

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA - FACOLTA' DI INGEGNERIA

# Innesti vascolari di piccolo calibro

---

Small-diameter vascular grafts

**INGEGNERIA BIOMEDICA**

**Laureando: Federico Bolner**

**Relatore: Dr. Andrea Bagno**

**Anno accademico 2009/2010**



# INDICE

## Abstract

### 1. Introduzione

### 2. Uno sguardo all'iperplasia intimale

### 3. Come ottenere una superficie non trombogenica

#### 3.1. Ruolo dell'endotelio ed endotelizzazione dell'innesto

##### 3.1.1. Endotelio

##### 3.1.2. Endotelizzazione

#### 3.2. *Compliance* e la rigidità

#### 3.3. Porosità

#### 3.4. Trattamento dell'innesto

### 4. Materiali

#### 4.1. Dacron

##### 4.1.1. Introduzione

##### 4.1.2. Trattamento preimpianto

##### 4.1.3. Risposta *in vivo*

#### 4.2. Teflon

##### 4.2.1. Introduzione

##### 4.2.2. Trattamento preimpianto

##### 4.2.3. Risposta *in vivo*

#### 4.3. Poliuretani

##### 4.3.1. Introduzione

##### 4.3.2. Risposta *in vivo* e porosità

##### 4.3.3. Elettrospinning

#### 4.4. PEU-PDMS

##### 4.4.1. Introduzione

##### 4.4.2. Biodegradazione e risposta infiammatoria

##### 4.4.3. Tossicità

##### 4.4.4. Emocompatibilità

##### 4.4.5. Risposta *in vivo* a lungo termine

### 5. Conclusioni

## ABSTRACT

In assenza di una vena safena autologa per un intervento di impianto vascolare, la prassi chirurgica si affida agli innesti sintetici.

In questa sede si intende presentare e riassumere le innovazioni nel campo degli innesti vascolari di piccolo calibro con particolare riguardo ai materiali sintetici utilizzati, ai trattamenti a cui vengono sottoposti per migliorarne le prestazioni ed alle prestazioni stesse, ottenute *in vivo*.

Innanzitutto verranno evidenziati importanti aspetti da valutare quando si progetta un innesto e si applicano trattamenti preimpianto, come proprietà meccaniche (in particolar modo la *compliance*), porosità e crescita di endotelio sulla superficie luminale, essenziali per arginare i più gravi problemi che affliggono questo tipo di impianto vascolare, ovvero iperplasia intimale e trombosi.

Dopodiché l'attenzione verrà puntata sui materiali più diffusi, approfondendo per ognuno vantaggi e svantaggi, e descrivendo come le specifiche proprietà influenzino la risposta *in vivo*. Si partirà da ePTFE (politetrafluoroetilene) e Dacron (polietilene tereftalato), materiali standard nelle applicazioni di protesi vascolari di largo diametro, fino ad arrivare agli elastomeri in poliuretano complianti e sufficientemente porosi per la crescita interna di tessuto, tuttavia non immuni da complicazioni (biodegradazione in primis).

Infine viene segnalato un recente studio italiano, condotto su un semi-IPN (*semi-interpenetrating polymer network*) in PEtU-PDMS, che integra polietere poliuretano (PEtU) e polidimetilsilossano (PDMS) ed unisce le ottime proprietà meccaniche dei poliuretani alla stabilità chimica e alla non tossicità dei sottoprodotti.

# 1. INTRODUZIONE

Il bypass chirurgico è un trattamento comune nelle patologie coronariche e dei vasi periferici. Queste ultime stanno diventando sempre più comuni mano a mano che la popolazione invecchia e sono la maggior causa di morte sia in U.S.A. che in Europa. Questo genere di operazioni viene effettuato più di 600,000 volte all'anno nei sopraccitati Paesi (1).

I vasi autologhi, in particolar modo la vena safena della gamba, rimangono il materiale standard utilizzato nelle operazioni di innesto vascolare sia coronarico che periferico; tuttavia più del 30 % dei pazienti non dispone di vene utilizzabili per la ricostruzione vascolare a causa di deformazioni delle vene stesse, scarsa qualità del vaso o mancanza dello stesso in seguito ad una precedente operazione (1). In questo caso è necessario utilizzare vasi artificiali che purtroppo, allo stato attuale, non garantiscono lo stesso livello di prestazioni e hanno un tasso di fallimento ancora abbastanza elevato dovuto principalmente alla mancata crescita di cellule endoteliali all'interno del vaso artificiale e alla diversa risposta meccanica fra arteria elastica e innesto invece rigido (1). Di conseguenza la ricerca di un materiale utilizzabile per gli innesti vascolari di piccolo calibro che possedesse elasticità simile alle arterie è stato da sempre obiettivo dei ricercatori.

Lo studio di materiali sintetici atti alla fabbricazione di vasi artificiali è in corso ormai da cinquant'anni. L'iniziale fallimento di materiali come il metallo, il vetro, l'avorio, la seta ed il nylon hanno portato all'attenzione criteri come durezza e assenza di trombogenesi; la ricerca è stata quindi indirizzata a materiali inerti che interagiscano in modo minimo con i tessuti, in particolare con il sangue (2). Il polietilentereftalato in forma di Dacron ed il politetrafluoroetilene espanso, ovvero Teflon espanso (ePTFE), hanno dimostrato un buon comportamento per quanto riguarda vasi con diametro superiore ai 6 mm, ma non sufficiente nelle applicazioni di piccolo diametro (< 4-6 mm). Dato che trovare un materiale completamente inerte è altamente improbabile, le ricerche si sono concentrate sui materiali conosciuti, in particolare sull'ottimizzazione dell'interazioni tessuto-materiale in modo da

migliorarne le prestazioni (2). Sia Dacron che Teflon sono stati sottoposti a varie modifiche: dall'utilizzo di eparina per diminuire la trombogenesi, fino all'applicazione di sostanze per stimolare la crescita di cellule endoteliali all'interno dell'innesto (3). Purtroppo questi innesti vascolari sono soggetti a limitazioni e hanno bisogno di essere migliorati: la maggior parte dei vasi in circolazione in ePTFE e Dacron non si avvicina alle proprietà elastiche delle arterie a cui vengono attaccati, spesso provocando iperplasia intimale (IH) e stenosi (3, 4). È stato suggerito che il problema dell'IH per questi vasi sia connesso, come già detto, alla differenza del modulo elastico fra arteria ospitante e innesto (3). Il problema è grave in quanto la maggior parte delle operazioni di innesti di piccolo calibro fallisce entro i cinque anni soprattutto a causa di stenosi a livello distale o ostruzione causata da IH, perciò possedere un innesto con ottima elasticità e predisporlo alla crescita di tessuto endoteliale al suo interno sono punti di importanza critica per minimizzare trombogenesi e durata in vivo.

Un ulteriore metodo per creare un vaso artificiale risiede nella cosiddetta ingegneria tessutale che coinvolge la crescita *in vitro* di cellule su uno scaffold naturale e/o sintetico col fine di creare un vaso nella sua interezza (5). Tuttavia, nonostante questa nuova tecnologia, nella prassi chirurgica si continuano ad utilizzare le ben conosciute e testate controparti sintetiche, le cui innovazioni non vengono comunque trascurate: recentemente il poliuretano è stato oggetto di studio viste le sue migliori proprietà meccaniche rispetto a Dacron e Teflon (4). Gli elastomeri di poliuretano hanno generalmente eccellenti caratteristiche fisiche; flessibilità, resistenza alla tensione, facilità di allungamento e buona emocompatibilità ne hanno fatto il materiale principe laddove fosse necessaria resistenza notevole agli sforzi di flessione, come impianti ventricolari, palloncini intra-aortici e componenti per cuori artificiali (1). Sfortunatamente i poliuretani sono polimeri instabili soggetti a degradazione in vivo, anche se negli ultimi anni sono stati fatti progressi per aumentarne la durata.

Un'altra importante classe di materiali utilizzati negli ultimi anni nei dispositivi biomedicali sono i cosiddetti siliconi o polidimetilsilossani (PDMSs). Il miglior pregio degli elastomeri a base di silicone è la loro ottima emocompatibilità, ma posseggono anche bassa tossicità, buona stabilità termica, resistenza all'ossidazione, riescono a

sopportare grande elongazione, ma resistono poco a sforzi di medio-grande entità (1). In passato sono stati sviluppati materiali come il PurSil (Ward et al., Polymer Technology Group, Berkeley, California, U.S.A.) costituito da una base di poliuretano e siliconi che fanno da struttura portante. Essi hanno mostrato buone proprietà e per questo motivo qui in Italia sono stati fatti studi in questo senso, con interessanti risultati dovuti anche all'attenzione posta nella microstruttura del vaso stesso che ne modifica in modo sostanziale la crescita cellulare all'interno e la tendenza a formare trombi (6). È infatti noto che due vasi artificiali della stessa sostanza, ma con porosità differente, reagiscono diversamente; in particolare se la superficie del lume del vaso è molto porosa ne trae beneficio l'emocompatibilità, poiché scoraggia l'adesione delle piastrine ed il rilascio nel plasma di tromboglobulina- $\beta$ , una proteina implicata nella loro attivazione (7).

In questa sede si intende presentare e riassumere le innovazioni nel campo degli innesti vascolari di piccolo calibro con particolare riguardo ai materiali utilizzati, ai trattamenti a cui vengono sottoposti per migliorarne le prestazioni ed alle prestazioni ottenute in vivo.

## **2. UNO SGUARDO ALL'IPERPLASIA INTIMALE**

L'iperplasia intimale (IH) è un processo biologico complesso che deriva dalla risposta del tessuto del vaso alla ferita che si verifica in tutti gli innesti, soprattutto vicino alle anastomosi. Assieme alle infezioni è una delle cause di fallimento a lungo termine degli innesti sintetici, sia di piccolo calibro che non. Essa interessa tutta la lunghezza degli innesti venosi, ma solo la regione peri-anastomotica degli innesti sintetici nell'uomo; ciò accade poiché l'endotelizzazione dell'innesto avviene praticamente solo in queste particolari zone e spesso il resto del vaso artificiale non viene colonizzato dalle cellule.

Quando si forma un trombo, esso è invaso dai macrofagi e viene riorganizzato in lesione dalla ricrescita di nuovi capillari e cellule muscolari lisce provenienti dal vaso

adiacente. Il reticolo di fibrina funge da impalcatura per la crescita interna delle cellule: macrofagi attivati, piastrine, cellule muscolari lisce rilasciano citochine, il fattore di crescita derivato dalle piastrine, il fattore di crescita dei fibroblasti e il fattore di crescita trasformante, che stimolano la proliferazione e la migrazione cellulare e l'angiogenesi.

La trombina generata durante il processo trombotico può anche stimolare crescita e migrazione delle cellule muscolari lisce. La successiva organizzazione della lesione a stadi più avanzati può sfociare infine in iperplasia neointimale (8) (Figura 1). Le cause della patologia possono essere ricercate nella mancanza di endotelio, ma in genere sembra che la causa principale sia la differenza di *compliance* (capacità dei vasi sanguigni di espandersi sotto la pressione sanguigna crescente) tra vaso nativo ed innesto, dovuta alla diversa rigidità dei due. È stato provato che la velocità di ispessimento della parete del vaso dipende dallo sforzo tangenziale al suo interno e dalle caratteristiche del materiale (4). Il ePTFE ha dimostrato di reagire molto meglio all'ispessimento del tessuto rispetto al Dacron, con dimensioni in genere di 1/4 - 1/8 (dopo due settimane) minore di quanto succeda nell'altro polimero e questo è proprio uno dei motivi della sua maggior diffusione (4).

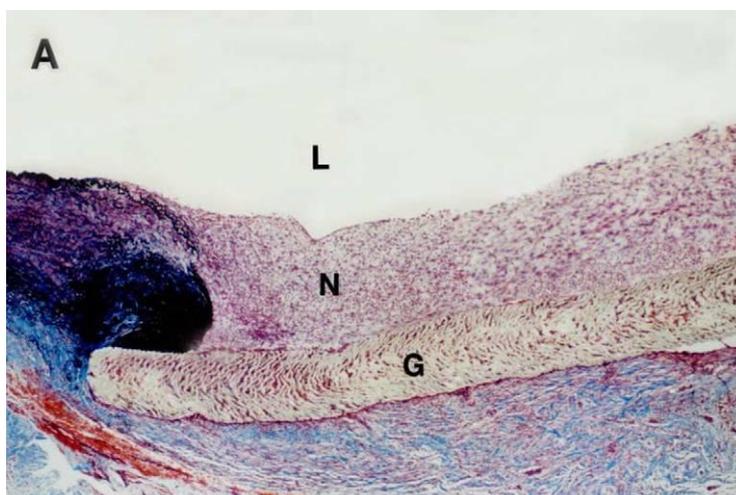


Figura 1 - Iperplasia neointima nei pressi dell'anastomosi distale. In blu il collagene; in nero l'elastina. L, lume; N, neointima; G, innesto in ePTFE. Ingrandimento x40.

### **3. COME OTTENERE UNA SUPERFICIE NON TROMBOGENICA**

Le protesi vascolari sono dispositivi medici che vengono impiantati permanentemente allo scopo di ripristinare l'efficacia di un tipo vascolare che, per qualsiasi motivo, non sia più in grado di trasportare correttamente il sangue. Gli impianti vascolari sono, nella quasi totalità dei casi, arteriosi: ciò dipende dal fatto che le patologie venose sono molto meno gravi in quanto la pressione venosa è inferiore a quella arteriosa (ciò limita il danno vascolare) e solitamente all'interno del corpo umano si generano circoli collaterali alternativi che drenano comunque il sangue venoso.

Come già detto gli innesti vascolari possono essere divisi in base alla loro misura: vi sono quindi vasi di grosso diametro (diametro interno > 6 mm) e vasi di piccolo calibro (diametro interno < 4-6 mm). La differenza non sta solamente nella dimensione, ma anche nella reazione che si riscontra all'interno del corpo umano ai due tipi di innesto. Nella caso di innesti vascolari di grosso diametro, infatti, il sangue scorre più velocemente e quindi è a contatto con le pareti del vaso per un tempo più breve. Questo dà luogo a minori problemi di compatibilità e fenomeni trombotici meno accentuati; il formarsi di una capsula fibrosa o l'innescarsi dell'iperplasia diventano invece situazioni critiche quando il vaso ha un diametro molto piccolo (Figure 2 e 3).

Le caratteristiche ideali di un innesto sono essenzialmente una vita media superiore a quella dell'ospite e nessuna reazione indesiderata. Vi sono vari accorgimenti da prendere, elencati brevemente qui di seguito e successivamente ripresi in maniera più approfondita.

Innanzitutto un notevole traguardo consisterebbe nel ricreare un endotelio naturale tramite insemminazione della protesi con cellule endoteliali. Questi tentativi non sono ancora riusciti a dare i risultati sperati a causa dell'incapacità di tali cellule di rimanere adese a lungo alla superficie della protesi e di proliferare normalmente. Con i progressi dell'ingegneria tessutale, tuttavia, si stanno facendo molti passi in avanti in

questa direzione. Inoltre, dimensioni e proprietà dell'innesto dovrebbero essere il più possibile simili a quelle delle arterie da sostituire (soprattutto le proprietà elastiche), per minimizzare disturbi nel flusso e per un trasferimento ottimale di energia pulsatile; un cattivo accoppiamento anastomotico è inefficiente e l'inefficienza è aggravata dal fatto che ci sono due anastomosi (zone di giunzione fra innesto e vaso) per ogni innesto.

Inoltre si può rendere porosa la parete della protesi, con la speranza che venga promossa la formazione di neointima (nuova superficie completamente naturale); questa situazione è sempre stata difficile da raggiungere: di solito la formazione di una neointima vera non si verifica e specialmente attorno alle anastomosi il tessuto neoformato può crescere in modo abnorme (iperplasia intimale) ed occludere il vaso.

Infine è possibile applicare rivestimenti interni non porosi, in materiale sintetico inerte, opportunamente funzionalizzato in senso biologico, come ad esempio il carbonio pirolitico, o utilizzare un anticoagulante incorporato nella parete protesica come l'eparina, anche se tali procedure hanno incontrato scarso successo clinico per le difficoltà di dosare la quantità e l'attività dell'eparina legata, il costo elevato e la mancanza di riproducibilità.

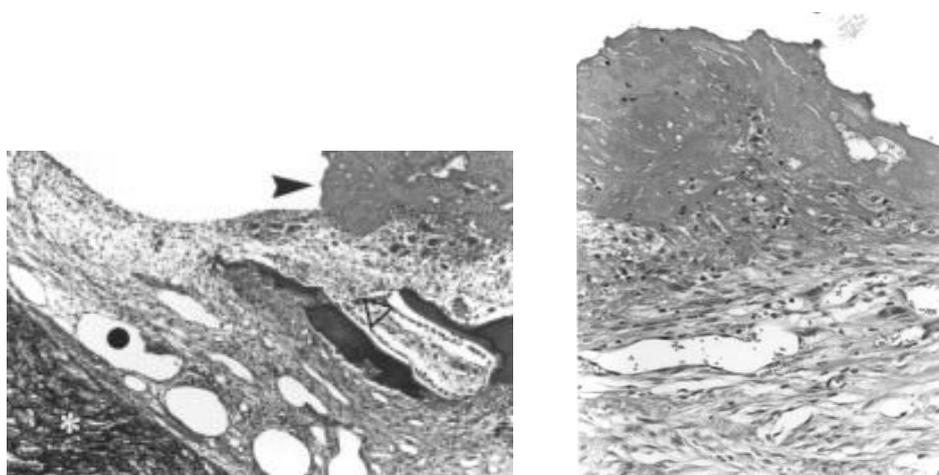


Figura 2 (a sinistra) - Trombo (indicato dalla freccia nera); calcificazione (triangolo con bordo nero); vascularizzazione (punto nero) su innesto in ePTFE (asterisco).

Figura 3 (a destra) - Ingrandimento 125x della giunzione tra trombo (parte scura in alto) e neointima sottostante.

## 3.1. Ruolo dell'endotelio ed endotelizzazione dell'innesto

### 3.1.1. Endotelio

Una volta si pensava che le cellule endoteliali fossero un semplice monostrato passivo di cellule del vaso, mentre ora si sa che inibiscono attivamente la formazione di trombi e l'iperplasia intimale e che fungono da superficie anticoagulante (Figura 4).

Quando la parete di un vaso si danneggia, vengono esposte le proteine della matrice sotto l'endotelio a cui si aggregano le proteine in circolazione, in particolare il fibrinogeno. In condizioni normali, le cellule endoteliali hanno una funzione antitrombotica: il glicocalice (la parte più esterna della membrana plasmatica) fornisce una prima barriera impedendo l'adesione delle piastrine; la produzione di ossido nitrico e prostaciclina rinforza la precedente azione e, oltre a questo, provoca vasodilatazione; infine la superficie delle cellule endoteliali metabolizza l'adenosindifosfato (ADP) che previene il reclutamento di nuove piastrine.

Situato tra il sangue e la parete vascolare, l'endotelio serve come superficie anticoagulante. *In vivo*, l'inizio della coagulazione in risposta ad un trauma avviene attraverso l'esposizione al sangue del fattore tissutale (TF) e la formazione del coagulo si verifica quando il fibrinogeno viene convertito in fibrina dalla trombina. Le cellule endoteliali hanno siti di legame per i diversi fattori della coagulazione ed uno strato intatto di cellule non espone il TF, funzionando di conseguenza come inibitore della coagulazione; inoltre, le cellule endoteliali espongono trombomodulina, una proteina che converte la trombina da proteina trombotica in antitrombotica.

L'innescò dell'iperplasia intimale, cioè la proliferazione delle cellule muscolari lisce che dalla tonaca avventizia migrano nell'intima, è attivato da due fattori di crescita diversi: il fattore di crescita dei fibroblasti (bFGF) e il fattore di crescita di derivazione piastrinica (PDGF). Un endotelio illeso ha una funzione protettiva nei confronti

dell'iperplasia intimale in quanto le cellule formano una barriera per l'afflusso di fattori della crescita e inibiscono la proliferazione delle cellule della muscolatura liscia (9).

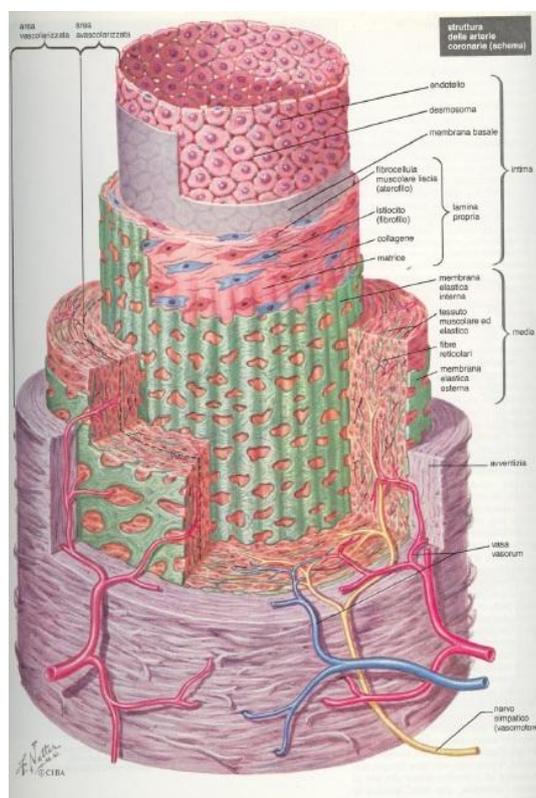


Figura 4 - La struttura del vaso, in alto la sua parte più interna: l'endotelio.

### 3.1.2. Endotelizzazione

La semina di cellule endoteliali (EC) per ottenere uno strato naturale all'interno di un innesto protesico di piccolo calibro per migliorarne le prestazioni ha una storia di oltre 25 anni e continua ancora oggi, anche se di recente le sono state affiancate moderne tecniche di semina di cellule staminali e di ingegneria tissutale. Sebbene l'utilizzo delle cellule staminali per la rigenerazione dei tessuti sia promettente, il loro utilizzo come alternativa per la semina di EC adulte non è ancora possibile: attualmente lo svantaggio maggiore consiste nella difficoltà di coltura *in vitro* e differenziazione in EC.

L'utilizzo delle cellule endoteliali ha dimostrato i suoi benefici sul tasso di pervietà dei bypass vascolari per innesti di piccolo calibro. Lo svantaggio è che questa tecnica non può essere utilizzata in caso di emergenza, in quanto le cellule endoteliali devono essere coltivate *ex vivo*. Sono state valutate alternative alle EC, come le cellule mesenchimali, che però si sono rivelate inadatte come alternative in quanto non mostrano tutte le proprietà antitrombotiche e fibrinolitiche negli esperimenti *in vivo*, o anche le cellule endoteliali microvascolari che potrebbero essere un'alternativa una volta rimossi alcuni limiti (9).

È importante distinguere l'endotelizzazione dovuta alle cellule provenienti dalle zone di anastomosi (giunzioni innesto – vaso nativo), che si indica con TAE (*transanastomotic endothelialization*), da quella dovuta a endotelio cresciuto grazie all'infiltrazione di capillari all'interno della parete del vaso (*transmural endothelialization*).

Vi sono quattro fattori principali che influenzano la TAE: la specie, l'età, le dimensioni del vaso e la superficie. Tutti questi fattori non fanno che complicare di gran lunga lo studio del fenomeno. La specie è il più influente dei quattro fattori: negli animali come il babuino, il cane, il coniglio ed il topo, ad esempio, per la crescita di una certa porzione di tessuto all'interno dell'innesto sono richieste poche settimane contro i diversi mesi per l'uomo, nel caso che questa crescita avvenga del tutto (4). Oltre a ciò, molti animali (topo, cane, coniglio e altri) hanno spontanee capacità angiogeniche e di endotelizzazione di un innesto vascolare poroso attraverso la crescita transmurale, mentre negli esseri umani ciò non avviene (10) (Figura 5).

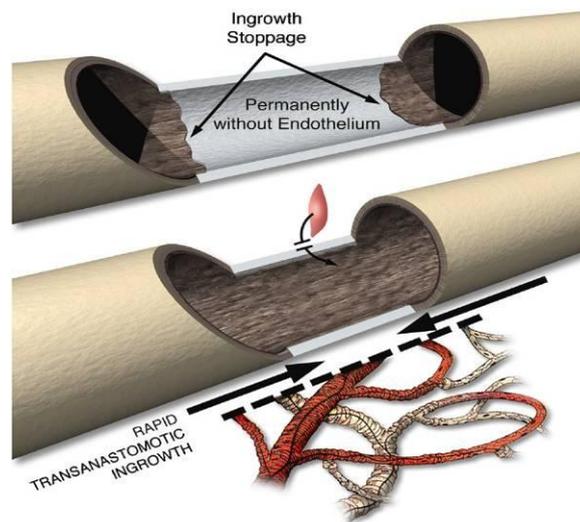


Figura 5 - Rappresentazione schematica di TAE, nel modello umano (sopra) e animale (sotto)

Dato il ruolo fondamentale che ricoprono le cellule endoteliali nell'impedire all'innesto di occludersi, è comprensibile quanto questo aspetto sia stato preso in considerazione dai ricercatori. È perciò ancor più sorprendente che la maggioranza di questi si sia affidata a modelli animali non adeguati a stimare l'endotelizzazione della parte centrale dell'innesto. È risaputo, da più di quarant'anni, che la crescita cellulare TAE non supera 1-2 cm di estensione anche dopo anni di permanenza dell'impianto quando invece gli innesti per bypass possono arrivare a 40-60 cm; perciò è ovvio come la TAE sia un meccanismo di scarsa rilevanza nell'essere umano. D'altro canto questo fenomeno è stato ampiamente studiato nel modello animale, dove fra l'altro a volte avviene una endotelizzazione addirittura su tutta la lunghezza dell'innesto. Inoltre sono stati spesso scelti per gli studi vasi troppo corti e periodi di impianto prolungati; non sorprende quindi che tali innesti presentino una rigenerazione cellulare completa (4) (Figure 6 e 7).

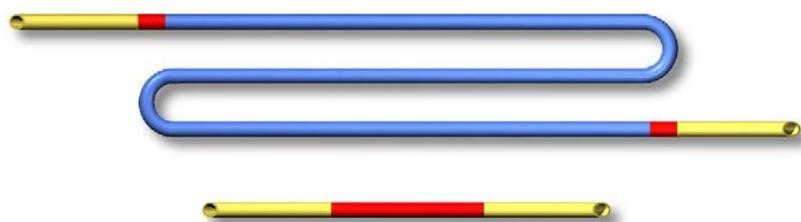


Figura 6 - Confronto schematico della lunghezza degli innesti usati per bypass clinici (60 cm, sopra) e nella maggior parte degli esperimenti negli animali (<6 cm, sotto). In giallo sono indicate le anastomosi, munite di endotelio; in rosso l'endotelio dovuto alla TAE; in blu la parte di innesto priva di endotelio.

Fra i modelli animali, le pecore rappresentano un modello utile per studiare il fallimento degli innesti, perché il loro sistema di coagulazione è simile a quella degli esseri umani (11). Il modello di pecora e quello umano presentano entrambi una risposta aggressiva all'intervento e le lesioni che ne derivano hanno istologia e modelli di proliferazione cellulare molto simili. È ancora da chiarire se il problema sia riprodotto in maniera esattamente uguale o meno, ma la pecora rimane comunque utile per le prove circa le ipotetiche cause del fallimento degli innesti di piccolo calibro, in particolare la formazione di trombi, e per valutare le modifiche e/o le terapie per migliorare la funzionalità dell'innesto (8).

Parlando di rigenerazione è importante considerare la porzione centrale dell'innesto, lontana dalle giunzioni. In questo caso, anche dopo prolungati periodi di impianto, una persistente reazione da corpo estraneo interessa gli interstizi delle protesi, mentre lo sviluppo di trombi sulla superficie luminale non si arresta. Così, la guarigione, definita come la conclusione del processo di riparazione, non si verifica. Inoltre, dal momento che non si formano tracce di tessuto vascolare né negli interstizi né sulla superficie di questi innesti, la rigenerazione rimane permanentemente assente. Per motivazioni ancora sconosciute, né la crescita transmurale né quella anastomotica dal vaso nativo adiacente sembrano essere in grado di promuovere l'endotelizzazione oltre la zona prossima alle anastomosi (4).

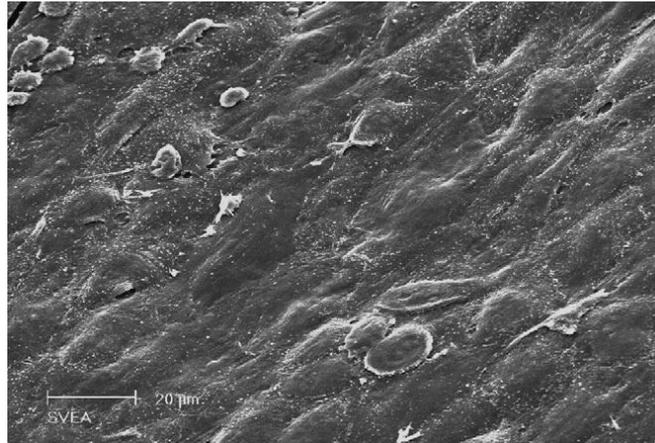


Figura 7 – L'immagine SEM (microscopio a scansione elettronica) porta un esempio di endotelizzazione completa nella parte centrale di un innesto in ePTFE ad alta porosità nel modello del topo.

Attualmente vi sono tre principali meccanismi per arrivare ad una endotelizzazione spontanea *in vivo*: la migrazione delle cellule endoteliali verso l'interno dal vaso nativo; la deposizione di cellule dell'endotelio in circolo sulla superficie luminale dell'innesto e l'endotelizzazione transmurale, quando le cellule endoteliali derivano dalla crescita di capillari all'interno dei pori della parete del vaso artificiale (12). Quest'ultima soluzione non dipende unicamente dalla stimolazione della crescita di capillari, ma anche della regolazione controllata della migrazione e della proliferazione delle cellule. Essa è stata promossa, ad esempio, nel topo attraverso l'utilizzo di proteine insolubili della matrice extracellulare su vasi in ePTFE commercialmente disponibili, ottenendo una crescita di capillari maggiore che nello stesso innesto non trattato (13) (Figura 8). Invece l'uso di plasmidi che stimolano il rilascio di fattori della crescita di cellule endoteliali non ha ottenuto risultati altrettanto entusiasmanti (10) (Figura 9).

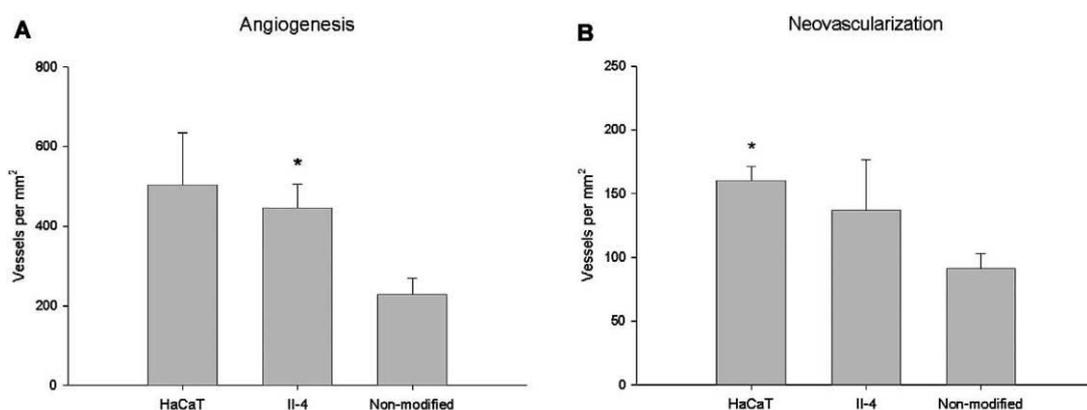


Figura 8 – Istogramma della risposta vascolare in un innesto in ePTFE nel topo, quando è rivestito con due tipi di proteine e non rivestito (vedi asse delle ascisse). Il grafico A mostra la risposta angiogenica (i vasi identificati nel tessuto perimplantare); il grafico B identifica la crescita di vasi all'interno dei pori dell'innesto. I valori sono espressi come media del numero di vasi per mm<sup>2</sup>.

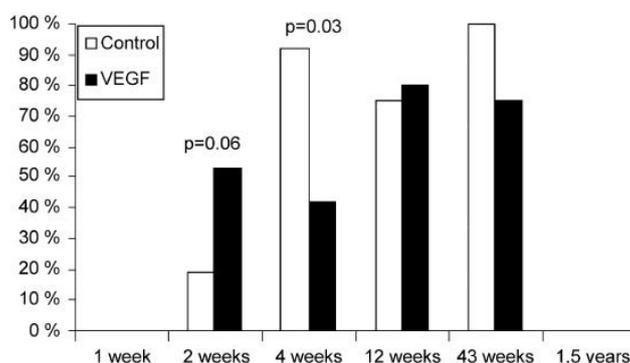


Figura 9 – Effetto dell'utilizzo plasmide pNGVL3\_VEGF<sub>165</sub> sulla crescita endoteliale in innesti in ePTFE di aorta nel modello del coniglio. Il grafico mostra la percentuale di superficie dell'innesto coperta da endotelio. Il plasmide promuove l'endotelizzazione a 2 settimane rispetto ai vasi non trattato (*Control*) (53 % vs 19 %, su n=32 modelli). Però, già dalla settimana 4 (42 % vs 92, n=24) fino alla fine del periodo di studio (settimana 43, 75 % vs 100 %, n=18) il plasmide non ha alcun effetto benefico.

### 3.2. Compliance e rigidezza

La *compliance* è la capacità di un vaso di espandersi sotto una pressione sanguigna crescente ed è data da  $\frac{\Delta D}{\Delta P} \times 100$  dove D è il diametro e P è la pressione ematica. Il

differente valore di *compliance* fra vaso nativo ed innesto protesico è uno degli imputati del fallimento degli impianti vascolari.

Le arterie non sono semplicemente dei condotti per trasportare il sangue da una parte all'altra del corpo, ma sono un organo attivo: la loro struttura elastica permette di trasmettere efficacemente il flusso pulsatile del sangue attraverso l'energia elastica, allo stesso tempo smorzando eccessive fluttuazioni di pressione (Figura 10). I vasi in ePTFE e Dacron commercialmente disponibili non riproducono tale comportamento. La risposta di un'arteria non è dovuta solamente all'alternarsi di pressione sistolica e diastolica, ma anche dalla pressione media con cui agisce l'impulso di pressione, cosicché alle basse pressioni il flusso è prevalentemente a carico delle fibre di elastina altamente distendibili, mentre a pressioni elevate è trasferito al collagene, scarsamente elastico.

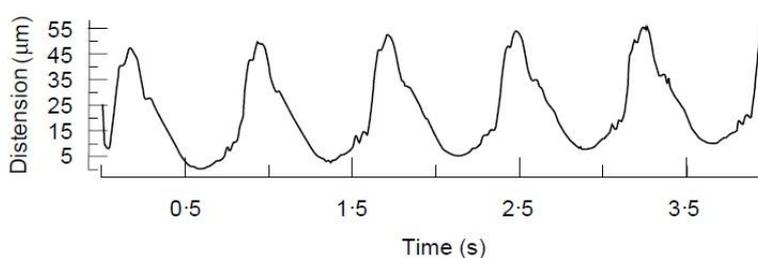


Figura 10 – Curva distensione-tempo di una vena safena.

Anche la vena presenta comportamento anisotropo, ma, a differenza delle arterie, il carico viene trasferito al collagene a pressioni inferiori poiché le pareti venose contengono meno elastina e muscolo liscio; di conseguenza la vena non ha la stessa efficacia quando esposta alle pressioni medie maggiori associate alla circolazione arteriosa (14).

Da uno studio comparativo tra *compliance* di un'arteria, una vena safena, ePTFE, Dacron e CPU (poliuretano policarbonato) in un bypass infrainguinale, emerge chiaramente il comportamento anisotropo di arteria e vena, cioè vi è un rapporto non lineare tra il grado di deformazione radiale esibita dall'arteria in risposta ad un aumento della pressione all'interno del lume, mentre è isotropo per i materiali sintetici (14).

Il comportamento elastico degli innesti e dei vasi è stato misurato rispetto ad una serie di pressioni medie, questo perché il tessuto dell'arteria è un materiale eterogeneo che non obbedisce alla legge di Hooke in risposta ai cambiamenti ciclici della pressione arteriosa. La vena safena ha proprietà simili a quelle dell'arteria per pressioni basse (30 mmHg) e pressioni alte (100 mmHg), ma non per l'intervallo di pressioni intermedie. Gli innesti sintetici non presentano questo modello di comportamento anisotropo ed hanno curve di pressione più uniformi (Figura 11).

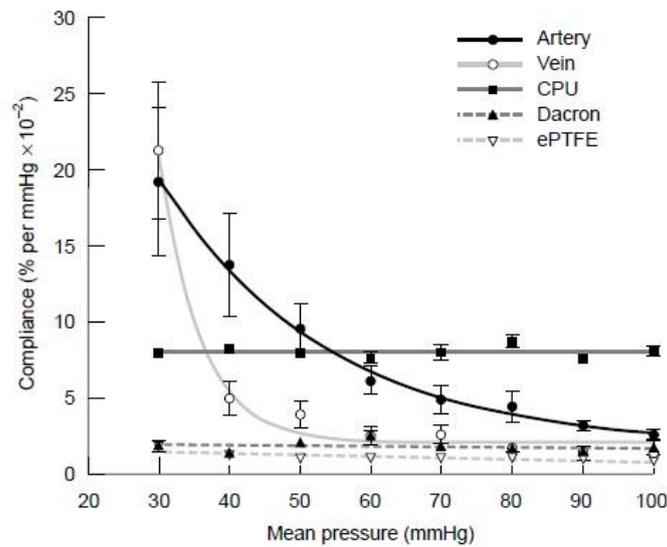


Figura 11 – Grafico *compliance* – pressione media registrata nell'innesto. Le curve non lineari per arteria e vena sono state interpolate mediante regressione non lineare, le altre attraverso regressione lineare.

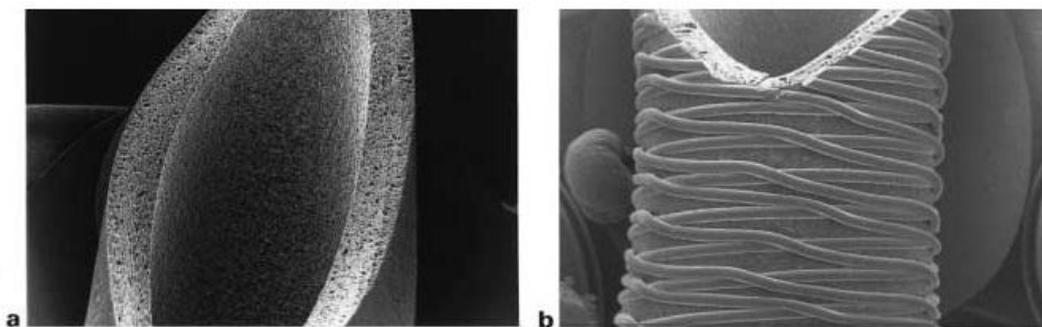


Figura 12 – Immagine SEM di innesti in poliuretano-policarbonato complianti, non rinforzati (a, ingrandimento 12.4x) e rinforzato (b, ingrandimento 12.0x).

Vi è una grande differenza in rigidità e compliance confrontando ePTFE e Dacron con l'arteria: la rigidità è molto più elevata e la compliance è minore per qualsiasi valore di pressione. Il poliuretano invece presenta caratteristiche migliori: quando si media su tutta la gamma di pressioni, si può notare la conformità del comportamento di CPU e arteria (media della compliance di 8.1 e 8.0 % per mmHg x 10<sup>-2</sup>, rispettivamente); la differenza tra l'arteria e CPU a pressioni medie di 30-60 mmHg non è particolarmente elevata, ma aumentando la pressione al di sopra di questo intervallo si arriva ad un inevitabile disallineamento dell'estensibilità: a 100 mmHg i valori di compliance sono di 8.1 % per mmHg x 10<sup>-2</sup> per il CPU e di 2.6 % per mmHg x 10<sup>-2</sup> per l'arteria (14) (Figura 12, 13).

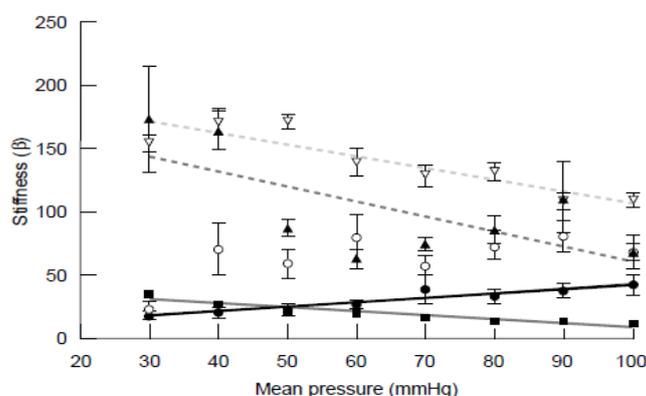


Figura 13 – Grafico rigidezza – pressione media registrata nell'innesto. Le curve sono state interpolate tutte secondo un modello di regressione lineare.

È interessante notare che gli indici di rigidità arteriosa e CPU sono rimasti simili su una gamma di pressioni più ampia rispetto a quanto avvenuto per i valori di compliance corrispondenti. Mentre la compliance descrive l'estensibilità funzionale del vaso in risposta ad un cambiamento della pressione sanguigna, la rigidità dell'arteria è un valore meno dipendente dal cambiamento quantitativo di pressione e quindi è stato proposto come un indice più utile per descrivere il comportamento viscoelastico di un vaso. L'equivalenza di rigidità tra arteria e CPU suggerisce che la natura elastica intrinseca del poliuretano e dell'arteria siano simili. Si può sostenere che gli innesti

destinati ad essere utilizzati in condizioni di flusso lento, come nel caso di innesti di piccolo calibro, dovrebbero preferibilmente avere un comportamento simile all'arteria per l'intervallo di pressioni più basse, piuttosto che più alte (14).

### 3.3. Porosità

Gli iniziali tentativi di sostituire porzioni di arterie con tubi di materiale solido resero subito chiaro che la porosità è un prerequisito per la pervietà dell'innesto, pertanto la valutazione della porosità strutturale degli innesti vascolari è divenuta una scelta importante. Gli sforzi volti a determinare i requisiti di porosità necessari alla guarigione del trapianto, tuttavia, sono complicati dalle caratteristiche specifiche del materiale, dalla sua unicità strutturale e dalle condizioni fisiopatologiche in cui si opera. La complessa struttura tridimensionale degli attuali innesti comprende una vasta gamma di pori di diverse dimensioni all'interno della matrice sintetica e questo difficilmente consente una definizione precisa degli spazi per la ricrescita delle cellule. I produttori di innesti sono soliti classificare la porosità come grado di permeabilità all'acqua; ad esempio, materiali come Dacron non sono solo definiti sulla base della maglia delle fibre di tipo *woven* o *knitted*, ma anche divisi in innesti ad elevata porosità (1500-4000 ml/cm<sup>2</sup>/min) e a bassa porosità (200-1000 ml/cm<sup>2</sup>/min). Lo stesso principio viene applicato al ePTFE sulla base delle distanze internodali. Tuttavia, anche se questi parametri di massima sono serviti come mezzo utile per caratterizzare i materiali, sono solo un indicatore limitato per la determinazione delle proprietà specifiche dell'innesto (4) (Figura 14).

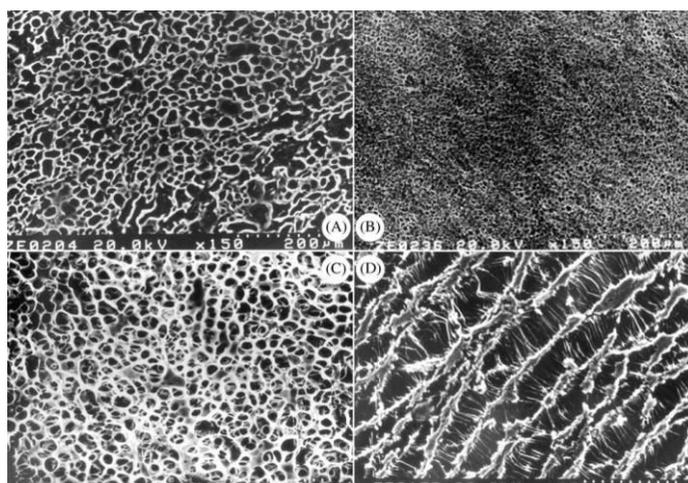


Figura 14 – La struttura microporosa di ePTFE e PU. A e B mostrano la superficie esterna di tipi differenti di innesto in PU. C e D mostrano la geometria interna di un innesto in PU e uno in ePTFE, rispettivamente.

I ricercatori sono stati a lungo perplessi sul perché gli spazi interstiziali di un innesto sono sufficientemente ampi per consentire a macrofagi e altre cellule infiammatorie di infiltrarsi, mentre le cellule del tessuto connettivo di simili dimensioni sono spesso assenti. Oggi si sa che alcune di queste cellule del connettivo, come le cellule muscolari lisce, seguono alla crescita di endotelio, pertanto la dimensione dei pori per una completa guarigione del trapianto è quella che permette la crescita sia dei capillari negli interstizi della protesi che di altre cellule. Poiché il diametro medio di una capillare è  $10\ \mu\text{m}$ , la superficie minima necessaria per la loro ricrescita sembra essere di almeno  $20\text{-}80\ \mu\text{m}^2$ . Il diametro di una arteriola funzionale, cioè completa di endotelio e almeno uno strato di cellule muscolari lisce, è di circa  $23.1 \pm 13.1\ \mu\text{m}$ . Oltre alla semplice superficie andrebbe anche considerato il diverso orientamento della muscolatura liscia nelle arterie e nelle vene, dovuto alle forze biomeccaniche che vengono esercitate (4).

Studi in laboratorio hanno segnalato che la completa rigenerazione cellulare di vasi di piccolo calibro in ePTFE avviene solo se la porosità del vaso è alta, così da poter permettere la crescita all'interno del vaso di capillari. L'influenza della porosità nel processo di rigenerazione cellulare è stato un argomento molto discusso e che ha raccolto pareri discordanti. Ci sono vari esperimenti che ipotizzano che la porosità

della parete esterna sia molto importante. Come esempio contrario, è stato effettuato uno studio su vasi di ePTFE di 2 mm di diametro sul coniglio. I vasi non solo erano divisi in innesti ad alta e bassa porosità, ma alcuni sono stati anche muniti di una membrana esterna in poliuretano impermeabile. Dopo due mesi non si sono registrati miglioramenti nei vasi più porosi rispetto a quelli meno porosi (15) (Figura 15). Questi risultati devono comunque da essere valutati con criticità, sia perché il modello animale differisce da quello umano (si veda il capitolo sull'endotelio), sia perché tali risultati sono stati ottenuti su innesti in ePTFE, che presenta una risposta ben differente rispetto ad altri materiali come il poliuretano, il quale presenta una distribuzione di pori geometricamente lontana da quella del Teflon.

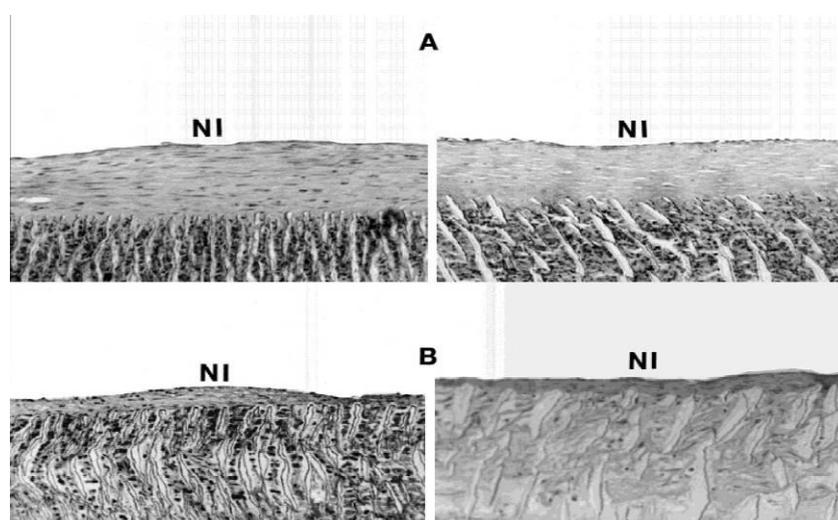


Figura 15 – Sezioni trasversali di 1 cm di campioni prelevati dopo 8 settimane dall'anastomosi prossimale di un innesto di carotide di topo in ePTFE standard (30  $\mu$ m IND, in alto a sinistra), ePTFE ad alta porosità (60  $\mu$ m IND, in alto a destra), PU standard (in basso a sinistra) e PU ad alta porosità (in basso a destra). La formazione di una neointima è uguale fra le diverse configurazioni di porosità dello stesso materiale.

Ulteriori approfondimenti sono stati compiuti in merito all'influenza dei pori presenti sulla superficie esterna dell'innesto sulla crescita di endotelio. L'esperimento è stato condotto in un periodo di 2 mesi sull'aorta addominale del topo utilizzando 32 innesti in poliuretano microporoso (Tecoflex), di diversa porosità esterna (5, 10, 20, 30  $\mu$ m denominati PU05, PU10, PU20, PU30, rispettivamente) e 8 in ePTFE (30  $\mu$ m IND),

utilizzati come riferimento. La superficie luminale per tutti gli innesti in PU era di 30  $\mu\text{m}$ , in modo da rendere il confronto indipendente da questo parametro. Le protesi sono state in seguito analizzate istologicamente e morfologicamente e sono stati quantificati il progresso della crescita di endotelio e il grado di infiltrazione dei tessuti della regione perimplantare. Tutte le protesi hanno mostrato una rapida crescita delle cellule endoteliali nella seconda settimana, dove le protesi in PU con dimensione dei pori esterni di 30  $\mu\text{m}$  hanno mostrato il tasso di crescita più alto; sempre durante la seconda settimana il tessuto perimplantare è cresciuto significativamente nella struttura protesica. La neointima, il cui ispessimento era prevalentemente situato nelle vicinanze delle anastomosi prossimali di alcune delle protesi in PU, non ha denotato apparentemente alcun rapporto con il grado di infiltrazione del tessuto perimplantare. Nelle protesi in PU uno strato completo di cellule endoteliali si è formato entro la fine della quarta settimana. Le protesi in ePTFE, invece, hanno mostrato una crescita interna di neointima molto limitata ed una copertura incompleta di cellule endoteliali. Si conclude che, per promuovere una crescita di tessuto la più rapida possibile, sono indicati gli innesti in PU30, ovvero quelli con la porosità maggiore, e che le differenze fra poliuretano e ePTFE in termini di porosità superficiale influenzano in maniera significativa questa crescita (16) (Figura 16).

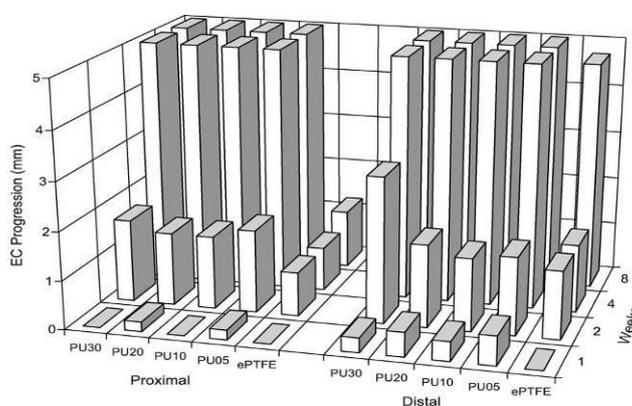


Figura 16 – Sviluppo delle cellule endoteliali in funzione del tempo a partire dalle zone di anastomosi.

Numerose osservazioni sperimentali hanno dimostrato l'importanza della microgeometria della superficie interna degli innesti e la sua influenza sul tasso di pervietà e sulla capacità di indurre la formazione di trombi. Questa ipotesi si basa su precedenti osservazioni sperimentali *in vivo* effettuate su innesti impiantati nell'aorta addominale del topo. In particolare, è stato dimostrato che una parete dell'innesto ad elevata porosità è meno trombogena di una a bassa porosità (7).

Con riferimento a tali risultati, recentemente sono stati realizzati alcuni innesti vascolari di piccolo calibro con diverse microgeometrie superficiali interne, utilizzando uno strumento denominato *Spray-Machine* che consente la produzione di innesti ad alta e bassa porosità della superficie luminale, con differenti concentrazioni di soluzione polimerica (0.2 %, 0.5% e 1.5, 2.0 %, rispettivamente). Per la realizzazione di questi innesti di 10 cm di lunghezza è stato scelto il Cardiothane-51 (CA), composto dal 10 % di polidimetilsilossano e 90 % di polietere-poliuretano, perché può essere facilmente elaborato ed ha soddisfacenti proprietà fisiche e buona biocompatibilità. Gli innesti sono stati poi inseriti in un circuito artificiale per simulare la circolazione del corpo, utilizzando sangue umano: dai risultati ottenuti è emerso che gli innesti con le due maggiori porosità hanno catturato una minore quantità di piastrine rispetto ai due con porosità più basse (7) (Figura 17).

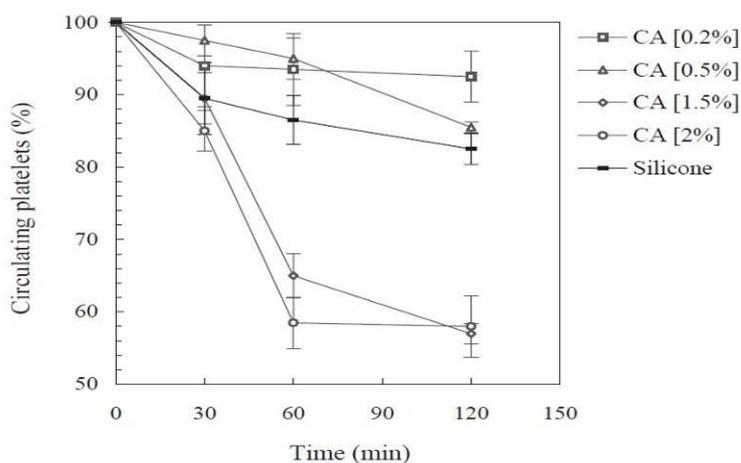


Figura 17 – Percentuali di piastrine circolanti negli innesti in silicone e CA, per diverse concentrazioni del polimero, rilevate nel tempo (30, 60, 120 minuti). Il numero di piastrine iniziale è stato posto al 100 %.

In questo studio *in vitro* è stato quindi dimostrato che un innesto di piccolo calibro con un lume ad alta porosità ha una migliore emocompatibilità di uno a bassa porosità, perché, grazie alla configurazione della superficie luminale, permette minore adesione piastrinica e immissione di  $\beta$ -TG (tromboglobulina- $\beta$ ) nel plasma. Pertanto, innesti realizzati con la stessa composizione chimica possono interagire con il sangue in modi diversi in relazione alla porosità della superficie interna.

### 3.4. Trattamento dell'innesto

La possibilità di applicare un rivestimento alla parete luminale dell'innesto si è tradotta nell'uso di svariati materiali e sostanze, sia inerti che non, che vanno dal silicone, al carbonio pirolitico, fino all'eparina. In generale, questi procedimenti variano da innesto a innesto secondo la tipologia del materiale in cui sono fabbricati, dato che con esso cambia il legame chimico che viene a crearsi fra copertura e parete dell'innesto.

Nonostante tali differenze, l'eparina rimane comunque la sostanza più impiegata per migliorare le prestazioni di un innesto. Per gli altri trattamenti si rinvia al capitolo sui materiali per un'analisi più specifica.

Nell'ambito dell'utilizzo di anticoagulanti e agenti antitrombotici il più indagato è sicuramente l'eparina, un glicosamminoglicano altamente solfato, ampiamente utilizzato come farmaco iniettabile (Figura 18).

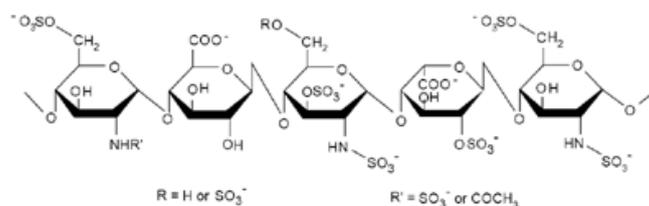


Figura 18 – Formula chimica dell'eparina.

Questo agente farmacologico ha la più alta densità di carica negativa tra tutte le biomolecole conosciute e ha ricevuto grande attenzione come mezzo per ridurre l'iperplasia intimale e la formazione di trombi. Simili benefici su superfici trattate con questo farmaco sono stati dimostrati in vari dispositivi clinici, compresi i filtri per emodialisi, stent intravascolari e circuiterie di by-pass cardiopolmonari (12).

L'eparina è un potente anticoagulante che agisce principalmente inibendo la trombina e i fattori della coagulazione IX, X, XI e XII, che sono coinvolti nella conversione della protrombina in trombina, riducendo così la formazione di trombina; oltre a questo ha un potente effetto antiproliferativo sulle cellule vascolari muscolari lisce e questa proprietà è indipendente dalla sua attività anticoagulante. Quest'ultimo effetto è in parte mediato attraverso le interazioni con i recettori cellulari, i fattori di crescita e gli inibitori delle proteasi. Le attività antiproliferative dell'eparina per le cellule della muscolatura liscia sono state dimostrate nei seguenti modelli: babuino, uomo, topo e bovino. Anche numerosi studi *in vitro* hanno dimostrato l'effetto inibitorio dell'eparina sulla proliferazione delle cellule muscolari lisce in coltura: scoraggia la sintesi del DNA e limita la trascrizione del gene necessario per il passaggio delle cellule da una fase del ciclo cellulare all'altra, diminuendone così il tasso di riproduzione. Diversi studi hanno scoperto ulteriori possibili meccanismi con cui l'eparina limita la proliferazione neointimale; l'eparina inibisce sia l'attività della proteina chinasi durante trasduzione di un segnale che la trascrizione degli attivatori delle proteine, può modulare la funzione e l'espressione di molteplici fattori di crescita, come il fattore di crescita dei fibroblasti di base (bFGF), regolare l'espressione del recettore del fattore di crescita epidermico e potenziare le proprietà inibitorie del fattore di crescita  $\beta$ -trasformante. Essa inibisce selettivamente anche la produzione di proteasi che sono determinanti per degradare la matrice extracellulare e ridurre così la proliferazione delle cellule (12) (Figura 19).

	Noncoated control (mm <sup>2</sup> )	Heparin-coated graft (mm <sup>2</sup> )
Graft neointima (BrdU%)	5.92 ± 0.68	3.12 ± 0.32
Vessel neointima (BrdU%)	3.42 ± 0.32	3.82 ± 0.54

Figura 19 – Effetto dell’eparina sulla proliferazione neointimale negli innesti in ePTFE nel modello canino. In tabella viene mostrata l’estensione superficiale di neointima (il metodo prevede un conteggio della numerosità delle cellule bromodeossiridina).

Tutti questi risultati suggeriscono che l’eparina svolge un ruolo fondamentale nella modulazione della migrazione delle cellule muscolari lisce e nella proliferazione neointimale attraverso una complessa cascata biochimica e cellulare. Di conseguenza, sono stati sviluppati nuovi trattamenti con eparina degli innesti di piccolo calibro per migliorarne pervietà e risultato clinico.

## 4. MATERIALI

I due polimeri prevalentemente utilizzati in ambito clinico per innesti di grande diametro sono Dacron e PTFE i quali, però, mostrano alcuni severi limiti nelle applicazioni di piccolo calibro. Per questo motivo la ricerca ha spinto verso il miglioramento di questi polimeri e l’utilizzo di nuovi materiali.

### 4.1. Dacron

#### 4.1.1. Introduzione

Il polietilene tereftalato in forma di Dacron è attualmente uno dei materiali di riferimento in ambito di chirurgia vascolare. Il PET fu introdotto nel 1939; successivamente DuPont sviluppò e brevettò la ben nota fibra di Dacron nel 1950 e sette anni dopo fu utilizzato nella prima operazione di innesto vascolare (2).

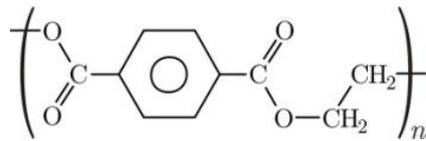


Figura 20 – Formula chimica del PET.

I vasi in Dacron disponibili sul mercato sono fabbricati nella loro forma “*woven*” (tessuto intrecciato regolare a righe verticali e orizzontali) o “*knitted*” (tessuto lavorato a maglia con trama "ad anelli") (Figura 21).

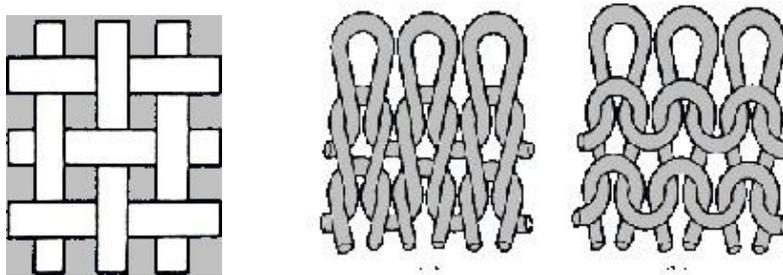


Figura 21 – Tessitura *woven* (a sinistra) e *knitted* (a destra).

A causa di questa differenza, i secondi posseggono migliore resistenza a sfilacciarsi e la possibilità di allungarsi in senso longitudinale, permettendo quindi di compensare un eventuale peggioramento delle condizioni o l’adesione sulla superficie esterna da parte delle cellule del tessuto circostante, anche perché gli interstizi fra i filamenti sono di diametro maggiore rispetto al Dacron *woven* (17). Alla filatura vengo spesso applicate tecniche particolari per migliorarne le caratteristiche, come ad esempio favorire flessibilità, estensibilità e per evitare la formazione di nodi. Inoltre vengono applicati alla superficie esterna del vaso anelli o spirali per resistere ad un’eventuale compressione ed evitare che l’innesto si contorca su se stesso (2).

Le caratteristiche del *knitted* Dacron ne hanno decretato una diffusione leggermente maggiore nelle sale operatorie rispetto alla forma *woven*, che rimane

comunque preferita da alcuni chirurghi per la grande resistenza alla rottura e alla deformazione e per la bassa permeabilità ai liquidi (4).

In generale il Dacron possiede buona biostabilità e può resistere per più di dieci anni dopo l'operazione senza subire particolare deterioramento, a parte la tendenza a dilatarsi nel caso di impianti aortici (condizione di rilevanza clinica trascurabile) (2).

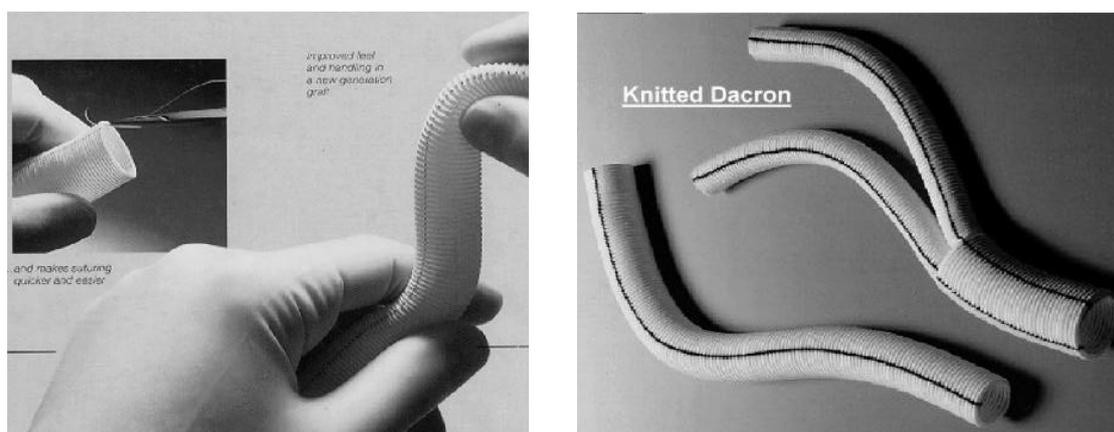


Figura 22 – Innesti in Dacron *woven* (sinistra) e *knitted* (destra).

#### 4.1.2. Trattamenti preimpianto

In merito ai trattamenti a cui sono sottoposti gli innesti prima dell'impianto, gli innesti in Dacron necessitano di un discorso a parte, in quanto, a differenza di quelli in altri materiali, non sono pronti ad essere utilizzati immediatamente dopo la produzione. Come già accennato i vasi in Dacron, soprattutto *knitted*, sono molto porosi; l'innesto deve essere quindi sottoposto ad un trattamento di presigillamento con il sangue del paziente per evitarne la fuoriuscita dalle pareti una volta in situ. Considerati i rischi di trombogenicità, spesso i vasi in commercio sono presigillati con proteine, come collagene e gelatina (che vengono riassorbiti nel giro di due settimane circa) o albumina (riassorbita in due mesi), legati covalentemente al vaso attraverso glutaraldeide, formaldeide o carbodiimmidi. Un esempio di tale applicazione sono gli innesti in Hemashield, sigillati attraverso collagene. Questi metodi, anche se efficaci,

creano una superficie che è soggetta a biodegradazione scarsamente controllabile, dipendente dalla risposta fisiologica, che varia da soggetto a soggetto, e dal tipo di proteina utilizzata (17). Ulteriori ricerche sono state indirizzate a trovare un sostituto di queste proteine: sono stati impiegati dei polimeri come poliuretano e silicone che però, anche se superiori nel sigillare gli interstizi, non migliorano ricorrenti complicazioni come trombosi e iperplasia intimale, probabilmente perché non cambiano le modalità di interazione fra tessuto e protesi. Il Dacron sigillato con poliuretano contenente all'interno della catena polimerica gruppi carbossilici, invece, interagisce con gli agenti biologici presenti nel sangue ed ha quindi migliori prestazioni *in vivo* (17).

Sono disponibili sul mercato anche vasi in Dacron trattati con eparina, principalmente legata alla superficie luminale del vaso con legami di tipo elettrostatico; la fibra sintetica deve essere opportunamente pretrattata per accogliere l'anticoagulante. Questi vasi hanno prestazioni leggermente superiori a quelli non trattati (2), purtroppo però non sono ancora soddisfacenti per applicazioni di vasi di piccolo calibro che continuano ad ostruirsi in poco tempo.

### **4.1.3. Risposta *in vivo***

#### ***Woven Dacron***

Per quanto riguarda il Dacron di tipo *woven*, immediatamente dopo l'impianto un sottile strato di fibrina, eritrociti, globuli bianchi e piastrine viene depositato sulla superficie interna della protesi a contatto col sangue. Durante i primi giorni questo strato trombotico si ispessisce lentamente fino a raggiungere l'equilibrio in una densa capsula di fibrina e si stabilizza dopo 18 mesi (nell'uomo); la fibrina riempie istantaneamente anche gli interstizi della parete dell'innesto e lo spazio tra innesto e tessuto circostante. All'interfaccia tra questa capsula fibrosa e i filamenti di Dacron comincia a sopraggiungere un numero variabile di macrofagi e successivamente alcuni capillari e fibroblasti iniziano a crescere negli spazi interstiziali. Questo processo è molto variabile nella sua estensione temporale e in intensità: nell'uomo può essere

osservato dopo circa 5 mesi oppure può anche non verificarsi. In via eccezionale ed in ristrette aree dell'innesto il tessuto raggiunge la capsula interna di fibrina e comincia a riorganizzare la base della capsula fibrosa. In un ancor minor numero di casi, queste aree di tessuto sostituiscono la fibrina della capsula nel suo intero spessore per formare una pseudo-intima. Sia che questa si formi o che permanga il solo strato di fibrina, entrambi raggiungono solitamente un equilibrio ad uno spessore di circa 400-500  $\mu\text{m}$ . In genere non si trovano cellule endoteliali nei primi due anni, ma dopo un impianto prolungato (più di undici anni) possono occasionalmente apparire piccole aree di EC sullo strato di fibrina.

Concludendo, la crescita interna di tessuto è molto limitata nel Dacron di tipo *woven* e raramente penetra nella parete interna. In più, anche se si estende alla capsula interna, molto difficilmente riesce a superare la compatta barriera di fibrina per raggiungere la superficie del sangue anche dopo decenni dall'impianto (4).

### ***Knitted Dacron***

Il Dacron di tipo *knitted* si comporta in maniera simile: un reticolo superficie di fibrina, globuli bianchi, eritrociti e piastrine aumenta fino a 100-500  $\mu\text{m}$  stabilizzandosi prima della fine del sesto mese di impianto. Anche se la maggioranza degli studi descrive la formazione sulla superficie dell'innesto di un endotelio maturo e di uno strato di muscolatura liscia ben sviluppata, come già accennato la lunghezza dell'innesto e il periodo di impianto di questi studi rendono quasi certo che il neotessuto non rappresenti altro che un'estensione della TAE. Questo sospetto è confermato da descrizioni di ricerche svolte su regioni realmente lontane dalle anastomosi, che infatti rimangono senza endotelio, e dove la capsula fibrosa interna sembra essere impenetrabile per il tessuto interstiziale. Molto raramente, però, si può assistere ad una completa endotelizzazione di protesi anche molto lunghe, tuttavia non è ancora chiaro da dove provengano le cellule. Anche se avvengono sporadiche crescite di tessuto endoteliale, queste si verificano in aree limitate e quindi la maggior parte della superficie dell'innesto rimane ricoperta dalla sola fibrina. Dopo l'impianto,

la parte esterna dell'innesto viene presto circondata da macrofagi e viene poi coperta da una capsula di tessuto connettivo; nello spazio fra queste crescono numerosi capillari che però rimangono confinati in questa zona (4).

In sintesi, la porosità della maglia di fibre permette un certo grado di crescita interna di tessuto dall'esterno. Allo stesso tempo, però, sembra che la capsula interna di fibrina rappresenti una barriera invalicabile per la crescita di tessuto connettivo trasmurale e per i capillari esterni, indipendentemente dal fatto che l'innesto sia di tipo *woven* o *knitted*. Inoltre, è anche interessante il fatto che la fibrina che copre gli innesti di Dacron sembra avere una maggiore propensione a catturare le cellule del sangue rispetto a quella sugli innesti in ePTFE. Le piccole isole di cellule endoteliali che si formano spesso poggiano su strati muscolari ugualmente isolati, ma il raro e tardivo manifestarsi del fenomeno lo rendono piuttosto irrilevante nel processo di guarigione (4).

## 4.2. Teflon

### 4.2.1. Introduzione

Il PTFE è stato brevettato da DuPont nel 1937 con il nome commerciale di Teflon. Grazie alle sue particolari caratteristiche che lo rendono particolarmente inerte, è stato ritenuto un isolante elettrico ideale. Il suo uso medico è iniziato con l'applicazione nelle valvole cardiache artificiali nel 1960. La macromolecola di PTFE è biostabile e perciò l'innesto non subisce deterioramento biologico all'interno il corpo. La superficie della protesi è elettronegativa e ciò minimizza la sua reazione con i componenti del sangue (2).

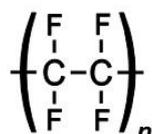


Figura 23 – Formula chimica del politetrafluoroetilene.

Nel 1969, Gore brevettò il PTFE espanso (Gore-tex) che è il materiale attualmente utilizzato negli innesti vascolari. Il polimero espanso è ottenuto attraverso un procedimento di estrusione, riscaldamento e successivo stiramento fino ad arrivare ad un materiale microporoso; gli innesti in ePTFE sono prodotti attraverso l'allungamento di un cilindro di materiale fuso che viene espanso successivamente (2).

Gli innesti in ePTFE sono costituiti da membrane solide e sottili, di forma irregolare, allineate a formare un cerchio (i cosiddetti nodi) e da un fitto reticolo di fini fibrille poste tra di esse. Anche se la porosità degli innesti in ePTFE è tradizionalmente definita sulla base della distanza tra i nodi (IND, *internodal distance*), la dimensione effettiva dei vuoti all'interno del parete protesica è la misura dei pori tra le fibrille, perciò gli spazi disponibili alla crescita di cellule all'interno dell'innesto sono molto più piccoli di quanto il parametro IND suggerisca (Figura24).

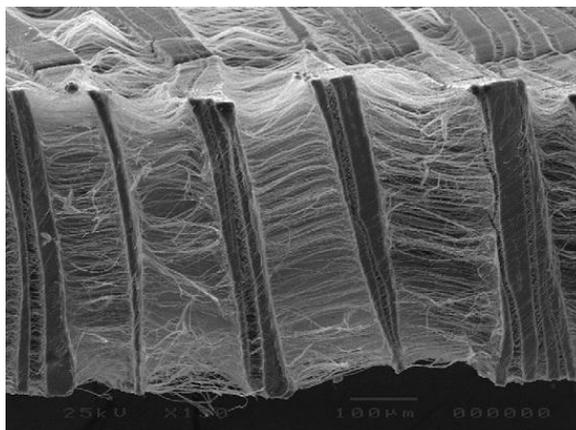


Figura 24 – Immagine SEM della sezione trasversale di un innesto in ePTFE con distanza internodale (IND) pari a 150 μm. Si può notare come gli spazi per la crescita di tessuto non siano proporzionali alla IND, ma piuttosto allo spazio fra le fibrille.

Il processo di espansione del Teflon nella sua tipica struttura nodo-fibrillare permette una vasta gamma di IND, ma fra queste diverse configurazioni le dimensioni degli spazi per la crescita interna sono molto simili.

Con punti di ancoraggio fissi e un materiale rigido come il Teflon, la distribuzione delle fibrille è limitata, rendendo così sproporzionati gli aumenti di IND necessari a

conseguire un moderato aumento degli spazi riservati alla crescita all'interno dell'innesto (spesso pochi micrometri). A parte le differenze di lunghezza tra le fibrille di innesti della stessa categoria ma di diametro diverso (ad esempio, 24.3 o 20.7  $\mu\text{m}$  per innesti di 6 e 10 millimetri), ci sono evidenti differenze anche fra IND di innesti da 30  $\mu\text{m}$  a seconda del costruttore (ad esempio  $17.8 \pm 5.6 \mu\text{m}$  contro  $23.8 \pm 6.2 \mu\text{m}$  per i due leader di mercato, rispettivamente). Inoltre gli spazi continui per la crescita interna di tessuto transmurale negli innesti a bassa porosità (IND di 30  $\mu\text{m}$ ) diminuiscono di dimensioni nei primi dieci strati di fibrille su un numero complessivo di circa 2000 strati di spessore della parete. Questo è dovuto all'ostruzione casuale degli spazi interfibrillari provocata da un accoppiamento non ottimale fra uno strato di fibrille e il successivo. Le dimensioni dei canali a disposizione non sarebbero pertanto sufficienti ad ospitare capillari già a partire dal livello 200 in poi, l'equivalente di un decimo dello spessore totale. Negli innesti in ePTFE ad alta porosità (IND di 60  $\mu\text{m}$ ), al contrario, la capillarizzazione transmurale sarebbe consentita dal 100 % degli spazi interni e persino alcune arteriole sarebbero in grado di raggiungere la superficie luminale (4).

Anche prima che questi dati fossero disponibili era già emerso empiricamente un simile livello minimo di porosità sotto cui la crescita interna di tessuto non è possibile. Nonostante le differenze tra produttore e produttore, questo livello è stato identificato all'interno di un intervallo relativamente ristretto, tra i 30 e 45  $\mu\text{m}$  di IND circa. Pertanto, è diventato di uso comune riferirsi agli innesti con un IND inferiore o uguale a 30  $\mu\text{m}$  come innesti "a bassa porosità" ed a quelli con IND maggiore di 45  $\mu\text{m}$  come innesti "ad alta porosità". Questa distinzione naturalmente non vale nel caso in cui il costruttore aggiunga un involucro esterno impenetrabile (4).

#### **4.2.2. Trattamenti preimpianto**

Diverse modifiche all'innesto di base sono state proposte per migliorarne la funzione: uno è quello di aumentare la permeabilità dell'innesto, dato che il tasso di crescita interna di tessuto è associato ad una limitata gamma di porosità e che la crescita di capillari transmurali può fornire la fonte di cellule per l'endotelizzazione

della superficie. Nonostante nel babuino e nel cane siano stati ottenuti risultati positivi, l'utilizzo di innesti in ePTFE ad alta porosità non ha dimostrato alcun vantaggio per quanto riguarda la deposizione di piastrine rispetto a quelli di IND standard di 30  $\mu\text{m}$  (2).

Per aumentarne l'elettronegatività, è stato legato alla superficie luminale dell'innesto un rivestimento di carbonio pirolitico, in modo da diminuire la formazione di trombi; i primi studi hanno dimostrato che in questo modo la deposizione piastrinica viene ridotta, ma i tassi di pervietà globale non sono migliorati rispetto a quelli degli innesti non rivestiti. Successivamente un rapporto del 2002 su uno studio effettuato in Europa sugli innesti in ePTFE rivestiti da carbonio per bypass intrainguinale ha invece dimostrato un miglior tasso di pervietà e trombogenesi decisamente più limitata rispetto agli innesti in ePTFE standard al secondo anno di impianto (2).

Si è già a conoscenza del fatto che il ePTFE possiede molecole idrofobiche e questo è anche un motivo della sua buona emocompatibilità. È stata dunque indagata una modifica su innesti di piccolo calibro per rendere la superficie ancora più idrofobica, ma i risultati ottenuti nel coniglio e nel maiale segnalano un generale peggioramento: la formazione di neointima è molto simile, ma la deposizione piastrinica è maggiore nell'innesto trattato (18) (Figura 25).

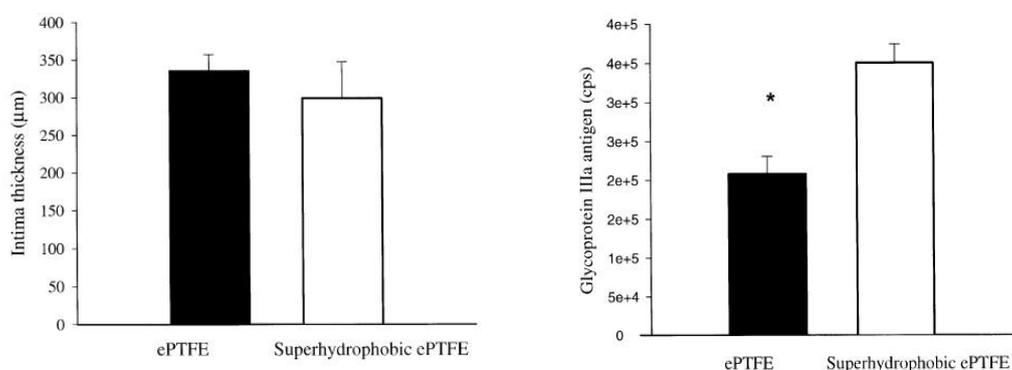


Figura 25 – A confronto spessore della neointima (a sinistra) e deposizione piastrinica (a destra, misurata in conteggi al secondo, cps) in un innesto in ePTFE trattato con sostanza idrofobica e uno in ePTFE standard.

Diverse sostanze bioattive sono state integrate negli innesti in ePTFE per migliorare il processo di guarigione. È stata utilizzata la colla di fibrina (FG) al fine di rilasciare lentamente fattori di crescita e conservare allo stesso momento le loro proprietà (come il fattore di crescita dei fibroblasti, delle piastrine e delle cellule dell'endotelio), e sostanze come eparina e perlecano (2).

L'eparina viene legata alla superficie luminale del vaso in ePTFE. Quest'operazione ha dimostrato di poter ridurre la formazione di trombi e migliorare la pervietà già dopo 8 settimane rispetto ad un innesto in ePTFE standard nel topo (2). Anche nel modello canino sono stati ottenuti interessanti risultati: alcuni innesti di piccolo diametro in ePTFE rivestiti di carbonio pirolitico sono stati cosparsi con seleparina, un analogo dell'eparina, con simili proprietà anticoagulanti. Questi vasi hanno dimostrato un migliorato tasso di pervietà rispetto agli innesti standard e migliore resistenza alla formazione di trombi (19) (Figura 26). Lo stesso risultato è stato ottenuto utilizzando la tecnologia di superficie bioattiva Carmeda per legare eparina al ePTFE (e mantenerne la bioattività nel tempo) (20) (Figura 27). Sempre nel modello canino già dopo 24 ore la deposizione di piastrine su un innesto in ePTFE all'arteria femorale era minore del 72 % rispetto all'innesto non trattato e l'iperplasia era molto più contenuta (12) (Figura 28).

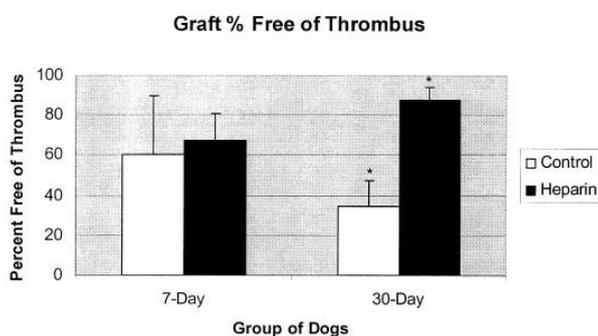


Figura 26 – Percentuale della superficie dell'innesto in ePTFE priva di trombi.

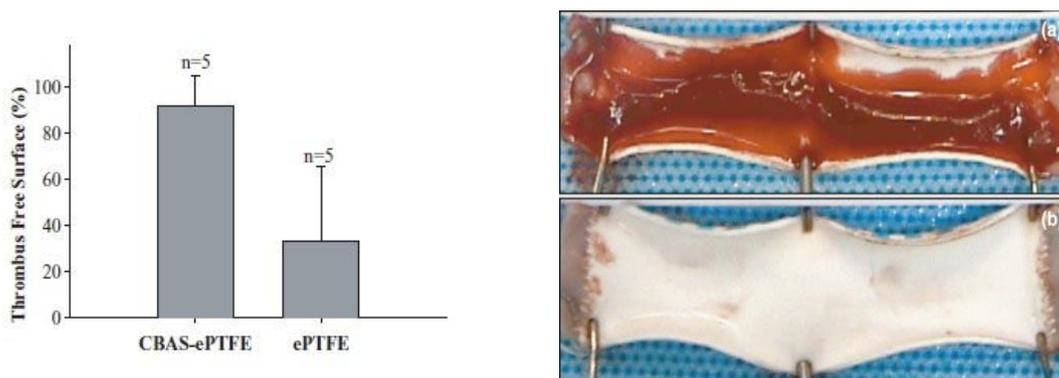


Figura 27 –Innesto in ePTFE trattato con eparina e non, nell’arteria carotide (modello canino, dopo 2 ore). A sinistra è mostrata la percentuale di innesto priva di trombi per le due tipologie di innesto. A destra si vede come la superficie luminale dell’innesto in ePTFE standard (sopra) sia ricoperta da trombi, mentre l’innesto trattato (sotto) ne sia quasi del tutto privo.

	Platelet deposition in noncoated control ( $\times 10^9$ )	Platelet deposition in heparin-coated graft ( $\times 10^9$ )	% Reduction
30 minutes	$0.32 \pm 0.05$	$0.29 \pm 0.07$	9%
60 minutes	$0.38 \pm 0.04$	$0.35 \pm 0.08$	8%
90 minutes	$0.42 \pm 0.07$	$0.39 \pm 0.11$	7%
24 hours	$5.12 \pm 0.81$	$1.43 \pm 0.09$	72%

Figura 28 – Confronto fra deposizione piastrinica su un innesto in ePTFE standard e uno trattato con eparina, valutata nel tempo (30, 60, 90 min e 24 h). In figura è mostrata la relativa riduzione percentuale.

Siccome l’eparina legata ai vasi sintetici ha prodotto risultati favorevoli nel modello animale, già qualche anno fa è stato commercializzato un innesto di piccolo calibro in ePTFE con rivestimento in eparina a lungo termine. È stata quindi testata la sua efficacia in laboratorio, per la prima volta sul sangue umano. Nelle prime ore nessuna traccia di piastrine o fibrina è stata trovata sugli innesti trattati, in contrasto con quanto avvenuto per gli innesti in ePTFE standard, dimostrando quindi una ridotta propensione alla trombogenesi da parte dei nuovi vasi sotto test (9)

Due potenziale meccanismi possono essere responsabili del calo di trombogenesi degli innesti eparinizzati. In primo luogo, l’eparina riduce la formazione della trombina a causa dell’inibizione della coagulazione. Come risultato, sia la formazione di fibrina che l’attivazione piastrinica mediata dalla trombina vengono diminuiti. In secondo

luogo, la superficie presenta carica negativa e questo impedisce una diretta interazione fra piastrine ed innesto a causa della repulsione elettrostatica, dato che la carica netta delle piastrine è anch'essa negativa (9).

Il primo studio a dimostrare che un proteoglicano naturale come il perlecano, abbondante nella membrana cellulare, possa essere utile per applicazioni nei vasi di piccolo calibro è recentissima. Per la dimostrazione è stato utilizzato un vaso in ePTFE trattato con perlecano in un modello carotideo di pecora, in cinque soggetti. Dopo sei settimane l'innesto è stato rimosso per valutare adesione superficiale di piastrine e cellule. Il perlecano ha mostrato di giocare un ruolo importante nella crescita di nuovo tessuto grazie alle sue catene ad eparansolfato (HS) che legano e modulano il rilascio di alcuni fattori della crescita. Attraverso questo legame e proteggendo i fattori di crescita dalla degradazione, il perlecano riesce a interagire con le molecole di adesione e i recettori superficiali delle cellule, stabilendo un significativo effetto modulante sull'angiogenesi e la crescita endoteliale. È stato infatti osservato un aumento nella copertura della superficie di ePTFE trattata con perlecano rispetto ai vasi standard, indicando così che questa sostanza può promuovere l'endotelizzazione di materiali protesici vascolari. Questo aumento è stato particolarmente evidente nella parte centrale degli innesti, regione che normalmente rimane priva di qualsiasi tessuto (21) (Figura 29).

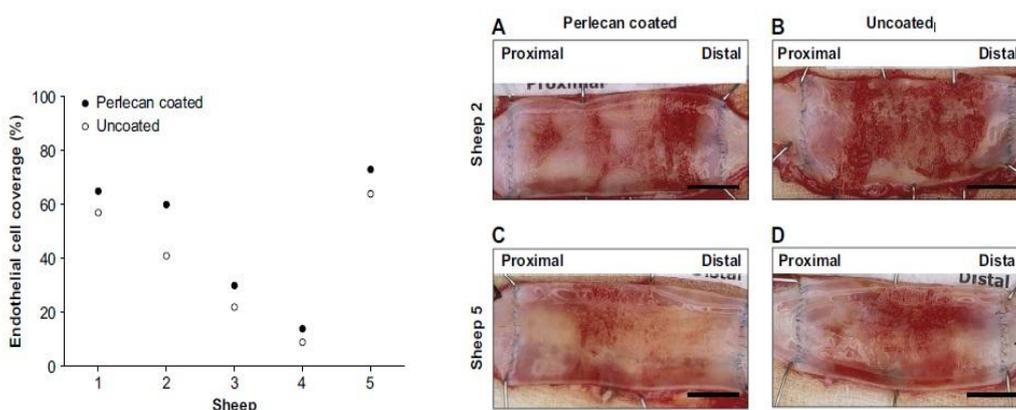


Figura 29 – Esperimento effettuato su 5 pecore con innesti in ePTFE standard e ricoperti da perlecano. La figura di sinistra mostra la percentuale di innesto coperta da endotelio. A destra si può osservare la stessa cosa visivamente nelle pecore 2 e 5.

Clinicamente, la chiusura degli innesti è dovuta alla formazione di trombi che deriva dalle variazioni di flusso laminare del sangue che passa attraverso il trapianto. Queste perturbazioni del flusso provocano l'attivazione delle piastrine che aderiscono alla superficie, promuovendo la formazione di trombi. Oltre a svolgere un ruolo nella stimolazione della crescita delle cellule endoteliali, il perlecano funziona anche come antiadesivo per le piastrine, proprietà modulata attraverso catene di HS. Data la struttura analoga di eparina e HS, è ragionevole ipotizzare che forniscano un meccanismo antitrombotico analogo.

Concludendo, le caratteristiche del perlecano, insieme ai confortanti risultati sperimentali, suggeriscono che può essere una componente utile per il miglioramento degli innesti di piccolo diametro al fine di fornire un'efficace riparazione del vaso.

### **4.2.3. Risposta *in vivo***

#### **ePTFE a bassa porosità (IND <30 µm)**

Le risposte degli innesti in ePTFE a bassa porosità sono molto simili fra loro, anche quando gli organismi riceventi il bypass appartengono a specie diverse. Durante le prime due settimane di impianto sulla superficie a contatto col sangue viene a formarsi un sottile strato di fibrina spesso circa 10-20 µm. Nelle settimane successive lo spessore di questo strato rimane costante, ma la sua composizione diventa più diversificata comprendendo fibrina acellulare compattata o libera e strati di piastrine intervallati da granulociti. Anche dopo prolungati periodi di osservazione, la regione centrale dell'innesto manca di ogni forma di copertura cellulare; allo stesso modo, non c'è crescita interna di tessuto transmurale. Durante le prime due settimane di impianto, la maggior parte degli interstizi della parete protesica sono privi di qualsiasi organismo, dopo un'altra settimana fanno la loro comparsa i macrofagi. Infine, a sei settimane dall'impianto, gli interstizi cominciano ad essere invasi dall'esterno da cellule del tessuto connettivo, ma anche dopo sei mesi la crescita interna del connettivo non è praticamente proseguita, rimanendo per lo più limitata alla parte esterna della parete della protesi, accompagnata da un ristretto numero di capillari (4).

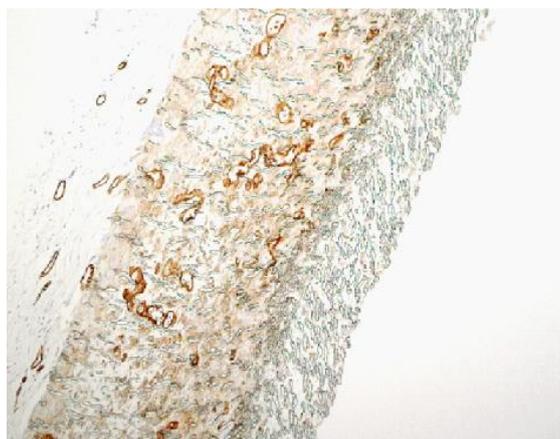


Figura 30 – Dimostrazione della dipendenza della crescita interna di capillari dagli spazi interfibrillari in un innesto in ePTFE con parete per 2/3 ad alta porosità e a bassa porosità nel 1/3 più interno (modello di babbuino).

#### **ePTFE ad alta porosità (IND >45 $\mu\text{m}$ )**

Contrariamente a quanto avviene negli innesti in ePTFE a bassa porosità, vi è una netta differenza fra le risposte in vivo dei vari modelli animali, in particolare per quanto riguarda la tempistica degli eventi. Inizialmente, un sottile strato di fibrina o uno strato amorfo di proteine ricopre buona parte dell'innesto e coesiste accanto alle zone scoperte, dove rimane visibile la struttura nodale. Un po' per volta la fibrina comincia ad attirare sulla sua superficie globuli bianchi e piastrine, mentre in profondità continua ad essere priva di cellule ad eccezione di qualche macrofago. Sotto questi macrofagi la fibrina che riempie gli interstizi del ePTFE inizialmente è acellulare, ma col tempo diventa sempre più popolata da macrofagi e leucociti, in particolare nel terzo esterno della parete del vaso sintetico. Dopo un periodo che nei modelli animali è stato stimato durare da un paio di settimane fino a mesi in dipendenza delle specie e dell'età, piccoli capillari iniziano a penetrare la parte più esterna della parete dell'innesto. Si riscontra ora la presenza di fibroblasti, ma la maggior parte degli interstizi rimane comunque occupata da macrofagi. I microvasi presto si sviluppano in arteriole mature: esse sono di piccolo diametro ( $23 \pm 13 \mu\text{m}$ ) e sono spesso accompagnate da almeno uno strato di cellule muscolari lisce. Questo processo richiede mesi nei modelli animali senescenti, per contro si compie nel corso

della seconda settimana di impianto in un giovane babbuino giallo. In questo caso appaiono piccole zone di cellule endoteliali sulla superficie a contatto col sangue e l'afflusso di sangue è spesso raggiunto prima della terza o quarta settimana di impianto. Dopo che l'endotelio si è formato iniziano a svilupparsi periciti e cellule muscolari lisce grazie al rilascio del fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF) (4).

## 4.3. Poliuretani

### 4.3.1. Introduzione

La categoria di materiali polimerici che oggi raccoglie maggior consenso ed attenzione è quella dei poliuretani, grazie alla grande versatilità strutturale, facilità di lavorazione e alle ottime proprietà elastomeriche che permettono di costruire innesti tubulari di piccolo calibro con modulate ed opportune caratteristiche chimico-fisiche, di compliance radiale (che Dacron e Teflon non possiedono) e di emocompatibilità.

I poliuretani (PU) sono stati originariamente sviluppati in Germania negli anni Trenta come rivestimenti superficiali, schiume e adesivi. Dal 1960 ne è iniziata la diffusione; Lycra è il nome commerciale di uno dei primi poliuretano segmentati, commercializzato nel 1962 da DuPont.

Il PU è stato usato per la prima volta come biomateriale nella produzione di pompe impiantabili, dispositivi di assistenza ventricolare e rivestimenti per i primi cuori artificiali e le buone proprietà ne hanno fatto un materiale interessante anche per gli innesti vascolari (2).

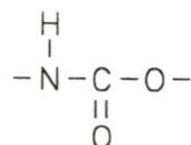


Figura 31- Formula chimica del gruppo uretano.

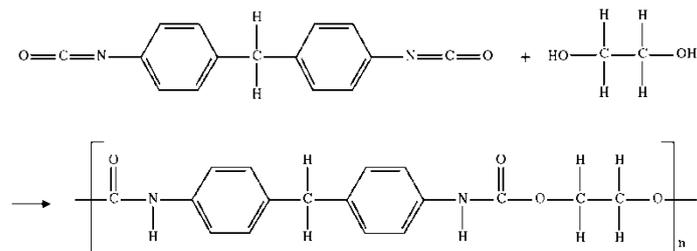


Figura 32 – Esempio di sintesi del poliuretano.

I poliuretani comprendono una famiglia molto ampia di polimeri, il cui attributo essenziale è la presenza del gruppo uretano [-NH(CO)O-] (Figure 31 e 32), risultato della reazione di un gruppo isocianato con un gruppo alcolico, presente in alcune delle sequenze che si ripetono nella catena principale. I poliuretani sono in genere copolimeri a blocchi o a segmenti costituiti da due fasi, una meno rigida dell'altra (*soft segment* e *hard segment*, rispettivamente) (Figura 33); il rapporto in peso tra le due fasi determina le caratteristiche meccaniche del polimero. L'hard segment consiste nel prodotto di reazione fra un diisocianato e un diolo e/o una diammina, mentre il soft segment è derivato da un macromonomero il cui peso molecolare varia da diverse centinaia a oltre un migliaio di Dalton. L'incompatibilità tra le due componenti, hard e soft, permette la separazione delle fasi all'interno del polimero, in modo tale che il materiale sia composto da domini rigidi dispersi all'interno di una matrice soft. Ciò conferisce le superiori proprietà fisiche dei PU, principalmente compliance e viscoelasticità, attributo importante per la biocompatibilità con sangue e altri tessuti.

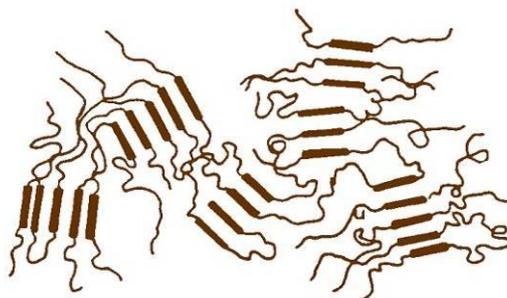


Figura 33 – Tipica struttura del poliuretano. I segmenti più spessi e rigidi (*hard segment*) sono circondati da filamenti più sottili (*soft segment*).

La grande maggioranza di PU contiene additivi per renderne più facile la produzione; in genere, questi sono residui di catalizzatori, coadiuvanti e stabilizzanti, i quali rimangono sulla superficie dopo il processo produttivo, ma che finora non hanno mostrato di aumentare la trombogenicità degli innesti (3).

Con i PU si possono produrre soffici schiume, fibre, rivestimenti rigidi e innesti con ottima compliance attraverso svariate tecniche (*filament winding, solvent casting*, deposizioni con tecnica spray, elettrospinning ecc..). A seconda dei reagenti si possono ottenere poliuretani più o meno idrofilici, o dotati di una superficie che accoppi idrofilicità con idrofobicità (in modo da incoraggiare l'adsorbimento di proteine specifiche), o innestabili con molecole attive come eparina, polipeptidi e altre ancora.

In genere, per le applicazioni biomediche si usano poliuretani che hanno proprietà elastomeriche. Quelli utilizzati negli innesti vascolari sono modellati nella loro forma finale attraverso processi di soluzione e/o fusione, oppure possono essere filati in fibre, fusi in strutture porose, o estrusi in tubi (3).

Ad oggi, i PU mostrano il più alto potenziale per ottenere protesi vascolari complianti, ma la loro composizione chimica è soggetta a problemi di biodegradazione non indifferenti. Una delle maggiori preoccupazioni che riguarda alcuni PU è il potenziale effetto cancerogeno dei sottoprodotti di degradazione. L'esempio più eclatante risale al 1991, quando la FDA (Food and Drug Administration) ha denunciato l'uso di schiuma poliuretanicica come materiale di rivestimento superficiale per protesi mammarie, dopo che era stato commercializzato per più di 20 anni (2).

Esistono molti tipi diversi di PU, tra cui il policarbonato-uretano, poliestere uretano ed il polietero uretano. La prima generazione di protesi vascolari in PU è stata sviluppata con poliestere uretano che però, nonostante abbia inizialmente mostrato buona biocompatibilità, ha poi denotato modificazioni chimiche superficiali e deterioramento in vivo. È stato infatti segnalato che i PU con polioli poliesteri come soft segment sono instabili, poiché tali segmenti sono degradati rapidamente per idrolisi (22). Sono stati poi indagati i polietero-uretani. Anche se in maniera molto minore, anche questi sono sensibili a idrolisi, in dipendenza sia dal contenuto di etere che dal livello di degradazione ossidativa, a cui fra l'altro sono maggiormente soggetti

(3). Negli ultimi anni si è scoperto che i polietere-uretani possono andare incontro a degradazione biologica secondo un processo noto come ESC, *environmental stress cracking* (Figura 34), che porta a microfessurazione superficiale dell'innesto; una volta iniziato il processo di frattura, questo può estendersi fino a creare danni irreparabili. Si crede che una delle cause possa essere la fatica a cui è sottoposto il materiale durante la lavorazione (22).

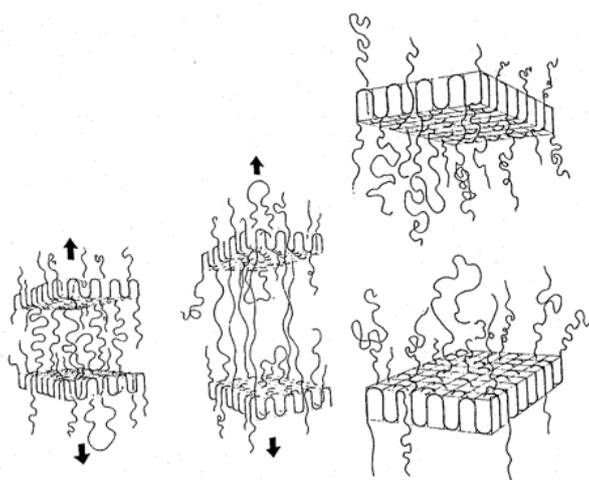


Figura 34 – Schematizzazione dell'environmental stress cracking.

Il problema della biostabilità dei primi poliuretani biomedici (fra cui si possono citare Biomer, Pellethane, Mitrathane, Tecoflex) è molto attuale e ha motivato la recente introduzione di nuovi copolimeri dotati di maggior stabilità (22). Una soluzione parziale è stata quella di produrre protesi in PU misti, per ovviare ai meccanismi di degradazione idrolitica e ossidativa. Il sito di degradazione è il soft segment (estere, carbonato o etere); l'idrolisi dell'hard segment è in genere possibile, ma non predominante. Un modo per ridurre queste complicazioni è quello di rimuovere sia i legami etere che estere, il che richiede una modifica dei processi produttivi. Uno sviluppo è stato indirizzato nell'utilizzo di soft segment composti interamente da molecole di idrocarburi (3). Una successiva generazione di innesti ha così utilizzato il policarbonato-uretano come materiale di base, senza legami etere e quindi in teoria

idroliticamente e ossidativamente più stabile e più resistente alla biodegradazione. Nella pratica questi innesti hanno confermato una resistenza molto elevata alla degradazione in vitro e in vivo. Vi sono stati anche tentativi di ridurre la trombogenicità di questi innesti, trattando la superficie con sostanze come eparina e dipiridamolo con un certo successo (3).

Nel corso del 2001 è stato sviluppato un innesto in policarbonato-uretano (CPU) conosciuto come MyoLink. Ha una struttura a nido d'ape ed è composto da due strati, interno ed esterno, e da una parte centrale spugnosa che permette la trasmissione della forza pulsatile (Figura 35). Questa struttura consente, inoltre, che la compliance permanga anche dopo la formazione di tessuto cicatriziale, a differenza di quanto avviene per altri tipi di protesi vascolare in PU, e permette all'innesto di mimare la gamma di elasticità dell'arteria ospitante. Questo è importante in quanto la compliance varia con l'età e lo stato patologico, ma soprattutto cambia da vaso a vaso (ad esempio coronarie e arteria femorale hanno differenti proprietà meccaniche) e l'innesto può essere modificato di volta in volta in base alle necessità per rispecchiare le proprietà dell'arteria nativa.

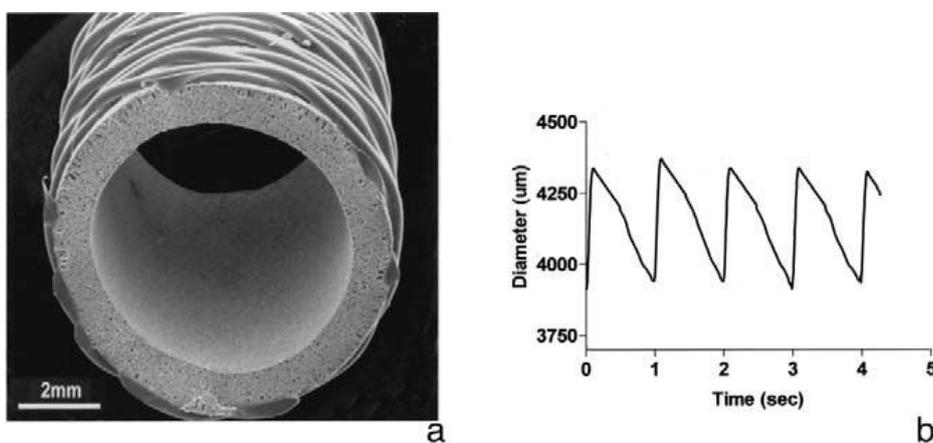


Figura 35 – Innesto in MyoLink rinforzato esternamente (a) e variazioni del diametro interno dell'innesto durante il ciclo cardiaco (b).

Grazie alla mancanza di etere ed estere nella composizione chimica, questo innesto resiste piuttosto bene alla biodegradazione. Negli esperimenti condotti *in vitro*

il MyoLink oppone maggiore resistenza alla biodegradazione rispetto ad un convenzionale polietere uretano (in questo caso è stato utilizzato il Pulsetec come confronto). L'innesto è stato impiantato in un modello canino per un periodo di 36 mesi e ha avvalorato le precedenti osservazioni. La compliance dell'innesto in CPU è stata paragonata a quella di arteria, vena, Dacron e ePTFE su un intervallo di pressione arteriosa media (30-100 mmHg), risultando significativamente più complianti di ePTFE e Dacron (Figura 36) (3).

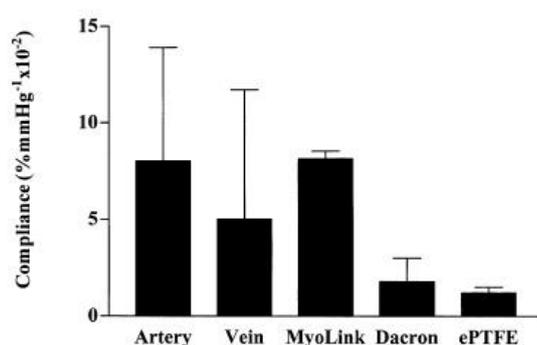


Figura 36 – Compliance media di arteria, vena ed innesti in MyoLink, Dacron e ePTFE. Si può notare come compliance di arteria ed innesto in MyoLink siano simili.

### 4.3.2. Risposta *in vivo* e porosità

L'entusiasmo con cui i PU vennero inizialmente adottati come materiali protesici vascolari è dovuto a due principali vantaggi su Dacron e Teflon: elasticità e facilità di manipolazione. La porosità è una caratteristica intrinseca degli innesti in PU, ma inizialmente è stata valutata come un fattore utile alla pervietà del vaso piuttosto che alla crescita interna di tessuto. Perciò, nei primi momenti di studio di questo materiale, le interconnessioni fra i pori erano quasi totalmente assenti, sia negli innesti in PU in forma fibrillare che quelli in schiuma di PU. Nonostante la dimensione dei pori fosse in qualche modo mutevole per entrambe le strutture, non sono stati creati con l'obiettivo di avere dimensioni adatte alla crescita interna. Ad esempio, configurazioni con spessore della fibra variabile tra 1 e 30  $\mu\text{m}$  possono generare dimensioni dei pori

fra i 10 e i 60  $\mu\text{m}$ ; tuttavia, indipendentemente dal tipo di processo produttivo degli innesti (weaving, knitting, elettrospinning, ecc...), la presenza di spazi comunicanti ammissibili per la crescita interna transmurale è quasi sempre casuale, piuttosto che intenzionale (4).

Similmente a quanto accade per il PU fibrillare, le schiume peccano di spazi sufficientemente ampi e interconnessioni fra di essi. Utilizzando la tecnica di inversione di fase standard, per esempio, vengono prodotti micropori più piccoli di 15  $\mu\text{m}$  i quali non permettono una penetrazione solo superficiale dell'innesto da parte dei capillari. Le modifiche di fase e temperatura nelle tecniche di inversione hanno consentito qualche grado di variabilità in questa microporosità.

Vi sono altre tecniche, fra cui *foam flotation* e *dip-coating*, che portano a strutture laminari con pori mal definiti e scarsamente interconnessi; espansione a gas, con pori non comunicanti fra loro; perforazione con il laser, con canali radiali attraverso un tubo solido piuttosto che pori tridimensionali (4).

Una volta spostata l'attenzione dalla scelta del materiale, la struttura superficiale, la porosità e la continuità dei pori diventano un aspetto importante per raggiungere l'obiettivo della crescita cellulare all'interno dell'innesto. Uno dei mezzi più semplici per raggiungere la porosità necessaria per permettere la crescita interna è quella di sovrapporre macropori alla struttura microporosa ottenuta per inversione di fase. La tecnica base di inversione di fase è stata integrata con l'aggiunta e la successiva estrazione di sostanze porogene che formano nel poliuretano pori di 30-75, 40 e 200  $\mu\text{m}$ . Tuttavia, l'uso di sali e altre sostanze porogene irregolari ha portato generalmente a pori di forma altrettanto irregolare, limitando la connettività tra i pori e intrappolando le stesse sostanze poroge residue all'interno della struttura. Per superare questi limiti è stata operata una variazione nella tecnica di inversione di fase e nel metodo di estrazione dei materiali porogeni, secondo cui una soluzione di PU viene infiltrata negli stretti spazi di una struttura preconfezionata formata da porogeni sferici. La successiva precipitazione ed estrazione del porogeno conduce a pori ben definiti, a forma di dodecaedro, insieme ad altrettanto ben definite interconnessioni fra gli stessi. Tale "schiuma a celle aperte" rappresenta un substrato ideale per la

crescita cellulare ed è una delle poche struttura tridimensionali che consentono la crescita di cellule e tessuti liberi di orientarsi in una data direzione (Figura 37) (4).

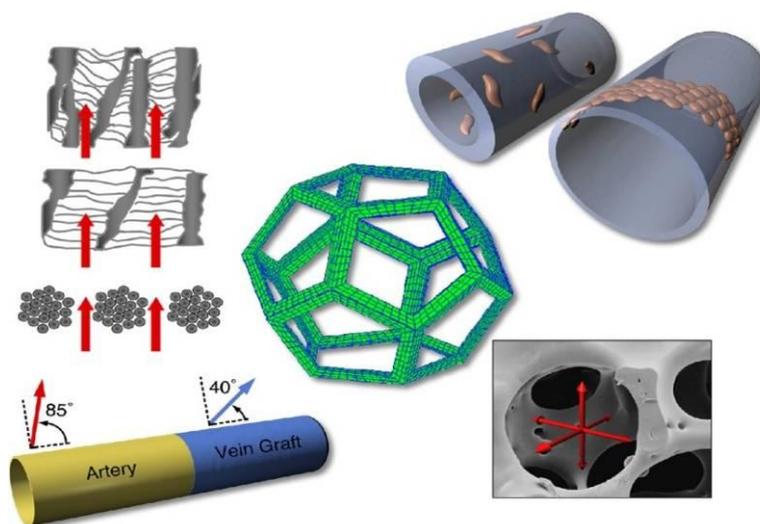


Figura 37 – In alto a sinistra: rappresentazione schematica comparativa degli spazi disponibili alla crescita interna di endotelio in ePTFE, Dacron e PU; mentre sia ePTFE che Dacron presentano strutture con una direzione crescita prestabilita e pongono un certo grado di limitazione spaziale, la struttura aperta a dodecaedro del PU (al centro) permette alle cellule di orientarsi liberamente in qualsiasi direzione. In basso a destra è mostrato un ingrandimento di innesto in PU con pori ben definiti, di forma sferica (157  $\mu\text{m}$ ) e ampi spazi di interconnessione. Nel progetto di un innesto compliant, l'orientamento delle cellule segue i requisiti di sforzo biomeccanico applicato all'innesto; questo principio si realizza nel diverso angolo di allineamento delle cellule muscolari lisce nelle arterie e nelle vene (in basso a sinistra e in alto a destra).

### PU fibrillare

A parte rare eccezioni, gli innesti in PU fibrillare sono in gran parte impenetrabili alla crescita interna di tessuto transmurale. Solo spazi inter-fibrillari particolarmente grandi consentono la completa penetrazione del tessuto in tutta la parete. Il comportamento *in vivo* di questo tipo di poliuretani ricorda quello del Dacron di tipo knitted piuttosto che del Teflon; in particolare l'ispessimento delle pareti annesse alle anastomosi è maggiore di quel che avviene su una superficie in ePTFE. Fin dal primo giorno la regione centrale dell'innesto è ricoperta da uno strato continuo di fibrina che difficilmente diminuisce lo spessore nel corso del primo anno, anche se non è così spesso come sul Dacron. La capsula esterna è solitamente sottile e densa, e presenta

occasionali infiltrazioni di macrofagi attorno alle fibre di PU. Dalla seconda settimana fino alla sesta i macrofagi diventano sempre più numerosi e la reazione infiammatoria va diminuendo dopo questo periodo (4).

### **Schiume di PU**

Nelle schiume in PU con dimensione media dei pori inferiore a 15  $\mu\text{m}$  non vi è crescita interna, se non minima, anche dopo un lungo periodo di tempo. Sotto questa misura critica, infatti, nella parete dell'innesto si insinuano solo alcuni eritrociti e gruppi di globuli bianchi. Invece in una configurazione in cui la dimensione dei pori è di 25-40  $\mu\text{m}$  o più, macrofagi, cellule giganti, fibroblasti e capillari popolano rapidamente la parete esterna dell'innesto durante le prime 3-4 settimane. Il grado di crescita interna è inizialmente più pronunciato per schiume di PU ad alta porosità, ma dopo 3 mesi circa è simile per tutte le porosità. Similmente a quanto accade negli innesti in PU fibrillare, la superficie a contatto col sangue presenta uno strato di fibrina più spesso di quello che si crea normalmente su gli innesti in ePTFE. Allo stesso modo, l'ispessimento del vaso nelle zone anastomotiche è fortemente sviluppato; questa iperplasia intima anastomotica è decisamente inferiore negli innesti in PU complianti quando confrontati con altri più rigidi. A causa del rapido accumulo di collagene all'interno dei pori degli innesti in PU, se non si è in presenza di strutture particolari, la compliance può diminuire anche del 50 % durante le prime 6 settimane. Spingendosi oltre, attraverso l'introduzione di grandi pori sferici ben definiti, uniformi e interconnessi, la risposta dell'organismo a questo tipo di innesto diventa più "controllabile" e l'interdipendenza tra infiammazione e vascolarizzazione è minore. La risposta infiammatoria e il numero di macrofagi sono stati ridotti del 56 % e 21 %, rispettivamente, quando la dimensione dei pori è stata aumentata da 66 a 157  $\mu\text{m}$ , mentre il tasso di vascolarizzazione diminuisce. La veloce e intensa penetrazione iniziale della parete esterna dell'innesto (Figura 38) ha evidenziato una questione molto importante: nonostante il notevole spazio riservato alla loro crescita, dopo un primo periodo, i capillari hanno mostrato un avanzamento piuttosto lento per percorrere i 0,6 mm che separano la parete dell'innesto dal sangue. Questa crescita

protratta nel tempo dà un'idea dell'intensità della reazione avversa che si viene a creare (4).

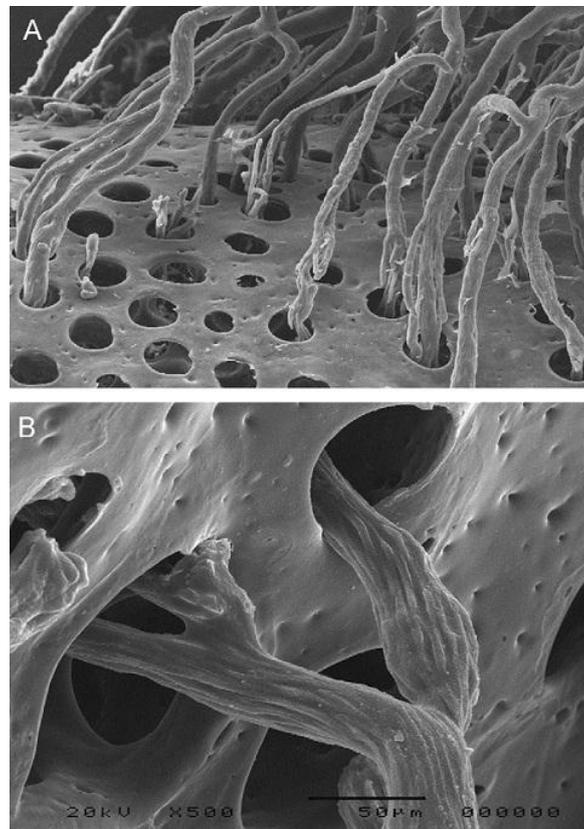


Figura 38 – Crescita di capillari negli spazi interstiziali di un vaso in PU.

Il fenomeno è stato meglio studiato in innesti all'arteria femorale in schiuma di PU nel babuino: immediatamente dopo l'impianto, l'intera parete dell'innesto è stata riempita da un vasto strato di fibrina, permettendo ai capillari esterni di raggiungere nella prima settimana la profondità di metà parete dell'innesto. Dopo 2 settimane, la ricrescita transmurale non è granché progredita verso la superficie luminale, mentre la fibrina diventava più compatta. Una settimana dopo, i capillari avevano raggiunto il terzo più interno della parete, ma lo strato di fibrina nei pori era diventato ancora più denso e compresso. Mentre ci sono volute 4-6 settimane per consentire a pochi capillari di raggiungere la superficie luminale e cominciare a proliferare sulla superficie

fibrinosa, sarebbe probabilmente occorso meno tempo per percorrere la distanza di 0,6 millimetri della parete se innesti si fossero occlusi nei primi giorni (4).

### 4.3.3. Elettrospinning

Fra le tecniche utilizzate per produrre innesti vascolari una delle più recenti ed innovative è l'elettrospinning. L'elettrospinning (dell'inglese *spinning*, ovvero filatura) è un metodo versatile per la costruzione tridimensionale di innesti polimerici sintetici con proprietà meccaniche analoghe a quelle del tessuto vascolare (Figura 39). Nel processo di elettrofilatura, un getto di soluzione polimerica passa attraverso un campo elettrico e durante il processo si solidifica su di un collettore tubolare in rotazione e genera fibre con diametro della scala del nanometro/micrometro. A seconda della velocità di rotazione del collettore, le fibre possono essere organizzate in uno schema orientato o meno. Questa sovrapposizione tridimensionale di fibre migliora il rispetto della compliance del vaso nativo da parte dell'innesto e ha dimostrato anche di contribuire al processo di guarigione, dato che topografie superficiali con pori e maglie stimolano efficacemente la diffusione, l'adesione e la proliferazione di cellule endoteliali, mentre l'orientazione di fibre e scanalature inducono un allineamento uniforme delle cellule sulla superficie (23).

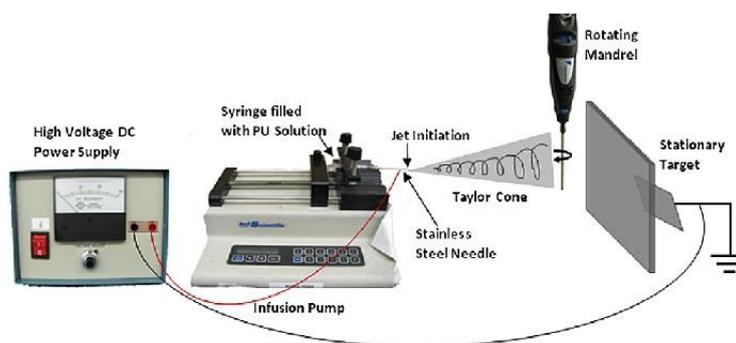


Figura 39 – Schematizzazione del processo di elettrospinning.

Gli innesti vascolari di piccolo diametro in PU possono essere fabbricati con una trama microscopica uniforme sulla superficie luminale utilizzando la tecnica

dell'elettrospinning. Quest'anno sono stati realizzati innesti composti interamente di microfibre allineate circonferenzialmente, lunghi circa 5 cm con diametro interno di 4mm (Figura 40).

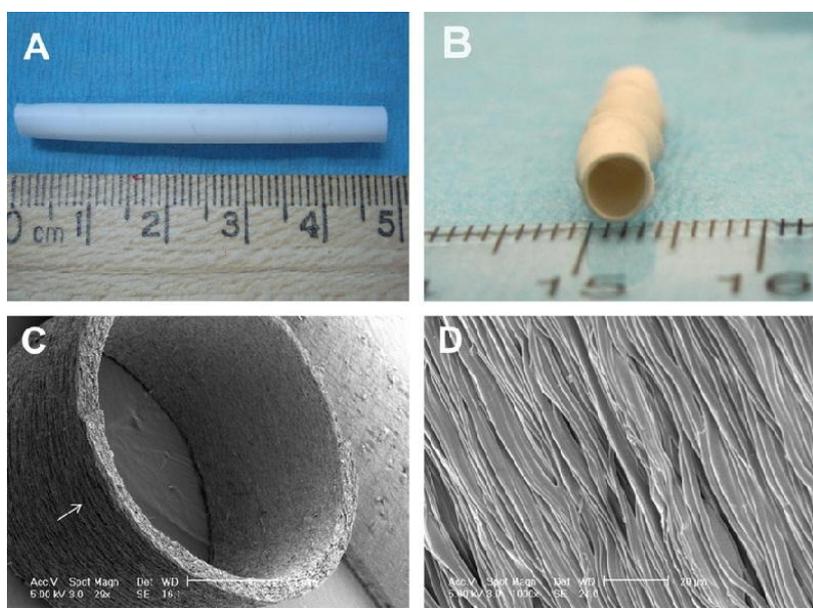


Figura 40 – Sopra si può vedere l'innesto in PU. Sotto l'immagine SEM mostra l'orientamento circonferenziale delle fibre.

Le proprietà meccaniche di questi innesti sono state individuate mediante una prova di trazione monoassiale. Il modulo di Young è stato determinato dalla pendenza della parte lineare della curva sforzo-deformazione per ogni campione (Figura 41). Questi innesti hanno mostrato un comportamento anisotropo per via dell'orientamento circonferenziale delle microfibre. Longitudinalmente, il modulo di Young misurato è stato di  $0,43 \pm 0,04$  MPa, mentre è aumentato di otto volte quando misurato in direzione parallela alle fibre. Per confronto, il modulo di Young dell'aorta del coniglio misurata in senso longitudinale è di  $0,50 \pm 0,05$  MPa, quello nella direzione perpendicolare non è stato calcolato, ma da dati sperimentali precedenti è noto essere molto maggiore. Così i moduli di Young dell'innesto sono risultati molto simili a quelli nativi del tessuto vascolare.

	Elastic modulus (MPa)
Nonwoven sheet	1.25 ± 0.28
Electrospun graft	
Longitudinal	0.43 ± 0.04
Circumferential	3.43 ± 0.98
Rabbit aorta	0.50 ± 0.05

Figura 41 – Valori medi del modulo elastico  $\pm$  l'errore. Per l'innesto in PU prodotto tramite elettrospinning il modulo è stato misurato sia longitudinalmente sia circonferenzialmente, mentre per arteria (aorta di coniglio) e innesto in PU isotropo standard (indicato in tabella come "non-woven sheet") solo in direzione longitudinale.

Il grafico sforzo-deformazione (Figura 42) mostra che gli innesti potrebbero sopportare carichi applicati parallelamente all'asse longitudinale (perpendicolare alle microfibre) fino al 300 % di deformazione, senza registrare cedimenti. In una serie di esperimenti in cui gli innesti sono stati suturati sull'aorta del coniglio si è scoperto che quest'ultima, a differenza del PU, si rompe a carichi così elevati. Dopo le prove di trazione, l'immagine SEM ha mostrato che la maggioranza delle microfibre, anche se non tutte, ha perso il proprio allineamento circonferenziale, apparendo orientata a caso; al contrario, tutte le microfibre hanno mantenuto il loro allineamento quando il carico è stato applicato parallelamente alle stesse. Nonostante questo cambiamento di orientamento delle fibre, gli innesti hanno resistito ad un'ulteriore prova di trazione con il 300 % di deformazione, che va ben oltre il valore fisiologico, e hanno mantenuto la propria integrità strutturale. Gli innesti hanno anche subito 10 cicli di prove di trazioni consecutive con 50 % di allungamento. In conclusione, i risultati dimostrano che la riorganizzazione delle microfibre è in grado di sostenere grandi deformazioni senza cedimenti dell'innesto (23).

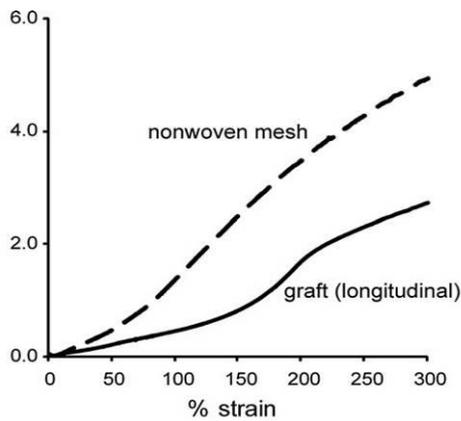


Figura 42 – Grafico sforzo-deformazione. A linea tratteggiata rappresenta un innesto in PU con fibre non orientate (isotropo), la linea continua l’innesto in PU prodotto tramite elettrospinning.

La biocompatibilità dei trapianti è stata valutata in base alla capacità delle cellule endoteliali di formare un monostrato sul rivestimento interno del vaso. La presenza di una topografia superficiale unidirezionale sulla superficie luminale degli innesti fornisce alle cellule endoteliali, per contatto diretto, la direzione di allineamento. La maggior parte delle cellule (> 90 %) si sono adattate allungando la proprio forma e adagiandosi sulle microscalanature (Figura 43) (23).

Sulla base di questi risultati, si può concludere che l’elettrospinning può essere utilizzato per fabbricare innesti in poliuretano di piccolo calibro durevoli, con una trama tridimensionale prestabilita, in grado di promuovere la formazione di un endotelio orientato.

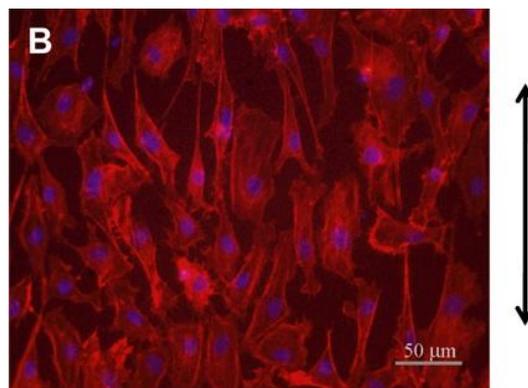


Figura 43 – La freccia mostra la direzione delle fibre e delle scanature. In figura si nota come le cellule crescano preferenzialmente secondo tale orientamento.

## 4.4. PEtU-PDMS

### 4.4.1. Introduzione

Gli elastomeri in poliuretano sono ampiamente apprezzati per la buona biostabilità e le ottime proprietà chimico-fisiche, tuttavia l'utilizzo è limitato a causa della biodegradazione nel lungo periodo, spesso accompagnata da reazioni infiammatorie. Un'altra importante classe di materiali che sono spesso utilizzati per la fabbricazione di dispositivi biomedicali è quella dei siliconi, o polisilossani, la cui variante più comune è il polidimetilsilossano (PDMS). Gli elastomeri a base di silossano sono stati utilizzati in una vasta gamma di applicazioni biomediche negli ultimi anni, grazie alla buona emocompatibilità, bassa tossicità, buona stabilità termica e ossidativa e alle proprietà antiadesive. Gli elastomeri in silicone convenzionali possono tollerare grandi allungamenti, ma posseggono una moderata resistenza alla trazione; tuttavia, il silicone mostra migliori proprietà di contatto col sangue rispetto ai PU commerciali (1). Il silicone in forma pura è stato raramente utilizzato per produrre innesti vascolari, ma piuttosto come sottile rivestimento di innesti fabbricati in altri materiali come Dacron o Teflon, con lo scopo principale di ridurre la risposta infiammatoria e il rischio di infezioni (il silicone scoraggia l'adesione cellulare) (24).

Per realizzare innesti vascolari di piccolo calibro, questioni importanti da prendere in considerazione sono la scelta del materiale, la porosità strutturale e le proprietà viscoelastiche intrinseche dell'innesto. Di conseguenza, elastomeri come PU e siliconi sembrano essere un'ideale classe di materiali adatta a questa applicazione, in quanto possono essere facilmente trasformati con varie tecniche in strutture complianti tubolari, porose o fibrillari.

Sotto quest'ottica recentemente è stata perseguita una nuova strategia per ridurre la propensione del PU all'ossidazione attraverso l'incorporamento nella catena polimerica di soft segment di PDMS. Materiali di questo tipo sono il CarboSil e il PurSil, quest'ultimo sviluppato da Ward et al. (Polymer Technology Group, Berkeley, California, USA). Uno degli studi più interessanti su questo tema è stato - e viene

tutt'ora - condotto proprio qui in Italia: seguendo un procedimento chimico differente, è stata sviluppata una formulazione elastomerica nella forma di un reticolato polimerico definito *semi interpenetrating polymer network* (semi-IPN), che combina le proprietà già collaudate dei suddetti PU e PDMS (1).

Nel corso di questo studio si è cercato di approfittare della predisposizione alla degradazione dei poliuretani e di mitigare questa caratteristica formando un semi-IPN fra PEtU (polietere uretano) e PDMS (polidimetilsilossano). Questo approccio ha il vantaggio della facilità di reperimento di un PEtU medicale standard, resistente ed elastico, che può essere utilizzato per creare una serie di polimeri con la stessa chimica di base, ma con quantità sempre crescenti di silicone al loro interno. Si è cercato quindi di determinare il miglior compromesso nella proporzione di silossano da utilizzare per dar luogo ad un adeguato livello di biostabilità, biodegradabilità e biocompatibilità.

Il materiale risultante dalla combinazione dei due elastomeri può essere definito come un semi-IPN non covalente composto da due sistemi di polimeri, in cui uno solo dei due - il PDMS funzionale - è legato alla catena dell'altro; il secondo polimero - la macromolecola di PEtU - interagisce attraverso gli hard segment tramite legami a idrogeno con gli atomi di ossigeno della catena principale del PDMS. La combinazione di questi due sistemi di polimeri risulta in un materiale che mostra migliori proprietà di quelle dei singoli componenti, a causa dell'effetto sinergico indotto dalla forzata compatibilità dei polimeri nel reticolato (Figura 44) (1).

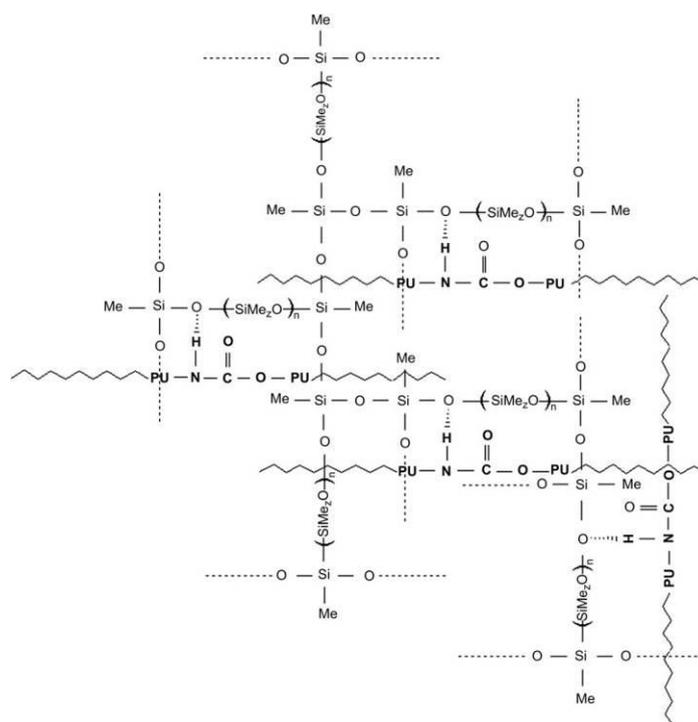


Figura 44 – Rappresentazione planare della PEtU-PDMS *semi-interpenetrating polymer network*. La macromolecola di PEtU interagisce con il reticolato di PDMS attraverso legami a idrogeno con gli atomi di ossigeno nel PDMS.

#### 4.4.2. Biodegradazione e risposta infiammatoria

Nel corso di una delle prime sperimentazioni (25) è stato utilizzato un poliuretano aromatico, utilizzato comunemente in campo biomedico, come materiale di base per una serie di polimeri. Attraverso una reazione di *cross-linking* è stato legato al poliuretano PDMS in concentrazioni crescenti (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 e 100 %); il processo è avvenuto tramite inversione di fase e deposizione con tecnica spray (utilizzando una Spray-Machine).

Lo scopo dell'esperienza consisteva nel determinare il miglior compromesso, in termini di percentuale di silossano, al fine di raggiungere buona biostabilità e alti livelli di biocompatibilità. La differenza in concentrazione di PDMS nei polimeri utilizzati per gli innesti si è tradotta in risposte *in vivo* altrettanto diverse. Sottili fogli di 100-200  $\mu\text{m}$  sono stati impiantati in posizione intramuscolare, utilizzando come modelli il topo e il coniglio, ed espianati dopo 3 e 6 mesi.

I polimeri che contenevano percentuali sia alte che molto basse di PDMS hanno subito notevole degradazione dopo i 6 mesi dall'impianto; per contro, i materiali con percentuali di silossano fra il 20 % ed il 40 % sono stati quelli che hanno mostrato la maggior resistenza (Figura 45).

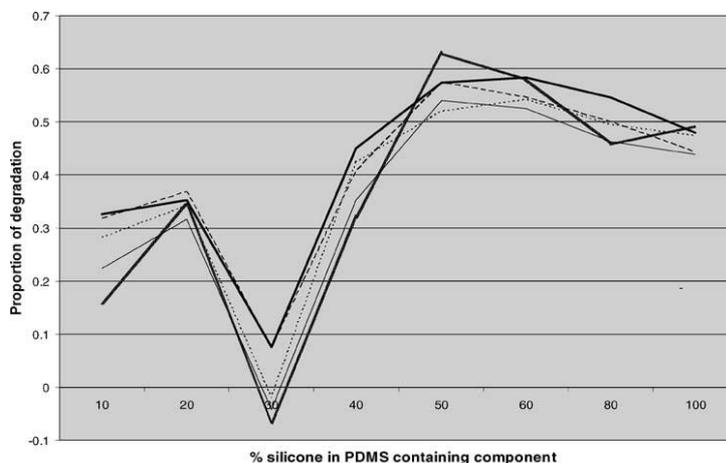


Figura 45 – Degradazione di una serie di PU-PDMS in funzione del contenuto di PDMS.

L'infiltrazione cellulare nei foglietti, avvenuta soprattutto ad opera dei macrofagi, è stata generalmente più intensa al diminuire della concentrazione di PDMS negli innesti, anche se con relazione non lineare; allo stesso modo l'attività dei macrofagi è stata meno intensa quando la concentrazione di silicone era alta (è da notare come questo comportamento sia in contrasto con quello registrato nell'analisi sulla biodegradazione).

Il polimero contenente il 30 % di silossano ha prodotto una capsula fibrosa più spessa degli altri; questa non è derivata dalla biodegradazione, visto che proprio questo specifico materiale ha presentato il minor tasso di degradazione. Invece, i foglietti con alto contenuto di silicone, si sono degradati molto più rapidamente seppur producendo la risposta infiammatoria più debole, suggerendo così che i prodotti di degradazione del PEtU-PDMS sono probabilmente non tossici. Questa apparente controversia si può spiegare con il ruolo chiave dello strato di proteine adsorbite che fungono da conduttrici della risposta immunitaria nei confronti degli impianti da parte.

L'idrofobicità del materiale cresce al crescere della percentuale di silossano contenuto e questo ha probabilmente un notevole effetto sulla conformazione e sulla composizione degli stati di proteine adsorbiti.

In conclusione, è stato dimostrato come il tasso di degradazione in questi polimeri possa essere modulato: i polimeri con il 30 % di silossano sono risultati quelli chimicamente più stabili e aventi il periodo di biodegradazione più lungo.

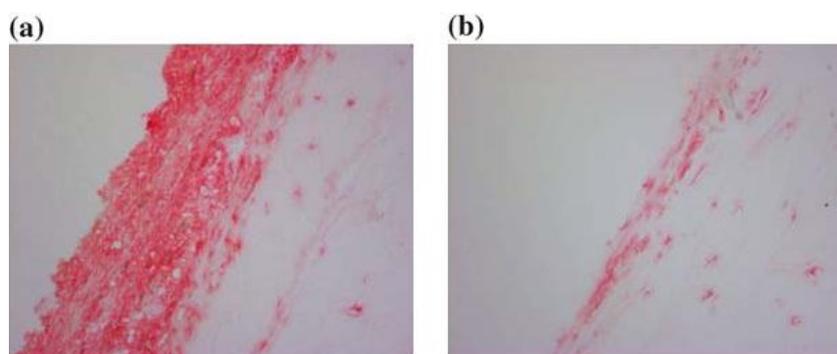


Figura 46 – Risposta del PU-PDMS contenente il 10 % (a) e 80 % di PDMS (b).

#### 4.4.3. Tossicità

Visto che ogni processo produttivo può introdurre tossicità nel manufatto finale, un anno più tardi (2006) è stato condotto uno studio sia *in vitro* che *in vivo* per sondare l'eventuale effetto tossico del PEtU-PDMS (26). Cellule endoteliali prelevate dall'ombelico umano e fibroblasti sono stati coltivati sui materiali PEtU-PDMS (10, 40 e 100 % PDMS), mentre gli studi *in vivo* (topo) sono stati condotti impiantando nel muscolo degli animali piccoli pezzetti (1 cm di lunghezza, 1 mm di diametro) degli stessi materiali usati *in vitro*.

I risultati ottenuti *in vitro* sono stati confermati da quelli *in vivo*: tutti i campioni hanno dimostrato di essere non citotossici per l'organismo, le cellule coltivate su PEtU-PDMS non hanno mostrato modifiche morfologiche e sono apparse identiche a quelle coltivate sul mezzo di coltura cellulare (Figura 47).

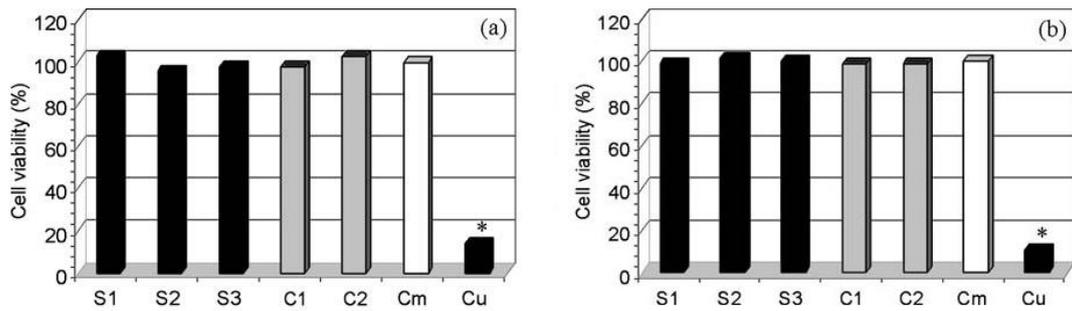


Figura 47 – Percentuale (calcolata in base al riferimento del 100% del Cm, mezzo di coltura) delle cellule ombelicali umane (a) e fibroblasti (b) incubati ed estratti dopo 72 ore da S1, S2, S3, ovvero PEtU-PDMS al 10, 40, 100 %, rispettivamente; Estane (C1), Cardiothane(C2) e rame (Cu).

#### 4.4.4. Emocompatibilità

Un successivo (2007) ma altrettanto importante esperimento che riguarda il PEtU-PDMS si è focalizzato sulla valutazione dell'emocompatibilità (6). Il test è stato condotto *in vitro* mediante un circuito nel quale sangue umano non coagulato circolava spinto da una pompa peristaltica, modificata per generare un flusso passivo nell'innesto in modo da non provocare emolisi durante il funzionamento (Figura 48). Per ciascun esperimento sono stati utilizzati innesti ripiegati a formare una circonferenza e messi in rotazione per 2 h a 37° C. Al momento dell'estrazione dal circuito sono stati valutati adesione piastrinica e quantità di  $\beta$ -TG (tromboglobulina- $\beta$ ) in circolo.



Figura 48 – Schema del dispositivo utilizzato per simulare il flusso di sangue.

Gli innesti sono stati creati utilizzando ancora una volta una tecnica spray, che utilizza il principio dell'inversione di fase, in cui è stata prodotta una rapida deposizione della soluzione di polimero su un mandrino rotante, permettendo la realizzazione di materiali con una distribuzione uniforme di PEtU-PDMS. La soluzione di PEtU-PDMS è stata portata vicino al punto di deposizione mediante l'aggiunta di un 17 % (in volume) di acqua distillata. Dopodiché, utilizzando uno strumento chiamato SprayMachine, la soluzione e l'acqua distillata sono state spruzzate insieme attraverso pistole opportunamente modificate per collidere su un mandrino rotante in Teflon. La combinazione della soluzione polimerica e dell'ulteriore acqua induce un'improvvisa inversione di fase del polimero in soluzione causandone la deposizione uniforme sul supporto. Questa tecnica permette di ottenere innesti con differente geometria interna in rapporto a parametri di fabbricazione quali pressione e flusso di soluzione polimerica e acqua nelle pistole, e quantità e concentrazione delle sostanze stesse.

Sono stati realizzati innesti in PEtU (per la precisione Estane 5714-F1, un polietere uretano termoplastico disponibile commercialmente), in PDMS e in PEtU-PDMS con percentuali crescenti di silicone (10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 e 90 %).

L'analisi a infrarossi delle superfici ha rivelato che esiste una concentrazione critica di PDMS (fra il 30 ed il 40 %) oltre la quale si hanno due differenti situazioni nel materiale: dal 10 al 30 % di PDMS la superficie dell'innesto esibisce preferenzialmente gruppi caratteristici del PU, mentre dal 40 % in poi i gruppi del silossano.

Lo studio si è concentrato sulla valutazione dell'emocompatibilità di tre sole configurazioni di innesti in PEtU-PDMS (10, 25 e 30 % di PDMS) di 10 cm di lunghezza e 5 mm di diametro interno e superfici ad alta porosità (120  $\mu\text{m}$  di dimensione media dei pori).

Il numero di piastrine sulla superficie è stato ottenuto per misura indiretta, contandole prima e dopo la simulazione; esso diminuisce per tutti i vasi, ma in maniera minore per quelli con concentrazioni più alte di PDMS (25 e 40 %) rispetto a quel che accade nei vasi con concentrazione più bassa (10 % PDMS) e in quelli in Estane (0 % PDMS). Risultati simili sono stati ottenuti misurando il rilascio di  $\beta$ -TG nel sangue, come si può vedere in Figura 49.

Se ne conclude una miglior emocompatibilità degli innesti in PETU-PDMS con il 25-40 % di PDMS nel reticolato polimerica.

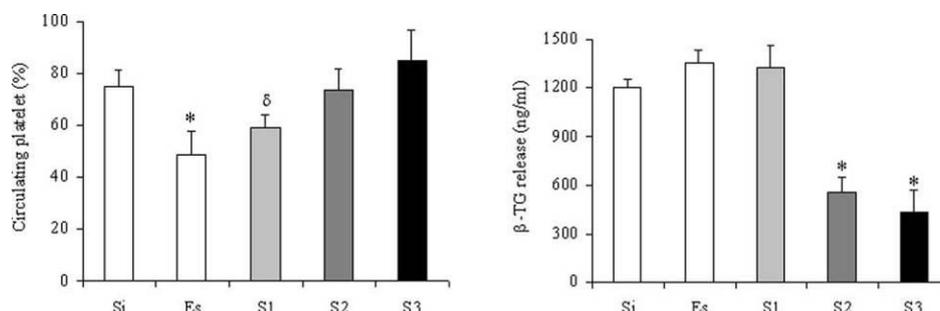


Figura 49 – A sinistra è mostrato il conteggio delle piastrine, a destra la quantità di β-TG circolante, per innesti in silicone (Si), Estane (Es), PETU-PDMS con 10, 25 e 40 % di PDMS (S1, S2, S3, rispettivamente).

#### 4.4.5. Prestazioni *in vivo* a lungo termine

La più recente esperienza che interessa questo particolare polimero è stata pubblicata quest'anno (2010) ed è stata anch'essa condotta in Italia (1). Lo scopo di questo studio *in vivo* è stato quello di valutare la biocompatibilità con sangue e tessuti di un innesto vascolare di piccolo calibro, fabbricato con un semi-IPN di PETU-PDMS, con due diversi strati porosi nello spessore della parete. Innesti relativamente lunghi sono stati impiantati, secondo le tecniche anastomotiche che emulano le condizioni di flusso adottate clinicamente per procedure di bypass periferico aorto-coronarico, nell'arteria carotide di ovini adulti e confrontati con innesti in ePTFE standard della stessa dimensione e lunghezza, impiantati in posizione contro laterale (Figura 50).



Figura 50 – Impianto dell'innesto con differenti tecniche anastomotiche.

Il materiale utilizzato per la fabbricazione dell'innesto è composto da due elastomeri commercialmente disponibili: un PEtU medico, fornito in forma granulare, l'Estane 5714F1 (Noveon, Bruxelles) (AMW 150,000-175,000 Da; rigidità 82 A; resistenza alla trazione 4.500 psi; allungamento 530 %), ed un PDMS biomedico (United Chemical Technologies, Inc., Bristol) (AMW 77,292 Da). L'Estane è composto da un soft-segment in ossido di politetrametilene (PTMO), un hard-segment isocianato a base di metilene difenilisocianato ed un estensore di catena di 1,4-butandiolo. Il PEtU, prima di essere sciolto, è stato ulteriormente purificato in una miscela 1:1 (v/v) metanolo-acetone.

La reazione tra il PEtU e PDMS è stata effettuata in un reattore a 82°C per 6 h, in una miscela di tetraidrofurano e 1,4-diossano (1:1 v/v), sotto agitazione e in atmosfera di azoto. In queste condizioni possono verificarsi interazioni fra atomi di idrogeno nei gruppi di uretano e atomi di ossigeno nella catena del PDMS. La modalità di preparazione del polimero permette di ottenere soluzioni di materiale omogeneo con diverso contenuto di PDMS (da 0 a 100 %); in particolare, per questo studio, è stato utilizzato il 30 % di PDMS (w/w) nella miscela, poiché negli studi sopraccitati si è rivelato essere un ottimo compromesso al fine di ottenere le migliori proprietà per l'utilizzo come materiale per innesti vascolari.

Sono stati prodotti innesti di 8 centimetri di lunghezza, 5 mm di diametro interno e 500 µm di spessore circa, con due diversi strati porosi nello spessore della parete: uno strato interno altamente poroso di circa 100 µm di spessore, e uno esterno a bassa porosità (circa 400 µm di spessore). Questa conformazione geometrica è stata realizzata in base a precedenti conclusioni che innesti con una struttura altamente porosa della superficie luminale sono meno trombogenici rispetto a quelli non porosi. Lo strato esterno più denso fornisce invece agli innesti la necessaria compliance e robustezza meccanica (Figura 51).

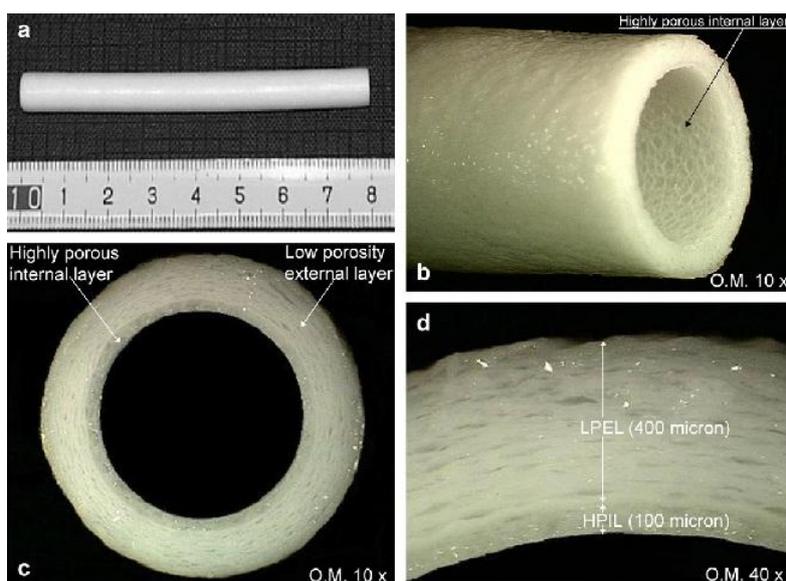


Figura 51 – L’innesto in PETU-PDMS in questione.

La compliance sulla circonferenza del vaso sintetico è stata determinata misurando la variazione del diametro nel corso di un cambiamento di pressione interna fisiologicamente realistico (diastolica/sistolica) ed è stato calcolato secondo la seguente espressione:  $\Delta D / (\Delta P * D)$ , dove  $\Delta D$  è la differenza tra diametro massimo e minimo,  $\Delta P$  è la differenza tra pressione massima e minima e  $D$  è il diametro diastolico. Le misurazioni sono state eseguite utilizzando un’apposita macchina di prova (DCT3, Dynatec Delta, Galena, MO, USA) che permette la determinazione della variazione di pressione interna a seguito di volumi calibrati iniettati nell’innesto indagato. Le prove sono state eseguite a 72 bpm in un intervallo di pressione che va da 80 a 120 mmHg. A 100 mmHg, i test condotti sugli innesti in ePTFE e PETU-PDMS evidenziano un valore medio di compliance circonferenziale del 1,5 % e del 9,21 %, rispettivamente. Quest’ultimo risultato è dello stesso ordine di grandezza di quello riportato da arterie carotidi ovine e canine ed è sicuramente molto migliore di quello degli innesti in ePTFE standard.

Otto pecore adulte con un peso di circa 60 kg sono state utilizzate per questo studio sperimentale della durata di 6 mesi (innesti di entrambi i materiali) e 24 mesi (soli innesti in PETU-PDMS). L’arteria carotide di ovino è stata considerata un modello

animale adatto, in quanto l'anatomia del collo della pecora lo rende adatto a impianti di innesti relativamente lunghi e perché il sistema di coagulazione di questo animale è considerato simile a quello degli esseri umani; inoltre, l'utilizzo della pecora nelle sperimentazioni è raccomandato dagli International Regulatory Affairs Offices della FDA.

Al momento dell'impianto, gli innesti in PEtU-PDMS erano morbidi ed elastici, facili da tagliare e suturare rispetto a quelli in ePTFE. Dopo il ripristino del flusso sanguigno attraverso il trapianto, era visibile a occhio nudo e al tocco una dilatazione pulsatile degli innesti in PEtU-PDMS, mentre nessuna dilatazione è occorsa in quelli in ePTFE. A 6 e 24 mesi dopo l'impianto tutti gli innesti in PEtU-PDMS erano ancora pulsatili ed elastici, mentre quelli in ePTFE sono risultati ancora più rigidi del principio a causa di calcificazioni interne.

La valutazione della pervietà degli innesti è stata effettuata con un Eco Doppler pulsato. All'espianto dopo 6 mesi tutti e otto gli innesti in PEtU-PDMS si sono mostrati pervi, mentre 2 dei 4 innesti ePTFE sono stati trovati occlusi; anche dopo i 24 mesi tutti gli innesti PEtU-PDMS erano ancora pervi.

Qualche giorno prima della conclusione del test, il sito di impianto è stato analizzato con una tomografia computerizzata che ha mostrato un moderato grado di allargamento radiale della parte centrale degli innesti in PEtU-PDMS, ma senza difetti di perfusione o rotture, con normali zone di anastomosi e senza alcuna formazione di aneurismi (Figura 52).



Figura 52 – Tomografia computerizzata della zona di impianto dell'innesto in PEtU-PDMS a 24 mesi. Si può notare il leggero allargamento radiale, maggiormente evidente nella zona prossimale.

L'osservazione degli innesti in PEtU-PDMS espantati dopo 6 mesi ha mostrato una superficie luminale priva di trombi; le estremità degli innesti erano tutte parzialmente coperte da un tessuto neointimale biancastro che si è esteso in modo omogeneo verso l'interno per circa 3 cm dall'anastomosi prossimale e 2 cm da quella distale, mentre la porzione centrale è apparsa coperta da un sottile strato di materiale rossastro fibrinoso (Figura 54). Nessuno degli innesti in PEtU-PDMS ha mostrato segni di calcificazione dopo 6 mesi. Diversamente, l'osservazione dei vasi sintetici in ePTFE espantati dopo 6 mesi ha rivelato che due di questi erano quasi completamente occlusi da trombi. Tutti gli innesti in ePTFE hanno mostrato segni macroscopici di calcificazione, anche molto forte (3 casi su 4). Nella parte centrale dell'innesto erano visibili piccole formazioni di trombi legate ad una neointima apparsa irregolare e frammentaria (estese zone della superficie del trapianto ne erano prive) (Figura 54).

Dall'esame dei vasi in PEtU-PDMS espantati dopo 24 mesi è risultato che tutti erano pervi, con una superficie luminale completamente coperta da una neointima continua biancastra e senza alcun segno di calcificazione (Figura 55). La tabella a pagina seguente sintetizza i risultati ottenuti.

	ePTFE	PETU-PDMS	PETU-PDMS
	6-Months	6-Months	24-Months
Thrombus	2/4	0/4	0/4
Patency	2/4	4/4	4/4
Radial Enlargement (%)	104.5 ± 3.2	110.5 ± 4.4	140 ± 7.3
Calcification	4/4	0/4	0/4

Figura 53 – Tabella riassuntiva che mostra presenza di trombi, pervietà, allargamento radiale e calcificazione nei vari innesti.

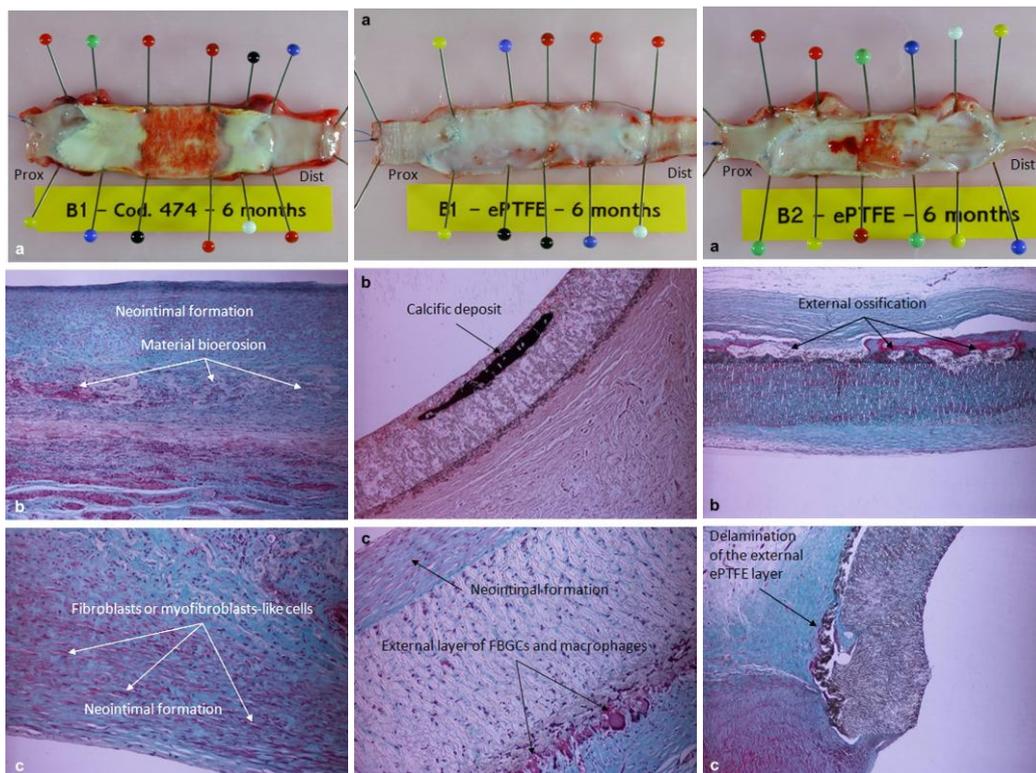


Figura 54 - A sinistra: Innesto in PETU-PDMS a 6 mesi. Si nota l'endotelizzazione della superficie luminale delle zone anastomotiche (a); sezione longitudinale dell'innesto vicino all'anastomosi prossimale che mostra uno strato relativamente spesso di neointima (b); dettaglio di sezione longitudinale dell'innesto in una zona vicina all'anastomosi distale che denota la presenza di fibroblasti. Al centro e a destra: Innesti in ePTFE dopo 6 mesi di impianto. Si notano formazione di trombi (a a destra) calcificazioni e ossificazioni (b centrali), una neointima biancastra piuttosto sottile e irregolare (c centrale)

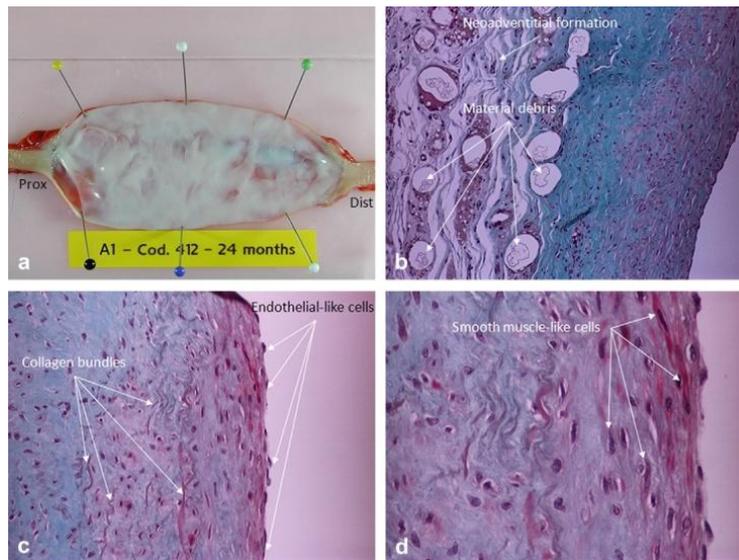


Figura 55 – Innesto in PETu-PDMS dopo 24 mesi di impianto, internamente completamente ricoperto da neointima biancastra (a). Negli ingrandimenti si vede la superficie esterna del vaso erosa e rimpiazzata da una neoavventizia (b), fibre di collagene orientate (c), neointima (c) e cellule muscolari lisce (d) sulla superficie luminale.

Dall'analisi istopatologica non è emerso alcun segno di IH. La superficie perimplantare di tutti gli innesti in PETu-PDMS è apparsa invasa da un abbondante tessuto fibrovascolare penetrato nei pori della parete del vaso sintetico. Dal vaso adiacente è cresciuta una neointima relativamente spessa (di circa 330  $\mu\text{m}$ ), contenente fibroblasti, mostrando alcuni segni di integrazione con il tessuto perimplantare infiltratosi nella parete. Sotto la neointima era visibile un processo di bioerosione, con un moderato numero di macrofagi e cellule giganti multinucleate da corpo estraneo, presenti in tutto il materiale. Al contrario, per gli innesti ePTFE si è assistito ad una moderata infiltrazione del tessuto perimplantare insieme ad assenza di neointima o formazione di strati fibrosi relativamente sottili. Le osservazioni dell'analisi istopatologica sono riassunte nella tabella a pagina seguente.

		ePTFE	PETU-PDMS	PETU-PDMS
		6-Months	6-Months	24-Months
Main morphological and histological observations	Implant material aspect	Wall of 650 $\mu\text{m}$ . Classical expanded microporous structure – IND approx. 40 $\mu\text{m}$ )	Wall of 500 $\mu\text{m}$ . Two layers 3D structure: microfibrillar HPIL (140 $\mu\text{m}$ ) and fibro-lamellar LPEL (30 $\mu\text{m}$ )	Remnants. Biodegraded (replacement of the graft by a fibro-connective wall of 840 $\pm$ 50 $\mu\text{m}$ )
	Graft junction	No failure	No failure	Continuity
	Perigraft surface	Limited to moderate perigraft tissue infiltration	Abundant perigraft tissue infiltration	Signs of neoadventice formation
	Inflammatory reaction	Low (macrophages, giant cells). No infection	PETU-PDMS > ePTFE (slightly). No infection	Decreased. Smooth-muscle-like cells differentiation
	Calcification	Calcific deposits (4/4) and ossification (1/4 samples)	No calcific deposits	No calcific deposits
	Luminal surface	No mural thrombus	Thin thrombus deposition in the medial segment	No mural thrombus
	Neointimal formation and degree of endothelialization	Relatively thin (245 $\pm$ 15 $\mu\text{m}$ ), fibrous, non-homogeneous (patchy) neointimal formation. Luminal surface moderately or markedly endothelialized.	Relatively thick (330 $\pm$ 20 $\mu\text{m}$ ) more differentiated neointimal formation (fibroblast or myofibroblast) extending approx. 2–3 cm from the anastomosis. No neointimal formation and endothelium in the medial segment	Completely endothelialized
	Material biodegradation	Absent to almost absent	Signs of material biodegradation	Almost complete
Systemic reaction	No analysis performed	No analysis performed	Absent (no analysis of the brain)	

Figura 56 – Tabella che riassume le osservazioni istopatologiche.

L'analisi SEM ha confermato le osservazioni dell'analisi istopatologica. L'endotelizzazione degli innesti in ePTFE è sembrata più rapida, tuttavia alcune zone dell'innesto erano prive di endotelio; per i vasi in PETU-PDMS è stata invece completa (lungo tutta la lunghezza dell'innesto), anche se più lenta – probabilmente a causa del denso strato fibroso –; inoltre le cellule endoteliali erano maggiormente differenziate, orientate e saldamente ancorate alla superficie luminale rispetto a quelle sul ePTFE.

Un'ultima interessante osservazione consiste nel fatto che l'innesto è stato quasi completamente biodegradato e sostituito dal tessuto senza mostrare le patologie tipiche degli impianti di innesto vascolare di piccolo calibro. I campioni hanno mostrato la sostituzione del materiale della parete con uno strato fibroconnettivo di circa 840  $\mu\text{m}$  e segni di formazione di una neoavventizia esterna e neointima interna. In alcune aree dei campioni si sono notati i segni della formazione di muscolatura: cellule muscolari lisce orientate in senso longitudinale e circolare in prossimità di fasci di collagene tipicamente ondulati (Figura 55).

## 5. CONCLUSIONI

Anche se la vena safena autologa è considerata il vaso ideale per ricostruzioni vascolari di piccolo calibro, non è sempre disponibile al trapianto (circa 1/3 dei casi clinici registrati), in quanto può trovarsi in cattive condizioni oppure perché i pazienti ne sono privi a causa di un precedente prelevamento. In questi casi è necessario un innesto alternativo. Le attuali tecniche di tissue engineering, anche se promettenti, non sono ancora a livello degli innesti sintetici i quali comunque rimangono l'unica alternativa nel caso di un intervento urgente.

Le ricostruzioni vascolari di arterie di largo diametro hanno in genere un tasso di successo piuttosto alto, ma la situazione è diversa nelle condizioni critiche che si registrano in vasi con diametro inferiore a 6 mm: il sangue scorre più lentamente prolungando di conseguenza il tempo di contatto con la parete; inoltre, la formazione di trombi e/o il sopraggiungere di iperplasia intimale di entità relativamente modesta nel vaso, a differenza di quanto avviene in innesti con diametro più grande, scaturirebbero l'occlusione dell'innesto e quindi un fallimento precoce della protesi.

Con l'obiettivo di attenuarne le problematiche, numerosi studi sono stati condotti sugli impianti vascolari di piccolo calibro nel corso degli anni, i quali, seppur registrando molteplici fallimenti, hanno definito importanti criteri da seguire nella fabbricazione di questo particolare tipo di protesi. Le proprietà meccaniche, in particolar modo la *compliance*, sono essenziali per permettere all'innesto sintetico di emulare il comportamento pulsatile dell'arteria e quindi di attenuare iperplasia intimale e migliorare il tasso di pervietà. È stato studiato anche il ruolo attivo dell'endotelio nel promuovere il processo di guarigione e integrazione al fine di scongiurare la formazione di trombi, come anche la porosità delle pareti esterna ed interna degli innesti, insieme all'orientamento e alla forma dei pori stessi, dimostratisi fondamentali per la crescita interna di tessuto poiché ne influenzano velocità e intensità.

ePTFE (politetrafluoroetilene) e Dacron (polietilene tereftalato) sono materiali standard nelle applicazioni di protesi vascolari di largo diametro, ma i tentativi di

utilizzare tali materiali protesici non hanno dato risultati clinici particolarmente soddisfacenti, nonostante i tentativi di migliorarne le prestazioni (ad esempio attraverso l'integrazione di sostanze anticoagulanti sulla parete dell'innesto); i principali indagati di questi fallimenti rimangono la rigidità del materiale, molto lontana dalle arterie invece elastiche, e la conformazione delle pareti, intrinsecamente difficili da penetrare da parte dei capillari esterni a causa della geometria interna dei pori non collegati fra loro, oltre che della formazione di un denso strato di fibrina sulla superficie dell'innesto.

Considerando porosità e *compliance* obiettivi importanti da raggiungere, l'attenzione si è spostata verso gli elastomeri in poliuretano, che hanno consentito di costruire innesti complianti sufficientemente porosi per una ricrescita interna. Il poliuretano esiste in varie forme (poli-etero/estere/carbonato poliuretano), non tutte però chimicamente stabili in ambiente fisiologico a causa della suscettibilità a degradazione ossidativa e idrolitica.

Le prospettive per gli innesti di piccolo calibro risiedono nelle nuove tecniche (vedi l'elettrospinning) e nelle varianti stabili dei poliuretani. In particolare è da segnalare un recente studio avvenuto in Italia condotto su una semi-IPN (*semi-interpenetrating polymer network*) PEtU-PDMS, che integra nella sua struttura polietere poliuretano (PEtU) e polidimetilsilossano (PDMS, la forma più comune del silicone) ed unisce le già citate ottime proprietà dei poliuretani alla stabilità chimica, alla lenta biodegradazione e alla non tossicità dei sottoprodotti.

## Bibliografia

1. **Soldani G, Losi P, Bernabei M, Burchielli S, Chiappino D, Kull S, Briganti E, Spiller D.** *Long term performance of small-diameter vascular grafts made of a poly(ether)urethane–polydimethylsiloxane semi-interpenetrating polymeric network.* 2010, *Biomaterials*, Vol. 31, p. 2592–2605.
2. **Xue L, Greisler HP.** *Biomaterials in the development and future of vascular grafts.* 2003, *J Vasc Surg*, Vol. 37, p. 472-480.
3. **Tiwari A, Salacinski H, Seifalian AM, Hamilton G.** *New prostheses for use in bypass grafts with special emphasis on polyurethanes.* 2002, *Cardiovascular Surgery*, Vol. 10, p. 191-197.
4. **Zilla P, Bezuidenhout D, Human P.** *Prosthetic vascular grafts: wrong models, wrong questions and no healing.* 2007, *Biomaterials*, Vol. 28, p. 5009-5027.
5. **Isenberg BC, Williams C, Tranquillo RT.** *Small-Diameter Artificial Arteries Engineered In Vitro.* 2006, *Circ. Res.*, Vol. 98, p. 25-35.
6. **Spiller D, Losi P, Briganti E, Sbrana S, Kull S, Martinelli I.** *PDMS content affects in vitro hemocompatibility of synthetic vascular grafts.* 2007, *J Mater Sci: Mater Med*, Vol. 18, p. 1097-1104.
7. **Losi P, Lombardi S, Briganti E, Soldani G.** *Luminal surface microgeometry affects platelet adhesion in small-diameter synthetic grafts.* 2004, *Biomaterials*, Vol. 25, p. 4447–4455.
8. **Kohler TR, Kirkman TR.** *Dialysis access failure: A sheep model of rapid stenosis.* 1999, *J Vasc Surg*, Vol. 30, p. 744-751.
9. **Heyligers JMM, Verhagen HJM, de Groot, Moll FL.** *Improving Small-Diameter Vascular Grafts: From the Application of an Endothelial Cell Lining to the Construction of a Tissue-Engineered Blood Vessel.* 2005, *Ann Vasc Surg*, Vol. 19, p. 448-456.
10. **Lahtinen M, Blomberg P, Baliulis G, Carlsson F, Khamis H, Zemgulis V.** *In vivo h-VEGF165 gene transfer improves early endothelialisation and patency in synthetic vascular grafts.* 2007, *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*, Vol. 31, p. 383-390.
11. **Byrom MJ, Bannon PG, White GH, Martin KC.** *Animal models for the assessment of novel vascular conduits.* 2010, *J Vasc Surg*, Vol. 52, p. 176-195.
12. **Lin PH, Bush RL, M.D., Yao Q, Lumsden AB, Chen C.** *Evaluation of Platelet Deposition and Neointimal Hyperplasia of Heparin-Coated Small-Caliber ePTFE Grafts in a Canine Femoral Artery Bypass Model.* 2004, *Journal of Surgical Research*, Vol. 118, p. 45–52.
13. **Kidd KR, Patula VB, Williams SK.** *Accelerated Endothelialization of Interpositional 1-mm Vascular Grafts.* 2003, *Journal of Surgical Research*, Vol. 113, p. 234–242.

14. **Tai NR, Salacinski HJ, Edwards A, Hamilton G, Seifalian AM.** *Compliance properties of conduits used in vascular reconstruction.* 2000, Br J Surgery, Vol. 87, p. 1516–24.
15. **Contreras MA, Quist WC, Logerfo FW.** *Effect of porosity on small-diameter vascular graft healing.* 2000, Microsurgery, Vol. 20, p. 15-21.
16. **Zhang Z, Wang Z, Liu S, Kodama M.** *Pore size, tissue ingrowth, and endothelialization of small-diameter microporous polyurethane vascular prostheses.* 2004, Biomaterials, Vol. 25, p. 177-187.
17. **Phaneuf MD, Dempsey DJ, Bide MJ, Quist WC, LoGerfo FW.** *Coating of Dacron vascular grafts with an ionic polyurethane: a novel sealant with protein binding properties.* 2001, Biomaterials, Vol. 22, p. 463-469.
18. **Toesa GJ, van Muiswinkelb KW, van Oeverenc W, Suurmeijera AJH, Timensa W,Stokroosd I, van den Dungen JJAM.** *Superhydrophobic modification fails to improve the performance of small diameter expanded polytetrafluoroethylene vascular grafts.* 2002, Biomaterials, Vol. 23, p. 255-262.
19. **Laredo J, Xue L, Husak VA, Ellinger J, Singh G, Zamora PO, Greisler HP.** *Silyl-heparin bonding improves the patency and in vivo thromboresistance of carbon-coated polytetrafluoroethylene vascular grafts.* 2004, J Vasc Surg, Vol. 39, p. 1059-1065.
20. **Begovac PC, Thomson RC, Fisher JL, Hughson A, Gallhagen.** *Improvements in GORE-TEX Vascular Graft Performance by Carmeda BioActive Surface Heparin Immobilization.* 2003, Eur J Vasc Endovasc Surg, Vol. 25, p. 432-437.
21. **Lord MS, Yu W, Cheng B, Simmons A, Poole-Warren L, Whitelock JM.** *The modulation of platelet and endothelial cell adhesion to vascular graft materials by perlecan.* 2009, Biomaterials, Vol. 30, p. 4898–4906.
22. **Santerre JP, Woodhouseb K, Laroched G, Labow RS.** *Understanding the biodegradation of polyurethanes: From classical implants to tissue engineering.* 2005, Biomaterials, Vol. 26, p. 7457-7470.
23. **Uttayarat P, Perets A, Li M, Pimton P, Stachelek SJ, Alferiev I, Composto RJ, Levy RJ, Lelkes PI.** *Micropatterning of three-dimensional electrospun polyurethane vascular grafts.* 2010, Acta Biomaterialia (Article in press).
24. **Larena-Avellaneda A, Dittmann G, Haacke C, Graunke F, Siegel R, Dietz A.** *Silicone-Based Vascular Prosthesis: Assessment of the Mechanical Properties.* 2008, Ann Vasc Surg, Vol. 22, p. 106-114.
25. **Rhodes N, Bellon JM, Bujan MJ, Soldani G, Hunt J.** *Inflammatory response to a novel series of siloxane-crosslinked polyurethane elastomers having controlled biodegradation.* 2005, J Mater Sci Mater Med, Vol. 16, p. 1207-1211.
26. **Briganti E, Losi P, Raffi A, Scoccianti M.** *Silicone based polyurethane materials: a promising biocompatible elastomeric formulation for cardiovascular applications.* 2006, J Mater Sci: Mater Med, Vol. 17, p. 259-266.