



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato in Medicina Cardiovascolare e Biotecnologie Chirurgiche ed Urologiche
Dipartimento di Discipline Chirurgiche, Oncologiche e Stomatologiche
Settore Scientifico Disciplinare MED/18

USO DI UNA PROTESI BIORIASSORBIBILE IN PHEA-PLA-PCL PER IL CONFEZIONAMENTO DI FISTOLE ARTERO-VENOSE STUDIO PRELIMINARE SU MODELLO SUINO

IL DOTTORE
VINCENZO DAVIDE PALUMBO

IL COORDINATORE
PROF. ATTILIO IGNAZIO LO MONTE

IL TUTOR
PROF. ATTILIO IGNAZIO LO MONTE

CICLO XXV
ANNO 2015

INDICE

1.	INTRODUZIONE	pag. 2
1.1	<i>Scaffold biorassorbibili: lo stato dell'arte</i>	pag. 2
1.2	<i>La chirurgia rigenerativa</i>	pag. 12
1.3	<i>L'ingegneria tissutale come approccio alla chirurgia rigenerativa</i>	pag. 15
1.4	<i>Materiali impiegati nell'ingegneria tissutale</i>	pag. 21
1.5	<i>Obiettivi</i>	pag. 30
2.	MATERIALE E METODI	pag. 31
3.	RISULTATI	pag. 45
4.	DISCUSSIONE	pag. 50
5.	CONCLUSIONI	pag. 55

BIBLIOGRAFIA

1. INTRODUZIONE

1.1 Scaffolds bioriassorbibili: lo stato dell'arte

Nella pratica clinica di oggi, vi è una forte necessità di alternative all'uso di graft vascolari autologhi usati per la chirurgia ricostruttiva vascolare (bypass coronarici, bypass degli arti inferiori, fistole artero-venose, riparazione di difetti congeniti del tratto di efflusso polmonare). D'altro canto, le lesioni vascolari dovute a traumi secondari ad incidenti stradali, al brillamento di ordigni esplosivi e le ferite da arma da fuoco, rappresentano fino al 90% di tutti i traumi vascolari riportati in letteratura, attirando l'attenzione della comunità scientifica mondiale.^{1,2} L'efficace riparazione di lesioni arteriose traumatiche è necessaria non solo per arrestare eventuali emorragie in corso, ma anche per migliorare e facilitare il flusso di sangue alle estremità distali o ad organi la cui irrorazione risulta essere compromessa da alterazioni nei tratti di afflusso arterioso e/o scarico venoso. Purtroppo, nei soggetti politraumatizzati, generalmente, si ha a disposizione poco tempo per stabilizzare il paziente, trattare l'ipotermia, le alterazioni del sistema coagulativo e l'acidosi metabolica. Attualmente, i vasi autologhi, ed in particolar modo la *vena safena*, sono i materiali più usati per la sostituzione di pareti arteriose di piccolo calibro.¹⁻³ La compatibilità immunologica è uno dei maggiori vantaggi offerti dall'utilizzo di questi patch "ready-to-use", tuttavia la disponibilità di idonei sostituti nativi potrebbe essere limitata in pazienti con patologia vascolare diffusa o nei politraumatizzati. Nei pazienti gravemente compromessi, il fisiologico insulto che incorre durante la raccolta della vena nativa deve

essere tenuto in considerazione e valutato alla luce della possibilità di utilizzare un patch alternativo. Per ridurre i tempi operatori, un condotto biologico può sorprendentemente sostituire un graft vascolare. In realtà i patch biologici utilizzati sono limitati ad alcune protesi e sono spesso rappresentati da *pericardio autologo*, *allogenico* o *xenogenico* (fissato in glutaraldeide).⁴⁻¹⁰ Purtroppo, questi patch hanno dei limiti ben noti tra i quali si annoverano le infezioni, la trombogenicità, la tendenza a calcificarsi, sono spesso causa di reazioni da corpo estraneo e non garantiscono un adeguato potenziale di crescita.⁴⁻¹⁰ Graft vascolari artificiali realizzati con materiali sintetici come il *poliestere* ed il *politetrafluoroetilene espanso* (*ePTFE*), vengono utilizzati di routine per ristabilire il flusso ematico in pazienti con vari disturbi cardiovascolari. Gli innesti convenzionali hanno clinicamente dimostrato una durata tutto sommato soddisfacente, tuttavia essi presentano ancora molti svantaggi, quali trombogenicità, stenosi e occlusione da iperplasia intimale (soprattutto negli innesti di piccolo calibro), suscettibilità alle infezioni, formazione di pseudoaneurismi e la mancanza di potenziale di crescita.^{3,11-13} In questo contesto, l'ingegneria dei tessuti si è inserita come uno dei più promettenti approcci per produrre sostituti vascolari biologicamente competenti. I campi della chirurgia in cui si rende necessario il ricorso a patch riassorbibili "ready-to-use" sono molteplici e comprendono: cardiocirurgia (trattamento delle patologie ischemiche cardiache), chirurgia vascolare (rivascolarizzazione distale dell'arto inferiore), neurochirurgia (riparazione di arterie intracraniche), chirurgia vascolare pediatrica, casi di ricostruzioni microchirurgiche dopo severi traumatismi della mano, confezionamento di fistole artero-venose per la dialisi, recupero di organi marginali da

donatore cadavere. Patch vascolari completamente biorassorbibili che hanno la capacità di indurre rigenerazione e crescita di una nuova parete vasale, possono superare i limiti degli attuali patch artificiali i quali sono costituiti da materiali non vitali, artificiali o allogenici, che mancano della capacità di crescita, riparazione e rimodellamento. Queste proprietà intrinseche limitano la funzione a lungo termine dei patch artificiali che presentano non solo l'onere del fallimento, ma anche dei rischi associati ai reinterventi. La necessità di un patch protesico che guidi la rigenerazione vascolare ha portato diversi autori a setacciare e percorrere diverse strade nell'ambito della ingegneria dei tessuti. Le strategie dell'ingegneria tissutale prendono le mosse da due assiomi: (1) la funzione dei vasi nativi, in particolare la funzione meccanica, dipende dalla loro struttura (caratteristico allineamento delle cellule muscolari lisce e delle fibre collagene della tunica media) e dalla loro composizione; (2) il vaso bioingegnerizzato, durante la fase di rimodellamento, da un lato vicaria la funzione e dall'altro fornisce una guida, un modello per il corretto allineamento del tessuto in fase di crescita. In una certa misura, tutti questi approcci si basano sulla capacità delle cellule (trapiantate o dell'ospite) di aderire e migrare all'interno dello scaffold e di rimodellare la sua composizione e/o struttura. È importante dire che, in linea di principio, il rimodellamento conferisce biocompatibilità, in virtù del riassorbimento completo dello scaffold iniziale. Naturalmente, lo scaffold iniziale deve essere rimpiazzato da cellule derivate dalla matrice extracellulare (ECM). Il rimodellamento determina anche quelle che sono le proprietà meccaniche e biologiche finali. È stato dimostrato che la morfogenesi tissutale è fortemente influenzata dalle

interazioni tra le cellule e la ECM durante il normale sviluppo del tessuto. I semplici supporti polimerici che sono stati utilizzati in passato forniscono solo un supporto architettonico per lo sviluppo del neo-tessuto, e non imitano adeguatamente le complesse interazioni tra le cellule tessuto-specifiche e le cellule della ECM che promuovono la rigenerazione tissutale funzionale. Nell'ingegneria tissutale, i biomateriali dovranno mimare le funzioni biologiche e meccaniche della ECM che si trova nei tessuti dell'organismo, fungendo da ECM artificiale.

I futuri progressi nell'ingegneria tissutale dipenderanno dallo sviluppo di nuovi biomateriali capaci di modulare attivamente i comportamenti delle cellule per la rigenerazione tissutale funzionale. Oh e Lee, ad esempio, hanno sperimentato l'idrofilizzazione di *scaffold polimerici sintetici biodegradabili* per migliorare la compatibilità con cellule e tessuti.¹⁴ Questa tecnica è stata considerata un approccio semplice ed efficace per ottenere delle colture cellulari in vitro e la rigenerazione tissutale su scaffold polimerici sintetici, in vivo. Levorson ha descritto il suo lavoro di fabbricazione e caratterizzazione di *scaffold elettrospinnati* per la rigenerazione della cartilagine.¹⁵ I condotti generati sono stati in grado di mantenere la cellularità in condizioni di assenza di siero, nonché di favorire la deposizione di glicosaminoglicani. Oggi l'elettrospinning è stato ampiamente usato come metodo di fabbricazione per generare nanofibre con un'ampia gamma di diametri, da diversi micrometri a 100 nm, o meno, a seconda delle varie esigenze. Sebbene molte altre tecnologie siano usate per la fabbricazione di scaffold, solo poche ottengono strutture con le caratteristiche simili alla naturale ECM, come si verifica per l'elettrospinning. Durante

gli scorsi due decenni, l'elettrospinning è diventato un popolare metodo di fabbricazione, in quanto può essere applicato a molte discipline ed è un processo di filatura relativamente semplice e poco costoso. Shin e colleghi hanno riesaminato gli attuali approcci per lo sviluppo di nanofibre tramite elettrospinning per la creazione di scaffold.¹⁶ Questi materiali elettrospinnati possono essere funzionalizzati con l'aggiunta di segnali biochimici e meccanici per migliorare le interazioni cellulari. Xu ha invece presentato un nuovo *scaffold a doppia componente proteica* in grado di rilasciare sostanze in maniera controllata grazie a differenti gradi di idrofilicità del materiale.¹⁷ Un metodo alternativo per la costruzione ex novo di uno scaffold, è l'uso di *matrici tissutali decellularizzate*, ancora considerate un sistema ideale per la loro affinità strutturale e meccanica con i tessuti nativi, contenendo proteine della ECM tessuto-specifiche che permangono anche dopo la decellularizzazione. Yoo e colleghi hanno esaminato le tecniche di decellularizzazione e i possibili metodi per utilizzare queste matrici decellularizzate a scopi rigenerativi.¹⁸ Kim ha invece sviluppato un'impalcatura composita formata da collagene derivato dalla matrice della sottomucosa di una vescica porcina decellularizzata e da un polimero sintetico di acido poli(lattico-co-glicolide) (PLCA).¹⁹ Si è visto che questi scaffold compositi forniscono un microambiente che può facilitare la differenziazione osteogenica delle cellule staminali derivate dal liquido amniotico. Choi et al. Hanno invece investigato le interazioni tra ECM e cellule endoteliali corneali umane per migliorare la proliferazione e la funzione delle cellule.²⁰ Il gruppo di Shin'oka ha riportato la prima applicazione clinica di un patch vascolare ingegnerizzato inseminato con cellule del midollo osseo umano.²¹ Allo stesso modo, *materiali biodegradabili*

ingegnerizzati in un bioreattore, si sono dimostrati eccellenti potenziali sostituti cardiovascolari.²²⁻²⁸ Ad ogni modo, la procedura di insemminazione cellulare ex vivo è complicata, invasiva, costosa e causa potenziale di contaminazione. Per superare questi problemi, gli ultimi anni hanno segnato una sostanziale inversione di tendenza per quel che riguarda i criteri di progettazione dei biomateriali sintetici, portando allo sviluppo di *materiali funzionalizzati* con molecole che mimano alcuni aspetti della struttura o della funzione dei microambienti extracellulari presenti in natura.²⁹⁻³³ Takahashi ha sviluppato un nuovo patch ingegnerizzato, composto da *acido poliglicolico* (PGA) ed *acido polilattico* (PLA), che ha mostrato un discreto rimodellamento in situ, grazie all'azione di cellule ospiti situ-specifiche; tutto questo, senza alcuna insemminazione cellulare dello scaffold ex-vivo.³⁴ Purtroppo, il PGA può indurre una risposta infiammatoria locale in sede di impianto del patch.³⁵ Questa evidenza ha motivato molti autori a testare protesi vascolari interamente composte da un estere benzilico di *acido ialuronico* (HA). L'HA può essere processato per ottenere vari tipi di presidi, come condotti, membrane, garze e spugne. Tutti questi scaffold sono altamente biocompatibili, non elicitando, una volta impiantati nel corpo umano, reazioni avverse, bensì essendo totalmente riassorbiti dai tessuti che li ospitano.³⁶ L'HA è il solo glicosamminoglicano (GAG) non solforato dell'ECM. Malgrado la sua semplice struttura, esso è coinvolto in un gran numero di funzioni biologiche, come la proliferazione e la migrazione cellulare, la morfogenesi, la cicatrizzazione, l'infiammazione, l'angiogenesi e la crescita tumorale.³⁷⁻⁴¹ Un ruolo biologico importante è correlato alla stimolazione della secrezione di citochine pro-

infiammatorie ed alla proliferazione di cellule endoteliali.³⁷⁻⁴¹ Per di più, recenti studi hanno sottolineato il ruolo dell'HA nella stimolazione dell'endotelizzazione, favorendo il reclutamento non solo delle cellule endoteliali mature, ma anche dei loro progenitori.^{40,42} I progenitori endoteliali, infatti, hanno la capacità di migrare ed aderire all'interno di biomateriali a base di HA, mantenere il loro fenotipo pre-endoteliale ed esprimere fattori angiogenetici, in particolar modo durante la prima settimana di crescita.^{40,42} Questi risultati indicano che i biomateriali composti da HA potrebbero rappresentare il microambiente adatto per i progenitori endoteliali, portando al superamento dei problemi relativi agli attuali materiali delle protesi vascolari, non ancora in grado di reclutare cellule endoteliali, allo scopo di formare uno strato endoteliale funzionale ed omogeneo, l'unico in grado di restaurare l'omeostasi vascolare in sede di intervento. Inoltre, studi in vitro con preparazioni di gel di acido ialuronico hanno appurato le potenzialità elastogenetiche da parte delle cellule muscolari lisce (SMC) neonatali.^{43,44} Un gruppo di studio italiano ha ottenuto stimolanti risultati sperimentando, in modelli suini e murini, protesi vascolari interamente composte da HA.^{42,45-49} Cellule vascolari umane, quali le cellule endoteliali³⁹ e SMC⁴⁰, sono state coltivate in vitro su costrutti a base di acido ialuronico (HYAFF) per sviluppare nuovi sostituti vascolari. Precedenti studi in vivo^{42,45-47} hanno confermato che i condotti di esteri benzilici di acido ialuronico (cioè HYAFF-11) possono sequenzialmente orchestrare gli eventi di rigenerazione vascolare necessari per la costruzione di arterie molto piccole. HYAFF-11 ha già dimostrato di essere molto ben tollerato e di non suscitare reazioni avverse nella pratica clinica.^{39,40}

Uno tra i principali elementi strutturali della parete arteriosa è rappresentato dalle fibre elastiche che rivestono i vasi e donano ad essi la caratteristica proprietà di compliance.⁴⁸ Nelle arterie, l'elastina conferisce una resistenza meccanica a basse forze, prima che le fibre collagene, più rigide, siano impegnate. L'elastina inoltre conferisce elasticità e previene la rottura del tessuto a causa dello stiramento imposto dal carico e consente il ritorno alla configurazione iniziale non appena il carico cessa. Oltre alla sua azione meccanica, l'elastina è un potente regolatore autocrino dell'attività delle SMC vasali, e la sua regolazione è importante per prevenire una patologica fibrosi cellulare. Infine, la degradazione dell'elastina, assieme all'attività delle metallo-proteinasi della matrice (MMP), risulta essere un processo cellulo-mediato osservato in quasi tutti i tipi di calcificazioni vascolari. Peptidi di elastina associati con il transforming growth factor- β (TGF- β) possono indurre l'espressione di geni osteogenici nelle SMC, probabilmente attraverso il segnale del recettore elastina-laminina (ELR).^{13,48} La loro presenza in un graft vascolare potrebbe migliorare notevolmente la progettazione e la pervietà; inoltre, le fibre elastiche influenzano il comportamento delle cellule vascolari attraverso la diretta interazione e la regolazione di fattori di crescita. Studi di eliminazione dell'elastina e osservazioni cliniche hanno rivelato l'essenzialità della funzione regolatrice dell'elastina durante lo sviluppo dell'arteria. In assenza di elastina extracellulare, la proliferazione delle SMC porta verso la stenosi vascolare.⁴⁹⁻⁵³ Quindi, per garantire un'adeguata funzione meccanica e prevenire le gravi complicanze, i patch arteriosi devono incorporare una componente elastica. Ulteriori approcci hanno contemplato la costruzione di tessuti su uno *scaffold di elastina isolata da*

cadavere, fornendo tropoelastina solubile ad una coltura cellulare o progettando *polimeri biocompatibili di elastina sintetica*.¹³ Uno tra i più promettenti approcci è stato descritto da l'Hereux e coll., che hanno sviluppato una tecnica completamente autologa definita *sheet-based tissue engineering*.⁵⁴⁻⁵⁶ Fibroblasti dermici sono ottenuti da una piccola biopsia cutanea e coltivati in condizioni che promuovano la formazione di uno scaffold completo, pronto per essere impiantato in 6 mesi. Questo approccio richiede molto tempo, con una durata totale di produzione di circa 24 settimane. È plausibile che nelle tecniche precedenti^{21, 57-59} il cambiamento delle condizioni di coltura cellulare dal 2 al 3-D utilizzando scaffold porosi, possa aver contribuito ad una perdita della capacità di biosintesi dell'elastina da parte delle SMC. È ormai noto, infatti, che lo scaffold debba fornire la chimica adeguata affinché le SMC secernano elastina. Pochi scaffold sono in grado di promuovere la biosintesi di elastina.

La possibilità di creare una guida per la rigenerazione vascolare, completamente biodegradabile, direttamente in vivo e senza un preconditionamento chimico o cellulare in vitro, può superare i principali problemi legati alle tecniche attuali. Gli innesti tissutali attualmente studiati richiedono un lungo periodo di preparazione, e quindi non possono essere utilizzati in situazioni di emergenza.⁶⁰⁻⁶² Inoltre, la maggiore durata della coltura aumenta il rischio di infezione e aumenta i costi in termini di personale, attrezzature e materiali necessari.

Nei graft vascolari creati con l'ingegneria tissutale (TEVG) l'inseminazione con cellule autologhe o la crescita in bioreattori prima dell'operazione è generalmente necessaria per

migliorare la loro performance e antitrombogenicità. Molte strategie sono state recentemente tentate per facilitare la rigenerazione tissutale autologa su materiali artificiali. Uno dei metodi più in uso è la manipolazione cellulare preoperatoria.^{21,63,64} Kaushal e collaboratori hanno dimostrato la funzionalità di neovasi di piccolo diametro prodotti con cellule progenitrici endoteliali.⁶³ Un altro metodo efficace è l'uso di bioreattori.^{63,65,66} Campbell ha suggerito che la cavità peritoneale dell'ospite è un bireattore a tutti gli effetti e ha dimostrato che esso è utile per determinare la crescita di tessuti sulle protesi vascolari poste al suo interno.⁶⁷ Inoltre, Hoerstrup e coll. hanno dimostrato la capacità di crescita di cellule coltivate in vitro su TEVG per 21 giorni in condizioni biomimetiche.⁶⁶ Sebbene l'utilità di questi trattamenti sia pienamente riconosciuta, i loro svantaggi, che includono l'invasività, il rischio di contaminazione e tempi ancora lunghi di preparazione, ne hanno limitato l'uso clinico. Per queste ragioni, Torikai e coll. hanno utilizzato la cellularizzazione in situ come metodo alternativo, più adatto per l'applicazione clinica grazie alla sua pronta disponibilità.^{29,68,69} Il patch che hanno progettato è composto da tre strati: l'interno (lato luminale) è composto da PGA con morfologia knitted miscelato a collagene microsponge, lo strato centrale è di PCL, e l'esterno è composto da PLA con morfologia woven. Il graft PGA/PLA dopo esser stato impiantato nell'aorta del maiale, ha mostrato una buona cellularizzazione in situ, con un'endotelizzazione relativamente precoce ed il popolamento con SMC funzionali. L'innesto si è rivelato abbastanza resistente per sopportare condizioni di alta pressione per almeno 12 mesi dopo l'impianto; nonostante la presenza di uno strato di PLA residuo, la protesi si è dimostrata in grado di acquisire un'intrinseca funzione

vascolare fisiologica. Considerando la necessità di sviluppare protesi di piccolo diametro, l'endotelializzazione completa e precoce dimostrata dal TEVG è stata significativa, in particolare nel contesto di strutture vascolari di piccolo diametro, come le arterie periferiche. Le limitazioni di questo studio sono però la mancanza di rigenerazione e di elastina e la presenza degli strati di PLA residui.

1.2 La chirurgia rigenerativa

La *chirurgia rigenerativa* è un settore interdisciplinare emergente della ricerca e delle applicazioni cliniche, focalizzato sul riparo, la sostituzione, la rigenerazione di tessuti o organi al fine di ripristinarne la funzionalità danneggiata da una qualsivoglia causa, compresi i difetti congeniti, le malattie infettive e i traumi.^{70,71} Questo campo comprende aree terapeutiche che inizialmente si credevano separate, come la terapia cellulare e l'ingegneria tissutale (creazione in vitro di tessuti/organi per un successivo trapianto come innesti di tessuto o organi perfettamente funzionanti).⁷² In particolare, si parla di “*terapia cellulare*” quando non è richiesto l'uso di uno scaffold e di “*ingegneria tissutale*” quando invece esso è necessario per supportare la rigenerazione del tessuto danneggiato (fig.1).⁷³ Questi due settori contemplano la sostituzione (trapianto), la riparazione (terapia cellulare esogena) o la rigenerazione di un tessuto (mobilizzazione del pool di cellule endogene, come per esempio le staminali).⁷⁴⁻⁷⁶

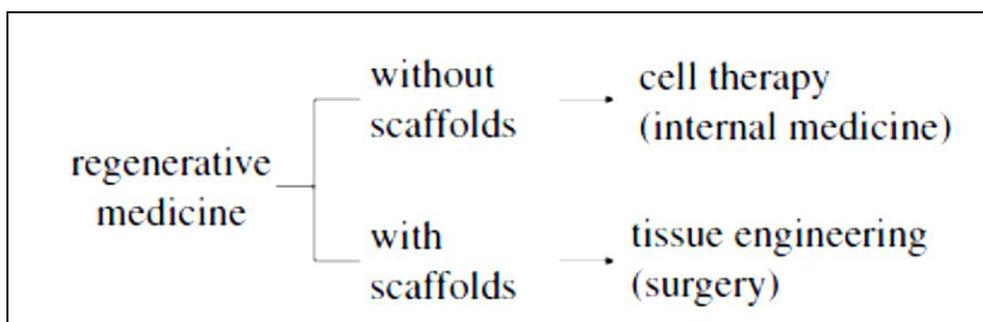


Figura1. Classificazione della medicina rigenerativa

La medicina rigenerativa utilizza, dunque, una combinazione di diversi approcci che la proiettano oltre il trapianto tradizionale e le terapie di sostituzione. Alcune tra le strategie utilizzate possono includere, ma non sono solo limitate ad esse, l'uso di cellule staminali, di molecole solubili, l'ingegneria genetica, l'ingegneria tissutale e la terapia cellulare avanzata.⁷⁷

Lo scopo di questa nuova branca della medicina, non è solo quello di rimpiazzare ciò che funziona male, bensì quello di fornire gli elementi richiesti per la riparazione in vivo, progettando sostituti che interagiscano con l'organismo vivente e allo stesso tempo ne stimolino le capacità intrinseche per la rigenerazione.^{77,78} Sebbene sia ancora un campo emergente, la medicina rigenerativa ha già dato vita a nuovi approcci terapeutici, come il sostituto di pelle ingegnerizzata Apligraf^{79,80} o la terapia rigenerativa dell'osso con cellule staminali adulte Osteocel.⁸¹

Le cellule e i materiali rappresentano le fondamenta della medicina rigenerativa. Diversi tipi cellulari sono stati utilizzati e sono attualmente utilizzati nella medicina rigenerativa.⁸²

Prima dell'isolamento e dell'identificazione delle cellule staminali umane venivano

impiegate le cellule isolate dai tessuti adulti. Queste erano usate in combinazione con dei materiali naturali o sintetici e rappresentavano un mezzo per valutare, in base alle caratteristiche strutturali di questi, le loro proprietà rigenerative.⁸³

Le cellule staminali di topo sono state isolate per la prima volta nel 1981⁸⁴ mentre le cellule staminali embrionali (ES) nel 1998.⁸⁵

A partire dalla loro identificazione, l'interesse si è focalizzato su un potenziale utilizzo di queste cellule per la medicina rigenerativa proprio perché esse hanno la capacità di differenziarsi nelle linee cellulari dei tre foglietti embrionali (endoderma, mesoderma ed ectoderma).⁸⁶ Queste cellule, data la loro intrinseca capacità di proliferare e differenziarsi in tutti i tipi cellulari (pluripotenza), rappresentano un'enorme risorsa per la medicina rigenerativa. Purtroppo, i problemi etici e la loro origine allogenica ne limitano il potenziale. Una fonte alternativa di cellule staminali pluripotenti che offre meno problematiche di natura etica è stata proposta recentemente.⁸⁷ Nel 2006, Takahashi e Yamanaka hanno dimostrato che le cellule della pelle derivanti sia dall'embrione che dal topo adulto possono essere riprogrammate a cellule staminali pluripotenti (iPS) attraverso l'uso dei cosiddetti "fattori di Yamanaka": Oct4, Sox2, Myc e Klf4.⁸⁸

Con la *chirurgia rigenerativa*, la riparazione di un tessuto non sano o il ripristino delle funzioni dell'organismo si possono ottenere tramite un trattamento definitivo, differendo in tal modo completamente dalle attuali pratiche basate sull'utilizzo di procedure farmacologiche o chirurgiche. Con i tradizionali approcci farmacologici, infatti, il paziente ha bisogno di una terapia per un periodo di tempo considerevole, se non per sempre.

Nonostante la terapia cellulare sia costosa per la produzione e/o la somministrazione, l'obiettivo sarà quello di dare luogo ad un ripristino permanente della funzione perduta del tessuto o dell'organo, ragion per cui, in ultima analisi, essa risulta più economica e apporta maggiori benefici rispetto alle attuali pratiche mediche.⁸⁷ Le applicazioni della chirurgia rigenerativa sono molteplici specialmente tenendo conto del fatto che il livello di invecchiamento della popolazione va aumentando sempre più, e con esso l'incidenza delle malattie legate a determinate fasce di età. Per esempio, le cellule possono essere usate come veicoli per la terapia genica,⁸⁹ mentre le cellule in coltura possono essere utilizzate per studiare uno specifico processo patologico o lo sviluppo di un farmaco in vitro. La scoperta delle iPS offre inoltre la possibilità di creare modelli di malattia per sostenere la scoperta di nuovi farmaci e per ottenere cellule specifiche del paziente a scopi terapeutici.⁹⁰

1.3 L'ingegneria tissutale come approccio alla chirurgia rigenerativa

I continui progressi della scienza medica e delle tecniche chirurgiche hanno permesso al trapianto, sia esso di tessuti o di interi organi, di diventare una delle opzioni potenziali per ripristinare le funzioni native di molte parti danneggiate del corpo umano. Sfortunatamente, la crescente richiesta di trapianti supera di gran lunga l'effettiva disponibilità da parte dei donatori di tessuti utilizzabili. Insieme ad altre questioni, come i problemi immunologici e la possibile contaminazione del tessuto donatore, la tecnica dei trapianti ha incontrato diversi limiti. Pertanto, una nuova tecnica è necessaria per ridurre questa discrepanza tra fabbisogno clinico e tessuti o organi sani disponibili. *L'ingegneria*

tissutale, come branca della chirurgia rigenerativa, è emersa come un nuovo approccio versatile per la riparazione/rigenerazione di tessuti danneggiati, con la potenzialità di superare i limiti delle terapie tradizionali.⁹¹

L'ingegneria tissutale è un campo interdisciplinare che applica i principi della biologia cellulare, della scienza dei materiali e dell'ingegneria biomedica per creare sostituti biologici finalizzati a ripristinare e mantenere la normale funzione di tessuti/organi malati e danneggiati (fig.2).

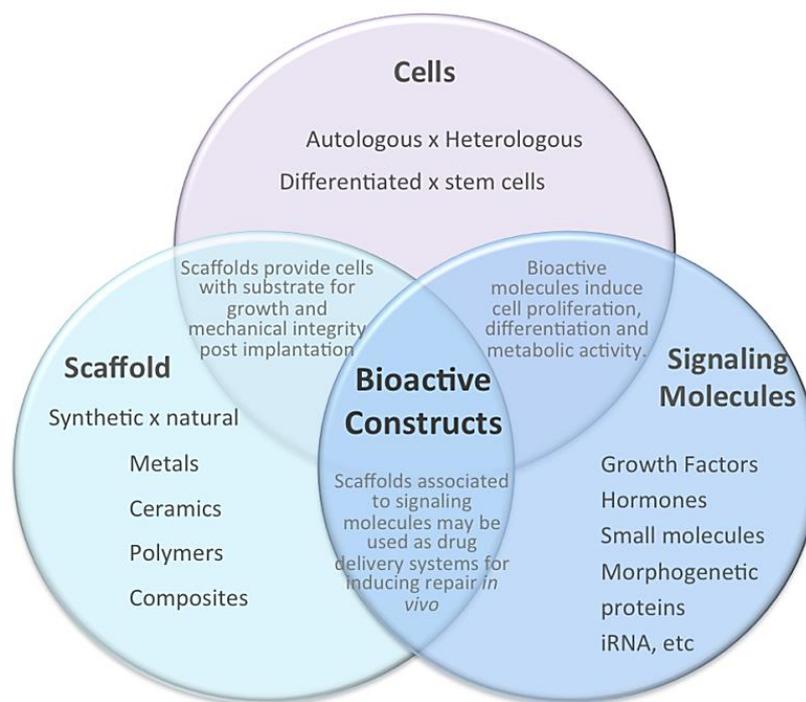


Figura 2. I tre componenti di base dell'ingegneria tissutale

Una delle principali sfide della traslazione dell'ingegneria tissutale alla clinica è la difficoltà di ricreare la complessità dei tessuti e degli organi, in modo da poterli utilizzare come sostituti in grado di vicariare in tutto e per tutto le funzioni degli organi o tessuti che sono venuti a mancare. I tessuti sono costituiti da cellule e matrice extracellulare (ECM), e differiscono tra loro per tipologia, contenuto e organizzazione di questi. In ingegneria dei tessuti, queste differenze devono essere considerate prima di scegliere biomateriali e progettare scaffold per una specifica applicazione.

Inoltre, i risultati di numerosi studi di valutazione delle interazioni cellula-biomateriale suggeriscono che i biomateriali su scala micro-/nanometrica possono anche agire come un "segnale" fisico che può influenzare il comportamento delle cellule, come l'adesione, la diffusione, la motilità, la sopravvivenza e differenziamento.⁹²

Si possono adottare differenti strategie che sfruttano l'ingegneria tissutale per la rigenerazione di tessuti persi, danneggiati o malati, ma in genere il tessuto di interesse determina il tipo di approccio scelto. Gli approcci più comuni comprendono: l'inseminazione di cellule su uno scaffold impiantato, l'impianto di tessuti cresciuti in vitro su uno scaffold, oppure l'impianto di scaffold senza cellule per supportare la rigenerazione tissutale in situ.

Quale che sia la scelta, lo scaffold deve fornire una struttura tridimensionale che supporti la crescita di nuovo tessuto al suo interno con proprietà simili al tessuto che deve essere sostituito.⁹³

L'adesione, la proliferazione e il differenziamento delle cellule sono fortemente influenzati dal microambiente associato allo scaffold così come dalla dimensione, dalla geometria, dalla densità dei pori, dalle finestre che connettono i pori e dalle proprietà della superficie.⁹⁴ Ci sono diverse proprietà chiave da considerare nella scelta dei materiali per l'ingegneria tissutale:

1. Biocompatibilità

Le cellule devono proliferare, migrare e funzionare normalmente dopo l'attecchimento allo scaffold. Inoltre non ci dovrebbe essere nessuna reazione avversa da corpo estraneo nei confronti del materiale dopo l'impianto. Anche i sottoprodotti della degradazione non devono essere tossici per le cellule.⁹⁵

2. Biodegradazione controllata

L'ospite rimodellerà il tessuto ingegnerizzato impiantato e col tempo lo degraderà. La velocità di degradazione del biomateriale dovrebbe corrispondere alla contemporanea produzione di nuova matrice extracellulare da parte dell'ospite. Se il tasso di degradazione è troppo lento la formazione di tessuto nascente potrebbe essere ostacolato; viceversa, se la velocità di degradazione è troppo veloce, la stabilità meccanica, e quindi la funzione del tessuto ingegnerizzato potrà essere compromessa.⁹⁶ Un modo per controllare la velocità di degradazione è quella di legare allo scaffold peptidi sensibili ad alcuni enzimi come viene attualmente fatto per l'idrogel di polietilene glicole (PEG) con le MMP.^{97,98} Altri metodi includono la regolazione del rapporto dei due composti durante la polimerizzazione, come la variazione del PGA e del PLA per la formazione dell'acido poli-(lattico-co-glicolico).⁹⁹

3. Proprietà di superficie

Un biomateriale interagirà con le cellule ospiti e influenzerà le loro attività.¹⁰⁰ Il biomateriale dovrebbe contenere ligandi (siti di legame e peptidi di segnalazione) che facilitino queste interazioni, come l'adesione delle superfici cellulari.¹⁰¹ I biomateriali naturali possiedono questi ligandi, mentre i materiali sintetici possono richiedere modifiche come il legame con la gelatina,¹⁰² o con frammenti di proteine fibronectina-mimetici,^{103,104} o con sequenze Arg-Gly-Asp (RGD)-like per i siti di adesione cellulare.¹⁰⁵

4. Proprietà meccaniche

Le proprietà meccaniche del biomateriale dovrebbero simulare dal punto di vista meccanico l'ambiente del sito anatomico target.¹⁰⁶ Le proprietà meccaniche possono molte volte essere caratterizzate dal modulo di Young (E). La "E" riguarda lo stress (forza per unità di superficie) all'interno di un materiale sottoposto alla deformazione. Tanto più un tessuto sarà "rigido", ossia avrà una deformazione inferiore per un dato stress, tanto più grande sarà la sua "E". La rigidità del materiale può essere facilmente modulata variando la concentrazione del polimero (ad esempio, la concentrazione di fibrinogeno in gel di fibrina),¹⁰⁷ ibridandolo con altri materiali (ad esempio, un polimero naturale),¹⁰⁸ o effettuando un cross-link successivo alla polimerizzazione.¹⁰⁹

5. Densità e struttura dei pori

La dimensione dei pori e la porosità sono di primaria importanza. I biomateriali devono presentare dei pori per facilitare l'homing cellulare così come il trasporto di nutrienti e sostanze di scarto.¹¹⁰ La porosità è generalmente caratterizzata dalla frazione volumetrica

dei materiali. Il requisito di porosità è altamente tessuto-specifico, poiché diversi tipi cellulari preferiscono diverse dimensioni dei pori.^{95,111} La dimensione dei pori può anche essere facilmente modulata in materiali sintetici. Per esempio, il metodo di centrifugazione può alterare le dimensioni dei pori in scaffold di PCL, e il tempo di congelamento può alterare la dimensione dei pori nello scaffold di collagene.^{112,113} Per una buona semina cellulare è auspicabile un'uniforme dimensione dei pori ed un'interconnessione tra gli stessi.^{114,115} Generalmente le dimensioni devono essere comprese tra i 100 ed i 200 μm .

È noto che la dimensione dei pori influisce sull'affinità e sulla vitalità cellulare, influenzando il movimento cellulare, il legame e la diffusione di fattori solubili paracellulari, il signaling intercellulare e il trasporto di nutrienti e metaboliti.¹¹⁶ La porosità determina lo spazio massimo disponibile per la massa cellulare nello scaffold; tuttavia, alti valori di porosità spesso compromettono le proprietà meccaniche dello scaffold.¹¹⁷ Dal punto di vista dell'applicazione, la dimensione dei pori e la porosità influenzano anche la neovascolarizzazione in vivo; infatti, tra i tanti problemi dell'ingegneria tissutale, un sufficiente apporto di ossigeno e nutrienti tramite lo scaffold è considerato come un prerequisito fondamentale per ottenere un'elevata vitalità delle cellule.

Inoltre, anche l'architettura dello scaffold richiede una certa considerazione. Una rete intricata di pori interconnessi riduce al minimo lo spazio morto, mentre la sua eccessiva tortuosità potrebbe alterare la circolazione del liquido interstiziale ed il trasporto di massa.¹¹⁸

L'architettura dello scaffold ha un'importanza sempre più crescente nell'ingegneria tissutale, e ciò ha portato ad un cambiamento di tendenza nella progettazione degli stessi, variando da scaffolds isotropici a scaffolds "biomimetici", eterogenei e anisotropi, il cui obiettivo è quello di mimare l'organizzazione delle cellule (come l'allineamento o il clustering) e/o della ECM del tessuto di interesse.⁹²

1.4 Materiali impiegati nell'ingegneria tissutale

Molti materiali polimerici sono in grado di provocare una reazione da parte del tessuto dell'ospite e perciò sono in grado di innescare un processo rigenerativo senza l'aggiunta di cellule. Questi materiali, pertanto, risultano potenzialmente utili per fini rigenerativi. Inoltre, i materiali polimerici possono essere usati come carrier cellulari o come veicoli per il rilascio di agenti terapeutici o fattori angiogenetici. Idealmente, per l'impianto, il materiale dovrebbe essere riassorbibile e dovrebbe essere inerte dal punto di vista farmacologico.⁸⁷ L'avvento della nanotecnologia ha permesso ulteriori sviluppi nel campo dei biomateriali, dato che le superfici nanomodificate possono indurre una migliore risposta cellulare rispetto alle superfici non trattate e un differenziamento più lungo e specifico dopo che le cellule vengono messe a contatto con questi materiali.¹¹⁹ I polimeri biocompatibili attualmente in uso, o in fase di sperimentazione, hanno una modalità d'azione più specifica che dipende dal tipo di materiale ingegnerizzato, dalla sua struttura molecolare, dalla sua superficie nanomodificata e dalle sue proprietà meccaniche.

La ricerca sui biomateriali ha assunto una crescente importanza negli ultimi anni e si è posta l'obiettivo di progettare ed ingegnerizzare materiali in grado di mimare le funzioni delle strutture naturali e di interagire positivamente con le cellule. Si definisce infatti *biomateriale* un materiale concepito per interfacciarsi con i sistemi biologici, per dare supporto o sostituire un qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo.¹²⁰

I biomateriali possono essere utilizzati sia in impianti permanenti o protesi (campo biomedico), sia in dispositivi che sono a contatto con il corpo umano per un periodo di tempo limitato (campo farmaceutico).¹²¹

Le prestazioni dei materiali impiegati in campo medico sono valutate in base alla loro biofunzionalità e biocompatibilità. La *biofunzionalità* si riferisce alle proprietà che un dispositivo deve avere per riprodurre una determinata funzione dal punto di vista fisico e meccanico; la *biocompatibilità*, invece, alla capacità del dispositivo di continuare a svolgere quella determinata funzione durante tutta la vita utile dell'impianto ed è strettamente connessa, quindi, alle interazioni tra i biomateriali ed i tessuti con cui vengono a contatto.¹²²

Due sono le caratteristiche principali che vanno considerate nella valutazione della biocompatibilità di un materiale: la resistenza del materiale ai processi di degradazione e gli effetti che i prodotti di tali processi hanno sui tessuti. Nell'ingegneria tissutale, i biomateriali mimano le funzioni biologiche e meccaniche della ECM che si trova nei tessuti dell'organismo fungendo da ECM artificiale (fig.3).

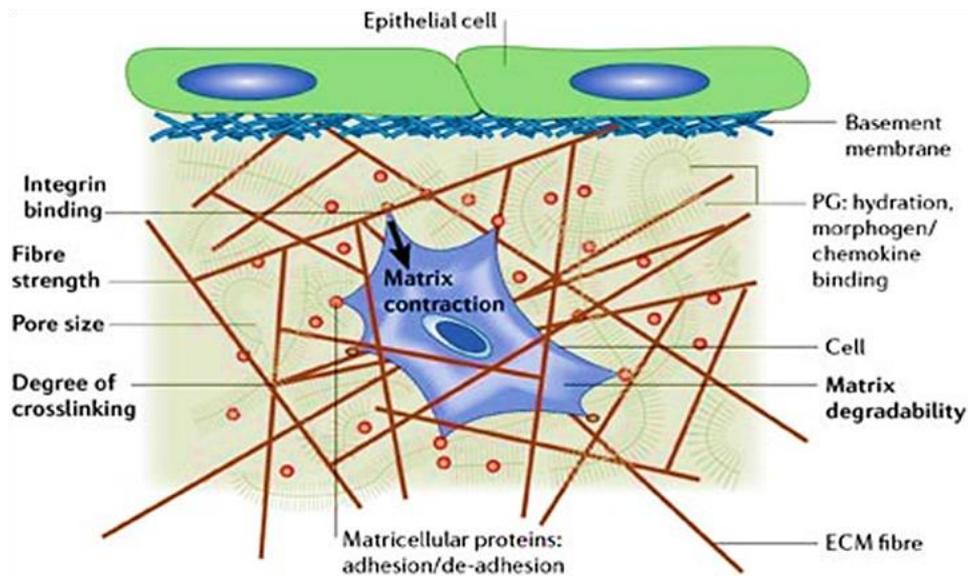


Figura 3. Struttura della matrice extracellulare

Come conseguenza, i biomateriali offrono una struttura tridimensionale alle cellule per permettere ad esse di formare nuovi tessuti con un'appropriata struttura e funzione e, possono anche permettere il rilascio di cellule e di fattori bioattivi (peptidi coinvolti nel processo di adesione cellulare, fattori di crescita), nelle sedi di interesse all'interno dell'organismo. Poiché la maggior parte dei tipi cellulari necessita di un substrato per l'ancoraggio e va incontro a morte se questo non è presente, i biomateriali forniscono quindi un supporto per l'adesione delle cellule in specifici siti dell'organismo. I biomateriali possono anche offrire un sostegno meccanico contro le forze che agiscono in vivo in modo tale che la predefinita struttura tridimensionale venga mantenuta durante lo sviluppo del tessuto. In definitiva, i biomateriali offrono un supporto meccanico temporaneo che permette al tessuto di crescere in tre dimensioni mentre le cellule vanno incontro ad una

riorganizzazione spaziale. Il biomateriale, opportunamente scelto, dovrebbe consentire al tessuto ingegnerizzato di mantenere un'integrità meccanica sufficiente da supportarlo durante lo sviluppo precoce, mentre nella fase tardiva esso dovrebbe iniziare a degradarsi in modo tale da non ostacolare ulteriormente la crescita del tessuto.¹²³

Inoltre, segnali bioattivi come i peptidi per l'adesione cellulare e i fattori di crescita possono essere inseriti insieme alle cellule per contribuire alla regolazione della funzione cellulare. Il biomateriale ideale dovrebbe essere biocompatibile ovvero biodegradabile e biorisorbibile per favorire la sostituzione con tessuto normale. I materiali non compatibili sono destinati ad una risposta infiammatoria o ad una reazione da corpo estraneo che può portare al rigetto e/o alla necrosi. Inoltre, i prodotti di degradazione dovrebbero essere rimossi dall'organismo attraverso i pathways metabolici, in modo tale che la loro concentrazione nei tessuti venga mantenuta ad un livello tollerabile. Per di più, il biomateriale dovrebbe fornire un microambiente nel quale si possa avere un'adeguata regolazione del comportamento cellulare (ad es. adesione, proliferazione, migrazione, differenziamento), in maniera tale che il tessuto funzionale possa formarsi. Il comportamento cellulare nel nuovo tessuto che si forma si è visto essere regolato da interazioni multiple delle cellule con il loro microambiente, incluse le interazioni con i ligandi coinvolti nell'adesione cellulare¹²⁴ e con i fattori di crescita solubili¹²⁵.

Generalmente, tre classi di biomateriali, di cui è già stata testata la biocompatibilità,^{126,127} vengono utilizzati per l'ingegneria tissutale: i materiali di origine naturale come il collagene, l'alginato e la fibroina; matrici tessutali acellulari (sottomucosa di vescica e del piccolo

intestino); polimeri sintetici (PGL, PLA). I materiali di origine naturale e le matrici tessutali acellulari hanno il potenziale vantaggio del riconoscimento biologico, mentre i polimeri sintetici possono essere prodotti in maniera riproducibile su larga scala con proprietà controllate (resistenza, tasso di degradazione, microstruttura).

Tra i polimeri naturali, la fibroina della seta fornisce un'importante opzione nelle applicazioni biomediche a causa della sua elevata forza tensile, la sua biodegradabilità controllata, le proprietà emostatiche, la non citotossicità, la bassa antigenicità e la prerogativa di non elicitare reazioni infiammatorie, e merita pertanto una speciale menzione.¹²⁸⁻¹³⁰ La fibroina della seta è una proteina naturale prodotta dal *Bombyx mori*, il baco della seta. Le fibre di seta sono costituite da due tipi di proteine autoassemblanti: la fibroina e la sericina. La fibroina è il principale componente delle fibre di seta e rappresenta il core, mentre la sericina è la proteina di rivestimento. La prima è costituita da regioni altamente organizzate, con struttura a foglietto e regioni semicristalline responsabili della tipica elasticità del tessuto.

Può essere usata come biomateriale in varie forme come film, membrana, gel, spugna, polvere.¹³¹⁻¹³³ Le applicazioni comprendono la medicazione delle ferite, la sintesi di matrici di immobilizzazione enzimatica, reti, protesi vascolari e impianti strutturali. La seta è stata messa in commercio per le suture biomediche già da decenni. A causa della sua particolare cristallinità e orientamento, così come la sua struttura compatta, la fibroina naturale è difficile da degradare. Come biomateriale approvato dall'FDA, la seta viene definita dalla United States Pharmacopea come non degradabile proprio per la sua trascurabile perdita

di forza tensile in vivo. Tuttavia, secondo la letteratura, la seta è degradabile, ma dopo un lunghissimo periodo di tempo. La ragione della sua resistenza può essere connessa al fatto che la degradazione della seta è di solito mediata dalla risposta dell'organismo ospite.¹³⁴ In genere, comunque, la seta viene assorbita lentamente in vivo.

Gli impianti costituiti da biomateriali polimerici posseggono alcuni vantaggi, alcuni dei quali sono: essere facilmente fabbricati in diverse forme (solidi, film, materiali viscoelastici, ecc.); possibilità di modulazione delle proprietà chimiche, fisiche e meccaniche, formando copolimeri o miscele, utilizzando differenti monomeri nello stesso polimero; resistenza alla corrosione; densità simile a quella dei tessuti naturali (1 g/cm^3); vista la loro somiglianza con i tessuti naturali (ad esempio il collagene), è possibile incorporare altre sostanze (ad esempio l'eparina) per legame diretto.¹³⁵

Gli svantaggi legati al loro utilizzo sono invece: il basso modulo elastico, soprattutto per i polimeri degradabili, che limita il loro uso nelle applicazioni dove è richiesta una grande resistenza al carico; la natura stessa della polimerizzazione, che li rende materiali biodegradabili; la difficoltà nell'ottenere polimeri utilizzabili come biomateriali senza utilizzare additivi, antiossidanti ed elasticizzanti.

I polimeri biomedici, a seconda del loro comportamento dopo l'impianto o quando sono in contatto con i fluidi biologici, possono essere classificati in non degradabili o biodegradabili. Tipici polimeri non degradabili sono: il polietilene ad elevato peso molecolare, usato in ortopedia; il polimetilmetacrilato, polimerizzato *in situ* per i cementi

ossei o utilizzato per lenti a contatto; il polidimetilsilossano, usato per tessuti molli e lenti intraoculari.

I polimeri biorassorbibili sono materiali polimerici, generalmente poliesteri alifatici, che si degradano in ambiente fisiologico attraverso l'idrolisi del legame estereo.

Il principale meccanismo di degradazione della maggior parte dei polimeri bioassorbibili è la degradazione idrolitica.¹³⁶

In base alla struttura del polimero assorbibile, essi possono anche subire degradazione enzimatica, in cui il polimero è degradato o assorbito da alcuni enzimi. La composizione del polimero influenza molto la degradazione enzimatica ed essa avviene sempre in connessione alla degradazione idrolitica. I poliesteri vengono ampiamente utilizzati nell'ingegneria tissutale. Questi polimeri si sono guadagnati l'approvazione della FDA per l'utilizzo sull'uomo in diverse applicazioni, comprese le suture.¹³⁷ In questi polimeri i legami esterei sono labili dal punto di vista idrolitico e vengono degradati mediante idrolisi non enzimatica. I prodotti di degradazione sono dei metaboliti naturali, non tossici e vengono eventualmente eliminati sotto forma di anidride carbonica e acqua. Il tasso di degradazione di questi polimeri può essere adeguato a diverse settimane o anni alterando la cristallinità, il peso molecolare iniziale e il rapporto tra acido lattico e glicolico nel copolimero. Poiché questi polimeri sono termoplastici si possono facilmente utilizzare per realizzare degli scaffold tridimensionali con la microstruttura e la dimensione desiderate mediante diverse tecniche.

Negli ultimi due decenni, i polimeri biodegradabili come il PLA, il PGA e il PCL, appartenenti alla famiglia dei α -idrossiesteri (fig.4), sono emersi come una classe di biomateriali di crescente interesse per le applicazioni chirurgiche, il rilascio controllato di farmaci e l'ingegneria tessutale (per esempio suture per la guarigione delle ferite, dispositivi per la fissazione interna delle strutture ossee, carrier per il rilascio di molecole bioattive, scaffold per la rigenerazione di tessuti o organi).

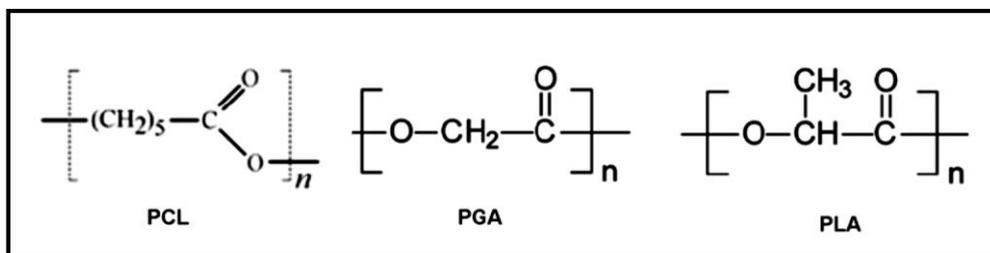


Figura 4. Unità ripetitive dei polimeri sintetici PCL, PGA e PLA

In genere, essi presentano proprietà meccaniche e fisiche prevedibili e riproducibili come la forza tensile, il modulo elastico e la velocità di degradazione, dietro condizioni controllate. A causa delle loro similarità chimiche e strutturali, essi si degradano in maniera simile attraverso processi di idrolisi degli esteri e decarbossilazione a partire dai terminali di catena, assicurando la loro completa rimozione mediante pathway naturali. Tuttavia, ci può essere una differente cinetica di degradazione che dipende dagli specifici legami interatomici e intermolecolari che possono avere una diversa suscettibilità all'attacco idrolitico con differenti effetti sulla degradazione finale.¹³⁸

Per esempio, il PCL è molto usato in ingegneria tissutale a causa della sua buona biocompatibilità e processabilità, ma la sua alta idrofobicità e bassa degradabilità in vivo lo rendono meno adatto per le applicazioni a lungo termine. Il PCL è un poliestere alifatico ottenuto dalla polimerizzazione a ciclo aperto del ϵ -caprolattone. Dal punto di vista fisico, esso si presenta semicristallino con una temperatura di fusione di 58-63°C e una temperatura di transizione vetrosa di circa -60°C. È altamente elastico a temperatura ambiente o corporea. L'unità ripetitiva del PCL è costituita da cinque gruppi non polari metilenici ed un gruppo estere relativamente polare (fig.4). Questa struttura conferisce al PCL proprietà uniche simili alle poliolefine per la presenza di gruppi $-CH_2$, mentre la presenza di collegamenti esteri-alifatici, idroliticamente instabili, causano la degradazione del polimero.

È facile da processare, biocompatibile e offre la possibilità di modificare la sue proprietà meccaniche e di degradazione tramite la formazione di copolimeri. Quando prodotto attraverso le tecniche di melting, il PCL, così come gli altri polimeri densi, generalmente manca di spazi vuoti e pori.¹³⁹ Si degrada lentamente e possiede un'elevata forza tensile e notevoli proprietà di allungamento. Il PCL è stato utilizzato in diverse applicazioni dell'ingegneria tissutale per la sua biocompatibilità, biodegradabilità e proprietà adeguate di legame con altre cellule.¹⁴⁰

Al contrario, il PLA e il PGA mostrano velocità di degradazione, proprietà fisiche e meccaniche dipendenti dal peso molecolare o dalla trasformazione a copolimeri, ma il loro processo di degradazione potrebbe scatenare il rilascio indesiderato di prodotti acidi che

possono causare una forte risposta infiammatoria oltre al precoce insuccesso dello scaffold.¹⁴¹ Dal momento che ogni polimero presenta una sua peculiarità, lo sviluppo di scaffold compositi, basati sulla combinazione di due o più tipi di materiali con proprietà selezionate, potrebbe rappresentare una soluzione appropriata e vantaggiosa in grado di rispondere a tutte le esigenze meccaniche e fisiologiche del tessuto ospite.¹⁴²

1.5 Obiettivi

L'obiettivo di questo lavoro è quello di sviluppare un sostituto tubulare biorassorbibile per la creazione di neovasi, grazie all'utilizzo di un modello suino. Lo scaffold utilizzato in questo lavoro è di forma tubulare e sarà utilizzato per il confezionamento di una *bridge fistula*, anastomizzando un'arteria con una vena dell'animale. I materiali utilizzati negli esperimenti dovrebbero comportarsi inizialmente come le comuni protesi vascolari; successivamente, una volta degradate ed assorbite dall'organismo ospite, dovrebbero dar vita nel sito di innesto ad un neovascolo dalle caratteristiche anatomiche e funzionali sovrapponibili a quelle dei condotti vascolari nativi dell'ospite. Per raggiungere tale obiettivo, il biomateriale, chimicamente funzionalizzabile, dovrà essere testato, step by step, in modo da apportare le dovute modifiche e renderlo adeguato alle esigenze di chi lo impianta e allo specifico contesto biologico in cui esso viene inserito.

2 MATERIALE E METODI

Gli scaffold polimerici testati sono stati preparati nel Laboratorio di Polimeri Biocompatibili del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Molecolari e Biomolecolari (STEMBIO) dell'Università di Palermo e sono costituiti da fibre elettrospinnate a base di polimeri biocompatibili, sia sintetici che naturali. Il polimero di partenza, utilizzato per la produzione dei copolimeri elettrospinnabili, è l' α,β -Poli(N-2-idrossiethyl)-D,L-aspartammide (PHEA).

L'elettrospinning è una tecnica che utilizza una sorgente ad alta tensione per polarizzare una soluzione di polimero o un polimero fuso che poi viene accelerato verso un collettore di polarità opposta. Tramite l'elettrospinning è possibile ottenere degli scaffold tridimensionali composti da fibre polimeriche micro-nanometriche interconnesse a formare una struttura microporosa (fig. 5).

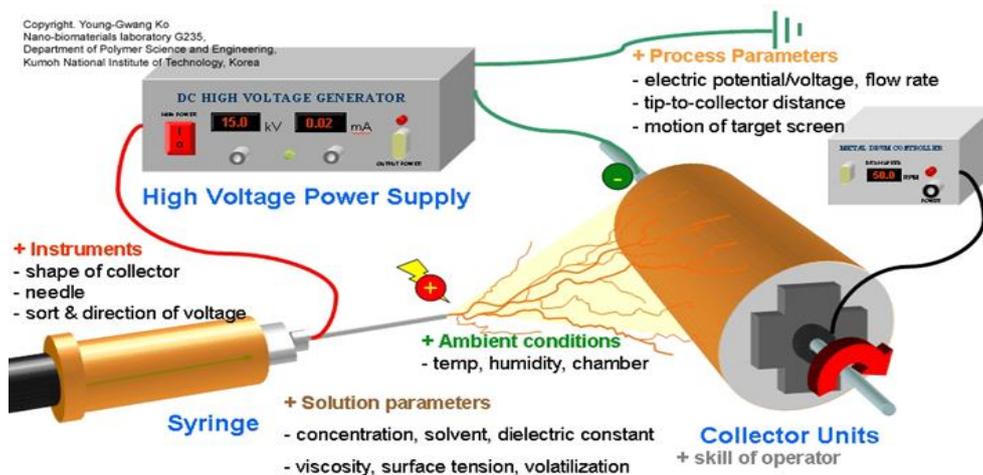


Figura 5. Un elettrodo dalla sorgente di alta tensione è attaccato al capillare (ago metallico). Il generatore di tensione “carica” la soluzione polimerica. L'intensità del campo elettrico induce le interazioni repulsive tra cariche uguali nel liquido e le forze di attrazione tra il liquido e collettore di carica opposta cominciano a esercitare una forza di trazione sul liquido, allungando la goccia pendente sulla punta del capillare

Il PHEA è un polimero sintetico biocompatibile solubile in acqua, con una struttura simile a quella delle proteine, il cui utilizzo come carrier di farmaci e come materiale di partenza per molte altre applicazioni biomediche e farmaceutiche è stato già riportato in letteratura.^{143,144}

Tale macromolecola, altamente *funzionalizzabile*, è stata utilizzata nel Laboratorio di Polimeri Biocompatibili come materiale di partenza per la sintesi del copolimero utilizzato per la costruzione dello scaffold oggetto del presente studio, ossia il PHEA-PLA, materiale ottenuto dal legame chimico del PHEA con il polimero biodegradabile PLA (fig. 6).^{145,146}

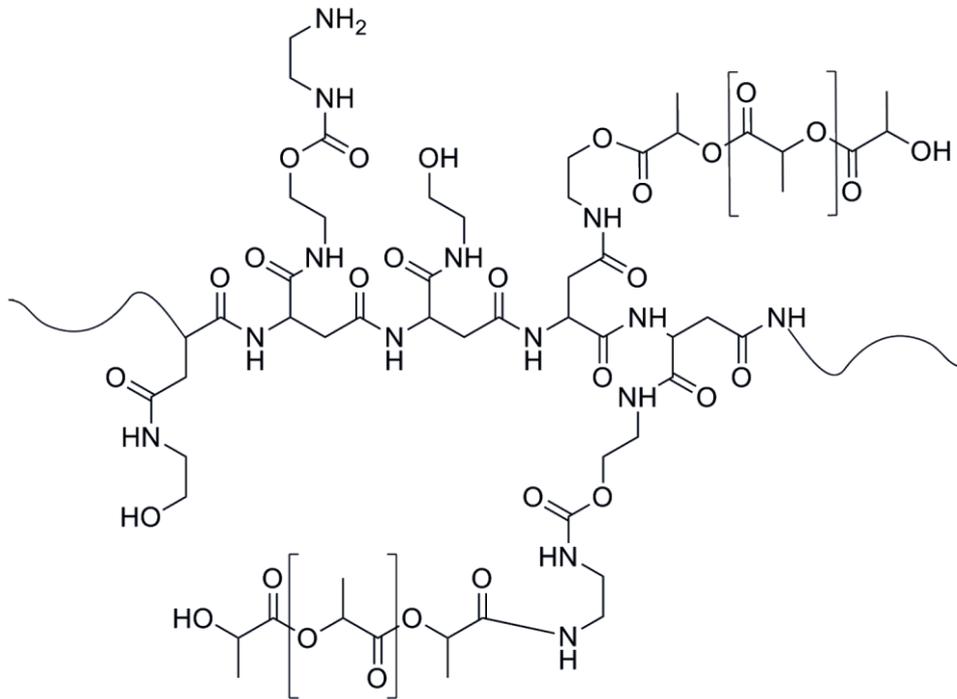


Figura 6. Formula planare di una molecola di PHEA-EDA-PLA

Il PHEA-PLA è stato successivamente elettrospinnato in miscela con il PCL. Da uno studio effettuato in precedenza dal nostro gruppo,¹⁴⁷ il PHEA-PLA + PCL è risultato un materiale molto elastico e dotato di un'elevata resistenza meccanica, caratteristiche probabilmente legate alla maggiore regolarità e omogeneità dimensionale delle fibre che lo costituiscono e all'assenza di fusione tra le stesse. I dati ottenuti dagli esperimenti in vivo hanno dimostrato che il materiale presenta una buona biocompatibilità, evocando una risposta flogistica di modesta entità, la quale ha un ruolo principe nei processi di riassorbimento del materiale e di rigenerazione tissutale, guidando la migrazione degli elementi staminali (fig. 7).

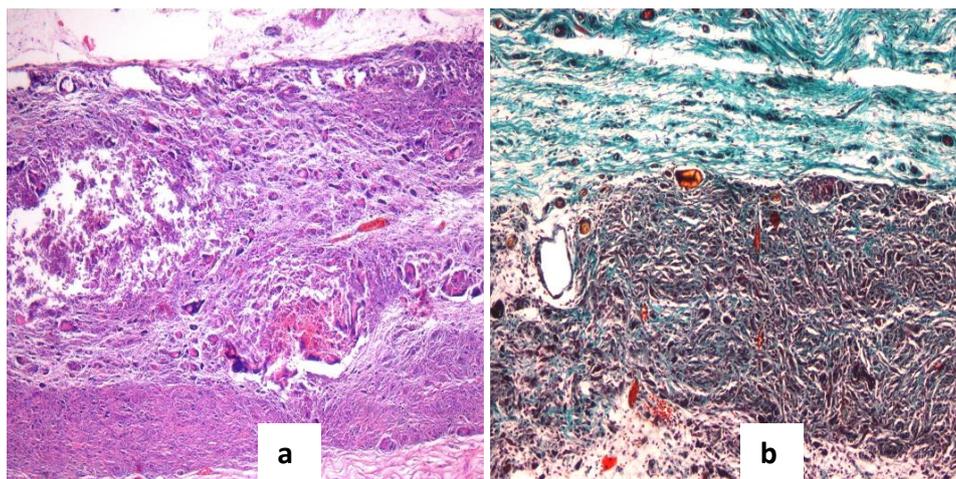


Figura7. Sezioni istologiche (ematossilina-eosina a; tricromica di Masson b), di tessuto dopo 40 giorni di impianto del materiale di PHEA-PLA + PCL (4x a; 10x b)

Gli scaffold ottenuti dalla miscela PHEA-PLA + PCL hanno presentato, inoltre, fibre con un diametro ricadente all'interno di un range dimensionale compreso tra 500 nm e 1 μ m, come si evince dalla figura 8.

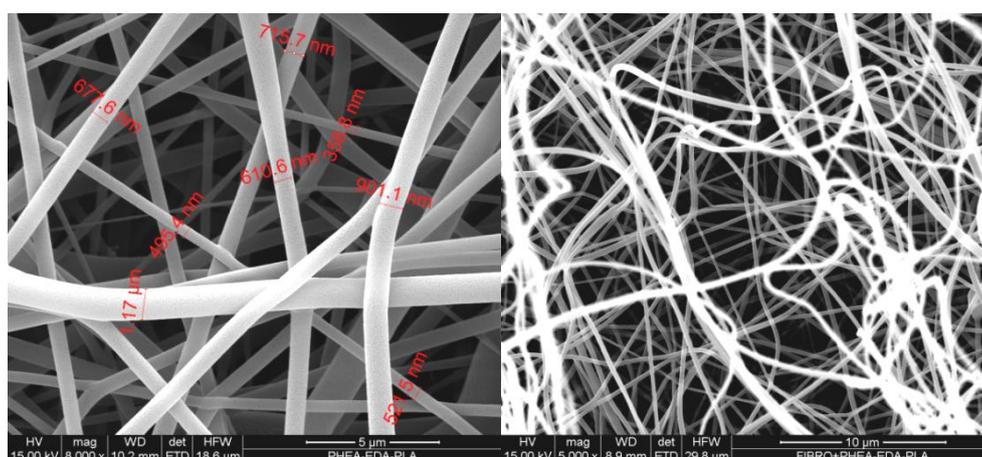


Figura 8. Microscopia SEM delle fibre di PHEA-PLA + PCL

Con tali caratteristiche il naturale homing cellulare è garantito, senza l'inconveniente di eventuali leakage di liquido dalla parete.

Gli scaffold tridimensionali ottenuti, sono stati successivamente tubulizzati per essere adattati alle esigenze sperimentali, avendo un diametro di circa 5 mm e lunghezza variabile da circa 3 a 13 cm (fig. 9).



Figura 9. Scaffold tubulare biorassorbibile

Grazie alla convenzione esistente tra Università degli Studi di Palermo e Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia “A. Mirri” di Palermo, presso lo stabulario dell’Istituto stesso sono stati utilizzati 7 maiali maschi con una età compresa tra 4 e 6 mesi e un peso variabile da 40 a 70 Kg. Durante gli esperimenti sono state confezionate 7 fistole artero-venose secondarie, una per ogni animale. I primi 5 maiali sono stati utilizzati per l’anastomosi carotido-giugulare (carotide comune – giugulare esterna), mentre gli ultimi 2,

per l'anastomosi tra arteria e vena iliache esterne. Le evidenze ottenute da ogni esperimento hanno costituito il fondamento per l'esecuzione dell'esperimento successivo, in cui sono state apportate modifiche o alla tecnica chirurgica utilizzata o alla composizione del materiale.

Tutte le procedure chirurgiche sono state effettuate avendo cura di mantenere una adeguata anestesia generale dell'animale (premedicazione: Zolazepam + Tiletamina 6.3 mg/Kg + Xilazina 2.3 mg/Kg – induzione: Propofol 0.5 mg/Kg – mantenimento: Isoflurano + Panturonio 0.07 mg/Kg). Tutti i maiali sono stati sottoposti successivamente ad un trattamento antibiotico postoperatorio con Ossitetraciclina (20 mg/Kg/die per 3 giorni). Con l'animale in posizione prona e i 4 arti fissati al tavolo operatorio, è stata praticata la tricotomia della regione di interesse e la disinfezione del campo operatorio con Povidone iodato 10%.

Previa incisione della cute, seguendo il margine anteriore del muscolo sterno-cleido-mastoideo, in un caso, o effettuando un tipico accesso a "J" in fossa iliaca, nel secondo, sono stati isolati e repertati rispettivamente il fascio vascolo-nervoso del collo ed i vasi iliaci. Mediante delicate manovre di dissezione smussa, si è proceduto alla liberazione dei tratti vascolari, più lunghi nel collo (circa 10 cm per la carotide interna), e più corti a livello iliaco (bastano 3-4 cm), in modo da rendere più agevoli tutte le manovre relative alla successiva anastomosi dell'impianto (fig. 10).

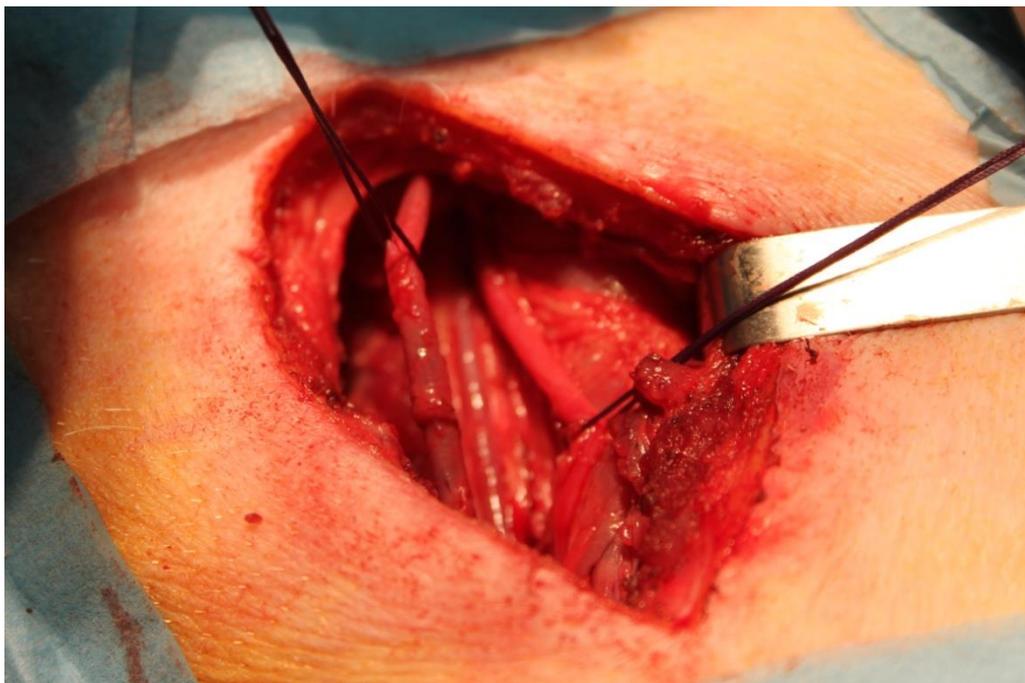


Figura 10. Fascio vascolo-nervoso del collo del maiale con arteria carotide interna, a destra e vena giugulare esterna, a sinistra (caricate su fettucce)

Nel primo maiale si è confezionata una *bridge fistula* artero-venosa in latero-laterale (fig. 11). Tuttavia questa soluzione è risultata essere sconveniente, in quanto la scarsa mobilizzazione dei vasi rende l'anastomosi latero-terminale del versante arterioso di difficile realizzazione.

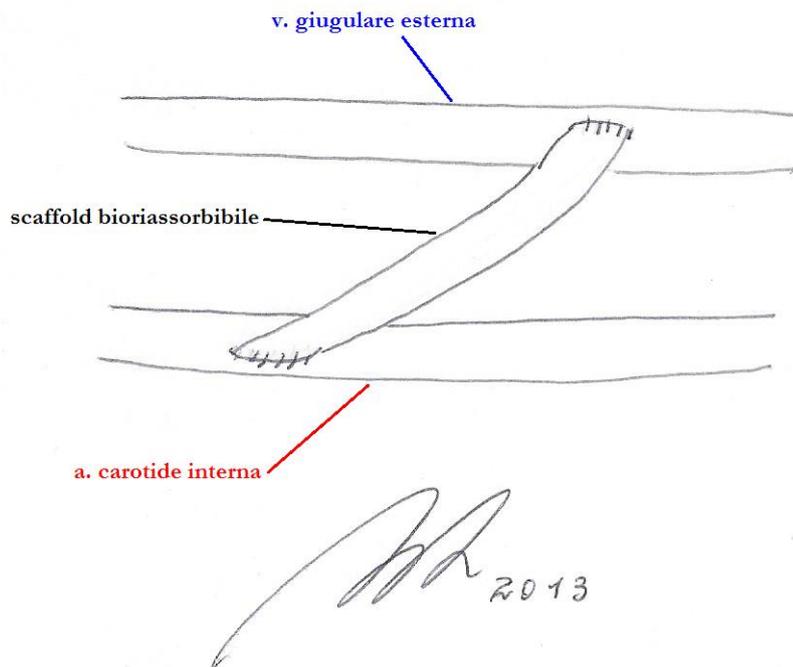


Figura 11. Bridge fistula tra a. carotide interna e v. giugulare esterna in latero-laterale, con anastomosi latero-terminale sul versante arterioso e termino-laterale sul versante venoso

Nei successivi due modelli si è optato per il confezionamento di una fistola artero-venosa secondaria tra arteria carotide interna e giugulare esterna in latero-terminale (fig. 12). Tale soluzione è risultata più agevole rispetto alla precedente, in quanto la presenza di maggiore stoffa tissutale ottenuta dopo preparazione e mobilizzazione della vena giugulare esterna, ha reso più agevole l'anastomosi latero-terminale sul versante arterioso.

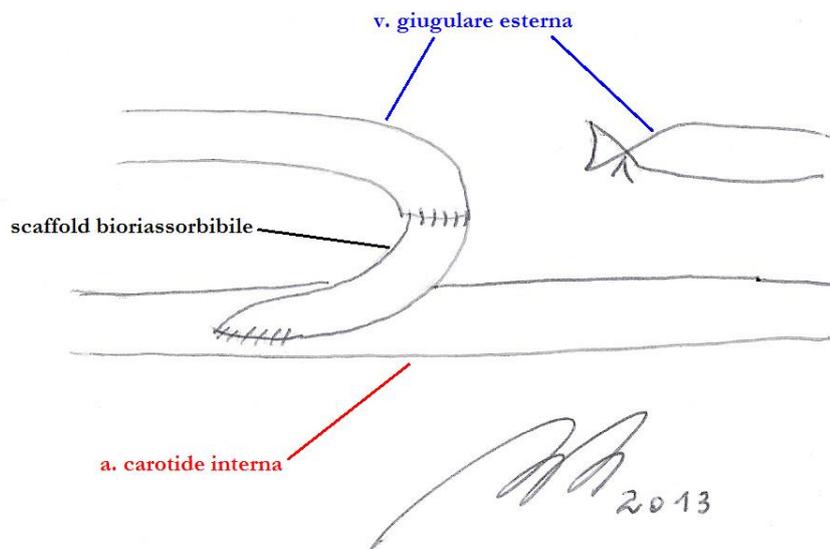


Figura 12. Bridge fistula tra a. carotide interna e v. giugulare esterna in latero-terminale, con anastomosi latero-terminale sul versante arterioso e termino-terminale sul versante venoso

Nei restanti 2 modelli si è confezionata invece una fistola artero-venosa in termino-terminale (fig. 13). Questa opzione risulta essere la migliore, non solo in termini emodinamici ma anche in termini di tecnica chirurgica.

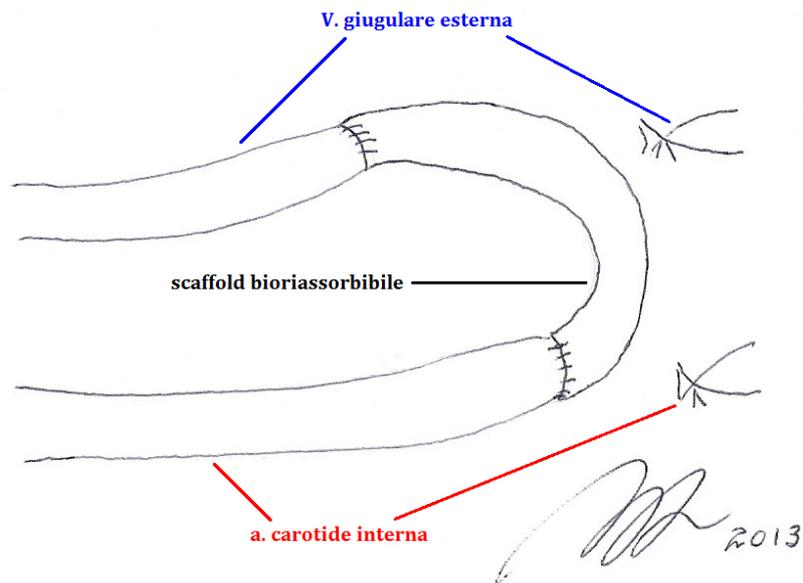


Figura 13. Bridge fistula tra a. carotide interna e v. giugulare esterna in termino-terminale, con anastomosi termino-terminale sul versante arterioso e termino-terminale sul versante venoso

Nei maiali 6 e 7 sono state confezionate rispettivamente una fistola artero-venosa secondaria latero-laterale tra arteria iliaca esterna sinistra e vena omologa ipsilaterale, e una bridge fistula, sempre latero-laterale, tra arteria iliaca esterna sinistra e omonima vena controlaterale. L'esigenza di variare la zona di intervento è stata dettata dalla possibilità ottenere flussi maggiori, più simili a quelli presenti nei vasi dell'uomo, e da una più semplice gestione della fase di monitoraggio ecografico.

In entrambe i casi sono stati usati scaffold tubulari di circa 5 mm di diametro e lunghezza di 3 e 13 cm rispettivamente (figg. 14-15).

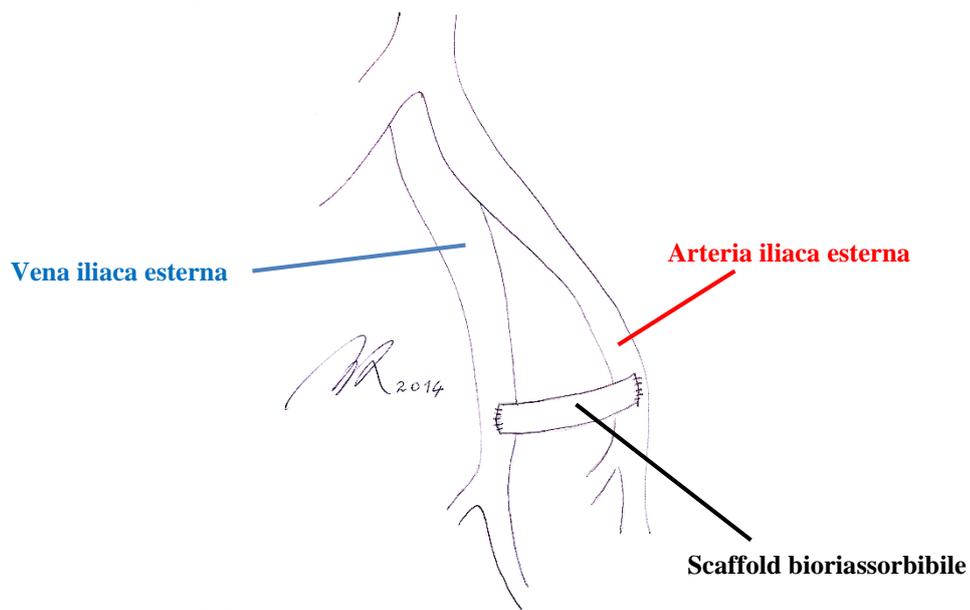


Figura 14. Bridge fistula tra a. iliaca esterna sinistra e v. iliaca omonima ipsilaterale, con anastomosi latero-terminale sul versante arterioso e termino-laterale sul versante venoso

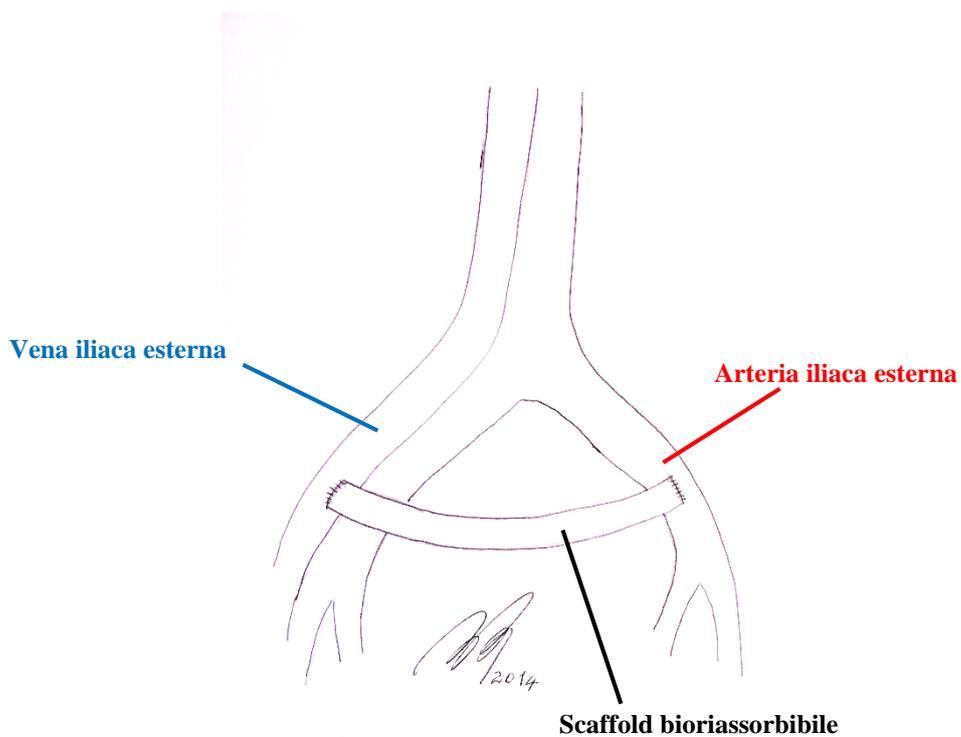


Figura 15. Bridge fistula tra a. iliaca esterna sinistra e v. iliaca omonima controlaterale, con anastomosi latero-terminale sul versante arterioso e termino-laterale sul versante venoso

Il materiale impiegato per la sintesi della protesi è stato eparinizzato¹⁴⁸ per evitare l'inconveniente della trombosi e favorire l'attecchimento degli elementi cellulari circolanti. La scelta di allungare la protesi è in parte derivata da una sostanziale difficoltà tecnica, da parte dell'equipe chirurgica, ad eseguire l'anastomosi tra due vasi adiacenti e scarsamente isolabili, ma è stata anche dettata dalla necessità di sviluppare un modello che potesse riprodurre nella maniera più fedele possibile, la realtà clinica. Infatti, nell'uomo, le protesi sono spesso utilizzate non tanto per connettere distretti vicini, quanto vasi distanti svariati centimetri l'uno dall'altro.

In tutti gli esperimenti l'anastomosi sia arteriosa che venosa è stata realizzata utilizzando un filo di sutura in materiale non assorbibile in ePTFE tipo 8-0, con una emicontinua a 180° (fig. 16).

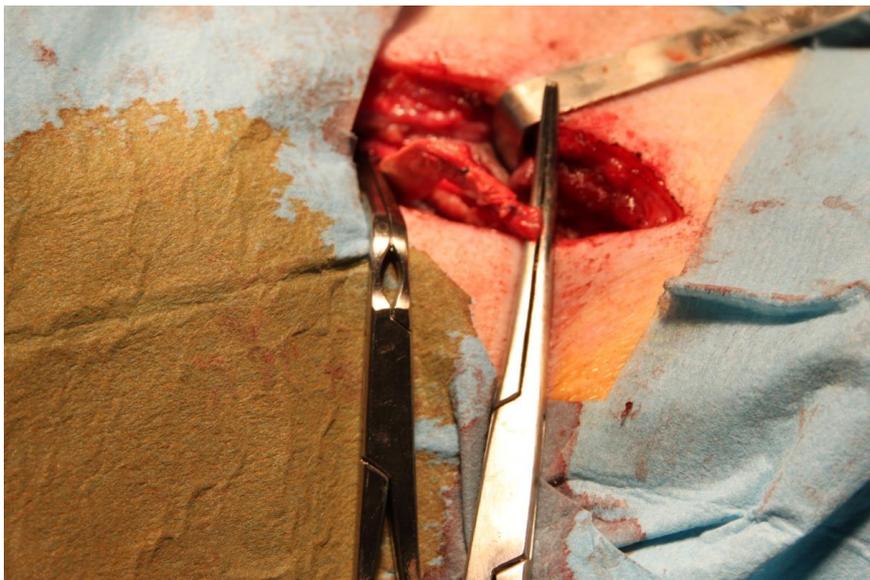


Figura 16. Reperto intraoperatorio che mostra lo scaffold già anastomizzato con l'a. carotide interna ancora clampata

Al declampaggio arterioso è stato possibile apprezzare in ogni caso un dispiegamento della struttura, che appariva inizialmente collassata su se stessa, e, palpatariamente, un thrill sulla superficie protesica (fig. 17).

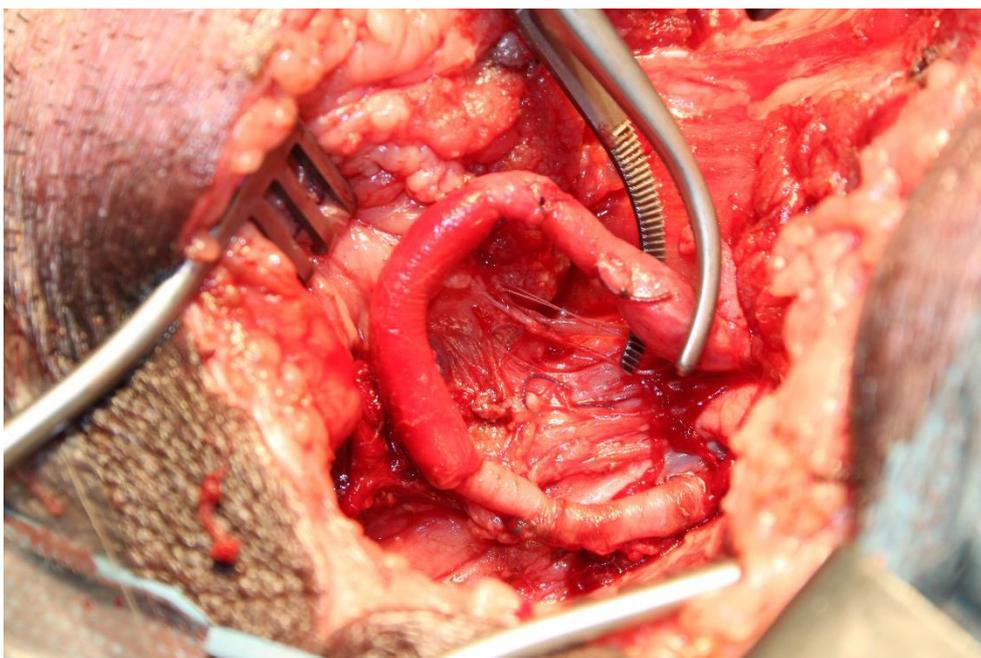


Figura 17. Reperto intraoperatorio. Protesi vascolare al declampaggio

La chiusura dei piani è stata effettuata mediante sutura tipo 0 riassorbibile a punti staccati per il sottocute, e mediante sutura, sempre a punti staccati, di materiale non riassorbibile tipo 0, per la cute. Subito dopo ogni intervento, una valutazione dei flussi sulla fistola è stata effettuata facendo ricorso all'ecocolordoppler, mediante sonda microconvex da 4-7.5 MHz. Gli animali sopravvissuti dopo 12 ore hanno iniziato una dieta idrica; a 24 ore dall'intervento sono stati alimentati con mangime solido e quindi stabulati nelle apposite gabbie. Uno studio dei flussi è stato eseguito, sempre mediante ecocolordoppler, a cadenza

regolare di una settimana. A circa un mese di distanza da ogni intervento, tutti gli impianti sono stati asportati in blocco avendo cura di non ledere le strutture vascolo-nervose viciniori, per lasciare in vita l'animale. Tutto il materiale ottenuto è stato poi subito immerso in una soluzione a tampone neutro di formalina al 10%, per permettere il successivo studio istologico previa colorazione con differenti marcatori tissutali. Più in particolare, l'analisi istologica si è concentrata sulla individuazione di elementi infiammatori e sul grado di assorbibilità dell'impianto, oltre che sul prender atto della qualità del tessuto neoformato.

3 RISULTATI

La protesi tubulare biorisorbibile da noi testata si è dimostrata molto maneggevole e resistente alla trazione. Le anastomosi confezionate alle estremità dell'impianto hanno dimostrato una perfetta tenuta pur sottoposta ad un regime pressorio arterioso. Il tessuto sviluppato dal laboratorio STEMPIO ha anche mostrato una discreta cedevolezza al passaggio dell'ago da sutura; questo fatto lo rende, da un punto di vista chirurgico, particolarmente adatto alle applicazioni cliniche per cui il materiale è stato pensato. Al declampaggio, il passaggio del flusso ematico non ha determinato danni o disfacimenti alle pareti del graft, anzi il condotto è rimasto perfettamente integro ed impermeabile al siero ematico. Ad una osservazione macroscopica, la protesi impiantata, subito dopo il declampaggio, ha mostrato caratteristiche morfologiche del tutto sovrapponibili a quelle dei vasi adiacenti e da essi indistinguibile. Per di più, il condotto anastomizzato mostrava una discreta quanto sorprendente elasticità, tale da permettergli di pulsare alla stessa maniera delle arterie viciniori. Il doppler eseguito subito dopo l'intervento, ha evidenziato una pervietà dell'anastomosi con flusso tipicamente turbolento (fig. 18).



Figura 18. Immagine al colordoppler della fistola arterovenosa tra arteria iliaca esterna sinistra e vena omonima ipsilaterale. È possibile apprezzare il tipico flusso turbolento nel tratto che connette i due vasi

Le successive valutazioni ecografiche hanno evidenziato la trombosi del graft, per i primi 5 animali, mentre gli ultimi 2, anche a distanza di un mese, hanno mantenuto uno shunt ematico adeguato agli scopi per cui la fistola era stata confezionata. A 30 giorni dall'intervento, l'espianto dei bridge carotico-giugulari è stato reso alquanto difficile dalla presenza di tenaci aderenze con i tessuti vicini, per cui si è resa necessaria l'amputazione del sito di impianto, sacrificando alcune strutture adiacenti, principalmente muscolari, avendo cura di risparmiare gli elementi del fascio vascolo-nervoso per lasciare in vita l'animale. L'espianto delle protesi vascolari dei maiali 6 e 7 è stato invece molto più agevole, essendo il condotto impiantato ancora pervio e nettamente delimitabile dai tessuti limitrofi.

Le sezioni istologiche del pezzo operatorio sono state realizzate presso l'Istituto di Anatomia Patologica del Policlinico di Palermo. I campioni sono stati esaminati mediante colorazione con ematossilina-eosina. Nei campioni si è riscontrata flogosi cronica a carattere granulomatoso con cellule giganti “da corpo estraneo”, associata a reazione fibrotica stromale, e multipli vasi di piccolo calibro neoformati; è stato inoltre possibile riscontrare in alcuni preparati istologici la presenza di materiale ancora non riassorbito nel contesto della flogosi granulomatosa (figg. 19-22).

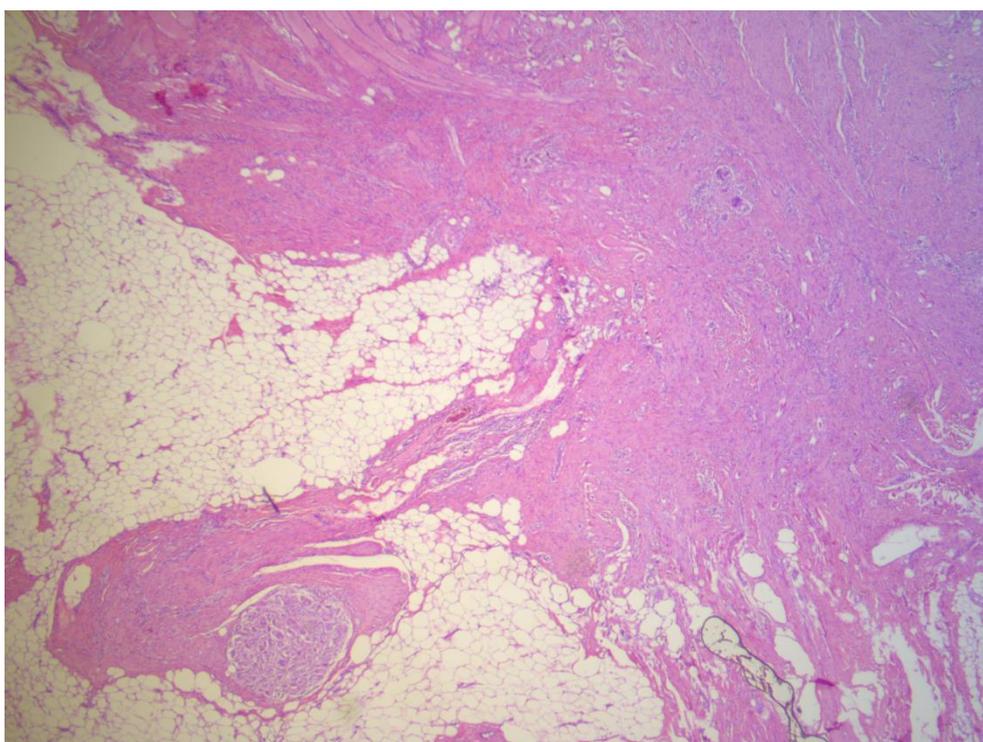


Figura 19. Ematossilina-Eosina (2.5x). Aree di reazione fibrotica perimuscolare con infiltrazione flogistica diffusa, a carattere granulomatoso

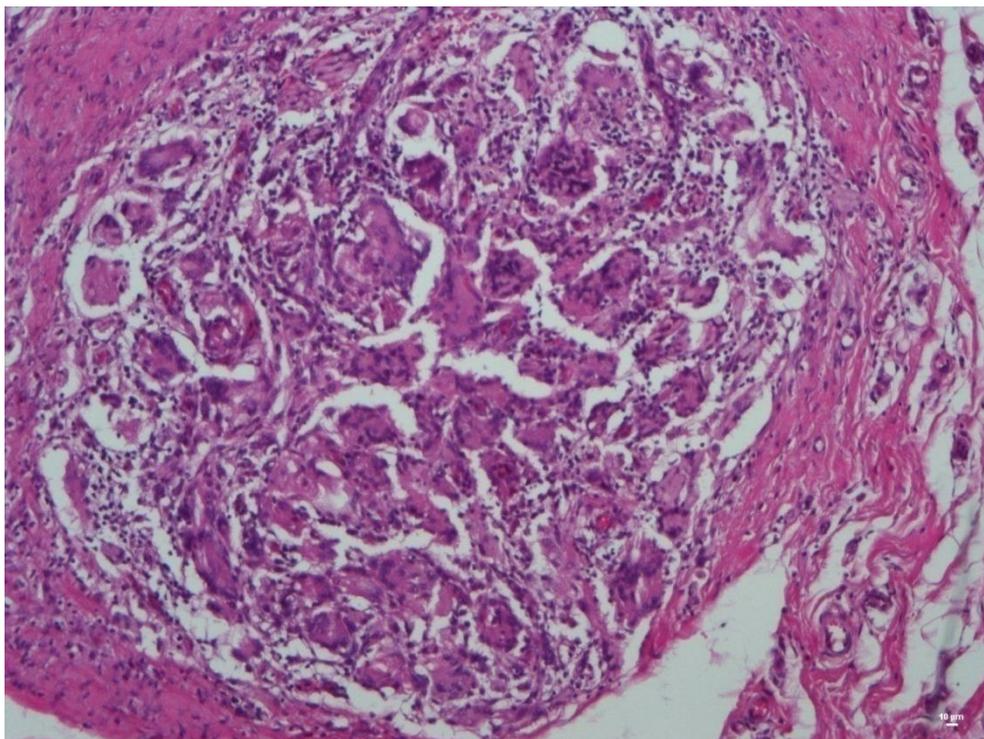


Figura 20. Ematossilina-Eosina (10x). Focolai di flogosi cronica a carattere granulomatoso con cellule giganti “da corpo estraneo”, associata a reazione fibrotica stromale

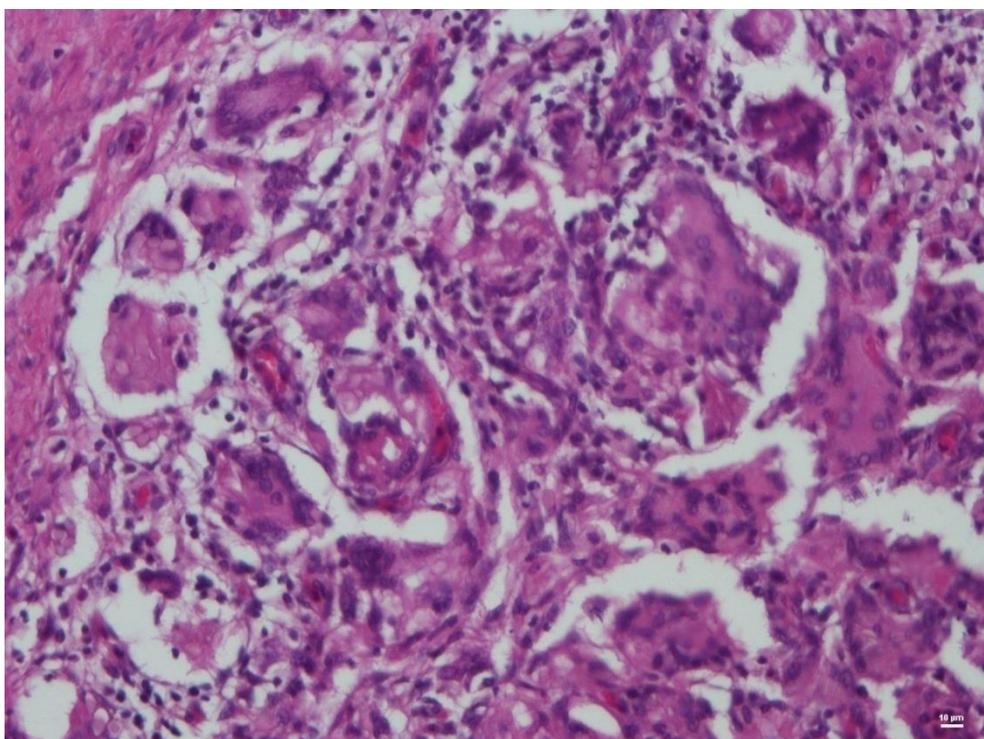


Figura 21. Ematossilina-Eosina (20x). Focolaio di flogosi cronica a carattere granulomatoso con cellule giganti “da corpo estraneo”, associata a reazione fibrotica stromale. Evidenza di multipli vasi di piccolo calibro neofornati

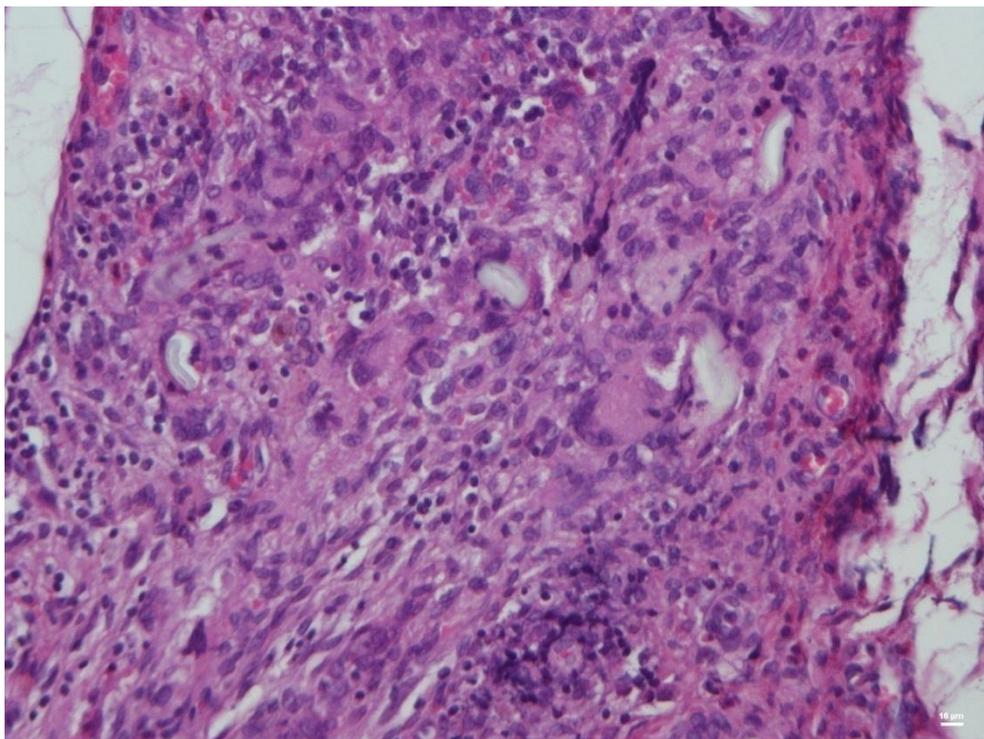


Figura 22. Ematossilina-Eosina (20x). Evidenza di materiale ancora non riassorbito nel contesto della flogosi granulomatosa

4 DISCUSSIONE

Con l'avvento dell'ingegneria tissutale, l'impiego di materiale biocompatibile completamente riassorbibile si è sempre più diffuso per la riparazione o l'intera sostituzione di organi, o parti di essi, danneggiati dal tempo o semplicemente da agenti esterni. Successi si sono ottenuti nella ricostruzione di organi artificiali come vasi sanguigni¹⁴⁹ o piccolo intestino¹⁵⁰ mediante coltura di cellule staminali con uno scaffold polimerico.

La possibilità di ottenere scaffold tubulari riassorbibili capaci di favorire la migrazione dell'epitelio circostante e poi riassorbirsi per lasciare il campo al tessuto nativo senza mantenere in sede materiale eterologo capace di evocare risposte infiammatorie, apre interessantissimi scenari. Su tali impalcature è possibile altresì inserire molecole farmacologicamente attive e/o fattori di crescita cellulare per guidare la rigenerazione tissutale. La rigenerazione, infatti, deve partire dalle estremità, cioè da quel tessuto di cui il ponte protesico deve essere ricoperto per ristabilire la normale fisiologia.

La creazione di vasi bioingegnerizzati è una via battuta già da molti anni, ed è già stata in parte dimostrata da alcuni studi, in particolare di autori giapponesi. Un gruppo della Saitama Medical University ha proposto l'uso di un copolimero di acido polilattico e policaprolattone rinforzati con fibre di acido poliglicolico.¹⁵¹ I risultati a 6 mesi sono stati incoraggianti visto il totale riassorbimento del materiale utilizzato e la formazione di un tessuto del tutto sovrapponibile alle strutture anatomiche native dell'animale.

Lo scaffold utilizzato nel nostro studio differisce dagli altri finora impiegati perché sembra presentare delle caratteristiche che lo rendono idoneo come sostituto temporaneo dei vasi sanguigni senza risentire dei precoci fenomeni di idrolisi che degradano troppo velocemente i materiali finora utilizzati. L'omogeneità delle fibre e la loro distribuzione conferiscono allo scaffold a base di PHEA-PLA caratteristiche morfologiche simili a quelle della ECM nativa. Tutti gli scaffold ottenuti hanno mostrato delle buone caratteristiche meccaniche che hanno consentito una facile manipolazione in tutti gli esperimenti condotti. L'idea di elettrospinnare il PHEA-PLA in miscela con il PCL ha permesso di ottenere degli scaffold potenzialmente utilizzabili nella riparazione o rigenerazione di tessuti biologici danneggiati, per esempio vasi sanguigni. Il campione di PHEA-PLA + PCL è risultato avere una buona elasticità e resistenza meccanica, probabilmente legata alla maggiore regolarità e omogeneità dimensionale delle fibre che lo costituiscono e all'assenza di fusione tra le stesse.

Infatti, gli studi preliminari che il nostro gruppo ha condotto dapprima in vitro e poi su modello di ratto, hanno dato impulso a proporre tale applicazione su un modello animale più grande, quale il maiale, che presenta un'anatomia quasi sovrapponibile a quella umana. Dai dati ottenuti durante la fase di sperimentazione è possibile evincere come la trombosi sia stato il dato più eclatante. Infatti, nei primi 5 impianti, a prescindere dalla tecnica chirurgica utilizzata, si è verificata la totale ostruzione del condotto. L'unico elemento di conforto che è possibile trarre da tali esperienze, è la presenza di un flusso pulsatile valido, anche se turbolento dato il tipo di anastomosi scelta, documentato all'eco-color-doppler,

nella prima ora successiva all'intervento. La trombosi è un fenomeno che è sicuramente legato al contatto del torrente ematico con il materiale da noi utilizzato, ma bisogna considerare molto bene, nel contempo, la spiccata ipercoagulabilità degli animali, e del maiale in particolare. Probabilmente, tutti e tre i fattori sopracitati, ossia il tipo di materiale, il flusso turbolento della fistola e l'assetto coagulativo del maiale, hanno contribuito allo stabilirsi del fenomeno trombotico. Sulla scorta di quanto detto, la scelta dell'anastomosi artero-venosa, sebbene mossa da reali esigenze cliniche, quali proporre scenari migliori ai pazienti dializzati, è stata infelice. Per migliorare la funzionalità dell'impianto e soprattutto poterne valutare a pieno le caratteristiche morfofunzionali, sarà necessario testare il condotto all'interno di un circuito esclusivamente arterioso in modo da garantire flussi più omogenei e soprattutto laminari, riducendo così una possibile fonte di trombosi. L'eparinizzazione del maiale è un altro obiettivo da perseguire affinché l'assetto coagulativo stesso dell'animale non prevarichi le esigenze di pervietà dello sperimentatore. La trombogenicità del polimero in uso, sicuramente il punto di maggiore debolezza dell'esperimento, è stata bypassata funzionalizzandolo con molecole di eparina legate covalentemente alla nano struttura dello scaffold. A un mese dall'impianto, entrambe le protesi vascolari dei maiali 6 e 7 sono rimaste pervie e hanno consentito alla fistola di funzionare a flussi adeguati per un'eventuale emodialisi. Inoltre, l'eparina, come costituente della sostanza amorfa della ECM, ha un ruolo importante nel guidare l'endotelizzazione vascolare e nel legare numerosi fattori di crescita.^{152,153} Questo permette alle cellule staminali circolanti di attecchire al tessuto impiantato e di favorire la

rigenerazione di un tessuto vitale, sovrapponibile per caratteristiche meccaniche e biologiche a quello dell'organismo ospite. D'altro canto, bisogna anche considerare che una minima adesione piastrinica può solamente agevolare il processo di colonizzazione e degradazione dello scaffold, grazie alla liberazione di una serie di fattori chemotattici e di crescita, in primis VEGF e PDGF. Poiché nella proliferazione e successivo differenziamento di una cellula non agiscono solamente fattori chimici bensì anche fisici, la precipua struttura elastica e la porosità del nostro materiale, contribuiscono a garantire un homing adeguato a quelle cellule staminali e non, che vi si insedieranno. Da questo punto di vista, il declampaggio arterioso ha messo in evidenza come il graft sia perfettamente compliant, rispondendo alle variazioni di flusso ematico nonché alle sollecitazioni dell'onda sfigmica arteriosa. Le proprietà tensili e la struttura microporosa sono responsabili di altri due risultati fondamentali per la nostra ricerca: la totale assenza di likeage sieroso o emorragia attraverso la parete ed una ottima resistenza al passaggio dell'ago di sutura con conseguente perfetta tenuta dell'anastomosi. L'ultrastruttura dello scaffold, con un intricato intreccio di nanofilamenti elettrospinnati distribuiti su uno spessore di circa 0.5 mm formanti pori dal diametro medio pari a circa 150 μm , permette alle cellule di colonizzare l'impianto e nel contempo impedisce ai fluidi di trasudare dalla superficie. Sono queste stesse caratteristiche che garantiscono a questo tessuto di rimanere intatto al passaggio dell'ago da sutura, in quanto le fibre di cui è costituito si divaricano e non vengono in alcun modo lese o tranciate dall'azione meccanica di puntura. È questa resistenza alla tensione che garantisce la perfetta tenuta dell'anastomosi, evitando perdite

ematiche a livello del punto di sutura. Questa caratteristica resistenza alla punzione potrebbe, in prospettiva, far riconsiderare l'utilizzo di tali device per un impiego nella accessologia vascolare, ed in particolare per il confezionamento di bridge fistula pungibili subito dopo l'impianto. Anche se i risultati istologici hanno messo in evidenza che l'espianto ad un mese sembra essere troppo precoce per la totale sostituzione del graft e la formazione di un tessuto vitale e funzionale, i dati ottenuti dagli ultimi due animali ci permettono di affermare che la protesi tubulare in PHEA-PLA-PCL eparinizzata può essere considerata un device applicabile in tutti i casi in cui si necessita di sostituire un tratto vascolare o di derivare il flusso ematico da un distretto all'altro del corpo. Il materiale studiato si è dimostrato comunque perfettamente biocompatibile e quasi totalmente riassorbito grazie alla reazione infiammatoria del tessuto ospite. Tale reazione infiammatoria, come è stato possibile valutare dalle sezioni istologiche, ha mostrato le caratteristiche di un'intensa reazione da corpo estraneo, con elementi linfomonocitari diffusi e cellule giganti polinucleate; inoltre, è stato possibile valutare la presenza di una importante neovascolarizzazione con la formazione di un intricato network vascolare. Probabilmente, l'espianto ad un anno di distanza dall'intervento ci avrebbe potuto permettere di capire la reale prerogativa del biomateriale nel ricostituire un tessuto con caratteristiche sovrapponibili a quelle del tessuto nativo dell'ospite, piuttosto che la formazione di una cicatrice amorfa priva di ogni funzione fisiologica, come accaduto per i primi 5 animali.

5 CONCLUSIONI

Un materiale protesico ideale dovrebbe rispondere a tre requisiti fondamentali:

- mantenere la continuità vasale;
- non permettere la fuoriuscita di sangue attraverso la parete ed attraverso la sutura nel breve periodo che segue l'impianto;
- non manifestare fenomeni stenotici una volta riassorbito il materiale protesico.

Purtroppo i polimeri sintetici hanno ancora delle limitazioni, specialmente quando vengono impiegati per la fabbricazione di piccoli vasi, questo a causa delle loro proprietà trombogeniche.

Nel nostro studio, tale problema è stato superato, almeno a breve termine, mediante l'eparinizzazione permanente del materiale, conseguendo un risultato soddisfacente dal punto di vista clinico. Questo, insieme alle proprietà elastiche e tensili del materiale, nonché alla biocompatibilità e biodegradabilità dello stesso, permettono di proporlo come possibile device di interesse chirurgico.

Valutata la fattiva trasferibilità dello scaffold in studio su un modello umano, l'obiettivo di un (si spera) prossimo futuro è quello di indagare gli effetti a lungo termine (almeno un anno) del flusso ematico e della naturale reazione infiammatoria dell'ospite sul materiale.

La mirabile funzionalizzabilità della nanostruttura presa in considerazione, ci permetterà di modificare ulteriormente la complessità del già intricato intreccio di fibre, per renderlo sempre più simile a quanto di più complesso esista in natura, ossia la matrice extracellulare.

BIBLIOGRAFIA

1. Fox CJ, Gillespie DL, O'Donnell SD, Rasmussen TE, Goff JM, Johnson CA, Galgon RE, Sarac TP, Rich NM. Contemporary management of wartime vascular trauma. *J Vasc Surg* 2005;41:638-644.
2. Tsai JW, Ayubi FS, Rice RD, Zhang Z, Armstrong PJ. Permacol (porcine dermal collagen) and Alloderm (acellular cadaveric dermis) as a vascular patch repair for common carotid arteriotomy in a rabbit model. *Ann Vasc Surg* 2009;23:374-381.
3. Muto A, Nishibe T, Dardik H, Dardik A. Patches for carotid artery endarterectomy: current materials and prospects. *J Vasc Surg* 2009;50:206-213.
4. Tremblay D, Zigras T, Cartier R, Leduc L, Butany J, Mongrain R, Leask RL. A comparison of mechanical properties of materials used in aortic arch reconstruction. *Ann Thorac Surg* 2009;88:1484-1491.
5. Smaill BH, McGiffin DC, Legrice IJ, Young AA, Hunter PJ, Galbraith AJ. The effect of synthetic patch repair of coarctation on regional deformation of the aortic wall. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000;120:1053-1063.
6. Hertzner NR, Mascha EJ. A personal experience with coronary artery bypass grafting, carotid patching, and other factors influencing the outcome of carotid endarterectomy. *J Vasc Surg* 2006;43:959-968.
7. Jacobowitz GR, Kalish JA, Lee AM, Adelman MA, Riles TS, Landis R. Long-term follow-up of saphenous vein, internal jugular vein, and knitted Dacron patches for carotid artery endarterectomy. *Ann Vasc Surg* 2001;15:281-287.
8. Aburahma AF. Patch closure improves results with carotid endarterectomy. *Semin Vasc Surg* 2004;17:243-252.
9. Wong P, Hopkins S, Vincente D, Williams K, Macri N, Berger R. Differences in neointima formation between impervious and porous polytetrafluoroethylene vascular patch material. *Ann Vasc Surg* 2002;16:407-412.
10. Bond R, Rerkasem K, Naylor R, Rothwell PM. Patches of different types for carotid patch angioplasty. *Cochrane Database Syst Rev* 2004;2:CD000071.
11. Edelman ER. Vascular tissue engineering: designer arteries. *Circ Res* 1999;85:1115-1117.
12. Christine ES, Jennie MB. Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. *Biomaterials* 2000;21:2215-2231.

13. L'Heureux N, Dusserre N, Marini A, Garrido S, de la Fuente L, McAllister T. Technology insight: the evolution of tissue-engineered vascular grafts – from research to clinical practice. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2007;4:389-395.
14. Oh SH, Lee JH. Hydrophilization of synthetic biodegradable polymer scaffolds for improved cell/tissue compatibility. *Biomed Mater* 2013;8:014101.
15. Levorson EJ, Sreerekha PR, Chennazhi KP, Kasper FK, Nair SV, Mikos AG. Fabrication and characterization of multiscale electrospun scaffolds for cartilage regeneration. *Biomed Mater* 2013;8:014103.
16. Rim NG, Shin CS, Shin H. Current approaches to electrospun nanofibers for tissue engineering. *Biomed Mater* 2013;8:014102.
17. Xu W, Atala A, Yoo JJ, Lee SJ. Controllable dual protein delivery through electrospun fibrous scaffolds with different hydrophilicities. *Biomed Mater* 2013;8:014104.
18. Arenas-Herrera JE, Ko IK, Atala A, Yoo JJ. Decellularization for whole organ bioengineering. *Biomed Mater* 2013;8:014106.
19. Kim J, Jeong SY, Ju YM, Yoo JJ, Smith TL, Khang G, Lee SJ, Atala A. In vitro osteogenic differentiation of human amniotic fluid-derived stem cells on a poly(lactide-co-glycolide) (PLGA)–bladder submucosa matrix (BSM) composite scaffold for bone tissue engineering. *Biomed Mater* 2013;8:014107.
20. Choi JS, Kim EY, Kim MJ, Giegengack M, Khang FA, Khang G, Shay S. In vitro evaluation of the interactions between human corneal endothelial cells and extracellular matrix proteins. *Biomed Mater* 2013;8:014108.
21. Shin'oka T, Matsumura G, Hibino N, Naito Y, Watanabe M, Konuma T, Sakamoto T, Nagatsu M, Kurosawa H. Midterm clinical result of tissue-engineered vascular autografts seeded with autologous bone marrow cells. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;129:1330-1338.
22. Cho SW, Park HJ, Ryu JH, Kim SH, Kim YH, Choi CY, Lee MJ, Kim JS, Jang IS, Kim DI, Kim BS. Vascular patches tissue-engineered with autologous bone marrow-derived cells and decellularized tissue matrices. *Biomaterials* 2005;26:1915-1924.
23. Schmidt D, Mol A, Neuenschwander S, Breymann C, Gossi M, Zund G, Turina M, Hoerstrup SP. Living patches engineered from human umbilical cord derived fibroblasts and endothelial progenitor cells. *Eur J Cardiothorac Surg* 2005;27:795-800.
24. Stock UA, Sakamoto T, Hatsuoka S, Martin DP, Nagashima M, Moran AM, Moses MA, Khalil PN, Schoen FJ, Vacanti JP, Mayer JE. Patch augmentation of the pulmonary artery with

- bioabsorbable polymers and autologous cell seeding. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000;120:1158-1167.
25. Yang C, Sodian R, Fu P, Luders C, Lemke T, Du J, Hubler M, Weng Y, Meyer R, Hetzer R. In vitro fabrication of a tissue engineered human cardiovascular patch for future use in cardiovascular surgery. *Ann Thorac Surg* 2006;81:57-63.
 26. Mettler BA, Sales VL, Stucken CL, Anttila V, Mendelson K, Bischoff J, Mayer JE. Stem cell-derived, tissue-engineered pulmonary artery augmentation patches in vivo. *Ann Thorac Surg* 2008;86:132-140.
 27. Sales VL, Mettler BA, Lopez-Illasaca M, Johnson JA, Mayer JE. Endothelial progenitor and mesenchymal stem cell-derived cells persist in tissue-engineered patch in vivo: Application of green and red fluorescent protein-expressing retroviral vector. *Tissue Eng* 2007;13:525-535.
 28. Mendelson K, Aikawa E, Mettler BA, Sales V, Martin D, Mayer JE, Schoen FJ. Healing and remodeling of bioengineered pulmonary artery patches implanted in sheep. *Cardiovasc Pathol* 2007;16:277-282.
 29. Iwai S, Sawa Y, Taketani S, Torikai K, Hirakawa K, Matsuda H. Novel tissue-engineered biodegradable material for reconstruction of vascular wall. *Ann Thorac Surg* 2005;80:1821-1827.
 30. Avci-Adali M, Paul A, Ziemer G, Wendel HP. New strategies for in vivo tissue engineering by mimicry of homing factors for self-endothelialisation of blood contacting materials. *Biomaterials* 2008;29:3936-3945.
 31. Avci-Adali M, Ziemer G, Wendel HP. Induction of EPC homing on biofunctionalized vascular grafts for rapid in vivo self-endothelialization: a review of current strategies. *Biotechnol Adv* 2010;28:119-129.
 32. Norotte C, Marga FS, Niklason LE, Forgacs G. Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting. *Biomaterials* 2009;30:5910-5917.
 33. Monchaux E, Vermette P. Effects of surface properties and bioactivation of biomaterials on endothelial cells. *Front Biosci (Schol Ed)* 2010;1-2:239-255.
 34. Takahashi H, Yokota T, Uchimura E, Miyagawa S, Ota T, Torikai K, Saito A, Hirakawa K, Kitabayashi K, Okada K, Sawa Y, Okita Y. Newly developed tissue-engineered material for reconstruction of vascular wall without cell seeding. *Ann Thorac Surg* 2009;88:1269-1276.
 35. Ceonzo K, Gaynor A, Shaffer L, Kojima K, Vacanti CA, Stahl GL. Polyglycolic acid-induced inflammation: Role of hydrolysis and resulting complement activation. *Tissue Eng* 2006;12:301-308.

36. Vindigni V, Cortivo R, Iacobellis L, Abatangelo G, Zavan B. Hyaluronan benzyl ester as a scaffold for tissue engineering. *Int J Mol Sci* 2009;10:2972-2985.
37. Genasetti A, Vigetti D, Viola M, Karousou E, Moretto P, Rizzi M, Bartolini B, Clerici M, Pallotti F, De Luca G, Passi A. Hyaluronan and human endothelial cell behavior. *Connect Tissue Res* 2008;49:120-123.
38. Ibrahim S, Ramamurthi A. Hyaluronic acid cues for functional endothelialization of vascular constructs. *J Tissue Eng Regen Med* 2008;2:22-32.
39. Turner NJ, Kielty CM, Walker MG, Canfield AE. A novel hyaluronan-based biomaterial (Hyaff-11) as a scaffold for endothelial cells in tissue engineered vascular grafts. *Biomaterials* 2004;25:5955-5964.
40. Remuzzi A, Mantero S, Colombo M, Morigi M, Binda E, Camozzi D, Imberti B. Vascular smooth muscle cells on hyaluronic acid: Culture and mechanical characterization of an engineered vascular construct. *Tissue Eng* 2004;10:699-710.
41. Pasquinelli G, Vinci MC, Gamberini C, Orrico C, Foroni L, Guarnieri C, Parenti A, Gargiulo M, Ledda F, Caldarera CM, Muscari C. Architectural organization and functional features of early endothelial progenitor cells cultured in a hyaluronan-based polymer scaffold. *Tissue Eng Part A* 2009;15:2751-2762.
42. Lepidi S, Grego F, Vindigni V, Zavan B, Tonello C, Deriu GP, Abatangelo G, Cortivo R. Hyaluronan biodegradable scaffold for small-caliber artery grafting: preliminary results in an animal model. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2006;32:411-417.
43. Joddar B, Ibrahim S, Ramamurthi A. Impact of delivery mode of hyaluronan oligomers on elastogenic responses of adult vascular smooth muscle cells. *Biomaterials* 2007;28:3918-3927.
44. Joddar B, Ramamurthi A. Elastogenic effects of exogenous hyaluronan oligosaccharides on vascular smooth muscle cells. *Biomaterials* 2006;27:5698-5707.
45. Pandis L, Zavan B, Abatangelo G, Lepidi S, Cortivo R, Vindigni V. Hyaluronan-based scaffold for in vivo regeneration of the rat vena cava: preliminary results in an animal model. *J Biomed Mater Res* 2010;93:1289-1296.
46. Zavan B, Vindigni V, Lepidi S, Iacopetti I, Avruscio G, Abatangelo G, Cortivo R. Neoarteries grown in vivo using a tissue-engineered hyaluronan-based scaffold. *FASEB J* 2008;22:2853-2861.
47. Lepidi S, Abatangelo G, Vindigni V, Deriu GP, Zavan B, Tonello C, Cortivo R. In vivo regeneration of small-diameter (2 mm) arteries using a polymer scaffold. *FASEB J* 2006;20:103-105.

48. Patel A, Fine B, Sandig M, Mequanint K. Elastin biosynthesis: the missing link in tissue-engineered blood vessels. *Cardiovasc Res* 2006;71:40-49.
49. Karnik SK, Brooke BS, Antonio BG, Sorensen L, Wythe JD, Schwartz RS. A critical role for elastin signaling in vascular morphogenesis and disease. *Development* 2003;130:411-423.
50. Long JL, Tranquillo RT. Elastic fiber production in cardiovascular tissue-equivalents. *Matrix Biol* 2003;22:339-350.
51. Li DY, Brooke B, Davis EC, Mecham RP, Sorensen LK, Boakk BB. Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis. *Nature* 1998;393:276-280.
52. Kielty CM, Sherratt MJ, Shuttleworth CA. Elastic fibres. *J Cell Sci* 2002;115:2817-2828.
53. Ratcliffe A. Tissue engineering of vascular grafts. *Matrix Biol* 2000;19:353-357.
54. L'Heureux N, Germain L, Labbe R, Auger FA. In vitro construction of a human blood vessel from cultured vascular cells: a morphologic study. *J Vasc Surg* 1993;17:499-509.
55. L'Heureux N, McAllister TN, de la Fuente LM. Tissue-engineered blood vessel for adult arterial revascularization. *N Engl J Med* 2007;357:1451-1453.
56. L'Heureux N, Dusserre N, Konig G, Victor B, Keire P, Wight TN, Chronos NA, Kyles AE, Gregory CR, Hoyt G, Robbins RC, McAllister TN. Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization. *Nat Med* 2006;12:361-365.
57. Alsberg E, Anderson KW, Albeiruti A, Rowley JA, Mooney DJ. Engineering growing tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:12025-12030 / Mann BK, West JL. Tissue engineering in the cardiovascular system: progress towards a tissue engineered heart. *Anat Rec* 2001;263:367-371.
58. Matsumura G, Hibino N, Ikada Y, Kurosawa H, Shin'oka T. Successful application of tissue engineered vascular autografts: clinical experience. *Biomaterials* 2003;24:2303-2308.
59. Weinberg CB, Bell E. A blood vessel constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science* 1986;231:397-400.
60. Ye Q, Zünd G, Jockenhoevel S, Hoerstrup SP, Schoeberlein A, Grunenfelder J, Turina M. Tissue engineering in cardiovascular surgery: new approach to develop completely human autologous tissue. *Eur J Cardiothorac Sur* 2000;17:449-454.
61. Zhang WJ, Liu W, Cui L, Cao Y. Tissue engineering of blood vessel. *J Cell Mol Med* 2007;11:945-957.
62. Kerdjoudj H, Moby V, Berthelemy N, Gentils M, Boura C, Bordenave L, Stoltz JF, Menu P. The ideal small arterial substitute: Role of cell seeding and tissue engineering. *Clin Hemorheol Microcirc* 2007;37:89-98.

63. Kaushal S, Amiel GE, Guleserian KJ, Shapira OM, Perry T, Sutherland FW, et al. Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. *Nat Med* 2001;7:1035-1040.
64. He M, Shirota T, Yasui H, Matsuda T. Canine endothelial progenitor cell-lined hybrid vascular graft with nonthrombogenic potential. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;126:455-464.
65. Niklason LE, Gao J, Abbott WM, Hirschi KK, Houser S, Marini R, et al. Functional arteries grown in vitro. *Science* 1999;284:489-493
66. Hoerstrup SP, Cummings I, Lachat M, Schoen FJ, Jenni R, Leschka S, et al. Functional growth in tissue-engineered living, vascular grafts: follow-up at 100 weeks in a large animal model. *Circulation* 2006;114:I159-66.
67. Campbell JH, Efendy JL, Campbell GR. Novel vascular graft grown within recipient's own peritoneal cavity. *Circ Res* 1999;85:1173-1178.
68. Torikai K, Ichikawa H, Hirakawa K, Matsumiya G, Kuratani T, Iwai S, Saito A, Kawaguchi N, Matsuura N, Sawa Y. A self-renewing, tissue-engineered vascular graft for arterial reconstruction. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008;136:37-45.
69. Iwai S, Sawa Y, Ichikawa H, Taketani S, Uchimura E, Chen G, et al. Biodegradable polymer with collagen microsp sponge serves as a new bioengineered cardiovascular prosthesis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004;128:472-479.
70. Haseltine WA. *J Regen Med* 2003;4:15-8.
71. Daar A. S. (2005) Regenerative medicine : A taxonomy for addressing ethical, legal and social issues .In : Gutmann T, Daar AS, Sells RA, Land W editors. Ethical ,legal and social issues in organ transplantation .Munich : PABST Publishers 368-77.
72. Baron F. and Storb R. (2008) Stem cell therapy: past, present and future . In *Advances in tissue engineering* (eds Polak J., Mantalaris S.& Harding S.E.) London UK : Imperial College Press pp.561-591.
73. Ikada Y. (2006) *J. R. Soc. Interface* 3:589-601.
74. Gioviale M.C., Damiano G., Cacciabauda F., Palumbo V.D., Bellavia M., Cassata G., Spinelli G., Buscemi G., Lo Monte A.I. (2011) *Transplant Proc* 43(4):1173-7.
75. Gioviale M.C., Damiano G., Montalto G., Buscemi G., Romano M., Lo Monte A.I. (2009) *Transplant Proc* 41(4):1363-6.
76. Damiano G., Gioviale M.C., Lombardo C., Lo Monte A.I. (2009) *Transplant Proc* 41(4):1116-8.
77. Greenwood HL., Singer P.A., Downey G.P., Martin D.K., Thorsteinsdottir H., Daar A.S. (2006a) *PLoS Med* 3(9):e381.

78. Vacanti C.A.(2006) *J. Cell. Mol. Med.* 10:569-76.
79. Petit-Zeman S.(2001) *Nat. Biotechnol.* 19:201-6.
80. Eaglstein WH.and Falanga V. (1997) *Clin Ther* 19:894-5.
81. OsirisTherapeutics (2005) Osteocel. Available:http://www.osiristx.com/products_osteocel.php.
82. Buttery L. and Shakesheff K.M. (2008) A brief introduction to different cell types. In *Advances in tissue engineering* (Polak J.,Mantalaris S., Harding S.E.) London UK: Imperial College Press pp.16-32.
83. Xynos I.D., Hukkanan M.V.J, Batten J., Buttery L.D., Hench L.L., Polak J.M. (2000) *Calcif. Tissue Int.* 67:321-9.
84. Evans M.J.and Kaufman M.H. (1981) *Nature* 292:154-6.
85. Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S, Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M.(1998) *Science* 282 :1145-7.
86. Guillot P.V., Cui W., Fisk N.M., Polak J.(2007) *J. Cell. Mol. Med.* 11:935-44.
87. Polak D.J. (2010) *J. R. Soc. Interface* 7:S777-S781.
88. Takahashi K. and Yamanaka S. (2006) *Cell* 126:663-76.
89. Kawamura T., Suzuki J., Wang J.V., Menendez S., Morera L.B., Raya A., Wahl G.M., Belmonte J.C. (2009) *Nature* 460:1140-4.
90. Hollander A.P.,Wraith D.C. (2008) Stem cell Immunology. In *Advances in tissue engineering* (eds. Polak J., Mantalaris S., Harding S.E.) London UK : Imperial College Press pp. 199-213.
91. Zhanga X., Reagan M.R., Kaplan D.L. (2009) *Adv. Deliv. Rev.* 61 (12):988-1006.
92. Singh M., Tech B., Berkland C., Detamore M.S.,(2008) *Tissue Engineering* 14:4.
93. Day R.M., Boccaccini A.R., Maquet V., Shurey S., Forbes A., Gabe S.M., Jerome R. (2004) *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 15:729-34.
94. Choi SW., Zhang Y., Xia Y. (2010) *Langmuir* 26 (24):19001-6.
95. Leong KF, Chua CK, Sudarmadji N, Yeong WY. (2008). Engineering functionally graded tissue engineering scaffolds. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 1:140–152.
96. Sill, T. J., & von Recum, H. A. (2008). Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, 29(13), 1989–2006. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.01.011.
97. Lutolf, M. P., Lauer-Fields, J. L., Schmoekel, H. G., Metters, A. T., Weber, F. E., Fields, G. B., et al. (2003). Synthetic matrix metalloproteinase-sensitive hydrogels for the conduction of tissue regeneration: engineering cell-invasion characteristics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(9), 5413–5418.

98. Bahney, C. S., Hsu, C.-W., Yoo, J. U., West, J. L., & Johnstone, B. (2011). A bioresponsive hydrogel tuned to chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *The FASEB Journal*.
99. Tibbitt, M. W., & Anseth, K. S. (2009). Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 103(4), 655–663.
100. Nicodemus, G. D., & Bryant, S. J. (2008). Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, 14(2), 149–165.
101. Chan, B., & Leong, K. (2008). Scaffolding in tissue engineering: General approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal*, 17, 467–479.
102. Liu, X., Won, Y., & Ma, P. X. (2006). Porogen-induced surface modification of nano-fibrous poly(l-lactic acid) scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 27(21), 3980–3987.
103. Petrie TA, Raynor JE, Dumbauld DW, Lee TT, Jagtap S, Templeman KL, Collard DM, García AJ (2010) Multivalent Integrin-Specific Ligands Enhance Tissue Healing and Biomaterial Integration. *Science Translational Medicine* 2 (45):45ra60.
104. Shekaran, A., & García, A. J. (2011). Extracellular matrixmimetic adhesive biomaterials for bone repair. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 96A(1), 261–272.
105. Takagi J (2004) Structural basis for ligand recognition by RGD (Arg-Gly-Asp)-dependent integrins. *Biochemical Society transactions* 32 (Pt3):403–406.
106. Geckil, H., Xu, F., Zhang, X., Moon, S., & Demirci, U. (2010). Engineering hydrogels as extracellular matrix mimics. *Nanomedicine*, 5(3), 469–484.
107. Raub, C. B., Unruh, J., Suresh, V., Krasieva, T., Lindmo, T., Gratton, E., et al. (2008). Image correlation spectroscopy of multiphoton images correlates with collagen mechanical properties. *Biophysical Journal*, 94(6), 2361–2373.
108. Wei, G., & Ma, P. X. (2004). Structure and properties of nanohydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 25(19), 4749–4757.
109. Helm, C. L., Zisch, A., & Swartz, M. A. (2007). Engineered blood and lymphatic capillaries in 3-D VEGF-fibrin-collagen matrices with interstitial flow. *Biotechnology and Bioengineering*, 96(1), 167–176.
110. Annabi, N., Nichol, J. W., Zhong, X., Ji, C., Koshy, S., Khademhosseini, A., et al. (2010). Controlling the porosity and microarchitecture of hydrogels for tissue engineering. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, 16(4), 371–383.
111. Owen, S. C., & Shoichet, M. S. (2010). Design of three-dimensional biomimetic scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 94A(4), 1321–1331.

112. Oh, S. H., Park, I. K., Kim, J. M., & Lee, J. H. (2007). In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method. *Biomaterials*, 28(9), 1664–1671.
113. O'Brien, F. J., Harley, B. A., Yannas, I. V., & Gibson, L. J. (2005). The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials*, 26(4), 433–441.
114. Liu, X., & Ma, P. X. (2004). Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Annals of Biomedical Engineering*, 32(3), 477–486.
115. Choi, S.-W., Zhang, Y., & Xia, Y. (2010). Three-dimensional scaffolds for tissue engineering: The importance of uniformity in pore size and structure. *Langmuir*, 26(24), 19001–19006.
116. Oh S.H., Park I.K., Kim J.M, Lee J.H. (2007) *Biomaterials* 28: 1664.
117. Karageorgiou V., Kaplan D.(2005) *Biomaterials* 26:5474.
118. Malda J., Woodfield T.B.F., Van Der Vloodt F., Kooy F.K., Martens D.E., Tramper J., Blitterswijk C.A., Riesle J. (2004) *Biomaterials* 25:5773.
119. Gentleman E., Swain R.J., Evans N.D., Boonrungsiman S., Jell G., Ball M.D., Shean T.A., Oyen M.L., Porter A., Stevens M.M. (2009) *Nat. Mater.* 8:763-70.
120. II International Consensus Conference on Biomaterials, Chester, Gran Bretagna, 1991.
121. Baldwin S.P., Saltzman W.M. (1998) *Adv. Drug Delivery Reviews* 33:71-86.
122. Thull R. (2002) *Biomol. Eng.* 19:43-50.
123. Kim B.S., Mooney D.J.(1998) *Trends Biotechnol.* 16:224-30.
124. Hynes R.O (1992) *Cell* 69:11-25.
125. Deuel T.F. (1997) Growth factors. In: *Principles of Tissue Engineering* edited by Lanza R.P., Langer R., Chick W.L. New York Academic Press pp.133-49
126. Pariente J.L., Kim B.S., Atala A. (2002) *J. Urol.* 167:1867-71.
127. Pariente J.L., Kim B.S., Atala A.(2001) *J. Biomed. Mater. Res.* 55:33-9.
128. Stitzel J., Liu J., Lee S.J., Kamura M., Berry J., Sokerc S., Limc G., Dykec M.V., Richard C., James J.Y. (2006) *Biomaterials* 27: 1088-94
129. Murugan R., Ramakrishna S. (2005) *Compos. Sci Technol* 65: 2385-2406.
130. Takasu Y., Hiromi Y., Kozo T. (2002) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66:2715-8.
131. Wang Y., Kim H.J, Vunjak-Novakovic G., Kaplan D.L. (2006) *Biomaterials* 27:6064-82.
132. Mauney J.R., Nguyen T., Gillen K., Kirker-Head C., Gimble J.M., Kaplan D.L. (2007) *Biomaterials* 28:5280-90.
133. Uebersax L., Hagenmuller H., Hofmann S., Gruenblatt E., Muller R., Vunjak-Novakovic G., Kaplan D.L., Merkle H.P., Meinel L. (2006) *Tissue Eng.* 12:3417-29.

134. Rossitch E.Jr., Bullard D.E., Oakes W.J. (1987) Childs Nerv. Syst. 3:375-8.
135. Jun S., Hong Y., Imamura H., Ha B.Y., Bechhoefer J., Chen P., (2004) Biophysical J 87:1249
136. Stehle M.A., Rosch P., Petry R., Hanck A., Thull R., Kiefer W., Popp J. (2004) Physical Chemistry Chemical Physics 6:5232.
137. Gilding DK. (1981) Biocompatibility of Clinical Implant Materials edited by Williams F.D., Boca Raton FL., CRC Press pp. 209-32.
138. Guarino V., Causa F., Taddei P., Di Foggia M., Ciapetti G., Martini D., Fagnano C., Baldini N., Ambrosio L. (2008) Biomaterials 29:3662-70
139. Sarkar S., Lee G.Y., Wong J.Y., Desai T.A. (2006) Biomaterials 27:4775-82.
140. Lee S.J., Liu J., Oh S.H., Soker S., Atala A., Yoo J.J. (2008) Biomaterials 29:2891-8.
141. Martin C., Winet H., Boo J.Y. (1996) Biomaterials 17(24):2373-80.
142. Heller J., Barr J., Shah D.T., Ng S.Y., Shen H.R., Baxter B.C. (2005) Poly(ortho esters) In: Ma P.X., Elisseff J. editors. Scaffolding in tissue engineering, Boca Raton FL., CRC Press pp. 91-110.
143. Craparo E.F., Teresi G., Bondi M.L., Licciardi M, Cavallaro G. (2011) International Journal of Pharmaceutics 406:135-44.
144. Licciardi M., Cavallaro G., Di Stefano M., Fiorica C., Giammona G. (2011) Macromol. Biosci. 11:445-54.
145. Pitarresi G, Palumbo F.S., Fiorica C., Calascibetta F., Giammona G. (2010) European Polymer Journal 46:181-4.
146. Pitarresi G., Palumbo F.S., Albanese A., Licciardi M., Calascibetta F., Giammona G. (2008) European Polymer Journal 44:3764-75.
147. Lo Monte A I, Licciardi M, Bellavia M, Damiano G, Palumbo VD, Palumbo F S, Abbruzzo A, Fiorica C, Pitarresi G, Cacciabauda F, Tripod C, Belmonte B, Spinelli G, Altomare R, Gioviale M C, Cassata G, Sammartano A, Genova P, Salina A, Buscemi G, Giammona G. Biocompatibility and biodegradability of electrospun Phea-Pla Scaffolds: our preliminary experience in a murine animal model. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures 2012;841-51.
148. Pitarresi G, Fiorica C, Palumbo FS, Rigogliuso S, Ghersi G, Giammona G. Heparin functionalized polyaspartamide/polyester scaffold for potential blood vessel regeneration. J Biomed Mater Res A 2014;102:1334-41.
149. Shin'oka T, Imai Y, Ikada Y. Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. N Engl J Med 2001;344:532-3.
150. Kaihara S, Kim S, Benvenuto M et al. End-to-end anastomosis between tissue-engineered intestine and native small bowel. Tissue Eng 1999;5:339-46.

151. Aikawa M, Miyazawa M, Okamoto K, Toshimitsu Y, Torii T, Okada K, Akimoto N, Ohtani Y, Koyama I, Yoshito I. A novel treatment for bile duct injury with a tissue-engineered bioabsorbable polymer patch. *Surgery*. 2009;147:575-80.
152. Pitarresi G, Fiorica C, Palumbo Fs, Rigogliuso S, Ghersi G, Giammona G. Heparin Functionalized Polyaspartamide/Polyester Scaffold For Potential Blood Vessel Regeneration. *J Biomed Mater Res A* 2013 (In Press).
153. Xu D, Fuster MM, Lawrence R, Esko JD. Heparan sulphate regulates VEGF 165- and VEGF 121-mediated vascular hyperpermeability *J Biol Chem* 2011;286:737-745.