [19].

I risultati condotti sui pazienti mostrano una buona integrazione del graft e il mantenimento dell'integrità del tessuto. Tuttavia, solo 4 su 9 pazienti hanno potuto continuare la terapia di dialisi poiché negli altri casi si è verificato il fallimento del graft dopo qualche mese dall'intervento. I risultati sono riportati nel grafico di Figura 1.9.

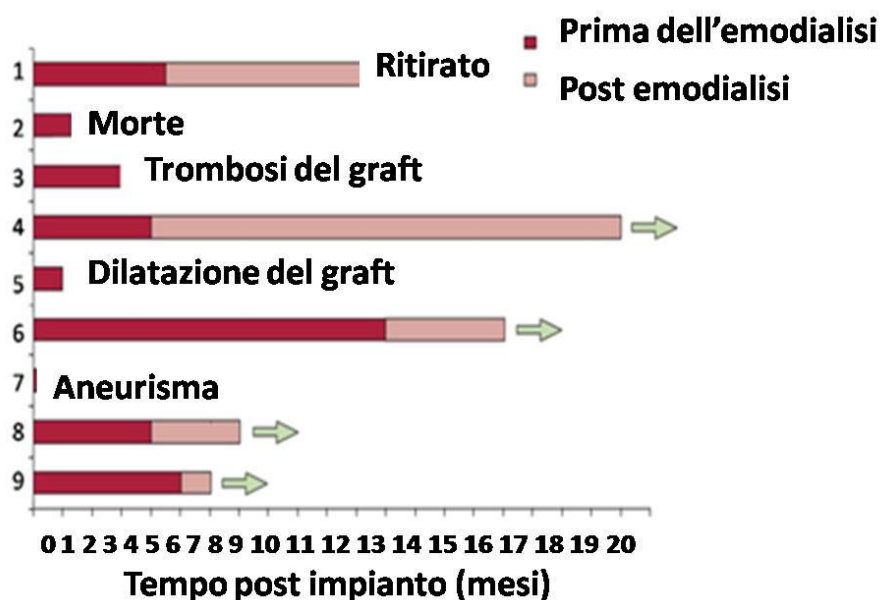


Figura 1.9 Risultati del primo caso di impianto di cytograft su uomo. I risultati riportano che a 6 mesi dall'impianto 4 pazienti su 9 hanno potuto continuare la terapia di emodialisi poiché, a differenza degli altri casi, cytograft ha mantenuto le proprie caratteristiche funzionali anche dopo 12 mesi dall'impianto. Adattato da [19].

Questa nuova tecnologia, secondo gli inventori, pone le basi per potere espandere gli studi verso l'utilizzo di cytograft per il bypass aorto-coronarico [19], poiché, anche in questo caso, sarebbe necessario un vaso dello stesso piccolo-medio calibro ma, a causa dei risultati ancora poco soddisfacenti, rimangono perplessità sulla validità di questo approccio. Oltre a questo, va tenuto in considerazione che le tempistiche necessarie per la

realizzazione di questo costrutto, essendo nell'ordine di una decina di settimane, non permettono l'uso del vaso ingegnerizzato nei casi d'urgenza, come ad esempio i casi di ischemia miocardica acuta.

In base a tutte le considerazioni fatte fin qui, ad oggi, il vaso sanguigno autologo maggiormente utilizzato resta l'arteria mammaria: tra gli elementi a suo vantaggio il principale è il mantenimento della pervietà nel tempo molto maggiore (pari circa al 95% dopo 10 anni dall'intervento) rispetto alla grande vena safena che, nello stesso arco temporale, mostra una pervietà pari al 50% [13].

Le migliori prestazioni dell'arteria mammaria, rispetto alla vena safena, sembrano essere riconducibili alle sue proprietà meccaniche, che sono paragonabili a quelle della coronaria che deve andare a sostituire. A tale proposito, nel paragrafo 1.4 sono riportate le differenti caratteristiche strutturali e meccaniche tra vene e arterie.

1.4 Struttura e proprietà meccaniche dei vasi sanguigni: arteria e vena a confronto

La parete vascolare di vene e arterie è un tessuto connettivo che presenta una struttura particolarmente complessa. (Figura 1.10).

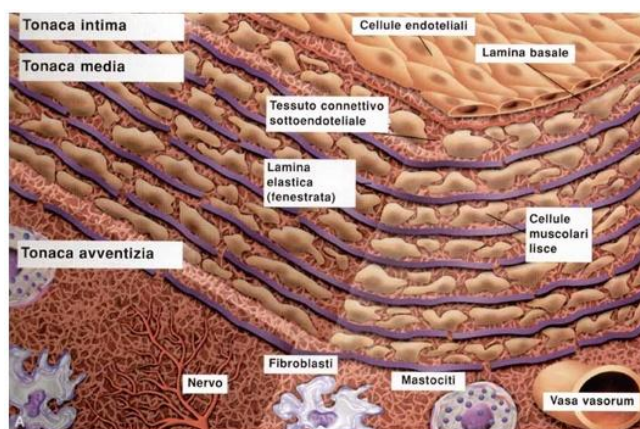


Figura 1.10 Schema di una parete vascolare di un'arteria. Si individuano i tre strati caratteristici: intima, media ed avventizia. L'intima è caratterizzata principalmente da uno strato di cellule endoteliali, la media presenta cellule muscolari lisce che, nel caso delle vene sono in maggiore quantità, e tessuto connettivo mentre, nell'avventizia troviamo i fibroblasti, fibre nervose ed i vasa vasorum deputati all'irrorazione dell'avventizia e di parte della media.

In generale si può dire che, sia per arterie che vene, la parete si componga di tre strati concentrici denominati tunica intima, media e avventizia, muovendosi dal lume verso l'esterno del vaso

L'intima è costituita da un singolo strato di cellule endoteliali (EC) e da un sottile strato sotto-endoteliale composto principalmente da fibre di collagene (membrana basale). Le cellule endoteliali, presenti a livello dell'intima, sono indispensabili per il mantenimento dell'integrità e della funzione della parete vascolare: sono infatti in grado di sintetizzare diversi elementi vasoattivi tra cui il monossido di azoto (NO) che è il principale regolatore del tono vasomotorio ed inibitore dell'attivazione, adesione e aggregazione piastrinica. L'NO svolge anche una funzione anti-infiammatoria poiché inibisce la secrezione di citochine. Tali effetti, uniti alle proprietà antimitotiche esercitate sulle cellule muscolari lisce, rendono l'NO la principale difesa contro l'aterosclerosi e la trombosi.

In presenza di fattori di rischio cardiovascolare, è frequente riscontrare alcune disfunzioni endoteliali, caratterizzate da alterazioni dell'attività catalitica dell'ossido nitrico sintetasi endoteliale, enzima che genera la molecola vaso protettiva NO.

L'endotelio è composto solitamente da uno strato di cellule appiattite, di forma poligonale o allungate secondo l'asse del vaso. Fra l'intima e la media è interposta la lamina elastica interna. La media costituisce generalmente lo strato più spesso ed è formata da uno stroma connettivale di fibre di collagene che sostiene fibre elastiche e cellule muscolari lisce (SMC). Nel caso delle arterie questa tunica è molto più spessa e ricca di elastina rispetto a quella delle vene. Tale differenza trova spiegazione nelle diverse funzionalità a cui i vasi arteriosi e vasi venosi sono adibiti: uno dei ruoli delle arterie è quello di accumulare un importante volume di sangue durante la sistole cardiaca (fase di eiezione ventricolare) e di espellerlo verso la periferia durante la successiva diastole cardiaca (fase di eiezione ventricolare); in tal modo il carattere pulsatile del flusso sanguigno, dovuto alla contrazione cardiaca, si smorza nell'albero arterioso fino ad assumere un valore di portata e di pressione costante a livello capillare [20]. Al contrario, le vene conducono il sangue dalle reti dei capillari dei diversi organismi al cuore e pertanto presentano una parete più sottile costituita principalmente da SMC che consente a queste di deformarsi più facilmente sotto l'azione dei muscoli esterni favorendo così il ritorno venoso (Figura 1.11).

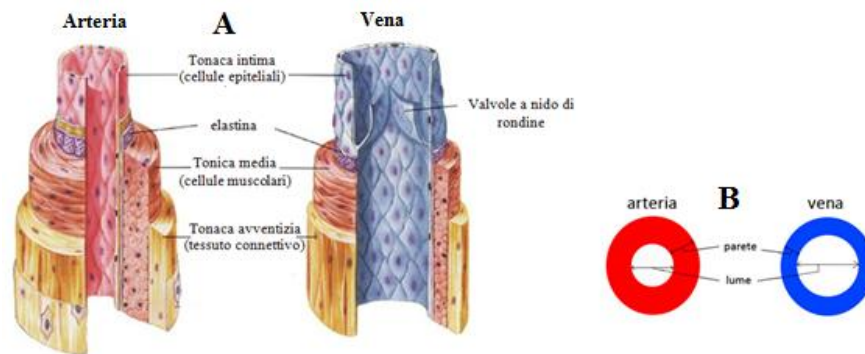


Figura 1.11 Arteria e vena a confronto. (A) Rappresentazione delle tre tonache vascolari rispettivamente dell'arteria e della vena. (B) Sezione frontale di arteria e vena a confronto: nell'arteria, rispetto alla vena, si osserva un maggiore spessore della parete.

E' opportuno, inoltre, precisare che per impedire che la contrazione muscolare spinga il sangue nella direzione sbagliata, molte vene degli arti inferiori contengono *valvole a nido di rondine* che, aprendosi a senso unico, favoriscono il passaggio del sangue e impediscono il suo reflusso (Figura 1.12).

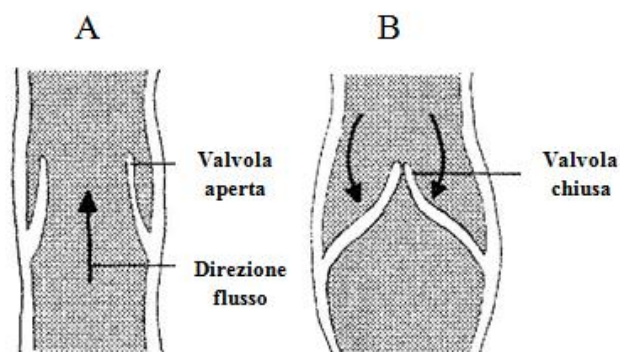


Figura 1.12 Valvole a nido di rondine. (A) La valvola si apre in un'unica direzione per favorire il passaggio del flusso. (B) Chiusura della valvola per impedire il reflusso del sangue.

Infine lo strato più esterno è quello costituito dalla tunica avventizia che è separata dalla media da un'ulteriore lamina elastica. L'avventizia è rappresentata da uno strato di tessuto connettivo fibroso, che contiene prevalentemente SMC e fibroblasti. 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. L'avventizia è attraversata, inoltre, da fibre nervose e vasi linfatici. Quando lo spessore della parete del vaso è tale per cui la distanza tra le cellule della parete e il sangue, che scorre all'interno del vaso, risulta superiore a

circa 25 μm , la tunica avventizia è perfusa da un sistema di piccoli vasi detti *vasa vasorum* deputati al trasporto di ossigeno e sostanze nutrienti ai tessuti della parete del vaso.

Le proprietà meccaniche del vaso sono determinate da quelle degli elementi che costituiscono la parete vascolare quali elastina, collagene e fibre muscolari che sono presenti in percentuale differente tra vene e arterie.

Uno schema di massima dell'organizzazione delle strutture all'interno della parete dei vasi è quello proposto nel 1973 da Azuna e Hsegawa, secondo cui le fibre muscolari sono avvolte ad elica a passo piccolo, l'elastina forma una lamina con fenestrature in direzione longitudinale e le fibre di collagene formano una rete disordinata e increspata in condizioni di modeste sollecitazioni, che si distende progressivamente all'aumentare della sollecitazione (Figura 1.13 A) [20]. L'elastina è una proteina naturale che presenta un basso modulo elastico, pari circa a 1 MPa. E' il principale costituente dei tessuti elastici, presenta un comportamento elastico quasi lineare, bassa isteresi (Figura 1.13B) e basso rilassamento. Tale comportamento è indispensabile per tutti quei tessuti in cui è richiesta un'ampia deformazione con ripristino delle dimensioni originali dopo la rimozione del carico o per quelli sottoposti a sollecitazioni cicliche.

Il collagene è una proteina strutturale che si presenta in varie forme nei diversi tessuti, è destinato principalmente a sostenere i carichi nelle pareti vascolari limitando le deformazioni e prevenendo le rotture meccaniche [20]. Il collagene ha infatti una risposta elevata per valori modesti di deformazione con un modulo elastico tre ordini di grandezza superiore a quello dell'elastina (circa 1GPa), presenta un comportamento non lineare causato dalla non linearità del materiale e dal fatto che le sue fibre generalmente entrano in azione progressivamente, moderata isteresi (Figura 1.13 B) e moderato rilassamento [20].

Infine, il muscolo ha caratteristiche meccaniche modeste, un'area di isteresi molto elevata quando sottoposto a sollecitazioni cicliche (Figura 1.13 B) [20].

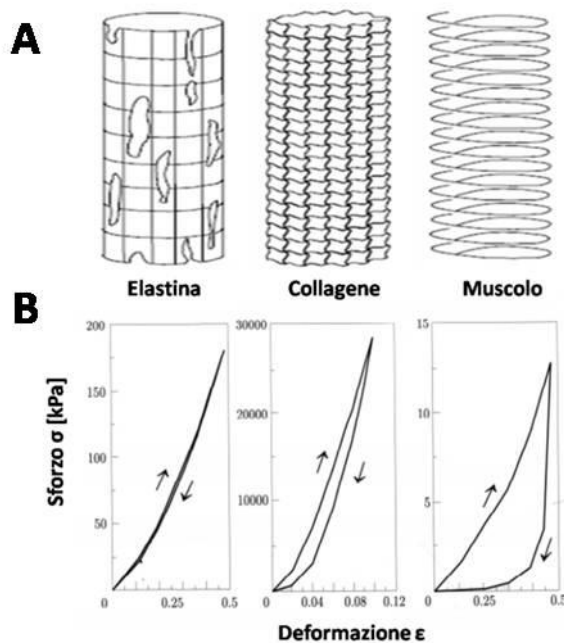


Figura 1.13 Componenti principali della parete dei vasi. (A) Disposizione delle strutture all'interno della parete del vaso; l'elastina forma una lamina con finestre in direzione longitudinale, il collagene forma una rete disordinata ed increspata mentre, le fibre muscolari sono avvolte ad elica. (B) Comportamento dei materiali in risposta ad una prova ciclica. Si osserva un andamento quasi lineare per l'elastina, una bassa isteresi per il collagene mentre, per il muscolo delle caratteristiche meccaniche più modeste con un'area di isteresi molto elevata. Adattato da [20].

Elastina, collagene e fibre muscolari sono presenti in proporzioni diverse in vene e arterie: in Figura 1.14 sono schematizzate le quantità degli elementi strutturali nelle vene e arterie di diametro (3.5-4 mm); si nota come nelle arterie il contenuto di elastina sia molto più significativo rispetto alle vene nelle quali, invece, è maggiore il contenuto di fibre di collagene e muscolari. Le arterie presentano pareti spesse, poco deformabili ed un elevato contenuto di elastina per rendere il vaso maggiormente elastico, in modo da smorzare la natura pulsatile del flusso sanguigno ed una tunica media costituita prevalentemente da lamine elastiche fenestrate alternate a fibre di collagene e SMC che hanno il compito di ridurre il lume del vaso e quindi di aumentare la resistenza al flusso nel caso in cui sia necessaria una minore perfusione del distretto servito dall'arteria.

Le vene, invece, presentano una parete più sottile, facilmente deformabile, che le rende più soggette al collasso per effetto di pressioni esercitate dall'esterno ed una tunica media prevalentemente muscolare che consente alle vene di regolare la distribuzione del sangue nei diversi distretti restringendosi e dilatandosi.

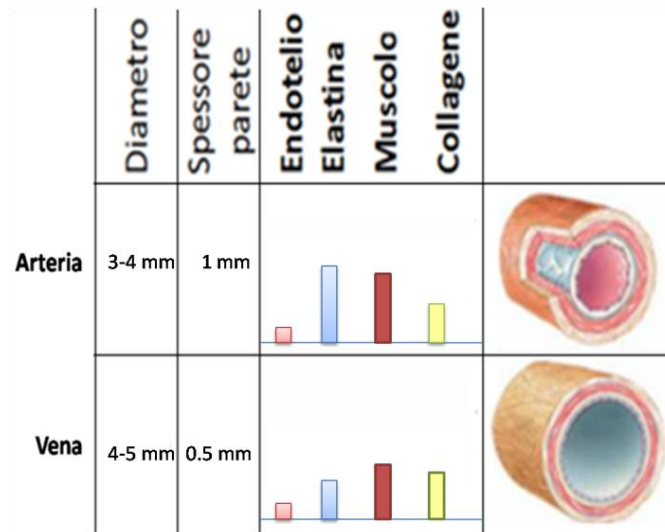


Figura 1.14 Caratteristiche morfologiche e strutturali di arteria e vena a confronto. Si osserva nell'arteria una parete più spessa caratterizzata da un'elevata quantità di elastina mentre, nella vena la parete risulta più sottile e con una predominanza di fibre muscolari.

Da ultimo, va ricordato che il comportamento biomeccanico dei vasi si può valutare con l'indice di compliance, definito come segue:

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

dove V è il volume di sangue [ml] e P è la pressione sanguigna [mmHg].

La compliance descrive 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.

Per basse pressioni (0- 50 mmHg: pressioni d'esercizio della vena) la compliance di una vena è 24 volte maggiore di quella di un'arteria a parità di diametro e portata.

In Figura 1.15 è rappresentata la compliance di un'arteria e di una vena come la tangente alla curva $\Delta V/\Delta P$, da questi due grafici si evince che le vene, a differenza delle arterie, possono sostenere ampie variazioni del volume ematico (fino al 200%) a seguito di piccole variazioni di pressione (da 0 a 10 mmHg). Tuttavia, a pressioni e volumi molto maggiori, la compliance venosa diventa paragonabile a quella arteriosa.

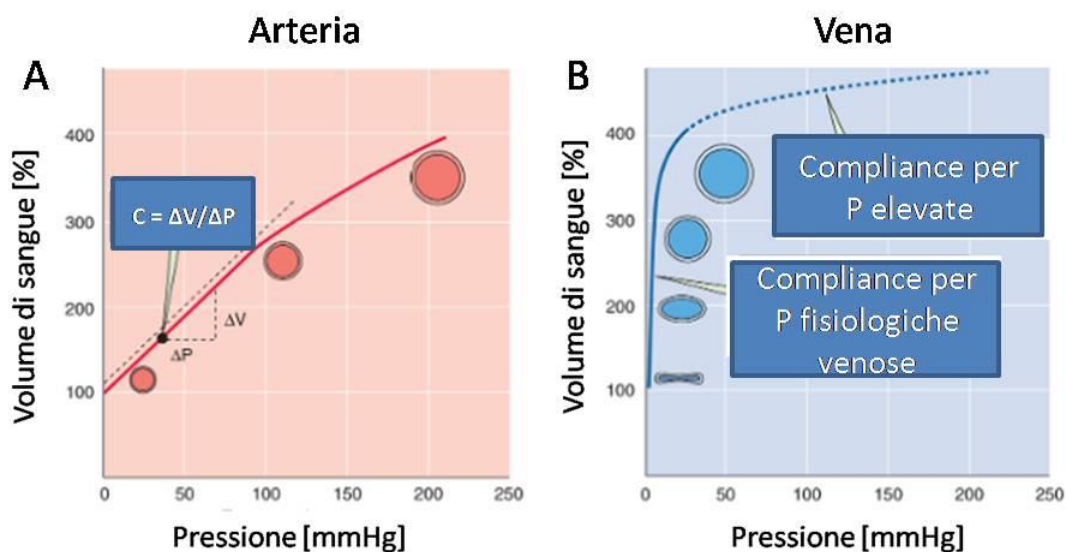


Figura 1.15 Curva di compliance di (A) arteria e (B) vena a confronto. Nella vena si osserva per piccole variazioni di pressione (con $P < 50$ mmHg) un elevato accumulo di sangue (fino a 300 ml) contro i 100 ml nell'arteria. Per pressioni maggiori ($P > 100$ mmHg), invece, la compliance della vena diventa paragonabile a quella dell'arteria. P : pressione.

1.5 Condotti arteriosi

I condotti arteriosi utilizzati per la rivascolarizzazione miocardica sono l'arteria mammaria interna, l'arteria radiale, l'arteria gastroepiploica destra, e l'arteria epigastrica inferiore. L'arteria mammaria interna (IMA) è il condotto ideale, con il quale devono confrontarsi tutti gli altri, grazie alla sua facilità di utilizzo.

L'arteria mammaria origina dall'arteria succlavia sinistra; in fase di intervento di bypass, vengono rimossi i vasi collaterali e la parte terminale viene anastomizzata con il ramo coronarico mantenendo intatta l'origine. 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 dei *vasa vasorum* che nutrono la parete arteriosa. L'arteria mammaria, per calibro (circa di 3-4 mm) e per caratteristiche morfologiche, è il vaso che più si adatta al ramo interventricolare anteriore ed ha inoltre una modesta tendenza all'iperplasia e ai processi aterosclerotici. L'utilizzo dei condotti arteriosi toracici nell'intervento di bypass è favorevole per quanto riguarda la compatibilità delle proprietà meccaniche ma presenta alcuni problemi tra cui la lunghezza limitata che li rende inutilizzabili nei bypass multipli. Infatti, nel caso di bypass multipli, solitamente si ricorre all'utilizzo dell'IMA e di segmenti di vena safena: che, rispetto al solo utilizzo della vena safena, consente di ottenere migliori risultati, con minore tasso di recidiva dei sintomi

(angina), migliore sopravvivenza e libertà da eventi cardiaci maggiori (infarto miocardico e reintervento).

1.6 La grande vena safena

La grande vena safena o safena interna origina dalla confluenza delle vene del lato mediale della pianta del piede e decorrendo medialmente nella gamba e nella coscia, risale verso l'alto dove confluisce nella vena femorale comune attraverso l'ostio safeno-femorale (Figura 1.16).

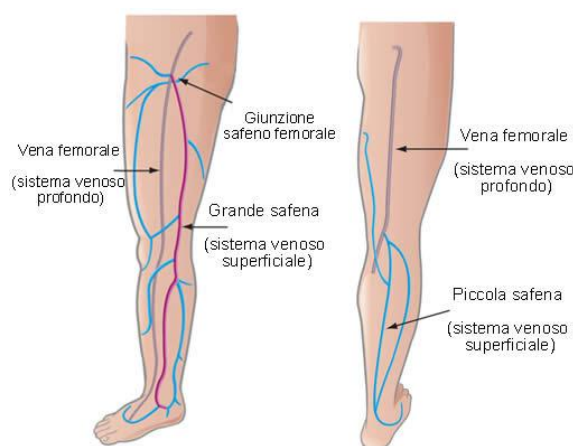


Figura 1.16 Negli arti inferiori si riconoscono due grossi distretti venosi superficiali: la grande vena safena (che origina dalla vena femorale) e la vena safena piccola. La grande safena è deputata alla circolazione superficiale della gamba e della coscia mentre, la piccola safena drena il sangue essenzialmente nella regione posteriore della gamba.

La vena safena, dopo l'arteria mammaria, è il condotto più utilizzato in quanto presenta una lunghezza che la rende adatta anche ai graft multipli; un diametro, specialmente al di sotto del ginocchio, pari a 3-4 mm, paragonabile a quello delle coronarie; ed inoltre è facilmente accessibile per via della sua posizione superficiale nella gamba.

1.6.1 Vein graft disease

Nonostante il largo impiego della vena safena come bypass aorto-coronarico, ancora oggi, si stima che il 30-50% dei graft venosi fallisca nei primi 18 mesi dopo l'impianto [21]. Nello specifico esistono due tipologie di fallimento: quelle a breve termine e quelle a lungo termine. Le prime, identificabili già nella prima settimana dall'impianto del graft, sono principalmente riconducibili alla formazione di un trombo che ostruisce il lume del vaso

(Figura 1.17 a). Mentre, le seconde sono caratterizzate da una serie di meccanismi biologici che si innescano in tempi che variano tra un mese e un anno dall'intervento, provocando uno sviluppo di iperplasia dell'intima ed un accelerato processo aterosclerotico che culmina con la stenosi del vaso e il fallimento del graft stesso. Come è possibile osservare in Figura 1.17, dopo un mese dall'impianto si verifica uno sviluppo di neointima causato dalla migrazione di SMC nell'intima del vaso (Figura 1.17 b), con una deposizione successiva di matrice extracellulare (ECM) (Figura 1.17 c); questa condizione patologica evolve poi nella formazione della placca aterosclerotica (Figura 1.17 d). Questo fenomeno è noto con il nome di Vein Graft Disease (VGD).

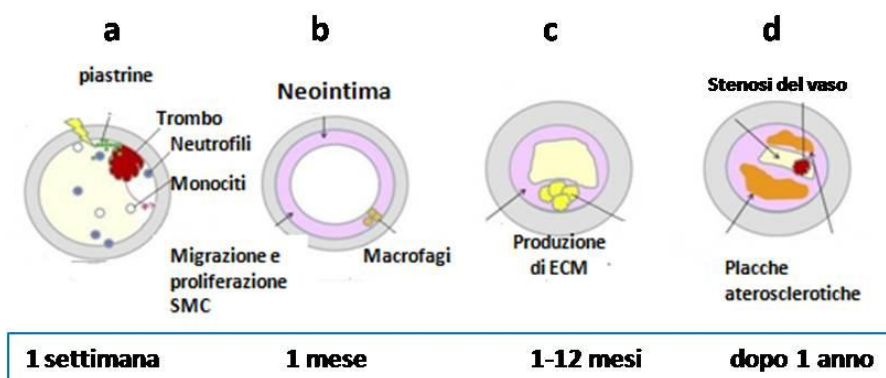


Figura 1.17 Evoluzione temporale del Vein Graft Disease (a) Nella prima settimana, a causa del danneggiamento endoteliale provocato dalla procedura chirurgica e dall'elevato shear stress generato dal flusso arterioso, si assiste alla formazione di un trombo, caratterizzato da un accumulo di neutrofili, piastrine e monociti. In molti casi, questa condizione evolve nel tempo mediante una serie di meccanismi biologici che si innescano a catena: tra cui, (b) la migrazione e proliferazione delle SMC, (c) la produzione di ECM e infine (d) uno sviluppo di Iperplasia dell'intima caratterizzata da formazione di placche aterosclerotiche e stenosi del vaso. In figura ECM: matrice extracellulare e SMC: cellule muscolari lisce.

Il primo elemento scatenante dell'intero processo è la procedura chirurgica d'espianto [22] (*harvesting*) che comporta la perdita del tessuto perivascolare e la distruzione dei *vasa vasorum* che vengono scollegati dall'arteria femorale [23]. La perdita dei *vasa vasorum*, deputati agli scambi gassosi e al nutrimento della parete vascolare, ha un effetto grave sull'omeostasi della parete vascolare. Infatti, la loro perdita provoca un rimodellamento vascolare acuto, caratterizzato da iperplasia dell'intima [24] e diminuzione delle proprietà elastiche del vaso [25].

Inoltre, al momento dell'espianto, al fine di evitare vasospasmi, la vena viene mantenuta pervia, per qualche minuto, mediante un flusso interno di soluzione farmacologica contenente sostanze vasodilatatrici, che raggiunge pressioni anche di 300-400 mmHg [26];

questa procedura genera dello *shear stress* sulla parete vasale che provoca una denudazione dello strato endoteliale con conseguente produzione di fattori di crescita di derivazione piastrinica e fattori di crescita dei fibroblasti, il cui rilascio sincrono è responsabile dell'innescamento di meccanismi biologici che sono alla base dello sviluppo di iperplasia dell'intima [27].

Questa condizione è poi ulteriormente aggravata dal danno da riperfusione che subisce la vena safena nel breve periodo che intercorre da quando viene espantata a quando poi viene riperfusa a livello del miocardio; il periodo di ischemia innesca una risposta infiammatoria mediante il rilascio di citochine e una riduzione della sintesi di NO, accompagnata dalla produzione di specie reattive dell'ossigeno (che possono avere un effetto dannoso sul tessuto). Successivamente, al momento della riperfusione i neutrofili, presenti all'interno del sangue ossigenato, vengono attratti verso l'endotelio danneggiato e mediante il rilascio di fattori di crescita e citochine viene indotta la migrazione di SMC e formazione di ECM verso l'intima. L'adesione dei neutrofili causa l'inizio della cascata coagulativa con formazione di uno strato di piastrine e fibrina a livello dell'endotelio danneggiato che, nel 12% dei casi, entro 30 giorni dall'impianto del graft può culminare con la formazione di un trombo [28]. Nel tentativo di limitare il danno al vaso durante la sua manipolazione chirurgica è stata introdotta una tecnica alternativa definita "*no touch*". Il metodo *no touch* prevede l'esportazione della vena safena con il tessuto perivascolare circostante, che svolge l'azione di protezione del vaso e permette di evitare la manipolazione diretta e quindi un suo danneggiamento. In Figura 1.18 sono riportate due immagini di vene safene espantate dal paziente mediante la tecnica convenzionale e la tecnica *no touch* [29].

Questa tecnica ha come obiettivo principale ridurre al minimo il danno provocato all'endotelio del vaso eliminando la distensione manuale. A titolo di esempio, in Figura 1.19 sono mostrate due immagini di sezioni di vene safene prelevate da pazienti mediante i due differenti metodi chirurgici. Le istologie sono state ottenute tramite colorazione immunoistochimica per la marcatura delle EC. I risultati riportano come il vaso manipolato con la procedura *no touch* mantenga un endotelio più intatto rispetto alla tecnica convenzionale, in cui, a seguito della distensione manuale, è evidente un'elevata perdita di cellule endoteliali.

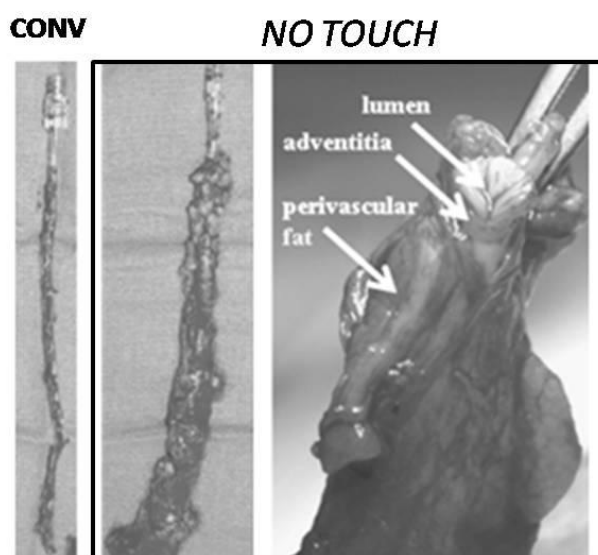


Figura 1.18 *Tecnica chirurgica convenzionale di bypass (CONV) a confronto con la tecnica chirurgica no touch (seconda immagine da sinistra e terza immagine ad un ingrandimento superiore). Si osserva come, a differenza del metodo convenzionale, la vena safena venga espantata dal paziente insieme a tutto il tessuto circostante (tessuto perivascolare) in modo tale da preservare l'avventizia ed evitare la manipolazione diretta del vaso stesso. Lumen: lume del vaso; Adventitia: avventizia del vaso e Perivascular fat: tessuto grasso perivascolare. Adattato da [29].*

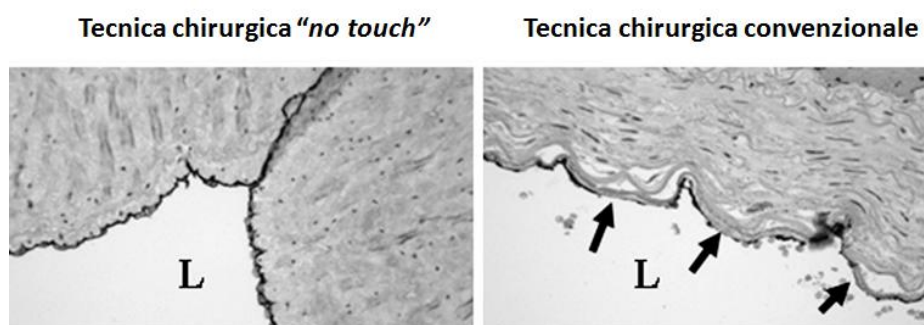


Figura 1.19 *Immagini immunohistochemiche per la marcatura di cellule endoteliali (con anticorpo CD31), di due segmenti di vena safena espantati da pazienti mediante la tecnica no touch (a sinistra) e la tecnica convenzionale (a destra). Le frecce nere indicano le zone del lume che presentano l'endotelio danneggiato. Si osserva che nella vena safena espantata mediante la tecnica no touch viene preservato lo strato endoteliale. Adattato da [29].*

In seguito alla trasposizione in ambiente arterioso, la vena subisce un rimodellamento vascolare, la cui causa sembra principalmente essere riconducibile al nuovo ambiente emodinamico. Gli eventi che si verificano a seguito della trasposizione del vaso in ambiente arterioso sono visibili in Figura 1.20 [30].

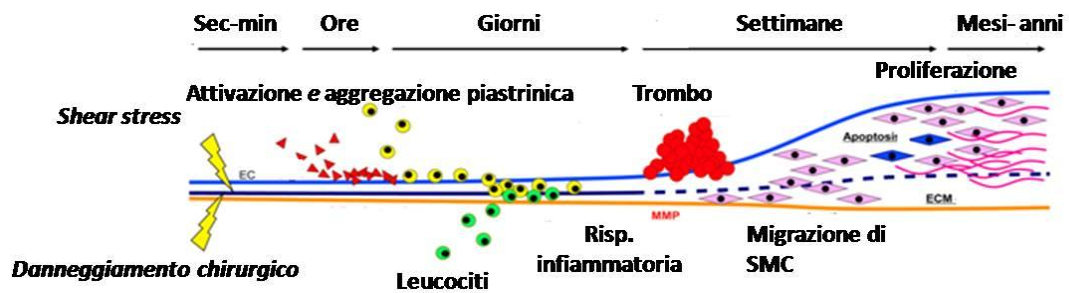


Figura 1.20 Eventi che concorrono alla formazione di neointima del graft venoso classificabili in 5 principali step: attivazione piastrinica, risposta infiammatoria, attivazione della cascata coagulativa, migrazione e proliferazione delle cellule muscolari. Nelle prime ore si assiste ad attivazione e aggregazione piastrinica sullo strato endoteliale danneggiato, questo da origine nei giorni successivi all'attivazione di una risposta infiammatoria con reclutamento di leucociti, che provoca il rilascio di fattori di crescita e citochine che induce la formazione di un trombo, nelle settimane e mesi successivi, si assiste anche alla migrazione, proliferazione e apoptosi di cellule muscolari lisce che vanno ad invadere l'intima del vaso. Tale condizione culmina con un rimodellamento vascolare caratterizzato da iperplasia dell'intima e massiva deposizione della matrice extracellulare, eventi che concorrono al fallimento del graft venoso Adattato da [30].

Il primo evento biologico è caratterizzato dal danneggiamento dello strato endoteliale causato principalmente dalla precedente manipolazione chirurgica e dalle condizioni di flusso non fisiologiche per la vena, caratterizzate da alta pressione (80-120 mmHg), portate elevate, pulsatili (in media 250 ml/min) e shear stress arterioso (1-7 Pa) [31]. A seguito di questa lesione, le cellule endoteliali non producono più NO, fondamentale per l'omeostasi, favorendo l'aggregazione e l'adesione piastrinica che, dopo circa una settimana, si traduce nella formazione di un trombo. Il trombo costituisce un valido supporto per l'adesione e la conseguente migrazione di monociti e leucociti plasmatici all'interno della parete vascolare dove, a seguito di attivazione, secernono molecole infiammatorie e fattori di crescita. Questi mediatori sono responsabili della apoptosi e trans-differenziazione delle cellule muscolari che, dopo una settimana circa dall'impianto, migrano dalla tonaca media all'intima, attraverso la matrice extracellulare che viene degradata ad opera delle proteinasi MMP2-MMP9. A seguito di questa fase acuta post-traumatica si ha una fase cronica in cui le cellule muscolari, migrate a livello intimale, secernono una grande quantità di matrice extracellulare fibrosa, provocando, nei mesi e negli anni, ispessimento dell'intima, fibrosi della media ed un complessivo irrigidimento del graft venoso. Tutti fattori che limitano la capacità della vena di adattarsi alla circolazione arteriosa.

Inoltre anche l'elevata pO₂ del sangue arterioso, 100 mmHg contro i 40 mmHg del sangue venoso, può provocare un ispessimento dell'intima ma, nonostante l'evidenza sperimentale di alcuni studi, tale ipotesi resta ancora troppo embrionale per essere considerata valida

[32]. Infine, un altro fattore molto importante, su cui però non si sa ancora molto, è lo stato di ipossia (minore pO_2 rispetto alle condizioni fisiologiche) generato nella parete vascolare a causa dalla perdita dei *vasa vasorum*. A tale proposito, non esistono ad oggi studi che dimostrano l'effetto dell'ipossia sul rimodellamento vascolare del graft venoso ma, quello che è noto, è che l'ipossia può provocare un ispessimento dello strato endoteliale e sotto-endoteliale generato dalla proliferazione/migrazione dei fibroblasti e altre cellule progenitrici presenti nell'avventizia della vena [33] (Figura 1.21).

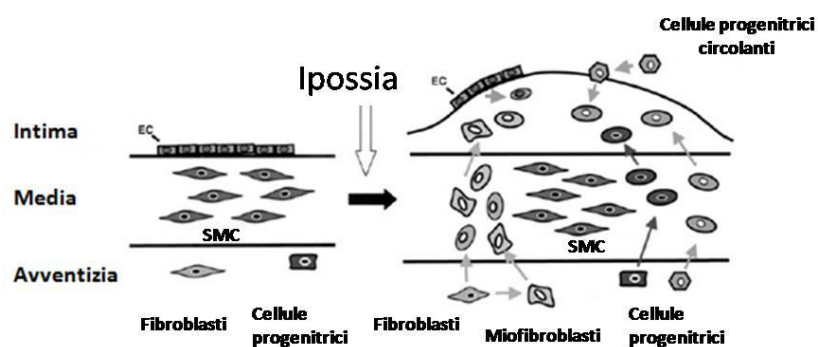


Figura 1.21 Schema del rimodellamento vascolare indotto da ipossia. Si osserva che una carenza di ossigeno induce i fibroblasti a differenziare in miofibroblasti, cellule dotate di una capacità migratoria e proliferativa. I miofibroblasti migrano così verso la media e l'intima attraverso la parete vascolare. Oltre a questo vi sono altre cellule progenitrici, presenti nell'avventizia e circolanti, di cui non si sa la vera eziologia, che attivate dalle condizioni di ipossia migrano verso l'intima del vaso; provocando un generale rimodellamento e ispessimento di tutta la parete vascolare. EC: cellule endoteliali. Adattato da [33].

La carenza di ossigeno, infatti, induce un cambiamento della fisiologia e del metabolismo dei fibroblasti che, dopo 48 ore dal danno ipossico, differenziano in miofibroblasti [34]. Queste cellule, caratterizzate da un'elevata capacità proliferativa e migratoria, migrano verso lo strato intimo del vaso e sintetizzano matrice extracellulare fibrosa, provocano un ispessimento della parete vasale. Inoltre, studi su modelli animali, condotti però su vasi arteriosi, hanno dimostrato che un minore apporto di ossigeno alla parete vasale, può provocare un rimodellamento vascolare caratterizzato dall'ispessimento della media e dell'avventizia, apoptosi cellulare ed un aumento dell'espressione di HIF1- α [35] che, in condizioni di ipossia, svolge un ruolo nell'attivazione del fattore angiogenico VEGF, con conseguente aumento dei *vasa vasorum* [36-37].

1.7 Conclusioni

Nonostante, i dati statistici riportino ancora un'elevata percentuale di fallimento dei graft venosi utilizzati nei bypass aorto-coronari, in clinica, questa modalità d'intervento risulta ampiamente in uso ed è per questo motivo che è di grande interesse comprendere quali siano i fenomeni cellulari alla base del *vein graft disease*.

Negli ultimi anni sono stati sviluppati sistemi di coltura *ex vivo* in grado di simulare le condizioni emodinamiche arteriose a cui la vena safena è esposta a seguito dell'intervento di bypass, con l'obiettivo principale di comprendere a pieno gli effetti degli stimoli meccanici sul rimodellamento vascolare.

Da un'analisi accurata della letteratura è emerso che anche le condizioni biochimiche del bypass, riconducibili all'elevata pO_2 arteriosa intra-luminale ed una carenza di ossigeno nella parete extra-avventiziale del vaso, possono concorrere al rimodellamento vascolare caratterizzato da fenomeni proliferativi di fibroblasti nell'intima, apoptotici e angiogenici ma, a tale proposito, vi è una letteratura molto povera e, pertanto questo lavoro di tesi nasce proprio dall'esigenza di indagare i meccanismi biologici e cellulari indotti dal nuovo ambiente biochimico a cui è esposta la vena nel bypass. Per questo studio è stato utilizzato un sistema *ex vivo* in grado di mantenere in coltura segmenti di vena safena umana esposti a differente pO_2 in condizioni di perfusione. Nello specifico il sistema utilizzato è in grado di mantenere la parete intra-luminale ad una pO_2 simile arteriosa (circa pari al 21%) e la parete extra avventiziale ad una pO_2 pari al 5%, in modo tale da simulare la carenza di ossigeno della parete vascolare causata dalla perdita dei vasa vasorum. Inoltre questo sistema permette di simulare le condizioni biochimiche venose (pO_2 intra-luminale pari al 5% ed extra-avventiziale pari al 21%) e anche le condizioni biochimiche standard utilizzate in tutti i sistemi *ex vivo* per lo studio del VGD (PO_2 intra-luminale ed extra-avventiziale pari al 21%).

Prima di passare alla descrizione dell'attività sperimentale del presente lavoro di tesi, nel capitolo successivo verranno descritti alcuni lavori basati sull'utilizzo di sistema *ex vivo* per lo studio degli effetti emodinamici e biochimici (in termini di pressione parziale di ossigeno) dell'ambiente del bypass e in secondo luogo verrà fatta una trattazione sul rimodellamento vascolare indotto da ipossia.

2. Rimodellamento vascolare indotto dall'ambiente emodinamico e biochimico del bypass: stato dell'arte.

In questo capitolo sarà descritto lo stato dell'arte relativo ai sistemi di coltura ex vivo utilizzati per studiare segmenti vascolari, con particolare attenzione ai sistemi che consentono di simulare le condizioni biochimiche ed emodinamiche caratteristiche del bypass aorto-coronarico. Verranno descritti quindi i modelli ex vivo statici e dinamici sviluppati e utilizzati per lo studio del VGD come conseguenza delle alterate condizioni emodinamiche e biochimiche indotte dal bypass. Infine, saranno descritti gli effetti dell'ipossia sul rimodellamento vascolare poiché durante il prelievo della vena safena la perdita dei vasavasorum può limitare l'apporto di sangue ossigenato alla parete vascolare (vedi capitolo 1).

2.1 Stato dell'arte dei sistemi di coltura ex vivo

Le indagini relative al VGD, condotte mediante l'utilizzo di sistemi di coltura *ex vivo* (Ex Vivo Vessel Culture Systems-EVCS) e di segmenti di vena safena (SV), permettono di studiare, in condizioni di coltura controllate, i meccanismi cellulari che sono alla base del fallimento del graft venoso nel bypass coronarico. Il loro principale vantaggio risiede nel fatto che, a differenza dei modelli animali, il loro utilizzo permette di indagare l'effetto dei diversi stimoli biomeccanici e biochimici. Fin dalla fine del 1900 [38], numerosi ricercatori, come Soyombo e collaboratori, si sono proposti di studiare gli eventi maggiormente rappresentativi del VGD, con lo scopo di comprendere i principali meccanismi biologici che concorrono alla stenosi del vaso. I sistemi EVCS si possono suddividere in due macro categorie: sistemi di coltura statici e sistemi di coltura dinamici (Figura 2.1).

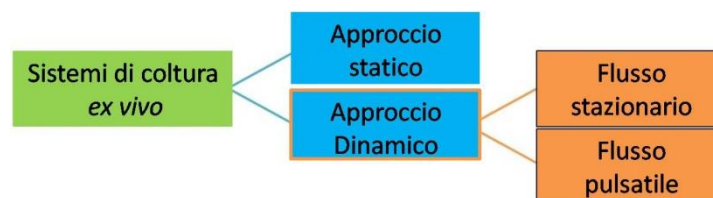


Figura 2.1 Rappresentazione schematica degli approcci utilizzati nei sistemi di coltura *ex vivo*. Si distinguono 2 tipi di approcci: statico e dinamico. All'interno dei sistemi dinamici si distinguono i sistemi a flusso stazionario e i sistemi a flusso pulsatile.

Nei sistemi di coltura statici i campioni sono mantenuti in coltura senza essere sottoposti a forze meccaniche mentrem nei sistemi di coltura dinamici i campioni vengono stimolati in condizioni di flusso di tipo stazionario o pulsatile

Il fine ultimo delle indagini condotte con questo tipo di approccio è quello di valutare il ruolo delle diverse componenti cellulari in modo da esplorare un'eventuale azione terapeutica che possa inibire e/o ridurre i meccanismi patologici che concorrono al fallimento del graft. Studiare il VGD è di grande importanza poiché, nonostante la procedura di bypass coronarico con graft venoso sia una soluzione chirurgica consolidata, l'occlusione del vaso, che si verifica nei mesi/anni successivi all'impianto, risulta ancora un problema irrisolto. Si stima, infatti, che l'intervento con graft venoso nel 15-20% dei casi fallisca nel primo mese, nel 25% dei casi al primo anno e nel 50% dei casi dopo dieci anni dall'intervento [39]. Il VGD è caratterizzato da iperplasia dell'intima (IH) indotta a seguito della trasposizione della SV da un ambiente emodinamico venoso ad un ambiente emodinamico arterioso. Negli ultimi anni, diverse evidenze sperimentali, come per esempio ipertrofia vasale, alterazione della composizione della matrice extracellulare ed un conseguente sviluppo di neointima, osservate in SV mantenute in coltura in condizioni emodinamiche fisiologiche, hanno portato i ricercatori ad interrogarsi sul fatto che possano esistere altri fattori, non solo biomeccanici ma, per esempio, anche biochimici che concorrono alla patogenesi del VGD [40].

Per fattori biochimici si intende, per esempio, la pO_2 arteriosa a cui è esposta la vena safena a seguito del bypass (molto maggiore rispetto al pO_2 fisiologia del sangue venoso che trasportano) e una carenza di ossigeno della parete del vaso causata dalla perdita dei *vasa vasorum* (deputati all'irrorazione della parete) a seguito dell'intervento chirurgico [40].

Come prima cosa la vena, appena espantata dalla gamba del paziente, viene privata dal tessuto perivascolare e della sua microcircolazione (i *vasa vasorum* vengono scollegati dall'arteria femorale). Successivamente, in posizione di bypass, la vena è sottoposta a stimoli biochimici (pO_2 intra-luminale arteriosa e pO_2 extra-avventiziale pari circa al 5%) e stimoli biomeccanici (flusso pulsatile arterioso) che insieme concorrono ad un rimodellamento vascolare che culmina con lo sviluppo di IH (Figura 2.2).

Qui di seguito sono riportati gli studi ritenuti più significativi nell'ambito della coltura *ex vivo* di tipo statico e successivamente, nel paragrafo 2.1.2, verranno descritti quelli condotti con approccio di tipo dinamico.

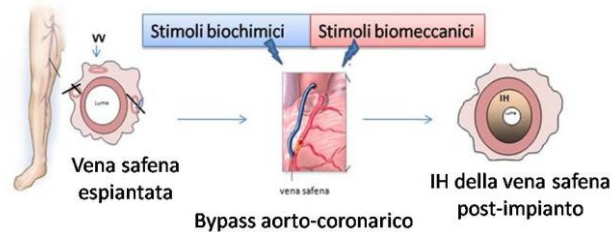


Figura 2.2 Eventi che concorrono al VGD della SV esposta alle condizioni biochimiche e biomeccaniche caratteristiche del bypass. Prima dell'intervento la vena è esposta a bassi flussi stazionari ed è irrorata dai vasavasorum, dopo l'impianto in posizione aorto-coronarica la vena viene privata della sua microcircolazione (causata dall'espianto) ed esposta a condizioni emodinamiche arteriose e pO_2 intraluminale arteriosa. Queste nuove condizioni sembrano essere responsabili del rimodellamento vascolare caratteristico del VGD.

2.1.1 Sistemi statici di coltura *ex vivo*

L'iperplasia dell'intima è stata per la prima volta descritta dal premio Nobel per la fisica Alex Carrel nel 1906 [41] e sembra essere riconducibile ad una sovra proliferazione delle cellule muscolari (SMC) della media che migrano nell'intima del vaso [42]. In figura 2.3 sono riportate 4 immagini istologiche con colorazione ematossilina e eosina (H&E) (Figura 2.3-A, B) e *Van Gieson* (per l'elastina) (Figura 2.3-C, D) dove si osserva lo sviluppo massivo di IH dei campioni SV mantenuti in coltura per 14 giorni rispetto ai controlli nativi [42].

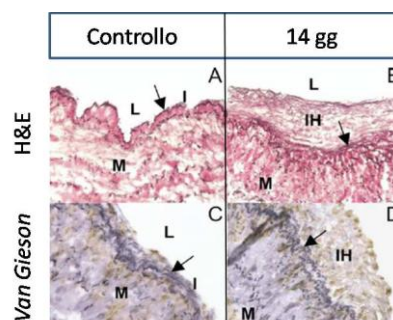


Figura 2.3 Colorazioni H&E (A-B) e colorazioni di *Van Gieson* per l'elastina (C-D) su sezioni di vena safena nativa e dopo 14 giorni di coltura. Le frecce nere indicano lo strato endoteliale. L: lume; M: media; IH: iperplasia dell'intima. Le istologie riportano uno sviluppo di IH nel vaso dopo 14 giorni di coltura (B-D) Adattata da [42].

Questa evidenza sperimentale è stata successivamente consolidata in uno studio dove, mediante indagini in immunofluorescenza e di immunistoichimica (marcatura per le cellule α -SMA¹ positive) condotte su campioni di vena safena dopo 10 giorni di coltura statica, è stata osservata la presenza di cellule muscolari lisce nell'intima del vaso [43]. (Figura 2.4).

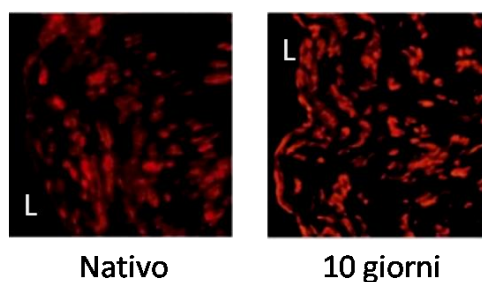


Figura 2.4 Immagini di sezioni di vena safena nativa (sinistra) e dopo 10 giorni di coltura (destra) Le colorazioni sono state ottenute mediante indagini in immunofluorescenza per la marcatura di cellule muscolari (α -SMA positive) visibili in rosso. Si osserva una consistente presenza di SMC a livello del lume del vaso (L) a 10 giorni di coltura, rispetto al campione nativo dove, invece, non si osserva la netta presenza di SMC a livello endoteliale. Adattato da [43].

Inoltre, analisi della proliferazione cellulare ottenute mediante marcatura con timina triziata, che viene incorporata nel DNA delle sole cellule in duplicazione, hanno mostrato cellule proliferanti nello strato neointimale, indicando che le SMC, così identificate, derivano sia da processi migratori che da processi proliferativi [38].

Infine un altro lavoro ha mostrato che il processo migratorio è facilitato dall'attività delle metalloproteasi MMP2-MMP3 che, degradando la matrice extracellulare, consentono alle SMC, presenti nella media, di migrare verso l'intima. Infatti, mediante l'inibizione farmacologica delle MMPs è possibile limitare l'IH poiché il mantenimento dell'integrità della matrice extracellulare funge sia da barriera fisica per le SMC che da inibitore attivo di alcune biomolecole, come fattori di crescita e citochine anch'essi responsabili del rimodellamento vascolare [44].

Altri studi, invece, si sono concentrati sull'effetto della tensione di ossigeno sul tessuto vascolare; questi lavori suggeriscono che, in sede di bypass, quando il graft venoso entra in contatto con il sangue arterioso, caratterizzato da una maggiore pO_2 (40 mmHg vs 100 mmHg) rispetto alla pO_2 fisiologica, subisce uno stress ossidativo con conseguente

¹ α -SMA: anticorpo specifico per marcare l' α -actina delle SMC

produzione di specie reattive all'ossigeno (ROS); l'elevata presenza di ROS sembra essere responsabile di un danneggiamento tessutale che provoca IH.

A titolo esemplificativo viene riportato un lavoro, condotto nel 2010 da Firstenberg e collaboratori [45], che si propone di studiare l'effetto della pO_2 arteriosa (circa pari a 100 mmHg) su segmenti di vena safena umana (hSV) coltivati in coltura statica. Il set up sperimentale prevede che i campioni biologici, prelevati da pazienti sottoposti all'intervento di bypass, siano mantenuti all'interno di piastre cellulari contenenti medium (DMEM con 10% di siero fetale bovino) ad una pO_2 pari a 95mmHg e ad una temperatura pari a 37°C, per 14 giorni.

Trascorso il tempo di coltura prestabilito, le sezioni di hSV e quelle native sono state sottoposte a colorazione con H&E e colorazione Van Giesen per l'elastina ed infine ad analisi immunoistochimiche per la valutazione della proliferazione cellulare (PCNA² positive) e colorazione DAPI³ (per la marcatura dei nuclei cellulari). Successivamente, mediante l'utilizzo del software Image-J, dalle immagini ottenute con colorazione per l'elastina è stata misurata l'area dell'intima identificabile come la zona interposta tra la lamina elastica interna (IEL) e la lamina elastica esterna (EEL). Infine, l'identificazione di ROS sul tessuto vascolare è stata ottenuta mediante saggio colorimetrico fluorescente con diidroetidio (DHE⁴).

Dalle analisi istologiche ottenute con colorazione con H&E e per l'elastina dei segmenti hSV nativi si evidenzia il mantenimento dello strato endoteliale e dell'integrità tessutale (Figura 2.5-A, B), mentre si osserva che le hSV coltivate in condizioni di pO_2 pari a 95 mmHg sviluppano IH (Figura 2.5-C, D).

² La PCNA è una proteina coinvolta nella sintesi del DNA rilevabile con tecniche immunologiche.

³ DAPI è un intercalante del DNA cellulare e si utilizza per marcare i nuclei cellulari.

⁴ DHE in presenza di ROS, viene ossidato a 2-idrossietidio emettendo un segnale fluorescente visibile nel canale del rosso.

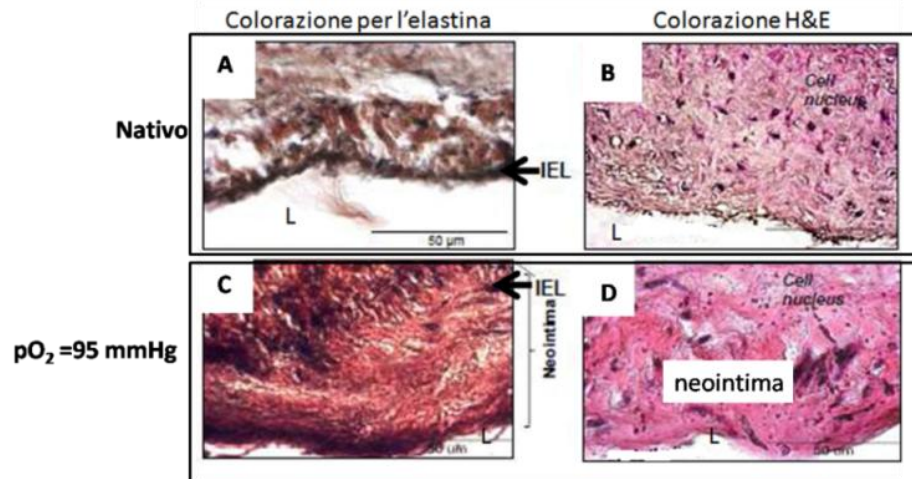


Figura 2.5 Immagini istologiche con colorazione per l'elastina (prima colonna) e con H&E (seconda colonna). (A-B) Campione nativo, (C-D) campione mantenuto in coltura con pO_2 pari a 95 mmHg. L: lume; IEL: lamina elastica interna (evidenziata dalla freccia nera). Si osserva uno sviluppo di neointima per i campioni coltivati con pO_2 pari a 95 mmHg. Adattato da [45].

Le analisi quantitative, condotte su sezione di hSV sottoposte a colorazione per l'elastina, mostrano che nei campioni coltivati in condizioni di pO_2 pari a 95 mmHg vi è un aumento statisticamente significativo dell'area dell'intima e della media del vaso rispetto ai campioni nativi (Figura 2.6-A, B) ed inoltre le analisi immunohistochimiche condotte con PCNA riportano un aumento, statisticamente significativo, della proliferazione cellulare se confrontate con i campioni nativi (Figura 2.6 C).

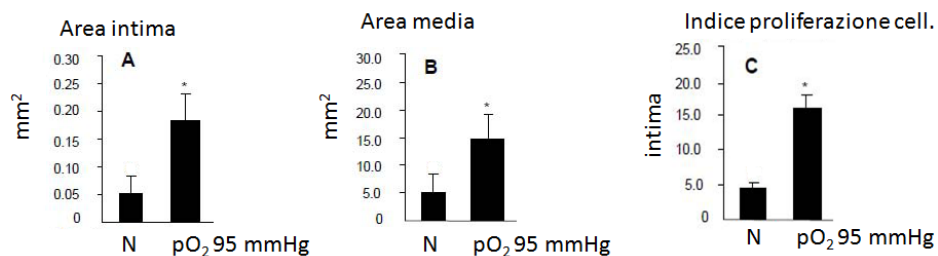


Figura 2.6 Analisi quantitative dei campioni nativi (N) e coltivati con $pO_2=95$ mmHg. (A) Misura dell'area dell'intima [mm^2]. (B) Misura dell'area della media [mm^2]. (C) Indice di proliferazione cellulare. Si osserva per tutte e tre le analisi un incremento significativo della grandezza in esame nei campioni coltivati ex vivo, rispetto ai campioni nativi. (*= $p<0.05$). Adattato da [45].

Infine, la valutazione dello stress ossidativo ha confermato l'ipotesi iniziale: le sezioni di hSV mantenute in coltura per 14 giorni hanno mostrato un aumento di ROS in associazione all'aumento di IH (Figura 2.7).

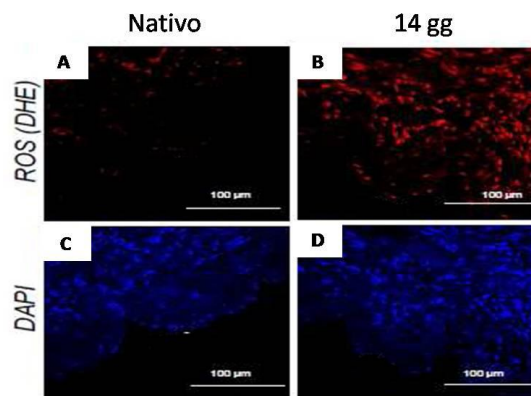


Figura 2.7 Immagini di sezioni di vena safena nativa (A-C) e coltivata in coltura statica per 14 giorni (B-D), ottenute da indagini in immunofluorescenza per la marcatura delle cellule che presentano al loro interno ROS (DHE positive) visibili in rosso e dei nuclei cellulari (DAPI) visibili in blu. Si osserva un incremento di ROS nelle cellule dei campioni coltivati ex vivo rispetto ai nativi. Adattato da [45].

In questa immagine è possibile osservare nei campioni mantenuti in coltura per 14 giorni in condizioni di pO_2 arteriosa un elevato livello di fluorescenza di DHE (indicativo della presenza di ROS).

Un'ulteriore conferma del fatto che la pO_2 arteriosa possa concorrere al rimodellamento vascolare di segmenti di vena safena è stata riscontrata anche nel lavoro di Joddler e collaboratori [32] del 2010. In questo studio, gli autori hanno osservato uno sviluppo di neointima in campioni di vena safena coltivati a pO_2 arteriose (circa 100 mmHg) rispetto a campioni coltivati in condizioni venose ($pO_2 = 40$ mmHg). Inoltre è stato dimostrato che, contrariamente alle vene, le arterie coltivate nelle medesime condizioni biochimiche del bypass (pO_2 circa pari a 95 mmHg) non evidenziano nessuno sviluppo di IH. Questo risultato è una conferma del fatto che essendo coltivate in condizioni biochimiche fisiologiche i vasi arteriosi non subiscono nessun tipo di danneggiamento. Queste osservazioni potrebbero anche spiegare il perché della minore percentuale di restenosi dei graft arteriosi rispetto a quelli venosi nel bypass aorto-coronarico. Nella campagna sperimentale condotta per questo studio [32], campioni di vena safena porcina (pSV) sono stati mantenuti in coltura, per 14 giorni, in medium con pO_2 rispettivamente pari a 40 mmHg, 75 mmHg e 95 mmHg mentre campioni di arteria femorale porcina (pFA) in pO_2 pari a 95 mmHg. Al termine delle due settimane sono state condotte colorazioni per l'elastina e con H&E per la valutazione della morfologia tessutale e la quantificazione dell'area dell'intima e della media. Infine, sono stati condotti saggi in immunofluorescenza (marcatura con α -SMA per le SMC e con DAPI per i nuclei cellulari) per la

quantificazione della densità cellulare. I risultati ottenuti dall'analisi della densità cellulare per i segmenti di pSV sono riassunti in Tabella 2.1 dove si osserva un aumento significativo della densità cellulare dei soli campioni pSV coltivati a pO₂ pari a 95 mmHg (Tabella 2.1).

Campioni (PSV)	Densità cellulare (n.cell/mm ²)	
Nativo	Intima: 50 ± 10	Media: 60±14
pO ₂ =40mmHg	Intima: 40±17	Media: 60±15
pO ₂ =75 mmHg	Intima: 60±17	Media: 70±15
pO ₂ =95 mmHg	Intima: 80±10 *	Media: 90±10 *

Tabella 2.1 Stima della densità cellulare dei campioni pSV. Si osserva un aumento significativo della densità cellulare nell'intima e nella media dei campioni coltivati in condizioni di pO₂ pari a 95 mmHg. (* = p<0.05). Adatta da [43].

Dalle analisi morfologiche è emerso che tutti i campioni (pSV e pFA), a seguito del tempo di coltura, hanno mantenuto la struttura caratteristica della parete del vaso, con uno sviluppo di IH per i soli campioni pSV coltivati a pO₂ pari a 75 mmHg e 95mmHg (Figura 2.8).

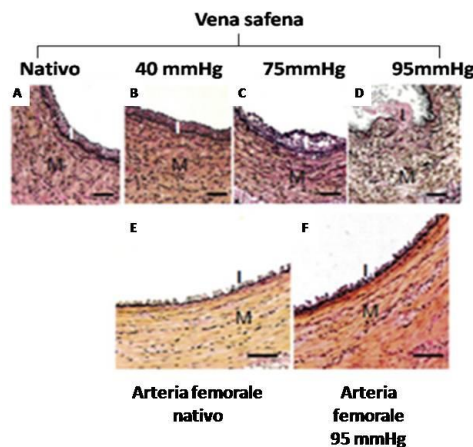


Figura 2.8 Immagini ottenute con colorazione per l'elastina. (A) Controllo nativo, (B) pSV coltivata con pO₂ pari a 40 mmHg, (C) pSV coltivata con pO₂ pari a 75 mmHg, (D) pSV coltivata con pO₂ pari a 95 mmHg, (E) arteria femorale nativa, (F) arteria femorale coltivata con pO₂ pari a 95 mmHg. M: media; I: intima. Si osserva un aumento dell'iperplasia dell'intima delle pSV coltivate con pO₂ pari a 75 mmHg e 95mmHg mentre, un mantenimento della struttura vascolare nell'arteria femorale coltivata con pO₂ pari a 95 mmHg se paragonata al suo campione nativo. Adattato da [32].

Nel lavoro del 2002 di Castronovo [46] viene proposto un modello *in vitro* per lo studio dell'IH indotta dall'ambiente biochimico costituito dal medium di coltura. Gli autori sostengono che i meccanismi coinvolti nell'IH, quali proliferazione e migrazione cellulare, possano essere facilmente indotti dal tipo terreno di coltura (contenente siero e/o fattori di crescita) normalmente utilizzato negli studi *ex vivo*.

In questo studio, segmenti di vene safene umane (hSV) sono stati posti in coltura, per due settimane, nei mezzi di coltura sotto elencati:

- 1) RPMI, medium privo di proteine, fattori di crescita e ormoni.
- 2) RPMI più siero fetale bovino (SBF) ricco di ormoni e fattori di crescita.
- 3) RPMI più plasma umano adulto contenente fattori coagulanti.

Alla fine del periodo di coltura (14 giorni), le analisi istologiche condotte con colorazione H&E hanno evidenziato integrità tessutale di tutti i campioni e nessuna evidenza di necrosi o degenerazione cellulare ma, con uno sviluppo di IH per i campioni coltivati in RPMI più siero (Figura 2.9 B) e più plasma (immagine non disponibile), a differenza dei campioni coltivati in RPMI semplice (Figura 2.9 A).

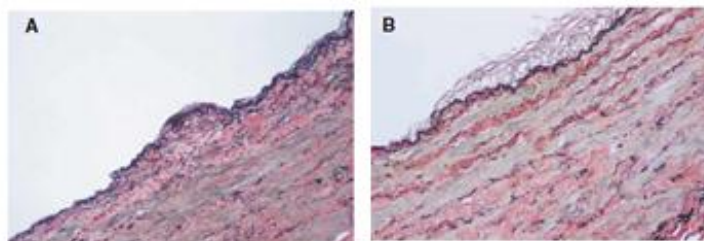


Figura 2.9 Immagine ottenuta con colorazione per l'elastina. (A) Campione nativo, (B) campione a due settimane in terreno di coltura contenente siero fetale bovino. Si evidenzia rimodellamento vascolare poiché i layer della parete vascolare in B sembrano avere un diverso spessore e si osserva uno sviluppo di neointima. Adattato da [46].

Dalle analisi morfologiche e morfometriche, condotte su campioni di hSV, con colorazione per l'elastina, è emerso che i medium RPMI addizionati con siero fetale bovino e plasma, dopo 2 settimane di coltura, hanno indotto nei segmenti di hSV un aumento dello spessore della parete vascolare con formazione di neointima. Infine, sono state condotte analisi immunoistochimiche (con marker PCNA che si lega solo alle cellule che si trovano nella fase di sintesi del loro ciclo cellulare), per la valutazione della proliferazione cellulare.

I risultati hanno evidenziato, dopo due giorni di cultura, un aumento significativo delle cellule proliferanti nell'intima, nella media e nell'avventizia nei campioni hSV mantenuti in RPMI più siero fetale bovino e in RPMI più plasma. Mentre, dopo due settimane d'incubazione, tutti i gruppi sperimentali hanno evidenziato un incremento della proliferazione cellulare in tutti i layer della parete vascolare. Dall'analisi di tutti i risultati ottenuti gli autori sostengono che i terreni di coltura che contengono numerosi fattori di crescita e proteine possono compromettere le indagini sullo studio del VGD poiché, già da soli, sono in grado di indurre proliferazione cellulare e conseguente rimodellamento vascolare. Pertanto, per un corretto modello *ex vivo* andrebbe utilizzato solo RPMI semplice.

2.1.2 Sistemi dinamici a perfusione stazionaria e pulsatile

I sistemi dinamici sono sistemi che consentono di sottoporre segmenti di vena a condizioni fluidodinamiche definite e controllate. Generalmente i componenti principali di tali sistemi sono: una camera di coltura, in cui viene alloggiato il campione biologico, un attuatore, (solitamente una pompa roller con a valle una camera di compliance che funge da filtro per ridurre il disturbo generato dalla pompa), una camera di riserva per il terreno di coltura (reservoir), uno scambiatore di gas per mantenere ossigenato il campione biologico e il medium di coltura ed infine un circuito idraulico necessario a connettere i vari elementi. Spesso, in particolar modo nei sistemi a stimolazione pulsatile, sono presenti flussimetri, trasduttori di pressione usati per il monitoraggio dei diversi parametri e controllati tramite PC. Tra i sistemi di coltura dinamica si possono distinguere sistemi dinamici a flusso stazionario e sistemi dinamici a flusso pulsatile. Vediamo di seguito alcuni esempi.

Uno dei primi sistemi è stato realizzato, nel 1996, da Porter e colleghi [47]. Il sistema, definito dagli autori "*flow ring*", permette di esaminare l'effetto di differenti condizioni di flusso (arterioso e venoso) su segmenti di vena safena. Tale sistema presenta due sottocircuiti: uno volto a simulare le condizioni venose e l'altro le condizioni arteriose. Ogni sottocircuito è composto da un reservoir e una pompa peristaltica per la movimentazione del medium (Figura 2.10). L'altezza modulabile di ogni reservoir permette, insieme alla variazione del numero di giri della pompa, di generare le due diverse condizioni fluidodinamiche.

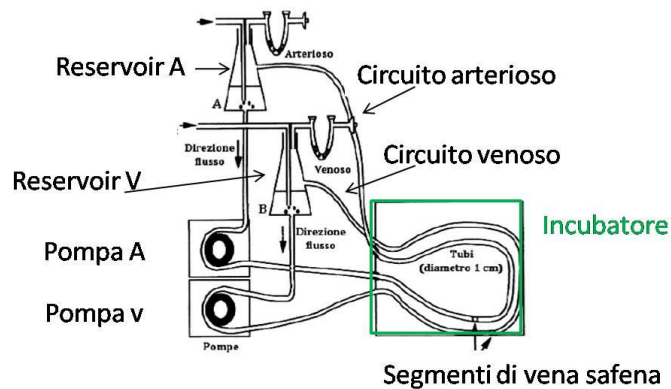


Figura 2.10 Rappresentazione schematica del sistema flow ring. Si distinguono due sottocircuiti; uno per la stimolazione arteriosa e uno per la stimolazione venosa; ogni sottocircuito è caratterizzato dalla presenza di un reservoir (A e V) ed una pompa (A e V). I segmenti di vena safena per ogni circuito sono posti nella camera di coltura all'interno dell'incubatore. Adattata da [47].

In questo lavoro, per ogni vena safena proveniente dallo stesso paziente, un campione è stato sottoposto a stimolazione in condizioni venose ($Q=70$ ml/min, $P=15$ mmHg, $\tau=0.1$ Pa), uno a stimolazione in condizioni arteriose ($Q=500$ ml/min, $P=85$ mmHg, $\tau=0.9$ Pa) e uno è stato utilizzato come controllo in condizioni statiche: queste condizioni di sperimentazione sono state mantenute per 13 giorni.

Le analisi immunoistologiche (Figura 2.11) condotte con colorazioni α -SMA per le SMC e con colorazione per le fibre elastiche mostrano per i campioni coltivati in condizioni statiche una presenza significativa di neointima (di uno spessore pari a $20 \mu\text{m}$) e per i campioni coltivati in condizioni venose uno strato neointimale più sottile (pari a $8 \mu\text{m}$), che per i campioni mantenuti in condizioni arteriose risulta praticamente assente. Da questi risultati gli autori desumono che lo *shear stress* è in grado di prevenire l'iperplasia dell'intima poiché nei campioni coltivati in condizioni statiche e in condizioni venose (bassi valori di *shear stress*) si osserva un consistente aumento dello strato neointimale, cosa non riscontrabile invece nei campioni mantenuti in condizioni arteriose.

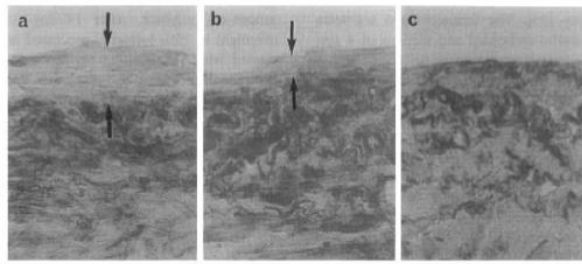


Figura 2.11 Immagini di sezioni trasversali di vena safena umana sottoposte a colorazione per le cellule muscolari e per l'elastina; (a) Campione dopo 13 giorni di coltura statica, (b) campione dopo 13 giorni di coltura in condizioni venose, (c) campione dopo 13 giorni di coltura in condizioni arteriose. I risultati mostrano presenza di neointima per (a) e (b) mentre nessuna evidenza di iperplasia dell'intima in (c). Adattato da [47].

Nel lavoro di Stooker e colleghi del 2001 [48], viene proposto un modello di stimolazione non pulsatile atto a studiare l'effetto della pressione arteriosa sulla vena safena. Lo studio propone inoltre l'utilizzo di uno stent in PTFE da porre esternamente al vaso per prevenirne la dilatazione. Il sistema usato è rappresentato schematicamente in Figura 2.12, dove è possibile osservare un reservoir per il terreno di coltura, la pompa roller per la sua movimentazione, due camere poste in parallelo per l'alloggiamento dei segmenti di vena safena e il traduttore di pressione.

In questo studio, due campioni di vena safena sono stati perfusi con un flusso non pulsatile ad una pressione arteriosa pari a 60 mmHg. Il primo campione è stato prelevato dopo 30 minuti di perfusione mentre il secondo dopo 60 minuti. Successivamente, lo stesso set up è stato utilizzato per la perfusione di due campioni, di cui uno contenuto dallo stent. Dopo 60 minuti di coltura, per le analisi dei risultati sono state condotte colorazione con H&E, analisi morfometriche e analisi immunohistochimiche (colorazione con CD31 per le EC).

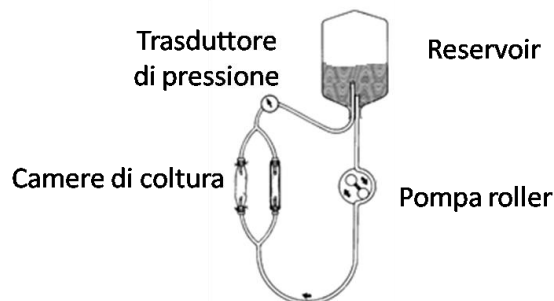


Figura 2.12. Rappresentazione schematica del sistema di coltura ex vivo. Il sistema è costituito da una pompa roller, due camere di coltura poste in parallelo tra di loro per l'alloggiamento dei campioni biologici, un traduttore di pressione e un reservoir. Adattato da [48].

I risultati mostrano una progressiva deendotelizzazione della parete vascolare a seguito della perfusione ad eccezione dei vasi con lo stent (Figura 2.13).

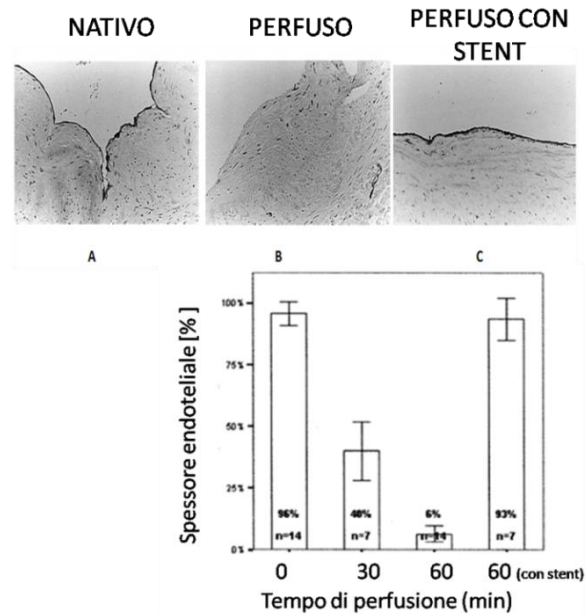


Figura 2.13 Sopra: colorazione per le cellule endoteliali con CD31. (A) Campione nativo, (B) campione perfuso per 60 min e (C) campione sostenuto dallo stent e perfuso per 60 min. Si osserva in (A) l'endotelio intatto prima della perfusione, in (B) una totale deendotelizzazione ed in (C) il mantenimento dello strato endoteliale. Sotto: misura dello strato endoteliale [%]. Per i campioni dopo 30 min di perfusione si osserva una diminuzione dello strato endoteliale che si riduce ulteriormente dopo 60 min di coltura. Nei campioni con lo stent (ultima colonna a destra) si osserva invece che dopo 60 min lo strato endoteliale è mantenuto. Adattato da [38].

Uno studio interessante sull'effetto della diversa pO_2 a cui è esposta la vena safena nel bypass coronarico è stato condotto nel 2010 da Joddar e collaboratori [32]. In questo lavoro gli autori si sono proposti di studiare, mediante un sistema *ex vivo* a flusso stazionario, segmenti di vena safena porcina (pSV) coltivati per 7 giorni in due diversi tipi di ambiente biochimico: arterioso ($pO_2=140$ mmHg) e venoso ($pO_2=75$ mmHg).

Il presente studio è stato condotto mediante il supporto del sistema *ex vivo* mostrato e descritto in Figura 2.14. Il sistema è costituito da una camera di coltura per l'alloggiamento del vaso, un circuito idraulico, una pompa per la movimentazione del terreno di coltura, un reservoir per la riserva del terreno di coltura ed un sistema di acquisizione e controllo dei dati.

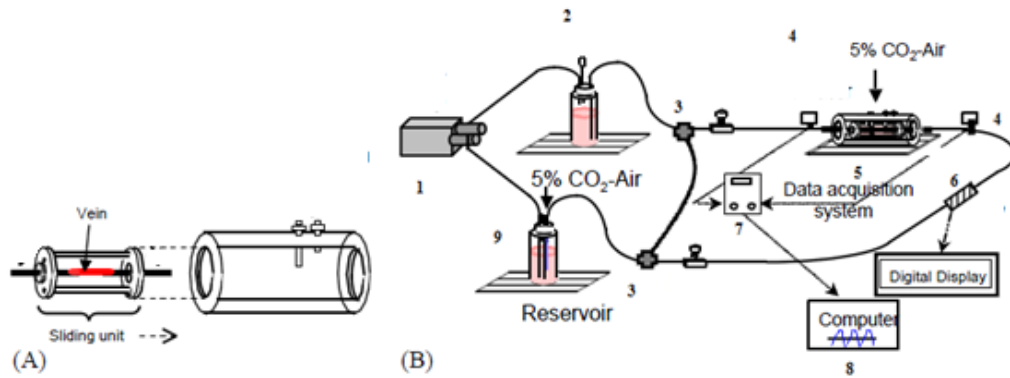


Figura 2.14 Schema del sistema di coltura. (A) Ingrandimento della camera per l'alloggiamento della vena: il vaso è incannolato a due cilindri in acciaio inossidabile e l'assemblato è inserito in una camera di PMMA, i porti sulla camera permettono lo scambio di gas con l'esterno. (B) Sistema di coltura completo: (1) pompa roller, (2) camera di compliance, (3) bypass in cui eventualmente deviare il flusso per il ricircolo del medium, (4) trasduttore di pressione, (5) camera per l'alloggiamento del vaso, (6) flussimetro, (7) sistema di acquisizione dati, (8) PC (9) reservoir/scambiatore di gas. Adattato da [32].

In questo lavoro sono stati individuati due gruppi sperimentali: il primo gruppo è composto da segmenti di pSV posti in coltura ad una pO_2 pari a 140 mmHg e una portata pari a 10 ml/min mentre il secondo è composto da segmenti di pSV posti in coltura ad una pO_2 pari a 75 mmHg e a una portata di esercizio sempre di 10 ml/min.

Per raggiungere i livelli di pO_2 desiderati, una miscela di gas è stata precedentemente lasciata gorgogliare nel terreno di coltura. Al fine di ottenere il terreno con una pO_2 pari a 140 mmHg è stato utilizzato un mix di gas composto da 5% di CO_2 e 95% di aria mentre, per ottenere il terreno con pO_2 pari a 75 mmHg è stata utilizzata una miscela di gas composta da 10% di CO_2 e 90% di N_2 . Alla fine dei 7 giorni di coltura sono state condotte analisi istologiche con colorazioni per l'elastina per differenziare la tunica intima da quella media, colorazioni in immunofluorescenza per distinguere rispettivamente le cellule endoteliali (con marcatore CD31) e muscolari (con marcatore α -SMA) e per individuare le cellule in proliferazione (con anticorpo PCNA).

I risultati permettono di osservare che tutti i segmenti pSV perfusi sono rimasti integri dopo sette giorni di coltura e che le pSV sottoposte ad una maggiore pO_2 (140 mmHg) hanno evidenziato una maggiore iperplasia dell'intima rispetto agli altri gruppi sperimentali (Figura 2.15).

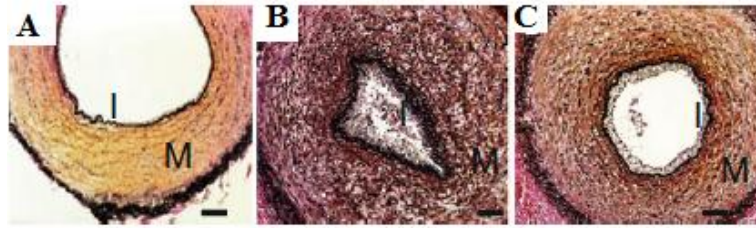


Figura 2.15 Immagini ottenute da colorazione per l'elastina. (A) pSV nativa, (B) pSV perfusa con $pO_2=140$ mmHg, (C) pSV perfusa con $pO_2=75$ mmHg. M: media; I: intima. Si osserva uno sviluppo di iperplasia dell'intima nelle pSV coltivate con pO_2 pari a 140 mmHg. Adattata da [32].

I risultati ottenuti da queste colorazioni sono coerenti con l'analisi quantitativa relativa alla misura dell'area dell'intima nelle pSV esposte alle diverse condizioni di pO_2 , infatti dal grafico riportato in Figura 2.16, si osserva che l'aumento della pO_2 comporta un significativo e progressivo aumento dell'area dell'intima (Figura 2.16).

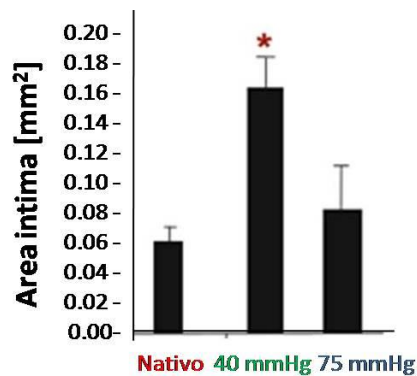


Figura 2.16 Valore dell'area dell'intima [mm²] delle pSV coltivate in diverse condizioni di pO_2 . Si osserva un incremento statisticamente significativo dell'area dell'intima nelle pSV coltivate con pO_2 pari a 140 mmHg, rispetto ai campioni di controllo e ai campioni coltivati con pO_2 pari a 75 mmHg. (* = $p<0.05$). Adattato da [32].

Infine, l'indice di proliferazione, nell'intima e nella media, per pSV mantenute in coltura con elevata pO_2 , è risultato statisticamente più elevato rispetto al controllo mentre, nelle pSV coltivate con una pO_2 minore, l'aumento delle proliferazione cellulare nell'intima non è risultato significativo rispetto alle pSV perfuse con pO_2 maggiore. I risultati ottenuti sono riassunti in Tabella 2.2.

Gruppi sperimentali	Indice di proliferazione cellulare [%] nell'intima	Indice di proliferazione cellulare [%] nella media
pSV nativo (n=7)	3.5 ± 1.8	1.1 ± 0.1
pSV pO ₂ = 140 mmHg (n=5)	25.2 ± 16.3 *	6.9 ± 1.6 *
pSV pO ₂ = 75 mmHg (n=5)	8.4 ± 3.5	0.9 ± 0.9

Tabella 2.2 *Indice di proliferazione cellulare per i gruppi sperimentali. Si nota un aumento statisticamente significativo dell'indice di proliferazione nelle media e nell'intima delle pSV coltivate con pO₂ pari a 140 mmHg rispetto ai controlli nativi. (*=p<0.05). Adattato da [32].*

Da questa campagna sperimentale gli autori ritengono che la diversa tensione di ossigeno, cui è sottoposta la vena safena nel bypass, abbia un effetto rilevante sul rimodellamento vascolare della parete stessa. Pertanto, sulla base di queste osservazioni, si ritiene che negli studi basati su modelli *ex vivo* del VGD sia necessario tenere in considerazione anche gli aspetti relativi al condizionamento biochimico. Infatti, come vedremo di seguito, la maggiore parte dei lavori condotti con modelli *ex vivo* sono volti solo allo studio del VGD indotto dalle condizioni emodinamiche arteriose del bypass aorto-coronarico.

Nel 2013, Berard e colleghi [49] propongono un modello *ex vivo* per studiare il differente ruolo delle forze emodinamiche (pressione parietale e *shear stress* arteriosi) nel rimodellamento vascolare della vena safena.

Gli esperimenti sono stati condotti su segmenti di vena safena umana (hSV) prelevati da pazienti sottoposti ad intervento di bypass agli arti inferiori. Il sistema di stimolazione usato (Figura 2.17) è in grado di generare un flusso pulsatile (60 pulsazioni/min) con una portata media di 80 ± 15 ml/min, indipendentemente dalla pressione applicata al sistema.

Il software permette una costante acquisizione e monitoraggio della pressione, della portata del fluido e della frequenza.

Lo *shear stress*, per tutte le prove condotte, è stato mantenuto ad un valore pari a 9-15 dyn/cm² in modo tale da valutare i diversi effetti generati dalla sola variazione della pressione imposta. Lo *shear stress* è stato calcolato mediante la formula seguente:

$$SS = \frac{4\mu Q}{\pi r^3}$$

dove μ , Q e r sono rispettivamente: la viscosità del mezzo (3.73 10⁻² dyn s/cm²), la portata di esercizio (80 ± 15 ml/min) e il raggio del vaso (in cm).

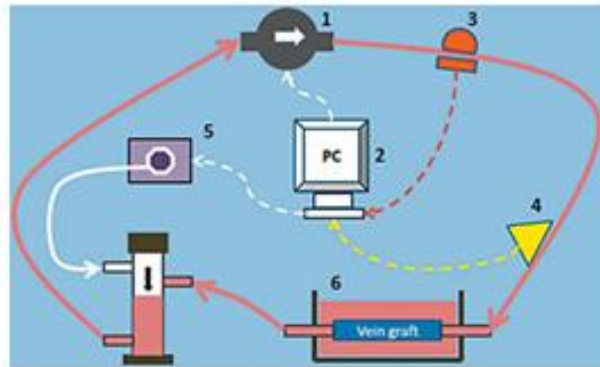


Figura 2.17 Rappresentazione schematica del sistema di coltura *ex vivo* utilizzato. Si individuano (1) la pompa per la movimentazione del terreno di coltura, (2) il PC per l'acquisizione dei dati, (3) il traduttore di pressione, (4) il flussimetro, (5) il sistema di controllo della pressione diastolica e, (6) la camera di coltura per l'alloggiamento del vaso. Adattato da [49].

Gli esperimenti sono stati condotti su due gruppi sperimentali; entrambi sottoposti, per 7 giorni, a condizioni arteriose in termini di portata e *shear stress* ma a valori pressori diversi:

Gruppo A: Pressione media di 7 mmHg.

Gruppo B: Pressione media di 70 mmHg.

Le analisi morfometriche, eseguite mediante istologie con colorazione H&E e di Van Gison, hanno evidenziato nei campioni del gruppo B lo sviluppo di neointima rispetto al controllo, mentre nei campioni sottoposti a bassi valori pressori (gruppo A) non è stata osservata neointima (Figura 2.18).

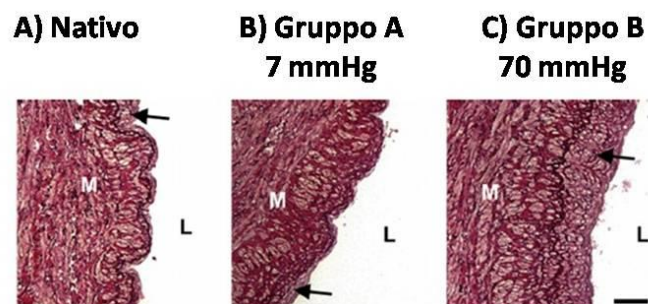


Figura 2.18 Colorazione H&E di segmenti di hSV. (A) Campione nativo, (B) campione sottoposto a bassi regimi pressori (7 mmHg), (C) campione sottoposto ad elevati regimi pressori (70 mmHg). L: lume; M: media. Si osserva (freccie nere) un aumento dello spessore dell'intima nel campione C. Adattato da [49].

Colorazioni immunohistochimiche con anticorpi per le cellule muscolari (α -SMA) hanno rilevato una marcata presenza di SMC nell'intima dei campioni stimolati con regimi pressori elevati rispetto a quelli sottoposti a pressioni minori (Figura 2.19). Infine, le analisi immunohistochimiche per Ki67⁵ mostrano una marcata presenza di cellule proliferanti nello strato neointimale di entrambi i campioni sottoposti a regimi pressori ma, con un maggiore incremento per il gruppo sottoposto a regimi pressori maggiori (Figura 2.19).

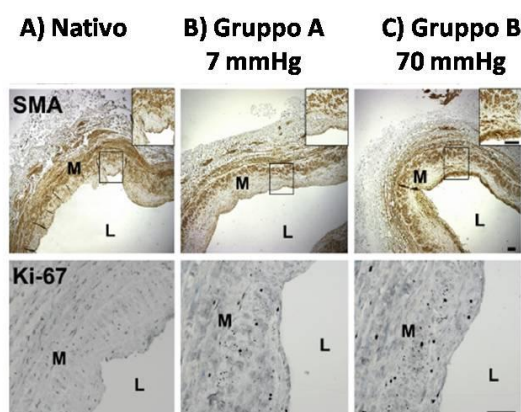


Figura 2.19 Analisi immunohistochimiche di segmenti di hSV. Sopra: immagini ottenute mediante marcatura delle cellule muscolari con α -SMA. Sotto: immagini ottenute mediante marcatura delle cellule proliferanti con Ki674. (A) Campione nativo, (B) campione sottoposto a bassi regimi pressori (7 mmHg), (C) campione sottoposto ad elevati regimi pressori (70 mmHg). M: media; L: lume. (α -SMA): si osserva in (C) una massiva presenza di cellule muscolari nell'intima rispetto al controllo. (Ki67): si osserva un aumento delle cellule proliferative in (C) rispetto al campione controllo. Tali risultati sono osservabili, anche se in maniera meno marcata nel campione (B). Adattato da [49].

Nel 2013, Piola e colleghi [50] propongono un sistema di cultura *ex vivo* per sottoporre segmenti di vena safena ai pattern di stimolazione pressoria arteriosa a cui è sottoposto *in vivo* il graft venoso a seguito del bypass.

Il sistema è inoltre in grado di simulare le condizioni emodinamiche dell'ambiente venoso. Il sistema di cultura è descritto in Figura 2.20. Gli elementi costitutivi del sistema sono: *i*) la camera di cultura che svolge una duplice funzione: alloggiamento per il vaso e reservoir per il mezzo di coltura, *ii*) la pompa peristaltica, *iii*) l'elettrovalvola, *iv*) il trasduttore di pressione, *v*) il PC per l'acquisizione dei dati e *vi*) il circuito idraulico con tubi in silicone.

⁵ Il Ki67 è un anticorpo specifico per un antigene nucleare che viene esposto durante le fasi replicative del ciclo cellulare.

Questo sistema, è in grado, mediante un software che controlla gli attuatori idraulici, di applicare una stimolazione pressoria pulsatile, programmabile dall'utente, alternata ad una fase di ricircolo del medium di coltura.

Gli esperimenti sono stati condotti, per 7 giorni, su segmenti di vena safena umana (hSV), divisi in due gruppi sperimentali:

Segmenti sottoposti a regime venoso (VP): le condizioni venose sono state riprodotte in termini di flusso stazionario con portata di 3 ml/min e pressione pari a 5 mmHg.

Segmenti stimolati in regime pressorio arterioso (CABG-like): sottoposti a condizioni arteriose che sono state riprodotte in termini di pressione pulsatile nel range 80-120 mmHg.

Al termine dell'esperimento i campioni VP e CABG-like sono stati sottoposti ad analisi di vitalità cellulare (MTT⁶), analisi morfologiche, analisi morfometriche ed analisi in immunofluorescenza (colorazione delle SMC, con marker α -SMA, delle EC, con CD31 e dei nuclei cellulari con DAPI).

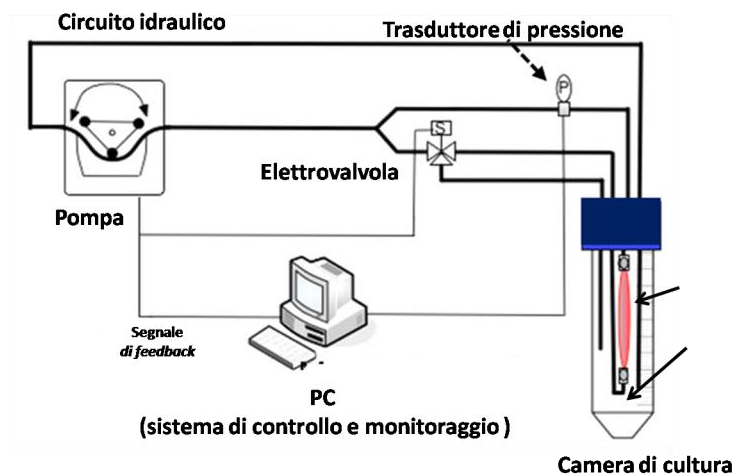


Figura 2.20 Sistema di coltura ex vivo. Si individuano la pompa peristaltica per la movimentazione del terreno di coltura che avviene attraverso il circuito idraulico, la camera di coltura per l'alloggiamento del vaso, il trasduttore di pressione, l'elettrovalvola per lo switch da stimolazione a ricircolo ed il PC come sistema di controllo e monitoraggio. Adattato da [50].

Dall'analisi per la vitalità cellulare è emerso che tutti i campioni, dopo 7 giorni di coltura, mantengono una vitalità paragonabile a quella dei campioni nativi di controllo. Le

⁶ Il saggio MTT è un saggio colorimetrico standard per la misurazione dell'attività di enzimi che sono tipicamente attivi solo nelle

colorazioni istologiche con Tricomia di Masson hanno mostrato che, in condizioni sia venose che di stimolazione, i segmenti di hSV mantengono le strutture caratteristiche tipiche del vaso con nessun tipo di degenerazione tessutale. Nei campioni CABG-like inoltre, si osserva una particolare disorganizzazione delle cellule muscolari circolari nella media rispetto ai campioni VP. I risultati ottenuti con la colorazione α -SMA/DAPI relativi ai campioni nativi e VP mostrano la presenza di una struttura organizzata delle SMC allineate in direzione circonferenziale rispetto al lume mentre, nei campioni CABG-like si osserva una riorganizzazione delle SMC, con una diminuzione delle SMC circolari (Figura 2.21).

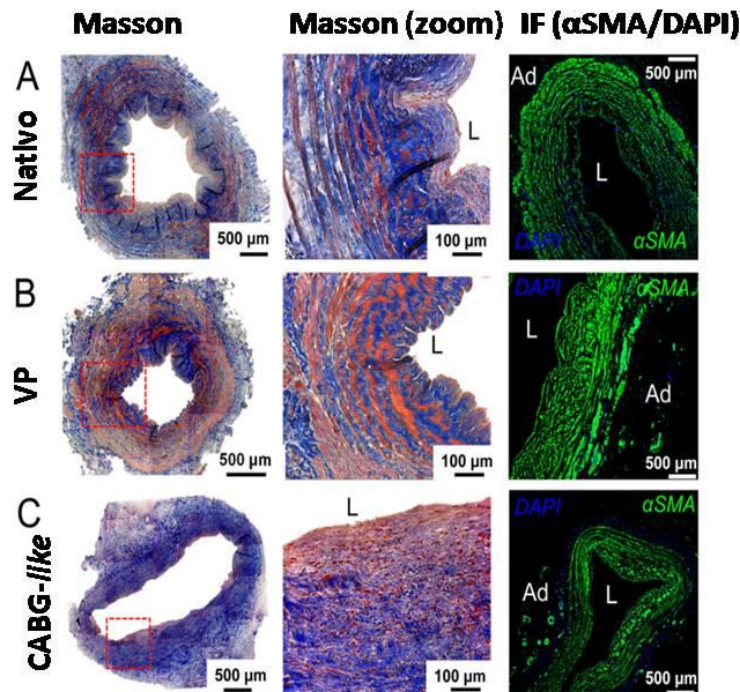


Figura 2.21 Immagini istologiche di segmenti di SV. (Prima e Seconda colonna) con colorazione Tricomica di Masson, (Terza colonna) immagini in immunofluorescenza con α -SMA e DAPI. (A) Nativo, (B) VP, (C) CABG-like. L: lume; Ad: avventizia. Le immagini mostrano un riarrangiamento strutturale delle cellule SMC per i soli campioni CABG-like. Adattato da[50].

Le indagini con CD31/DAPI, per la marcatura delle EC, mostrano una parziale perdita delle EC a livello del lume dei campioni CABG-like (Figura 2.22).

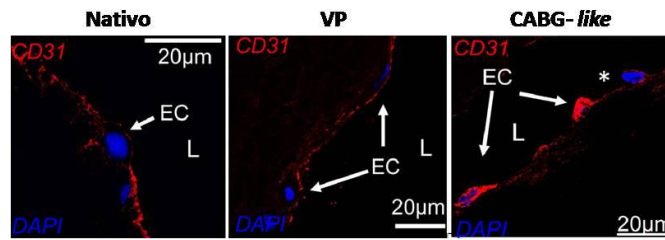


Figura 2.22 Immagini di segmenti di SV ottenute da indagini in immunofluorescenza per la marcatura delle EC (CD31) e dei nuclei cellulari (DAPI). (A) Nativo, (B) VP, (C) CABG-like. L: lume. Si osserva per il campione CABG-like un parziale distacco delle EC a livello del lume del vaso. Adattato da [50].

Infine, le analisi morfometriche, condotte su sezioni di campioni biologici VP e CABG-like, evidenziano una diminuzione significativa dello spessore della parete del vaso dei campioni CABG-like rispetto ai VP ed un aumento perimetrale del lume dei segmenti di hSV stimolati rispetto a quelli in cultura VP (Figura 2.23).

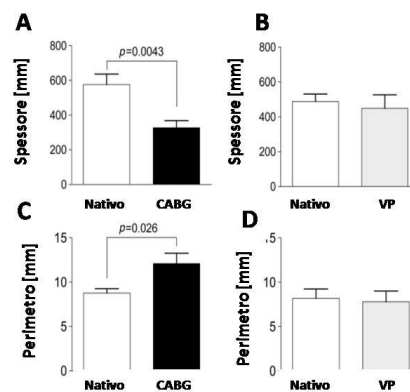


Figura 3.23 Analisi morfometriche dei campioni nativi, CABG-like e VP. Misura dello spessore della parete del vaso per i campioni CABG-like (A) e per i campioni VP (B). Misura del perimetro luminale per i campioni CABG-like (C) e VP (D). Si osserva per i campioni CABG-like una diminuzione statisticamente significativa dello spessore della parete ed un aumento significativo del perimetro luminale. Adattato da [50].

Considerando quanto osservato dalle analisi morfologiche, morfometriche e in immunofluorescenza emerge che le elevate pressioni di stimolazione arteriose inducono un rimodellamento e una riorganizzazione delle strutture caratteristiche della parete dei vasi, con una de-endothelizzazione del lume che può compromettere l'omeostasi del vaso.

Dall'analisi condotta fino adesso è emerso che le condizioni emodinamiche arteriose a cui è esposta la vena safena nel bypass aorto-coronarico possono indurre fenomeni proliferativi, aumento del perimetro luminale e migrazione di SMC verso l'intima con conseguente formazione di IH. Oltre a questo i primi lavori condotti per lo studio

dell'effetto dell'elevata pO_2 intra-luminale del sangue arterioso coronarico hanno riportato che questa condizione biochimica può concorrere al rimodellamento della parete della vena safena, inducendo un aumento delle cellule proliferanti nell'intima e nella media e provocando un danneggiamento del vaso a causa dello stress ossidativo generato dall'elevata pO_2 arteriosa. Tutte queste considerazioni portano a dedurre che le diverse tensioni di ossigeno (non fisiologiche per la vena) come per esempio anche un'elevata mancanza di sangue ossigenato verso la parete del vaso (causato dalla distruzione dei VV durante l'atto chirurgico) possano partecipare allo sviluppo del VGD. Infatti, da un'analisi accurata dei lavori presenti in letteratura volti allo studio dell'effetto dell'ipossia sulla parte vascolare è emerso che una carenza di ossigeno può provocare anch'essa un rimodellamento vascolare caratterizzato principalmente da fenomeni angiogenici e apoptotici. Di seguito è riportato in maniera dettagliata quanto detto fino adesso

2.2. Effetto dell'ipossia sul tessuto vascolare

Diversi lavori, condotti principalmente su animali *in vivo*, hanno studiato l'effetto dell'ipossia principalmente su vasi arteriosi. Da tali analisi, è emerso che la diminuzione della pO_2 , sul tessuto vascolare, provoca un rimodellamento della parete che può concorrere all'occlusione del vaso. In particolare, quello che è stato osservato è un aumento dello spessore della media e dell'avventizia ed un'elevata espressione del fattore di crescita delle cellule endoteliali vascolari (VEGF) che è noto per essere coinvolto nel processo di angiogenesi [36].

Molti autori ritengono che l'aumento dello spessore della media sia facilmente attribuibile all'ipertrofia delle cellule muscolari e in particolar modo ad un'elevata deposizione di matrice extracellulare, con predominanza di collagene ed elastina [51], mentre nell'avventizia, tale aumento, sembra essere riconducibile ad un aumento della proliferazione di fibroblasti e miofibroblasti [52]. I fibroblasti sembrano essere le cellule che maggiormente risentono dell'ipossia producendo una grande quantità di matrice extracellulare e inducendo un aumento di fattori di trascrizione quali NF- κ B ed HIF-1 α , coinvolti nell'apoptosi cellulare e nell'angiogenesi [53-54-36]. Anche a livello dell'intima è stato osservato un ispessimento legato probabilmente alla migrazione dei miofibroblasti. Infatti, come è stato spiegato nel paragrafo 1.6.1 del Capitolo 1, in condizioni di ipossia i fibroblasti cambiano il loro fenotipo in miofibroblasti (cellule dotate di elevate capacità

proliferativa, migratoria e di sintesi di ECM) e migrano verso l'intima del vaso, grazie all'attivazione delle metalloproteasi che degradano la matrice extracellulare [34] (Figura 2.24).

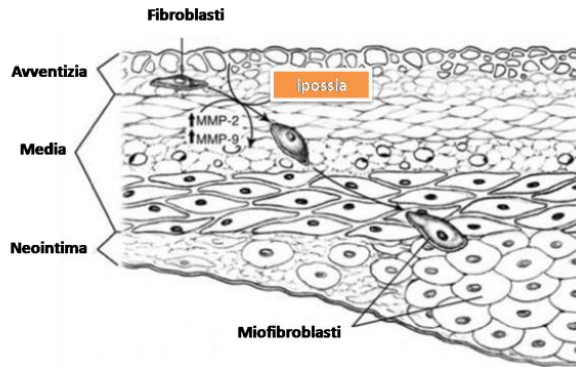


Figura 2.24 Schema rappresentativo dell'evoluzione di IH causata dalla migrazione dei miofibroblasti a seguito d'ipossia. Si osserva che l'ipossia induce un cambiamento fenotipico dei fibroblasti in miofibroblasti ed un'attivazione delle MMP2-9 deputate alla degradazione di matrice extracellulare: facilitando così la migrazione dei miofibroblasti verso l'intima. Adattato da [34].

Le condizioni ipossiche all'interno di un tessuto vascolare determinano l'attivazione di HIF-1 α . La sua attivazione induce l'adattamento metabolico, e attiva a sua volta fattori angiogenici che stimolano la nascita di nuovi vasi e altri fattori responsabili dell'apoptosi cellulare (Figura 2.25).

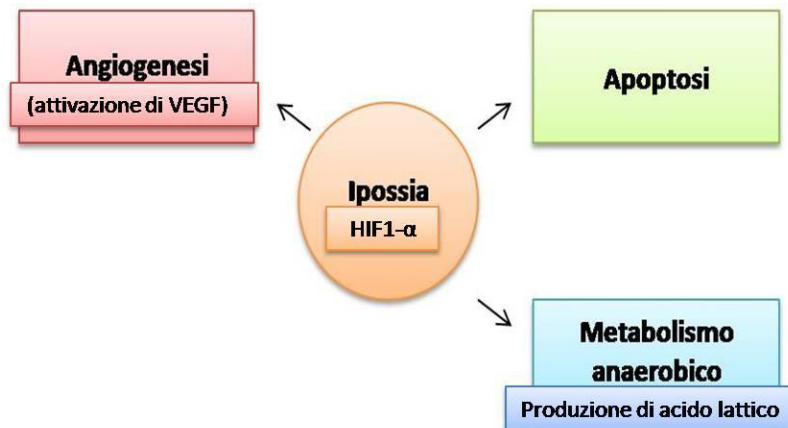


Figura 2.25 Riassunto degli effetti dell'ipossia sulle cellule. Attivazione di HIF-1 α con conseguente attivazione del fattore di trascrizione VEGF e quindi angiogenesi; attivazione del segnale di apoptosi cellulare e attivazione del metabolismo anaerobico con produzione di acido lattico.

L'angiogenesi rappresenta un insieme di processi funzionali che portano alla formazione di nuovi vasi sanguigni a partire da quelli preesistenti. Tale fenomeno è un complesso meccanismo in cui la proliferazione, il differenziamento e la migrazione delle cellule endoteliali dei vasi rivestono un ruolo molto importante. E' stato dimostrato che l'ipossia è uno dei principali stimoli in grado di indurre una sovra espressione di VEGF (potente fattore pro angiogenico), tuttavia, molti meccanismi regolatori di VEGF sono ancora da comprendere a pieno.

Cellule endoteliali, progenitori di cellule endoteliali, periciti, cellule muscolari lisce e componenti della matrice extracellulare sono gli attori coinvolti nella sequenza di eventi che porta alla nascita di un nuovo capillare.

Il meccanismo dell'angiogenesi è molto complesso ed è caratterizzato da diversi stadi ben definiti, riassunti in Figura 2.26.

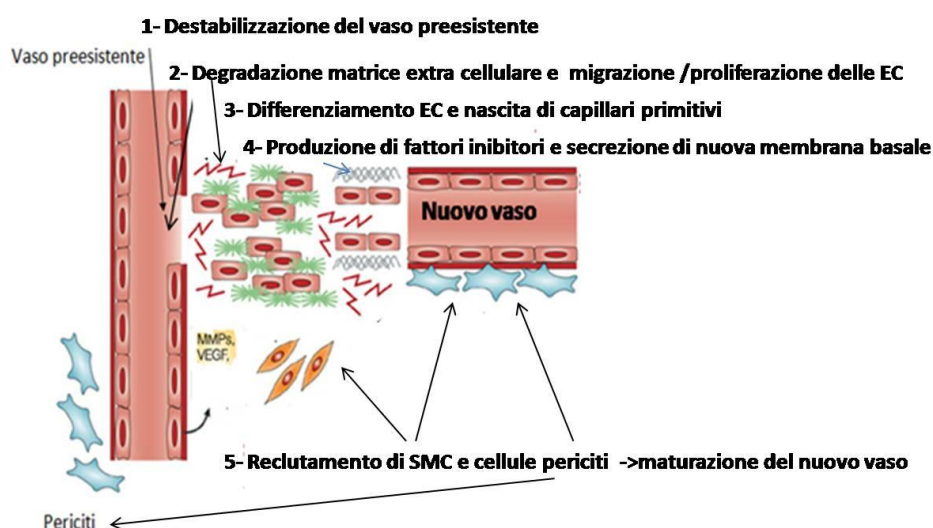


Figura 2.26 Rappresentazione schematica del processo di angiogenesi. (1) La prima fase prevede una destabilizzazione del vaso preesistente con distacco delle cellule endoteliali, (2) segue la degradazione della matrice extracellulare indotta dalle MMPs, tale degradazione permette alle EC di migrare e proliferare verso la zona dove si svilupperà il nuovo vaso. (3) Successivamente vi è un differenziamento delle cellule EC che vanno a costituire il nuovo capillare. (4) La quarta fase è caratterizzata da un rilascio di fattori inibitori che bloccano la proliferazione e la migrazione di EC e vi è una secrezione di nuova membrana basale. (5) L'ultima fase, infine, prevede il reclutamento delle cellule di supporto quali cellule muscolari e periciti e quindi la maturazione del nuovo vaso. EC: cellule endoteliali; SMC: cellule muscolari lisce.

All'inizio dell'angiogenesi si verifica una prima fase di destabilizzazione dei vasi preesistenti dovuta ad un aumento della permeabilità vasale e alla perdita delle connessioni tra le cellule endoteliali e le cellule di supporto (periciti e cellule muscolari lisce) con

conseguente destabilizzazione delle pareti del vaso Segue una seconda fase di migrazione delle cellule endoteliali nella regione del tessuto dove è necessaria la formazione di nuovi vasi. Nel corso di tale fase, vengono liberati vari enzimi proteolitici come le metalloproteasi che degradando la matrice extracellulare facilitano la migrazione delle cellule endoteliali. In seguito a tale degradazione le cellule endoteliali sono indotte a proliferare grazie agli stimoli di diversi fattori di crescita come VEGF e angiopoietine. Il terzo stadio dell'angiogenesi corrisponde al differenziamento delle cellule endoteliali ed è caratterizzato dalla formazione di capillari primitivi. La quarta fase è caratterizzata da un rilascio di fattori inibitori, quali ang2, che bloccano la proliferazione e la migrazione di EC e vi è una secrezione di nuova membrana basale. L'ultima tappa di maturazione è la stabilizzazione dei nuovi capillari accompagnata dal reclutamento delle cellule di supporto, quali SMC e periciti, per comporre il nuovo vaso maturo [55].

Nel 2002 Kuwahara e colleghi [36] hanno voluto valutare l'angiogenesi prodotta da ipossia indotta su di un'aorta di topo mediante una parziale costrizione meccanica del vaso. Il tipo d'ipossia, così generata, è nota con il termine di "ipossia stagnante". L'ipossia stagnante può essere dovuta al ristagno del sangue in un tessuto a monte di una ostruzione che ne impedisce il deflusso provocando così un progressivo impoverimento in nutrienti ed ossigeno.

Dopo 3, 7, e 28 giorni di ipossia sono state prelevate sezioni di aorta del topo e sono state sottoposte ad analisi immunocitochimiche per la valutazione dell'angiogenesi. Per le analisi è stato utilizzato un anticorpo specifico per marcare le cellule in proliferazione (BrdU7) e un anticorpo per marcare le cellule endoteliali (vWFactor8).

Mentre per valutare la presenza dei fattori caratteristici dell'ipossia sono stati utilizzati due anticorpi specifici per rilevare l'espressione di HIF-1 α e VEGF. Dalle analisi così condotte, è emerso che già dopo 7 giorni di ipossia, le EC sono proliferate e migrate a formare nuovi vasa vasorum.

In figura 2.27 sono riportati i risultati delle analisi condotte dopo 7 giorni di ipossia, dove è possibile osservare, a livello dell'avventizia, un aumento della proliferazione delle cellule endoteliali con formazione di nuovi vasa vasorum.

⁷ BrdU è un anticorpo specifico per un antigene nucleare che viene esposto durante le fasi replicative del ciclo cellulare.

⁸ Fattore di Von Willebrand è un marcatore per le cellule endoteliali.

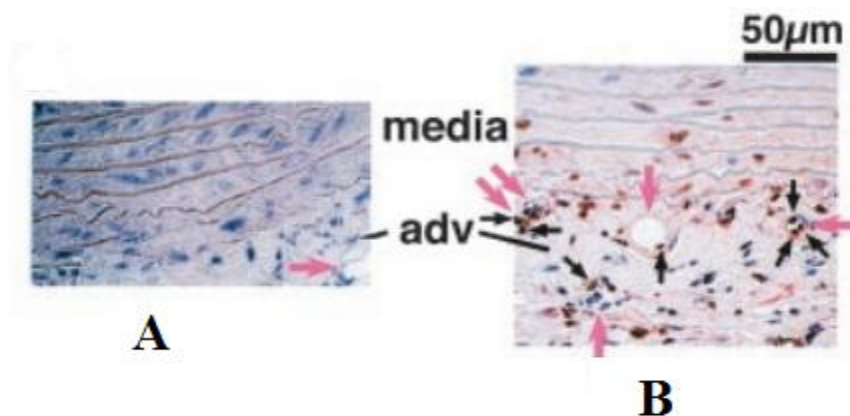


Figura 2.27 Immagine immunohistochemica di aorta di topo per BrdU (Blu) e vW Factor (marrone). (A) Campione al tempo 0, (B) campione dopo 7 giorni di ipossia. Le frecce rosa indicano la presenza di vasa vasorum e le frecce nere le cellule proliferanti. In (B) si nota nell'avventizia un aumento delle cellule proliferanti e dei vasa vasorum rispetto al controllo nativo. Media:tunica media;adv: avventizia. Adattato da [36].

Inoltre dalle analisi immunohistochemiche si è potuto osservare che, a seguito dell'ipossia è stato attivato HIF-1 α con conseguente attivazione di VEGF sia nella media che nell'avventizia del vaso (Figura 2.28).

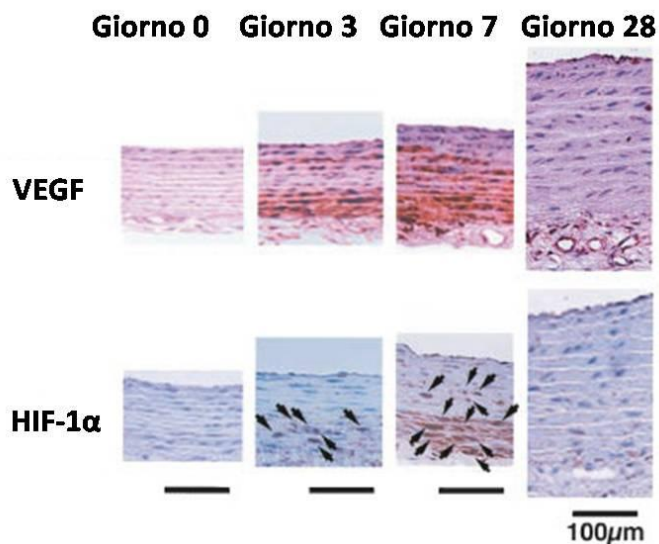


Figura 2.28 Immagini di sezione di aorta di topo sottoposta ad analisi immunohistochemiche per VEGF (sopra) e HIF-1 α (sotto). Prima colonna: sezione di aorta nativa. Seconda colonna: sezione di aorta espianata dopo 3 giorni di ipossia. Terza colonna sezione di aorta espianata dopo 7 giorni di ipossia. Quarta colonna: sezione di aorta espianata dopo 28 giorni di ipossia. Le frecce nere indicano i nuclei cellulari HIF-1 α positivi. Le analisi riportano che all'aumentare dei giorni di ipossia vi è un aumento dell'espressione di HIF-1 α e di VEGF con conseguente nascita dei vasa vasorum. Si nota che al giorno 28 però il segnale di HIF-1 α si spegne, mentre l'angiogenesi termina il suo processo. Adattato da [36].

Il fenomeno dell'angiogenesi può essere considerato un meccanismo di riparo attuato a fronte di una possibile condizione patologica, che, in questo caso, è rappresentata dalla carenza di ossigeno. Nel caso in cui l'angiogenesi non venga adeguatamente attuata si può assistere a cambiamenti che portano a morte cellulare e a un possibile danneggiamento delle strutture tessutali. Alcuni studi hanno infatti dimostrato che l'ipossia può indurre l'apoptosi cellulare: la chiave regolatrice di questo processo è il fattore HIF-1 α che, incrementando la concentrazione di proteine proapoptotiche (BNIP3) e stabilizzando p53 (fattore di trascrizione che regola il ciclo cellulare), stimola l'apoptosi cellulare [54].

L'apoptosi cellulare o morte programmata, a differenza della necrosi (inevitabilmente dannosa per l'organismo) è un processo fisiologico di autodifesa della cellula e, pertanto non innesca nessun tipo di risposta infiammatoria. La morte cellulare per apoptosi è un evento che può coinvolgere anche una singola cellula ed è codificato da un programma genico mediato dalla sintesi di proteine enzimatiche specifiche. Si può dire che l'apoptosi ha inizio dall'attivazione a cascata di alcune proteine chiamate caspasi (proteine presenti in tutte le cellule nella loro forma inattiva) che, a seguito di segnali di diverso tipo, come può essere per esempio una la mancanza di ossigeno, vengono attivate e danno origine ad una serie di eventi molecolari che culminano con la morte cellulare [54].

In una cellula in apoptosi la cromatina viene degradata e condensata, le molecole del DNA vengono via via frammentate e per gemmazioni della membrana cellulare vengono liberati i così detti "corpi apoptotici" che contengono tutti gli organelli cellulari [54].

Nel 2002, Kajino e colleghi [56] hanno pubblicato un lavoro in cui viene osservato che l'ipossia, intesa come una carenza di ossigeno rispetto alle condizioni fisiologiche, può causare apoptosi cellulare. Le analisi biologiche, condotte in questo studio, sono state effettuate su una sezione di un dotto arterioso di un agnello prematuro in cui, a causa di una mutazione genetica, la mancanza di *vasa vasorum* ha provocato una condizione di ipossia nella tunica media del vaso.

Gli autori hanno osservato che questa condizione è stata indotta dal fatto che un vaso che presenta uno spessore della parete maggiore di 0.5mm, come in questo caso, deve estrarre ossigeno sia dal sangue che scorre all'interno del vaso sia da quello proveniente dai *vasa vasorum*. Da ciò ne consegue che una mancanza di una delle due fonti di ossigeno può compromettere la vitalità delle cellule presenti all'interno della parete vascolare.

Per investigare la condizione di ipossia sono state condotte analisi in immunofluorescenza con marker EF5⁹ [57] che permette di rilevare la presenza di cellule che presentano carenza di ossigeno.

Per l'analisi dell'apoptosi cellulare è stato eseguito il saggio fluorimetrico TUNEL¹⁰.

I risultati delle analisi condotte con EF5 mostrano che nella parete media del vaso la mancanza dei *vasa vasorum* ha generato ipossia. Le analisi TUNEL mostrano che le cellule morte per apoptosi sono solo quelle presenti nelle zone media del vaso dove le analisi EF5 hanno precedentemente rilevato ipossia tissutale. Le zone della parete del vaso che non sono risultate positive per le analisi con EF5 sono risultate anche negative per il saggio TUNEL. In Figura 2.29 sono riportate due immagini di una sezione del dotto arterioso in cui nella prima sono state marcate le cellule in ipossia (marcate con anticorpo EF5) mentre nella seconda sono state marcate le cellule in apoptosi (TUNEL). Da queste immagini si evince che nella parete esterna del vaso vi è un'elevata fluorescenza di EF5 (Figura 2.29 A) indicativo del fatto che vi è ipossia cellulare e che nella stessa zona è stata rilevata apoptosi cellulare (Figura 2.29 B).

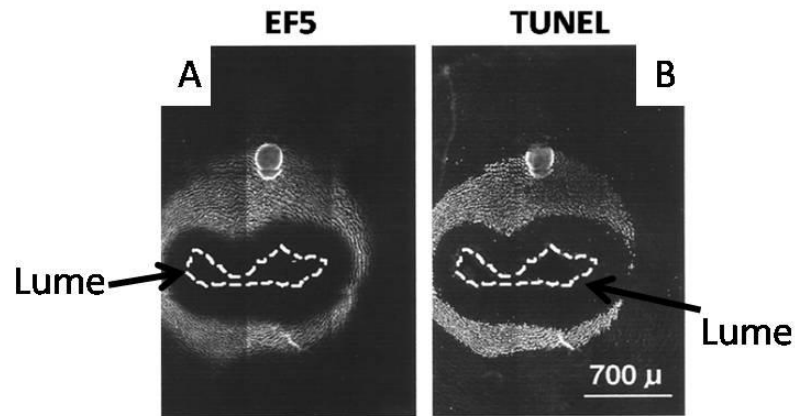


Figura 2.29 Immagini di una sezione del dotto arterioso ottenuta mediante analisi in immunofluorescenza. (A) Marcatura delle cellule in ipossia con anticorpo EF5: le zone chiare indicano la positività per EF5 (B) Marcatura delle cellule in apoptosi mediante saggio TUNEL: le zone chiare indicano le cellule in apoptosi. Si osserva che nella parete del vaso vi sono cellule in ipossia (A) e che nella stessa zona vi è una marcata presenza di cellule in apoptosi (B). La zona tratteggiata rappresenta il lume del vaso. Adattato da [56].

⁹ EF5 è un anticorpo che marca le cellule in ipossia poiché si lega alle cellule che presentano un basso metabolismo cellulare, tale legame viene inibito nel caso in cui vi è un'elevata concentrazione di O₂.

¹⁰ Il saggio TUNEL consente l'individuazione delle cellule in apoptosi mediante colorazione delle estremità dei frammenti del DNA delle cellule apoptotiche.

Va infine detto che l'ipossia può indurre alterazioni anche nel metabolismo cellulare poiché, una riduzione dei livelli di ossigeno nel tessuto fa sì che le cellule debbano procurare ATP mediante il metabolismo anaerobico. Tale meccanismo procura energia alle cellule mediante la degradazione del glucosio ma ha come sottoprodotti una serie di cataboliti acidi tra cui il più importante è l'acido lattico. L'abbassamento del pH, provocato dall'aumento di acido lattico, può avere ripercussioni anche gravi sullo stato di salute delle cellule e quindi sull'intero tessuto.

Sono comunque molti i meccanismi che si possono instaurare in un tessuto a seguito di ipossia; quello che è certo è che se non vengono attuati da parte dell'organismo meccanismi che aumentano la disponibilità di ossigeno, come per esempio l'angiogenesi, il tessuto è destinato a necrotizzare [58].

2.3 Conclusioni

Dall'analisi effettuata in questo capitolo è stato possibile delineare le principali cause che possono concorrere al rimodellamento vascolare della vena safena esposta a condizioni emodinamiche e biochimiche del bypass aorto-coronarico.

Dagli studi condotti con sistemi *ex vivo* in grado di simulare l'ambiente emodinamico arterioso è emerso che un flusso pulsatile, caratterizzato da elevate pressioni ed elevato *shear stress* può provocare sulla vena safena un danno endoteliale con conseguente alterazione dell'omeostasi vasale che provoca migrazione e proliferazione delle SMC nell'intima ed un cambiamento della morfologia della vena caratterizzato da una diminuzione dello spessore della parete ed un aumento del perimetro luminale del vaso: tutti fenomeni che danno origine alla formazione di iperplasia dell'intima.

Dagli studi condotti con modelli *ex vivo* di tipo statico è emerso, inoltre, che l'ambiente biochimico a cui è esposta la vena safena nel bypass provoca anche esso la formazione di neointima: i ricercatori hanno infatti dimostrato che valori di pO_2 arteriosa intra-luminale generano sulla vena uno stress ossidativo con conseguente danno tissutale.

Da un'analisi più approfondita, inoltre, è stato possibile osservare che la mancanza di ossigeno verso la parete vascolare arteriosa può dare origine ad una serie di meccanismi biologici caratterizzati da migrazione, proliferazione e morte cellulare. Nello specifico è stato dimostrato che la carenza di ossigeno provoca l'attivazione del fattore HIF-1 α che è responsabile dell'attivazione del fattore pro angiogenico VEGF. La sovra espressione di

VEGF da origine ad una serie di meccanismi a catena caratterizzati da degradazione dell'ECM, migrazione e proliferazione di EC e formazione di nuovi *vasa vasorum*. Oltre a questo è stato dimostrato che la mancanza dei *vasa vasorum*, deputati a fornire ossigeno e nutrimento alla parete vascolare, provoca ipossia tissutale con conseguente apoptosi cellulare.

A fronte del fatto che condizioni di ipossia possono provocare rimodellamento vascolare è di grande interesse capire se gli stessi avvenimenti biologici, riscontrati nei vasi arteriosi, sono presenti anche nella vena safena a seguito dell'intervento di bypass aorto-coronarico poiché, una migliore comprensione di questi meccanismi spigherebbe, in maniera più completa, il fenomeno del VGD che si verifica nel bypass a seguito dell'intervento.

Nel capitolo successivo verranno descritti i materiali e metodi utilizzati per condurre lo studio del rimodellamento vascolare indotto, su segmenti di vena safena, dall'ambiente biochimico tipo bypass.

3. Materiali e metodi: prove su banco del sistema di coltura e campagna sperimentale con segmenti di vena safena umana.

In questo capitolo, dopo una breve descrizione del sistema di coltura ex vivo utilizzato per la campagna sperimentale, verrà descritto il percorso di ottimizzazione e messa a punto del modulo deossigenante, per il quale sono state condotte 2 tipologie di prove: prove a circuito aperto e prove con ricircolo del fluido. Successivamente verrà descritta lo studio sperimentale condotto presso il LIT su campioni di vena safena umana mantenuti in coltura nel sistema ex vivo.

3.1 Obiettivi del lavoro

L'obiettivo del presente lavoro di tesi è lo studio dell'effetto dell'ambiente biochimico del bypass aorto-coronarico (caratterizzato da una pO_2 intra-luminale arteriosa ed una carenza di O_2 nella regione extra-avventiziale, causata dalla perdita dei VV durante l'*harvesting* dell'intervento di bypass) sul rimodellamento vascolare del graft venoso.

Il fine ultimo di questo progetto è quindi il raggiungimento di una comprensione completa dei meccanismi cellulari alla base del rimodellamento vascolare del graft a seguito del sua trasposizioni in ambiente biochimico differente

A seguito di un accurata analisi dello stato dell'arte (*capitolo 2*) è emerso, infatti, che un minore apporto di ossigeno alla parete vascolare di vasi arteriosi provoca un rimodellamento caratterizzato principalmente da ispessimento della media e dell'avventizia, fenomeni angiogenici, apoptotici e dalla formazione di iperplasia dell'intima. Inoltre, è anche stato evidenziato che una pO_2 intra-luminale, maggiore rispetto al valore fisiologico venoso ($pO_2=5\%$, pari a 38 mmHg), può generare sulla parete vascolare uno stress ossidativo che può essere dannoso per il tessuto.

Per la realizzazione di questa campagna sperimentale campioni di vena safena umana sono stati mantenuti in coltura, per 7 giorni, all'interno di un sistema *ex vivo* in grado di simulare l'ambiente biochimico del bypass e di mantenere quindi la regione intra-luminale del vaso ad una pO_2 pari al 21% e la regione extra-avventiziale ad una pO_2 pari al 5%.

Questo sistema, realizzato in un precedente lavoro di tesi [59] svolto presso il Laboratorio di Micro e Biofluidodinamica Sperimentale (μ BSLab) del DEIB (Dipartimento di Elettronica, Informazione e Bioingegneria) del Politecnico di Milano, oltre ad essere in

grado di simulare l'ambiente biochimico del bypass (vedi sopra) è in grado di generare diversi ambienti biochimici (intesi come differenti pO_2 del terreno di coltura) tra cui: l'ambiente biochimico venoso, caratterizzato da una pO_2 intra-luminale pari al 5% ed extra-avventiziale pari al 21% e l'ambiente biochimico standard, caratterizzato da una pO_2 intra-luminale ed extra-avventiziale pari al 21%, utilizzato in tutti in modelli *ex vivo* per lo studio del VGD. Il presente lavoro di tesi è stato condotto in due parti: la prima parte del lavoro è stata realizzata presso il μ BSLab del DEIB del Politecnico di Milano dove sono state effettuate prove su banco per la messa a punto del modulo deossigenante del sistema di coltura *ex vivo*. La seconda parte del lavoro, invece, è stata svolta in collaborazione con il gruppo di ricerca del Laboratorio di Ingegneria Tissutale Cardiovascolare (LIT) dell'I.R.C.C.S. Centro Cardiologico Monzino e, si è incentrata sulla messa a punto di campagne sperimentali su campioni di vena safena umana coltivati all'interno del sistema di coltura *ex vivo* (prima citato). All'interno di questa campagna sperimentale sono stati delineati 3 gruppi sperimentali, all'interno dei quali sono stati studiati gli effetti rispettivamente dell'ambiente biochimico del bypass, dell'ambiente biochimico standard ed infine dell'ambiente biochimico venoso. I risultati parallelamente ottenuti sono stati poi confrontati tra di loro.

3.2 Sistema di coltura *ex vivo*

Il sistema di coltura *ex vivo*, utilizzato in questo studio sperimentale, consiste in un sistema di stimolazione per vasi sanguigni che, tramite l'utilizzo di una camera di coltura bi-compartimentale, permette di mantenere distinti l'ambiente intra-luminale del vaso, da quello extra-avventiziale. Tale configurazione, schematizzata in Figura 3.1, risulta ottimale per potere esporre le due regioni a condizionamenti differenti.

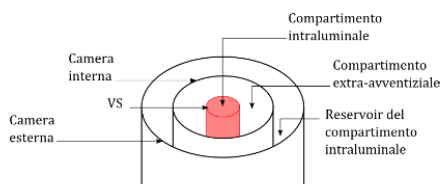


Figura 3.1 Rappresentazione in sezione degli elementi che realizzano la compartimentazione della camera di coltura: la camera interna va a realizzare il compartimento extra-avventiziale, la camera esterna costituisce il reservoir del compartimento intra-luminale. Adattato da [59].

Questo sistema consta di 3 componenti principali: una camera di coltura, un modulo ossigenante e un modulo deossigenante.

La camera di coltura è composta da due camere concentriche e da un tappo che garantisce la chiusura ermetica di tutta la camera. La camera più interna contiene il vaso e costituisce il reservoir per l'avventizia mentre la camera più esterna funge da reservoir per il compartimento intra-luminale. In Figura 3.2 è riportata una fotografia dei componenti della camera di coltura.

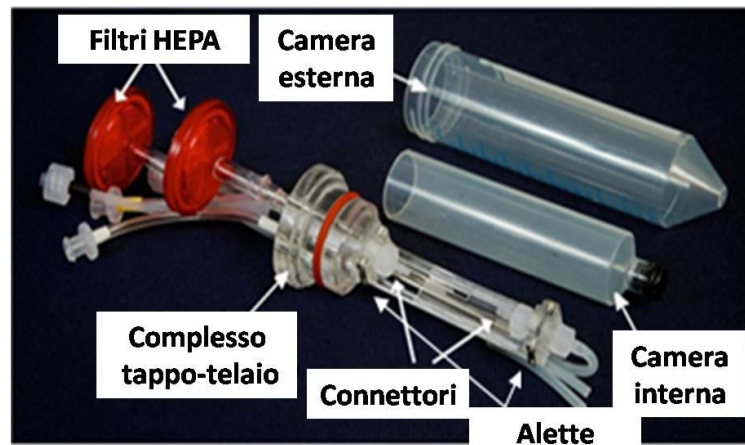


Figura 3.2 Fotografia degli elementi che costituiscono la camera bi-compartimentale. Si notano la camera esterna, la camera interna e il telaio portavaso saldamente attaccato al tappo della camera di coltura. A livello del complesso tappo-telaio si notano, inoltre, 2 filtri HEPA (posti per il mantenimento della pressione atmosferica all'interno dei due compartimenti). Nel telaio porta-vaso vi sono i connettori per calzare il vaso che viene ancorato ad essi mediante l'utilizzo di vessel loop (successivamente bloccati attorno alle alette metalliche presenti nel porta vaso). Infine si notano i tubi per la connessione con il modulo ossigenante e deossigenante. Adattato da [59].

Nella camera interna viene posta la vena, che in posizione verticale, viene calzata su i connettori presenti nel telaio portavaso mediante dei *vessel loop* (ancorati al telaio attraverso delle alette metalliche). Nel telaio portavaso vi sono degli alloggiamenti per le cannule che servono come condotti per il medium che entra/esce dalla camera. L'estremità superiore del telaio è saldamente incollata con colla acrilica al tappo della camera.

Il posizionamento della camera interna avviene per incastro nella parte interna del tappo che è dimensionata appositamente al fine di creare interferenza con il diametro interno della camera interna mentre, la camera esterna, realizzata con un tubo falcon da 50 ml (International P.B.I. S.P.A., Milano, Italia), si accoppia con il tappo della camera mediante l'utilizzo di un o-ring posto attorno al tappo.

Il tappo della camera presenta otto fori: due per alloggiare i filtri HEPA (che permettono di mantenere la pressione atmosferica rispettivamente nella camera interna e nella camera esterna) due per l'ingresso e l'uscita del terreno di coltura che scorre all'interno del vaso e altri 4 per l'ingresso e l'uscita del terreno di coltura della camera interna e di quella esterna.

Il modulo ossigenante è composto da un circuito ossigenante realizzato con tubi in silicone (Platinum Cured, Cole Parmer, IL USA) permeabili all'ossigeno (dimensionati in modo tale da garantire una completa ossigenazione del medium che scorre al loro interno) e una pompa peristaltica Watson-Marlow (323 DU, WatsonMarlow Group) con testa pompante 314 D per la movimentazione del medium ossigenato.

Infine il modulo deossigenante è costituito dal deossigenatore, che verrà descritto dettagliatamente nel paragrafo successivo, tubi in silicone rivestiti di PVC (che essendo poco permeabili all'ossigeno consentono di mantenere meglio il livello di deossigenazione ottenuta) ed una seconda pompa peristaltica Watson-Marlow (323 Du, WatsonMarlow Group) con testa pompante 314 D per la movimentazione del medium deossigenato (Figura 3.3).

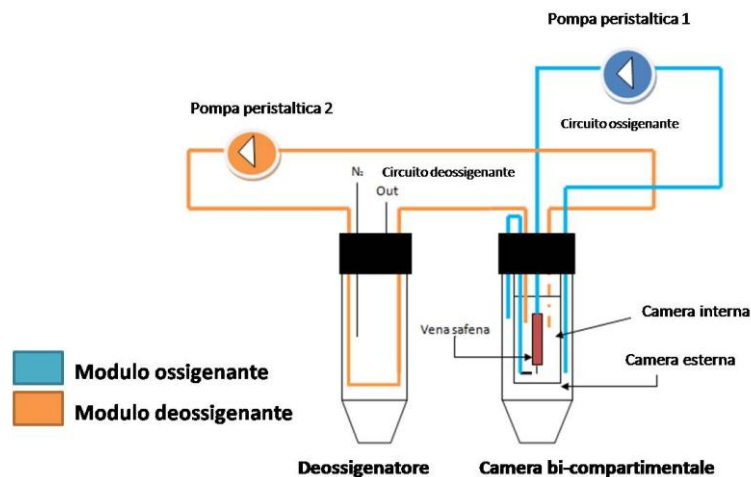


Figura 3.3. Sistema di coltura ex vivo costituito dalla camera bi-compartimentale, il modulo ossigenante (azzurro) e il modulo deossigenante (arancione). La camera bi-compartimentale è composta da due camere concentriche: la camera esterna e la camera interna. La camera più interna contiene il vaso e costituisce il reservoir per l'avventizia mentre la camera più esterna funge da reservoir per il compartimento intraluminal. Il modulo ossigenante è composto da un circuito ossigenante realizzato con tubi in silicone e una pompa peristaltica. Il modulo deossigenante è costituito dal deossigenatore, tubi in silicone rivestiti di PVC ed una seconda pompa peristaltica per la movimentazione del medium deossigenato.

Il sistema così realizzato prevede che il medium contenuto nel reservoir più esterno venga prelevato dalla pompa peristaltica (1), ossigenato attraverso i tubi in silicone, fatto fluire all'interno del vaso e riversato di nuovo nella camera esterna (circuito evidenziato in blu in Figura 3.3) mentre che il terreno di coltura, contenuto nella camera interna, venga prelevato mediante una seconda pompa peristaltica (2), deossigenato e riversato all'interno di essa (circuito evidenziato in arancione in Figura 3.3).

Questo sistema, inoltre, permette di ottenere altre configurazioni che verranno dettagliatamente descritte nei paragrafi successivi.

3.3 Deossigenatore per colture *ex vivo*

Il modulo deossigenante utilizzato per le prove su banco è costituito da una camera, realizzata con una falcon da 50 ml chiusa ermeticamente mediante un tappo che presenta quattro accessi. Due accessi sono collegati ad un tubo in silicone, dedicati all'ingresso del fluido ossigenato e all'uscita del fluido deossigenato, gli altri due accessi, invece, sono dedicati all'ingresso e all'uscita del lato gas (Figura 3.4).



Figura 3.4 Fotografia del deossigenatore. Come è possibile osservare, il deossigenatore è composto dal tappo avente due accessi per il lato gas e due accessi per il lato fluido. Il mezzo di coltura viene fatto fluire all'interno del tubo in silicone attraverso il quale si realizza lo scambio gassoso. Adattato da [59, 61]

Il tubo in silicone, dentro cui scorre il fluido, è l'elemento attraverso il quale si realizza lo scambio gassoso; imponendo nel lato gas del deossigenatore una pO_2 pari a 0 mmHg (iniettando per esempio azoto puro), le dimensioni caratteristiche del tubo in silicone ($D_{int}=0.8$ mm, $D_{ext}=1.6$ mm e $L=40$ cm) garantiscono che un fluido entrante con una pO_2

pari al 21% abbia in uscita una pO_2 pari circa al 5%. Il suo dimensionamento è basato sull'utilizzo di un modello teorico, adattato da un modello precedentemente sviluppato da Orr e Colleghi [58], che prevede che la pO_2 del fluido in uscita dal deossigenatore ($pO_{2\ OUT\ Deoxy}$) sia funzione del livello di ossigeno presente nel medium che entra nel deossigenatore ($pO_{2\ IN\ Deoxy}=160\ mmHg$), della pO_2 presente della camera del deossigenatore ($pO_{2\ GAS}=0\ mmHg$) e della lunghezza (L) del tubo in silicone dentro cui scorre il fluido:

$$pO_{2\ OUT\ Deoxy} = pO_{2\ GAS} - (pO_{2\ GAS} - pO_{2\ IN\ Deoxy}) e^{-\frac{UWL}{\alpha Q}} \quad (1)$$

dove U è il coefficiente globale di scambio di massa che dipende dalle caratteristiche geometriche di permeabilità del tubo, dalle caratteristiche del gas e dal numero di Reynolds. W è la circonferenza media logaritmica dipendente dal diametro interno ed esterno del tubo ed infine α e Q sono rispettivamente il coefficiente di solubilità dell'ossigeno e la portata del fluido entrante nel deossigenatore.

Da questo bilancio di massa, imponendo: $W=0.28$ (ottenuta per un tubo di diametro interno 0.8 mm e spessore pari a 0.8 mm), $\alpha=0.74\ mmHg/\mu m$, $Q=5\ ml/min$ ed $U=2.3\ 10^{-12}$, è stata calcolata la lunghezza caratteristica del tubo attraverso il quale viene effettuato lo scambio:

$$L = -\frac{\alpha Q}{UW} \ln \frac{pO_{2\ GAS} - pO_{2\ OUT\ Deoxy}}{pO_{2\ GAS} - pO_{2\ IN\ Deoxy}} \quad (2)$$

Per una trattazione completa del modello si rimanda a [59, 61].

3.3.1 Messa a punto del modulo deossigenante

Al fine di validare il modello matematico utilizzato per il dimensionamento del sistema di deossigenazione, sono state condotte due tipologie di esperimenti. Nel primo esperimento (prove a circuito aperto) sono state fatte prove caratterizzate dall'assenza di ricircolo del fluido, finalizzate a determinare l'efficacia della deossigenazione in un singolo passaggio del fluido mentre, nel secondo esperimento (prove a circuito chiuso), sono state fatte prove che replicano le condizioni reali di esercizio del deossigenatore, caratterizzate dal continuo ricircolo del medium contenuto nella camera del bioreattore. Queste seconde prove sono state condotte con lo scopo di valutare il comportamento nel transitorio e a regime del sistema deossigenante durante le normali condizioni di esercizio. In entrambi gli esperimenti, in sostituzione del medium, si è utilizzata acqua demineralizzata ed inoltre per termostatare l'ambiente di esercizio le prove sono state condotte all'interno di una stufa

con temperatura pari a 37°C. Per la misura della pO_2 all'uscita del deossigenatore si è ricorsi all'impiego di un sensore di ossigeno (PreSens, Precision Sensing GmbH, Germany) che mediante una patch immersa nel fluido rileva la concentrazione di ossigeno presente. Tale sensore è collegato con presa USB al PC che mediante un apposito software permette di leggere *real time* i valori di pO_2 misurati dal sensore.

3.3.1.1 Prova in assenza di ricircolo

Nel primo esperimento l'obiettivo è stato quello di determinare l'efficacia della deossigenazione in un singolo passaggio del fluido all'interno del deossigenatore. La rappresentazione schematica del setup allestito è mostrata in Figura 3.5.

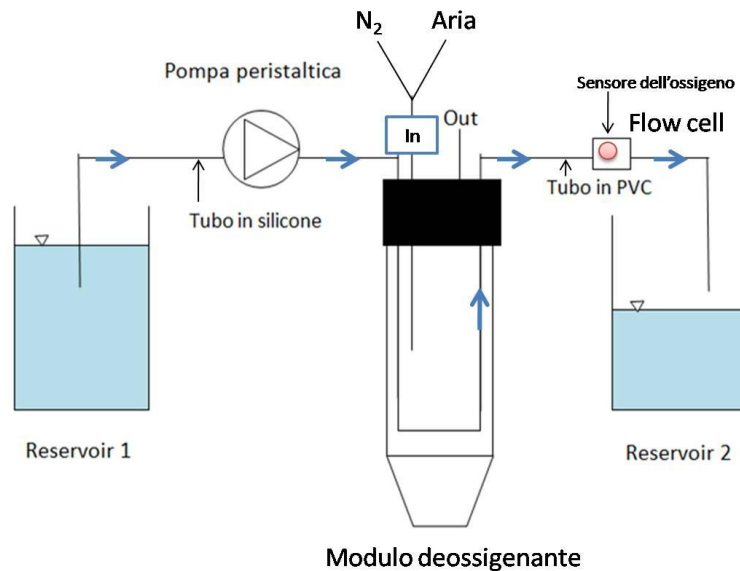


Figura 3.5 Schema di setup allestito per la prova senza ricircolo. Si distinguono il reservoir 1 da cui viene prelevato il fluido di lavoro, la pompa peristaltica, il modulo deossigenante, la flow cell in cui è situato il sensore di misura della pO_2 e il reservoir 2 in cui si riversa il fluido in uscita dal sensore. L'ingresso IN del lato gas del deossigenatore è collegato a due flussimetri, uno collegato alla bombola dell'azoto e l'altro alla bombola dell'aria. Tramite la regolazione dei due flussimetri è possibile regolare la portata di ingresso dell'aria e dell'azoto. Il lato Out del deossigenatore, invece, è mantenuto in atmosfera. I tubi del circuito di mandata sono in silicone mentre quelli di ritorno, per preservare la deossigenazione del fluido, sono in PVC.

Durante la prova l'acqua demineralizzata, lasciata precedentemente ad equilibrarsi in atmosfera, viene prelevata, per mezzo della pompa peristaltica, dal primo reservoir, fatta fluire all'interno del modulo deossigenante, convogliata all'interno di una flow cell, in cui è posizionata la patch per la lettura della concentrazione di O_2 , ed infine versata all'interno

di un secondo reservoir. I tubi del circuito di mandata sono in silicone mentre quelli di ritorno, per preservare la deossigenazione del fluido, sono in PVC. L'ingresso del lato gas è collegato a due flussimetri, uno collegato alla bombola dell'aria mentre il secondo alla bombola dell'azoto. Tramite la regolazione dei due flussimetri è possibile regolare la portata di ingresso dell'aria e dell'azoto.

Gli esperimenti sono stati condotti applicando diversi valori di portata di esercizio: 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 ml/min e, iniettando nel lato gas del deossigenatore azoto puro con una portata pari a 0.3 l/min.

Lo scambio di massa specifico è stato stimato come la differenza tra la pO_2 del fluido in ingresso e la pO_2 del fluido in uscita dal deossigenatore. Infine, lo scambio totale è stato calcolato come il prodotto tra la portata di esercizio e lo scambio di massa specifico. I risultati sono stati poi confrontati con il modello matematico descritto nel paragrafo 3.3.

La prova è stata svolta come segue:

Il setup allestito viene posto all'interno di una stufa per mantenere la temperatura pari a $37^{\circ}C$.

1. Si attiva la pompa peristaltica e si fa ricircolare il fluido per circa un'ora. Questo serve per debollare il circuito e per fare in modo che il sensore di pO_2 arrivi a regime (la lettura della pO_2 viene effettuata per tutta la prova ogni 0.5 min).
2. Si inetta aria all'interno del deossigenatore con una portata pari a 1 l/min e si attende che il valore di uscita dal deossigenatore sia circa pari ad una pO_2 del 21%.
3. Quando il valore di pO_2 si è stabilizzato, si procede a chiudere l'ingresso dell'aria e ad aprire l'ingresso dell'azoto, iniettando all'interno del deossigenatore azoto puro ad una portata di 0.3 l/min e si imposta il primo valore di portata del fluido; sono stati condotti esperimenti a valori crescenti di portata del fluido (0.5, 1, 2, 10, 20 ml/min).
4. Impostando il primo valore di portata del fluido pari a 0.5 ml/min si attende, per circa 1h, il transitorio della prima portata e si procede con i successivi valori di portata.
5. Al termine dell'ultima portata si chiude l'ingresso dell'azoto e si procede a fare fluire aria all'interno del modulo deossigenante attendendo che il valore di pO_2 si riporti al valore iniziale del 21 %.

3.3.1.2 Prova con ricircolo del mezzo

Gli esperimenti a circuito chiuso sono stati condotti per validare il comportamento del sistema deossigenante durante il transitorio e a regime; a tal fine si è cercato di riprodurre nel modo più fedele possibile le condizioni reali di esercizio del sistema caratterizzate dal continuo ricircolo del mezzo all'interno del modulo deossigenante. La camera di coltura (del sistema *ex vivo* descritto al paragrafo 3.2) utilizzata per questa prova è stata privata della camera interna andando a tappare quindi l'ingresso e l'uscita della camera interna.

Il setup allestito per questa prova è mostrato in Figura 3.6.

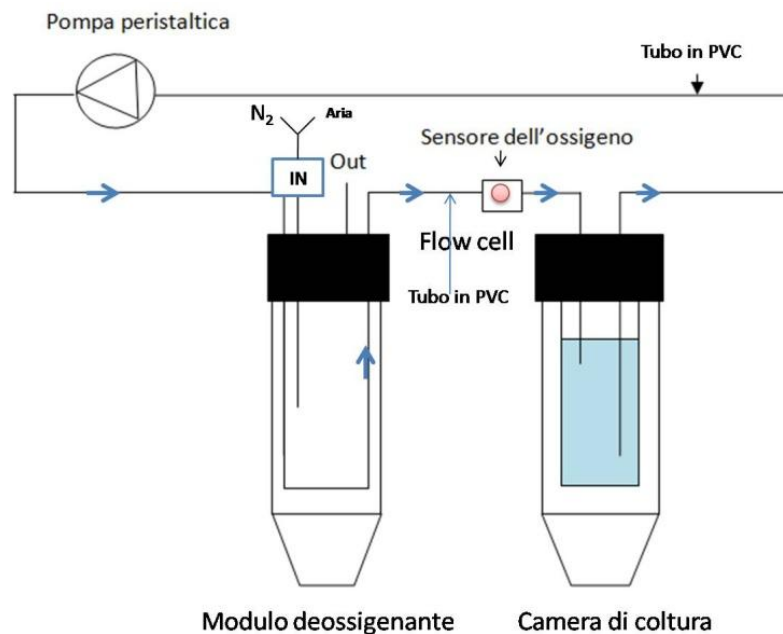


Figura 3.6 Schema di setup allestito per la prova con ricircolo; si distinguono la camera di coltura da cui viene prelevato il fluido di lavoro, la pompa peristaltica, il modulo deossigenante e la flow cell in cui è situato il sensore di misura della pO_2 . Il fluido viene prelevato dalla camera, deossigenato all'interno del deossigenatore, fatto fluire all'interno della flow cell per la lettura della pO_2 e riversato nuovamente all'interno della camera. L'ingresso IN del lato gas del deossigenatore è collegato a due flussimetri, uno collegato alla bombola dell'azoto e l'altro alla bombola dell'aria. Tramite la regolazione dei due flussimetri è possibile regolare la portata di ingresso dell'aria e dell'azoto. Il lato Out del deossigenatore, invece, è mantenuto in atmosfera. I tubi del circuito sono in PVC (per preservare la deossigenazione del fluido).

In questo circuito l'acqua demineralizzata viene prelevata, per mezzo della pompa peristaltica, direttamente dalla camera di coltura, deossigenata attraverso il modulo deossigenante, convogliata nella flow cell per la lettura della pO_2 in uscita dal deossigenatore e quindi riversata nuovamente all'interno della camera di coltura.

L'ingresso del lato gas è sempre collegato ai due flussimetri dell'aria e dell'azoto. I tubi del circuito sono in PVC.

In questa prova è stata misurata la pO_2 del fluido in uscita dal deossigenatore avendo impostato diversi valori di saturazione dell'ossigeno sul lato Gas del deossigenatore (0%, 25%, 50%, 75% e 100%) ed impostando una portata di ricircolo del fluido pari a 5 ml/min. Per ogni livello di saturazione di O_2 , la prova è stata ripetuta tre volte.

I diversi valori di saturazione dell'ossigeno sono stati ottenuti mediante una miscela di N_2 ed aria ottenuta impostando le diverse portate di gas con i rispettivi flussimetri. Per questioni di disponibilità sono stati utilizzati sia per l'aria che per l'azoto flussimetri da 0.8 l/min, i diversi livelli di saturazione imposti durante la prova sono riassunti in Tabella 3.1.

Saturazione dell' O_2	Q (aria)	Q(N_2)
0%	0 l/min	0 l/min
25%	0.2 l/min	0.6 l/min
50%	0.4 l/min	0.4 l/min
75%	0.6 l/min	0.2 l/min
100%	0.8 l/min	0 l/min

Tabella 3.1 Riassunto dei diversi livelli di saturazione di ossigeno ottenuti per la prova. Ogni valore % di ossigeno (prima colonna) è stato ottenuto impostando una portata di aria (seconda colonna) e di azoto (ultima colonna) ed iniettando la miscela di gas, così ottenuta, all'interno del lato IN gas del deossigenatore.

La prova è stata svolta come segue:

Il set up allestito viene posto all'interno della stufa con temperatura pari a 37°C.

- 1) Si attiva la pompa peristaltica con una portata fissa pari a 5 ml/min e si fa ricircolare il fluido per circa un'ora, per attendere che il sensore di ossigeno arrivi a regime (la lettura della pO_2 viene effettuata per tutta la prova ogni 0.5 min).
- 2) Si inietta aria all'interno del deossigenatore con una portata pari a 0.8 l/min e si attende che il valore di uscita dal deossigenatore sia circa pari ad una pO_2 del 21%.
- 3) Quando il valore di pO_2 si è stabilizzato, si procede a chiudere l'ingresso dell'aria e ad aprire l'ingresso dell'azoto, iniettando quindi all'interno del deossigenatore azoto puro ad una portata di 0.3 l/min, ottenendo così una saturazione dell'ossigeno pari allo 0%.
- 4) Si attende che il fluido si deossigeni raggiungendo una pO_2 pari al 5%.

- 5) Raggiunto il transitorio del primo punto, si procede imponendo una portata di aria pari a 0.2 l/min e di azoto pari a 0.6 l/min, ottenendo così una saturazione dell'ossigeno pari al 25%.
- 6) Si attende circa un'ora che il sistema vada a regime e che si stabilizzi ad un valore di pO_2 stabile.
- 7) Si procede così ad impostare la portata dell'aria e dell'azoto pari a 0.4 l/min ottenendo una saturazione dell'ossigeno pari al 50%.
- 8) Attesa di circa un'ora fino a raggiungimento di un nuovo valore di pO_2 stabile.
- 9) Si aumenta la portata dell'aria a 0.6 l/min e si diminuisce quella dell'azoto a 0.2 l/min, ottenendo così una saturazione dell'ossigeno pari al 75%.
- 10) Attesa di circa un'ora per un nuovo valore stabile di pO_2 .

Infine si procede ad impostare la portata dell'aria pari a 0.8 l/min e quella dell'azoto pari a 0 l/min, ottenendo una saturazione dell'ossigeno pari al 100%.

Per l'elaborazione dei dati delle tre prove condotte per ogni valore di saturazione dell'ossigeno, è stata calcolata la media del valore di pO_2 ottenuta all'uscita del deossigenatore in funzione delle diverse pressioni parziali di O_2 imposte sul lato gas.

3.4 Campagna sperimentale su campioni di vena safena

All'interno di questo paragrafo verrà descritta la campagna sperimentale svolta presso il laboratorio LIT. Il sistema di coltura *ex vivo*, utilizzato per le prove sperimentali condotte su segmenti di vena safena umana, è quello descritto nel paragrafo 3.2. Il set up allestito, all'interno della stanza cellule del LIT, è mostrato in Figura 3.7, dove è possibile individuare, all'interno dell'incubatore ($pCO_2=5\%$ e $T=37^\circ C$) la camera bi-compartimentale e il deossigenatore mentre, all'esterno, le due pompe peristaltiche (una per il circuito ossigenante e l'altra per il circuito deossigenante) ed una bombola di azoto collegata al lato gas del deossigenatore. La portata dell'azoto è regolata mediante un flussimetro direttamente collegato alla bombola dell'azoto.

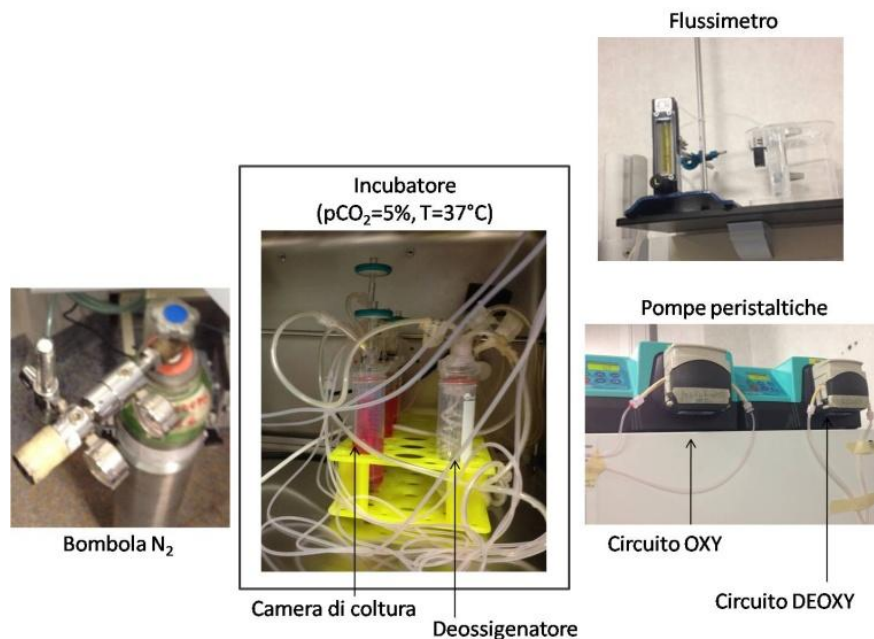


Figura 3.7. Setup allestito per la campagna sperimentale condotta su segmenti di vena safena umana. All'interno dell'incubatore si distinguono la camera di coltura (contente il segmento di vena safena) e il deossigenatore mentre, all'esterno dell'incubatore troviamo: la bombola dell'azoto, le due pompe peristaltiche rispettivamente per la movimentazione del medium ossigenato e per il medium deossigenato ed infine il flussimetro per la regolazione della portata di azoto.

3.4.1 Definizione dei gruppi sperimentali

La campagna sperimentale è stata condotta su segmenti di vena safena umani, divisi in tre gruppi sperimentali (n=4 per ciascun gruppo). I gruppi sperimentali sono così definiti:

- 1) Gruppo sperimentale bypass: le vene assegnate a questo gruppo sono state sottoposte a condizioni biochimiche che simulano le condizioni del bypass aorto-coronarico, ovvero con un valore di pO_2 intra-luminale pari al 21% e una pO_2 extra-avventiziale pari al 5%.
- 2) Gruppo sperimentale standard: le vene assegnate a questo gruppo sono state sottoposte a condizioni biochimiche definite standard, ovvero con un valore di pO_2 intra-luminale e extra-avventiziale pari al 21%. Queste condizioni di coltura sono quelle normalmente utilizzate negli studi su VGD mediante sistemi di coltura *ex vivo*.
- 3) Gruppo sperimentale venoso: le vene assegnate a questo gruppo sono state sottoposte a condizioni biochimiche di tipo venoso, ovvero con un valore di pO_2 intra-luminale pari al 5% e una pO_2 extra-avventiziale pari al 21%.

Per tutti i gruppi sperimentali è stata utilizzato una valore di portata del terreno di coltura del circuito ossigenante e del circuito deossigenante pari a 5 ml/min ed una pressione intra-luminale pari circa a 5 mmHg. Nel gruppo bypass e venoso la deossigenazione del medium è stata ottenuta iniettando nel lato gas del deossigenatore azoto puro, con una portata pari a 30 ml/min. Per il gruppo standard, al fine di ottenere in entrambi i compartimenti un medium avente una pO_2 pari al 21%, il lato gas del deossigenatore è stato mantenuto in atmosfera. In tabella 3.2 è riportato uno schema della suddivisione dei gruppi sperimentali e delle condizioni di prova.

Gruppo sperimentale	Campioni	pO_2 intra-luminale	pO_2 extra-avventiziale
Bypass	SV 131 SV 133 SV 134 SV 136	$pO_2 = 21\%$	$pO_2 = 5\%$
Standard	SV 107 SV 110 SV 117 SV 91	$pO_2=21\%$	$pO_2 = 21\%$
Venoso	SV 136 SV 138 SV 144 SV 147	$pO_2 = 5\%$	$pO_2=21\%$

Tabella 3.2 In tabella è riportata la suddivisione dei 3 gruppi sperimentali: nella prima colonna ritroviamo i nomi dei gruppi sperimentali, nella seconda colonna i campioni appartenenti ai diversi gruppi e in terza e quarta colonna il valore di pO_2 intra-luminale ed extra avventiziale per i 3 gruppi sperimentali.

3.4.2 Protocollo sperimentale della campagna sperimentale

Per ognuno di questi campioni, prima del montaggio all'interno del sistema di perfusione è stato prelevato un segmento di lunghezza pari a 0.5 cm che costituisce, per ogni esperimento, il campione di controllo al tempo zero. Tale tratto è stato immediatamente fissato in paraformaldeide al 4% e incluso in paraffina per le successive analisi biologiche. Tutta la campagna sperimentale è stata eseguita seguendo un protocollo che prevede 4 fasi successive:

i) preparazione del campione di vena safena umana *ii)* assemblaggio della camera bi-compartimentale *iii)* integrazione della camera bi-compartimentale con il circuito ossigenante e il circuito deossigenante *iv)* messa in esercizio del sistema.

Qui di seguito verrà descritte nel dettaglio ogni singola fase.

Fase 1: preparazione del campione

I segmenti di vena safena (SV) sono stati ottenuti dal Dipartimento di Chirurgia Cardiovascolare del Centro Cardiologico Monzino di Milano e prelevati da pazienti sottoposti all'intervento di bypass aorto-coronarico. Per questi esperimenti, l'uso di vene safene umane è stato autorizzato dal Comitato Etico locale e approvato con un consenso informato.

Ogni SV prelevata dalla gamba del paziente, mediante la tecnica *no touch* è stata incannulata dal lato della sua parte distale per identificare la direzione delle valvole a nido di rondine presenti al loro interno e i vasi collaterali sono stati chiusi mediante clip o suture. Il segmento destinato alla ricerca è stato poi posto all'interno di un contenitore sterile contenente terreno di coltura, sigillato e consegnato al personale del LIT.

Nel laboratorio di coltura cellulare, ogni campione è stato pulito dall'eventuale presenza di sangue residuo mediante una perfusione intraluminale con terreno di coltura Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM) e conservato a 4°C in terreno Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM), addizionato con 10% di Siero Fetale Bovino (FBS), 1% di L-glutamine e 1% di penicillina-streptomicina. Ogni campione è stato utilizzato entro 24-48h dal prelievo.

Fase 2: assemblaggio della camera bi-compartimentale

Prima di procedere all'assemblaggio del sistema, la camera di coltura, la camera interna, il deossigenatore e i tubi sono stati decontaminati all'interno di un bagno caldo contenente una soluzione al 0.5% di Anyosime DD1 (Laboratoires Anios, Lille-Hellemmes, France) per circa dieci minuti. Per garantire una maggiore disinfezione dei tubi la soluzione è stata fatta fluire all'interno per mezzo di una siringa con attacco luer. Tutto il materiale è stato poi asciugato con aria filtrata.

Dopo la procedura di decontaminazione, la camera di coltura, la camera interna e il deossigenatore sono stati sterilizzati con ossido di etilene (EtO) presso il reparto di

sterilizzazione del Centro Cardiologico Monzino. I tubi sono stati mantenuti scollegati poiché i connettori luer possono essere punti di accesso per infiltrazioni batteriche e sono stati posti all'interno di apposite scatole di plastica che mantengono la sterilità e poi sterilizzate in autoclave. All'interno dell'autoclave il vapore raggiunge una temperatura di 121° C alla quale le più resistenti spore batteriche vengono distrutte in 5-10 min.

Dopo la fase di sterilizzazione si procede all'assemblaggio dei diversi componenti in ambiente sterile: sotto cappa a flusso laminare.

Per tutti e tre i gruppi sperimentali le procedure di posizionamento del vaso all'interno della camera e l'assemblaggio della camera interna con quella esterna sono comuni.

Come prima cosa la vena viene calzata su i due connettori presenti sul porta vaso della camera, in modo tale che il vaso sia orientato con le valvole interne aperte e sia quindi garantita, durante la coltura, la perfusione dall'alto verso il basso (Figura 3.8 A).

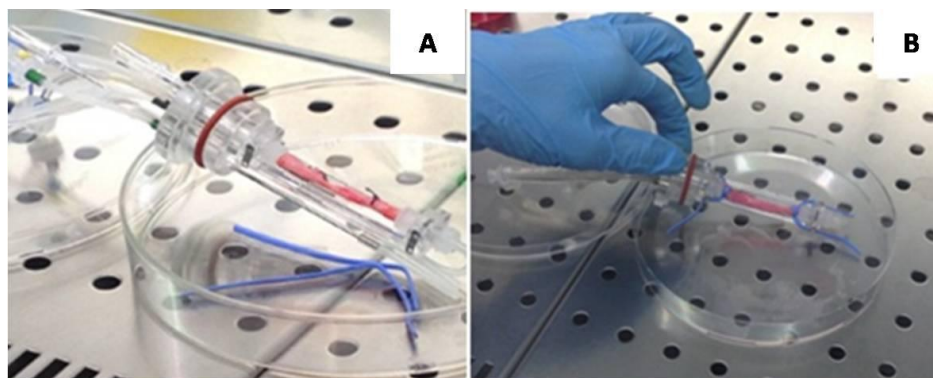


Figura 3.8. (A) La vena viene calzata su i due connettori presenti nel portavaso e successivamente (B) il vaso viene saldamente ancorato ad esso mediante l'utilizzo dei vessel loop (visibili in blu in figura)

Successivamente la vena viene ancorata ai connettori mediante l'utilizzo dei *vessel loop* (Figura 3.8 B), che verranno poi fissati nelle alette metalliche presenti sul porta vaso. In seguito, vaso e porta vaso, così assemblati, vengono inseriti all'interno della camera interna; l'assemblaggio avviene per interferenza (Figura 3.9 A). Infine la camera interna viene messa all'interno di una falcon da 50 ml monouso e sterile (che costituirà la camera esterna) e fissata ad essa mediante l'utilizzo dell'o-ring presente sul tappo della camera di coltura (Figura 3.9 B).

Il passo successivo consiste nel riempimento della camera interna con il mezzo di coltura affinché la vena mantenga la sua vitalità.

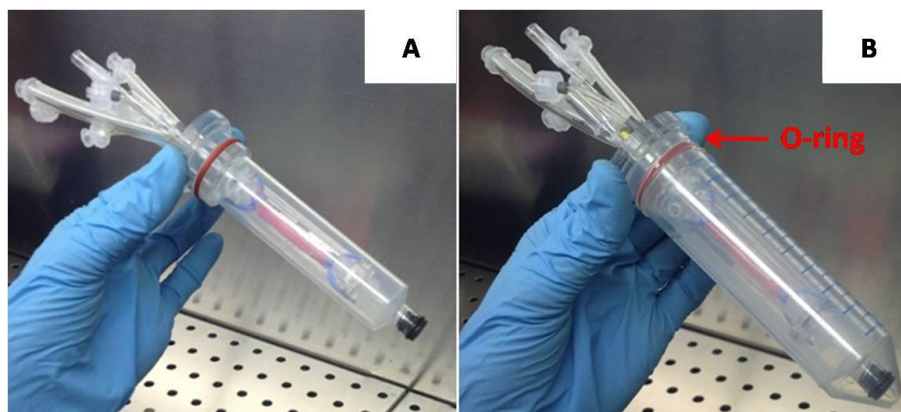


Figura 3.9 (A) Inserimento del portavaso all'interno della camera interna (accoppiamento per interferenza). (B) Inserimento della camera interna all'interno di una falcon (camera esterna) sterile e monouso da 50 ml (accoppiamento con o-ring presente sul tappo della camera).

Fase 3: integrazione della camera bi-compartmentale con il circuito ossigenante, il circuito deossigenante e il deossigenatore

La camera bi-compartmentale così assemblata viene collegata al circuito ossigenante, deossigenante e al deossigenatore. Tale fase risulta differente per i tre gruppi sperimentali poiché si vogliono ottenere condizionamenti biochimici differenti:

- Bypass: pO_2 intra-luminale pari al 21% ed extra-avventiziale pari al 5%
- Standard: pO_2 intra-luminale ed extra-avventiziale pari al 21%
- Venoso: pO_2 intra-luminale pari al 5% e extra-avventiziale pari al 21%

Le configurazioni del circuito adottate per i 3 gruppi sperimentali sono descritte qui di seguito:

Assemblaggio Circuito bypass :

Per il gruppo sperimentale bypass l'assemblaggio dei due circuiti ossigenante e deossigenante viene eseguito seguendo la configurazione mostrata in (Figura 3.10). Tale configurazione prevede che il fluido (intra-luminale) presente nella camera esterna, venga prelevato, mediante la pompa peristaltica, ossigenato (pO_2 pari al 21%), fatto fluire all'interno del vaso e riversato nuovamente nella camera esterna (circuito azzurro). Mentre il medium presente nella camera interna (extra-avventiziale) venga prelevato, mediante una seconda pompa peristaltica, fatto confluire all'interno del deossigenatore, quindi deossigenato (pO_2 pari al 5%) e riversato nuovamente nella camera interna (circuito arancione). Il lato gas del deossigenatore è collegato alla bombola dell'azoto.

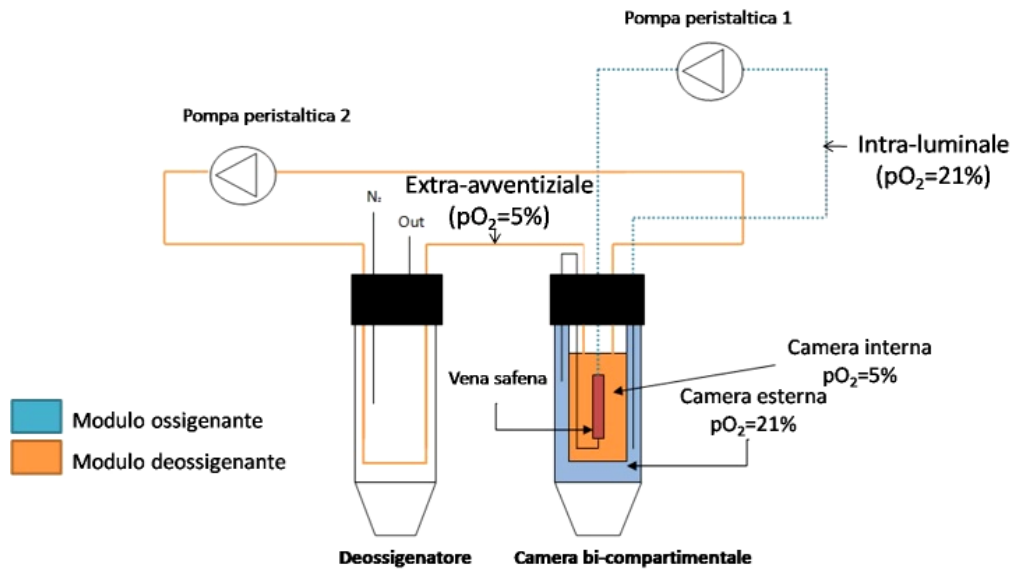


Figura 3.10 Configurazione bypass. Individuiamo in colore arancione il medium deossigenato mentre in azzurro il medium ossigenato. Il fluido (intra-luminale) presente nella camera esterna viene prelevato mediante la pompa peristaltica 1, ossigenato mediante i tubi in silicone e fatto fluire all'interno del vaso (circuitto in azzurro). Mentre il medium (extra-avventiziale) presente nella camera interna viene prelevato mediante una seconda pompa peristaltica, deossigenato e riversato nella camera interna (circuitto arancione)

Assemblaggio circuito standard:

Per il gruppo sperimentale standard l'assemblaggio dei due circuiti ossigenanti viene eseguito mediante la configurazione mostrata in Figura 3.11. Tale configurazione è la stessa utilizzata per il gruppo sperimentale bypass con la variante che nel lato gas del deossigenatore non viene iniettato azoto, ma viene mantenuto in atmosfera (aria) quindi con una pO₂ pari al 21%. Questa variante permette che entrambi i medium (intra-luminale ed extra-avventiziale) abbiano una pO₂ pari al 21%. In figurai i circuiti, essendo entrambi ossigenanti, sono evidenziati in azzurro.

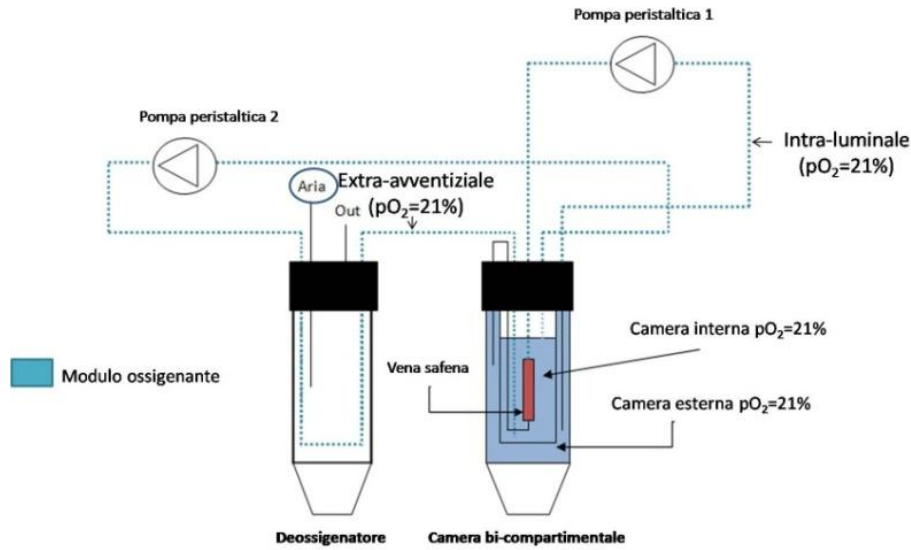


Figura 3.11 Configurazione standard. Si nota che tale configurazione è uguale a quella utilizzata per il gruppo sperimentale bypass con la variante che il lato gas del deossigenatore viene mantenuto in atmosfera per avere anche il medium della parete extra-avventiziale ad una pO_2 pari al 21%. Individuiamo in colore azzurro il medium ossigenato. Il fluido (intra-luminale) presente nella camera esterna viene prelevato mediante la pompa peristaltica 1, ossigenato mediante i tubi in silicone e fatto fluire all'interno del vaso. E così anche il medium (extra-avventiziale) presente nella camera interna viene prelevato, mediante una seconda pompa peristaltica, ossigenato passando attraverso il deossigenatore che contiene aria e riversato nella camera interna.

Assemblaggio circuito venoso:

Per il gruppo sperimentale venoso l'assemblaggio dei due circuiti ossigenante e deossigenante viene eseguito mediante la configurazione mostrata in Figura 3.12. Tale configurazione prevede che il fluido (extra-avventiziale) presente nella camera interna venga prelevato, mediante la pompa peristaltica, ossigenato (pO_2 pari al 21%) e riversato nuovamente nella camera interna (circuito azzurro) mentre, che il medium presente nella camera esterna (intra-luminale) venga prelevato, mediante una seconda pompa peristaltica, fatto fluire all'interno del deossigenatore, quindi deossigenato (pO_2 pari al 5%) e riversato nuovamente nella camera esterna (circuito arancione). Il lato gas del deossigenatore è collegato alla bombola dell'azoto.

Al termine dell'assemblaggio delle circuiterie viene effettuato il riempimento di tutti i tubi e della camera con il terreno di coltura ed infine vengono posizionati i filtri HEPA nella camera bi-compartimentale.

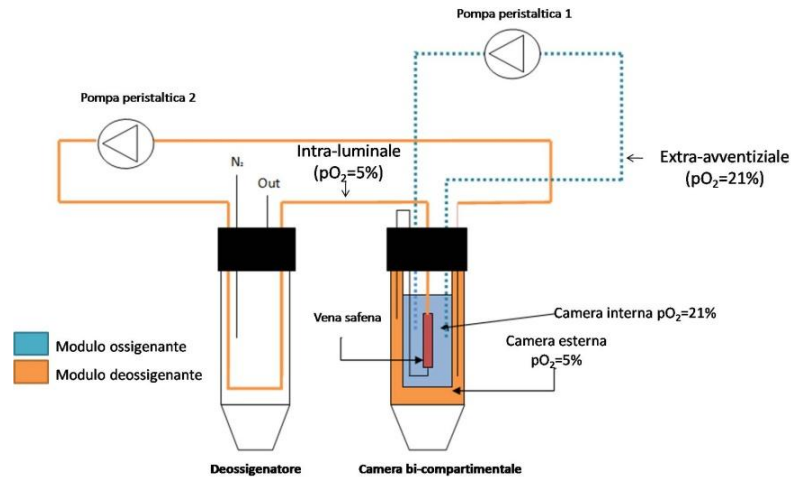


Figura 3.12 Configurazione venoso. Individuiamo in colore arancione il medium deossigenato mentre in azzurro il medium ossigenato. Il fluido (extra-avventiziale) presente nella camera interna viene prelevato mediante la pompa peristaltica 1, ossigenato mediante i tubi in silicone e riversato nuovamente nella camera interna. Il medium (intra-luminale) presente nella camera esterna viene prelevato mediante una seconda pompa peristaltica, deossigenato, fatto fluire all'interno del vaso e, riversato nuovamente nella camera esterna.

Fase 3: messa in esercizio del sistema

Il sistema assemblato, sotto cappa sterile nella configurazione opportuna, non presentando accessi per possibili agenti batterici, viene portato fuori dalla cappa e posto all'interno dell'incubatore ($T^{\circ}=37$ e $CO_2=5\%$). I tubi del sottopompa vengono alloggiati nella apposita sede della testa pompante, il lato gas IN del deossigenatore (per i due gruppi sperimentali bypass e venoso) viene collegato alla bombola d'azoto, impostando una portata pari a 30 ml/min, mentre per il gruppo standard il lato gas IN del deossigenatore viene mantenuto in atmosfera. Entrambe le pompe peristaltiche per la movimentazione del fluido (del circuito ossigenante e del circuito deossigenante) vengono azionate con una portata pari a 5 ml/min (pari a 68 rpm).

Per tutti i campioni dei gruppi sperimentali dopo 3-4 giorni di coltura è stato eseguito un cambio del mezzo di coltura. Il cambio del mezzo è una procedura essenziale durante un periodo di coltura prolungato, infatti garantisce che il tessuto sia mantenuto in vita fornendogli del nuovo nutrimento ed eliminando i cataboliti secreti dalle cellule del tessuto che possono avere un effetto tossico. Per tutti i gruppi sperimentali tale procedura, effettuata sotto cappa sterile, prevede che circa metà del terreno presente nel sistema venga eliminato e ne venga aggiunto di nuovo in ugual misura. Per i due gruppi bypass e venoso il medium deossigenato, contenuto rispettivamente nella camera interna e nella camera esterna, viene eliminato e sostituito con un altro fresco precedentemente deossigenato.

Per deossigenare il terreno necessario al cambio mezzo si mettono 30 ml di terreno DMEM, addizionato con 10% di FBS, 1% di L-glutamine e 1% di penicillina-streptomina, all'interno di una flask, che presenta un filtro che, mantenendo il terreno sterile, garantisce lo scambio gassoso tra l'interno e l'esterno. Successivamente, la flask viene posta in una camera contenente azoto puro, opportunamente realizzata con due accessi sul tappo (per l'ingresso e l'uscita dell'azoto). La flask, al fine di garantire una completa deossigenazione del medium, viene mantenuta all'interno della camera per circa 2-3 giorni.

Al termine del settimo giorno di coltura il sistema viene disassemblato e il campione biologico conservato e preparato per le successive analisi biologiche. Gli elementi entrati in contatto con il campione e con il terreno di coltura, quindi la camera interna, il deossigenatore e la tuberia, vengono decontaminati e sterilizzati seguendo la procedura descritta nella Fase 2 mentre, la camera esterna, essendo monouso, viene eliminata.

3.4.3 Analisi e caratterizzazione biologica dei campioni di vena safena

Dopo sette giorni di coltura, ogni campione di SV è stato immediatamente fissato in paraformaldeide e formalina al 10%, disidratato mediante una scala di alcoli crescente e infine incluso in paraffina (Figura 3.13).



Figura 3.13 Segmento di vena safena incluso in paraffina. Il cerchio arancione indica il segmento di SV che a seguito della solidificazione della paraffina vi è rimasto incluso al suo interno.

Per alcuni campioni, inoltre, dal segmento iniziale è stato ottenuto un secondo segmento di SV che è stato utilizzato, così com'era, per la valutazione della vitalità cellulare del tessuto (mediante il saggio MTT che verrà descritto nel paragrafo successivo).

Dal segmento incluso in paraffina sono state preparate con un microtomo (RM 2145 Leica) sezioni trasversali di spessore pari a 5 μm che sono state immerse in acqua, mantenute per qualche minuto in un bagnetto termostato a 37°C (Figura 3.14) e successivamente disposte su vetrini per microscopia ottica. Il passaggio in acqua viene eseguito per distendere il tessuto. Le sezioni, così preparate, sono state utilizzate per le successive analisi istologiche e in immunofluorescenza. La stessa procedura è stata seguita per ogni rispettivo segmento SV fissato al tempo 0 che viene utilizzato come controllo.

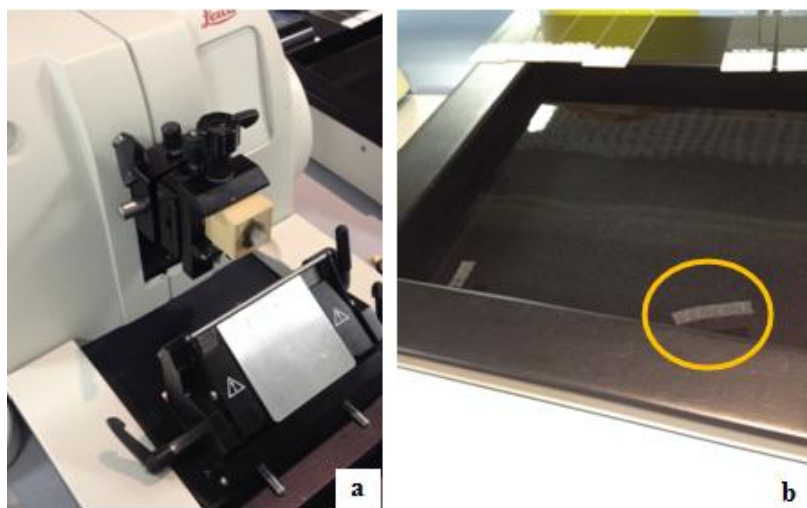


Figura 3.14 Preparazione delle sezioni di vena safena su vetrini per microscopia ottica. (a) Il campione incluso in paraffina viene alloggiato su un apposito supporto per essere tagliato con il microtomo. (b) Le sezioni di spessore 5 μm , così ottenute, vengono immerse per qualche minuto in un bagnetto termostato ($T=37^\circ\text{C}$) e successivamente posizionate sui vetrini per microscopia ottica. Il cerchio giallo indica un esempio di sezioni di un campione SV che sono state tagliate trasversalmente e immerse nel bagnetto.

Al termine del tempo di coltura è stata valutata la vitalità cellulare di alcuni campioni al tempo 0 e al tempo 7 con saggio MTT (3, (4, 5-dimethylthiazol-2), 2, 5-difeniltetrazolium bromide) Sono state inoltre svolte analisi istologiche, con colorazione ematossilina e eosina (H&E) e Tricotomia di Masson, ed analisi in immunofluorescenza (IF) con anticorpo specifico per marcare le cellule muscolari ($\alpha\text{-SMA}$) e per marcare le cellule endoteliali (CD31). Infine, a seguito del fatto che stimoli come l'ipossia possono generare morte e angiogenesi sono state condotte analisi specifiche per quantificare la densità cellulare (a partire da immagini in IF per i campioni bypass e standard e da immagini

istologiche ottenute con colorazione H&E per i campioni venosi), analisi di apoptosi cellulare (saggio TUNEL) ed infine analisi morfometriche per la quantificazione della *Lenght Density* dei *vasa vasorum* (sulla base di immagini istologiche ottenute con colorazioni H&E). Di seguito verranno descritte nel dettaglio le diverse indagini biologiche effettuate.

3.4.3.1 Analisi della vitalità tessutale: saggio MTT

Al termine dei 7 giorni di coltura per i campioni del gruppo bypass e per i campioni del gruppo standard sono state condotte analisi per la vitalità tessutale. La vitalità tessutale è stata verificata sui campioni di SV mediante il saggio MTT (bromuro di 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio). MTT è un saggio colorimetrico standard per la valutazione qualitativa dell'attività mitocondriale degli enzimi che riducono l'MTT conferendo al tessuto un colore blu/violaceo. L'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi (reduttasi) è attivo infatti soltanto nelle cellule vive e la sua funzione consiste nel tagliare l'anello di tetrazolio dell'MTT (sostanza di colore giallo) con la formazione di formazano (un sale blu). Facendo in modo che se vi è vitalità cellulare il tessuto si colora di viola.

Brevemente la polvere di MTT è stata sciolta in PBS ottenendo una concentrazione finale pari a 0.5 mg/ml, una piccola porzione di tessuto tagliato del segmento di vena è stato incubato nella soluzione (MTT e PBS) per un ora (T=37°C) e, il campione di controllo negativo, fissato precedentemente in formaldeide 4%, è stato poi anche esso incubato con soluzione di MTT. Nel controllo negativo è stata indotta morte cellulare e quindi se il saggio funziona correttamente il campione non dovrà colorarsi di viola.

3.4.3.2 Analisi qualitative morfologiche: colorazioni H&E, Tricromia di Masson, immunofluorescenza.

Per le valutazioni morfologiche i campioni sono stati sottoposti ad analisi istologiche e in immunofluorescenza. Per valutare l'integrità e la morfologia del tessuto vascolare, le sezioni appartenenti ai 3 gruppi sperimentali al tempo zero e al tempo sette, sono state colorate con H&E e Tricromia di Masson.

La colorazione con H&E è stata ottenuta immergendo il vetrino prima nella soluzione di ematossilina e, dopo un lavaggio in acqua demineralizzata, nella soluzione di eosina. L'ematossilina colora in blu/violetto i componenti cellulari carichi negativamente, come acidi nucleici, proteine di membrana e elastina. Mentre, l'eosina colora in rosso/rosa i componenti carichi positivamente, come molte proteine cellulari, le proteine mitocondriali e le fibre di collagene. La colorazione con tricromia di Masson è stata ottenuta utilizzando un apposito kit (kit Bio-Optica). Tale metodo colora di nero i nuclei e i gameti, di rosso il citoplasma e le fibre muscolari, di blu le fibre di collagene e di giallo gli eritrociti.

Entrambi i protocolli prevedono che le sezioni, prima della colorazione, siano sottoposte al trattamento per la rimozione della paraffina, mediante immersioni successive del campione in soluzioni con scala decrescente di alcoli, ed, infine, disidratate, mediante soluzioni con scala crescente di alcoli. In appendice A sono riportati in dettaglio i protocolli seguiti per la colorazione H&E e tricromia di Masson.

Per una migliore valutazione dell'organizzazione delle componenti cellulari sono state eseguite analisi in immunofluorescenza. Mediante tale tecnica vengono usati degli anticorpi primari, in questo caso un anticorpo specifico per marcare l' α -actina delle cellule muscolari (SMC) e un anticorpo specifico per marcare la proteina CD31 delle cellule endoteliali (EC) e successivamente viene utilizzato un anticorpo secondario, marcato con fluorocromo, che si lega al rispettivo anticorpo primario.

Brevemente, le sezioni spesse 5 μ m sono state sottoposte al protocollo di rimozione della paraffina, poi allo smascheramento mediante immersione in una soluzione di Tris 10 mM / EDTA 1 mM ad una temperatura di circa 90°C e al bloccaggio mediante incubazione in BSA 5% per 1h. Successivamente sono state incubate per 24h con gli anticorpi primari. In particolare l'anticorpo mouse anti-human α SMA (1:500;cat.M-0851,Dako) è stato utilizzato per marcare le SMC e il goat anti-human CD31 (1:200; cat.sc-1506 Santa Cruz Biotechnology,Inc) per marcare le cellule endoteliali. Il giorno seguente, dopo un accurato lavaggio in PBS 1% per circa 10 minuti, le sezioni sono state incubate per 1h con l'anticorpo secondario Alexa Fluor 488 anti-mouse e Alexa Fluor 546 anti-goat. Infine, per la marcatura dei nuclei cellulari è stato utilizzato DAPI (Vector Laboratories, CA, USA), un intercalante del DNA.

3.4.3.3. Stima della densità cellulare

La valutazione della densità cellulare, dei campioni bypass e standard, è stata condotta a partire da immagini ottenute in immunofluorescenza. La densità cellulare è stata calcolata sulle 3 diverse tuniche (tunica intima+media longitudinale, tunica media circonferenziale e tunica avventizia) della parete vascolare di ogni campione SV al tempo 0 e al tempo 7.

E' stata inoltre stimata la densità cellulare totale su tutta la parete vascolare degli stessi campioni SV al tempo 0 e al tempo 7.

La densità cellulare è stata calcolata come il rapporto tra il numero totale di cellule presenti nell'area (A) espressa in mm²:

$$\text{Densità cellulare} = \frac{\sum_{i=1}^n \text{cellula}}{A}$$

Qui di seguito è riportata la procedura per la conta del numero di cellule e per il calcolo dell'area.

Per la valutazione quantitativa della densità cellulare dei campioni, i preparati sottoposti a colorazione in immunofluorescenza (α -SMA/DAPI) sono stati osservati al microscopio a fluorescenza con ingrandimento 10X. e per ogni campione sono state acquisite 4 immagini che virtualmente suddividono la sezione in 4 quadranti (Figura 3.15).

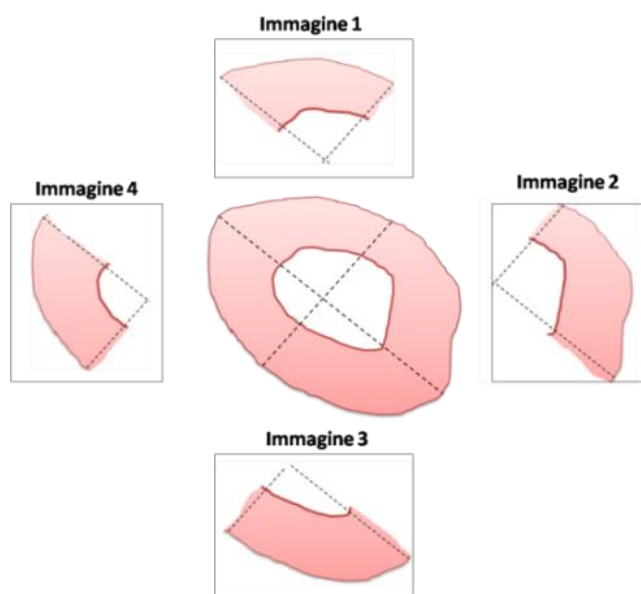


Figura 3.15 Schema esemplificativo del metodo utilizzato per sezionare l'immagine di ogni campione SV. Partendo dalle immagini IF (α -SMA/DAPI), ottenute con microscopio a fluorescenza, l'intera sezione di vena è stata virtualmente divisa in 4 quadranti. Su ognuna delle 4 immagini ottenute è stata poi calcolata, per le 3 tuniche, la rispettiva densità cellulare.

Per ognuna delle 4 immagini, appartenenti allo stesso campione, sono state ottenute manualmente, mediante l'utilizzo del software GIMP (Version 2.6.12), le tre regioni della parete vascolare rispettivamente riconducibili all'avventizia, la media circonferenziale e l'intima + media longitudinale (Figura 3.16). E mediante il supporto del software Image-J (Versione 1.47, software per Java, National Institutes of Health, USA) è stata calcolata l'area di ogni singola regione, espressa in mm^2 .

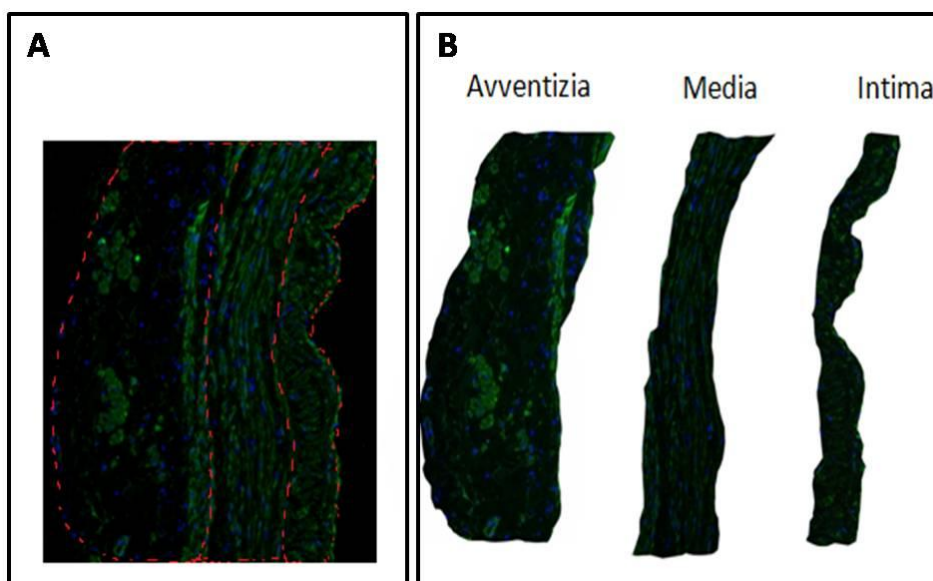


Figura 3.16 Metodo per la suddivisione delle tre tuniche della parete del vaso. (A) Immagine di una sezione di campione SV ottenuta mediante colorazione in immo fluorescenza (α SMA e DAPI) sulla quale sono state delineate manualmente, mediante l'utilizzo del software GIMP, le tre diverse tuniche. (B) Le tre regioni, precedentemente delineate, sono state poi divise tra di loro sempre mediante l'utilizzo del software GIMP. Per ognuna di queste regioni è stata infine calcolata l'area (con il supporto del software Image-J).

Successivamente, dopo il calcolo dell'area, per ogni regione è stata eseguita la conta automatica (mediante il software Image-J) delle cellule presenti; le cellule sono state individuate grazie alla colorazione DAPI che colora di blu i nuclei cellulari (Figura 3.17).

Infine per una corretta stima della densità cellulare è stata calcolata la media di tutte le densità cellulari (riferite ad ogni singola regione) ottenute in ognuna delle 4 immagini dello stesso campione. Mentre, per la stima della densità cellulare totale per ognuna delle 4 immagini sono state sommate tutte le cellule presenti nelle 3 tuniche e le rispettive aree (poi anche in questo caso è stata calcolata la media dei risultati ottenuti da ognuna delle 4 immagini dello stesso campione).

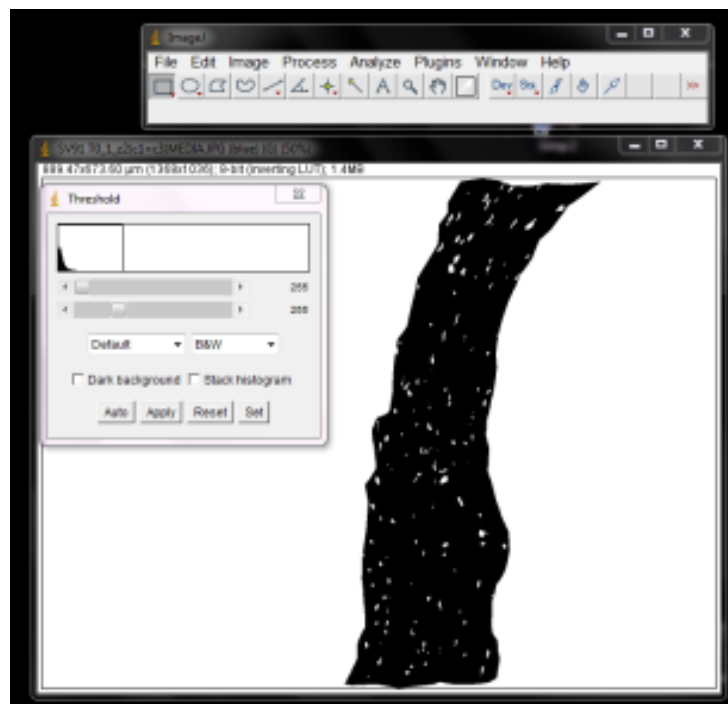


Figura 3.17 Immagine esemplificativa della schermata del software Image-J utilizzato per la conta cellulare automatica. In figura si osserva la tunica media di una sezione di SV sulla quale è stata eseguita la conta cellulare. In bianco i nuclei cellulari che verranno contati dal software.

3.4.3.4 Analisi istologica dell'apoptosi cellulare

Per studiare l'effetto della minore pO_2 a cui è esposta la parete extra-avventiziale dei campioni SV del gruppo bypass è stata condotta l'analisi per l'apoptosi cellulare mediante l'utilizzo del saggio TUNEL (*The DeadEnd Colorimetric Tunel System*). I risultati ottenuti sono stati poi confrontati con i campioni SV del gruppo standard. Il saggio colorimetrico TUNEL sfrutta il fatto che le cellule in apoptosi frammentino il proprio DNA liberando le terminazioni 3'-OH. Tali terminazioni servono come substrato per l'enzima rTdT (terminal deossinucleotidil transferasi ricombinante) che vi trasferisce un nucleotide biotinilato. Successivamente, a questo nucleotide biotinilato viene legato l'enzima HRP (perossidasi di rafano) coniugato a streptavidina. La reazione colorimetrica ha luogo dopo la somministrazione del substrato della perossidasi (perossido di idrogeno e Diaminobenzidine) generando la marcatura marrone delle cellule apoptotiche. Per la colorazione TUNEL si utilizzano campioni inclusi in paraffina, sezionati, sparaffinati e reidratati. Si procede poi con la permeabilizzazione del tessuto incubando le sezioni per 30 min in 20 μ g / ml di Proteinasi K (Gibco BRL) in 10 mM Tris 7.5 e 5 mM di EDTA. Si elimina l'acqua in eccesso sul vetrino con carta assorbente e si effettua la colorazione con

soluzione TUNEL su ogni sezione per 1 ora a 37°C al buio. Al termine della colorazione si esegue una colorazione con ematossilina (per marcare i nuclei cellulari) si pone sulla sezione il montante liquido e il vetrino copri-oggetto e successivamente si pongono i vetrini in incubazione a 37°C per 24 ore. Il controllo positivo viene trattato con DNAsi per indurre la rottura del DNA e avere la conferma che il kit funzioni correttamente, mentre il controllo negativo subisce lo stesso processo degli altri campioni ad eccezione del fatto che non viene trattato con l'enzima che catalizza la reazione e crea il precipitato.

Per l'analisi quantitativa della morte cellulare, i preparati istologici sono stati poi osservati al microscopio ottico Axioskop (Carl Zeiss Microscopy, NY, USA) con ingrandimento 20X. Utilizzando il software Axio Vision per ogni campione sono state acquisite 4 immagini, ad ingrandimento 20X, (che anche in questo caso come per la conta dalle immagini IF) suddividono virtualmente la sezione in 4 quadranti). Queste immagini sono state poi consegnate ad un operatore esperto per la conta del numero totale delle cellule (nuclei marcati con ematossilina e nuclei TUNEL positivi) e del numero di cellule TUNEL positive. Il rapporto tra il numero di cellule TUNEL positive e il numero delle cellule totali fornisce indicazioni quantitative sull'apoptosi cellulare.

3.4.3.5 Analisi immunoistochimiche per la stima della proliferazione cellulare

Per la stima della proliferazione cellulare, lo staff di biologi ha svolto analisi immunoistochimiche dirette contro il marker di proliferazione Ki67 e contestualmente alla colorazione per ki67 le sezioni sono state colorate con ematossilina (per marcare i nuclei cellulari). In appendice A è riportato in dettaglio il protocollo seguito per la colorazione con Ki67.

Le analisi sono state condotte per 3 campioni del gruppo sperimentale bypass e 3 del gruppo standard con i rispettivi campioni al tempo 0.

Successivamente, i preparati sono stati osservati al microscopio ottico Axioskop (Carl Zeiss Microscopy, NY, USA) con ingrandimento 10X e 63X (per ottenere anche immagini dei Vasa Vasorum). La conta cellulare è stata eseguita sulle immagini acquisite ad un ingrandimento 63X (per le sole cellule presenti nei VV) seguendo la stessa procedura di analisi condotta per la stima della morte cellulare. (*paragrafo 3.4.3.4*) Quindi la percentuale di cellule proliferative è stata calcolata per ogni campione come il rapporto tra

il numero delle cellule $ki67^+$ e il numero totale delle cellule (nuclei marcati con ematossilina e nuclei marcati con $ki67$) moltiplicato per 100.

3.4.3.6 Misura della *length density*

Per la valutazione dei fenomeni di angiogenesi indotti dalla minore pO_2 agente sulla parete vascolare, per tutti i campioni SV al tempo 0 e al tempo 7 è stata condotta la misura della *length density*. La misura della *length density* fornisce un'informazione quantitativa sulla distribuzione dei *vasa vasorum* (VV) presenti nell'avventizia di un vaso. Nello specifico, all'interno di questo metodo i *vasa vasorum* vengono classificati in base alla lunghezza dell'asse minore in tre sottoinsiemi: rispettivamente di piccola, media e grande taglia. Confrontando la *length density* di un campione al tempo zero e di un campione a tempo 7 è possibile ricavare informazioni su fenomeni angiogenici; infatti lo sviluppo di *vasa vasorum* di piccola taglia è indicativo del fatto che durante il periodo di coltura sono nati dei VV, mentre un aumento dei VV di media taglia indica che i VV già presenti al tempo 0, a seguito del periodo di coltura, hanno aumentato le proprie dimensioni e così vale per un aumento dei VV di grande taglia. Qui di seguito è riportato il metodo utilizzato per la misura della *length density*.

In seguito alle colorazioni H&E i preparati istologici sono stati osservati al microscopio ottico Axioskop (Carl Zeiss Microscopy, NY, USA) e mediante l'utilizzo del software Axio Vision (Carl Zeiss Microscopy, NY, USA), sono state acquisite, ad ingrandimento 40X, le immagini di tutti i *vasa vasorum* presenti nell'avventizia di ogni singolo campione e, per ogni VV è stato misurato l'asse maggiore e l'asse minore. Successivamente, in base alla lunghezza dell'asse minore di ogni *vasa vasorum* (assunto come diametro del VV), per ogni campione sono state classificate 3 tipologie di *vasa vasorum*:

- VV di piccola taglia: con asse minore compreso tra 4 e 14 μm
- VV di media taglia: con asse minore compreso tra 14 e 24 μm
- VV di grande taglia con asse minore compreso tra 24 e 44 μm

Tutti i *vasa vasorum* con l'asse minore non compreso all'interno del range (4-44 μm) sono stati eliminati automaticamente dalla misura della *length density*. Successivamente, per ognuno di questi 3 intervalli (4-14 μm , 14-24 μm e 24-44 μm) è stata calcolata la *length density* (L_d):

$$L_d = \frac{\sum_{i=1}^n Ri}{Ad}$$

dove R_i rappresenta il rapporto tra l'asse maggiore e l'asse minore del singolo VV ed A_d l'Area dell'avventizia [mm^2].

L'area dell'avventizia, di ogni singolo campione, è stata calcolata partendo dalle immagini di sezioni di SV sottoposte a colorazione H&E e acquisite con microscopio ottico ad ingrandimento 2.5X. Dalle immagini 2.5X, mediante software GIMP (Version 2.6.12), è stata manualmente delineata la sola superficie dell'avventizia e l'area di tale superficie è stata poi calcolata mediante il software Image-J (Versione 1.47 software per Java, National Institutes of Health, USA).

In figura 3.20 è mostrata, a titolo esemplificativo, l'immagine dell'intera sezione di un campione di vena safena acquisita ad ingrandimento 2.5X e due immagini, dello stesso campione, acquisite ad ingrandimento 40X, che riportano due VV presenti nell'avventizia del vaso. Nelle due immagini dei VV sono stati segnati rispettivamente con la lettera **a** l'asse maggiore e con la lettera **b** l'asse minore.

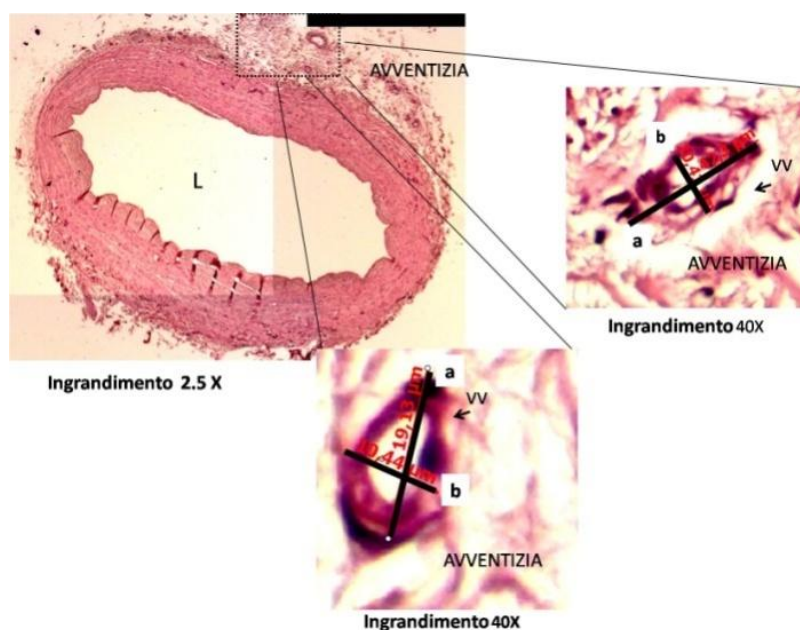


Figura 3.18 Esempio di un'immagine dell'intera sezione di un campione SV, colorato con H&E, ottenuta con microscopio ottico ad un ingrandimento 2.5X e i successivi ingrandimenti (40X) dei vasa vasorum presenti nell'avventizia. Nell'immagini dei vasa vasorum sono stati segnati con **a** l'asse maggiore e con **b** l'asse minore di ogni VV.

4. Risultati

In questo capitolo saranno descritti e discussi i risultati delle prove su banco condotte per la messa a punto del modulo deossigenante. Verranno quindi riportati gli esiti delle prove finalizzate a determinare l'efficacia del deossigenatore in assenza e con ricircolo del fluido. Successivamente, saranno presentati i risultati della campagna sperimentale condotta per lo studio del rimodellamento di campioni di vena safena umana indotto da diverse condizioni di ossigenazione. Inoltre, sarà presentato un modello teorico sviluppato come strumento di supporto all'interpretazione dei dati biologici. Tale modello è stato realizzato per calcolare il profilo di concentrazione dell'ossigeno nella parete di un vaso posto nelle diverse condizioni biochimiche di coltura. Infine verranno riportati i risultati ottenuti dall'applicazione di questo modello.

4.1 Risultati della messa a punto del modulo deossigenante

Al fine di validare il modello matematico di dimensionamento del sistema di deossigenazione, descritto nel paragrafo 3.3 del Capitolo 3, sono state condotte prove in assenza e con ricircolo del fluido: il set up di prova per entrambe le sperimentazioni è riportato ai paragrafi 3.3.1.1 e 3.3.1.2.

Nella campagna sperimentale con configurazione a circuito aperto è stata misurata la pO_2 del fluido in uscita dal deossigenatore al variare della portata di esercizio e imponendo al lato gas del deossigenatore una portata di azoto puro pari a 0.3 l/min. Le portate di esercizio del fluido sono state rispettivamente pari a 0.5, 1, 2, 5, 20 ml/min. Per ogni valore di portata la prova è stata ripetuta per tre volte.

Al termine della prova è stata calcolata la media di tutte le pO_2 registrate in ingresso ed in uscita dal deossigenatore per ogni portata di fluido imposta. Successivamente è stato calcolato lo scambio di massa specifico come differenza tra la pO_2 media registrata all'ingresso e all'uscita del deossigenatore.

I risultati sono riportati in Figura 4.1: quello che si osserva è che all'aumentare della portata di esercizio lo scambio specifico decresce, poiché per portate crescenti, a parità di lunghezza del tubo lungo il quale avviene lo scambio, il tempo di permanenza del fluido nello scambiatore diminuisce.

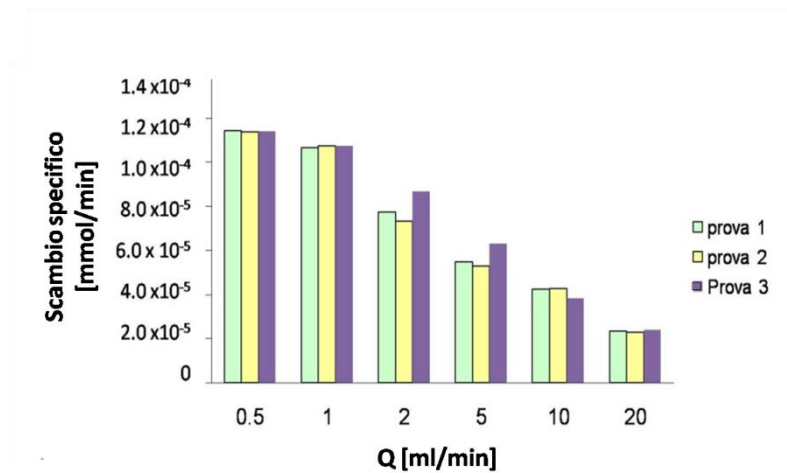


Figura 4.1 Valori dello scambio di massa specifico (espresso in concentrazione di O_2) ottenuti dalle prove in assenza di ricircolo calcolati per ogni portata di esercizio [ml/min]. Per ogni valore di portata la prova è stata ripetuta per tre volte.

I risultati sperimentali sono stati confrontati con i valori teorici di pO_2 in uscita dal deossigenatore, ricavati dall'equazione (1) del modello descritto nel paragrafo.3.3. In Figura 4.2 è riportato il risultato ottenuto dal confronto dei dati sperimentali con il modello teorico: nel grafico è riportato l'andamento dello scambio di massa specifico sperimentale in funzione della portata Q .

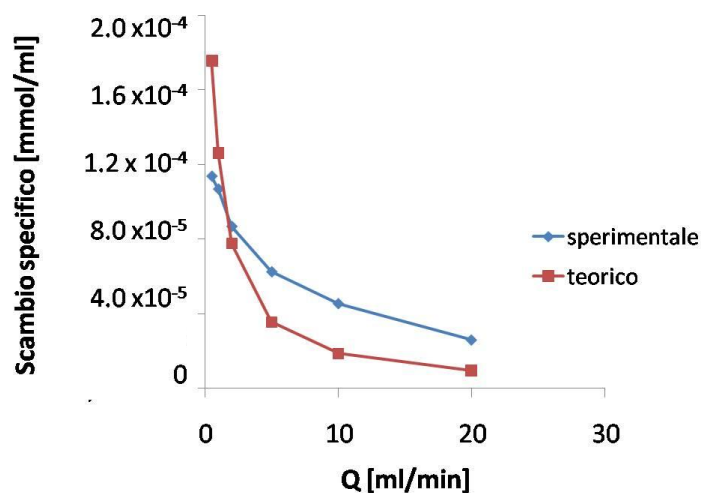


Figura 4.2 Confronto tra il modello teorico (linea rossa) e i dati ottenuti sperimentalmente (linea blu) dello scambio di massa specifico al variare della portata di esercizio del fluido. Si osserva che all'aumentare della portata di esercizio lo scambio di massa specifico diminuisce. Inoltre, si può notare che i dati sperimentali seguono lo stesso andamento di quelli teorici. Tuttavia, per valori di Q inferiori a 2 ml/min l'efficienza del deossigenatore è inferiore rispetto a quella stimata dal modello.

I dati sperimentali sono stati confrontati con il modello teorico anche in termini di scambio di massa totale, calcolato come il prodotto dello scambio di massa specifico per la portata di esercizio (Figura 4.3).

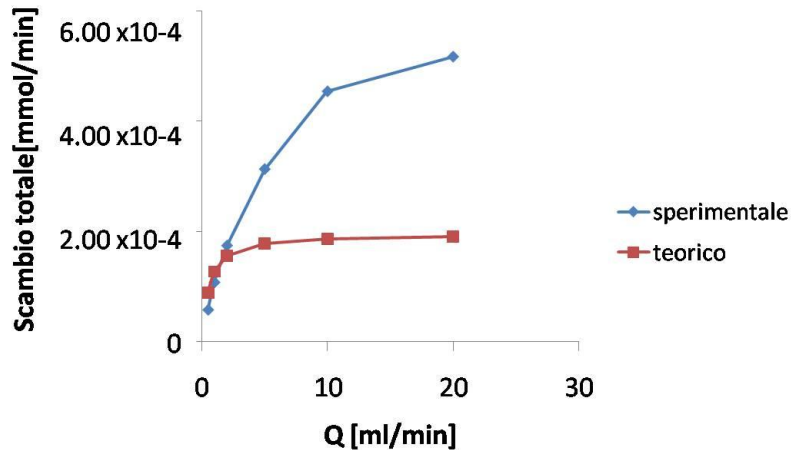


Figura 4.3 Confronto tra il modello teorico (linea rossa) e i dati ottenuti sperimentalmente (linea blu) dello scambio di massa totale al variare della portata di esercizio del fluido. Si osserva che all'aumentare della portata di esercizio lo scambio di massa totale aumenta. Inoltre, per valori di Q inferiori a 2 ml/min l'efficienza del deossigenatore è inferiore rispetto a quella stimata dal modello teorico.

Dal confronto tra i dati sperimentali e i dati teorici (Figura 4.2 e Figura 4.3) è emerso che, come era prevedibile, all'aumentare della portata di esercizio lo scambio di massa specifico diminuisce (Figura 4.2) mentre, lo scambio di massa totale aumenta (Figura 4.3). Inoltre, si può osservare che in Figura 4.2 i dati sperimentali seguono lo stesso andamento dei dati teorici. Infine, in entrambi i grafici, per portate inferiori a 2 ml/min, il deossigenatore è risultato meno efficiente rispetto a quanto predetto dal modello teorico. Tale risultato può essere imputabile alla non idealità del sistema ed all'impossibilità di ottenere a valle della deossigenatore un circuito totalmente impermeabile all'ossigeno. Inoltre, un'altra possibile spiegazione di questo risultato, potrebbe essere legata allo strumento di misura, utilizzato per la lettura della pO_2 , poiché per valori di portata molto bassi, per via della sensibilità del sensore, non sempre è stato possibile rilevare il corretto valore di pO_2 .

Successivamente, per validare il comportamento del sistema deossigenante durante il transitorio e a regime, sono state condotte prove con ricircolo del fluido che simulano le reali condizioni di esercizio del deossigenatore, che verranno utilizzate per la campagna

sperimentale condotta su campioni di vena safena. Per queste prove è stata misurata la pO_2 del fluido in uscita dal deossigenatore avendo imposto diversi valori di saturazione dell' O_2 al lato gas del deossigenatore e mantenendo un'unica portata di ricircolo del fluido pari a 5 ml/min. Nello specifico è stata calcolata la media delle pO_2 registrate in uscita dal deossigenatore alla fine del transitorio, imponendo rispettivamente una saturazione dell' O_2 pari a 0%, 25%, 75% e 100%.

I risultati delle prove hanno messo in evidenza che diminuendo la saturazione dell'ossigeno all'interno della camera deossigenante la pO_2 del fluido, misurata in uscita dal deossigenatore, diminuisce e si stabilizza ad un valore pari al 5% (corrispondente ad una concentrazione di O_2 pari a 5×10^{-5} mmol/ml). I risultati di questa seconda prova sono riportati in Figura 4.4, dove, al fine di rendere più immediata la comprensione, il valore della pO_2 registrata dal sensore di O_2 , al variare della saturazione dell'ossigeno, è stato convertito, mediante la legge di Henry, in concentrazione di O_2 (cO_2).

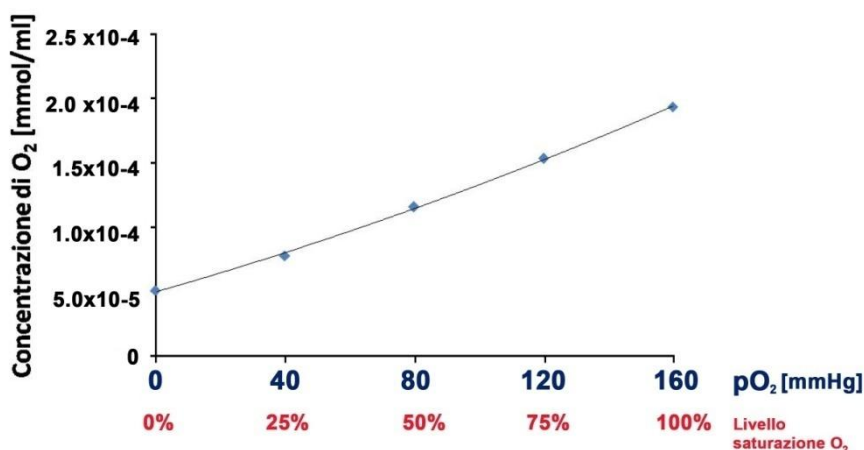


Figura 4.4 Risultati ottenuti dalla prova con ricircolo del fluido. In figura è riportato l'andamento della concentrazione di O_2 , misurata all'uscita del deossigenatore, al variare della saturazione di ossigeno (in rosso) imposta al lato gas del deossigenatore. In blu sono riportati i rispettivi valori della pO_2 espressa in mmHg. Si osserva che all'aumentare della saturazione dell'ossigeno la concentrazione di O_2 in uscita dal deossigenatore diminuisce fino ad un valore pari a 5×10^{-5} mmol/ml (corrispondente ad una pO_2 circa pari a al 5%).

Da queste analisi è emerso che nelle condizioni reali di esercizio il deossigenatore è in grado di deossigenare il fluido in ingresso fino ad una concentrazione di O_2 minima pari a 5×10^{-5} mmol/ml ($pO_2=5\%$).

A fronte dei risultati ottenuti e quindi della validazione del dimensionamento del modulo deossigenante, per la campagna sperimentale condotta su segmenti di vena safena umana si

è deciso di utilizzare il sistema di coltura *ex vivo* imponendo al lato gas del deossigenatore un livello di saturazione dell'O₂ pari allo 0% in modo tale da ottenere un livello di concentrazione di O₂ del medium deossigenato pari a 5×10^{-5} mmol/ml (pO₂=5%).

I risultati della campagna sperimentale, condotta per lo studio del rimodellamento di segmenti di vena safena indotto da differenti condizioni di ossigenazione, sono riportati nel paragrafo successivo.

4.2 Risultati della campagna sperimentale con i campioni di vena safena umana in diverse condizioni di ossigenazione

In questo paragrafo verranno riportati i risultati biologici della campagna sperimentale volta alla analisi degli effetti indotti da diversi valori di pO₂ imposti sulla parete extra-avventiziale o intra-luminale di segmenti di vena safena umana. Le indagini sono state condotte utilizzando il sistema *ex vivo* descritto nel paragrafo 3.2. I campioni di vena safena umana sono stati suddivisi in 3 gruppi sperimentali: n=4 campioni sono stati sottoposti a condizioni di ossigenazione simili al bypass aorto-coronarico (pO₂ intraluminale pari al 21% ed extra-avventiziale pari al 5%), n=4 campioni sono stati sottoposti a condizioni biochimiche di coltura *in vitro* di tipo standard (pO₂ intraluminale ed extra-avventiziale pari al 21%) ed infine n=4 campioni sono stati sottoposti a condizioni biochimiche di coltura di tipo venoso (pO₂ intraluminale pari al 5% ed extra-avventiziale pari al 21%).

Tutti i campioni sono stati mantenuti in coltura per 7 giorni in condizioni di flusso stazionario con portata pari a 5 ml/min ed una pressione intra-luminale pari a 5 mmHg.

Al termine del periodo di coltura, per una prima valutazione della vitalità cellulare, tutti i campioni del gruppo bypass e del gruppo standard sono stati sottoposti a saggio MTT. Successivamente, per tutti i campioni sono state condotte analisi qualitative morfologiche con colorazione H&E e tricromica di Masson. Per i soli campioni del gruppo bypass e standard sono state condotte analisi in immunofluorescenza (per marcare le cellule muscolari lisce, le cellule endoteliali e i nuclei cellulari) dalle quali è stata successivamente valutata la stima della densità cellulare nelle diverse regioni della parete del vaso e su tutta la parete vascolare. Per i campioni venosi, invece, la stima della densità cellulare è stata effettuata a partire dalle immagini istologiche sottoposte a colorazione H&E e valutata su tutta la parete vascolare. I campioni bypass e standard inoltre, sono poi stati sottoposti ad

analisi qualitative e quantitative per l'apoptosi cellulare (saggio TUNEL) e ad analisi immunoistochimiche (Ki67) per la valutazione della proliferazione cellulare. Infine, al fine di valutare i fenomeni angiogenici, per tutti i campioni appartenenti ai tre gruppi sperimentali è stata eseguita la misura della *length density* dei *vasa vasorum* presenti nell'avventizia di ogni campione

In tabella 4.1 è riportata la sintesi delle analisi svolte per i diversi campioni.

Gruppo sperimentale	Campioni	MTT	H&E	Masson	IF	Densità cellulare	TUNEL	Ki-67	Length density
Bypass	SV 131	X	X	X	X	X	X	X	X
	SV 133	X	X	X	X	X	X	X	X
	SV 134	X	X	X	X	X	X	X	X
	SV 136	X	X	X	X	X	X	X	X
Standard	SV 107	X	X	X	X	X	X	X	X
	SV 110	X	X	X	X	X	X	X	X
	SV 117	X	X	X	X	X	X	X	X
	SV 91	X	X	X			X	X	X
Venoso	SV 136		X	X					X
	SV 138		X	X		X			X
	SV 144		X	X		X			X
	SV 147		X			X			X

Tabella 4.1 Tabella riassuntiva delle analisi svolte sui campioni SV al tempo 0 e al tempo 7.

4.2.1 Analisi della vitalità cellulare dei vasi: saggio MTT

Per la valutazione della vitalità cellulare dei campioni standard e venosi è stato condotto il saggio MTT su anelli di vena safena; i risultati sono stati confrontati con un campione nativo (fissato) e uno nativo non fissato.

Dalla colorazione dei segmenti di vena safena, ottenute mediante il saggio MTT, si è potuto osservare che il campione nativo, prelevato al tempo 0, conserva la vitalità cellulare mentre, nel campione bypass, dopo 7 giorni di coltura, è stato osservato un minore coinvolgimento dell'attività mitocondriale delle cellule del tessuto, dato indicativo di una possibile morte cellulare. Infine, anche nel campione standard sono state osservate, seppure in maniera meno evidente rispetto al campione bypass, delle zone del tessuto in cui vi è una minore vitalità cellulare. In Figura 4.5 sono riportate 4 immagini ritenute significative del comportamento osservato in quasi tutti i campioni bypass e standard (dove le zone di minore vitalità cellulare sono indicate dalle frecce nere). Le immagini riportate sono state

ottenute da colorazione MTT di 2 segmenti di SV di un campione nativo, rispettivamente controllo negativo (tessuto fissato) e controllo positivo (tessuto nativo) (Figura 4.5–A, B), di un segmento di campione bypass (SV 134) (Figura 4.5-C) e di un segmento di campione standard (Figura 4.5–D).

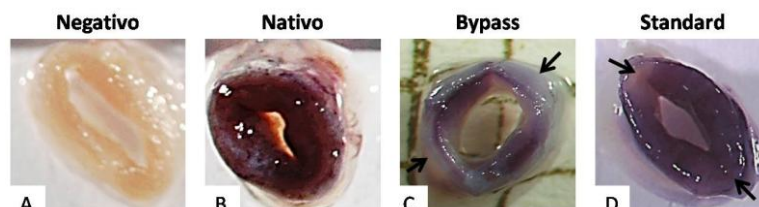


Figura 4.5 Immagini di segmenti di vena safena umana, ottenute al microscopio ottico. (A) Controllo negativo, in cui è stata indotta morte cellulare, (B) campione nativo, (C) campione del gruppo bypass, (D) campione standard, sottoposti a saggio MTT. Si osserva per il campione nativo una completa vitalità cellulare del tessuto mentre nel campione bypass e in parte nel campione standard emergono delle zone del tessuto (indicate con le frecce nere in C-D) che non si sono colorate indice del fatto che alcune cellule potrebbero essere morte.

Successivamente, per valutare quale zona della parete del tessuto sia coinvolta nel processo di morte cellulare, lo stesso campione bypass (SV134), mostrato precedentemente in Figura 4.5-B, è stato sezionato al fine di ottenere la regione luminale separata dalla parete più esterna del vaso: da questa seconda analisi si è potuto apprezzare che la parete interna del vaso, se paragonata a quella più esterna presenta una migliore vitalità cellulare. Infatti, come è possibile osservare in Figura 4.6-A la parete luminale del campione ha un colore viola più intenso (indicato dalle frecce verdi) rispetto alla parete esterna del vaso (Figura 4.6-B, indicato dalle frecce rosse) che presenta ancora delle zone di viola più tenue.

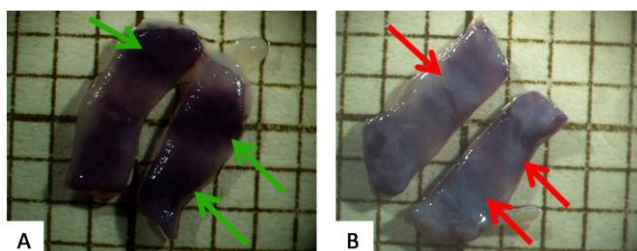


Figura 4.6 Immagini di un segmento di vena safena del campione SV 134 bypass: il segmento è stato sottoposto a colorazione MTT e, successivamente, sezionato al fine di ottenere la parete luminale (A) separata da quella più esterna (B). Le frecce verdi indicano le zone vitali mentre, le rosse le zone non vitali. Si osserva che la parete esterna presenta una colorazione viola tenue indice del fatto che vi sono delle cellule morte.

4.2.2 Analisi morfologiche qualitative: colorazione H&E, tricromica di Masson e immunofluorescenza

Dalle colorazione H&E delle sezioni dei campioni di vena safena si è potuto osservare che in tutti i campioni SV (appartenenti ai 3 gruppi sperimentali), dopo 7 giorni di coltura, l'integrità tessutale del vaso è preservata e in nessuna delle immagini istologiche acquisite sono state osservate zone fibrotiche o segni di degenerazione tessutale. Dall'analisi dei campioni appartenenti al gruppo bypass, confrontati con i campioni nativi, è emerso che i campioni del gruppo bypass mostrano (a livello qualitativo) una diminuzione delle cellule muscolari nella media del vaso ed un aumento dei *vasavascularum*. Nell'avventizia In Figura 4.7 sono riportate 6 immagini istologiche di sezioni trasversali di SV ritenute significative del comportamento osservato. Le immagini sono state ottenute dalle sezioni trasversali di un campione nativo (Figura 4.7-A, B,C) e dalle sezioni trasversali di un campione del gruppo bypass (Figura 4.7-D, E, F), sottoposte a colorazione H&E ed acquisite utilizzando il microscopio ottico con ingrandimento pari a 2.5X, 10X e 20X (da sinistra verso destra). Dal confronto tra il campione del gruppo bypass (Figura 4.7-D) e il campione nativo (Figura 4.7-A) emerge che l'organizzazione strutturale della parete appare preservata e che l'avventizia risulta integra anche dopo 7 giorni di coltura. Dall'analisi qualitativa delle immagini acquisite ad ingrandimento superiore è emerso che nel campione del gruppo bypass vi è una diminuzione delle SMC della tunica media del vaso (zona delineata con tratteggio nero, in Figura 4.7 E) ed un aumento in numero e in dimensione dei *vasa vasorum* presenti nell'avventizia (indicati in Figura 4.8-E dalle frecce nere). Inoltre, l'immagine del campione del gruppo bypass, ottenuta ad ingrandimento 20X (Figura 4.7-F) conferma l'ipotesi di una diminuzione delle SMC nella tunica media presenti nella parete vascolare.

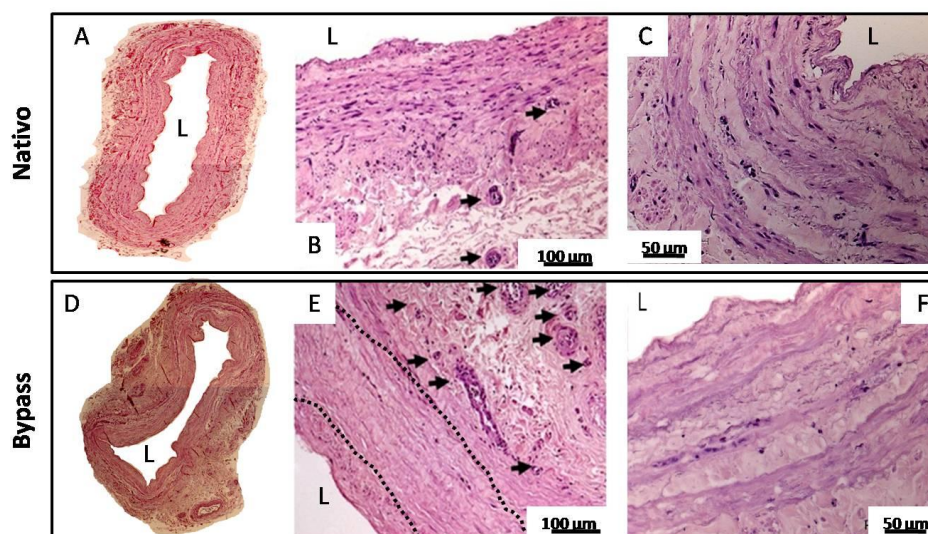


Figura 4.7 Immagini ottenute al microscopio ottico, ad ingrandimento 2.5X (A-D), 10X (B-E) e 20 X (C-F) di sezioni trasversali di vena safena umana sottoposte a colorazione H&E. (A, B, C): campione nativo; (D, E, F): campione del gruppo bypass. L: lume. Si osserva per il campione del gruppo bypass un aumento in numero ed in dimensione dei vasavasorum presenti nell'avventizia (indicati dalle frecce nere in E) ed una diminuzione delle cellule nella media del vaso (zona delineata dalle due linee tratteggiate in E). Anche nell'immagine ottenuta ad ingrandimento superiore (F) si osserva una diminuzione delle cellule nella parete del vaso.

Le immagini ottenute con colorazioni tricromica di Masson di segmenti di vena safena umana nativa e condizionati per replicare le condizioni di bypass mostrano che, dopo 7 giorni di coltura, i segmenti venosi nel complesso mantengono la struttura caratteristica della parete vascolare: le SMC e le fibre di elastina mostrano un andamento circonferenziale, la matrice extra cellulare non presenta anomalità o crescita abnorme e non si osserva un aumento o diminuzione dello spessore della parete del vaso (Figura 4.8).

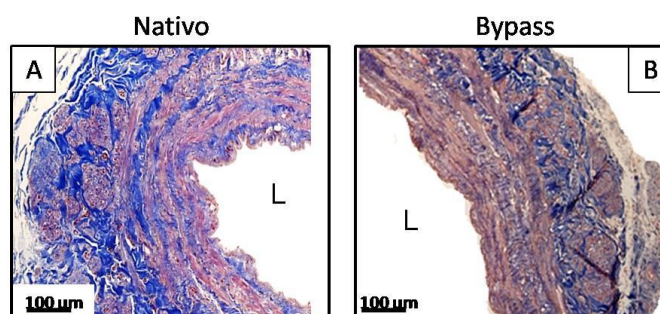


Figura 4.8 Immagini di sezioni trasversali di vena safena umana sottoposte a colorazione tricromica di Masson ottenute con microscopio ottico ad ingrandimento 10X. (A) campione nativo, (B) campione bypass. L: lume. Si osserva, dopo 7 giorni di coltura in condizioni di bypass, il mantenimento della struttura caratteristica della parete del vaso: le SMC e le fibre muscolari mantengono il loro allineamento circonferenziale e non si notano degenerazioni o crescita abnorme di ECM.

Dall'analisi dei campioni coltivati in condizioni standard, condotte con colorazione H&E e tricromica di Masson, rappresentate in Figura 4.9, è emerso che, anche in queste condizioni di coltura, tutti i campioni mantengono le strutture caratteristiche tipiche della parete del vaso. Le immagini sono state ottenute da sezioni di SV di un campione nativo (Figura 4.9-A, B, C) e di un campione del gruppo standard (Figura 4.9-D, E, F) ed acquisite utilizzando il microscopio ottico, impostando un ingrandimento pari a 2.5X e 10X. Dai preparati istologici si può osservare che la parete vascolare del campione del gruppo standard, confrontato con il campione nativo, si mantiene integra, le SMC mantengono il loro allineamento circonferenziale e l'avventizia risulta preservata. Infine, è possibile osservare a livello dell'intima del vaso del campione standard un lieve danneggiamento dello strato endoteliale caratterizzato dal distacco di alcune cellule endoteliali presenti nel lume del vaso (evidenziate dalle frecce nere in Figura 4.9-E); per una migliore valutazione di questo fenomeno è necessario condurre indagini in immunofluorescenza per marcare nello specifico le cellule endoteliali. I risultati di questa analisi sono riportati nei paragrafi successivi.

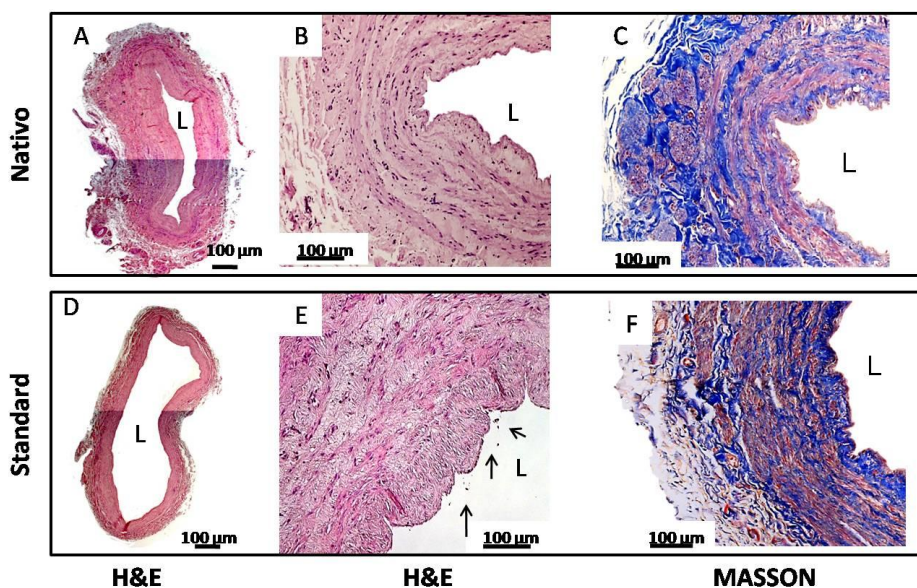


Figura 4.9 Immagini ottenute al microscopio ottico ad ingrandimento 2.5X (A-D) e 10X (B-C-E-F), di sezioni di vena safena umana sottoposte a colorazione H&E e tricromica di Masson. (A-B-C): campione nativo, (D-E-F) campione standard. L: lume del vaso. Si osserva che il campione del gruppo standard, dopo 7 giorni di coltura, mantiene la struttura caratteristica della parete del vaso: l'avventizia risulta preservata e le SMC sono correttamente allineate in direzione circonferenziale. Si osserva inoltre, nel campione standard (E) un danneggiamento dello strato endoteliale caratterizzato dal distacco di alcune cellule endoteliali (evidenziate dalle frecce nere).

Infine, dalle analisi dei campioni trattati in condizioni venose, condotte con colorazione H&E e tricromica di Masson è emerso che, a differenza di quanto è stato osservato nei campioni del gruppo bypass, non si osserva nessun rimodellamento vascolare. Da un'analisi qualitativa, si può infatti osservare che le SMC sono ancora presenti a livello della tunica media e non si riscontra un aumento dei *vasa vasorum* nell'avventizia (Figura 4.10-D, E). Inoltre la struttura caratteristica della parete del vaso è preservata e le SMC e le fibre muscolari hanno il corretto allineamento in direzione circonferenziale. Dalle immagini ottenute ad un ingrandimento superiore, è possibile osservare il mantenimento delle fibre muscolari tipiche della tunica media (evidenziate dalla freccia nera in Figura 4.10-F) ed una corretta organizzazione della parete del vaso con il mantenimento delle cellule SMC longitudinali (evidenziata da un rettangolo tratteggiato in Figura 4.10-F) e delle SMC circonferenziali nella media del vaso.

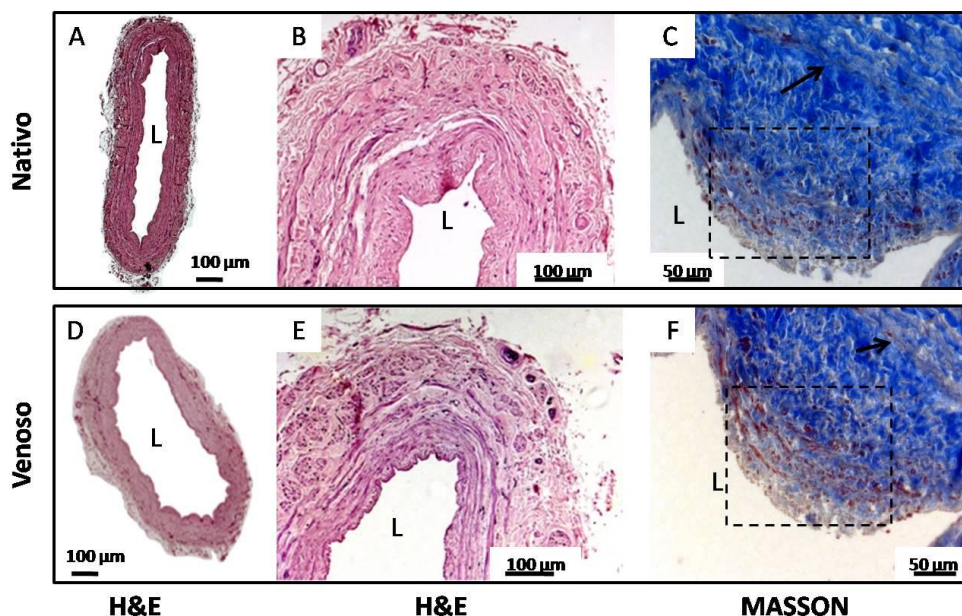


Figura 4.10 Immagini ottenute al microscopio ottico ad ingrandimento 2.5X (A-D), 10X (B-E) e 20 X (C-F) di sezioni di vena safena umana sottoposte a colorazione H&E e tricromica di Masson. (A-B-C): campione nativo, (D-E-F), campione venoso, L:lume del vaso. Si osserva il mantenimento della integrità della parete vascolare con un arrangiamento circonferenziale delle fibre muscolari e SMC tipiche della media (freccia nera in F) e il mantenimento delle cellule SMC longitudinali (rettangolo tratteggiato in F).

Da una prima analisi puramente qualitativa è stato osservato che i campioni del gruppo bypass mostrano una diminuzione delle cellule della tunica media ed un possibile aumento in numero e dimensione dei *vasa vasorum* a livello della tunica avventizia. Per quanto riguarda, i campioni del gruppo standard è stato osservato che nel complesso mantengono

la struttura caratteristica della parete vascolare e che nell'intima si ha un modesto danneggiamento dello strato endoteliale. Infine, dal confronto dei campioni del gruppo venoso con i rispettivi campioni nativi non è stato riscontrato nessun tipo di rimodellamento.

A fronte dei risultati ottenuti, per una migliore valutazione dell'organizzazione delle componenti cellulari (principalmente cellule muscolari lisce ed endoteliali) nei campioni del gruppo bypass e standard sono state svolte analisi in immunofluorescenza (IF). Le indagini sono state condotte utilizzando un anticorpo specifico per marcare l' α -actina delle cellule muscolari (α -SMA) e un anticorpo specifico per il fattore CD31 delle cellule endoteliali; in entrambi i casi per la colorazione dei nuclei cellulari è stato utilizzato il DAPI (agente intercalante del DNA). Mediante questa tecnica, le cellule muscolari vengono colorate di verde, quelle endoteliali di rosso e i nuclei cellulari di blu. Dalle colorazioni in immunofluorescenza è emerso che nei campioni dei gruppi bypass e standard (tempo 7 giorni), rispetto ai campioni nativi (tempo zero), vi è una diminuzione delle cellule presenti nella parete del vaso. In Figura 4.11 sono riportate 6 immagini istologiche di segmenti SV ritenute rappresentative del comportamento osservato. Le immagini riportate sono ottenute da sezioni trasversali di SV di un campione nativo (Figura 4.11-A, D), di un campione del gruppo bypass (Figura 4.11-B, E), e di un campione del gruppo standard (Figura 4.11-C, F), sottoposte a colorazione in immunofluorescenza (α -SMA, CD31 e DAPI) ed acquisite al microscopio a fluorescenza, ad ingrandimento pari a 10X. Dall'analisi delle immagini dei campioni del gruppo bypass si osserva una diminuzione del numero di cellule a livello della tunica media (evidenziate dalle frecce bianche in Figura 4.11-B) e il mantenimento delle SMC a livello dell'avventizia del vaso (Figura 4.11-B). Inoltre, dalle immagini ottenute con la marcatura CD31 si può osservare che lo strato endoteliale è preservato (indicato dalle frecce rosse in Figura 4.11-E). Dall'analisi delle immagini dei campioni del gruppo standard si osserva una diminuzione delle cellule presenti nella tunica media e nella tunica avventizia (indicato dalle frecce bianche in Figura 4.11-C) ed inoltre, come è emerso anche dalle indagini condotte con H&E, si osserva una diminuzione delle cellule CD31 positive a livello dell'intima del vaso (evidenziate dalle frecce rosse in Figura 4.11-F).

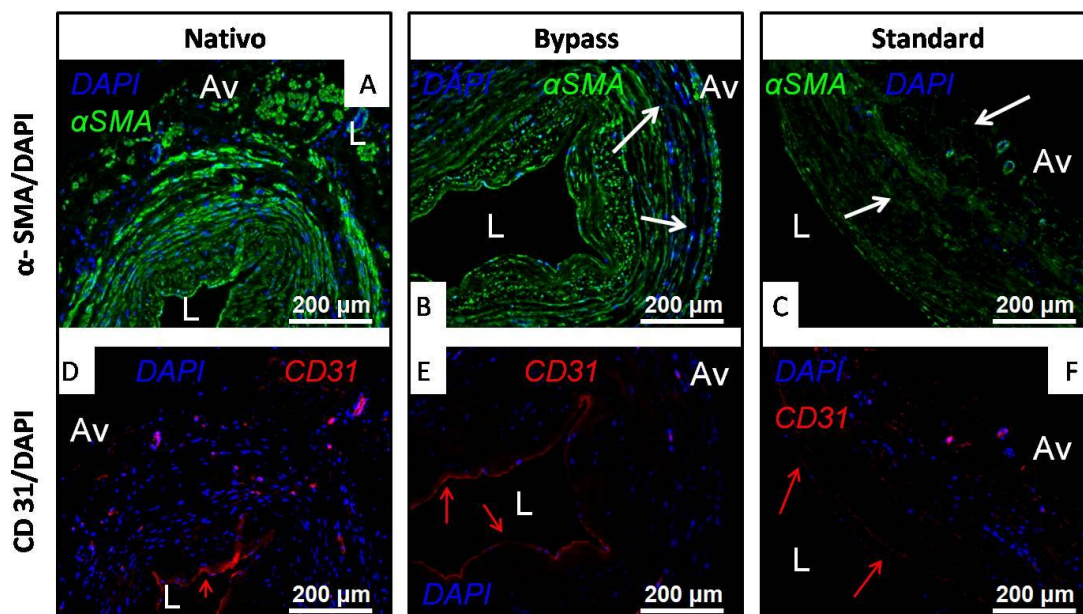


Figura 4.11 Immagini di sezioni di vena safena umana ottenute al microscopio a fluorescenza ad ingrandimento 10X, sottoposte a analisi in immunofluorescenza per marcare le cellule SMC con anticorpo α -SMA (in verde), le cellule endoteliali con anticorpo CD31 (in rosso) e i nuclei cellulari con DAPI (in blu). L:lume; AV: avventizia del vaso. (A-D) campioni nativi, (B-E) campioni bypass, (C-F) campioni standard. Dalle immagini dei campioni bypass si osserva che vi è una diminuzione delle SMC nella media (evidenziato dalle frecce bianche in B), inoltre, dell'immagine condotta con CD31, si evince che nei campioni bypass lo strato endoteliale risulta preservato (evidenziato dalle frecce rosse in E). Le immagini dei campioni standard mostrano una diminuzione delle SMC in tutta la parete del vaso (evidenziate dalle frecce bianche in C) e delle EC a livello del lume del vaso (evidenziate con le frecce rosse in F).

4.2.3 Stima della densità cellulare

Dopo avere osservato, dalle analisi precedenti (H&E e IF), una diminuzione delle cellule presenti nella parete vascolare dei campioni bypass e standard è stata condotta un'analisi quantitativa di questo fenomeno. Per la quantificazione della densità cellulare sono state utilizzate le sezioni utilizzate per le analisi in immunofluorescenza. Dalle immagini ottenute dalle analisi in immunofluorescenza, seguendo il metodo riportato nel paragrafo 3.4.3.3, sono state calcolate, mediante la conta automatica del software Image-J, le cellule presenti nelle diverse tuniche del vaso (tunica intima + cellule muscolari in direzione longitudinale, tunica media con cellule muscolari in direzione circonferenziale e tunica avventizia) e sempre mediante il software Image-J, sono state calcolate le rispettive aree (esprese in mm^2). La densità cellulare è stata calcolata come il rapporto tra il numero di cellule presenti in ogni singola regione e l'area della rispettiva regione. Dalla somma di tutte le cellule presenti nelle tre regioni e delle rispettive aree è stata calcolata la densità

cellulare totale (calcolata come il rapporto tra il numero di cellule totali e l'area di tutta la parete del vaso).

In figura 4.12 sono mostrate, a titolo esemplificativo, due immagini per la comprensione del metodo utilizzato: nella prima immagine (Figura 4.12-A) sono stati evidenziati, in colore diverso, tutti i nuclei appartenenti alle 3 diverse tuniche, mentre nella seconda immagine (Figura 4.12-B) sono state evidenziate, in colore diverso, le tre tuniche delle quali è stata calcolata l'area.

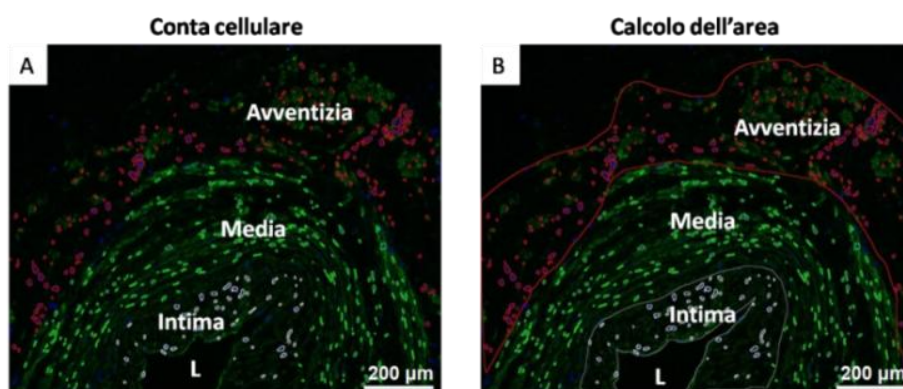


Figura 4.12 Immagini di una sezione di campione SV sottoposta ad analisi in immunofluorescenza (α -SMA e DAPI) ed acquisite con microscopio a fluorescenza ad ingrandimento 10X. (A) i nuclei cellulari appartenenti alle diverse tuniche del vaso vengono selezionati e contati mediante l'utilizzo del software Image-J. (B) Ogni tunica viene selezionata e successivamente utilizzata per il calcolo dell'area. L: lume del vaso.

Per quanto riguarda i campioni venosi (per i quali non sono state eseguite analisi in immunofluorescenza) la stima della densità cellulare di tutta la parete del vaso è stata condotta a partire da immagini istologiche colorate con H&E e considerando tutta la parete vascolare.

Dalle analisi della stima della densità cellulare, calcolata per ogni singola tunica appartenente alla parete del vaso dei campioni del gruppo bypass, è emerso che, rispetto ai campioni nativi, vi è una diminuzione delle densità cellulare in tutte e 3 le tuniche del vaso. Inoltre, è stato riscontrata una diminuzione statisticamente significativa della densità cellulare relativa alla tunica media del vaso. In Figura 4.13 sono riportati i risultati della stima della densità cellulare per i campioni del gruppo bypass (a 7 giorni, tempo t7) relativi alla tunica intima + cellule muscolari longitudinali (Figura 4.13-A), alla tunica media con cellule circolari (Figura 4.13-B) e alla tunica avventizia (Figura 4.13-C), a confronto con i rispettivi campioni nativi (tempo t0 in figura).

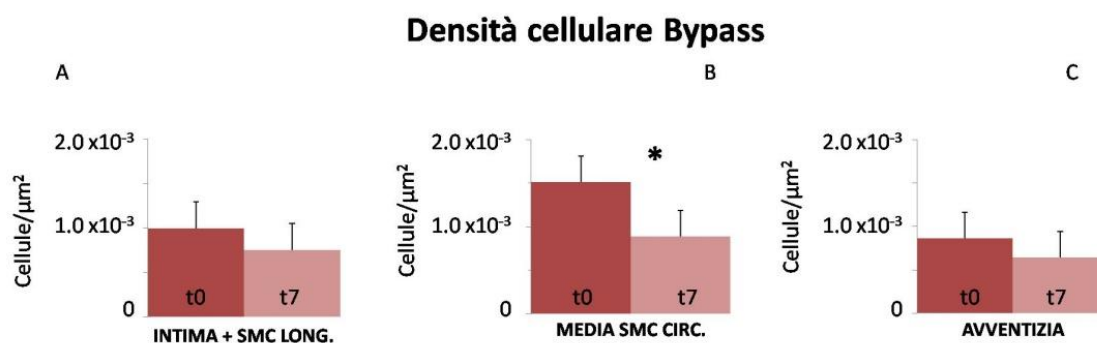


Figura 4.13 Risultati della stima della densità cellulare per i campioni del gruppo bypass (al tempo 0 e al tempo 7) calcolata per le 3 tuniche della parete del vaso: (A) intima + cellule muscolari longitudinali, (B) media con cellule muscolari circolari e (C) avventizia. (* = $P < 0.05$). I risultati riportano una diminuzione statisticamente significativa della densità cellulare nella tunica media del vaso.

Dalle analisi condotte per i campioni del gruppo standard è emersa una diminuzione statisticamente significativa della densità cellulare relativa alla tunica media (Figura 4.14-B) e alla tunica avventizia (Figura 4.14-C) del vaso. I risultati sono riportati in Figura 4.14, dove sono posti a confronto i dati della densità cellulare, relativa alle diverse tuniche, dei campioni al tempo 0 e al tempo 7.

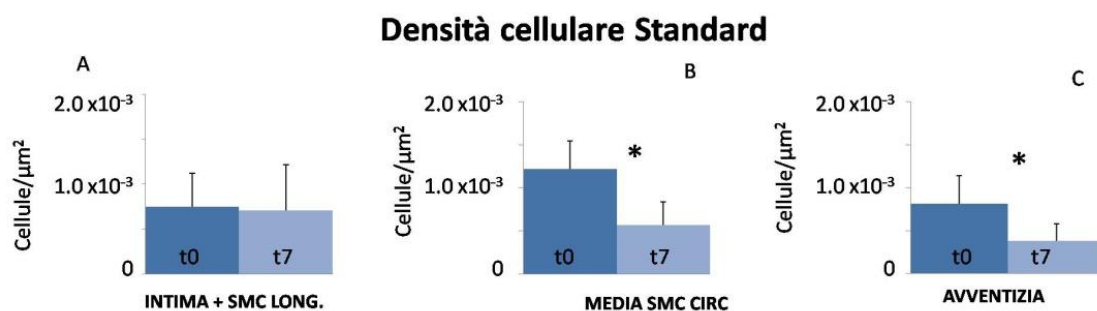


Figura 4.14 Risultati della stima della densità cellulare per i campioni del gruppo standard calcolata per le 3 tuniche della parete vascolare del vaso: (A) intima + cellule muscolari longitudinali, (B) media con cellule muscolari circolari e (C) avventizia. (* = $P < 0.05$). I risultati riportano una diminuzione statisticamente significativa della densità cellulare nella media e nell'avventizia del vaso dei campioni dopo sette giorni di coltura.

Successivamente, per tutti i campioni dei 3 gruppi sperimentali è stata valutata la densità cellulare su tutta la parete vascolare. Da queste analisi è emerso che per i campioni del gruppo sperimentale bypass e standard, dopo 7 giorni di coltura, si osserva una

diminuzione statisticamente significativa della densità cellulare (Figura 4.15-A, B), mentre nei campioni venosi la densità cellulare non è variata (Figura 4.15 C).

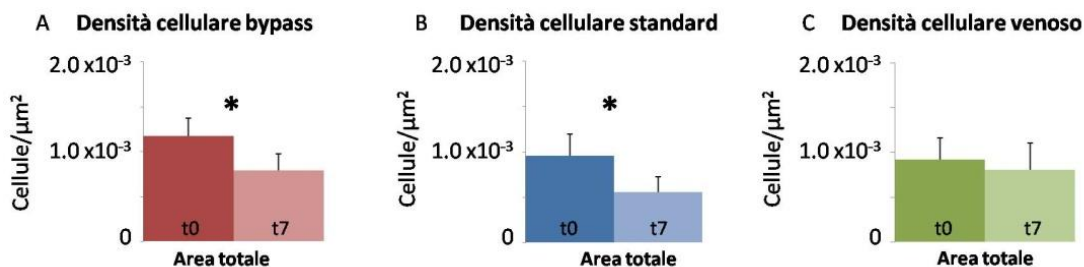


Figura 4.15 Risultati della stima della densità cellulare totale per (A) i campioni del gruppo bypass, (B) i campioni del gruppo standard e (C) i campioni del gruppo venoso, confrontati con i rispettivi controlli al tempo 0. (* = $P < 0.05$). Si osserva per i campioni dei gruppi bypass e standard una diminuzione statisticamente significativa della densità cellulare rispetto ai campioni nativi.

4.2.4 Analisi dell'apoptosi cellulare

Avendo osservato per entrambi i gruppi di campioni bypass e standard, una diminuzione delle cellule nella parete del vaso, sono state effettuate analisi con saggio colorimetrico TUNEL per rilevare la presenza di cellule apoptotiche; poiché una diminuzione delle cellule può essere dovuta a morte cellulare.

Le colorazioni del saggio TUNEL, condotte per i campioni dei gruppi bypass e standard, dopo 7 giorni di coltura, hanno riportato che i campioni del gruppo bypass presentano cellule apoptotiche a livello della tunica media del vaso se confrontate con i campioni nativi e del gruppo standard. In Figura 4.16 sono riportate 6 immagini istologiche ritenute rappresentative del comportamento osservato; le cellule apoptotiche sono colorate di marrone, mentre quelle vive di viola. Le immagini sono state ottenute da sezioni di SV, di un campione nativo (Figura 4.16–A, D), di un campione del gruppo bypass (Figura 4.16–B, E) e di un campione del gruppo standard (Figura 4.16–C, F), sottoposte a saggio TUNEL ed acquisite al microscopio ottico con ingrandimento pari a 20X. Nelle immagini, il cerchio verde indica le cellule vive (nuclei colorati di viola, ematossilina) mentre il cerchio rosso indica le cellule morte (nuclei colorati di marrone). Si osservano cellule apoptotiche nella tunica media del campione del gruppo bypass, mentre si osservano cellule vive nell'avventizia, comprese le cellule che costituiscono i *vasa vasorum* che non si sono colorate di marrone. Per quanto riguarda, invece, il campione del gruppo standard si osserva che tutte le cellule risultano vive.

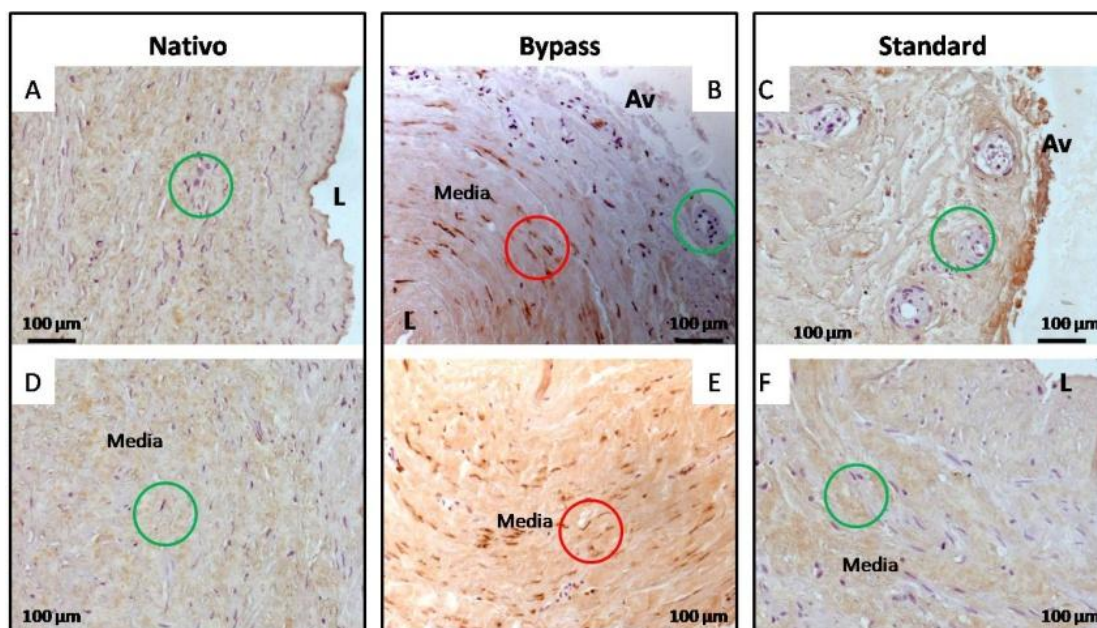


Figura 4.16 Immagini ottenute con microscopio ottico, ad ingrandimento 20X, di sezioni trasversali di vena safena umana sottoposte a saggio TUNEL. Nelle cellule vive i nuclei cellulari sono colorati di viola mentre nelle cellule apoptotiche i nuclei cellulari sono colorati di marrone. I cerchi verdi evidenziano alcune cellule vive e i cerchi rossi alcune cellule in apoptosi. (A-D) campione nativo, (B-E) campione del gruppo bypass (C-F) campione del gruppo standard. L: lume del vaso. Per il solo campione del gruppo bypass si osservano cellule in apoptosi nella zona mediale del vaso.

Sulle immagini istologiche sottoposte a colorazione ematossilina/TUNEL è stata calcolata la percentuale di cellule morte (numero di cellule TUNEL positive / numero di cellule totali). Tale analisi mostra una tendenza all'aumento delle cellule apoptotiche nei campioni del gruppo bypass rispetto ai campioni nativi, che non risulta tuttavia significativa. Per quanto riguarda i risultati della conta cellulare condotta per i campioni del gruppo standard al tempo t0 e al tempo 7, è stato riscontrato che, come già evidenziato dall'osservazione delle immagini al microscopio ottico, non vi è un incremento di cellule apoptotiche. In Figura 4.17 sono riportati i risultati dell'analisi quantitativa.

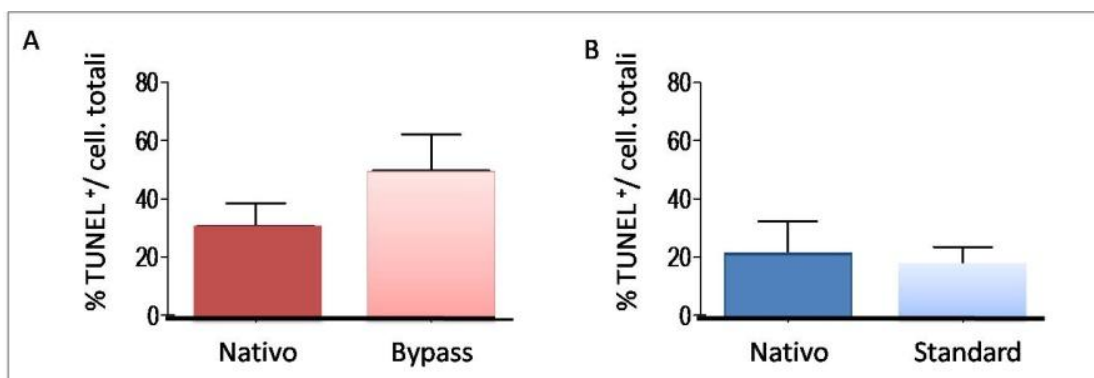


Figura 4.17 Risultati dell'analisi quantitativa delle cellule morte per apoptosi nei campioni dei gruppi (A) bypass e (B) standard a confronto con i rispettivi campioni nativi. Si osserva per i campioni del gruppo bypass una tendenza all'aumento delle cellule apoptotiche rispetto ai campioni nativi, anche se non statisticamente significativa.

4.2.5 Analisi della proliferazione cellulare

Sono state condotte, per i campioni dei gruppi bypass e standard (nativi e al tempo 7), analisi per la valutazione della proliferazione cellulare delle cellule dei *vasa vasorum* presenti nell'avventizia dei campioni dei gruppi bypass e standard; nello specifico, la proliferazione cellulare è stata valutata mediante analisi immunohistochimiche con l'anticorpo diretto contro la proteina Ki67 (associata alla proliferazione cellulare).

In figura 4.18 sono riportate, a titolo esemplificativo, 6 immagini ottenute da sezioni di vena safena (di un campione nativo, gruppo bypass e gruppo standard) sottoposte a colorazione immunohistochimica (Ki67) ed acquisite utilizzando il microscopio ottico con ingrandimento pari a 10X e 63X. Da queste immagini si possono osservare (indicate dalle frecce nere) le cellule marcate con Ki67 che presentano una colorazione scura, tendente al nero, rispetto alle cellule colorate con ematossilina, dall'aspetto violaceo. Ciò che si osserva, a livello qualitativo, è la presenza di un numero di cellule che esprimono il marcatore Ki67 molto maggiore per i campioni del gruppo bypass (Figura 4.18-B) rispetto ai campioni del gruppo standard (Figura 4.18-C) e nativo (Figura 4.18-A). Inoltre, ad un ingrandimento superiore è possibile constatare l'aumento di cellule proliferanti a livello dei *vasa vasorum* presenti nell'avventizia dei campioni del gruppo bypass (Figura 4.18- E).

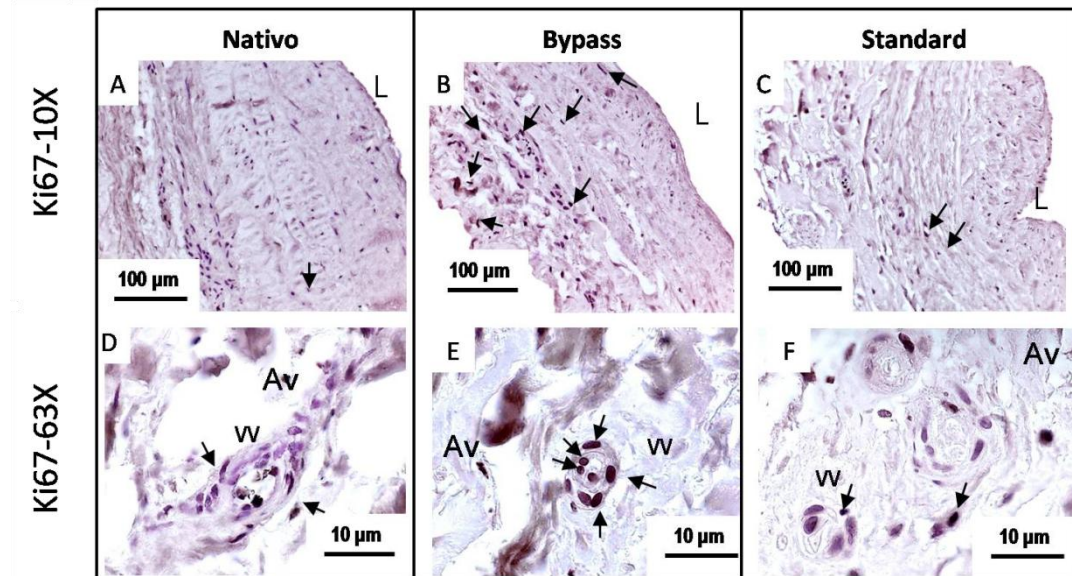


Figura 4.18 Immagini ottenute al microscopio ottico, ad ingrandimento 10X e 63X, di sezioni trasversali di vena safena umana sottoposte ad analisi immunohistochimica con anticorpo Ki-67 per la marcatura delle cellule proliferanti. (A-D) campione nativo. (B-E) campione del gruppo bypass, (C-F) campione del gruppo standard. L: lume; VV: vasa vasorum; Av: avventizia. Le cellule proliferanti sono evidenziate dalle frecce nere. Si osserva, in particolare per il campione del gruppo bypass, un aumento delle cellule proliferanti rispetto al campione nativo. Le immagini ottenute ad un ingrandimento superiore evidenziano inoltre la presenza di cellule proliferanti anche a livello dei VV dei vasi del gruppo bypass (E).

Successivamente sono state condotte analisi quantitative per valutare la proliferazione delle cellule dei *vasa vasorum* appartenenti ai diversi campioni (bypass e standard) al tempo 0 e al tempo 7. Il parametro utilizzato per questo confronto è stato il rapporto tra il numero di cellule marcate con Ki67 ed il numero di cellule totali sempre appartenenti ai *vasa vasorum*. Le analisi hanno riportato per i campioni del gruppo bypass, un aumento significativo di cellule proliferanti, a differenza dei campioni del gruppo standard per i quali non è stata riscontrata nessuna differenza significativa (Figura 4.19).

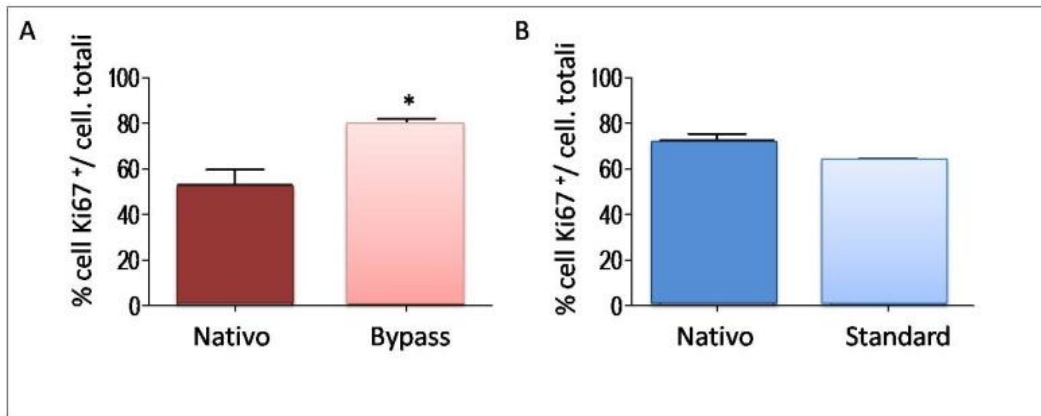


Figura 4.19 Risultati della conta cellulare delle cellule proliferanti rispetto alle cellule totali. (A) campioni del gruppo bypass (A), (B) campioni del gruppo standard a confronto con i rispettivi campioni nativi. Si osserva per i campioni del gruppo bypass un aumento statisticamente significativo delle cellule proliferanti. (*= $p < 0.005$).

4.2.6 Misura della *length density*

A fronte dei risultati ottenuti delle analisi morfologiche condotte con colorazione H&E, che hanno riportato un aumento dei *vasa vasorum* (in numero ed in dimensione) nell'avventizia dei campioni del gruppo bypass, dopo 7 giorni di coltura, è stata eseguita la misura della *length density* dei *vasa vasorum* dei campioni nativi e al tempo 7. Successivamente, i risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli ottenuti dai campioni standard e venosi. La misura della distribuzione della *length density* dei *vasa vasorum* è stata eseguita sulle sezioni di vena safena umana sottoposte a colorazione H&E. In seguito alla colorazione, dai preparati istologici sono state acquisite le immagini ad ingrandimento pari a 40 X di tutti i *vasa vasorum* presenti nell'avventizia di ogni campione e, da queste immagini, per mezzo dello strumento di misura presente nel software Axio Vision, è stata calcolata la lunghezza dell'asse maggiore e dell'asse minore di ogni singolo *vasa vasorum*. In Figura 4.20 è mostrata, a titolo esemplificativo, una porzione del pannello di misura del software Axio Vision durante la misura dell'asse maggiore e dell'asse minore di tutti i *vasa vasorum* presenti nell'avventizia di un campione SV: nel pannello a destra si osservano alcune immagini dei VV nei quali è stato tracciato e misurato il relativo asse maggiore e asse minore, mentre, nel pannello a sinistra è riportata una tabella in cui sono riassunti tutti i valori dell'asse maggiore (indicato con **a**) e dell'asse minore (indicato con **b**) di ogni *vasa vasorum*.

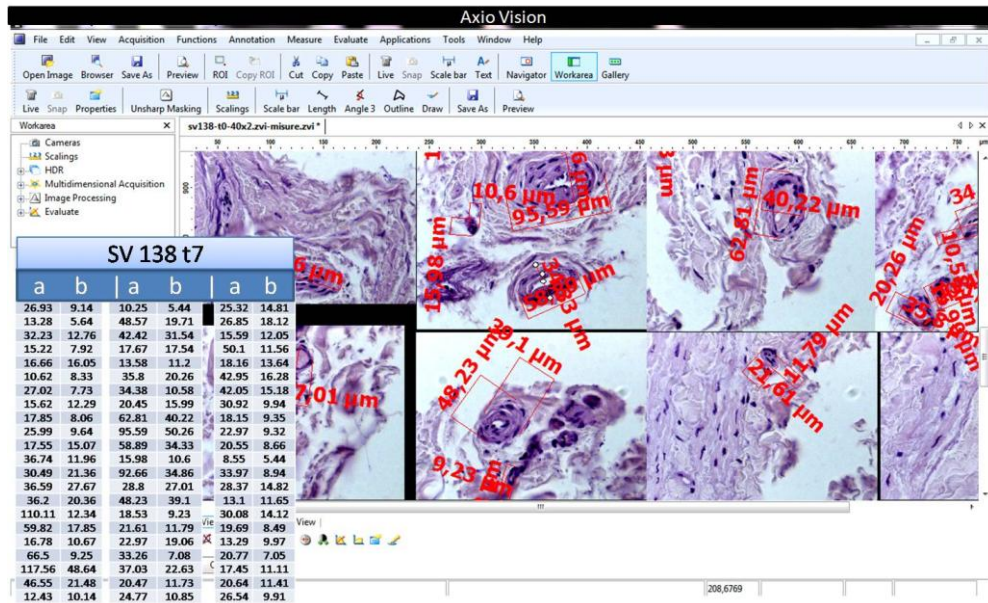


Figura 4.20 Esempio del procedimento di misura dell'asse maggiore (a) e dell'asse minore (b) di ogni vasa vasorum presente nell'avventizia del campione in esame. In rosso sono riportate le lunghezze di ogni asse espresse in μm . L'analisi è stata condotta su immagini di SV sottoposte a colorazione di H&E ed acquisite ad un ingrandimento 40X. In tabella i risultati ottenuti dalla misura di tutti i vasa vasorum del campione SV dove sono riportati in a i valori degli assi maggiori e in b i valori degli assi minori.

Per la stima della *length density* dei vasa vasorum di ogni campione SV, al tempo 0 e al tempo 7, sono stati individuati, in base alla lunghezza dell'asse minore, tre sottoinsiemi (rispettivamente 4-14 μm , 12-24 μm , 24-44 μm) in un range compreso tra 4 μm e 44 μm . In Figura 4.21 sono riportate, a titolo esemplificativo, 3 immagini istologiche di sezioni di campioni SV sottoposte a colorazione H&E, nelle quali è possibile osservare un vasa vasorum di piccolo calibro (4-14 μm), uno di medio calibro (12-24 μm) e di uno di grande calibro (24-44 μm).

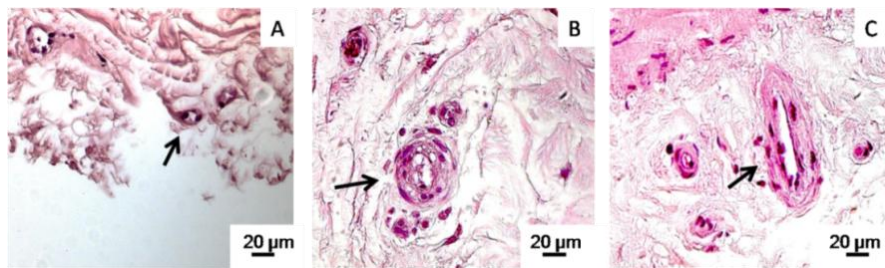


Figura 4.21 Immagini esemplificative di vasa vasorum (indicati dalla freccia nera) presenti nell'avventizia di campioni di vena safena sottoposti a colorazione H&E ed acquisite con microscopio ottico ad un ingrandimento pari a 40X. (A) vasa vasorum di piccolo calibro, (B) vasa vasorum di medio calibro e (C) vasa vasorum di grande calibro.

I risultati ottenuti dalla misura della *length density* di tutti i campioni SV, sottoposti alle 3 differenti condizioni biochimiche di coltura, hanno riportato un aumento statisticamente significativo dei *vasa vasorum* di piccolo (4-14 μm) e medio (24-44 μm) calibro nei soli campioni bypass (Figura 4.22).

Questo tipo di analisi ha permesso di rilevare che le condizioni di coltura che simulano l'ambiente aorto-coronarico inducono sul vaso un rimodellamento adattivo delle cellule vascolari che, in condizioni di ipossia, attivano risposte angiogeniche. Infatti, da quanto è emerso nel Capitolo 2 (*paragrafo 2.2*) in carenza di O_2 si attivano una serie di fattori di trascrizione (tra cui HIF-1 α e VEGF) che stimolano la migrazione delle EC e successivamente delle SMC e periciti (cellule che andranno a comporre il neo-vaso, insieme alle EC) verso la zona della parete vascolare dove è necessario un nuovo vaso [55].

Inoltre, tale evidenza è in accordo con quanto presente in letteratura, dove lo studio di Kuwahara e colleghi [36] ha riportato un aumento di VV nell'avventizia di un vaso mantenuto in condizioni di ipossia. Per un ulteriore approfondimento delle considerazioni inerenti a quanto riscontrato da questa analisi si rimanda al Capitolo successivo.

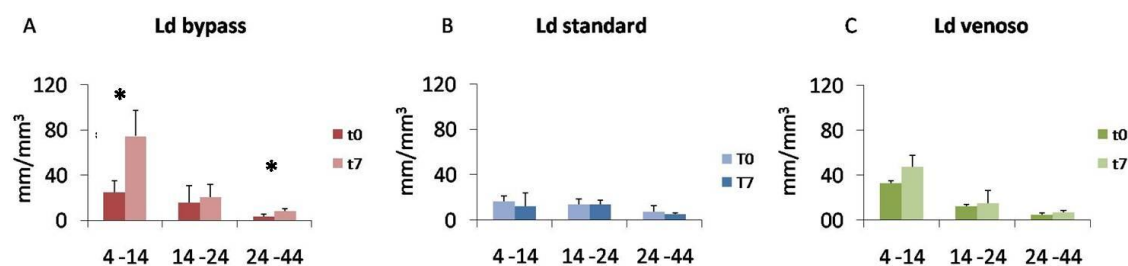


Figura 4.22 Risultati della misura della *length density* (*Ld*) dei VV dei campioni di vena safena. (A) Gruppo bypass, (B) gruppo standard (C) gruppo venoso. I dati sono riportati per i tre sottoinsiemi dei VV; piccoli (4-14 μm), medi (14-24 μm) e grandi (24-44 μm). (* = $P < 0.05$). I risultati evidenziano, dopo 7 giorni di coltura, un aumento di tutti e tre i tipi di VV, per tutti e 3 i gruppi sperimentali ma, un aumento statisticamente significativo dei VV di piccolo e medio calibro è stato osservato solo nei campioni del gruppo bypass.

4.3 Modello teorico della diffusione dell'ossigeno attraverso la parete vascolare

A fronte dei risultati delle indagini condotte con il saggio TUNEL, dalle quali è emerso che nei soli campioni del gruppo sperimentale bypass è stata riscontrata apoptosi cellulare nella tunica media del vaso; si è voluto investigare se questo fenomeno potesse essere indotto dalla carenza di ossigeno per le cellule presenti nella media. Poiché, come è stato precedentemente descritto nel paragrafo 2.2 del Capitolo 2, uno degli eventi scatenanti

dell'apoptosi cellulare è proprio una condizione di ipossia. Quindi per interpretare e supportare i dati ottenuti dalle analisi sperimentali, è stato creato un modello matematico in grado di fornire una stima della diffusione dell'ossigeno attraverso la parete di un vaso. Il modello fornisce il profilo di concentrazione dell'O₂ nella parete del vaso in funzione del raggio del vaso. Con questo modello è possibile quindi stimare in maniera approssimativa la pO₂ presente in un determinato punto della parete vascolare.

Di seguito verrà riportato il metodo utilizzato per la realizzazione del modello teorico applicato nel caso di un vaso posto in condizioni di coltura che simulano l'ambiente biochimico del bypass aorto-coronarico.

Il modello matematico è basato sull'utilizzo del modello di Krogh [62] e, per la sua realizzazione sono state assunte le seguenti ipotesi: *i*) il vaso è stato assunto come un costruito cilindrico, di spessore costante pari alla differenza tra il raggio interno e raggio esterno del vaso, *ii*) il profilo di concentrazione dell'ossigeno dipende dal consumo cellulare e dal coefficiente di diffusione dell'O₂ nel tessuto vascolare, *iii*) la diffusione dell'O₂ in direzione assiale è stata ipotizzata pari a 0 ed infine *iv*) la distribuzione cellulare all'interno del tessuto è stata ipotizzata omogenea su tutta la parete vascolare.

Partendo da queste ipotesi, è possibile stimare il profilo di concentrazione dell'ossigeno nel vaso applicando l'equazione della diffusione-reazione, a regime, ipotizzando una simmetria cilindrica del profilo e un consumo cellulare di ordine zero:

$$D \nabla^2 c = V \tag{1}$$

dove D è il coefficiente di diffusione dell'O₂ nel tessuto (assunto pari al coefficiente di diffusione dell'O₂ in un tessuto connettivo, pari a 1.04×10^{-5} cm²/s [63], c è la concentrazione di O₂ ed infine V è definito come il consumo cellulare massimo di O₂.

Imponendo le condizioni al contorno (c.c) che tengono conto dei livelli di O₂ presenti nell'ambiente interno ed esterno al vaso (pO₂ costante e rispettivamente, pari al 21% e al 5%) (Figura 4.21), il modello è stato sviluppato come segue:

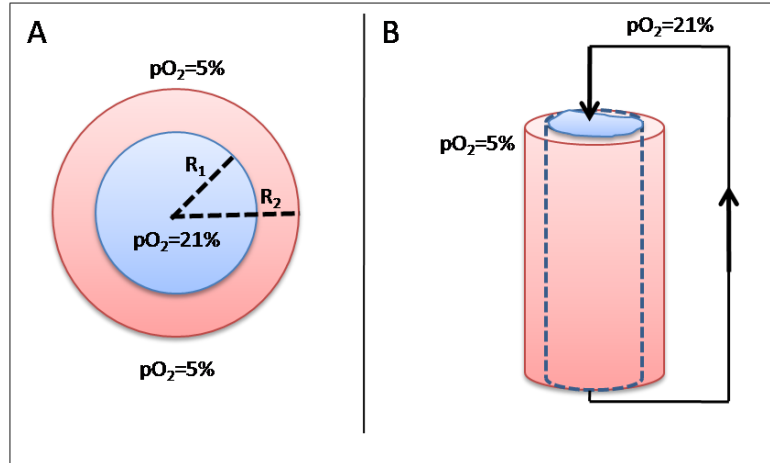


Figura 4.23 Visione frontale(A) e laterale (B) del vaso in coltura nelle condizioni biochimiche che simulano il bypass aortocoronarico: l'area intraluminale del vaso è esposta ad una pO_2 pari al 21% mentre, la parte esterna del vaso ad una pO_2 pari al 5%. R_1 : raggio interno del vaso e R_2 : raggio esterno del vaso.

c.c.1: per $r = R_1$, $pO_2 = pO_{2\text{INT}} = 21\% = c_{\text{INT}}$

c.c.2: per $r = R_2$, $pO_2 = pO_{2\text{EXT}} = 5\% = c_{\text{EXT}}$

Partendo dall'equazione (1), scriviamo il laplaciano in forma cilindrica

$$D \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} r \frac{\partial c}{\partial r} = V \quad (2)$$

Organizzando i termini e integrando entrambi i membri in dr si ottiene

$$r \frac{\partial c}{\partial r} = \frac{V}{2D} r^2 + k_1 \quad (3)$$

Con k_1 costante di integrazione. Integrando di nuovo otteniamo

$$c(r) = \frac{V}{4D} r^2 + k_1 \ln r + k_2 \quad (4)$$

Con k_2 costante di integrazione. Imponendo all'equazione (4) di soddisfare le c.c.1 e c.c.2 si ottengono queste due relazioni:

$$c_{\text{INT}} = \frac{V R_1^2}{4D} + \ln R_1 k_1 + k_2 \quad (5)$$

$$c_{\text{EXT}} = \frac{V R_2^2}{4D} + \ln R_2 k_1 + k_2 \quad (6)$$

Dall'equazione (6) ricavo k_2 in funzione di k_1 e R_2 :

$$k_2 = c_{\text{EXT}} - \frac{V R_2^2}{4D} - \ln R_2 k_1 \quad (7)$$

Sostituendo nell'equazione (5) l'equazione (7) ed esplicitando k_1 si perviene alla relazione:

$$k_1 = \frac{\frac{V (R_2^2 - R_1^2)}{4D} + C_{INT} - C_{EXT}}{\ln \frac{R_1}{R_2}} \quad (8)$$

Sostituendo nell'equazione (7) l'equazione (8) otteniamo il valore di k_2 :

$$k_2 = c_{EXT} - \frac{V R_2^2}{4D} - \ln R_2 \frac{\frac{V (R_2^2 - R_1^2)}{4D} + C_{INT} - C_{EXT}}{\ln \frac{R_1}{R_2}} \quad (9)$$

Sostituendo così i valori di k_1 e k_2 , nell'equazione (4), si ottiene il profilo di concentrazione:

$$c(r) = c_{EXT} - \frac{V (R_2^2 - r^2)}{4D} - (\ln R_2 - \ln r) \left[\frac{c_{INT} - c_{EXT} + \frac{V}{4D} (R_2^2 - R_1^2)}{\ln \frac{R_1}{R_2}} \right] \quad (10)$$

dove $c(r)$ è la concentrazione di O_2 in funzione delle coordinate radiale r e V che è il consumo cellulare calcolato come il rapporto tra la densità cellulare volumetrica e il consumo cellulare per una singola cellula:

$$V = v_{cell} N_v$$

dove v_{cell} è il consumo metabolico per una singola cellula posto pari a $1.82 \text{ nmol/min} \times (10^6 \text{ cell.})^{-1}$: tale valore è stato ottenuto considerando un valore medio tra il consumo delle cellule endoteliali (pari a $1 \text{ nmol/min} \times (10^6 \text{ cell.})^{-1}$) e il consumo delle cellule muscolari (pari a $2.64 \text{ nmol/min} \times (10^6 \text{ cell.})^{-1}$) [64]; N_v è la densità cellulare volumetrica calcolata mediante un metodo stereo logico [65]:

$$N_v = \frac{\bar{N}_a}{\bar{D} + t}$$

dove \bar{N}_a è la densità cellulare media per unità di area, \bar{D} è il diametro medio dei nuclei cellulari (assunto pari a $20 \mu\text{m}$) [68] e t è lo spessore della sezione istologica di vena safena umana (pari a $5 \mu\text{m}$). Il valore medio della densità cellulare per unità di area è stato calcolato a partire da immagini di SV in immunofluorescenza di 3 campioni (*metodo riportato al paragrafo 3.4.3.3 del capitolo 3*) ed è risultato pari a $1.05 \times 10^{-3} \pm 2.39 \times 10^{-4}$

cell/ μm^2 .

Sostituendo i valori sotto riportati nell'equazione (10) si ottiene l'equazione del modello teorico applicato al caso reale di condizioni di coltura che simulano le condizioni di ossigenazione simili al bypass aorto-coronarico.

R_1 = raggio interno del vaso pari a 1.75 mm

R_2 = raggio esterno del vaso pari a 2.75 mm

$$C_{\text{EXT}} = \alpha_{\text{O}_2} p_{\text{O}_2 \text{ INT}} = 1.3 \frac{\text{nmol}}{\text{ml mmHg}} 0.21 \text{ bar } 760 \frac{\text{mmHg}}{\text{bar}} = 207. \frac{\text{nmol}}{\text{ml}}$$

$$C_{\text{INT}} = \alpha_{\text{O}_2} p_{\text{O}_2 \text{ EXT}} = 1.3 \frac{\text{nmol}}{\text{ml mmHg}} 0.05 \text{ bar } 760 \frac{\text{mmHg}}{\text{bar}} = 49 \frac{\text{nmol}}{\text{ml}}$$

V = consumo cellulare volumetrico = 7.64×10^1 [nmol/min ml]

Inoltre imponendo all'equazione (4) di soddisfare le cc1 e cc2 (sotto riportate) del caso standard o venoso, si perviene ai rispettivi profili di concentrazione.

Caso standard: c.c.1_S: per $r = R_1$, $p_{\text{O}_2} = p_{\text{O}_2 \text{ INT}} = 21\% = c_{\text{INT}}$

c.c.2_S: per $r = R_2$, $p_{\text{O}_2} = p_{\text{O}_2 \text{ EXT}} = 21\% = c_{\text{EXT}}$

Caso venoso: c.c.1_V: per $r = R_1$, $p_{\text{O}_2} = p_{\text{O}_2 \text{ INT}} = 5\% = c_{\text{INT}}$

c.c.2_V: per $r = R_2$, $p_{\text{O}_2} = p_{\text{O}_2 \text{ EXT}} = 21\% = c_{\text{EXT}}$

I risultati ottenuti dall'applicazione del modello nelle differenti condizioni biochimiche di coltura sono riportati in Figura 4.24, Figura 4.25 e Figura 4.26: dove i valori di concentrazione di ossigeno sono stati convertiti, mediante la legge di Henry, in valori di p_{O_2} .

Osservando il grafico relativo all'andamento della p_{O_2} per i campioni bypass (Figura 4.24) si può notare che la p_{O_2} raggiunge a livello della tunica media del vaso un valore minimo pari allo 0% (~ 38 mmHg) e poi risale fino ad un valore massimo pari al 5% a livello della tunica avventizia. Nel caso invece delle condizioni di coltura standard (Figura 4.25) si può notare che a livello nella tunica media la p_{O_2} si mantiene in un intervallo compreso tra il 10 e 15%, poi aumenta nella tunica avventizia fino a raggiungere di nuovo un valore pari circa al 21%. Infine, nel grafico riportato in Figura 4.26, riferito al caso del condizionamento venoso, si può notare che l'andamento della p_{O_2} attraverso la parete del

vaso è opposto rispetto al caso bypass ed a livello della tunica media la pO_2 si mantiene in un intervallo compreso tra il 5 e il 15%. Inoltre si nota che in nessuna tunica la pO_2 non raggiunge mai un valore pari allo 0%.

A fronte dei risultati ottenuti si può constatare che le condizioni di ossigenazione simili al bypass aorto-coronarico provocano un abbassamento della pO_2 a livello della tunica media del vaso (valori non fisiologici per la vena: vedi grafico in Figura 4.26). Questo risultato spiegherebbe quanto osservato dai dati sperimentali ottenuti dallo studio su campioni di vena safena umana, dove sono state osservate cellule apoptotiche proprio a livello della tunica media (Figura 4.16, paragrafo 4.2.4). In accordo con quanto riportato in letteratura [56] (paragrafo 2.2 del Capitolo 2), si può ipotizzare che l'ipossia, riscontrata nella parete del vaso (se paragonata al caso venoso presente in Figura 4.26), ha indotto apoptosi. Inoltre l'angiogenesi osservata, della misura della *length density*, potrebbe essere spiegata dalla carenza di ossigeno che è emersa anche livello della tunica avventizia. Tale risultato è in accordo con i lavori presenti in letteratura [36], dove è stato osservato che una carenza di ossigeno induce uno sviluppo dei VV (paragrafo 2.2 del Capitolo 2).

In conclusione si può dire che, tenendo in considerazione tutti i risultati ottenuti, le condizioni di ossigenazione simili al bypass aorto-coronarico provocano nel vaso una condizione di ipossia che induce principalmente lo sviluppo di due fenomeni differenti: apoptosi cellulare e angiogenesi.

La stima della densità cellulare condotta per i campioni del gruppo bypass (paragrafo 4.2.3) ha riportato una diminuzione statisticamente significativa delle sole cellule presenti nella tunica media. Si può ipotizzare che tale diminuzione sia legata all'apoptosi cellulare. Nel caso delle cellule presenti nella tunica avventizia, invece, si può assumere che tale diminuzione non sia stata riscontrata poiché, in questa regione è stata indotta anche angiogenesi, pertanto la possibile diminuzione della densità cellulare è stata controbilanciata dalla proliferazione cellulare indotta da stimoli angiogenici.

Infine, dal confronto dei dati ottenuti dal modello matematico applicato al caso standard e al caso venoso e considerando i risultati ottenuti dalle indagini biologiche (diminuzione statisticamente significativa della densità cellulare nella tunica media e avventizia dei campioni del gruppo standard) è possibile ipotizzare che, come è già stato dimostrato in alcuni lavori di letteratura [45], l'elevata presenza di ossigeno presente a livello di tutta la

parete vascolare abbia indotto un produzione delle ROS causando quindi stress ossidativo, e necrosi cellulare.

Nel Capitolo successivo verranno riportate le ulteriori considerazioni riferite a questi fenomeni e le possibili analisi biologiche che andrebbero condotte al fine di potere meglio accertare quanto ipotizzato fino adesso.

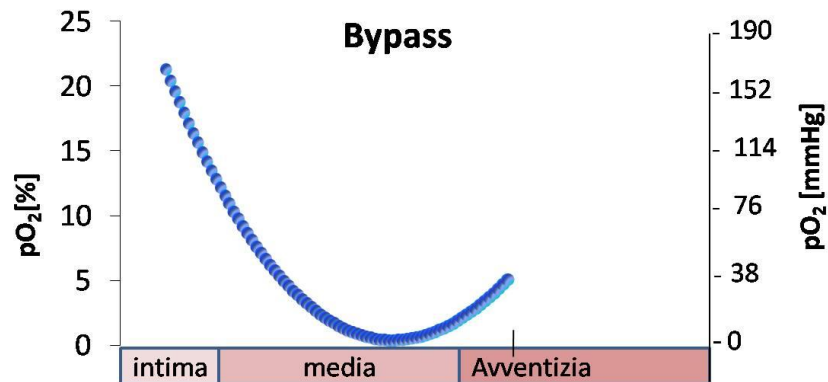


Figura 4.24 Risultati del modello teorico applicato al caso delle condizioni di ossigenazione simili al bypass aorto-coronarico. Il grafico riporta l'andamento della pO_2 attraverso la parete vascolare, in funzione del raggio del vaso. I risultati mostrano che nella media si ha una condizione di ipossia dove il valore minimo raggiunto è pari allo 0% mentre nell'avventizia i valori di pO_2 tendono a risalire fino ad un valore pari al 5%.

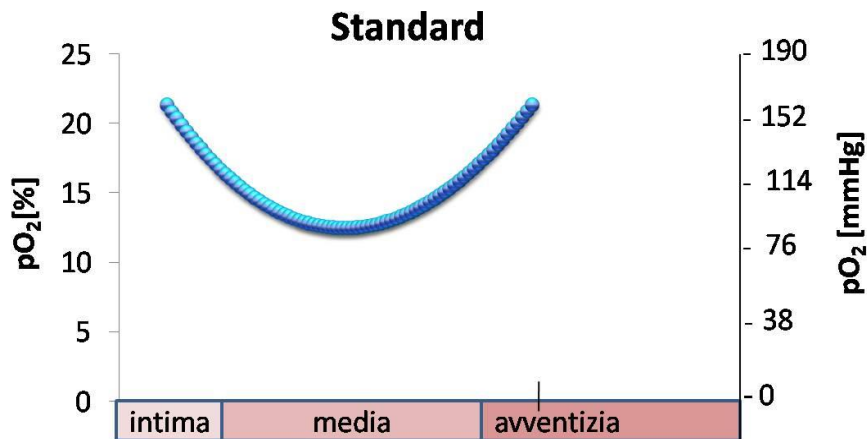


Figura 4.25 Risultati del modello teorico applicato al caso delle condizioni di ossigenazione simili a quelle utilizzate all'interno degli studi ex vivo del VGD. Il grafico riporta l'andamento della pO_2 attraverso la parete vascolare, in funzione del raggio del vaso. I risultati mostrano che in condizioni standard la pO_2 a livello della media si mantiene in un intervallo compreso tra il 10 e 15%.

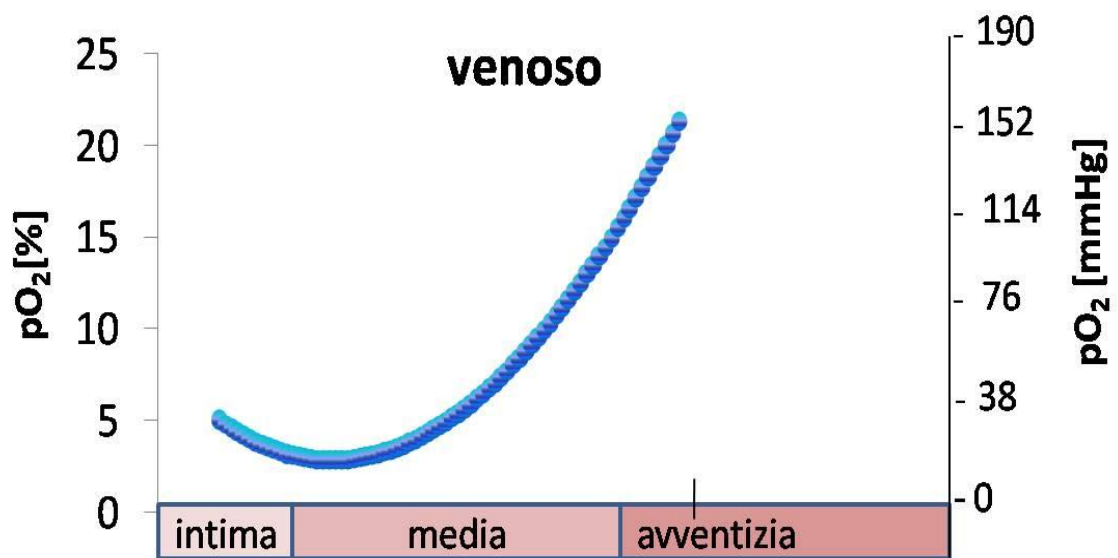


Figura 4.26 Risultati del modello teorico applicato al caso delle condizioni di ossigenazione simili a quelle dell'ambiente venoso. Il grafico riporta l'andamento della pO_2 attraverso la parete vascolare, in funzione del raggio del vaso. I risultati mostrano che la pO_2 presenta un andamento opposto rispetto all'andamento riscontrato per il gruppo bypass e non raggiunge mai il valore di pO_2 pari allo 0%,

5. Conclusioni e sviluppi futuri

Il presente lavoro di tesi è volto allo studio dei fenomeni cellulari alla base del rimodellamento vascolare a cui va incontro la vena safena quando viene impiegata come bypass aorto-coronarico.

Il progetto si è sviluppato in tre parti principali: la prima parte del lavoro è stata realizzata presso μ BSLab del DEIB del Politecnico di Milano dove sono state condotte prove su banco per la messa a punto del modulo deossigenante di un sistema di coltura *ex vivo*. La seconda parte del lavoro, invece, è stata svolta in collaborazione con il gruppo di ricerca del Laboratorio di Ingegneria Tissutale Cardiovascolare (LIT) dell'I.R.C.C.S. Centro Cardiologico Monzino ed è stata incentrata sullo studio del rimodellamento vascolare di segmenti di vena safena umana coltivati all'interno di un sistema bicompartimentale in grado di riprodurre le condizioni biochimiche del bypass aorto-coronarico. Infine, per una migliore comprensione dei risultati ottenuti dalle analisi biologiche, l'ultima parte del lavoro si è incentrata sullo sviluppo di un modello matematico per lo studio della diffusione dell'ossigeno attraverso la parete vascolare di un vaso mantenuto in diverse condizioni biochimiche di coltura.

Il sistema *ex vivo*, utilizzato all'interno del presente lavoro di tesi, si è dimostrato un valido strumento per lo studio del Vein graft Disease (VGD) su campioni di vena safena mantenuti in coltura in differenti condizioni di ossigenazione. La camera bicompartimentale ha, infatti, permesso di mantenere distinta la regione intra-luminale del vaso dalla regione extra-avventiziale ed inoltre, grazie all'integrazione nel sistema di un modulo ossigenante e di un modulo deossigenante è stato possibile ottenere differenti ambienti biochimici e studiare in tale modo l'effetto della diversa pO_2 nelle distinte regioni della parete vascolare.

Le prove di collaudo del modulo deossigenante hanno mostrato che modulando la miscela di gas (aria e N_2) da introdurre, è possibile ottenere diversi livelli pO_2 , fino ad un valore minimo pari al 5%.

Dal confronto tra i dati sperimentali e i dati torici, dello scambio di massa specifico e dello scambio di massa totale (ottenuti durante le prove a circuito aperto) è emerso che, come era prevedibile, all'aumentare della portata di esercizio lo scambio di massa specifico diminuisce mentre, lo scambio di massa totale aumenta. Inoltre, nel risultato ottenuto dallo

scambio specifico è stato osservato che i dati sperimentali seguono lo stesso andamento dei dati teorici. Tuttavia, per portate inferiori a 2 ml/min, in entrambi gli scambi di massa (specifico e totale), il deossigenatore è risultato meno efficiente rispetto a quanto predetto dal modello teorico.

Dalle prove a circuito chiuso si è potuto constatare che, al diminuire del livello di saturazione dell'ossigeno, la concentrazione di O₂ all'interno del fluido diminuisce; imponendo una saturazione dell'ossigeno pari allo 0% il valore della concentrazione di O₂ scende e si stabilizza ad un valore pari a 5×10^{-5} mmol/ml (corrispondente circa ad una pO₂ pari a 38 mmHg o 5%) e non pari a 0 come si auspicava

Una spiegazione di questo risultato potrebbe essere identificabile nella difficoltà di ottenere un circuito totalmente impermeabile all'O₂; a causa, per esempio, della diffusione dell'O₂ dal pelo libero nella camera di coltura, dai tubi in PVC e dai connettori luer del circuito, che sono realizzati con materiali caratterizzati da una permeabilità non nulla all'O₂, i cui effetti non sono stati tenuti in considerazione nel modello. A tale proposito, sarebbe interessante utilizzare, durante una prova a circuito chiuso (paragrafo 3.3.1.2 del capitolo 3), due sensori per la misura della pO₂, posti a cavallo dei vari elementi del circuito (per esempio, prima e dopo la camera di coltura oppure, prima e dopo un connettore luer) in modo tale da valutare quali di questi scambi gassosi giochi un ruolo rilevante rispetto agli altri.

Inoltre il sistema potrebbe essere ottimizzato ridefinendo i parametri caratteristici del sistema, quali il dimensionamento del modulo deossigenante e la portata di ricircolo. In tale senso si potrebbero variare i parametri che influenzano lo scambio di gas all'interno del deossigenatore. Per esempio, essendo la deossigenazione influenzata anche dalle dimensioni caratteristiche del tubo in silicone, attraverso il quale avviene lo scambio di O₂, si potrebbe aumentare la superficie di scambio di O₂ aumentando il diametro interno oppure la lunghezza del tubo (tenendo in considerazione che non venga eccessivamente aumentato il volume di priming, che deve rimanere inferiore ai 100 ml). Ed inoltre, si potrebbe imporre nell'equazione utilizzata per il dimensionamento del tubo in silicone (eq. 1 nel paragrafo 3.3 del capitolo 3) una portata di ricircolo del fluido inferiore ai 5 ml poiché tale modifica, se fatta tenendo conto delle tempistiche della deossigenazione, aumenterebbe lo scambio di O₂. Inoltre, al fine di ottimizzare la deossigenazione, potrebbero essere usati tubi aventi una permeabilità all'O₂ più bassa rispetto al PVC, in

modo tale da evitare che vi siano infiltrazioni di O_2 nel fluido che si immette nella camera di coltura.

Infine, per rendere il sistema più versatile (se si volessero, per esempio, condurre delle sperimentazioni in cui sia necessario variare la pO_2 del terreno di coltura, durante la prova) si potrebbero apportare delle modifiche progettuali al sistema per ottenere, in maniera automatizzata, diversi livelli di pO_2 del fluido; introducendo, ad esempio, un sistema retroazionato con dei flussimetri di misura e controllo della portata di gas (attualmente disponibili in commercio, con controllo via software e con collegamento USB per il PC) e un sensore che permetta la misura *real time* dell' O_2 (del fluido di esercizio). Tali modifiche prevedono che impostando un certo valore di pO_2 desiderata (per esempio tramite un'interfaccia utente), il sistema sia in grado di acquisire e variare il livello di pO_2 del fluido cambiando la portata di aria e N_2 .

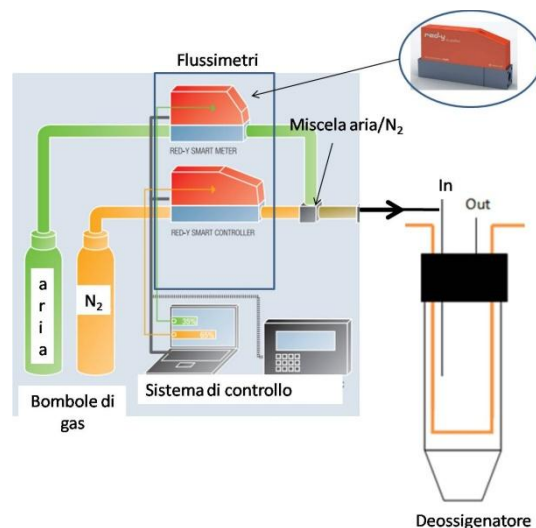


Figura 5.1 Esempio progettuale di un sistema in grado di regolare, mediante l'utilizzo di due flussimetri a gas, il livello concentrazione di O_2 nel fluido in esercizio. A sinistra, le bombole dell'aria e dell'azoto collegate a due flussimetri direttamente connessi, tramite USB, al PC. A destra, il deossigenatore all'interno del quale viene iniettata la miscela di aria/azoto.

Un'alternativa progettuale più semplice sarebbe quella di rendere il sistema in grado di ossigenare o deossigenare il fluido, in maniera automatizzata, mediante un'interfaccia utente. Tale sistema sarebbe ottenibile introducendo a monte dei tubi collegati ai due flussimetri (aria e N_2), un'elettrovalvola pinza-tubo che blocchi in maniera alternata l'ingresso di aria e di azoto (Figura 5.1). Anche in questo caso il sistema avrà bisogno di

un sensore dell'O₂ e un sistema software che in base alle specifiche, di ossigenazione/deossigenazione, richieste dall'utente comandi l'elettrovalvola.

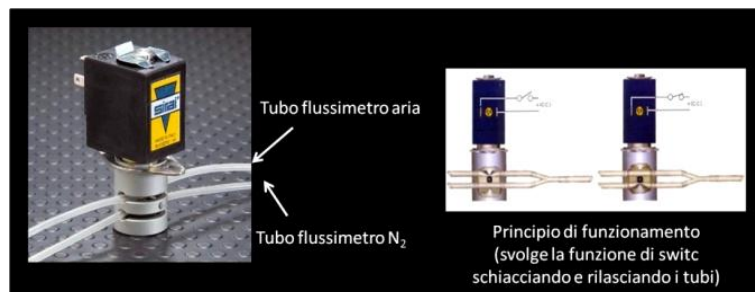


Figura 5.1 Esempio di elettrovalvola pinza-tubo. A sinistra: fotografia di un'elettrovalvola, a destra schematizzazione del principio di funzionamento dell'elettrovalvola che svolge la funzione di switch schiacciando e rilasciando il tubo.

Quindi, nel caso sia richiesta la deossigenazione del fluido l'elettrovalvola occluderà il tubo dell'aria mentre, in caso contrario, verrà occluso l'ingresso di N₂.

Da quanto descritto precedentemente in letteratura, negli studi sull'effetto della pO₂ su segmenti di vena safena, è emerso che il livello di pO₂ del medium, viene raggiunto iniettando una miscela di azoto e aria prima di porre il medium in coltura [32]. Questo metodo non permette, a differenza del modulo deossigenante in esame, né di mantenere il fluido deossigenato per periodo medio/lungo di coltura (perché non è previsto un accesso per fare gorgogliare la miscela di gas all'interno del sistema *ex vivo*), né di regolare finemente i valori di pO₂ desiderata. Mentre, il sistema deossigenante, utilizzato all'interno di questo lavoro di tesi e descritto nel paragrafo 3.3 del Capitolo 3, risulta nel suo insieme un elemento versatile e grazie alle dimensioni ridotte ha il vantaggio di potere essere introdotto anche in altri sistemi che richiedono la deossigenazione del fluido. Per esempio, anche semplicemente per deossigenare il terreno di coltura all'interno di petri per colture cellulari.

Per quanto riguarda il sistema *ex vivo* sarebbe interessante apportargli alcune modifiche al fine di ottenere un unico sistema di coltura in grado di generare, mediante un software (quindi tramite un'interfaccia utente, per esempio mediante l'utilizzo di LabVIEW), tutte le condizioni biochimiche di coltura ottenibili (es. con ambiente intra-luminale ed extra-avventiziale a pO₂ pari 21% o 5% oppure, con ambiente intra-luminale a pO₂ pari al 5% ed extra-avventiziale pari 21% e viceversa). Una possibile soluzione progettuale che si

potrebbe realizzare in futuro, al fine di ottenere l'*upgrade* del sistema già esistente, è presentata in figura 5.2, e le modifiche da effettuare sono elencate di seguito:

- 1) Nella camera bicompartimentale sono stati aggiunti 3 fori sul tappo della camera uno per l'ingresso alla camera esterna e due per l'ingresso alla camera interna, (rispettivamente per prelevare il medium intra-luminale da deossigenare e, il medium extra-avventiziale da ossigenare e riversarlo nuovamente nella camera interna nella configurazione venosa).
- 2) Per la gestione del modulo ossigenante, è stata aggiunta una nuova pompa peristaltica: nella configurazione che replica le condizioni di ossigenazione simili a quelle del bypass sarà da mantenere attiva la pompa indicata in figura come "pompa OXY bypass" mentre, per la configurazione venosa la "pompa OXY venoso".
- 3) Sono state aggiunte 3 elettrovalvole pinza-tubo per la gestione del modulo deossigenante. Le elettrovalvole n.1 e quella n.2, evidenziate in Figura 5.1, alloggiavano un tubo appartenente alla configurazione bypass e un tubo appartenente alla configurazione venosa. Mantenendo pervii i tubi della configurazione bypass 2 (indicato in figura con un simbolo rosso a sinistra dell'elettrovalvola n. 1 e n.2) tale sistema permette di prelevare dalla camera interna il medium (extra-avventiziale), deossigenarlo e riversarlo nella camera interna mentre, mantenendo pervii i tubi appartenenti alla configurazione venosa (indicato in figura con un simbolo verde a destra dell'elettrovalvola n.1 e n.2) il medium (intra-luminale) verrà prelevato dalla camera esterna, deossigenato, fatto fluire all'interno del vaso e riversato nuovamente nella camera esterna.
- 4) Infine l'elettrovalvola IN, presente in ingresso del lato gas del deossigenatore è stata introdotta per controllare l'ingresso dei gas. In questa elettrovalvola sono alloggiati il tubo collegato al flussimetro dell' N_2 (indicato in figura con il simbolo B/V) e il tubo collegato al flussimetro dell'aria (indicato in figura con il simbolo S) Per la configurazione bypass e venoso sarà da mantenere pervio il tubo dell'azoto (B/V) mentre, per la configurazione standard sarà da mantenere pervio il tubo dell'aria (S).

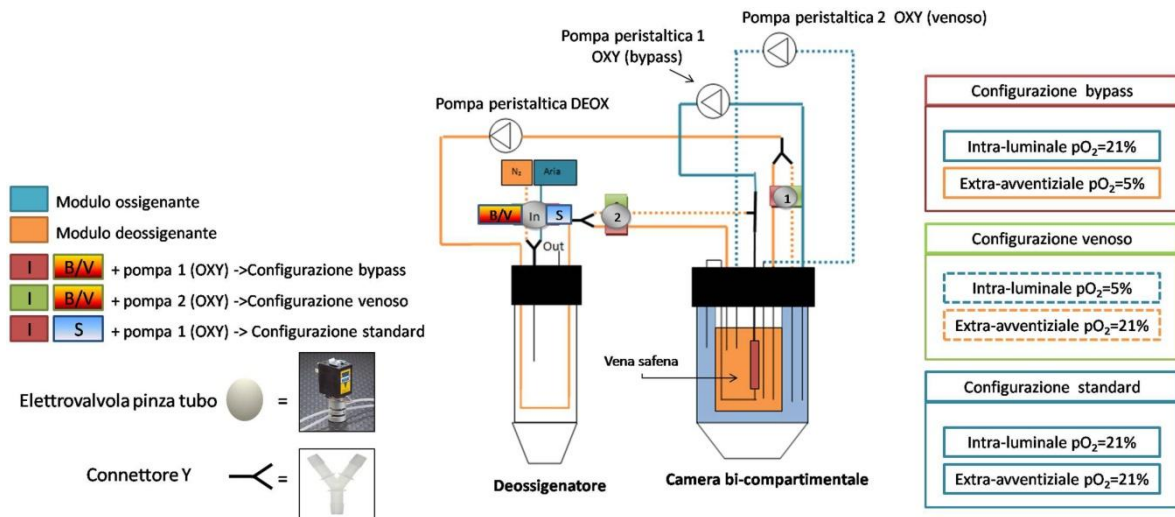


Figura 5.2 Evoluzione del sistema di coltura ex vivo. A sinistra la legenda per il comando dell'elettrovalvola n.1 e n.2 (rosso o verde) e dell'elettrovalvola In (B/V o S) (ovvero: lato rosso e lato BV per la configurazione bypass, lato verde e lato B/V per la configurazione venosa e lato rosso e lato S per la configurazione standard) e per il tipo di pompa OXY del modulo ossigenante da utilizzare al fine di ottenere le diverse configurazioni. In centro la schematizzazione del sistema. A destra le diverse configurazioni ottenibili (bypass, venoso e standard). Tale sistema permette, mediante il monitoraggio delle elettrovalvole visibili in figura, di generare 3 diverse configurazioni di coltura. Rispettivamente di tipo bypass (mantenendo pervi i tubi della configurazione bypass, quindi lato rosso delle elettrovalvole 1 e 2, il lato B/V dell'elettrovalvola IN del deossigenatore e attivando la pompa peristaltica 1 del modulo ossigenante), di tipo venoso (mantenendo pervi i tubi della configurazione venoso, quindi il lato verde dell'elettrovalvole 1 e 2, il lato B/V dell'elettrovalvola IN del deossigenatore e attivando la pompa 2 del circuito ossigenante) infine, di tipo standard (mantenendo la configurazione bypass ma con il tubo dell'aria (lato S dell'elettrovalvola IN del deossigenatore) pervio).

Le modifiche progettuali apportate al sistema ex vivo consentono di ottenere le 3 configurazioni mantenendo sempre lo stesso circuito. La configurazione bypass sarà ottenibile mantenendo pervi i tubi della configurazione bypass (“lato rosso” delle elettrovalvole n.1 e n.2, “lato B/V” dell'elettrovalvola IN del deossigenatore) e attivando la “pompa peristaltica OXY numero 1”. Mentre, la configurazione standard sarà ottenibile mantenendo la configurazione bypass ma lasciando pervio il tubo dell'aria (“lato S” dell'elettrovalvola IN del deossigenatore). Infine, la configurazione venosa sarà ottenibile mantendo pervi i tubi della configurazione venosa (“lato verde” dell'elettrovalvola n.1 e n.2, “lato B/V” dell'elettrovalvola IN del deossigenatore) e attivando la “pompa peristaltica OXY numero 2”, spegnendo quindi la “pompa OXY numero 1”.

Le nuove modifiche, seppure possano rendere il sistema più complesso, permettono di ottenere alcuni vantaggi, infatti, mediante questo sistema, sarà possibile gestire in maniera automatizzata le diverse configurazioni di coltura, cambiandole anche durante il periodo di coltura. Per esempio, questo sistema permetterebbe di studiare il danno da ri-perfusione

simulando il processo che subisce la vena safena durante l'intervento chirurgico. Tale sperimentazione sarebbe ottenibile mantenendo inizialmente il vaso in coltura in configurazione venosa (stato in cui si trova la vena prima di essere sfilata dalla gamba del paziente), successivamente, per qualche ora, in condizioni di ipossia totale, simulando così il periodo di ischemia che intercorre da quando il vaso viene sfilato dalla gamba a quando poi viene ripperfuso in sede coronarica, (configurazione ottenibile spegnendo le pompe OXY 1 e 2, mantenendo attivi sia il "lato rosso" che "lato verde" delle elettrovalvole 1 e 2 e mantendo pervio il tubo dell'azoto ("lato B/V" dell'elettrovalvola IN del deossigenatore)) ed infine, terminare il periodo di coltura in configurazione bypass.

Infine, per una migliore comprensione dei meccanismi alla base della patogenesi del *vein graft disease*, generato sia da stimoli biomeccanici, che da stimoli biochimici (precedentemente descritti *nel paragrafo 2.1 del Capitolo 2*), sarebbe opportuno integrare il sistema bicompartimentale con il sistema *ex vivo* (attualmente presente presso il μ BSLab) in grado di riprodurre i pattern di stimolazione pressoria arteriosa a cui è sottoposto *in vivo* il graft venoso a seguito del bypass [59, 61]. L'integrazione di questi due sistemi permetterebbe di creare un sistema *ex vivo* in grado di simulare le condizioni emodinamiche caratteristiche dell'ambiente arterioso coronarico ed inoltre le condizioni biochimiche a cui è soggetto il graft venoso a seguito nel bypass aorto-coronarico.

Dagli esperimenti condotti su campioni di vena safena umana, mantenuti per 7 giorni in condizioni di ossigenazione simili al bypass aorto-coronarico (pO_2 intra-luminale pari al 21% ed extra-avventiziale pari al 5%), è emerso che una carenza di ossigeno nella parete della vena safena può indurre un rimodellamento vascolare caratterizzato principalmente da fenomeni angiogenici e apoptotici con conseguente diminuzione della densità cellulare.

In particolare, dalla stima della densità cellulare, condotta per i campioni bypass, è emerso che i segmenti di vena safena al tempo 7 mostrano una diminuzione statisticamente significativa delle cellule presenti nella tunica media della parete del vaso.

Per valutare se la diminuzione della densità cellulare fosse legata all'apoptosi è stato effettuato il saggio TUNEL, che ha mostrato una tendenza all'aumento delle cellule apoptotiche e una loro marcata presenza nella zona della media della parete vascolare (*Figura 4.16, paragrafo 4.2.4 del Capitolo 4*). Il modello teorico (*descritto nel paragrafo 4.3 del capitolo 4*) ha confermato che, in condizioni di coltura di tipo bypass, nella media la pO_2 raggiunge un valore minimo pari a 0%, permettendo di ipotizzare che la morte

cellulare presente in questa tunica sia dovuta alla mancanza di O₂. Tale conclusione è in accordo con quanto dimostrato in letteratura [56]. Dove, precedenti studi, hanno riportato che mantenendo un condotto arterioso in ipossia è stata riscontrata apoptosi cellulare.

Per quanto riguarda l'analisi della formazione di nuovi vasi, è stata misurata la *length density* dei *vasa vasorum* (VV). Da tale indagine è risultato un aumento statisticamente significativo dei VV di piccola e media taglia nei campioni SV a 7 giorni di coltura. Questo tipo di fenomeno è riconducibile ad un adattamento delle cellule vascolari che, in condizioni di ipossia, attivano risposte angiogeniche atte a fornire nuovamente ossigeno e nutrimenti alla parete del vaso. I risultati ottenuti sono in accordo con quanto rilevato nel lavoro di Kuwahara e colleghi (*riportato nel paragrafo 2.2 del Capitolo 2*) [36] che dopo 3 giorni di ipossia generata un vaso arterioso hanno osservato uno sviluppo di VV.

Parallelamente, è stata valutata la proliferazione cellulare nella parete del vaso ed è stata fatta un'analisi quantitativa delle cellule proliferanti attorno ai VV, essendo l'aumento di tale fenomeno correlato all'angiogenesi. Tale analisi ha riportato un aumento delle cellule proliferanti in tutta la parete vascolare ed un aumento statisticamente significativo delle cellule proliferanti dei VV. Dati presenti in letteratura [36, 34] dimostrano che, in condizioni di ipossia, due tipi cellulari proliferano in modo più marcato: le EC, tramite l'attivazione di VEGF, per la formazione di nuovi VV e i fibroblasti che cambiano il loro fenotipo in miofibroblasti a elevata capacità proliferativa e migratoria. Osservando le immagini ottenute dalle analisi immunoistologiche per la proliferazione cellulare (Ki67) (*Figura 4.18 presente nel paragrafo 4.25 del Capitolo 4*), si può quindi ipotizzare che siano queste cellule, presenti nell'avventizia del vaso, ad aumentare l'indice di proliferazione nelle condizioni bypass analizzate.

Per una completa comprensione di questo “meccanismo di adattamento” andrebbero condotte ulteriori analisi. In primo luogo sarebbe necessario identificare la presenza dei principali fattori di trascrizione coinvolti nell'angiogenesi indotta da ipossia, ovvero HIF-1 α e VEGF [36]. Successivamente, sarebbe interessante studiare i cambiamenti dell'espressione e dell'attivazione delle metalloproteasi (MMP-2 e MMP-9), poiché la migrazione delle EC verso l'area destinata ad ospitare il nuovo vaso, avviene attraverso la matrice extracellulare precedentemente degradata dalle MMPs [55]. Inoltre, potrebbe essere utile valutare l'evoluzione del rimodellamento della parete vascolare mantenendo in coltura i vasi per tempi superiori ai 7 giorni.

Oltre a questo, per confermare che le cellule si trovano in una condizione di ipossia si potrebbe eseguire un saggio per misurare le concentrazioni di lattato, poiché durante il metabolismo anaerobico le cellule rilasciano cataboliti come l'acido lattico. Nel caso in cui tale analisi risultasse troppo complessa per via della ridotta concentrazione di lattato nel mezzo di coltura, si potrebbero effettuare analisi più accurate come la PCR quantitativa su enzimi glicolitici per valutare se vi è un aumento del metabolismo.

Infine, andrebbero svolte ulteriori analisi dell'indice di proliferazione suddividendo la parete vascolare nelle tre tuniche per quantificare le cellule proliferanti presenti in ogni singola zona. Questa analisi potrebbe essere interessante poiché, nonostante sia evidente che l'aumento della proliferazione cellulare sia legato alla nascita di nuovi VV, si potrebbe riscontrare un aumento delle cellule proliferanti a livello dell'intima. Tale fenomeno, come dimostrato nel lavoro di Joddar e collaboratori [32], potrebbe essere correlato alla formazione di neointima causata dalla pO_2 intraluminale arteriosa. La formazione di neointima non è stata riscontrata dall'osservazione delle immagini di campioni bypass sottoposti a colorazioni H&E, ma questo non è tuttavia sufficiente a escluderne la generazione che andrebbe valutata su campioni di SV in cui viene marcata l'elastina [32]. Mediante questo tipo di colorazione, infatti, è possibile identificare le lamine elastiche che dividono le tuniche della parete del vaso e misurare quindi, tramite l'utilizzo del software Image-J, l'area dell'intima (identificabile come la zona interposta tra la lamina elastica interna e la lamina elastica esterna) dei campioni al tempo 0 e al tempo 7.

Dalle analisi condotte per i campioni standard è emerso che dopo 7 giorni di coltura si assiste ad una diminuzione statisticamente significativa delle cellule SMC nella media e nell'avventizia della parete del vaso. La negatività del saggio TUNEL, la presenza non significativa di cellule proliferanti e nessun aumento dei VV portano a pensare che queste cellule siano morte per necrosi.

Nel caso in cui la diminuzione della densità cellulare sia legata alla morte per necrosi, questa potrebbe essere causata dal "danno da ri-perfusione" che provoca stress ossidativo [28, 45]. Il danno da ri-perfusione si verifica quando l'ossigeno è reintrodotta nell'area ischemica di un tessuto attraverso il ripristino della circolazione. Questa ri-perfusione di O_2 innesca la produzione delle ROS (specie reattive all'ossigeno) che danneggiano il tessuto ischemico. Per quanto riguarda la vena safena, il danno si genera al momento dell'estrazione del vaso dalla gamba del paziente e prosegue durante la ri-perfusione nel

sistema *ex vivo* (ambiente con pO₂ pari al 21%). In questo contesto, il danno è duplice, in quanto la vena passa da una pO₂ intra-luminale fisiologica, pari circa al 5%, ad un periodo di ischemia fino ad essere ri-perfusa con una pO₂ superiore rispetto alla fisiologica (pO₂ arteriosa pari circa al 21%).

Per indagare se effettivamente nelle condizioni biochimiche di coltura di tipo standard il vaso vada incontro a stress ossidativo, come è stato riportato nel lavoro di Firstenberg e collaboratori [45] (*paragrafo 2.1.1 del capitolo 2*), andrebbero condotte analisi per valutare la presenza delle ROS nella parete vascolare [45]. Infatti, all'interno di questo studio i ricercatori dopo avere mantenuto in coltura, per sette giorni, un segmento di vena safena in condizioni biochimiche che simulano l'ambiente arterioso hanno verificato, mediante indagini in immunofluorescenza, la presenza di ROS nella parete del vaso.

La diminuzione della densità cellulare osservata nei campioni standard permette di concludere che, in accordo con quanto presente in letteratura [32], le condizioni biochimiche di coltura possano indurre cambiamenti a livello tissutale. Pertanto negli studi su VGD, mediante sistemi di coltura *ex vivo*, oltre a tenere in considerazione l'aspetto emodinamico dell'ambiente coronarico va considerato anche quello biochimico.

Infine, dalle analisi condotte per i campioni venosi, è emerso che dopo 7 giorni di coltura i campioni non mostrano rimodellamento vascolare. Le immagini istologiche mostrano che la struttura caratteristica della parete del vaso viene mantenuta, le SMC e le fibre muscolari mantengono un allineamento circonferenziale lungo il lume e l'avventizia risulta preservata. Dalla stima della densità cellulare non sono emersi cambiamenti significativi tra i campioni t0 e t7, così come la misura della *length density* non ha riportato aumenti significativi dei VV. La mancanza di un rimodellamento vascolare può essere attribuibile, al fatto che il campione sia stato mantenuto in condizioni fisiologiche di coltura e che pertanto tali condizioni non abbiano indotto cambiamenti morfologici. Tale ipotesi sarebbe in accordo con i dati presenti in letteratura [32] (*paragrafo 2.1.1 e 2.1.2 del capitolo 2*), dove nello studio di Joddar è stato osservato che mantenendo in coltura, per sette giorni, un segmento di vena safena all'interno di un sistema *ex vivo* che simula le condizioni biochimiche dell'ambiente venoso, non sono stati osservati rimodellamenti vascolari.

Per confermare quanto ipotizzato fino adesso, andrebbero condotte analisi più approfondite come colorazioni in IF, saggio TUNEL e analisi per la proliferazione cellulare.

Lo sviluppo del modello teorico ha permesso di studiare l'andamento della pO_2 attraverso la parete di un vaso posto nelle diverse condizioni biochimiche di coltura. Durante la simulazione di questo modello è stato riscontrato che i valori di pO_2 , ottenuti al variare del raggio del vaso, sono strettamente influenzati da diversi parametri: il consumo cellulare, il coefficiente di diffusione dell' O_2 e lo spessore della parete del vaso. Si ritiene che i risultati del modello vadano assunti come qualitativi, poiché, per la sua realizzazione sono state fatte molteplici assunzioni. Prima di tutto è stata ipotizzata una simmetria cilindrica del vaso e la misura del raggio interno ed esterno del vaso sono state ottenute da immagini istologiche di campioni SV sottoposte a colorazione H&E, mediante l'utilizzo del software AxioVision. Va considerato che la misura del raggio può essere stata compromessa dal fatto che sia difficile ottenere delle istologie in cui la sezione del vaso resta perfettamente circolare; infatti, durante il taglio delle sezioni SV possono verificarsi dei piccoli ripiegamenti del tessuto che possono facilmente variare la geometria del vaso. Tale limite si potrebbe superare mantenendo i vasi in pressioni prima di fissarli: in modo tale da evitare che il vaso modifichi la sua geometria.

Oltre a questo, va considerato che, per semplicità di calcolo, all'interno del modello è stato utilizzato un unico coefficiente di diffusione dell' O_2 , sia per la parete vascolare che per il terreno di coltura. Per rendere il modello più affidabile, sarebbe dunque necessario utilizzare due diversi coefficienti di diffusione per i due compartimenti: uno per il coefficiente di diffusione dell' O_2 nel terreno di coltura (pari a $3.24 \times 10^{-1} \text{cm}^2/\text{s}$ [14]) e l'altro per il coefficiente di diffusione dell' O_2 all'interno del tessuto vascolare (pari a 1.04×10^{-5}) (Figura 5.3).

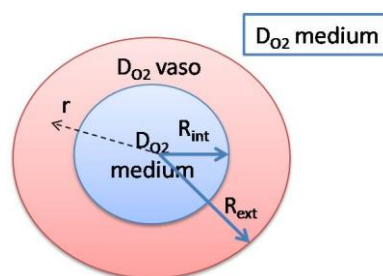


Figura 5.3 Rappresentazione schematica delle condizioni al contorno da introdurre nel modello matematico. L' O_2 all'interno del lume e all'esterno del vaso ($r < R_{int}$ e $r > R_{ext}$) diffonde nel medium (coefficiente di diffusione dell' O_2 nel medium) mentre, nella parete vascolare ($R_{int} < r < R_{ext}$) diffonde con un coefficiente di diffusione relativo al tessuto vascolare.

Infine, il consumo cellulare dell'intero vaso è stato calcolato come il prodotto tra la densità cellulare volumetrica ed il consumo di una singola cellula, assumendo una distribuzione cellulare omogenea su tutto il tessuto vascolare. Essendo il modello dipendente anche dal consumo cellulare, per una maggiore affidabilità dei risultati, si potrebbe calcolare il consumo di tutto il segmento di vena safena misurando, a monte e a valle del vaso, la concentrazione di O₂ presente nel terreno di coltura, ottenendo dalla differenza dei due il consumo cellulare di O₂ effettivo.

In futuro, sarebbe interessante implementare il modello, attraverso le migliorie proposte, ma tale modello si è rivelato tuttavia sufficiente a confermare la presenza di ipossia nelle condizioni bypass studiate.

In conclusione, in questo lavoro di tesi, è stato valutato se il rimodellamento vascolare del graft venoso sia indotto, oltre che (come già stato dimostrato da diversi lavori di letteratura [50]) dalle condizioni emodinamiche arteriose, anche da quelle biochimiche. Simulando le condizioni biochimiche cui è esposta la vena safena in sede coronarica è stato osservato che vi è un rimodellamento vascolare caratterizzato da angiogenesi, proliferazione e apoptosi delle cellule. È interessante notare che tali processi potrebbero avere effetti sia positivi che negativi sull'impianto. In particolare, l'angiogenesi può partecipare ad un ripristino della microcircolazione deputata all'apporto di ossigeno alla parete vascolare ischemica, mentre l'iper-proliferazione può risultare anche dannosa, partecipando all'ispessimento, irrigidimento e stenosi della parete vasale e alla formazione della placca aterosclerotica. L'apoptosi può inserirsi in questi processi da una parte controbilanciando la tendenza iper-proliferativa, dall'altra esacerbando il danno con conseguenze anche gravi, come la rottura della placca e la calcificazione dei vasi [66, 67].

I dati presentati in questo lavoro, seppur preliminari, rappresentano un punto di partenza per la comprensione di quali siano le condizioni ottimali per studiare il VGD includendo anche gli aspetti relativi alle condizioni di ossigenazione del vaso. Le analisi proposte come sviluppi futuri permetterebbero di comprendere in maniera più esaustiva i meccanismi alla base dei fenomeni osservati, implementando quindi il lavoro svolto.

APPENDICE -Protocolli biologici

Colorazione ematossilina/eosina:

1) Sparaffinare i vetrini:

Xilolo 1 6'

Xilolo 2 6'

Alcool assoluto 3'

Alcool 95% 3'

Alcool 75% 3'

Alcool 50% 3'

Acqua demineralizzata 3'

2) Ematossilina (Emallume sol. sec. Mayer) 3'

Passaggio veloce in acqua

3) Eosina (200 ml di H₂O demineralizzata + 7 ml di eosina soluzione acquosa madre all'1%) 5'

Lavaggio

4) Disidratazione:

Alcool 80% 30''

Alcool 95% 30''

Alcool assoluto 1'

Lasciar scolare bene

Xilolo 1 5'

Xilolo 2 5'

5) Montaggio con balsamo del Canada.

Colorazione tricromica di Masson (kit Bio-Optica):

1) Sparaffinare i vetrini:

Xilolo 1 6'

Xilolo 2 6'

Alcool assoluto 3'

Alcool 95% 3'

Alcool 75% 3'

Alcool 50% 3'

Acqua demineralizzata 3'

2) Colorazione

-Coprire ogni sezione con 6 gocce del reagente A

- Aggiungere 6 gocce del reagente B 10'

- Asciugare il vetrino senza lavarlo

- Aggiungere 10 gocce del reagente C 4'

- Lavare velocemente in acqua demineralizzata

- Aggiungere 10 gocce del reagente D 4'

- Lavare in acqua demineralizzata

- Aggiungere 10 gocce del reagente E 10'

- Asciugare il vetrino senza lavarlo

- Aggiungere 10 gocce del reagente F 5'

- Lavare in acqua demineralizzata

3) Disidratazione:

Alcool 80% 30''

Alcool 95% 30''

Alcool assoluto 1'

Lasciar scolare bene

Xilolo 1 5'

Xilolo 2 5'

4) Montaggio con balsamo del canada

Immunoistochimica con DAB per Ki67:

1)Riscaldare le sezioni in stufa a 60°C per 30'

2)Preriscaldare la soluzione di sodio citrato fino a bollore

3)Reidratarle le sezioni:

Xilolo 1 6'

Xilolo 2 6'

EtOH 100% 3'

EtOH 95% 3'

EtOH 75% 3'

EtOH 50% 3'

ddH₂O 3'

- 4) Smascheramento dell'antigene: 15' in microonde a 750 watt in tampone citrato (10 mM Sodio citrato, 0.05% tween 20 a pH6)
- 5) Diluire con acqua demineralizzata e far raffreddare 30'
- 6) Contornare le sezioni con la pap-pen
- 7) Incubare le sezioni in H₂O₂ 3%, 0.1% NaN₂ 20'
- 8) Lavaggio rapido in PBS
- 9) Bloccare con stock serum (kit) 30' RT
- 10) Lavaggio rapido in PBS
- 11) Blocco biotina/avidina:
- 12) Blocco avidina D 15' RT
- 12) Lavaggio rapido
- 13) Blocco biotina 15' RT
- 14) Lavaggio rapido
- 15) Incubazione anticorpo primario: Ki67 (Abcam, Cambridge, UK, ab15580), 1:200 in stock serum, 1h RT
- 16) Lavaggio in PBS 5'
- 17) Incubazione anticorpo secondario: ab II° del kit, 1:200 in PBS, 30' RT
- 18) Preparare vectastain ABC reagent: diluire reagente A 1:100 in PBS, agitare bene, aggiungere reagente B 1:100, lasciare a RT 30' prima dell'uso
- 19) Lavaggio in PBS 5'
- 20) Incubare 30' con vectastain ABC reagent a RT
- 21) Lavaggio in PBS 5'
- 22) Incubazione con DAB (SK-4100, Vector Laboratories):
- 23) Diluire in ddH₂O
- 24) Buffer solution 1:50
- 25) DAB solution 1:25
- 26) H₂O₂ solution 1:100
- 27) Ni solution 1:50
- 28) Guardare al microscopio per il tempo esatto di incubazione
- 29) Lavaggio in PBS 5'
- 30) Incubare in Ematossilina 8''-15''

31) Lavare bene in acqua cambiando l'acqua più volte 10'

32) Deidratare velocemente:

EtOH 80% pochi secondi

EtOH 95% pochi secondi

EtOH 100% 1'

Xilolo

33) Montare con balsamo del Canada.

34) Incubare le sezioni in H₂O₂ 3%, 0.1% NaN₃ 20'

Bibliografia

1. Guyton, A.C. and J.E. Hall, *Fisiologia Medica*. 2006: EdiSES.
2. Mezurek, T., Zhang, L., Zalewsky, A., Mannion, J.D., Diehl, J.T., Arafat, H., Human Epicardial Adipose Tissue Is A Source of Inflammatory Mediators. *Circulation*, 2003; 108:2460-2466.
3. Iacobellis, G., Corradi, D., & Sharma, A. M. (2005). Epicardial adipose tissue: anatomic, biomolecular and clinical relationships with the heart. *Nature clinical practice Cardiovascular medicine*, 2(10), 536-543.
4. Schaper, W. (1971). *The collateral circulation of the heart* (Vol. 1). North-Holland Pub. Co.
5. Annuario statistico italiano Istat 2013
6. Go, A. S., Mozaffarian, D., Roger, V. L., Benjamin, E. J., Berry, J. D., Borden, W. B., ... & Stroke, S. S. (2013). Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, 127(1), e6.
7. Munther K. Homoud, MD Coronary Artery Disease Tufts-New England medical Center Spring 2008.
8. Gulati, R., Rihal, C. S., & Gersh, B. J. (2009). The SYNTAX Trial A Perspective. *Circulation: Cardiovascular Interventions*, 2(5), 463-467.
9. Grainger, D. J., Metcalfe, J. C., & Weissberg, P. L. (1996). *U.S. Patent No. 5,545,569*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
10. Acharya, G., & Park, K. (2006). Mechanisms of controlled drug release from drug-eluting stents. *Advanced drug delivery reviews*, 58(3), 387-401.
11. Rashid, S. T., Fuller, B., Hamilton, G., & Seifalian, A. M. (2008). Tissue engineering of a hybrid bypass graft for coronary and lower limb bypass surgery. *The FASEB Journal*, 22(6), 2084-2089.
12. Xue, L., & Greisler, H. P. (2003). Biomaterials in the development and future of vascular grafts. *Journal of vascular surgery*, 37(2), 472-480.
13. Piola, M., Soncini, M., Prandi, F., Polvani, G., Beniamino Fiore, G., & Pesce, M. (2012). Tools and procedures for ex vivo vein arterialization, preconditioning and tissue engineering: a step forward to translation to combat the consequences of

- vascular graft remodeling. *Recent patents on cardiovascular drug discovery*, 7(3), 186-195.
14. Fondamenti di ingegneria dei tessuti per la medicina rigenerativa. Pàtron, 2009.
Barron, V., Lyons, E., Stenson-Cox, C., McHugh, P. E., & Pandit, A. (2003). Bioreactors for cardiovascular cell and tissue growth: a review. *Annals of biomedical engineering*, 31(9), 1017-1030.
 15. Barron V, Lyons E, Stenson-Cox C, McHugh PE, Pandit A., *Bioreactors for cardiovascular cell and tissue growth: A review*. Ann Biomed Engin 2003; 31(9):p. 1017-30.
 16. Dashwood, M. R., & Loesch, A. (2009). The saphenous vein as a bypass conduit: the potential role of vascular nerves in graft performance. *Current vascular pharmacology*, 7(1), 47-57.
 17. Weinberg CB, Bell E. A blood vessel model constructed from collagen band cultured vascular cells. *Science*, 1986;231: p.397-400.
 18. L'Heureux, N., Dusserre, N., Konig, G., Victor, B., Keire, P., Wight, T. N., ... & McAllister, T. N. (2006). Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization. *Nature medicine*, 12(3), 361-365
 19. McAllister, T. N., Maruszewski, M., Garrido, S. A., Wystrychowski, W., Dusserre, N., Marini, A., ... & L'Heureux, N. (2009). Effectiveness of haemodialysis access with an autologous tissue-engineered vascular graft: a multicentre cohort study. *The Lancet*, 373(9673), 1440-1446
 20. Biomeccanica: analisi multiscala di tessuti biologici. Pàtron, 2007.
 21. Longchamp, A., Alonso, F., Dubuis, C., Allagnat, F., Berard, X., Meda, P., ... & Haefliger, J. A. (2014). The use of external mesh reinforcement to reduce intimal hyperplasia and preserve the structure of human saphenous veins. *Biomaterials*, 35(9), 2588-2599.
 22. Khaleel, M. S., Dorheim, T. A., Duryee, M. J., Thiele, G. M., & Anderson, D. R. (2013). Saphenous Vein Conduit in Coronary Artery Bypass Surgery—Patency Rates and Proposed Mechanisms for Failure.
 23. Lescalié, F., Germouty, I., Chevalier, J. M., Enon, B., Moreau, P., & Pillet, J. (1986). Extrinsic arterial supply of the great saphenous vein: an anatomic study. *Annals of vascular surgery*, 1(2), 273-277.

24. Barker, S. G., Talbert, A., Cottam, S., Baskerville, P. A., & Martin, J. F. (1993). Arterial intimal hyperplasia after occlusion of the adventitial vasa vasorum in the pig. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 13(1), 70-77.
25. Stefanadis, C., Vlachopoulos, C., Karayannacos, P., Boudoulas, H., Stratos, C., Filippides, T., ... & Toutouzas, P. (1995). Effect of vasa vasorum flow on structure and function of the aorta in experimental animals. *Circulation*, 91(10), 2669-2678.
26. Thatte, H. S., & Khuri, S. F. (2001). The coronary artery bypass conduit: I. Intraoperative endothelial injury and its implication on graft patency. *The Annals of thoracic surgery*, 72(6), S2245-S2252.
27. Dashwood, M. R., & Loesch, A. (2009). The saphenous vein as a bypass conduit: the potential role of vascular nerves in graft performance. *Current vascular pharmacology*, 7(1), 47-57.
28. Fitzgibbon, G. M., Kafka, H. P., Leach, A. J., Keon, W. J., Hooper, G. D., & Burton, J. R. (1996). Coronary bypass graft fate and patient outcome: angiographic follow-up of 5,065 grafts related to survival and reoperation in 1,388 patients during 25 years. *Journal of the American College of Cardiology*, 28(3), 616-626.
29. Dashwood, M. R., & Tsui, J. C. (2013). 'No-touch'saphenous vein harvesting improves graft performance in patients undergoing coronary artery bypass surgery: A journey from bedside to bench. *Vascular pharmacology*, 58(3), 240-250.
30. Muto, A., Model, L., Ziegler, K., Eghbalieh, S. D., & Dardik, A. (2010). Mechanisms of vein graft adaptation to the arterial circulation: insights into the neointimal algorithm and management strategies. *Circulation journal: official journal of the Japanese Circulation Society*, 74(8), 1501.
31. Dummler, S., Eichhorn, S., Tesche, C., Schreiber, U., Voss, B., Deutsch, M. A., ... & Krane, M. (2011). Pulsatile ex vivo perfusion of human saphenous vein grafts under controlled pressure conditions increases MMP-2 expression. *Biomedical engineering online*, 10.
32. Joddar, B., Shaffer, R. J., Reen, R. K., & Gooch, K. J. (2011). Arterial pO₂ stimulates intimal hyperplasia and serum stimulates inward eutrophic remodeling in porcine saphenous veins cultured ex vivo. *Biomechanics and modeling in mechanobiology*, 10(2), 161-175.

33. Stenmark, K. R., Fagan, K. A., & Frid, M. G. (2006). Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling cellular and molecular mechanisms. *Circulation research*, 99(7), 675-691.
34. Misra, S., Fu, A. A., Misra, K. D., Shergill, U. M., Leof, E. B., & Mukhopadhyay, D. (2010). Hypoxia induces a phenotypic switch of fibroblasts to myofibroblasts through a MMP-2/TIMP mediated pathway: Implications for venous neointimal hyperplasia in hemodialysis access. *Journal of vascular and interventional radiology: JVIR*, 21(6), 896.
35. Greijer, A. E., & Van der Wall, E. (2004). The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *Journal of clinical pathology*, 57(10), 1009-1014..
36. Fumitaka Kuwahara et al, Hypoxia inducible factor-1 α /Vascular endothelial growth factor pathway for adventitial vasa vasorum formation in hypertensive rat aorta. *Hypertension* 2002;39.46-50
37. Olsson, A. K., Dimberg, A., Kreuger, J., & Claesson-Welsh, L. (2006). VEGF receptor signalling In control of vascular function. *Nature reviews Molecular cell biology*, 7(5), 359-371.
38. Soyombo, A. A., Angelini, G. D., Bryan, A. J., Jasani, B., & Newby, A. C. (1990). Intimal proliferation in an organ culture of human saphenous vein. *The American journal of pathology*, 137(6), 1401.
39. Berard, X., Déglise, S., Alonso, F., Saucy, F., Meda, P., Bordenave, L., ... & Haefliger, J. A. (2013). Role of hemodynamic forces in the ex vivo arterialization of human saphenous veins. *Journal of vascular surgery*, 57(5), 1371-1382.
40. Joddar, B., Shaffer, R. J., Reen, R. K., & Gooch, K. J. (2011). Arterial pO₂ stimulates intimal hyperplasia and serum stimulates inward eutrophic remodeling in porcine saphenous veins cultured ex vivo. *Biomechanics and modeling in mechanobiology*, 10(2), 161-175.
41. Carrel, A., & Guthrie, C. C. (1906). Anastomosis of blood vessels by the patching method and transplantation of kidney. *Journal of the American Medical Association*, 47(20), 1648-1651.
42. Déglise, S., Martin, D., Probst, H., Saucy, F., Hayoz, D., Waeber, G., ... & Haefliger, J. A. (2005). Increased connexin43 expression in human saphenous veins

- in culture is associated with intimal hyperplasia. *Journal of vascular surgery*, 41(6), 1043-1052.
43. Mekontso-Dessap, A., Kirsch, M., Guignambert, C., Zadigue, P., Adnot, S., Loisanche, D., & Eddahibi, S. (2006). Vascular-wall remodeling of 3 human bypass vessels: organ culture and smooth muscle cell properties. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 131(3), 651-658.
 44. Klaus Kallenbach et al., *inhibition of SMC migration and neointima formation in vein grafts by over expression of matrix metalloproteinase-1* Vasc Surg., 2009; 43(3).
 45. Joddar, B., Reen, R. K., Firstenberg, M. S., Varadharaj, S., McCord, J. M., Zweier, J. L., & Gooch, K. J. (2011). Protandim attenuates intimal hyperplasia in human saphenous veins cultured ex vivo via a catalase-dependent pathway. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(6), 700-709..
 46. Castronuovo Jr, J. J., Smith, T. J., & Price, R. M. (2002). Validation of an in vitro model of human saphenous vein hyperplasia. *Journal of vascular surgery*, 35(1), 152-157..
 47. Porter, K. E., Nydahl, S., Dunlop, P., Varty, K., Thrush, A. J., & London, N. J. (1996). The development of an in vitro flow model of human saphenous vein graft intimal hyperplasia. *Cardiovascular research*, 31(4), 607-614.
 48. Stooker, W., Niessen, H. W. M., Van Hinsbergh, V. W. M., Wildevuur, C. R. H., & Eijssman, L. (2001). Perivenous support reduces early changes in human vein grafts: studies in whole blood perfused human vein segments. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 121(2), 290-297.
 49. Berard, X., Déglise, S., Alonso, F., Saucy, F., Meda, P., Bordenave, L., ... & Haefliger, J. A. (2013). Role of hemodynamic forces in the ex vivo arterialization of human saphenous veins. *Journal of vascular surgery*, 57(5), 1371-1382.
 50. Piola, M., Prandi, F., Bono, N., Soncini, M., Penza, E., Agrifoglio, M., ... & Fiore, G. B. (2013). A compact and automated ex vivo vessel culture system for the pulsatile pressure conditioning of human saphenous veins. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*.
 51. Stenmark, K. R., Fagan, K. A., & Frid, M. G. (2006). Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling cellular and molecular mechanisms. *Circulation research*, 99(7), 675-691.

52. Short, M., Nemenoff, R. A., Zawada, W. M., Stenmark, K. R., & Das, M. (2004). Hypoxia induces differentiation of pulmonary artery adventitial fibroblasts into myofibroblasts. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 286(2), C416-C425.
53. Kannan, K., & Jain, S. K. (2000). Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology*, 7(3), 153-163.
54. Greijer, A. E., & Van der Wall, E. (2004). The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *Journal of clinical pathology*, 57(10), 1009-1014.
55. Mascarin, A. (2010). COINVOLGIMENTO DEL RECETTORE-2 DI VEGF NELL'EFFETTO PRO-ANGIOGENICO INDOTTO IN CELLULE ENDOTELIALI UMANE DA AGONISTI DEL COMPLESSO RECETTORIALE CRLR/RAMP-2.
56. Kajino, H., Goldbarg, S., Roman, C., Liu, B. M., Mauray, F., Chen, Y. Q., ... & Clyman, R. I. (2002). Vasa vasorum hypoperfusion is responsible for medial hypoxia and anatomic remodeling in the newborn lamb ductus arteriosus. *Pediatric research*, 51(2), 228-235.
57. Dolbier Jr, W. R., Li, A. R., Koch, C. J., Shiue, C. Y., & Kachur, A. V. (2001). [¹⁸F]-EF5, a marker for PET detection of hypoxia: synthesis of precursor and a new fluorination procedure. *Applied Radiation and Isotopes*, 54(1), 73-80.
58. Brahim-Horn, M. C., Chiche, J., & Pouysségur, J. (2007). Hypoxia and cancer. *Journal of molecular medicine*, 85(12), 1301-1307.
59. BRESCIANI, E. (2013). Sviluppo di un sistema di coltura bicompartimentale per lo studio ex vivo del vein graft disease in segmenti di vena safena.
60. Pesce M, Orlandi A, Iachininoto MG, Straino S, Torella AR, Rizzuti V, Pompilio G, Bonanno G, Scambia G, Capogrossi MC. 2003, Myoendothelial differentiation of human umbilical cord blood-derived stem cells in ischemic limb tissues, *Circ Res*, 93: e51-62.
61. PIOLA, M. (2013). A bioengineering approach aimed at understanding the role of hemodynamic forces acting on human saphenous vein after coronary artery by-pass grafting (Doctoral dissertation, Italy).

62. Krogh A. 1919, The supply of oxygen to the tissues and the regulation of the capillary circulation, *J Physiol*,**52**: 457-74.
63. Weibel ER. 1984. The pathway for oxygen : structure and function in the mammalian respiratory system. Cambridge, Mass.; Lonodn: Harvard University Press. xv, 425 p. p.
64. Motterlini R, Kerger H, Green CJ, Winslow RM, Intaglietta M. 1998, Depression of endothelial and smooth muscle cell oxygen consumption by endotoxin, *The American journal of physiology*,**275**: H776-82.
65. West MJ. 1999, Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias, *Trends in Neurosciences*,**22**: 51-61.
66. Bennett, M. R. (1999). Apoptosis of vascular smooth muscle cells in vascular remodelling and atherosclerotic plaque rupture. *Cardiovascular research*, *41*(2), 361-368.
67. Son, D. J., Ha, S. J., Song, H. S., Lim, Y., Yun, Y. P., Lee, J. W., ... & Hong, J. T. (2006). Melittin inhibits vascular smooth muscle cell proliferation through induction of apoptosis via suppression of nuclear factor- κ B and Akt activation and enhancement of apoptotic protein expression. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *317*(2), 627-634.
68. Croll TI, Gentz S, Mueller K, Davidson M, O'Connor AJ, Stevens GW, Cooper-White JJ. 2005, Modelling oxygen diffusion and cell growth in a porous, vascularising scaffold for soft tissue engineering applications, *Chemical Engineering Science*,**60**: 4924-4934