



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

**Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova**

Dipartimento di Scienze del Farmaco

---

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA E MEDICINA DELLA  
RIGENERAZIONE  
CICLO XXVI

**SOSTITUTI BIOLOGICI VASCOLARI A BASE DI ACIDO IALURONICO**

**Direttore della Scuola:** Ch.ma Prof.ssa Maria Teresa Conconi

**Supervisore:** Ch.mo Dott. Vincenzo Vindigni

**Dottoranda:** Dott.ssa Laura Pandis



## SOMMARIO

Riassunto

Abstract

1.Introduzione .....	1
1.1. Il Tessuto Vascolare .....	1
1.1.1. Anatomia dei vasi arteriosi e venosi .....	1
1.1.2. Fisiologia dell'apparato vascolare .....	18
1.2. L'Ingegneria Tissutale e la medicina rigenerativa .....	16
1.3.1.Generalità .....	16
1.3.2.I biomateriali .....	16
1.3.3.L'acido ialuronico .....	18
1.3. Prodotti dell'ingegneria tissutale per la sostituzione di vasi di piccolo calibro .....	20
Generalità .....	20
Gli scaffold .....	23
1.4.Gli impianti vascolari a base di acido ialuronico .....	26
2. Progettazione e Scopo della tesi .....	27
3. Materiali e metodi .....	29
Impianto di patch arterioso a base di acido ialuronico nella aorta addominale del ratto .....	29
Impianto del condotto tubulare a base di acido ialuronico nella vena cava del ratto .....	31
Sostituzione del peduncolo vascolare nel lembo libero del coniglio .....	32
4. Risultati .....	33
Osservazioni su patch arterioso a base di acido ialuronico nell'aorta addominale del ratto .....	33
Osservazioni sul condotto tubulare a base di acido ialuronico nella vena cava del ratto .....	34
Osservazioni sulla sostituzione del peduncolo vascolare nel lembo libero del coniglio .....	36
5. Discussione e conclusioni .....	37
6. Bibliografia .....	41



## **RIASSUNTO**

Il ritrovamento di un adeguato sostituto per la rigenerazione dei vasi di piccolo calibro è diventato uno degli argomenti più dibattuti in letteratura negli ultimi anni. Questo in virtù dei recenti progressi della medicina rigenerativa, che offre nuove applicazioni cellulari e biomateriali, e delle vaste applicazioni cliniche che questo presidio potrebbe avere, che spaziano dalla sostituzione dei vasi coronarici e periferici alla correzione di malformazioni vascolari in pazienti pediatriche. I biomateriali finora utilizzati per le protesi vascolari di largo calibro hanno dato risultati deludenti quando applicate in vasi con diametro inferiore ai 6 mm portando inevitabilmente alla occlusione del lume vasale in brevi periodi. La ricerca di un prodotto ideale in questo campo è resa difficoltosa dalla complessità dell'argomento che presenta diverse problematiche a se stanti come lo studio delle interazioni cellulari (cellule vasali-cellule sanguigne), delle proprietà meccaniche, dei modelli sperimentali in vivo ed in vitro. In questo studio osservazionale si è voluto testare un biomateriale a base di acido ialuronico in tre diversi modelli sperimentali con lo scopo di sviluppare un modello di guarigione tissutale, provare la rigenerazione venosa e la funzionalità di questo costruito in condizioni simili a quelle della pratica clinica. Lo studio si è strutturato in 3 progetti diversi condotti su modelli animali. Nel primo progetto delle lamine di acido ialuronico sono state utilizzate per riparare dei difetti sulla parete vascolare della aorta addominale del ratto. Sono stati operati 20 animali (250-350 gr). Dopo isolamento dell'aorta addominale si è aperta una breccia in essa (1 x 5 mm) e si è riparato il difetto posizionando la lamina di acido ialuronico. Si sono valutati i campioni tissutali dopo il loro espanto a 1, 2, 4, 8 e 16 settimane con preparati istologici e di immunoistochimica. Nel secondo progetto un condotto tubulare di acido ialuronico (2 mm diametro per 1.5 cm lunghezza) è stato interposto dopo interruzione della vena cava del ratto come una guida riassorbibile per la rigenerazione venosa. I campioni tissutali sono stati valutati dopo 30, 90 e 60 giorni con metodiche istologiche ed immunoistochimiche. Nel terzo progetto i condotti di acido ialuronico sono stati interposti nei vasi componenti il peduncolo vascolare di un trapianto libero (lembo inguinale) nel coniglio. Sono stati operati 16 animali, 8 di essi hanno costituito un gruppo di controllo dove sono state eseguite e delle microanastomosi senza interposizione del condotto. La vitalità dei lembi è stata valutata dopo 1, 2 e 3 settimane dall'intervento. Rispettivamente si è rilevata nello studio con le lamine una progressiva rigenerazione del vaso arterioso con tutte le sue componenti, partendo dalla tonaca intima e avventiziale e proseguendo con la tonaca muscolare. Dopo 16 settimane il biomateriale è stato completamente degradato e sostituito dalla neoparete composta da cellule endoteliali, muscolari lisce, collagene ed elastina organizzati in strati ordinati. Nel progetto con l'impianto di condotti in sede venosa si è documentata la progressiva rigenerazione venosa già completa dopo 30 giorni dall'impianto ma consolidata a 60. La degradazione totale dopo 4 mesi ha fornito un ambiente protetto per la rigenerazione durante le fasi iniziali. Nel ultimo progetto tutti i lembi si sono dimostrati vitali dopo 3 settimane dall'impianto nel caso della sostituzione arteriosa e nei controlli,  $\frac{3}{4}$  di essi erano vitali nel caso della sostituzione venosa. Sono state registrate alcune complicanze quali la deiscenza della ferita chirurgica e la formazione di sieromi, che tuttavia non appaiono correlate alla protesi impiantata ma all'intervento chirurgico ed allo specifico animale. Dopo queste osservazioni è afferabile che il patch in acido ialuronico si è dimostrato capace di supportare efficacemente la rigenerazione vascolare. Da questo esperimento si è estrapolato un modello tridimensionale di guarigione del tessuto vascolare con le varie tappe temporali. Con l'utilizzo del condotto tubolare nella vena cava si è ottenuta la sua rigenerazione senza l'obliterazione fino a 4 mesi dall'impianto. Infine il condotto tubolare è stato

efficace nel supportare la vascolarizzazione di un trapianto libero, pertanto è stata provata la funzionalità della componente vascolare. Questi risultati aprono nuove prospettive nella chirurgia vascolare, chirurgia pediatrica e nella cardiocirurgia. Nello specifico in chirurgia ricostruttiva, questi prodotti potrebbero essere utilizzati per l'allungamento di peduncoli vascolari nei trapianti liberi o nella chirurgia dei reimpianti.

## **ABSTRACT**

The discovery of an adequate tissue substitute for the regeneration of small vessels has become one of the most debated issues in the last years. This is due to recent advances in regenerative medicine, which offers new cellular types and biomaterials, and the large clinical applications that this product may have, ranging from the replacement of the coronary vessels to correction of peripheral vascular malformations in pediatric patients. The biomaterials used so far for large caliber vascular prostheses have yielded disappointing results when applied in vessels with a smaller diameter than 6 mm, leading to occlusion of the vessel lumen in short periods. The finding of an ideal product in this area is difficult to reach first of all for the cellular complexity of the vascular tissue but also for involvedness of cellular interactions (vascular cells - red blood cells), mechanical properties and convolution of experimental models in vivo and in vitro. The aim of this observational study was to test a biomaterial based on hyaluronic acid in three different experimental models and to develop a model of tissue healing, to prove venous regeneration and functionality of this construct in similar to daily clinical practice conditions. The study is constituted of 3 different projects on animal models. In the first project patches of hyaluronic acid have been used to repair defects on the vascular wall of abdominal aorta of rat, there were operated 20 animals ( 250-350 g ). After isolation of the abdominal aorta, a breach was opened in it (1 x 5 mm) and the defect was repaired by placing the patch of hyaluronic acid. Tissue samples were evaluated after their removal to 1, 2, 4, 8 and 16 weeks with histological and immunohistochemical studies. In the second project a tubular conduit of hyaluronic acid ( 2 mm diameter, 1.5 cm length ) was placed after interruption of cava vein of the rat as a resorbable guide to vein regeneration . The tissue samples were evaluated after 30, 90 and 60 days with histological and immunohistochemical methods. In the third project the conduits of hyaluronic acid have been placed in vessels forming the vascular pedicle of a free tissue flap (groin flap) in the rabbit. 16 animals were operated, 8 of them were a control group, where microanastomosis were executed without interposition of any conduit. The vitality of the flaps was evaluated after 1, 2 and 3 weeks postoperatively. In the first project was detected a progressive regeneration of the arterial vessel in all its components, starting from the intima and adventitia and continuing with the muscularis. After 16 weeks, the biomaterial was completely degraded and replaced by a new vascular wall composed of endothelial cells, smooth muscle cells, collagen and elastin arranged in layers. In the project with the installation of venous ducts was documented a progressive venous regeneration already complete after 30 days of implantation but consolidated in 60 days. The total degradation after 4 months proved a protected environment for the regeneration during the initial stages . In the last project all flaps were viable after 3 weeks in cases of replacement and in control group ,  $\frac{3}{4}$  of them were vital in the case of venous replacement. There were recorded some complications such as dehiscence of the surgical wound and the seromas formation, which however did not appear to be related to implanted prosthesis but to surgical procedures and the specific animal. After these observations is claimable that the hyaluronic acid patch is able to support vascular regeneration. From this experiment was extrapolated a three-dimensional model of vascular tissue healing with the various stages. With the use of the tubular duct into the cavavein was obtained regeneration without the occlusion up to 4 months after implantation. Finally, tubular conduits successfully supported the vascularization of a free flap, and in this way was proved the functionality of the vascular component. These results open new perspectives in vascular , pediatric and cardiac surgery. Specifically in reconstructive

surgery, these products could be used for the elongation of vascular pedicles in transplantation free flaps surgery or replants .





## **1.INTRODUZIONE**

### **1.1.II Tessuto Vascolare**

#### **1.1.1. Anatomia dei vasi arteriosi e venosi**

##### ***Generalità***

L'apparato vascolare risulta di un complesso di canali, nei quali, per l'azione del cuore, suo organo centrale, e di meccanismi coadiuvanti, si compie la circolazione degli umori organici, ovvero del sangue e della linfa. Si distinguono vasi sanguigni e vasi linfatici, rispettivamente costitutivi dell'apparato vascolare sanguifero e dell'apparato vascolare linfatico. L'apparato vascolare sanguifero è un sistema di canali sostanzialmente chiuso, che il sangue percorre in una costante direzione; il cuore, organo muscolare cavo, contraendosi ritmicamente, avvia il sangue nelle arterie, vasi a decorso centrifugo; partite dal cuore assai voluminose, le arterie attraverso progressive divisioni, si riducono sia di calibro che nello spessore della parete, e raggiunti i vari organi vi penetrano ramificandosi ulteriormente in essi. Fanno loro seguito, dopo un notevole numero di divisioni, vasellini di grandezza microscopica, i capillari sanguigni.

Questi costituiscono reti più o meno estese e di forma varia nelle quali il calibro dei canali è piuttosto uniforme, pur con differenze nei vari organi e tessuti; delle reti, per convergenza dei capillari, hanno origine le vene, vasi a disposizione centripeta, che confluiscono entro gli organi, aumentando in calibro e spessore parietale finché usciti dagli stessi, e per ulteriori fusioni ridottisi a piccoli tronchi, fanno capo al cuore. (1)

##### ***Le Arterie***

###### ***Caratteri generali***

Le arterie sono condotti muscolomembranosi deputati al trasporto e alla distribuzione del sangue agli organi. Originano dai ventricoli del cuore con i grossi vasi arteriosi, aorta e tronco polmonare, che ramificandosi ripetutamente formano rispettivamente l'albero arterioso della grande circolazione e della piccola circolazione; terminano nella compagine degli organi con esili rami, le arteriole, che immettono il sangue nelle reti vascolari di scambio del distretto capillare. (1)

Le arterie, essendo a valle dei ventricoli del cuore, sono sottoposte ad alti valori pressori derivanti dalla forza sistolica e dalla resistenza vascolare periferica. Per il diverso sviluppo del sistema, la pressione arteriosa è minore nel piccolo circolo. L'elevato regime pressorio esistente nei distretti arteriosi condiziona i peculiari caratteri costruttivi delle arterie che presentano, già all'esame macroscopico, una apprezzabile elasticità e consistenza della loro parete. Le arterie, nel vivente, hanno un aspetto di condotti cilindrici, di colore bianco roseo, di diametro variabile, decrescente verso la periferia del sistema. Le arterie solitamente decorrono in sede profonda nelle logge muscolari, affiancate ai rami venosi corrispondenti; talora, comprese in una guaina connettivale comune alle vene, ai nervi, ai vasi linfatici, formano, con questi, i fasci vascolonervosi. Nel portarsi agli organi, le arterie seguono solitamente il percorso più breve e hanno pertanto, in prevalenza, andamento rettilineo; tuttavia, negli organi mobili o di volume variabile, assumono spesso decorso tortuoso. Le arterie si riducono di calibro dall'origine alla terminazione in proporzione al numero e al volume dei rami che emettono. Il calibro di un'arteria diminuisce subito

dopo l'emergenza di ogni ramo e si mantiene immutato fino all'origine del successivo. Confrontando il calibro complessivo dei rami di un'arteria con il calibro della stessa, si osserva che il primo è costantemente maggiore, e ancora, molto maggiore risulta la superficie totale di sezione di tutte le ramificazioni arteriose rispetto a quella dell'aorta. Si può concludere perciò che il letto vascolare arterioso si amplia notevolmente dal centro verso la periferia. In rapporto al diametro, si distinguono arterie di grosso calibro (da 3 cm a 0,7 cm), arterie di media e piccolo calibro (da 0,6 mm a 0,2 mm), arteriole (di 100 micron e valori inferiori) cui corrispondono tipi strutturali diversi che condizionano differenti prestazioni nel quadro generale della funzione circolatoria. (2)

Ogni arteria può emettere rami collaterali che, di solito, si distaccano dal tronco principale formando con questo un angolo acuto, aperto verso la periferia. Più raramente l'angolo è retto o ottuso: in quest'ultima evenienza il ramo si dice ricorrente. Alla loro estremità le arterie possono continuare direttamente con un'altra arteria destinata a territori più distali del corpo, oppure risolversi in uno o più rami terminali. Ciascuna arteria vascolarizza, con i suoi rami collaterali e terminali, una zona definita del corpo, detta territorio di distribuzione. I territori di distribuzione delle arterie non sono tuttavia esattamente stabiliti, come i territori d'innervazione, per la frequente variabilità individuale che esiste nella distribuzione periferica dei rami arteriosi; inoltre lo scambio di rami fra arterie che servono territori contigui fa sì che questi nella maggior parte, non siano nettamente separati tra di loro ma, sotto il profilo della vascolarizzazione arteriosa, ma più o meno comunicanti l'uno con l'altro. Questa disposizione anatomica rende possibile una sufficiente irrorazione del territorio anche in caso di interruzione dell'arteria principale. Esistono tuttavia arterie i cui rami si distribuiscono a territori esattamente delimitati detti zone o segmenti, senza attuare nessuno scambio di vasi, nemmeno a livello arteriole, con rami arteriosi di zone limitrofe. Tali arterie sono dette arterie terminali e i loro rami di distribuzione rami zonali o segmentali. Arterie di questo tipo si trovano nei polmoni, nei reni, nella milza, nella corteccia telencefalica, nell'occhio (arteria centrale della retina). L'occlusione, per cause patologiche, di un ramo zonale, data la assenza di rami vascolari di supplenza provenienti da arterie di territori contigui, determina la totale interruzione del flusso sanguigno nel rispettivo territorio di distribuzione, con gravi turbe trofiche e necrosi dei tessuti. (3)

Una evenienza molto importante sotto il profilo funzionale e clinico è rappresentata dalle comunicazioni esistenti fra arterie diverse, denominate anastomosi; rami anastomotici sono detti i tratti arteriosi che le formano. Anastomosi esistono, anche se non frequenti, fra arterie di medio calibro; sono presenti, con buona frequenza, fra arterie di piccolo calibro; costituiscono quasi la regola fra le arteriole, anche di differenti territori, a esclusione di quelli nei quali esistono arterie terminali. La presenza di anastomosi fra arterie di grosso calibro è da considerare una anomalia, o può addirittura rientrare nel quadro di una condizione malformativa. (2)

La nutrizione della parete arteriosa avviene per diffusione di materiali dal lume vascolare, ma nelle arterie di grosso e medio calibro esistono piccole arterie nutritizie, dette vasa vasorum, che provvedono alla irrorazione sanguigna degli strati più esterni della parete. Queste arterie si ramificano nella tonaca avventizia, dove si risolvono in una fitta rete di vasi capillari; nelle arterie di calibro maggiore, ramuscoli arteriosi penetrano anche nella parte esterna della tonaca media. Nell'avventizia di queste arterie, sono presenti anche piccoli vasi venosi e vasi linfatici a decorso prevalentemente longitudinale. Le arterie sono fornite di rami nervosi, le cui fibre sono efferenti o afferenti. Le fibre efferenti sono amieliniche e portano impulsi che regolano il tono arterioso. Formano reti in sede avventiziale e inviano fibre alle cellule muscolari dello strato più esterno della tonaca media. I terminali nervosi sono costituiti da estese espansioni che non formano

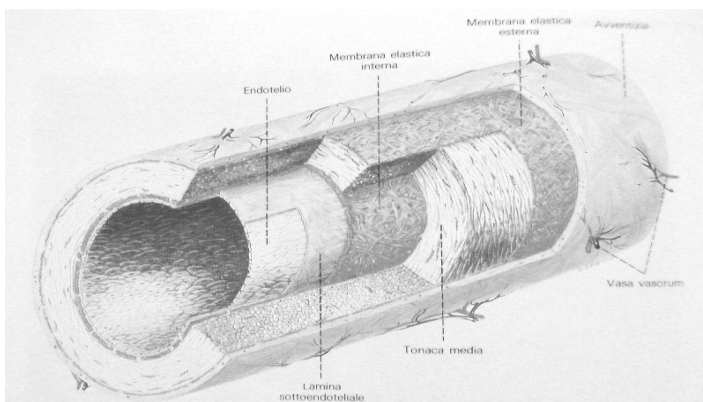
tuttavia tipiche giunzioni citoneurali con le cellule muscolari lisce (l' intervallo sinaptico é di 60-400 nm), la trasmissione nervosa si determinerebbe pertanto attraverso la liberazione di un mediatore in grado di diffondere attraverso la lamina basale che circonda le miocellule, mentre la diffusione dello stimolo avverrebbe attraverso le giunzioni serrate esistenti fra le cellule muscolari. Le fibre effettrici sono ortosimpatiche e svolgono azione vasocostrittrice. Non é certa l'esistenza di fibre vasodilatatrici; questo effetto potrebbe tuttavia determinarsi come conseguenza di una riduzione del tono ortosimpatico; oppure, come è stato riscontrato nella muscolatura scheletrica o in organi ghiandolari, per la liberazione rispettivamente di acetilcolina e di bradichinina che svolgono azione vasodilatatrice. Le fibre afferenti o sensitive trasportano, in direzione centripeta, stimoli provenienti da recettori periferici specializzati. Sono noti: i pressocettori (barocettori) dell'arco aortico e del seno carotico che rilevano variazioni della pressione sistemica; i chemiocettori dei glomi aortico e carotico sensibili delle variazioni di concentrazione di H<sup>+</sup>, CO<sub>2</sub>; e ossigeno; i meccanocettori, rappresentati da corpuscoli del Pacini, situati nell'avventizia dell'aorta. Alcune fibre potrebbero inoltre trasportare stimoli nocicettivi provenienti da arterie di territori coinvolti in eventi patologici o traumatici capaci di determinare sensazioni dolorifiche. (1)

### *Struttura*

Gli elementi strutturali della parete arteriosa sono: l'endotelio, le fibre elastiche, le fibre collagene e le cellule muscolari. **L'endotelio** forma il rivestimento interno, a scarso attrito, delle arterie e continua, senza soluzione, in tutti gli altri organi cavitari dell'apparato vascolare. E' composto solitamente di cellule appiattite, disposte in unico strato, di forma poligonale o allungate secondo l'asse del vaso, unite tra loro da giunzioni occludenti. Mediante il trasporto vescicolare provvede ai fenomeni nutritivi della parete arteriosa. Svolge compiti di grande importanza nella fisiologia dell'apparato vascolare sanguifero, per il gran numero di sistemi enzimatici localizzati alla superficie delle cellule. In condizioni di normalità, inibisce, per le cariche negative di superficie e attraverso la sintesi di prostaciline e di prostaglandine, l'adesione delle piastrine e gli altri fenomeni che sono alla base della formazione dei trombi. In condizioni di lesione della parete vascolare contribuisce, rilasciando sostanze che intervengono nei meccanismi della coagulazione e dell'emostasi alla riparazione del danno. Questi stessi meccanismi tuttavia sono anche alla base dei processi di trombosi endoarteriosa in caso di lesioni patologiche della parete vasale (aterosclerosi). Ha capacità rigenerative e, in casi di ricanalizzazione del tratto trombotico di una arteria, partecipa a fenomeni ricostruttivi. **Le fibre elastiche e le fibre collagene** rappresentano le strutture responsabili delle peculiari proprietà di resistenza e di deformabilità delle arterie, mentre alle cellule muscolari spetta la capacità di modificare attivamente l'ampiezza del lume arterioso. Sul piano organizzativo, la parete delle arterie è costituita da tre tonache concentriche denominate, dall'interno all'esterno, intima, media e avventizia (o esterna). La tonaca media che é anche la più spessa, caratterizza in base alla sua costituzione il tipo strutturale e condiziona il comportamento funzionale delle arterie. Nella tonaca media delle arterie di grosso calibro prevale il tessuto elastico; in quelle di medio e piccolo calibro prevale il tessuto muscolare. Si distinguono pertanto arterie di tipo elastico e arterie di tipo muscolare; le prime (arterie di grosso calibro) hanno una parete elastica e intervengono passivamente nella circolazione del sangue: esse si dilatano durante la sistole ventricolare e, nella fase diastolica del ciclo cardiaco, tornano, per l'energia elastica accumulata, alle dimensioni originarie favorendo così la progressione del sangue; le seconde (arterie di medio e piccolo calibro) hanno parete contrattile e sono quindi in grado di variare attivamente il loro lume, regolando così la quantità di sangue che affluisce agli organi e ai tessuti; ciò consente una

irrorazione degli organi variabile in relazione al loro livello di attività funzionale. Alla estrema periferia dell'albero arterioso le arteriole, provviste di sfinteri muscolari precapillari, governano il transito alterno e differenziale del sangue nei vari distretti del territorio capillare; inoltre, le variazioni di ampiezza del lume e il tono della loro parete rappresentano fattori essenziali delle cosiddette resistenze periferiche che opponendosi alla forza della gittata sistolica, determinano gli elevati valori pressori che sono propri del distretto vascolare arterioso. Un dato indicativo delle variazioni morfofunzionali della struttura delle arterie, dai grossi vasi alle arteriole, è fornito dal rapporto variabile fra spessore della parete e ampiezza del lume vascolare. Nelle arterie di tipo elastico lo spessore di parete corrisponde a circa 1/10 del calibro, nelle arterie muscolari a circa 1/4, nelle arteriole maggiori a circa 1/2. (4)

Arterie di grosso calibro di tipo elastico : Si considerano di grosso calibro le arterie che hanno un diametro da 3 cm a 7 mm; comprendono l'aorta, i grossi vasi arteriosi (arteria brachiocefalica, arteria carotide comune, arteria carotide interna, arteria succlavia, arteria iliaca comune) e il tronco polmonare. Esse presentano una tonaca intima dello spessore di circa 100 micron, formata dall'endotelio che appoggia su uno strato sottoendoteliale, costituito da connettivo con fibre collagene ed elastiche intrecciate, rari fibroblasti e macrofagi. Questo strato è delimitato esternamente da una o più lamine elastiche fenestrate che costituiscono, nell'insieme, la lamina elastica interna. La tonaca media (spessa fino a 500 micron) è costituita da numerose membrane elastiche fenestrate disposte concentricamente (fino a 40 strati nell'aorta) e congiunte tra loro da fascetti elastici di connessione. Gli spazi fra le lamine elastiche contengono connettivo collagene ricco di fibroblasti e fascetti di cellule muscolari lisce, disposte concentricamente. Queste ultime, scarse nelle grosse arterie che partono dal cuore, aumentano progressivamente procedendo verso le arterie di medio calibro. Esternamente la tonaca media è delimitata da una lamina elastica esterna spesso discontinua. La tonaca avventizia è formata da connettivo collagene che continua nel connettivo dell'ambiente perivascolare. Sono presenti anche in questo strato fasci di fibre elastiche che, addensati al limite con la tonaca media, partecipano alla costituzione della lamina elastica esterna. (1)



**Fig.1: Rappresentazione tridimensionale di un'arteria di tipo muscolare (3)**

Arterie di medie e piccolo calibro ( di tipo muscolare) ( Fig1): Hanno un diametro fra 7 mm e 0,1 mm e presentano una prevalente struttura muscolare. Appartengono a questo tipo strutturale la maggior parte delle arterie. La tonaca intima è sempre sottile e formata da cellule endoteliali allungate in direzione longitudinale che riposano su un esile strato sottoendoteliale; è delimitata esternamente dalla lamina elastica interna che si presenta come strato omogeneo, ondulato e rifrangente. Nelle arterie di medio calibro (fino a 2 mm) la tonaca media, che forma circa la metà dello spessore della parete, è costituita in prevalenza da fascetti di cellule muscolari lisce ad

andamento circolare o elicoidale a passo breve, intercalate a fasci elastici e collageni. Le cellule muscolari lisce, all'esame ultra-strutturale, risultano circondate da una lamina basale che si interrompe nei punti in cui si stabiliscono contatti fra elementi vicini; queste zone di contatto permettono il passaggio dell'impulso nervoso da una membrana plasmatica all'altra. In corrispondenza della zona di confine con l'avventizia il materiale elastico si addensa a formare una lamina elastica esterna composta da grossi fasci, a decorso prevalentemente longitudinale, intrecciati a rete. La tonaca avventizia é assai sviluppata e composta da fasci collageni intrecciati con fibre elastiche che continuano gradualmente con quelli del connettivo perivascolare; vi si ritrovano piccoli vasi sanguiferi (vasa vasorum) e ramuscoli nervosi. Nelle arterie di piccolo calibro (inferiore a 2 mm), la tonaca media, che supera sempre la metà dello spessore della parete, è essenzialmente formata da cellule muscolari lisce, a disposizione circolare o spirale a passo breve, inframmezzate da una delicata intelaiatura di fibre elastiche e collagene. Al confine con l'avventizia non esiste una vera e propria lamina elastica. La tonaca avventizia é sempre sottile ed é in continuità con il connettivo perivasale. (1-3)

Arteriole: Hanno un diametro di 100-50 micron e danno origine per ramificazione alle arteriole terminali di calibro inferiore ai 50 µm. Da queste originano infine le metarteriole, del diametro di 10-15 µm, che immertono il sangue nel distretto capillare. La tonaca intima, molto sottile, é formata da cellule endoteliali allungate secondo l'asse del vaso, sottese da una sottile lamina sottoendoteliale; al limite con la tonaca media, si osservano rami discontinui di una struttura elastica che ricorda la lamina elastica interna delle arterie muscolari. Questa già ridotta componente elastica scompare del tutto nelle arteriole terminali. La tonaca media é formata da cellule muscolari lisce a disposizione circolare o elicoidale a passo breve, poste su due o tre piani, che nelle arteriole terminali si riducono a uno strato cellulare. Fra le cellule muscolari, o fra queste e le cellule endoteliali, si possono osservare, nei punti di contatto diretto, giunzioni serrate. La tonaca avventizia é formata da un fine reticolo di fibre collagene con rari fibroblasti. Le metarteriole, alla loro origine, mostrano un endotelio a cellule rigonfie e un manicotto contrattile formato da 2 o 3 strati di cellule muscolari lisce a disposizione circolare. Questi dispositivi, detti sfinteri precapillari, regolano il transito del sangue nelle reti capillari degli organi; sembrano aprirsi e chiudersi a intervalli regolari di 6-8 secondi. (1)

## ***Le Vene***

### *Caratteri generali*

Le vene sono condotti membranosi che hanno origine dalle reti capillari dei tessuti e degli organi, procedono in direzione centripeta e confluiscono a costituire tronchi di calibro sempre maggiore. Riconducono al cuore il sangue refluo dal distretto capillare a un regime pressorio che è notevolmente inferiore a quello che esiste nell'albero arterioso, fattore questo di primaria importanza ai fini della loro caratterizzazione strutturale. Le vene differiscono dalle arterie principalmente per la maggiore sottigliezza e la minore elasticità della loro parete, per essere facilmente depressibili e dilatabili, per la presenza di valvole, per la frequenza delle anastomosi. Hanno normalmente forma cilindrica, ma quando sono vuote di sangue possono apparire appiattite e collabite se riempite possono dilatarsi fino ad assumere un calibro notevole. Esistono vene (come ad esempio le vene del collo) che sono fortemente ancorate all'ambiente circostante dalle fasce o da loro espansioni e che pertanto si mantengono fisse e costantemente beanti. Il loro numero è maggiore di quello delle arterie; in molti distretti per ogni arteria si hanno due vene satelliti;

esistono tuttavia numerose vene, come ad esempio le vene sottocutanee, che non sono satelliti di sistemi arteriosi. Il calibro complessivo dei rami affluenti è superiore a quello del tronco venoso che origina dalla loro confluenza: pertanto il letto vascolare si va riducendo dalla periferia verso il centro e di conseguenza la corrente venosa acquista velocità crescente in direzione del cuore. In rapporto al loro diametro le vene vengono distinte, come le arterie, in vene di grosso, medie e piccolo calibro. Tale distinzione risulta però scarsamente significativa in quanto non esiste per le vene precise corrispondenza tra caratteristiche strutturali e calibro. Esistono vene, come quelle del collo, che hanno struttura assai semplice e pareti sottili, facilmente lacerabili, e altre vene di calibro corrispondente, come alcune vene degli arti, che posseggono pareti spesse, consistenti, assai simili a quelle delle arterie. Per la loro situazione si distinguono vene superficiali o profonde. Le vene superficiali decorrono nei tegumenti, accolte nello spessore del tessuto connettivo sottocutaneo, e hanno pertanto situazione superficiale rispetto alla fascia comune; si trovano principalmente negli arti e nel collo ma anche nelle pareti del torace e dell'addome; sono visibili attraverso la cute come cordoni bluastri pur potendo variare la loro evidenza entro limiti assai ampi in dipendenza dello spessore dei piani superficiali. Le vene profonde hanno collocazione sottofasciale; decorrono negli interstizi muscolari affiancate ai rami arteriosi corrispondenti e talvolta comprese in una guaina connettivale comune alle arterie, ai nervi e ai vasi linfatici, entrano nella costituzione dei fasci vascolonervosi oppure appartengono ai distretti viscerali.

La maggior parte delle vene, e specialmente quelle nelle quali il sangue scorre in senso antigravitario presenta formazioni caratteristiche denominate **valvole**. (Fig 2) Queste sono pieghe membranose foggiate a tasca che sorgono dalla parete venosa, simili alle valvole semilunari aortiche e polmonari rivolte con la loro concavità in direzione del cuore. Hanno forma a nido di rondine e presentano un margine aderente spesso, un margine libero sottile, una faccia parietale concava, che guarda verso la parete della vena e una faccia assiale, convessa, che guarda verso il lume del vaso. Generalmente a un medesimo livello si trovano due pieghe valvolari poste a coppia una di fronte all'altra che, se distese da reflussi di corrente, vengono a contatto con i bordi liberi e realizzano la chiusura del dispositivo valvolare. Esistono valvole costituite da un unico lembo e, più raramente, da tre lembi. Al di sopra del margine aderente di ciascun lembo valvolare la parete venosa si presenta assottigliata e alquanto dilatata a costituire il seno valvolare che appare all'esterno come una dilatazione fusiforme o sacciforme del vaso. La distribuzione delle valvole non è regolare e uniforme, ma corrisponde a precise esigenze funzionali. Si trovano valvole più numerose nei distretti dove il deflusso del sangue avviene con maggiore difficoltà come, per esempio, nelle vene degli arti inferiori nelle quali il sangue procede verso il cuore in direzione opposta alla forza di gravità, mentre valvole mancano quasi sempre nelle vene della testa e del collo nelle quali il deflusso del sangue verso il cuore è favorito dalla forza di gravità. Valvole esistono tuttavia anche in vene di piccolo calibro dei territori viscerali, indipendentemente dai fattori dinamici sopra ricordati. Evidentemente, in queste sedi, la presenza delle valvole ha il compito di limitare gli effetti di eventuali fenomeni di stasi venosa distrettuale.

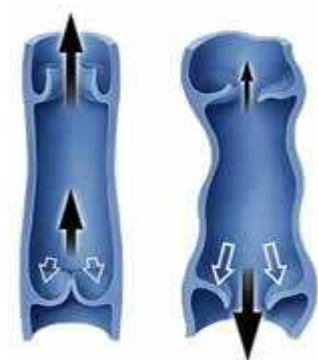


Fig. 2: Valvole venose (3)

Come nelle arterie, nella parete delle vene si distinguono tre strati, o tonache una tonaca interna o intima, una tonaca media e la tonaca esterna o avventizia. Tuttavia nelle vene tale schematizzazione strutturale non é costantemente applicabile poiché, accanto a vene che mostrano una parete di notevole complessità esistono altre vene che presentano una estrema semplicità costitutiva e inoltre perché sovente la delimitazione tra le singole tonache non é così evidente come nelle arterie. Gli elementi che compongono la parete venosa sono quelli propri anche delle arterie: l'endotelio, le fibre collagene, le fibre elastiche e le cellule muscolari ma esiste, nei due tipi di vasi, una netta differenza nella quantità e nell'ordinamento dei singoli materiali costruttivi. La parete delle vene si diversifica da quella delle arterie principalmente per il minore sviluppo del contingente elastico e per la netta prevalenza del materiale collagene che ne forma la tessitura di fondo. Ciò conferisce alle vene caratteri meccanici e funzionali che sono differenti rispetto a quelli delle arterie e in armonia con le condizioni del circolo che nelle vene si effettua sempre a un regime pressorio non elevato. Esistono inoltre, fra vene diverse, notevoli differenze di struttura che sono principalmente in rapporto con le particolari condizioni secondo le quali si effettua il circolo venoso refluo, nei diversi distretti. Abbiamo già avuto occasione di sottolineare che esistono vene, come quelle della testa e del collo, nelle quali i valori pressori sono estremamente bassi e il sangue scende verso il cuore favorito dalla forza di gravità, e altre vene, come quelle dei territori sottodiaframmatici del tronco e dell'arto inferiore in particolare, nelle quali la circolazione avviene invece in direzione contraria alla forza di gravità. Le prime, anche se di grosso calibro, hanno parete sottile a struttura fibrosa, e sono dette vene di tipo recettivo. Le seconde hanno parete spessa, fornita di un ricco corredo muscolare e sono dette vene di tipo propulsivo. Vi sono tra questi due tipi numerosi aspetti strutturali di transizione. Variazioni strutturali della parete venosa possono essere inoltre legate a particolari condizioni funzionali e anche in rapporto con l'età. Le vene di piccolo calibro (fino a 1 mm di diametro) presentano ovunque una analoga struttura. Pertanto, tenendo conto dei dati strutturali più significativi, distingueremo: vene di piccolo calibro, vene di tipo recettivo e vene di tipo propulsivo(1).

Vene Di Piccolo Calibro: Hanno parete molto sottile e delicata. La tonaca intima é costituita dall'endotelio e da un' esile lamina sottoendoteliale con fibre collagene e rare fibre elastiche. La tonaca media, che è formata in prevalenza da tessuto collagene, può contenere, in quantità assai modesta, cellule muscolari a disposizione circolare o spirale. L'avventizia di connettivo fibrillare lasso continua indistintamente con l'ambiente perivascolare. Tra le vene di piccolo calibro, le venule postcapillari hanno notevole importanza funzionale. La parete delle venule postcapillari è formata da endotelio che poggia su una lamina basale, all'esterno della quale si addossano periciti e un esile strato di fibre collagene. L'endotelio è piano, ma in molti distretti si presenta isoprismatico o batiprismatico; in questi ultimi casi, pur non essendo dotate di pareti molto consistenti, le venule postcapillari risultano sempre facilmente identificabili. Le venule postcapillari hanno distribuzione ubiquitaria, peraltro, in alcuni organi come quelli linfoidi, esse presentano una particolare localizzazione anatomica. Nel timo, per esempio, si trovano in corrispondenza della giunzione tra la corticale e midollare. L'endotelio delle venule postcapillari é dotato di elevata permeabilità ed inoltre di capacità ricognitive nei riguardi di alcuni elementi figurati del sangue quali i linfociti. Queste cellule abbandonano il torrente circolatorio in corrispondenza del distretto postcapillare, con un meccanismo di migrazione che prende il nome emperipolesi e che consiste in una prima fase di contatto tra linfocito e cellula endoteliale (fase ricognitiva) e nel successivo passaggio per via diacellulare (attraverso la cellula endoteliali) e non intercellulare (tra due cellule endoteliali). Le



venule postcapillari rappresentano quindi il distretto vascolare che presenta maggiore importanza ai fini del traffico di cellule linfoidi tra organi diversi e all'interno di uno stesso organo(1-3).

Vene di tipo recettivo: Sono rappresentate dalle vene dei territori sopradiaframmatici e in particolare dalle vene della testa e del collo e anche da alcune vene dell'arto superiore e dei distretti viscerali. Hanno parete poco spessa di tipo fibroso. La tonaca intima è formata dall'endotelio da uno strato di connettivo fibroso contenente esili reti di fibre elastiche; la tonaca media è rappresentata da una tessitura di fibre collagene con scarse fibre elastiche e rare cellule muscolari a direzione circolare; la tonaca avventizia è di tessuto collagene, con rare fibre elastiche. Le singole tonache non sono sempre nettamente distinte(1-3).

Vene di tipo propulsivo: Sono rappresentate dalla maggior parte delle vene dei territori sottodiaframmatici ed in particolare dalle vene dell'arto inferiore e da molte vene viscerali. La loro parete è sempre spessa talora anche in maniera considerevole come nel caso delle vene profonde dell'arto inferiore. La tonaca intima è costituita dall'endotelio, da una spessa lamina sotto endoteliale di fibre collagene, contenente indiscreta quantità fibre elastiche e talora fascetti di cellule muscolari a disposizione longitudinale od obliqua. La tonaca media ha spessore considerevole e può costituire anche i 2/3 della parete: consiste di una trama di fasci collagene con rare fibre elastiche e di abbondanti fascetti di cellule muscolari a disposizione circolare o a spirale. La tonaca avventizia è ben sviluppata e risulta costituita da connettivo collagene contenente fibre elastiche disposte a rete. In rapporto con l'età si assiste alla progressiva comparsa di un contingente muscolare in sede avventiziale talvolta anche abbondante e costituito da fascetti di miocellule a direzione longitudinale. Nelle vene di tipo propulsivo il tessuto muscolare non possiede mai un ordinamento compatto come nelle arterie e i fascetti di miocellule risultano sempre separati da maglie anche grossolane di tessuto connettivo che forma la tessitura di fondo della parete. Sulla scorta dei caratteri strutturali peculiari di queste vene, si ritiene possibile una loro partecipazione attiva nella dinamica del circolo venoso refluo(1-3).

### ***L' Endotelio***

Le cellule endoteliali dei capillari si arrotolano a formare un tubo dal diametro di 8-10 µm che rimane di calibro costante per tutta la lunghezza del capillare. L'ampiezza del lume è tale da permettere il passaggio delle cellule del sangue.

La superficie esterna della cellula endoteliale è circondata da una lamina basale prodotta dalla stessa cellula. In sezione trasversale è possibile notare che nei piccoli capillari la parete è costituita da una singola cellula, mentre due o tre porzioni di cellule endoteliali partecipano alla costituzione della parete dei capillari più larghi. Nei punti di contatto le cellule endoteliali tendono a sovrapporsi e formano delle pieghe marginali che si proiettano nel lume.

Le cellule endoteliali si uniscono tra loro mediante fasce di occlusione, ovvero mediante giunzioni occludenti (serrate) che possono formare barriere di permeabilità (zonule occludenti), con cellule strettamente affiancate o, in alcuni casi, un rivestimento discontinuo, con sporadiche zone di contatto (Macule occludenti), che presenta fissurazioni intercellulari. Le cellule endoteliali sono anche collegate tra di loro e spesso con altre cellule extravascolari, così come lo sono, mediante giunzioni desmosomiali (giunzioni comunicanti) con cellule muscolari lisce, facilitando la cooperazione fra le cellule che sono collegate in questo modo (4).

### ***Angiogenesi e vasculogenesi***

La microcircolazione può facilmente modificare la sua forma aggiungendo nuovi vasi e presumibilmente riassorbendo quelli vecchi danneggiati. Lo sviluppo di nuove reti vascolari avviene nel tessuto embrionale per permettere la crescita tissutale, ma non solo. Infatti il rimodellamento continua, anche se con un andamento ridotto, per tutta la vita, per es. nel rivestimento dell'utero durante la mestruazione e in generale nei tessuti adulti che sono stati danneggiati (3,5).

La formazione dei vasi sanguigni nell'embrione e nei tessuti extraembrionali avviene attraverso due meccanismi: la vasculogenesi e l'angiogenesi (6).

La **vasculogenesi** avviene durante la terza settimana dal concepimento, nella specie umana. Inizialmente, gli angioblasti (cellule mesenchimali formanti i vasi) si aggregano e formano isole di cellule angiogeniche (le isole sanguigne). All'interno delle isole sanguigne appaiono piccole cavità per confluenza di sottili spazi intercellulari. Gli angioblasti si appiattiscono per formare le cellule endoteliali che si dispongono attorno alle cavità delle isole sanguigne e costituiscono l'endotelio. Le cavità rivestite da endotelio si fondono e formano reti di canali endoteliali (7).

L'allargamento del plesso così formato avviene tramite l'**angiogenesi**, ovvero dalla gemmazione endoteliale da vasi preesistenti e fusione con altri vasi. Le cellule mesenchimali che circondano i primitivi vasi sanguigni endoteliali si differenziano in elementi dei tessuti muscolare e connettivo dei vasi. Quindi, arterie e vene si formano da piccoli vasi costituiti solo da endotelio e lamina basale, i periciti il tessuto connettivo e le cellule muscolari lisce sono aggiunte più tardi, sotto l'influenza di segnali prodotti dalle endoteliali. La reclutazione dei periciti dipende in particolare dal PDGF- $\beta$  secreto dalle endoteliali. Le cellule endoteliali di arterie e vene differiscono nelle loro proprietà di superficie almeno nell'embrione: la membrana plasmatica delle cellule arteriolari contiene una proteina transmembrana chiamata efrina-B2 (ha un unico dominio transmembrana), mentre le membrane delle cellule venose contengono il corrispondente recettore proteico, Eph-B4, che è un recettore con un dominio intracellulare tirosina chinasi. Queste molecole mediano un segnale dato dal contatto cellula-cellula, e sono essenziali per lo sviluppo di una rete vascolare appropriatamente organizzata. Infatti topi knockout privi di efrina-B2 presentano notevoli anomalie dello sviluppo dei vasi, la vasculogenesi sembra essere normale ma l'angiogenesi è difettosa (5,7). In tutto il sistema vascolare del corpo adulto le cellule endoteliali mantengono la capacità di divisione e di movimento. Le cellule endoteliali non solo riparano e rinnovano il rivestimento dei vasi già formati ma formano nuove strutture vascolari. In queste circostanze possono essere riattivate per proliferare con un tempo di duplicazione solamente di pochi giorni. Esistono prove del fatto che quando è richiesta una crescita vascolare rapida, la popolazione locale di cellule endoteliali può aumentare reclutando dal torrente circolatorio dei precursori di cellule endoteliali derivanti dal midollo osseo, anche la loro percentuale in circolo è esigua (5). Sono state isolate infatti precursori delle endoteliali (EPC), residenti nel midollo osseo, dalla frazione leucocitaria del sangue periferico (8). Queste cellule si sono differenziate in endoteliali in vitro.

Il processo dell'**angiogenesi** avviene fisiologicamente nell'adulto nel ciclo endometriale e nella guarigione delle ferite. Si manifesta in condizioni patologiche come il cancro, l'artrite reumatoide, la psoriasi e gli emangiomi (9). I nuovi vasi nell'adulto originano come capillari che spuntano da piccoli vasi già esistenti. Il processo dell'angiogenesi avviene in seguito a specifici segnali che possono venire osservati in strutture naturalmente trasparenti come la cornea dell'occhio. Irritanti applicati alla cornea inducono la crescita di nuovi vasi sanguigni dal margine

dei tessuti circostanti, che hanno una ricca vascolarizzazione, verso il centro della cornea che normalmente non è vascolarizzata (5). Questo dimostra come i capillari nuovi si diramano da capillari già esistenti, esplorando il tessuto circostante finché non incontrano un altro capillare con il quale fondersi permettendo così il passaggio del sangue (5).

Il principale bersaglio degli stimoli angiogenetici sono le venule postcapillari e le piccole vene terminali (10). E' un processo ordinato caratterizzato da una precisa sequenza di eventi: inizialmente i vasi già esistenti si ingorgano e si dilatano in seguito all'attivazione delle endoteliali. Una degradazione localizzata della lamina basale dalle metallo-proteinasi permette la migrazione delle endoteliali nell'interstizio. Si formano così degli abbozzi vasali immaturi, che comprendono cellule endoteliali attivate, mentre altre endoteliali proliferano dietro a quelle migrate per prime. Successivamente, si ha un rimodellamento e la neoformazione della matrice extracellulare attorno al nuovo vaso, il quale si canalizza e formando anastomosi e anse capillari, viene attraversato dal flusso sanguigno. In seguito, il periciti vengono incorporati attorno all'endotelio e una membrana basale continua si forma attorno al nuovo vaso. Riassumendo il processo angiogenetico richiede interazioni precise fra la matrice extracellulare, le cellule che vi prendono parte ed i fattori di crescita cellulari (11).

#### *Fattori che controllano l'angiogenesi.*

I diversi stimoli che determinano tale attività angiogenetica sono ancora oggetto di studio: sembra che tra di essi siano compresi vari fattori angiogenetici rilasciati da macrofagi, da cellule T attivate e da altre sorgenti (che comprendono le mastcellule), capaci di creare gradienti chemiotattici che stimolano l'attività mitotica e che determinano differenziazione e maturazione cellulare. E' interessante notare che alcuni tessuti non sono dotati di una rete vascolare propria, come ad esempio la cartilagine e gli epiteli stratificati. Ciò può essere dovuto in parte, all'attività di fattori inibenti la crescita vascolare(3).

I segnali tissutali che riguardano l'angiogenesi sono complessi, ma un ruolo chiave è rivestito da una proteina nota come vascular endothelial growth factor (VEGF), una lontana parente della platelet-derived growth factor (PDGF). La regolazione dell'angiogenesi avviene dopo incremento dei livelli di VEGF, a causa di cambiamenti della stabilità del suo mRNA e della quota di trascrizione. Un'insufficiente ossigenazione di qualsiasi cellula provoca l'incremento della concentrazione intracellulare attiva di una proteina per la regolazione genica, chiamata hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1), che stimola la trascrizione di VEGF, e di altri geni necessari in condizioni di bassa ossigenazione tissutale.

Altri fattori di crescita, compresi alcuni membri della famiglia dei fattori di crescita per i fibroblasti, possono stimolare l'angiogenesi ma influiscono su diversi tipi cellulari. Il primo fattore di crescita isolato è stato proprio il basic fibroblast growth factor (bFGF). Poi è stato purificato l'acid fibroblast growth factor (aFGF). Ad oggi sono stati identificati otto polipeptidi che sono stati completamente purificati, sequenziali e clonati da diversi laboratori. Questi differiscono molto fra di loro in proprietà biochimiche e biologiche. Inoltre il processo dell'angiogenesi è fortemente dipendente dalla natura della matrice extracellulare che circonda la cellula poiché la formazione di tubi capillari è promossa dai componenti della lamina basale come la laminina che le stesse endoteliali peraltro producono (5)

**Tabella I: Polipeptidi angiogenetici. I due tipi di FGF e l'angiotensina sembrano essere i fattori più potenti (12).**

Peptide	Peso Molecolare	Subunità	Mitogenicità delle endoteliali in vitro	Altre attività biologiche correlate con l'angiogenesi
bFGF (8,82) Fibroblasts Growth Factor	18,000	1	+	Sia bFGF che aFGF sono mitogenici per molti tipi cellulari; si legano all'eparan solfato stimolano le endoteliali a migrare ed a formare strutture tubulari ,aumentano la produzione di proteasi e di attivatore del plasminogeno
aFGF (83.84) Fibroblasts Growth Factor	16400	1	+	
VEGF/VPF(14,91 ,92) Vascular endothelial. Vascular Permeability Factor	45000	2	+	L'attività proliferativa è specifica per le cellule dell'endotelio vascolare,aumenta la permeabilità vascolare, induce le endoteliali a produrre l' attivatore del plasminogeno e il suo inibitore
PD-ECGF(15) Platelet Derived Endothelial Cell Growth Factor	45000	1	+	Stimola la sintesi DNA nelle endoteliali e la chemotassi;Non ha attività proliferativa; amplifica la mitogenicità dei FGF sulle endoteliali
TGF- $\alpha$ (100) Tumor Growth Factor	5500	1	+	Trasforma cellule normali in un fenotipo trasformato; Si lega al recettore per EGF
Angiogenina (102)	14100	1	0	Stimola le endoteliali a formare diacilglicerolo e a secernere prostaciclina attivando la fosfolipasi C e la fosfolipasi A2, rispettivamente; ha un' unica attività ribonucleolitica essenziale per la neovascolarizzazione
TGF- $\beta$ (107) Tumor Growth Factor	25000	2	-	Potenzia la produzione di matrice extracellulare; E' chemotattica per i monociti.
TNF- $\alpha$ (109,110) Tumor Necrosis Factor	55000	3	-	Induce la produzione di bFGF nelle endoteliali e potenzia la sua secrezione.

#### *Funzioni secernenti dell'endotelio*

Per lungo tempo si è creduto che l'endotelio dei vasi sanguigni svolgesse soltanto un ruolo passivo, consistente nel fornire un rivestimento liscio e non trombogenico atto a favorire il flusso sanguigno. Ora è invece noto che l'endotelio secerne alcune componenti della matrice extracellulare

sottostante, quali fibronectina, laminina, e collagene, di tipo II, III, IV e V. Altri prodotti dell'endotelio sono coinvolti nel processo di coagulazione, nella migrazione dei neutrofili, nel ricircolo dei linfociti e nel mantenimento del tono vascolare, come ad esempio M-CSF, GM-CSF e PAF. Gran parte dei loro prodotti è secreta in modo costitutivo, ad eccezione del fattore di von Willebrand, che viene immagazzinato all'interno di granuli secretori atipici, i corpi di Weibel-Palade e rilasciato nel sangue per esocitosi in risposta a citochine, quali l'interleuchina 1 (IL-1) e il fattore di necrosi tumorale (TNF), che vengono liberate nei punti di lesione dei vasi sanguigni. Il fattore di von Willebrand favorisce il legame delle piastrine all'endotelio nella formazione del coagulo emostatico, e pertanto svolge l'importante compito di limitare l'emorragia nei vasi danneggiati. Di recente si è scoperto che le cellule endoteliali sintetizzano ossido di azoto (NO) a partire dalla L-arginina, che attiva un enzima in grado di provocare il rilassamento della muscolatura liscia (12).

L'endotelio risponde all'anossia con il rilascio di sostanze vasocostrittrici, la più potente fra le quali è l'endotelina -1, un peptide che si lega alla muscolatura liscia delle arterie, che induce aumenti della pressione arteriosa molto più efficacemente dell'angiotensina II, il regolatore sistemico del tono vascolare. L'endotelina - 1 esercita un'azione ipertensiva di durata relativamente elevata, ma non è ancora chiaro se sia coinvolta nella regolazione dell'intero sistema cardiovascolare o se venga prodotta localmente nel corso di risposte difensive quali l'emostasi che si verifica dopo una lesione vascolare. Il lipopolisaccaride batterico, l'istamina, e alcune citochine (TNF, IL1) attivano le cellule endoteliali inducendole a sintetizzare e a esporre sulla loro membrana molecole di adesione intercellulare (ICAM-1, ICAM-2) e il fattore di attivazione piastrinica (PAF). Contemporaneamente alla sintesi di PAF, la selectina P viene rilasciata dai granuli nel citoplasma endoteliale ed inserita nella membrana. L'arresto dei leucociti circolanti nei punti di infiammazione è mediato dal loro legame con la selectina P dell'endotelio e dal legame della selectina L presente sulla superficie dei leucociti stessi con recettori che si trovano sulle cellule endoteliali, determinandosi in tal modo un ancoraggio con lento movimento di rotolamento dei leucociti sulla superficie endoteliale. Il PAF collocato sulle cellule endoteliali ha anche una funzione di segnale: induce infatti una modificazione strutturale nelle integrine presenti sui leucociti così da accrescere la loro affinità di legame per le ICAM dell'endotelio, provocando infine un legame più tenace e la cessazione del loro lento movimento. Il PAF aumenta anche la capacità dei leucociti di rispondere a fattori chemiotattici provenienti dai punti di invasione batterica. Dopo adesione all'endotelio i leucociti si polarizzano e migrano attraverso l'endotelio per fagocitare e distruggere i batteri (2). Inoltre l'endotelio possiede recettori per le LDL, transferrina, mannosio, galattosio ed Apo E (13).

#### *Gli antigeni di superficie espressi dalle cellule endoteliali*

Particolarmente importante è l'antigene CD105, che viene espresso dalle cellule endoteli, dai macrofagi e dalle cellule mesenchimali (Mesenchymal Stem Cell MSC). È stato dimostrato che le MSC estratte dal midollo osseo CD105+ si possono differenziare in cellule endoteliali, con l'ausilio di fattori di crescita endoteliali. Queste cellule esprimono il CD31, marcatore per eccellenza della endoteliale matura, ma la loro plasticità è fortemente dipendente dalle condizioni di coltura (presenza di VEGF). Comunque in questi studi precedenti le cellule non formavano colonie endoteliali classiche ma rimanevano sparpagliate (14). È inoltre stata constatata la presenza di endoteliali CD105+ nei tessuti tumorali o comunque rigenerativi dove è richiesta una spiccata attività angiogenetica. L'espressione genica di CD105 è aumentata in condizioni di ipossia:

sembrerebbe che l'espressione di CD105 prevenga l'apoptosi nelle cellule ipossiche e così promuova l'angiogenesi (15).

Designazione CD	Sinonimi	Struttura molecolare	Funzioni note o preposte
CD31	PECAM-1	140kD	Ruolo nell'adesione leucociti - endotelio
CD34	–	90kD	Ligando per L-selectina
CD40	–	Eterodimero :catene di 44 e 48 kD	Recettore per il CD40 , ligando espresso dai linfociti T; appartiene alla famiglia FAS/TNF-R
CD51	Catena $\alpha$ del recettore per la vitronectina	Eterodimero di 140kD,si associa con CD61	Adesione : Recettore per vitronectina,fibrinogeno,vWF
CD62E	E -selectina, ELAM-1	115kD	Adesione leucociti – endotelio
CD62P	P- selectina, PADGEM	130-150 kD	Adesione leucociti – endotelio, piastrine
Cd102	ICAM-2	55-65kD	Ligando per l'integrina LFA-1
CD105	Endogлина ENG	Dimero di 95 kD	Recettore per il TGF $\beta$ 3 e TGF $\beta$ 1
CD106	VCAM-1	90/95 kD	Recettore per l'integrinaVLA-4 ,ruolo nell'adesione cellulare, nell'attivazione linfocitaria e nell'emopoiesi
CDw109	–	150 /170 kD	?

**Tabella II:Antigeni di superficie espressi dalle cellule endoteliali (13).**

**Oltre al complesso MHC II, le cellule endoteliali esprimono diversi antigeni di superficie che variano a seconda dello stato maturativo e della stimolazione umorale della cellula stessa.I principali sono illustrati nella tabella**

### 1.1.2. Fisiologia del tessuto vascolare: considerazioni biofisiche

I vasi sanguigni sono un sistema chiuso di condotti che porta il sangue dal cuore ai tessuti e da questi nuovamente al cuore. Una parte di liquido interstiziale entra nei linfatici ed, attraverso questi, passa nel sistema vascolare. Il sangue scorre nei vasi, principalmente per la spinta che riceve dall'azione pompante del cuore, ma nel caso della circolazione sistemica, anche per effetto del rimbalzo elastico delle arterie durante la diastole, della compressione delle vene da parte dei muscoli scheletrici nel lavoro muscolare e della pressione intratoracica negativa nell'ispirazione. La resistenza al flusso dipende in piccola parte dalla viscosità del sangue, e principalmente invece dal diametro dei vasi, specie da quello delle arteriole. In ogni tessuto, il flusso è regolato da meccanismi locali chimici e da meccanismi generali nervosi ed umorali, che dilatano o restringono i vasi del tessuto. Tutto il sangue passa per i polmoni, mentre nella circolazione sistemica esso passa per i vari circuiti differenti, in parallelo tra loro, disposizione questa che permette ampie variazioni del flusso sistemico totale.

Flusso Pressione e Resistenza: Il sangue scorre naturalmente da aree ad alta pressione verso aree a bassa pressione, tranne in alcune situazioni nelle quali la quantità di moto mantiene transitoriamente il flusso. Il rapporto fra Flusso medio, pressione media e resistenza dei vasi sanguigni è analogo, in linea generale, al rapporto tra corrente, forza elettromotrice e resistenza nei circuiti elettrici, espresso dalla legge di Ohm (Eq.1, Tab.3). Il flusso in ogni parte del sistema vasale è dato dalla pressione di perfusione effettiva esistente in quella parte divisa per la resistenza. Per pressione effettiva di perfusione si intende la differenza fra la pressione endovasale media all'estremità arteriosa e la pressione endovasale media all'estremità venosa. Le unità di resistenza (pressione divisa per il flusso) sono  $\text{dine}\cdot\text{s}/\text{cm}^5$ .

Applicabilità dei principi fisici al flusso nei vasi sanguigni: I principi fisici e le equazioni che valgono per i liquidi perfetti in tubi rigidi sono stati spesso applicati al sistema circolatorio. Tuttavia i vasi non sono condotti rigidi ed il sangue non è un liquido perfetto, bensì un sistema a 2 fasi formato da un liquido e da cellule. Per questo il comportamento della circolazione differisce, spesso notevolmente, da quello calcolabile in base a questi principi, tuttavia questi aiutano a comprendere molti fenomeni fisiologici.

*Flusso laminare:* Il flusso del sangue nei vasi sanguigni, come quello di un liquido in sottili tubi rigidi è normalmente laminare. Entro i vasi sanguigni, uno strato infinitamente sottile di sangue: in contatto con le pareti, non si muove. Lo strato immediatamente più interno ha una bassa velocità, quello successivo una velocità maggiore, e così via, la velocità raggiungendo il massimo al centro della corrente. Il flusso resta laminare fino ad una certa velocità critica. A questa velocità o superiori il flusso è turbolento. La probabilità di turbolenza è in rapporto anche con il diametro del vaso (analogo) e con la viscosità del sangue (inversamente analogo). Questa probabilità può essere espressa dal rapporto tra forze inerziali e viscosità nell'equazione di Reynolds (Eq.2, Tab.3), la quale produce un numero proporzionale alla probabilità di turbolenza. In base a questo principio la costrizione di un'arteria aumenta la velocità del flusso del sangue attraverso la costrizione e conseguentemente generando turbolenze. Allo stesso modo la aumentata viscosità sanguigna abbassa la probabilità di turbolenze.

*Velocità media:* È importante distinguere la velocità, che è lo spostamento per unità di tempo, dal flusso che è il volume per l'unità di tempo. La velocità è proporzionale al flusso diviso per

l'area trasversa del condotto (Eq.3, Tab.3). Applicando questo principio al sistema circolatorio è comprensibile come la velocità diminuisca nei distretti periferici.

*Flusso:* Il rapporto tra flusso e viscosità ematica e raggio del condotto viene descritta nell'equazione di Poiseuille Hagen (Eq.4, Tab.3) e poiché il flusso è uguale alla differenza di pressione per la resistenza, possono essere correlate tramite questa formula il flusso, la resistenza ed il raggio del vaso. Emerge che piccole variazioni di questo raggio possono influenzare enormemente il flusso nei vasi, poiché è analogo al raggio elevato alla quarta. Per esempio: il flusso attraverso un vaso e raddoppiato per un aumento del raggio di appena il 19% e se il raggio viene raddoppiato la resistenza si riduce al 6% del valore precedente.

*Viscosità e resistenza:* La resistenza è determinata non solo dal raggio dei vasi ma anche dalla viscosità del sangue

*Pressione critica di chiusura:* In un tubo rigido. Il rapporto fra pressione e flusso di liquidi omogenei è lineare, non lo è invece nei vasi sanguigni, in vivo. Quando in un piccolo vaso la pressione scende sotto un certo livello, il flusso cessa. sebbene la pressione non sia zero. Ciò è dovuto al fatto che occorre una certa pressione per forzare i globuli rossi attraverso i capillari e al fatto che i vasi sono circondati da tessuti che esercitano pressione su di essi. La pressione alla quale il flusso cessa è la pressione critica di chiusura

*Legge di Laplace* Il vaso è soggetto a forze inverse quali la pressione distendente e la tensione. Il loro equilibrio è spiegato dalla legge di Laplace (Eq.5, Tab.3); questa legge dice che la tensione nella parete di un cilindro è uguale al prodotto della pressione trasmurale per il raggio diviso lo spessore della parete. Nelle strutture con pareti sottili perciò la pressione è uguale alla tensione diviso il raggio, di conseguenza tanto più piccolo è il raggio tanto minore è la tensione necessaria a far equilibrio alla pressione distendente(16).

Eq.1: Legge di Ohm	$F(\text{flusso}) = \frac{P(\text{pressione})}{R(\text{resistenza})}$
Eq.2: Legge di Reynolds	$Re(\text{Probabilità di turbolenze}) = \frac{\rho(\text{densità}) \times D(\text{diametro vaso}) \times V(\text{velocità flusso})}{\eta(\text{viscosità})}$
Eq.3	$V(\text{velocità flusso}) = \frac{Q(\text{Flusso})}{A(\text{area trasversa del condotto})}$
Eq.4: Legge di Poiseuille Hagen	$Q(\text{Flusso}) = \frac{\Delta P(\text{differenza di pressione})}{R(\text{resistenza})}$ $Q(\text{Flusso}) = \Delta P(\text{differenza di pressione}) \times \frac{\pi}{8} \times \frac{1}{\eta(\text{viscosità})} \times \frac{r^4(\text{raggio})}{l(\text{lunghezza})}$
Eq.5: Legge di Laplace	$T(\text{tensione}) = \frac{P(\text{pressione trasmurale}) \times r(\text{raggio})}{W(\text{spessore vasale})}$

**Tab.3 Equazioni**



## 1.2. L'ingegneria tissutale e la medicina rigenerativa

### *Generalità*

Secondo il vocabolario controllato della U.S. National Library of Medicine's (MESH) usato per classificare gli articoli catalogati nel sistema MEDLINE/PubMed. MeSH ), viene definita( dal 2002) come ingegneria tissutale la scienza che si occupa di generare dei tessuti in vitro per delle applicazioni cliniche, come la sostituzione di tessuti danneggiati o mal funzionanti. Nel 2004 è stata introdotta anche la definizione della Medicina Rigenerativa .Essa è un campo della medicina deputato allo sviluppo di strategie per la riparazione o sostituzione di tessuti danneggiati o organi funzionalmente insufficienti. Questo scopo viene raggiunto tramite l'ingegneria tissutale, il trapianto di cellule staminali, gli organi artificiali ed omologhi .

Secondo le linee guida dell' Istituto della Sanità Statunitense (National Institutes of Health) a questa disciplina potrebbe contribuire alla risoluzione del problema della scarsa disponibilità di organi paragonata all'enorme numero di pazienti che necessitano un trapianto d'organo.

L'ingegneria dei tessuti è un ramo di ricerca sviluppatosi nell'ultimo decennio per la realizzazione di sostituti biologici per ripristinare mantenere e migliorare le funzioni tissutali (17). Le perdite di sostanza legate a traumi, difetti congeniti, resezioni tumorali o patologie possono venir sopperite tramite allotrapianti, xenotrapianti o autotrapianti, tutte metodiche con notevoli svantaggi, come ad esempio la scarsa disponibilità degli organi a disposizione, la difficoltà di conservazione, i problemi immunologici e infettivologici (18).

Ad oggi si possono identificare quattro espressioni principali dell' ingegneria tissutale:

- utilizzo di cellule isolate , cresciute ed amplificate in sistemi in vitro direttamente trapiantate nell'ospite (sostituti cellulari semplici);
- utilizzo di molecole biologiche con effetti inducenti la crescita e/o la differenziazione dei tessuti, diffuse da vettori naturali o artificiali;
- utilizzo di sostituti di matrice extracellulare;
- utilizzo di cellule isolate coltivate in vitro su adeguate matrici (scaffold) ;

La ricerca attuale è rivolta allo studio di nuovi supporti tridimensionali in grado di favorire l'attecchimento e la crescita di cellule, costituiti da sostanze di derivazione animale, come ad es. il collagene, o da materiali di nuova sintesi. Tali supporti vengono definiti biomateriali (18).

### *I biomateriali*

Dal 1960 ad oggi distinguiamo tre generazioni di biomateriali.

-**"Prima generazione"**(dal 1960 alla fine degli anni '70), costituita inizialmente da materiali bio-inerti, ovvero da materiali che coesistono con il tessuto biologico circostante, senza alcun cambiamento significativo, in quanto non innescano alcuna reazione apprezzabile nell'organismo, né di rifiuto né di riconoscimento. Il principio che ha guidato lo sviluppo dei materiali bioinerti era quello di ridurre al minimo la risposta immunitaria nell'organismo ospite, principio che rimane tuttora valido. Appartengono a questa classe, tra gli altri, il polietilene ad altissimo peso molecolare, gli ossidi di tantalio, titanio e zirconio e l'allumina. Vari studi hanno però dimostrato che l'impiego di materiali inerti, non ha portato a risultati molto soddisfacenti. Infatti nessun dispositivo che sia tollerato passivamente dall'organismo e non stimoli una incorporazione ed un riconoscimento, può assicurare la stabilità delle sue prestazioni nel lungo periodo.

-**“Seconda generazione”**. Si tratta di materiali bioattivi e di materiali bioassorbibili. I primi promuovono la formazione di legami con il tessuto biologico, al quale è consentita la crescita sulla superficie del materiale stesso. Appartengono a questa classe, tra gli altri, alcuni biovetri e l'idrossiapatite ad alta densità. I materiali biorassorbibili subiscono una progressiva dissoluzione all'interno del sistema biologico, senza suscitare alcuna reazione di rigetto e senza effetti tossici. Un esempio di materiali biorassorbibili è dato dai comuni fili di sutura biodegradabili, in cui il polimero composto dall'acido polilattico e poliglicolico si decompone in CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O. Appartengono a questa classe, tra gli altri, l'idrossiapatite porosa e alcuni poliuretani.

-**“Terza generazione”**. I concetti, prima separati, di materiali bioattivi e materiali biorassorbibili convergono nei biomateriali di "terza generazione": i materiali bioattivi vengono resi anche riassorbibili e i materiali riassorbibili sono resi anche bioattivi. Sono i biomateriali di terza generazione ad essere utilizzati nell'ingegneria tissutale. Essi, infatti, devono essere capaci di interagire sia con le cellule, supportandone la crescita e la produzione dei componenti della matrice extracellulare, sia, in generale, con l'ambiente in cui vengono inseriti. Contemporaneamente il biomateriale deve essere degradato, lasciando spazio alla crescita di altre strutture, come ad esempio i vasi, garantendo quindi la piena integrazione del costruito ingegnerizzato. Un esempio di biomateriale di terza generazione è dato dagli esteri dell'acido ialuronico.

I biomateriali utilizzati nel tissue engineering possono essere suddivisi in tre classi principali: naturali, semisintetici e sintetici

**I biomateriali naturali** maggiormente usati sono generalmente di natura proteica (come, ad esempio, il collagene di origine bovina o porcina e la fibrina) o polisaccaridica (come, ad esempio, l'acido ialuronico). La loro stessa natura aminoacidica o polisaccaridica può facilitare l'adesione o il mantenimento di funzioni differenziate. D'altro canto, però, questi materiali di origine naturale presentano alcuni inconvenienti, quali la composizione spesso variabile, la scarsa prestazione meccanica, il limitato tempo di permanenza (veloce degradazione o assorbimento) e, soprattutto nel caso di materiali di derivazione animale, problemi relativi alla contaminazione da parte di virus o agenti infettivi non convenzionali.

**I biomateriali semisintetici** vengono prodotti mediante modificazione chimica dei polimeri naturali al fine di migliorarne le caratteristiche meccaniche, la lavorabilità e i tempi di degradazione. Questo tipo di modifica viene fatta generalmente nei polimeri di origine saccaridica a causa della loro elevata idrofilicità che li rende poco idonei alla produzione di matrici per la coltivazione delle cellule. Tra i biomateriali semisintetici troviamo i derivati esterei dell'acido ialuronico (HYAFF) (18).

**I biomateriali sintetici**, pur presentando ,degli aspetti positivi (tra cui, ottima riproducibilità ed interessanti caratteristiche meccaniche), hanno un tempo di degradazione troppo lungo, con il conseguente rischio di esporre il sito d'impianto a fenomeni di tossicità cronica. Tra i biomateriali sintetici troviamo l'acido polilattico e l'acido poliglicolico (19).

Per una corretta progettazione dei biomateriali è necessario tenere in considerazione sia le proprietà biologiche (biocompatibilità) sia quelle fisico-chimiche-meccaniche (porosità, stabilità chimica e resistenza meccanica).

**Tabella III:\* membrana a base di submucosa intestinale porcina**

	Aspetto	Struttura interna
<b>Biomateriali naturali</b>		
▪Collageno	Membrane Spugne	Fibrosa Struttura amorfa porosa
▪Fibrina	Gel semisolido di consistenza variabile	Fibrosa
▪SIM*	Membrana	Fibrosa
▪Tricalcio fosfato	Granulare	Granulare
▪idrossiapatite	Ceramica	Struttura amorfa porosa
<b>Biomateriali semisintetici</b>		
▪Esteri dell'acido ialuronico	Fili e tessuti Tessuti-non tessuti Membrane Granulato Microsfere Spugne Strutture tubolari	Fibrosa Fibrosa Struttura amorfa Granulare Struttura cava Struttura amorfa porosa Struttura amorfa
▪Collageno cross-linkato	Membrane Spugne	Fibrosa Struttura amorfa reticolata
<b>Biomateriali Sintetici</b>		
▪Acido polilattico/poliglicolico e miscele	Fibre Microsfere Tessuti	Fibrosa Struttura cava Fibrosa
▪Acido policaprolattone e miscele	Tessuti-non tessuti Membrane	Fibrosa Struttura amorfa
▪PTFE	Spugne	Struttura amorfa porosa

La tabella presenta le possibilità tecnologiche date dalla lavorabilità di materiali impiegati per l'ingegneria tissutale. I polimeri naturali conservando la struttura del materiale nativo, hanno un numero limitato di configurazioni possibili. I polimeri sintetici o semisintetici, qualora siano solubili in solventi non acquosi, possono invece essere lavorati, impiegando varie tecnologie, dando origine a fibre (con ulteriori possibilità di tessitura, cardatura, ecc..), membrane continue, strutture porose, e così via (17)

### ***L'acido ialuronico***

L'acido ialuronico è una molecola polisaccaridica lineare lunga e non flessibile costituita da unità disaccaridiche che si ripetono (glucuronato e N-acetil-glucosammina) facente parte della famiglia dei glicosaminoglicani(GAG), importanti costituenti della matrice extracellulare. Diversamente dagli altri GAG, l'acido ialuronico non è solforato a livello dell'amino zucchero e di conseguenza non è carico negativamente e non attrae cationi quale il sodio. Ha un peso molecolare

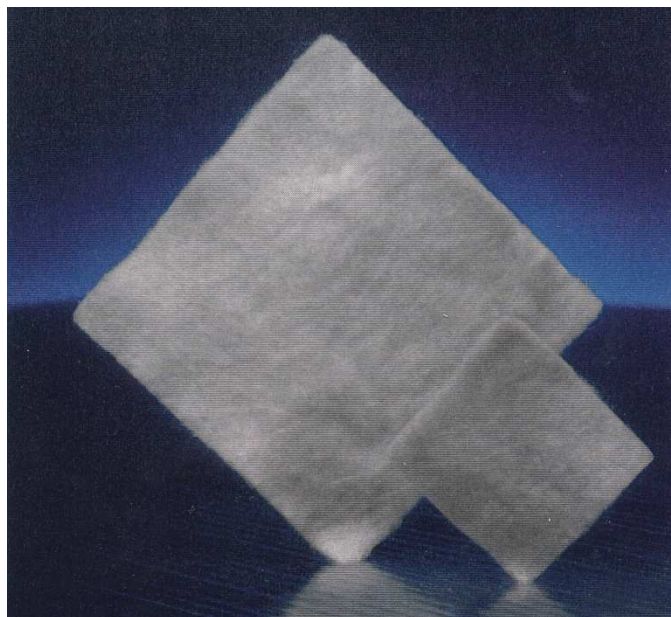
di  $10^7$ - $10^8$  Da. A livello del tessuto connettivo l'acido ialuronico raggiunge dimensioni di  $20\mu\text{m}$  e legandosi ai proteoglicani, soprattutto aggregati, formano delle grandissime molecole di peso molecolare di diversi milioni di Dalton. Queste sono responsabili dello stato gelificato della matrice extracellulare che agisce come barriera alla diffusione rapida dei liquidi (1). L'acido ialuronico può essere isolato da tessuti animali così come da colture microbiche. Questo materiale assorbe un'enorme quantità di acqua all'equilibrio ed eventualmente diventa totalmente solubile, ma grazie al suo alto peso molecolare si dissolve molto lentamente. Forma quindi gel acquoso che non si presta a formare strutture tridimensionali stabili.

#### *HYAFF*

Di recente nei laboratori FAB (Fidia Advanced Biopolymers, Abano Terme Italia), l'HA è stato utilizzato per la preparazione di polimeri semisintetici, insolubili in acqua, previa esterificazione dei gruppi carbossilici, presenti nell'acido glucuronico, con alcoli alifatici o aromatici (20). Questa reazione viene attuata mediante la graduale aggiunta dell'agente esterificante al sale d'ammonio quaternario dell'HA. È importante osservare che l'esterificazione può essere controllata abbastanza accuratamente (la reazione è infatti stechiometrica ed il grado di esterificazione ottenuto è determinato esclusivamente dalla quantità di agente alchilante aggiunta), in modo da ottenere derivati a diverso grado di esterificazione (da 0 a 100%) del gruppo carbossilici.

Questi polimeri semisintetici, che vengono denominati HYAFF, presentano una buona stabilità ed una notevole capacità di interagire con molecole polari. Pur mantenendo le stesse proprietà biologiche dell'HA, gli HYAFF mostrano, rispetto a questo, un tempo di permanenza nel luogo dell'applicazione in vivo più lungo.

Essi inoltre hanno la caratteristica di poter essere processati mediante varie tecniche di tessitura fino ad ottenere diversi tipi di manufatti, come garze, spugne, microsfele, granuli, membrane, feltri di non-tessuto (NW), con caratteristiche differenti, idonee ad una vasta gamma di applicazioni biomediche (21).



**Figura 3:**Scaffold di HYAFF 11 sotto forma di non tessuto (Non Woven ,NW)

Sono stati condotti numerosi esperimenti per chiarire i diversi aspetti della biocompatibilità a lungo e a breve termine dei biomateriali HYAFF, sia in vitro che in vivo (22). Questi studi hanno dimostrato che tali materiali risultano assolutamente biocompatibili e che sono in grado di presentare differenti proprietà biologiche a seconda del tipo di modificazione chimica che viene apportata alla molecola dell'HA (23). Sono state effettuate indagini anche per identificare e quantificare i prodotti di degradazione di questi derivati dell'HA, per comprendere meglio i meccanismi del loro bioassorbimento. Da queste indagini è emerso che i derivati esterificati dell'HA subiscono un'idrolisi spontanea del legame estereo in ambiente acquoso, che viene influenzata sia dal pH che dal contenuto ionico. E' stato inoltre provato che la loro biodegradabilità varia a seconda del tipo di estere e della percentuale di esterificazione dei gruppi carbossilici della molecola originaria. Tutto ciò permette di sintetizzare biomateriali con stabilità differenti, che possono essere degradati in un arco di tempo variabile tra pochi giorni e diversi mesi, e di poter scegliere tra questi il più adatto all'utilizzo nelle diverse situazioni (5). Sono proprio questi biomateriali che, grazie alla loro biocompatibilità e biodegradabilità modulabile, si adattano particolarmente bene ad essere utilizzati come substrati per coltivare cellule che successivamente verranno trapiantate su tessuti lesionati (6).

Da allora biomateriali a base di acido ialuronico sono stati usati per l'ingegneria di costrutti di diversi tessuti: cute, tessuto cartilagineo e tessuto osseo. Esistono ad oggi diverse forme di questo biomateriale come garze, spugne, microsfeere, granuli, membrane, feltri di non tessuto (Non Woven), con caratteristiche differenti, idonee ad una vasta gamma di applicazioni biomediche (21).

#### *Acido ialuronico e Angiogenesi*

L'HA ha anche un ruolo di primissimo piano nell'angiogenesi tessutale, infatti l'angiogenesi dipende fondamentalmente dalla capacità di migrazione e proliferazione delle cellule endoteliali, processi che a loro volta dipendono dalla presenza di HA.

Diversi studi in vitro hanno già dimostrato che la concentrazione locale e, in particolare, la dimensione delle molecole di HA hanno un effetto diretto sia sulle cellule endoteliali, sia sul processo angiogenico, in particolare sono risultati attivi gli oligosaccaridi ialuronici costituiti da 4 fino a 25 disaccaridi. L'HA si è dimostrato attivo anche nel favorire la migrazione e la successiva attivazione dei macrofagi tessutali e dei neutrofili che, una volta attivati, sono in grado di secernere fattori angiogenici e mitogeni essenziali nella formazione del tessuto di granulazione che è la base dell'angiogenesi (8). E' stato dimostrato che il biomateriale a base di HA (Hyaff-11®) promuove il processo di formazione di nuovi capillari poiché permette alle cellule endoteliali di crescere ed organizzarsi in strutture capillari (9,10).

### **1.3. Prodotti dell'ingegneria tissutale dei vasi di piccolo calibro**

#### ***Generalità***

Nella odierna società occidentale la prevalenza della aterosclerosi arteriosa è in aumento, e perciò le patologie vascolari cardiache e periferiche costituiscono la maggior causa di morte (24). Una relazione della British Heart Foundation ha rivelato che queste patologie sono responsabili di più di un terzo delle morti nel Regno Unito (25). Secondo questa relazione, si stima che circa 12 milioni di persone sotto l'età di 75 anni hanno o hanno avuto episodi di angina e circa 800 000 hanno sofferto un infarto miocardico. Inoltre, la prevalenza di pazienti con l'ischemia di arto inferiore è di 1 /2500, pazienti che se lasciati non curati, richiederanno delle amputazioni maggiori

(26). Sebbene la chirurgia endovascolare e mininvasiva siano sempre più utilizzate, rimane un numero significativo di casi irrisolti, che riguardano la malattia arteriosa complicata o le procedure endovascolari fallite. Per il bypass degli arti inferiori, l'intervento di riferimento è ritenuto il bypass con vena safena autologa con un 75 % di pervietà al 5 anno (27), mentre per il bypass cardiaco l'intervento gold standard è rappresentato dal bypass con l'utilizzo della mammaria interna (28). Sfortunatamente un 30 % di pazienti che necessitano di bypass degli arti inferiori non dispone di una appropriata vena safena (29) e nemmeno tutti i pazienti candidati a bypass coronarico presentano una adeguata arteria mammaria interna (30). Questi fattori hanno suscitato l'interesse dei ricercatori per lo sviluppo di condotti vascolari alternativi che soddisfino le proprietà meccaniche e biologiche dei vasi nativi. Le alternative attuali sono delle protesi a base di polytetrafluoroethylene espanso (l'ePTFE) ed il terephthalate di polietilene. Comunque, la loro pervietà a 5 anni è solo 40-50 per cento quando usati nel bypass all'arteria poplitea (31) prossimale e 20 per cento a 3 anni quando usati per il bypass infrapopliteo (32). Vi sono pertanto in questo campo diversi approcci che variano dagli approcci cellulari o d'ingegneria tissutale all'utilizzo di componenti omologhe o meramente sintetiche.

### ***Il sostituto cardiovascolare ideale***

Le proprietà del sostituto ideale arterioso sono elencate nella tabella 5. Sfortunatamente attualmente nessun prodotto possiede tutte queste qualità. Sebbene i tassi di pervietà siano accettabili con l'utilizzo di sostituti in ePTFE o Dacron nei grossi vasi (33), i risultati non sono soddisfacenti quando i prodotti attualmente in commercio vengono applicati nei piccoli vasi. Questo è dovuto al basso-flusso dentro un vaso di piccolo diametro (34-36) e alla differenza di compliance tra la protesi ed il vaso (37-39). L'iperplasia intimale (40) ed la trombogenicità inerente al materiale protesico sono i maggiori fattori contribuenti.

La ricerca di un sostituto vascolare di piccolo-diametro ha fornito dettagli sulle proprietà biologiche ed emodinamiche di vasi sanguigni e ha posto nuovi quesiti in quest'ambito. L'innesto tubulare di Spark (41) è stato uno dei primi sostituti "biologicamente" orientati. Questo tubo di fibrocollagene è stato prodotto dalla reazione di corpo estraneo attorno a un mandrino di silicone. Comunque, non si è dimostrato affidabile, essendo incline prima alla trombosi ed in seguito alla degenerazione aneurismatica (42). Anche gli altri innesti biologici, come la vena safena criopreservata (43), la vena ombelicale (44,45) o gli allografts arteriosi (46), presentano tassi di pervietà e complicazioni che ha reso inaccettabile il loro utilizzo di routine. Il concetto di innesti "viventi" biologici implica la capacità di immediata risposta agli stimoli ambientali, la possibilità di remodellamento dall'ospite e di autoriparazione se vi fosse una lesione. Una delle maggiori differenze tra i condotti protesici ed autologhi è la presenza negli'ultimi di uno strato vivente funzionale di cellule di endoteliali che riposa su uno strato metabolicamente attivo di cellule

Proprietà desiderate(2)
Forza tensile ed elasticità adeguate
Nessuna Tossicità
Nessuna immunogenicità
Biocompatibilità
Disponibilità immediata in diverse misure per casi urgenti;
Maneggievolezza
Resistenza alla trombosi
Resistenza all' infezione
Integrazione con l'ospite e crescita in paziente pediatrico
Ragionevole costo di realizzazione
Resistenza all' infezione
<b>Tab.5: Proprietà del biomateriale ideale per il tessuto vascolare</b>

muscolari lisce, e matrice extracellulare ricca di collagene. La presenza di elastina e di collagene nella parete arteriosa danno le proprietà elastiche adeguate. Gli attuali condotti protesici mancano di queste proprietà e non possono "guarire" completamente negli esseri umani, non stimolando la crescita di tessuto necessaria ovvero la copertura della superficie dall'endotelio (47). Ci sono tre fonti possibili di endotelializzazione: la crescita transanastomotica dall'arteria nativa, la crescita trans murale, la deposizione dal circolo di precursori circolanti di cellule endoteliali (48). Il più vivo interesse era attorno all'endotelializzazione transanastomotica. Comunque, si è chiarito presto che questo genere di "guarigione" negli esseri umani, di solito anziano e diabetico, è raramente possibile al contrario di quanto osservato nei modelli animali (49). Sebbene i cani ed i babuini abbiano una buona capacità di crescita endoteliale transanastomotica, gli esseri umani conseguono raramente crescite per più di 10 millimetri attorno alle anastomosi (48).

### ***Lo sviluppo di un vaso sanguigno con metodiche di ingegneria tessutale***

Il lavoro pionieristico di Carrel e Guthrie nello sviluppo di culture tessutali ha cambiato l'approccio alla moderna progettazione tessutale vascolare (50). Comunque, lo sviluppo di vasi sanguigni durevoli e funzionali costituisce un'ardua sfida. Attualmente pochissimi degli innesti tessutali realizzati con metodiche di ingegneria vascolare sono stati usati in clinica (51-54).

Tre sono le componenti fondamentali in questo approccio: lo scaffold (sia biologico che protesico), la matrice, e le cellule endoteliali di rivestimento. Lo scaffold deve fornire la forma necessaria e la forza iniziale ma anche consentire alle cellule di aderire e proliferare dentro una data struttura. Può essere permanente e fornire un sostegno a lungo termine, o biodegradabile, rimanendo integro il tempo sufficiente per consentire al vaso sanguigno crescente di maturare adeguatamente. La matrice extracellulare ha un ruolo cruciale nell'assistere l'adesione, la proliferazione, ed il mantenimento di un corretto fenotipo delle cellule endoteliali. Potrebbe avere molte forme, dai peptidi purificati e le glicoproteine, alle matrici cellulari composte da fibroblasti e cellule muscolari lisce(55). Uno strato endoteliale sano è vitale per creare una superficie antitrombogenica.

### ***Il seeding di cellule endoteliali nei condotti protesici***

Nei primi tentativi di ingegneria dei vasi sanguigni è stato tentato direttamente il seeding del lume del condotto protesico con cellule endoteliali nel tentativo di sopperire alla mancanza di una superficie antitrombogenica. Attualmente sono stati sviluppati metodi molto efficaci per il prelievo di cellule endoteliali (56,57). Un approccio a 2 stadi, con un periodo di cultura delle cellule, è di solito necessario per ottenere dei numeri sufficienti di cellule prima di qualunque tentativo di seeding.

Recentemente sono state sviluppate nuove tecniche per migliorare l'adesione cellulare (58-60). Si sono dimostrati particolarmente promettenti l'uso di molecole bioattive, come il tripeptide Arg-Gly-Asp (61) o la addizione di fibroblast fundamental factor (62) su una superficie protesica. Per evitare la cultura cellulare, Jarrel (63) ha studiato l'uso di cellule di endoteliali derivate dal tessuto adiposo, concludendo che queste cellule potrebbero essere raccolte in numero sufficiente per rivestire un condotto protesico in un intervallo di tempo ragionevole. Comunque, la controversia riguardante la purezza e l'origine di queste cellule del microcircolo ha portato all'abbandono del loro utilizzo(64). La strategia ora in via di maggior sviluppo per incoraggiare la formazione di cellule endoteliali o muscolari lisce è a partenza dalle cellule staminali (65-67). Questa strategia ha il vantaggio di fornire cellule indifferenziate con un'alta capacità di raddoppiamento cellulare per lunghi periodi di tempo. Questi progenitori sono capaci di differenziarsi in più linee:

l'ematopoietica, la mesenchimale ed endoteliale (68). Le cellule mesenchimali si sono dimostrate capaci di differenziarsi in cardiomiociti in strutture simil vascolari in vitro ed in vari modelli in vivo(69). Le cellule di progenitrici endoteliali potrebbero essere raccolte dal midollo osseo o dal sangue circolante e hanno anche loro un potenziale differenziativo in cellule muscolari lisce e cardiomiociti<sup>63</sup>. Potrebbero essere isolate ed allargate dopo prelievi abbastanza piccoli di sangue periferico (51-69). Matsumura (70) ha sperimentato l'uso di uno scaffold biodegradabile con le cellule di progenitrici endoteliali nella cava nel modello canino. L'analisi degli espianti ha confermato che queste cellule avevano proliferato ed si erano differenziate in l'endoteliali e cellule muscolo lisce. Sebbene i test clinici che usano i condotti protesici endotelializzati per il bypass femoropopliteo siano rari ed i dati di followup limitati, c'è stato qualche studio promettente. In un recente studio (51), sono stati descritti i risultati di 153 bypass endotelializzati con una pervietà primaria di 62,8 percento a 7 anni. Stranamente vi è un tasso di pervietà di 70,8 percento per il bypass ai vasi sotto il ginocchio e 60,0 percento per quelli al di sopra del ginocchio. Comunque, questa chirurgia è limitata solo a centri specializzati con la possibilità di eseguire culture cellulari. Non è chiaro se questi ottimi risultati di solo centro potrebbero essere conseguiti anche da altri ed inoltre se questo approccio molto costoso condurrebbe agli alti tassi di pervietà a lungo termine.

### ***Gli scaffold naturali***

L'uso di scaffold naturali acellulari è stata dapprima proposta da Rosenberg (71) il quale ha usato l'arteria carotide bovina. Lantz(72) ha sviluppato un innesto biologico vascolare derivato dalla mucosa del piccolo intestino del maiale e l'ha testato nel modello canino. La biocompatibilità ed i buoni tassi di pervietà dimostrati dal prodotto in seguito all'impianto nell'aorta, la carotide e le arterie femorali, e nella cava accrescono le aspettative su di esso. Dopo 90 giorni, gli innesti hanno mostrato una struttura istologica simile a quella del vaso adiacente. Allo stesso modo, Huynh(73) ha usato uno scaffold di collagene derivato dalla mucosa del piccolo intestino del maiale e collagene bovino di tipoI. Quest'impalcatura è stata decellularizzata usando il Triton X-100 e la superficie luminale è stato trattato con l'eparina. Quest'innesto acellulare è stato poi impiantato nelle aorte di coniglio ed espantato a 90 giorni. Non vi era segno di trombosi. Clarke(74), usando soluzioni ipotoniche ed il ribonucleasi, ha decellularizzato gli ureteri bovini che sono stati poi innestati nell'aorta del cane con pervietà del 100 percento e nessun aneurisma a 10 mesi. Gli innesti di vena di allogena, come la vena di safena criopreservata o la vena ombelicale umana (HUV), hanno trovato una collocazione nella chirurgia periferica vascolare, sebbene il loro uso rimanga limitato. I primi report di rottura degli innesti attraverso la degenerazione della parete vasale hanno causato serie preoccupazioni negli addetti ai lavori(44).Una recente revisione retrospettiva di 240 rivascularizzazione infrainguinale con vena di safena criopreservata ha dimostrato una pervietà solo del 30 percento a 1 anno(75). Malgrado gli studi promettenti sugli innesti di seconda-generazione, come HUVstabilizzata con la gluteraldeide(76), in pratica tali bypass tendono ad essere riservati solo ai casi secondari dopo infezione di altre protesi.

### ***Gli scaffold permanenti sintetici***

Dopo i scarsi risultati di questi prodotti in termini di pervietà a distanza essi stanno adesso tornando all'attenzione di molti studiosi internazionali combinati a miscele di prodotti biologici , che possano migliorarne le performance.



Nel 1979, Bell descrisse il fenomeno di contrazione dei fibroblasti umani in una soluzione proteica (77). Ha dimostrato che il tasso di contrazione del gel di collagene potrebbe essere controllato variando la concentrazione proteica o cellulare del miscuglio, ipotizzando che questo modello potrebbe essere usato per studiare la funzione dei fibroblasti. Partendo da questo studio di riferimento, le cellule di muscolo bovine lisce sono state usate per formare un gel di collagene intorno a un mandrino tubolare. Una manica di rete di Dacron esterna ha rinforzato la matrice cellulare risultante. La superficie esteriore è stata poi arricchita con fibroblasti bovini finché dopo un'ulteriore contrazione è risultata una struttura tubolare che può poi essere sfilata dal mandrino centrale, consentendo la semina di cellule endoteliali nel lume. Questo innesto rinforzato con il Dacron ha una rassomiglianza fondamentale a un'arteria muscolare. Comunque, l'innesto manca di elastina e le cellule incorporate hanno adottato un'orientamento non soddisfacente longitudinale perché la contrazione della matrice si è sviluppata in senso radiale. Ratcliffe(78) ha usato uno scaffold di uretano con i cellule muscolari lisce "precondizionate" per 4 o più settimane, generando le proteine di matrice extracellulare come il collagene, l'elastina ed i proteoglicani. In seguito sono state seminate e ricoltivate le endoteliali. Gli innesti risultanti sono stati impiantati nell'arteria carotide di cani con pervietà del 100 per cento a 4 settimane. Per sopperire alla mancanza di compliance presentata dalla maggior parte degli scaffolds (79,80) un innovativo innesto di uretano è stato sviluppato, ed è stato ricoperto con una matrice di collagene e rivestito con le cellule di endoteliali estratte dall'omento umano.

### ***Gli scaffold biodegradabili sintetici***

I lavori più recenti in questo ambito riguardano biopolimeri sintetici con i poliuretani, il PLLA e PGA. Yue(81) ha usato uno scaffold microporoso biodegradabile di poliuretano e seminando in esso cellule muscolari lisce murine. Tali innesti sono stati impiantati nell'aorta di topo dimostrando un pervietà superiore ai controlli non cellularizzati. Niklason(82) ha invece studiato l'acido di polyglycolico (PGA), chimicamente modificato dalla soda caustica per aumentare l'idrofilicità e migliorando così l'assorbimento proteico. Gli innesti di PGA sono stati cellularizzati con cellule muscolari lisce e poi coltivati per 8 settimane sotto le condizioni di pressione di pulsatile prima del seeding con le cellule endoteliali. I condotti risultanti erano morfologicamente simili alle arterie native e si contraevano in modo sensibile quando esposti alla serotonina o all'endotelina 1. Inoltre hanno resistito le pressioni radiali sopra i 2000 mmHg. Questi condotti sono stati impiantati alla fine nelle arterie safene del suino. Gli innesti hanno avuto un tasso di pervietà al 100 per cento a 4 settimane, invece dei controlli non sviluppati in bireattore pulsatile sono andati incontro a trombosi entro 3 settimane. Shum-Tim(83) ha usato un polimero di PGA e polidrossialcognato (PHA) come scaffold su a cui ha coltivato un miscuglio di cellule muscolari ed endoteliali e fibroblasti. Quando impiantati nell'aorta addominale dell'agnello, tutto gli innesti sono rimasti pervii a 150 giorni; i controlli non cellularizzati sono invece andati incontro a trombosi.

### ***Vasi progettati senza l'uso di scaffold***

Si sono sviluppati dei vasi esclusivamente mediante l'uso di colture cellulari. Hirai (84) ha sviluppato descritto un condotto tubolare costituito gelificando un mix di collagene in soluzione e cellule muscolari lisce canine in uno stampo tubolare. Dopo 10 giorni di cultura, il tubo è stato finalmente arricchito con le cellule endoteliali di giugulare canina. La pressione di rottura rilevata per questi condotti è di 50 mmHg con la minima concentrazione di collagene e fino a 110 mmHg per quei preparati con più alta concentrazione (85). Quattordici innesti sono stati impiantati nella

vena cava per un periodo di 24 settimane. Sebbene nella loro fabbricazione non è stata usata alcuna impalcatura, gli innesti e le anastomosi sono stati rinforzati con la rete di Dacron durante l'impianto (86). Nove dei quattordici innesti si sono dimostrati pervi a 24 settimane.

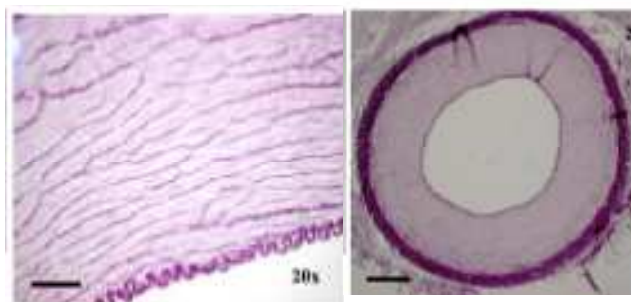
L'Heureux (87) ha prodotto un innesto innovativo esclusivamente mediante culture di cellule umane. Sono stati utilizzati degli strati di fibroblasti, cellule muscolari lisce ed endoteliali. Gli innesti sono stati impiantati nei cani, con un tasso di pervietà di solo 50 percento a 1 settimana. Malgrado recenti progressi nell'ingegneria dei tessuti ed i nuovi approcci meccanici e biologici per replicare la struttura e la funzione di un vaso sanguigno di piccolo diametro, nessun innesto artificiale è stato ancora adottato nella pratica clinica di routine. Lo studio delle tipologie cellulari e delle matrici extracellulari e le loro interazioni sarà cruciale al successo di questo tipo di sforzo. Un approccio alternativo è l'uso di materiali di nanocompositi amfilici nella fabbricazione di superfici emocompatibili (88). Lo sviluppo di bioreattori pulsatili sono necessari per migliorare la maturazione degli innesti cellularizzati. Inoltre, per questi prodotti di raggiungere l'arena clinica, diverse questioni riguardanti la regolamentazione devono essere soddisfatte. Queste applicazioni potranno probabilmente essere a disposizione solo in centri specializzati con grandi risorse di laboratorio o. Un'altra frontiera è costituita dalle molecole bioattive. Sebbene le molecole con la sequenza Arg-gly-asp RGD sia estremamente efficace nel guidare l'adesione e la proliferazione e differenziazione successiva delle endoteliali sul poliuretano e gli scaffold biodegradabili, la manipolazione ulteriore di sequenze di peptide potrebbe aumentare quest'efficacia, particolarmente se usati in scaffold nanocompositi.

Un altro approccio promettente coinvolge nel seeding di situ che usa questo peptide RGD (89). È probabile, attraverso lo sviluppo di tale scaffold, l'endotelizzazione si realizzi in vivo, fornendo perciò un prodotto "off-the-shelf" Questo eviterebbe diverse questioni che complicano il passaggio di alcune applicazioni dal laboratorio alla clinica, come la richiesta di colture sterili, tempo per effettuarle ed enormi risorse economiche per mantenerle.

#### **1.4. Gli impianti a base di acido ialuronico**

I biomateriali a base di acido ialuronico sono biodegradabili e biocompatibili, e sono attualmente utilizzati per parecchie applicazioni di ingegneria tissutale(90). Precedenti studi hanno dimostrato come questi biomateriali promuovano l'adesione e la proliferazione di cellule endoteliali e cellule muscolari lisce(91,92). Queste specifiche proprietà hanno suggerito di sperimentare questo biomateriale nel campo dell'ingegneria tissutale in ambito vascolare. Inoltre l'acido ialuronico può essere plasmato in molte forme. Perciò è stato sviluppato un condotto tubulare a base di acido ialuronico ( Hyaff11) chiamato ABAT (Artery regeneration BioAssisted Tube) che è stato utilizzato per saggiarne la funzionalità a livello del tessuto vascolare arterioso. In uno studio preliminare un innesto di 2mm di diametro è stato impiantato nell'aorta addominale del ratto. I rilievi istologici ed immunostochimici hanno dimostrato la piena rigenerazione dell'arteria, il riassorbimento del biomateriale dopo 120 giorni dall'impianto senza rilevazione di eventi avversi(93).

Lo stesso biomateriale tubulare (con un calibro maggiore 4mm) è stato utilizzato nella carotide del modello porcino. E stata dimostrata una valida rigenerazione della tonaca media . In particolare si è osservata la rigenerazione della componente elastic del vaso La pervietà è stata provata con prove Eco doppler ogni 15 giorni. Dopo 5 mesi il biomateriale si è degradato ed è stato sostituito da una arteria completamente simile a quella nativa(94).



**Figura 4. Sezioni trasversali della protesi dopo 4 mesi. : completa rigenerazione della lamina elastica (Scale bar 2 mm)(94).**

## **PROGETTAZIONE E SCOPO DELLO STUDIO**

Questo studio si prefigge di sperimentare in diversi modelli animali dei biomateriali a base di acido ialuronico (Hyaff-11). E' diviso in tre sezioni che si prefiggono diversi obiettivi.

a. Il biomateriale in forma laminare verrà utilizzato per riparare dei difetti sulla parete vascolare della aorta addominale del ratto. Nel contesto dell'aorta addominale del ratto questo biomateriale in forma tubulare è già stato sperimentato, dimostrandosi efficace nel guidare la rigenerazione vasale(93). Il presente studio si prefigge di sperimentare il prodotto in forma laminare su un deficit parziale di parete per una eventuale futura applicazione clinica, ma anche per comprendere gli step della guarigione e costruire un modello di rigenerazione arteriosa.

b. Un condotto tubulare di acido ialuronico (2 mm diametro per 1.5 cm lunghezza) è stato interposto dopo interruzione della vena cava del ratto come una guida riassorbibile per la rigenerazione venosa. Lo scopo di questo esperimento è la valutazione della eventuale rigenerazione venosa.

c. I condotti di acido ialuronico sono stati interposti nei vasi componenti il peduncolo vascolare di un trapianto libero (lembo inguinale) nel coniglio. Questo studio permette di dimostrare la funzionalità dei condotti in questione , poiché valuta la vitalità dei trapianti liberi , dei quali l'afflusso e il deflusso di sangue avviene unicamente attraverso le protesi.



## MATERIALI E METODI

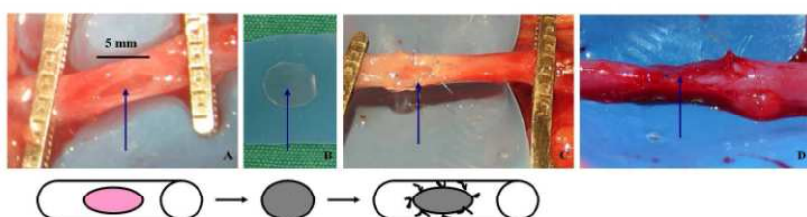
### Impianto di patch arterioso a base di acido ialuronico nella aorta addominale del ratto

#### *Materiale usato per il patch*

Il materiale usato per la realizzazione dei patch è una lamina semipermeabile, trasparente di HYAFF 11 ® (Fidia Advanced Biopolymers, Abano-Terme, Italia), un ester benzilico di acido di ialuronico. Nello specifico lo HYAFF 11 ® è derivato dall'esterificazione totale dello ialuronico (ialuronato di sodio con peso molecolare dai 80 kD ai 200 kDa) con l'alcol benzilico. Il prodotto finale è un polimero uncrosslinkato lineare con un peso molecolare indeterminato; è insolubile nella soluzione acquosa ed è soggetto a idrolisi spontanea nel tempo, rilasciando l'alcol benzilico e l'acido ialuronico. La lamina creata ha uno spessore di 0.1 mm-thicknessed un peso specifico di 100 g/m<sup>2</sup>.

#### *Impianto del patch nell' aorta addominale del ratto*

Il protocollo è stato approvato dal Comitato di Cura Istituzionale Animale di Università di Padova. Sono stati operati Venti topi di Wistar maschi del peso tra i 250–350 gr. Le procedure chirurgiche sono state eseguite con gli animali mantenuti sotto anestesia gassosa (Sevofluorane). L'area addominale è stata rasa ed è stata asetticamente preparata con lo iodio-povidone (Betadine). Attraverso un'incisione trasversale addominale di 3 cm è stata isolata ed esposta l'aorta, dalle arterie renali al biforcazione dell'aorta. Dopo aver clampato il vaso, è stata aperta sulla parete arteriosa una breccia (Fig 5) rettangolare (1 x 5 millimetri). Il difetto arterioso è stato riparato con il patch di HA. Il patch è stato confezionato ritagliando un rettangolo di materiale da un foglio di 10 x 15 cm in una forma conveniente ed un un po' più grande del difetto della parete vascolare (Fig 5B). La breccia è stata riparata con 6 punti staccati di sutura 10-0 di prolene, con l'ausilio del microscopio operatorio(Fig5). Questo materiale protesico, essendo morbido ed elastico, si è dimostrato facile da modellare e suturare, ma allo stesso tempo abbastanza forte per sostenere i punti e non venir quindi lacerato dal filo. Questa lamina trasparente è stata facilmente fissata sul difetto controllando i sottostanti margini della breccia indotta(Fig.5C). Il tempo richiesto per l'impianto del patch è stato 40 minuti. Non è stata somministrata nessuna terapia anticoagulante prima o dopo l'operazione, e nessuna terapia antibiotica profilattica. Tutte le procedure chirurgiche sono state eseguite in una moda identica da un chirurgo solo. Nel postoperatorio gli animali sono stati nutriti con una dieta standard e senza restrizioni.



**Fig5. Impianto del patch (A) Freccia azzurra sul difetto vascolare (B)Freccia azzurra sul patch. (C) Freccia azzurra sul difetto vascolare riparato (D) Freccia azzurra sul patch subito dopo l'apertura delle clamp  
265x74mm (150 x 150 DPI)**

### ***L'espianto dei preparati***

Sono stati sacrificati quattro animali a 1, 2, 4, 8 e 16 settimane. Prima del sacrificio, i topi sono stati valutati per rilevare eventuali problemi nelle condizioni generali. L'anestesia è stata indotta come nella procedura d'impianto. Il punto d'impianto è stato esposto con attenzione. È stata raccolta la documentazione fotografica per le osservazioni macroscopiche. Dopo clampaggio, l'aorta è stata incisa trasversalmente, dapprima distalmente poi prossimalmente, 5 millimetri dal patch. I segmenti prelevati sono stati risciacquati con attenzione con soluzione salina eparinata. I campioni sono stati tagliati trasversalmente alla linea mediana in due pezzi e sono stati fissati in formaldeide. Dopo il prelievo del segmento aortico, gli animali sono stati sacrificati con un'overdose di barbiturici (la soluzione di sodio di Nembutal, i Laboratori di Abbott, il Parco di Abbott, IL).

### ***Istologia ed Immunoistochimica***

I campioni, dopo deidratazione e inclusione in paraffina sono stati sezionati. Le sezioni dell'aorta sono state colorate con l'ematoxilina-eosina (EE) e la soluzione di Weighert. Negli studi di immunofluorescenza delle cellule endotheliali sono stati usati degli anticorpi al fattore di Willebrand di von (il vWF) (DAKO, Carpinteria, CA). Le cellule sono state inoltre studiate per rilevare l'espressione di myosin light chain kinase (MLK) secondo il metodo descritto da Vescovo et al., per caratterizzare le cellule muscolari lisce. (95,96).

## **Impianto del condotto tubulare a base di acido ialuronico nella vena cava del ratto**

### ***Realizzazione delle protesi vascolari***

Il biomateriale, derivato dall'esterificazione totale di ialuronato (ialuronato di sodio di peso molecolare 80–200 kDa) con l'alcol benzilico e commercialmente identificato come come HYAFF-11, è stato dissolto in DMSO. Un cilindro rotante in acciaio, Ø 3 millimetri, è stato ricoperto con 1,5 ml dell'HYAFF-11/DMSO, e la soluzione è stata coagulata in seguito in un bagno di etanolo. I tubicini modellati sono stati tolti con attenzione dal cilindro, dando origine a condotti di 2,0 cm nella lunghezza e 2 millimetro di diametro (0,5mm spessore), lavati nell'acqua ed asciugato con flusso d'aria. Confezionati poi in fiale tipo Falcon, sono stati sterilizzati mediante gamma-radiazione. Questo tubicini in HYAFF-11 sono stati donati dalla Fidia Advanced Biopolymers (Abano-Terme, Italia). Sono stati usati per precedenti lavori nelle arterie e perciò nominati ABAT (Artery Bio-regeneration Assit Tube).

### ***Impianto delle protesi nella vena cava del ratto***

Il protocollo è stato approvato dal Comitato di Cura Istituzionale Animale di Università di Padova. Sono stati operati quindici topi di Wistar maschi dal peso di 250–350 g. Le procedure chirurgiche sono state eseguite mentre gli animali venivano mantenuti sotto l'anestesia gassosa (Sevofluorane). I vasi maggiori addominali sono stati esposti tramite di un' incisione addominale di 3 cm. Dopo isolamento e clampaggio della vena, nel suo segmento sottorenale (1,5 cm) è stato inserito il condotto ABAT, 2 millimetro nel diametro e 1,5 cm nella lunghezza, precedentemente ammorbidito nella soluzione fisiologica per circa 1 ora. Il condotto è stato dapprima anastomizzato prossimalmente poi distalmente con i monconi della vena ricevente mediante i punti singoli di 10,0 prolene. Non è stata somministrata nessuna terapia anticoagulante prima o dopo l'operazione, e nessuna terapia antibiotica profilattica. Tutte le procedure chirurgiche sono state eseguite dallo stesso chirurgo seguendo il protocollo. Nel postoperatorio gli animali sono stati nutriti con una dieta standard e senza restrizioni. Tutte le procedure chirurgiche sono state eseguite in una moda identica da un chirurgo solo. Gli animali sono stati nutriti con una dieta standard senza restrizioni.

### ***Espianto delle protesi***

Cinque animali sono stati sacrificati ad 30, 60 e 90 giorni. L'anestesia è stata indotta come nell'intervento d'impianto. Dopo il clampaggio, la vena cava è stata inciso trasversalmente, dapprima distalmente poi prossimalmente, 3 millimetri dalle anastomosi. Le protesi sono state fissate in formaldeide per gli studi istologici ed immunoistochimici. Dopo l'espianto dell'innesto, l'animale è stato ucciso con un'overdose di barbiturici (la soluzione di sodio di Nembutal, i Laboratori di Abbott, il Parco di Abbott, IL).

### ***Analisi morfologica dei campioni***

I campioni tissutali, dopo inclusione e sezione, sono stati colorati con ematossilina/eosina e con la soluzione di Weighert e valutati per l'infiltrazione cellulare. Gli studi di immunofluorescenza per la ricerca di cellule endoteliali sono stati eseguiti con anticorpi per fattore di Willebrand di von (il vWF) (DAKO, Carpenteria, CA). Per caratterizzare le cellule di muscolo vascolari lisce invece è stato utilizzato l'anticorpo per la myosin light chain kinase (MLCK) secondo il metodo precedentemente descritto(95,96).



## Sostituzione del peduncolo vascolare nel lembo libero del coniglio

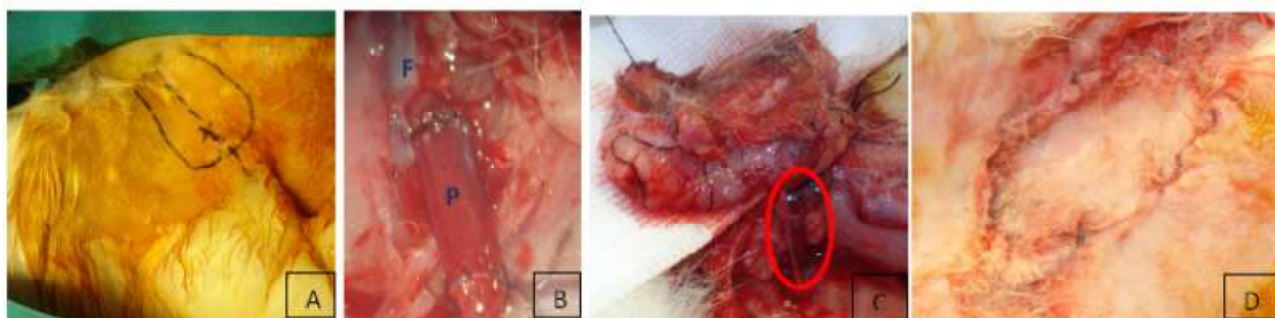
Tutti gli animali hanno ricevuto cure in conformità con il "la Guida di ICH per la Cura e l'Uso degli Animali di Laboratorio". Dei conigli bianchi tipo "New Zealand" (n 16), (con peso corporeo da 3 a 5kg) sono stati operati sotto in condizioni sterili e di anestesia generale con anestesia gassosa a base di Sevoflurane/Ossigeno(2.5%) a 1 L/min usando un apposito ventilatore dopo l'induzione con il ketamina/xylazina intramuscolare a 35/5 mg/kg. Tutte la procedure chirurgiche sono state portate a termine dal medesimo un chirurgo seguendo il protocollo approvato dal CEASA (Comitato Etico per la Sperimentazione Animale) dell'Università degli Studi di Padova.

Dopo tricotomia e disinfezione, il polso femorale è stato rilevato ed il lembo di epigastrico è stato scolpito attorno ad esso (Fig 6).(2 cm sopra e 1 cm sotto la piega inguinale). Usando un microscopio operatorio, il peduncolo, che consiste nei vasi epigastrici inferiori superficiale, è stato esposto ed i vasi sono stati isolati A questo punto si diversifica nei vari gruppi: a.

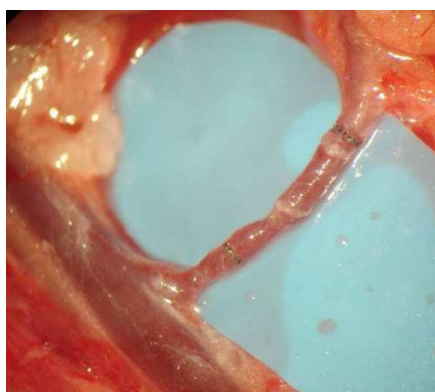
Gruppo A (4 conigli): Il peduncolo venoso è stato interrotto e la protesi vascolare è stata inserita tra i monconi venosi (1 cm x 2 mm di diametro) (anastomosi end-to-end con 10-0 Nylon) (Fig.6B-C).

Gruppo B (4 conigli): Dopo l'isolamento del peduncolo, la vena è stata interrotta e risuturata in 2 punti (anastomosi end-to-end con 11-0 nylon) (Fig.7).

Una volta completata l'anastomosi, le clamp micro vascolari sono state rilasciate ed è stato eseguito il test di pervietà, inoltre è stato osservato il colore del lembo. La cute è stata suturata con 4-0 vicryl (Fig.6D). E' stata somministrata della cefazolina i.m. durante la procedura chirurgica e nel post-operatorio è stato somministrata della cefalexina 500 mg/giorno per 7 giorni. Il lembo è stato quotidianamente controllato per i segni di ischemia e/o la congestione venosa. Il controllo fotografico è stato solo fatto al 7 giorno ed alle 3 settimane. I conigli sono stati posti in gabbie separate dopo la chirurgia.



↑ Fig. 6 : A. Disegno del lembo B. dettaglio della protesi P inserita nella vena epigastrica( vena femorale F). C. Visione del lembo sollevato con il peduncolo sostituito D.. Sutura cutanea



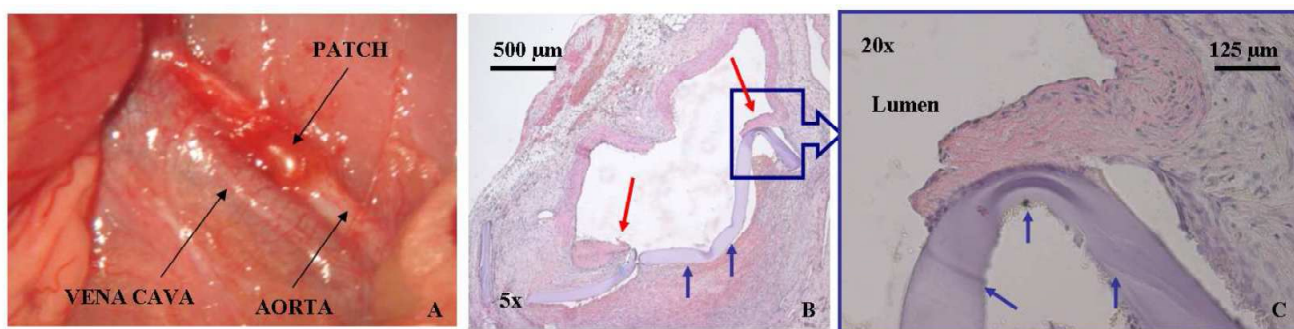
← Fig. 7: Doppia sutura venosa nel gruppo B

## RISULTATI

### Osservazioni sul patch arterioso a base di acido ialuronico

#### *Osservazioni macroscopiche*

Tutti gli animali hanno tollerato l'intervento chirurgico e sono sopravvissuti senza complicazioni post-operatorie finché sono stati sacrificati a 1, 2, 4, 8, e 16 settimane dopo l'impianto del patch. Non sono stati rilevate formazioni quali ematomi, il sieromi, aneurismi o segni d'infezione. Quando all'impianto venivano tolte le clamp, bastava una lieve pressione per ottenere la cessazione del gemizio ematico dovuto ai buchi in corrispondenza dei punti di sutura (Fig 5). Il biomateriale ha evidente mantenuto la sua struttura 1 settimana dopo l'intervento (Fig 8 ). Due e quattro settimane dopo l'impianto, il biomateriale si presentava sempre integro (Fig 9AB). L'impianto scompariva all'osservazione a occhio nudo a 8 settimane dopo il primo intervento, ove una membrana di tessuto copriva il patch e solo i punti erano individuabili(Fig 9C). La parete dell'arteria manteneva la sua struttura anatomica ed un lume pervio senza segni di dilatazione o restringimento dopo 16 settimane.

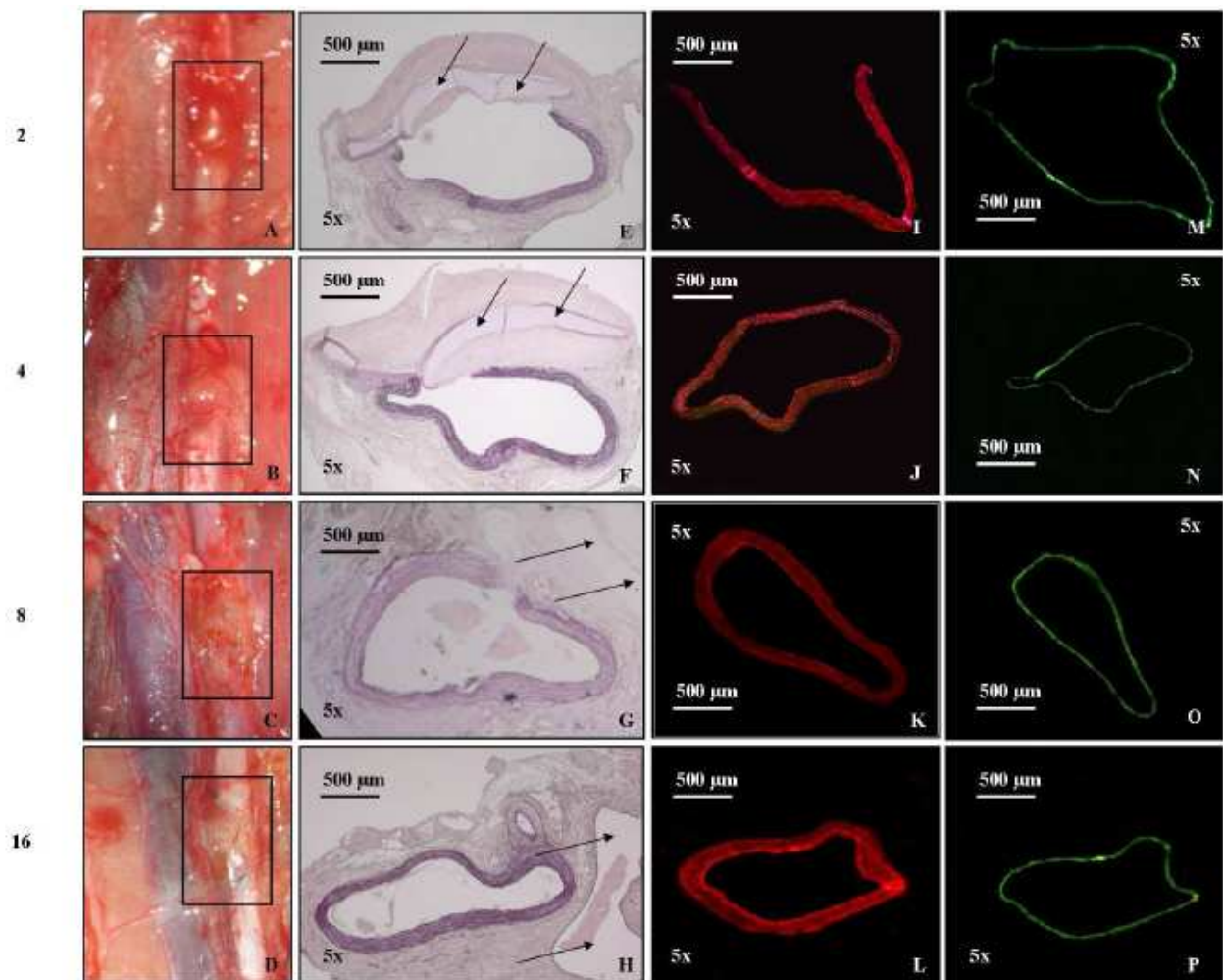


**Fig.8.** Espianto dopo 1 settimana dal riparo. (A) aspetto macroscopico(B)Freccia azzurra sul biomateriale e rossa sul margine endoteliale (colorazione EE)(C) Dettaglio del margine suturato (colorazione EE).258x70mm (150 x 150 DPI)

#### *Osservazioni istologiche ed immunoistochimiche*

La rigenerazione del tessuto vascolare inizia dai margini della lesione(Fig 8). La superficie esterna dell'impianto viene ricoperta da uno strato di tessuto vascolarizzato, fibroso di connettivo (Ill. 2B). Il biomateriale si dimostra adeso al lume della neo-arteria senza segni di infiltrazione di tessuto vascolare 2 settimane dopo l'impianto (Fig 9E). Il tessuto connettivo circonda il biomateriale esteriormente, formando un muro di adventizia che isola il biomateriale dall'ambiente esterno. La colorazione è positiva per le fibre elastiche e le cellule muscolari vascolari lisce è limitata al tratto di arteria originale (Fig 9EI). Il tessuto rigenerato, che ha rivestito la superficie luminale del patch, è principalmente formato da cellule endoteliali vWF positive (Fig 9M). Quattro settimane dopo la riparazione, i componenti elastici della parete neo-arteriosa si manifestano progressivamente lungo la superficie luminale del patch (Fig 9F). come le cellule muscolari vascolari lisce, markate per MLCK (Fig 9J), e le cellule vWF positive (Fig 9N). Otto settimane dopo la chirurgia, il biomateriale è ancora presente ma estruso in parte dalla nuovo parete arteriosaa (Fig 9G). La colorazione di Weighert nelle sezioni trasversali (Fig 9G) dimostra un lume

vascolare di normale diametro ed istologia. Gli strati elastici, muscolari ed endoteliali sono completi (Fig 9 G, K, O). Sedici settimane dopo l'intervento riparano il biomateriale è completamente scomparso, lasciando delle lacune (Fig 9H).



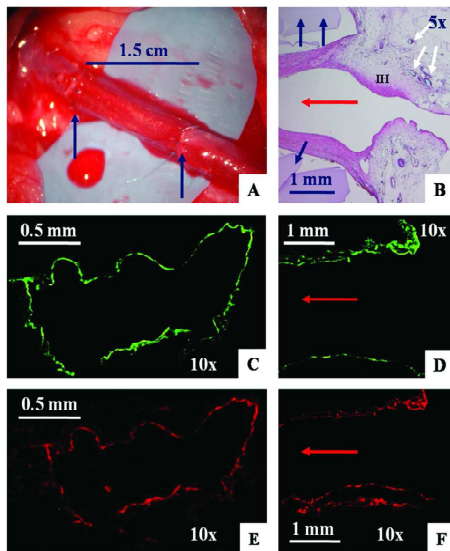
**FIG.9. Osservazioni a 2, 4, 8, 16 settimane dall'intervento chirurgico . (A), (B), (C), (D) aspetto macroscopico(E), (F), (G),(H) Colorazione Weigert (I), (J), (K), (L) Immunofluorescenza con anticorpi MLCK (M), (N), (O), (P) Immunofluorescenza con anticorpi anti-vWF 279x233mm (150 x 150 DPI)**

### **Osservazioni sul condotto tubulare a base di acido ialuronico nella vena cava**

#### ***Osservazioni macroscopiche***

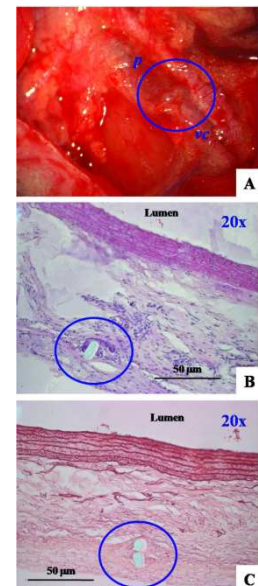
Questo materiale protesico si è dimostrato maneggevole da un punto di vista chirurgico, essendo morbido ed elastico, e facilmente suturabile. La Figura 10A illustra il tubo dopo che la liberazione delle clamp vascolari: quando i morsetti sono stati tolti, il flusso ematico si è ristabilito attraverso la protesi, che è apparsa perfettamente integrata con la vena originale. All'espianto non si è mai evidenziato alcun segno di dilatazione a aneurismatica o collasso delle pareti vascolari/occlusione. La figura 11A mostra la protesi al giorno 60: le anastomosi erano solide e ben integrate con la vena originale; il biomateriale era ancora presente, ed avvolgeva il neovasco, avendo una consistenza morbida. Dopo 90 giorni il biomateriale è gelatinizzato, appare di colore giallo e può essere asportato in parte dal nuovo tratto di vena, dimostrando il proprio riassorbimento

progressivo. Negli esperimenti precedenti, abbiamo come questo venga completato in 120 giorni(93,94). Non sono mai stati osservati fenomeni quali la dilatazione aneurismatica o il collasso delle pareti vascolari. Il tasso di sopravvivenza animale è stato del 100% e nessun segno di insufficienza venosa periferica è stato osservato.



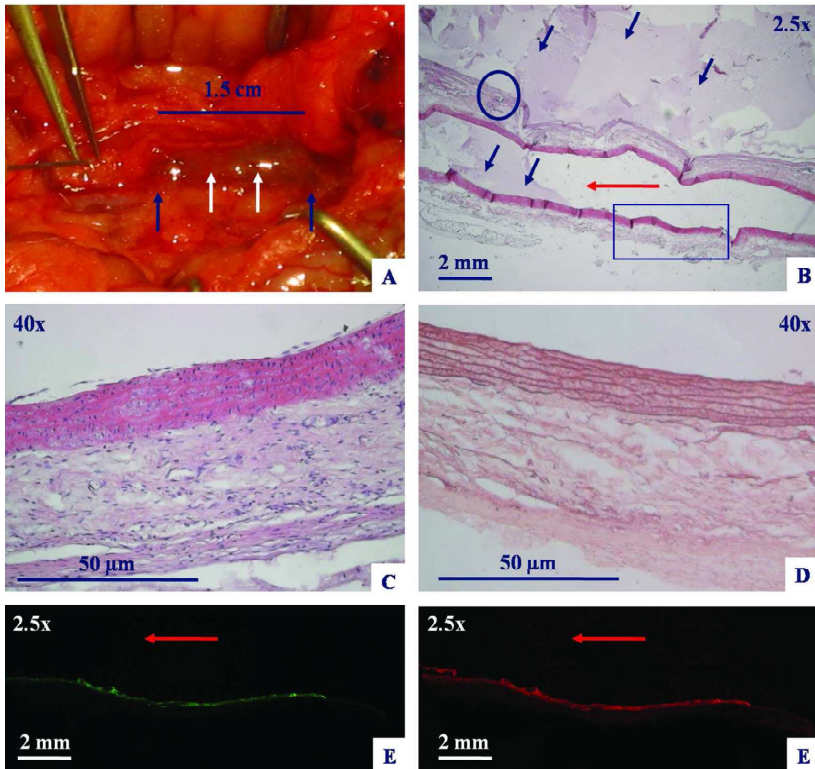
← FIGURA 10: Rigenerazione completa del vaso dopo 30 gg. (A) Aspetto della protesi dopo l'impianto. (B) Sezione longitudinale della protesi colorata con EE. (C)(E)Sezioni trasversali della neovena colorate con marker per vWF e MLCK. (F)(D) Sezioni longitudinali. La freccia rossa indica il flusso ematico. 114x140mm (300 x 300 DPI)

FIGURA 11:Aspetto macroscopico e → microscopico dopo 2 mesi dall'impianto(A) il cerchio evidenzia il sito anastomotico tra la protesi (p) ed la vena ricevente(vc). (B)(C) colorazioni istologiche, i cerchi blu dimostrano il materiale di sutura. 73x177mm (300 x 300 DPI)



### Osservazioni istologiche ed immunoistochimiche

La fig 1 mostra la protesi 30 giorni dopo l'intervento chirurgico. Il biomateriale è chiaramente visibile e ha mantenuto la sua struttura (le frecce blu nella Figura 10B). Le sezioni longitudinali rivelano la presenza di uno strato sottile di tessuto di recente formazione sulla superficie luminale del condotto (la Figura 10B). La rigenerazione di tessuto neovascolare inizia dai siti anastomotici prossimali e distali ( Figura 10B), progredendo nel tubo senza dar segni di infiltrazione nelle pareti della protesi (Figura 10B), e convergendo nel mezzo. Le frecce bianche indicano i punti di sutura nel sito anastomotico. L'iperplasia intimale è evidente nel vaso nativo nel sito anastomotico ed è dovuta ad un disadattamento di diametro tra la vena cava e la protesi, andrà diminuendo nei campioni successivi. Il tessuto che ha rivestito la superficie luminale del tubo, è principalmente composto di cellule endoteliali vWF + (Figura 10 C e 10D) e di uno sottile strato continuo di cellule di muscolari vascolari lisce ( Figura 10E e 10F), come indicato dalla positività per l' anticorpo specifico per la myosin light chain kinase (MLCK). Sessanta giorni dopo l'impianto, la protesi è ancora presente e la neo-vena si estende nel condotto, mantenendo uno spessore costante e non infiltrandosi nelle pareti protesiche (Figura 11 ). Le cellule appiattite sulla superficie luminale, circondate dagli altri componenti cellulari, rassomigliano a una parete di vena naturale (la Figura 11B). La componente elastica della parete di neo-vena comincia progressivamente a rigenerare dal sito anastomotico,( Fig11). Il nuovo vaso è perfettamente integrato con l' originale, non vi sono segni di interruzione tessutale dove i punti sono stati collocati ( Figura 11B e 11C). 90 giorni dopo l'impianto il lume della neo-vena è dello stesso diametro della vena originale( Fig 12). Il biomateriale è gelatinizzato, tanto che residui si sono staccati spesso dai campioni durante l'elaborazione istologica. Le colorazioni EE dimostrano un lume vascolare di istologia normale. La colorazione di Weigert dimostra una componente elastica lineare, continua (Figura 12D). L'immunostaining positivo per il vWF e MLCK ha continuato a evidenziare un rivestimento uniforme della superficie luminale (Fig.12 E,F).



**FIGURE 12:** A tre mesi Il biomateriale è parzialmente riassorbito ed una nuova vena si è formata al suo interno (A) aspetto macroscopico (B) Sezione longitudinale della protesi colorata in EE a basso ingrandimento.

A ingrandimento maggiore è evidente lo strato elastico(D) e la normale istologia di parete( C) (E),(F): Sezioni longitudinali positive per il vWF e la MLCK

134x127mm (300 x 300 DPI)

### Osservazioni sulla sostituzione del peduncolo vascolare nel lembo libero nel coniglio

Alcuni degli animali sono stati esclusi da questo studio: 2 di loro sono infatti mancati durante l'intervento chirurgico probabilmente per un' overdose di anestetico. In un coniglio il lembo è stato modellato ma dopo il suo isolamento non vi era afflusso nel peduncolo. In questo animale probabilmente una trazione durante la dissezione del lembo ha causato lo spasmo del peduncolo vascolare. Negli animali rimanenti un condotto di 1.5 cm di lunghezza e di 2 millimetri di diametro è stato posizionato nella vena deferente del lembo per sostenerne il drenaggio, ottenendo un test di pervietà positivo immediatamente dopo l'impianto, e quindi un lembo fasciocutaneo vitale. Tutti gli animali inclusi nello studio hanno goduto di buone condizioni generali durante l'esperimento. Il flusso sanguigno distale per l'arto inferiore è stato mantenuto conservando il ramo profondo della vena femorale. Non è stato osservato alcun deficit venoso negli arti operati. A 3 settimane dall'intervento chirurgico, 3 dei 4 innesti sintetici erano pervi e 3 dei 4 lembi erano vitali. Durante la riesplorazione degli animali 2 di loro presentavano un sieroma nella regione delle cicatrici chirurgiche. Un lembo era vitale nel terzo giorno postoperatorio ma era necrotico nel sesto giorno, vi era inoltre una deiscenza della ferita. All'esplorazione l'innesto è risultato trombizzato. In un altro animale la deiscenza non si è accompagnata con il fallimento dell'innesto. L'animale è passato attraverso un debridement veloce ed una chiusura della ferita. Tutti i lembi nel gruppo di controllo (B) sono risultati vitali.

## **DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

La richiesta in ambito clinico di un prodotto pronto all'utilizzo per il riparo di difetti del tessuto vascolare riguarda diverse aree chirurgiche quali la chirurgia cardiaca (il trattamento di patologie ischemiche e malformative), la chirurgia vascolare (rivascolarizzazione degli arti inferiori), la neurochirurgia (la riparazione di arterie intracraniche), la chirurgia pediatrica vascolare ed i casi rari di ricostruzione microchirurgica dopo i severi traumi della mano. In particolare, nelle applicazioni pediatriche c'è bisogno di materiali di sostituzione ingegnerizzati, simil-autologhi con un proprio potenziale di crescita. In questi ambiti i biomateriali classici utilizzati quali il e PTFE o il dacron hanno dimostrato diverse problematiche a breve e lungo termine, come l'infezione e la trombosi che porta poi all'occlusione vasale. L'utilizzo di prodotti allogenici ha portato alla loro degenerazione a causa della risposta immunitaria dell'ospite, o per tessuti decellularizzati comunque alla trombosi precoce (97). Effettivamente, queste proprietà intrinseche limitano le funzioni a lungo termine di questi prodotti, portando ad eventi avversi ed interventi secondari, particolarmente quando usati in campo pediatrico. Altre complicazioni a lungo termine frequentemente osservate dopo l'uso di materiali protesici in ambito vascolare includono la formazione di pseudoaneurismi e lo sviluppo stenosi cicatriziali. Pertanto attualmente in clinica i vasi autologhi, ovvero segmenti di vena autologa, sono il materiale più comunemente usato per la sostituzione di vasi di piccolo diametro e la costituzione di patch. (97) La compatibilità immunologica è uno dei maggiori vantaggi offerti da questa tecnica di "pronto utilizzo". Comunque, la disponibilità di validi vasi nativi potrebbe essere limitata nei pazienti con patologia vascolare diffusa, considerando poi anche le lesioni del sito donatore che residuano dopo queste procedure.

Queste considerazioni hanno spinto i ricercatori ad individuare un valido sostituto vasale sviluppato tramite le metodiche d'ingegneria tissutale. La progettazione di un vaso ingegnerizzato è guidata da due assiomi, (1) le proprietà meccaniche di un vaso, dipendono dalla sua struttura (ed in particolare dall'allineamento delle fibre muscolari e delle fibre collagene ed elastina della tonaca media) tanto quanto dalla composizione, e (2) il sostituto vascolare ingegnerizzato dovrebbe servire come guida funzionale che mentre fornisce sostegno alla normale attività vasale, ovvero sostiene il flusso sanguigno, fornisce anche una guida per l'allineamento e la rigenerazione del tessuto autologo. Questo approccio si basa sul presupposto che le cellule (trapiantate o dell'ospite) aderiscano e migrino dentro il costruito, e contribuiscano alla rigenerazione della struttura vasale. Questo processo di crescita tissutale deve essere sincronizzato con la sostituzione del biomateriale dall' ECM, ed in ogni momento del processo le due componenti del vaso ( biomateriale e tessuto rigenerato) devono supportare efficacemente il flusso sanguigno.

La scelta dell'acido ialuronico per la riparazione vascolare si basa su molti studi sulle proprietà di questo biomateriale altamente biocompatibile e nello specifico sulle sue interazioni con le componenti cellulari vasali(98-101). Il biomateriale di acido ialuronico a lunga-catena/alto peso molecolare (1500kDa) non è citotossico, trombogenico, immunogenico, e non induce l'infiammazione cronica. Questi ultimi 2 aspetti probabilmente sono dovuti alla conservazione della forma molecolare tra le diverse specie animali (102). Questa molecola è naturalmente presente in tutti i vasi sanguigni normali nell'intima e nell'adventizia. L'acido ialuronico è l'unico glicosaminoglicano non solfatato della matrice extracellulare. Malgrado la sua struttura semplice, l'acido ialuronico è coinvolto in un gran numero di funzioni biologiche, come la proliferazione

cellulare e la migrazione, la morfogenesi, la guarigione delle ferite, l'infiammazione, l'angiogenesi, e la crescita tumorale (91, 102-105). Un importante ruolo biologico è attribuito agli oligosaccaridi di acido ialuronico che stimolano la secrezione di citochine e la proliferazione endoteliale (102-105). Inoltre, recenti studi indicano che l'acido ialuronico potrebbe stimolare di per sé l'endotelizzazione favorendo il reclutamento di endoteliali e cellule progenitrici delle endoteliali(EPC)(100,91). Le EPC possono aderire al biomateriale e mantenere il loro fenotipo di preendoteliali, ed esprimere fattori angiogenici, soprattutto durante la prima settimana(91,100). Questi risultati indicano che l'acido ialuronico potrebbe essere un biomateriale candidato promettente come veicolo per le EPC e quindi potrebbe essere usato per l'ingegneria tissutale vascolare in quanto capace di favorire la ricostruzione di un endotelio normalmente funzionale e confluyente.

In precedenti studi è stato testato un condotto tubulare a base di acido ialuronico per sostituire un tratto di aorta addominale nel topo e si è dimostrato capace di sostenerne la rigenerazione arteriosa.(98-101). In seguito questo prodotto è stato testato anche sul modello porcino. Quindi nel presente studio si è deciso di testare la capacità di questo biomateriale di sostenere la rigenerazione della parete vascolare arteriosa in una forma laminare. Questa forma a patch potrebbe essere sfruttata in future applicazioni cliniche ma ci consente anche di osservare dettagliatamente e con maggior facilità rispetto alla forma tubulare gli step della guarigione tissutale. I nostri risultati macroscopici ed istologici hanno confermato la capacità dell'acido ialuronico di creare un ambiente biomimetico per la rigenerazione del tessuto. La parete arteriosa si è rigenerata sopra il biomateriale senza produrre segni di infiltrazione nel contesto della lamina stessa. Il patch ha dimostrato una buona resistenza in vivo fino alla rigenerazione completa della parete vascolare, evitando complicazioni quali la dilatazione e la trombosi acuta. Le osservazioni macroscopiche dimostrano come l'acido ialuronico sia abbastanza forte per resistere alla pressione interna del vaso durante l'intero processo rigenerativo nella sua componente centrale e periferica (margini sostenuti dalle suture). L'assenza di infiltrato cellulare linfocitario o di neutrofili ha comprovato la biocompatibilità del materiale, che è stato completamente degradato dopo sedici settimane dalla riparazione. Inoltre, la capacità dell'acido ialuronico di ridurre l'aderenza postoperatoria nel modello dimostra come il processo di rigenerazione sia isolato dall'ambiente esterno ed dal suo intervento potenzialmente dannoso. Il numero di cellule muscolari vascolari lisce e di fibroblasti è progressivamente aumentato, in modo analogo alla degradazione del biomateriale. In conclusione, abbiamo ottenuto un ben documentato modello di rigenerazione arteriosa e queste scoperte sono un passo incoraggiante verso l'uso possibile di questo biomateriale in forma laminare e tubulare in ambito clinico o come modello in vivo per lo studio dei meccanismi e le fasi di rigenerazione arteriosa e la sua possibile modulazione farmacologica. La comprovata presenza di cellule endoteliali, senza la presenza di elementi trombotici anche nei primissimi campioni prelevati, ha guidato alla conferma della non trombogenicità di questo materiale che pertanto è stato successivamente testato nella rigenerazione venosa

Lo sviluppo della chirurgia ricostruttiva venosa è stato ostacolato dalla mancanza di materiali convenienti per la costituzione di innesti(109-120). Ci sono solo poche pubblicazioni in letteratura riguardo la possibilità di sostituire un tratto venoso con del materiale protesico. Le protesi microvascolari hanno dimostrato proprietà estremamente insoddisfacente una volta inserite nel sistema venoso. Poiché i risultati preliminari sono stati molto scoraggianti, un numero minimo di studi è stato portato a termine. Le protesi di piccolo diametro non hanno mai lasciato il laboratorio, a causa del loro alto tasso di trombosi (109-120). Diversi fattori concorrono

all'occlusione protesica micro-venosa, come lo stato di basso-flusso combinato con la trombogenicità del materiale innestato. Con questo studio preliminare, abbiamo dimostrato la possibilità di creare una protesi capace di indurre la rigenerazione venosa completa e che venga riassorbita completamente alla fine di avvenimenti rigenerativi, lasciando in situ una nuova vena. Il vaso rigenerato è cresciuto nel condotto tubulare senza dare segni di infiltrazione nell'ambito del biomateriale. Dopo 30 giorni, lo strato di endoteliale era evidente lungo la superficie luminale. Dopo 60 giorni, tutte le strutture si erano rigenerate: Uno strato di cellule muscolari lisce e di elastina è stato osservato. Dopo 90 giorni il biomateriale è gelatinizzato, segno della sua iniziale degradazione. Il tasso di sopravvivenza animale è del 100% e non vi è stato nessun segno di insufficienza venosa nelle regioni periferiche. Il prodotto da noi testato si è dimostrato idoneo a sostenere la rigenerazione venosa, consentendo la ricostituzione completa delle strutture vascolari nel sito di impianto. La nuova vena assomiglia alla vena cava adiacente, fatto dimostrato dalla presenza della tonaca intima composta da cellule endoteliali, un piccolo strato subendoteliale di tessuto connettivo ed una tunica media con alcune cellule muscolari lisce, fibre elastiche ed alcuni fibroblasti, ed una adventizia molto ben rappresentata. Le proprietà meccaniche dei tubuli di acido ialuronico hanno evitato il collasso delle pareti venose nei siti anastomotici, mostrando una buona compliance in condizioni di basso flusso.

Sebbene la dimostrata possibilità di guidare la rigenerazione venosa direttamente in vivo, senza il precondizionamento chimico e cellulare in vitro, sia di grandissimo interesse il modello murino presenta alcune limitazioni. Il posizionamento della protesi nella vena cava è stata obbligata dalle dimensioni dell'animale. Ma la vena cava non è un vaso con proprietà similari a quelli nei quali effettivamente verrebbe usato il condotto in una futura applicazione clinica, poiché è un vaso a bassa pressione ma con un flusso obbligato essendo vicinissimo alla pompa cardiaca. Per testare quindi il condotto in situazioni più verosimiglianti alle future applicazioni abbiamo utilizzato un altro modello animale: nello specifico abbiamo inserito la protesi vascolare all'interno di un peduncolo vascolare per un trapianto libero nel coniglio(lembo inguinale). In questo modello la vena e la arteria scelte sono gli unici vasi che sostengono rispettivamente l'afflusso e il deflusso del sangue dal lembo scoltito. Questo modello sperimentale è stato già usato in studi simili. Nello specifico nello studio dove è stato utilizzato un innesto costituito da politetrafluoroetilene espanso (e-PTFE o Gore- Tex) (121,122): tutti i lembi sono andati incontro a necrosi entro le 36 ore dall'impianto degli innesti. In un altro studio con innesti di Poli-lattico) -co-poli(epsilon-caprolattone) P (LLA-CL )70:30) (123) è stata dimostrata la pervietà degli innesti per 7 settimane, ma anche la totale assenza di formazione di uno strato endoteliale. Questo risultato dimostra la necessità di ricoprire in vitro questo tipo di innesti vascolari con delle cellule endoteliali.

Negli anni '60, prima dello sviluppo della microchirurgia ricostruttiva, l'uso di lembi peduncolati era molto comune. In quel periodo molti studi clinici sperimentali sono stati eseguiti per scoprire il tempo minimo richiesto da un lembo per la propria autonomizzazione. L'assioma attorno al quale ruotava questa chirurgia era attendere almeno 3 settimane per la neovascolarizzazione del lembo (124). Alcuni studi sperimentali hanno mostrato che questo tempo può essere anche più breve, poiché un lembo di tessuto poteva sopravvivere in modo indipendente se i vasi nutritivi venivano sezionati in ottava giornata(125). Da queste considerazioni si può assumere che un condotto vascolare in grado di sopperire alla vascolarizzazione di un lembo libero per 3 settimane possa essere ritenuto funzionalmente efficace. Il lembo inguinale è un modello accettato per testare le protesi vascolari come già detto : ha un'anatomia costante, è molto semplice



da realizzare, è basato su dei vasi di tipo periferico. Malgrado ciò vi sono state alcune problematiche nell'esecuzione dell'esperimento quali la gestione anestesiológica dell'animale e la gestione postoperatoria delle complicanze rilevate (sieromi e deiscenze delle ferite), che comunque non erano correlate all'inserimento delle protesi ma all'intervento chirurgico. Nonostante queste difficoltà logistiche il periodo di osservazione preposto è stato portato a termine nei gruppi delle sostituzioni vascolari e dei controlli. La vitalità dei lembi scolpiti ha dimostrato come questi innesti siano funzionalmente efficaci. Saranno necessarie delle conferme istologiche riguardo le condizioni di queste protesi impiantate e sicuramente saranno utili esperimenti su di un numero di animali più importante. Inoltre sarà interessante testare degli innesti più lunghi magari in animali di maggior taglia.

Ad oggi comunque i dati finora presentati dimostrano la funzionalità di questo innesto, che dal punto di vista chirurgico risulta fondamentale. Questo studio pertanto avvicina questi innesti all'utilizzo clinico, in particolare nell'ambito della chirurgia plastica, dove potranno essere utilizzati per l'allungamento dei peduncoli in lembi microchirurgici o nella traumatologia dell'arto superiore.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Anatomia umana di Bucciante Luigi - Piccin-Nuova Libreria - 1986
2. Anatomia del Grey, terza edizione italiana su trentasettesima edizione inglese. 1993. Zanichelli Editore S.p.A.. Bologna.
3. Anatomia dell'uomo , Edi Ermes, seconda edizione 1999
4. Istologia, Lesile P. Gartner, James L. Hiatt. 1998. Edizioni EDISES. Napoli.
5. Alberts B, Jonson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: Molecular Biology of the Cell. Quarta edizione. Garland Science, Taylor & Francis group. New York. U.S.A.. 2002
6. Cassell OCS, Hofer SOP, Morrison WA, Knight KR: Vascularisation of tissue –engineered grafts: the regulation of angiogenesis in reconstructive surgery and in disease states. British Journal of Plastic Surgery 2002; 55
7. K.L.Moore, T.N.V. Persaud :Lo sviluppo prenatale dell'uomo : Embriologia ad orientamento medico. EDISES. Napoli. 1999.
8. Lodish [el al] :Biologia Molecolare della Cellula.Zanichelli editore. Bologna.2002
9. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al.: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science 1997; 275:964–7.
10. Folkman J: Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. Nature Med 1995; 1: 27–31.
11. Norrby K. Angiogenesis: new aspects relating to its initiation and control. APMIS 1997; 105: 417–37.
12. Stein I, Neeman M, Shweiki D, Itin A, Keshet E. Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia and hypoglycaemia and coregulation with other ischemia-induced genes.Mol Cell Biol 1995; 15: 5363–8.
13. Folkman J, Shing Y : Angiogenesis. The journal of Biological chemistry 1992; vol.267, n°16
14. Bernhard , Palson [et al.]:Tissue engineering. CRC Press LLC, Florida, USA, 2003.
15. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS: Immunologia cellulare e molecolare. Piccin S.p.A., Padova, 1998.
16. . Ganong, Fisiologia medica, marzo 2006 Edizioni Piccin
17. Langer R e Vacanti JP: Tissue engineering. Science 1993; 260: 920-926.

18. Luigi Donati [et al] : Ingegneria tissutale :dalle prospettive sperimentali alle realtà cliniche .Monduzzi, Bologna, 2003.
19. Kulkarni RK, Bartak D.E., Leonard F. :Biodegradable poly (lactic acid) polymers. J.Biomed Mat Res 1971.
20. Rastrelli A, Beccaro M, Biviano F, Calderoni G, Pastorello A: Hyaluronic acid esters, a new class of semisynthetic biopolymers: chemical and physico-chemical properties, Clin. Implant Material, Advanced in Biomaterials 1990 ;vol. 9: 199-205,
21. Abatangelo G, Barbucci R, Brun P, Lamponi S: Biocompatibility and enzymatic degradation studies on sulphated hyaluronic acid derivatives, Biomaterials 1997.
22. Cortivo R., Brun P., Rastrelli A., Abatangelo G.: In vitro studies of biocompatibility of hyaluronic acid esters, Biomaterials, 1991.
23. Benedetti L., Cortivo R., Berti T., Berti A., Pea F., Mazzi M., Moras M., Abatangelo G.: Biocompatibility and biodegradation of different hyaluronan derivatives (HY AFF) implanted in rats, Biomaterials, 14:1154-1160,1993.
24. Baguneid MS, Fulford PE, Walker MG. Cardiovascular surgery in the elderly. J R Coll Surg Edinb 1999; 44: 216–221.
25. Coronary Heart Disease Statistics. British Heart Foundation:London, 2003.
26. Critical limb ischaemia: management and outcome. Report of a national survey. The Vascular Surgical Society of Great Britain and Ireland. Eur J Vasc Endovasc Surg 1995; 10:108–113.
27. Taylor LM Jr, Edwards JM, Porter JM. Present status of reversed vein bypass grafting: five-year results of a modern series. J Vasc Surg 1990; 11: 193–205.
28. Cameron A, Davis KB, Green G, Schaff HV. Coronary bypass surgery with internal-thoracic-artery grafts – effects on survival over a 15-year period. N Engl J Med 1996; 334:216–219.
29. Veith FJ, Moss CM, Sprayregen S, Montefusco C. Preoperative saphenous venography in arterial reconstructive surgery of the lower extremity. Surgery 1979; 85: 253–256.
30. Seifalian AM, Tiwari A, Hamilton G, Salacinski HJ. Improving the clinical patency of prosthetic vascular and coronary bypass grafts: the role of seeding and tissue engineering. Artif Organs 2002; 26: 307–320.
31. Klinkert P, Post PN, Breslau PJ, van Bockel JH. Saphenous vein versus PTFE for above-knee femoropopliteal bypass. A review of the literature. Eur J Vasc Endovasc Surg 2004; 27: 357–362.

32. Kashyap VS, Ahn SS, Quinones-Baldrich WJ, Choi BU, Dorey F, Reil TD et al. Infrapopliteal-lower extremity revascularization with prosthetic conduit: a 20-year experience. *Vasc Endovascular Surg* 2002; 36: 255–262.
33. Abbott WM, Green RM, Matsumoto T, Wheeler JR, Miller N, Veith FJ et al. Prosthetic above-knee femoropopliteal bypass grafting: results of a multicenter randomized prospective trial. Above-Knee Femoropopliteal Study Group. *J Vasc Surg* 1997; 25: 19–28.
34. Burkel WE. The challenge of small diameter vascular grafts. *Med Prog Technol* 1988; 14: 165–175.
35. Tiwari A, Salacinski H, Seifalian AM, Hamilton G. New prostheses for use in bypass grafts with special emphasis on polyurethanes. *Cardiovasc Surg* 2002; 10: 191–197.
36. Salacinski HJ, Tiwari A, Hamilton G, Seifalian AM. Cellular engineering of vascular bypass grafts: role of chemical coatings for enhancing endothelial cell attachment. *Med Biol Eng Comput* 2001; 39: 609–618.
37. Baguneid MS, Goldner S, Fulford PE, Hamilton G, Walker MG, Seifalian AM. A comparison of para-anastomotic compliance profiles after vascular anastomosis: nonpenetrating clips versus standard sutures. *J Vasc Surg* 2001; 33: 812–820.
38. Tai NR, Giudiceandrea A, Salacinski HJ, Seifalian AM, Hamilton G. In vivo femoropopliteal arterial wall compliance in subjects with and without lower limb vascular disease. *J Vasc Surg* 1999; 30: 936–945.
39. Salacinski HJ, Goldner S, Giudiceandrea A, Carson RJ, Hamilton G, Seifalian AM et al. The mechanical behavior of vascular grafts: a review. *J Biomater Appl* 2001; 15: 241–278.
40. Chervu A, Moore WS. An overview of intimal hyperplasia. *Surg Gynecol Obstet* 1990; 171: 433–447.
41. Sparks CH. Silicone mandril method of femoropopliteal artery bypass. Clinical experience and surgical technics. *Am J Surg* 1972; 124: 244–249.
42. Hallin RW. Complications with the mandril-grown (Sparks) dacron arterial graft. *Am Surg* 1975; 41: 550–554.
43. Harris L, O'Brien-Irr M, Ricotta JJ. Long-term assessment of cryopreserved vein bypass grafting success. *J Vasc Surg* 2001; 33: 528–532.

44. Dardik H, Ibrahim IM, Sussman B, Kahn M, Sanchez M, Klausner S et al. Biodegradation and aneurysm formation in umbilical vein grafts. Observations and a realistic strategy. *Ann Surg* 1984; 199: 61–68.
45. Dardik H. The second decade of experience with the umbilical vein graft for lower-limb revascularization. *Cardiovasc Surg* 1995; 3: 265–269.
46. Castier Y, Leseche G, Palombi T, Petit MD, Cerceau O. Early experience with cryopreserved arterial allografts in below-knee revascularization for limb salvage. *Am J Surg* 1999; 177: 197–202.
47. Tiwari A, Salacinski HJ, Hamilton G, Seifalian AM. Tissue engineering of vascular bypass grafts: role of endothelial cell extraction. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2001; 21: 193–201.
48. Sales KM, Salacinski HJ, Alobaid N, Mikhail M, Balakrishnan V, Seifalian AM. Advancing vascular tissue engineering: the role of stem cell technology. *Trends Biotechnol* 2005; 23: 461–467.
49. Rashid ST, Salacinski HJ, Hamilton G, Seifalian AM. The use of animal models in developing the discipline of cardiovascular tissue engineering: a review. *Biomaterials* 2004; 25: 1627–1637.
50. Carrel A., Guthrie CG. Uniterminal and biterminal venoustransplantations. *Surg Gynecol Obstet* 1906; 2: 266–286.
51. Meinhart JG, Deutsch M, Fischlein T, Howanietz N, Froschl A, Zilla P. Clinical autologous in vitro endothelialization of 153 infrainguinal ePTFE grafts. *Ann Thorac Surg* 2001; 71(Suppl): S327–S331.
52. Naito Y, Imai Y, Shin'oka T, Kashiwagi J, Aoki M, Watanabe M et al. Successful clinical application of tissue-engineered graft for extracardiac Fontan operation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 125: 419–420.
53. Shin'oka T, Imai Y, Ikada Y. Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. *N Engl J Med* 2001; 344: 532–533.
54. Matsumura G, Hibino N, Ikada Y, Kurosawa H, Shin'oka T. Successful application of tissue engineered vascular autografts: clinical experience. *Biomaterials* 2003; 24: 2303–2308.
55. Tiwari A, Salacinski HJ, Punshon G, Hamilton G, Seifalian AM. Development of a hybrid cardiovascular graft using a tissue engineering approach. *FASEB J* 2002; 16: 791–796.
56. Grenier G, Remy-Zolghadri M, Guignard R, Bergeron F, Labbe R, Auger FA et al. Isolation and culture of the three vascular cell types from a small vein biopsy sample. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2003; 39: 131–139.

57. Pawlowski KJ, Rittgers SE, Schmidt SP, Bowlin GL. Endothelial cell seeding of polymeric vascular grafts. *Front Biosci* 2004; 9: 1412–1421.
58. Nasser BA, Pomerantseva I, Kaazempur-Mofrad MR, Sutherland FW, Perry T, Ochoa E et al. Dynamic rotational seeding and cell culture system for vascular tube formation. *Tissue Eng* 2003; 9: 291–299.
59. Williams C, Wick TM. Perfusion bioreactor for small diameter tissue-engineered arteries. *Tissue Eng* 2004; 10: 930–941.
60. Baguneid M, Murray D, Salacinski HJ, Fuller B, Hamilton G, Walker M et al. Shear-stress preconditioning and tissue-engineering-based paradigms for generating arterial substitutes. *Biotechnol Appl Biochem* 2004; 39:151–157.
61. Punshon G, Vara DS, Sales KM, Kidane AG, Salacinski HJ, Seifalian AM. Interactions between endothelial cells and a poly(carbonate-silsesquioxane-bridge-urea)urethane. *Biomaterials* 2005; 26: 6271–6279.
62. Wissink MJ, Beernink R, Scharenborg NM, Poot AA, Engbers GH, Beugeling T et al. Endothelial cell seeding of (heparinized) collagen matrices: effects of bFGF pre-loading on proliferation (after low density seeding) and pro-coagulant factors. *J Control Release* 2000; 67: 141–155.
63. Jarrell BE, Williams SK, Stokes G, Hubbard FA, Carabasi RA, Koolpe E et al. Use of freshly isolated capillary endothelial cells for the immediate establishment of a monolayer on a vascular graft at surgery. *Surgery* 1986; 100:392–399.
64. Visser MJ, van Bockel JH, van Muijen GN, van Hinsbergh VW. Cells derived from omental fat tissue and used for seeding vascular prostheses are not endothelial in origin. A study on the origin of epitheloid cells derived from omentum. *J Vasc Surg* 1991; 13: 373–381.
65. Kuehnle I, Goodell MA. The therapeutic potential of stem cells from adults. *BMJ* 2002; 325: 372–376.
66. Wang H, Riha GM, Yan S, Li M, Chai H, Yang H et al. Shear stress induces endothelial differentiation from a murine embryonic mesenchymal progenitor cell line. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1817–1823.
67. Rumpold H, Wolf D, Koeck R, Gunsilius E. Endothelial progenitor cells: a source for therapeutic vasculogenesis? *J Cell Mol Med* 2004; 8: 509–518.
68. Martin-Rendon E, Watt SM. Stem cell plasticity. *Br J Haematol* 2003; 122: 877–891

69. Moscoso I, Centeno A, Lopez E, Rodriguez-Barbosa JI, Santamarina I, Filgueira P et al. Differentiation 'in vitro' of primary and immortalized porcine mesenchymal stem cells into cardiomyocytes for cell transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37: 481–482.
70. Matsumura G, Miyagawa-Tomita S, Shin'oka T, Ikada Y, Kurosawa H. First evidence that bone marrow cells contribute to the construction of tissue-engineered vascular autografts in vivo. *Circulation* 2003; 108: 1729–1734.
71. Rosenberg N, Martinez A, Sawyer PN, Wesolowski SA, Postlethwait RW, Dillon ML Jr. Tanned collagen arterial prosthesis of bovine carotid origin in man. Preliminary studies of enzyme-treated heterografts. *Ann Surg* 1966; 164: 247–256.
72. Lantz GC, Badylak SF, Hiles MC, Coffey AC, Geddes LA, Kokini K et al. Small intestinal submucosa as a vascular graft: a review. *J Invest Surg* 1993; 6: 297–310.
73. Huynh T, Abraham G, Murray J, Brockbank K, Hagen PO, Sullivan S. Remodeling of an acellular collagen graft into a physiologically responsive neovessel. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 1083–1086.
74. Clarke DR, Lust RM, Sun YS, Black KS, Ollerenshaw JD. Transformation of nonvascular acellular tissue matrices into durable vascular conduits. *Ann Thorac Surg* 2001; 71(Suppl): S433–S436.
75. Farber A, Major K, Wagner WH, Cohen JL, Cossman DV, Lauterbach SR et al. Cryopreserved saphenous vein allografts in infrainguinal revascularization: analysis of 240 grafts
76. Neufang A, Espinola-Klein C, Dorweiler B, Reinstadler J, Pitton M, Savvidis S et al. Sequential femorodistal composite bypass with second generation glutaraldehyde stabilized human umbilical vein (HUV). *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2005;30: 176–183.
77. Bell E, Ivarsson B, Merrill C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 1274–1278.
78. Ratcliffe A. Tissue engineering of vascular grafts. *Matrix Biol* 2000; 19: 353–357. 1994; 19: 658–667.
79. Salacinski HJ, Punshon G, Krijgsman B, Hamilton G, Seifalian AM. A hybrid compliant vascular graft seeded with microvascular endothelial cells extracted from human omentum. *Artif Organs* 2001; 25: 974–982.
80. Kannan RY, Salacinski HJ, Butler PE, Hamilton G, Seifalian AM. Current status of prosthetic bypass grafts: a review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005; 74: 570–581.

81. Yue X, van der LB, Schakenraad JM, van Oene GH, Kuit JH, Feijen J et al. Smooth muscle cell seeding in biodegradable grafts in rats: a new method to enhance the process of arterial wall regeneration. *Surgery* 1988; 103: 206–212.
82. Niklason LE, Gao J, Abbott WM, Hirschi KK, Houser S, Marini R et al. Functional arteries grown in vitro. *Science* 1999; 284: 489–493.
83. Shum-Tim D, Stock U, Hrkach J, Shinoka T, Lien J, Moses MA et al. Tissue engineering of autologous aortas using a new biodegradable polymer. *Ann Thorac Surg* 1999; 68: 2298–2304.
84. Hirai J, Kanda K, Oka T, Matsuda T. Highly oriented, tubular hybrid vascular tissue for a low pressure circulatory system. *ASAIO J* 1994; 40: M383–M388.
85. Hirai J, Matsuda T. Self-organized, tubular hybrid vascular tissue composed of vascular cells and collagen for low-pressure-loaded venous system. *Cell Transplant* 1995; 4: 597–608.
86. Hirai J, Matsuda T. Venous reconstruction using hybrid vascular tissue composed of vascular cells and collagen: tissue regeneration process. *Cell Transplant* 1996; 5: 93–105.
87. L'Heureux N, Paquet S, Labbe R, Germain L, Auger FA. A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *FASEB J* 1998; 12: 47–56.
88. Kannan RY, Salacinski HJ, Butler PE, Seifalian AM. Polyhedral oligomeric silsesquioxane nanocomposites: the next generation material for biomedical applications. *Account Chem Res* 2005; 38: 879–884.
89. Alobaid N, Salacinski HJ, Sales KM, Ramesh B, Kannan RY, Hamilton G, et al. Nanocomposite containing bioactive peptides promotes endothelialisation of cardiovascular bypass grafts by circulating endothelial progenitor cells: an in-vitro evaluation. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2006; (in press).
90. Tonello C, Vindigni V., Zavan B, Brun P., Abatangelo S., Abatangelo G. and Cortivo R. In vitro reconstruction of an endothelialized skin substitute provided with microcapillary network using biopolymer scaffold. *FASEB J*. 12.07.05, 2005 (on line). *FASEB J*. 2008 Aug; 22(8):2853-61. Epub 2008 Apr 2.
91. Remuzzi A, Mantero S, Colombo M, Morigi M, Binda E, Camozzi D, Imberti B. Vascular smooth muscle cells on hyaluronic acid: culture and mechanical characterization of an engineered vascular construct. *Tissue Eng*. 2004; 10(5-6):699-710.
92. Turner NJ, Kielty CM, Walker MG, Canfield AE. A novel hyaluronan-based biomaterial (Hyaff-11) as a scaffold for endothelial cells in tissue engineered vascular grafts. *Biomaterials*. 2004; 25(28):5955-5964.



93. Lepidi S, Grego F, Vindigni V, Zavan B, Tonello C, Deriu GP, Abatangelo G, Cortivo R. Hyaluronan biodegradable scaffold for small-caliber artery grafting: preliminary results in an animal model. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2006 Oct;32(4):411-7. Epub 2006 May 5.
94. Zavan B, Vindigni V, Lepidi S, Iacopetti I, Avruscio G, Abatangelo G, Cortivo R. Neoarteries grown in vivo using a tissue-engineered hyaluronan-based scaffold. *FASEB J* August 2008 Vol. 22 , 2853-2865
95. Vescovo G, Scannapieco G, Spanò E, Calliari I, Leprotti C, Serafini F, Ambrosio GB, Dalla Libera L. Myosin light chain kinase in vascular smooth muscle. An immunohistochemical study in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Basic Appl Myol* 1996;6:183-187.
96. Dalla Libera L, Podhorska-Okolow M, Martin B, Massimino ML, Brugnolo R, Cantini M. Smooth muscle myosin light-chain kinase is transiently expressed in skeletal muscle during embryogenesis and muscle regeneration both in vivo and in vitro. *J Muscle Res Cell Motil* 1997;18:295-303.
97. Muto A, Nishibe T, Dardik H, Dardik A. Patches for carotid artery endarterectomy: current materials and prospects. *J Vasc Surg* 2009;50(1):206-13.
98. Pandis L, Zavan B, Abatangelo G, Lepidi S, Cortivo R, Vindigni V. Hyaluronan-based scaffold for in vivo regeneration of the rat vena cava: Preliminary results in an animal model. *J Biomed Mater Res* 2010;93(4):1289-96.
99. Zavan B, Vindigni V, Lepidi S, Iacopetti I, Avruscio G, Abatangelo G, Cortivo R. Neoarteries grown in vivo using a tissue-engineered hyaluronan-based scaffold. *FASEB J* 2008;22(8):2853-61.
100. Lepidi S, Grego F, Vindigni V, Zavan B, Tonello C, Deriu GP, Abatangelo G, Cortivo R. Hyaluronan biodegradable scaffold for small-caliber artery grafting: preliminary results in an animal model. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2006;32(4):411-7.
101. Lepidi S, Abatangelo G, Vindigni V, Deriu GP, Zavan B, Tonello C, Cortivo R. In vivo regeneration of small-diameter (2 mm) arteries using a polymer scaffold. *FASEB*
102. Genasetti A, Vigetti D, Viola M, Karousou E, Moretto P, Rizzi M, Bartolini B, Clerici M, Pallotti F, De Luca G, Passi A. Hyaluronan and human endothelial cell behavior. *Connect*
103. Ibrahim S, Ramamurthi A. Hyaluronic acid cues for functional endothelialization of vascular constructs. *J Tissue Eng Regen Med* 2008;2(1):22-32.
104. Turner NJ, Kielty CM, Walker MG, Canfield AE. A novel hyaluronan-based biomaterial (Hyaff-11) as a scaffold for endothelial cells in tissue engineered vascular grafts. *Biomaterials* 2004;25:5955-64.
105. Pasquinelli G, Vinci MC, Gamberini C, Orrico C, Foroni L, Guarnieri C, Parenti A, Gargiulo M, Ledda F, Caldarera CM, Muscari C. Architectural organization and functional features of

early endothelial progenitor cells cultured in a hyaluronan-based polymer scaffold. *Tissue Eng Part A* 2009;15(9):2751-62.

106. Campoccia D, Doherty P, Radice M, Brun P, Abatangelo G, Williams DF. Semisynthetic resorbable materials from hyaluronan esterification. *Biomaterials* 1998;19:2101-27.
107. Milella E, Brescia E, Massaro C, Ramires PA, Miglietta MR, Fiori V, Aversa P. Physicochemical properties and degradability of non-woven hyaluronan benzylic esters as tissue engineering scaffolds. *Biomaterials* 2002 Feb;23(4):1053-63.
108. Benedetti L, Cortivo R, Berti T, Berti A, Pea F, Mazzo M, Moras M, Abatangelo G. Biocompatibility and biodegradation of different hyaluronan derivatives (Hyaff) implanted in rats. *Biomaterials* 1993 Dec;14(15):1154-60.
109. Bartels HL, Van Der Lep B, Robinson PH. Prosthetic microvenous grafting in the rat femoral vein. *Lab Anim* 1993;27:47-54. 2. Gloviczki P, Hollier LH, Dewanjee MK, Trasek VF, Hoffman EA, Kaye MP. Experimental replacement of the inferior vena cava: factors effecting patency. *Surgery* 1984;95:657-666.
110. Gloviczki P, Hollier LH, Dewanjee MK, Trasek VF, Hoffman EA, Kaye MP. Experimental replacement of the inferior vena cava: factors effecting patency. *Surgery* 1984;95:657-666.
111. Hiratzka LF, Wright CB. Experimental and clinical results of grafts in the venous system. A current review. *J Surg Res* 1978;25:542-561.
112. Nugent HM, Edelman ER. Tissue Engineering Therapy for Cardiovascular Disease. *Circ Res* 2003;92:1068-1078.
113. Padilla L, Sastre N, Chousleb A, Di Silvio M, Contreras M, Manzano B, Reyes N, Sanchez R, Fajer J. Polytetrafluoroethylene microprosthesis in the venous system of the rat. *J Reconstr Microsurg* 1987 Jan;3(2):159-63.
114. Cuadros CL, Hughes JE. Patency of synthetic microvenous conduits: an experimental study in the femoral vein of the rat. *Plast Reconstr Surg* 1986 Sep;78(3):378-82.
115. Robinson PH, van der Lei B, Schakenraad JM, Jongebloed WJ, Hoppen HJ, Pennings AJ, Nieuwenhuis P. Patency and healing of polymeric microvenous prostheses implanted into the rat femoral vein by means of the sleeve anastomotic technique. *J Reconstr Microsurg* 1990 Jul;6(3):287-92.
116. Van der Lei B, Bartels HL, Dijk F, Schakenraad JM, Nieuwenhuis P, Robinson PH. Experimental microvenous reconstructions with Gore-Tex polytetrafluoroethylene prosthesis implanted by means of the sleeve anastomotic technique. *Microsurgery* 1991;12(1):23-9.
117. Oguchi H, van der Lei B. The 3M precise microvascular anastomotic system for implanting PTFE microvenous prostheses into the rat femoral vein. *Plast Reconstr Surg* 1996 Mar;97(3):662-5.