

POLITECNICO DI MILANO

Facoltà di Ingegneria dei Sistemi

Corso di Laurea Specialistica in Ingegneria Biomedica

Dipartimento di Ingegneria Biomedica



**STUDIO DELLA PERFUSIONE NEI BIOREATTORI
PER COSTRUTTI TUBOLARI**

Relatore: Prof.ssa Sara Mantero

Correlatore: Ing. M. Adelaide Asnaghi

Tesi di laurea di:

Sergio Novelli Matr. 720940

Anno Accademico : 2009 – 2010

Alla mia famiglia

Ai miei amici

Indice

Sommario.....	3
----------------------	----------

Abstract.....	13
----------------------	-----------

Introduzione.....	23
--------------------------	-----------

Cap. 1: Bioreattori per costrutti tubolari.....	30
--	-----------

1.1 Bioreattore per la trachea.....	32
-------------------------------------	----

1.1.1 <i>Struttura della trachea e principali patologie.....</i>	32
--	----

1.1.2 <i>Ingegnerizzazione della trachea.....</i>	35
---	----

1.1.3 <i>Il bioreattore per l'ingegnerizzazione della trachea.....</i>	36
--	----

1.2 Bioreattore per i vasi di piccolo calibro.....	46
--	----

1.2.1 <i>Struttura dei vasi arteriosi e principali patologie.....</i>	46
---	----

1.2.2 <i>Ingegnerizzazione dei vasi di piccolo calibro.....</i>	50
---	----

1.2.3 <i>Il bioreattore.....</i>	51
----------------------------------	----

1.3 La perfusione nei bioreattori.....	57
--	----

1.3.1 <i>I vantaggi della perfusione.....</i>	57
---	----

1.3.2 <i>Il circuito di perfusione.....</i>	61
---	----

Cap. 2: Modifica del bioreattore per la trachea.....	64
---	-----------

2.1 Specifiche di progetto.....	64
---------------------------------	----

2.2 Il primo progetto: flusso interno.....	67
--	----

2.2.1 <i>L'albero di coltura.....</i>	67
---------------------------------------	----

2.2.2 <i>L'albero motore ed il blocco agitatori.....</i>	70
--	----

2.2.3 Sistema complessivo e considerazioni.....	74
2.3 Secondo progetto: camera di raccolta interna.....	77
2.3.1 Camera di raccolta interna.....	77
2.3.2 Insetto lato motore.....	81
2.3.3 Sistema complessivo e considerazioni.....	83
2.4 Terzo progetto: modifiche albero e camera.....	87
2.4.1 Modifica all'albero di coltura.....	87
2.4.2 Modifiche alla camera di coltura.....	89
2.4.3 Sistema complessivo e considerazioni.....	92
Cap. 3: Dimensionamento del sistema di perfusione.....	95
3.1 Lunghezza dei tubi ossigenanti.....	95
3.2 Trasporto di ossigeno e Shear Stress.....	104
3.2.1 Dimensionamento della portata.....	104
3.2.2 Trasporto di ossigeno.....	109
3.2.3 Modello alternativo per il trasporto di ossigeno.....	118
Conclusioni e sviluppi futuri.....	123
Appendice.....	125
Bibliografia.....	132

Sommario

L'ingegneria tissutale, offre un'alternativa alle tradizionali tecniche di trapianto di organi ed impianto di protesi largamente impiegate in ambito clinico per ripristinare la funzionalità di un tessuto patologico. Il fine ultimo di questa disciplina è la creazione di un costrutto vitale partendo dalle cellule del paziente, capace di adattarsi, crescere e rigenerarsi una volta impiantato. Per fare questo, si avvale di tre elementi principali:

- le cellule: la scelta della corretta fonte cellulare è un punto cruciale per l'ingegnerizzazione di un tessuto;
- lo scaffold: fornisce un supporto tridimensionale alle cellule. Forma, struttura e materiali sono scelti a seconda della specifica applicazione;
- il bioreattore: costituisce il sistema di condizionamento della coltura, fornendo opportuni stimoli e mantenendo il costrutto in un ambiente sterile.

Questo lavoro di tesi si focalizza sul terzo elemento: il bioreattore. In particolare sono presentati due dispositivi per l'ingegnerizzazione di costrutti tubolari: uno per la trachea e uno per i vasi di piccolo calibro. Viene inoltre descritto un circuito di perfusione, in grado di attuare un migliore scambio di metaboliti e cataboliti rispetto ad una coltura statica e fornire una stimolazione idrodinamica al costrutto, che, in alcuni casi, può influire sul corretto sviluppo del tessuto (McCulloch et al., 2004; Eoin et al., 2008; Hoerstrup et al., 2001).

Il circuito di perfusione (fig. 1), è pensato per adattarsi a diversi dispositivi,

pertanto risulta essere molto essenziale. Gli elementi che lo compongono sono:

- una pompa Shuttle (Harvard Apparatus) di dimensioni contenute, con un range di portata di 1,25 – 50 mL/min, adatta per essere posizionata nell'incubatore;
- un sistema di tubi (Tygon® SI Silicone 3350 Platinum) con avvolgimenti, che garantiscono l'ossigenazione del medium. La lunghezza è stata calcolata in 8,48 m assumendo una portata di 20 mL/min, sulla base del modello presentato da David E. Orr et al., 2008;
- un reservoir che deve essere dimensionato a seconda della specifica applicazione;
- un sistema di elementi di collegamento tra circuito e bioreattore.

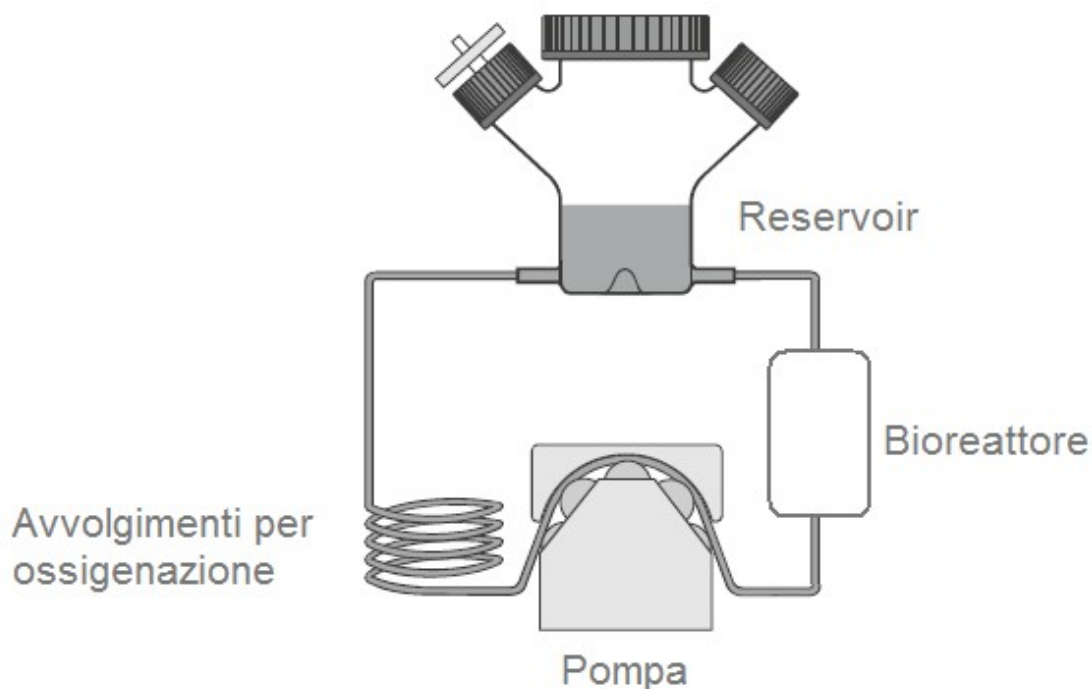


Figura 1. Schematizzazione del circuito di perfusione

Il bioreattore per la trachea (fig. 2) preso in considerazione, è stato realizzato sulla base di quello sviluppato dall'ingegner M. A. Asnaghi durante la tesi di laurea specialistica. In questo dispositivo, il costruito tubolare è posizionato all'interno di una

camera di coltura in PSU (polisulfone), ed è immerso per metà nel medium. Un motore brushless pone in rotazione lo scaffold attorno al suo asse, esponendo la superficie esterna alternativamente alla fase liquida ed a quella gassosa, garantendo nel primo caso lo scambio di metaboliti e cataboliti, e nel secondo caso la saturazione di ossigeno.

Il costrutto è montato su un albero di coltura in PEEK (poliaril etereterchetone) che funge da supporto meccanico. All'interno del lume dello scaffold è introdotto il medium di coltura, che rimane confinato tra l'albero e la superficie interna. La sostituzione del terreno di coltura interno prevede l'apertura della camera, comportando quindi dei rischi per la sterilità.



Figura 2. Foto del bioreattore assemblato. È ben visibile la camera di coltura ed il coperchio (parti gialle), l'albero su cui viene alloggiato lo scaffold (al centro in grigio) e uno dei due agitatori del medium (barretta metallica parallela all'albero).

Questo bioreattore non consente la perfusione del lume dello scaffold, pertanto vengono presentati dei progetti per la modifica al dispositivo, in modo da renderlo compatibile con il circuito di perfusione.

Gli obiettivi che sono stati posti all'inizio del progetto sono:

- perfusione del costrutto tubolare;

- rotazione assiale dello scaffold;
- possibilità di seminare il lume interno dello scaffold;
- separazione dei volumi;
- circuito interno dell'aria;
- assenza di spigoli vivi e di possibili punti di accumulo del medium difficilmente raggiungibili.

Il primo punto fondamentale, è la modifica dell'albero di coltura in modo da permettere la perfusione. A questo proposito sono stati progettati dei fori assiali sulle estremità dell'albero, con un profilo atto ad ottimizzare la sezione di passaggio del flusso (fig. 3).

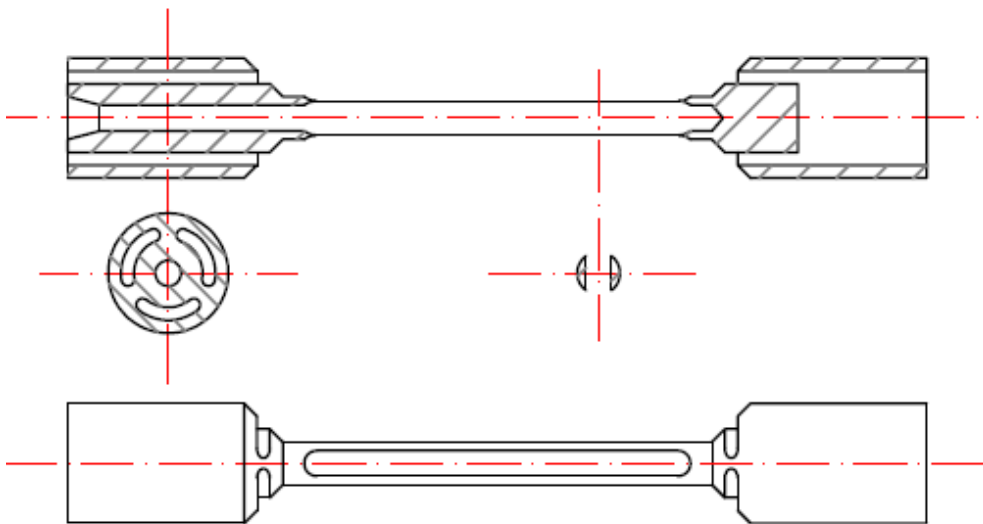


Figura 3. Disegno dell'albero di coltura del primo progetto; è visibile il foro allungato, ricoperto di membrana ossigenante, che mette in comunicazione il circuito dell'aria con il lume dello scaffold.

In questo albero è previsto anche un circuito dell'aria interno, costituito da un foro assiale e da due fori allungati sullo stelo centrale, ricoperti da una membrana ossigenante. Sia il circuito del medium, sia quello dell'aria, trovano continuità anche nell'albero motore e terminano all'esterno del bioreattore: il primo in una camera di raccolta, il secondo posto a contatto con l'atmosfera dell'incubatore tramite un filtro.

L'assemblaggio del bioreattore avviene grazie alle parti mobili che lo

costituiscono (fig. 4). Il dispositivo così progettato necessita del disassamento del motore e presenta alcuni svantaggi:

- l'accoppiamento tra i due alberi risulta critico sia per la trasmissione del moto, sia per l'isolamento dei due terreni e del circuito dell'aria;
- la membrana ossigenante è di difficile posizionamento e deve mantenere l'isolamento tra il circuito dell'aria e quello di perfusione;
- il bioreattore non permette la semina interna dello scaffold.

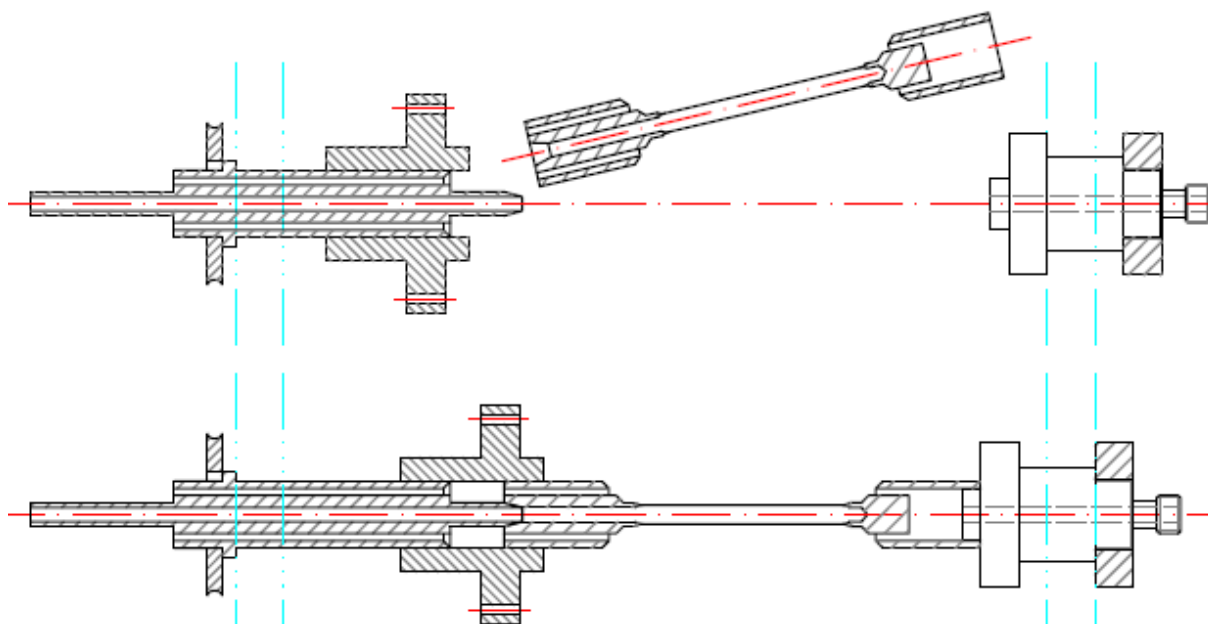


Figura 4. Schema di assemblaggio del bioreattore.

Alla luce di queste considerazioni, è stato sviluppato un progetto alternativo.

Il secondo progetto (fig. 5), mantiene la sezione di passaggio del flusso disegnata per il precedente albero di coltura, ed ha le seguenti caratteristiche:

- separazione in due settori della camera di coltura tramite un setto, con conseguente riduzione del volume di priming. Il settore più grande, contiene il medium di coltura esterno ed alloggia il costruito, il settore più piccolo raccoglie il medium in uscita dall'albero di coltura;
- possibilità di passare dalla fase di semina alla fase di coltura in perfusione

muovendo un componente esterno alla camera, senza dover intervenire direttamente all'interno di essa;

- non necessita del disassamento del motore e rende utilizzabile il sistema di supporto del bioreattore per la trachea già realizzato.

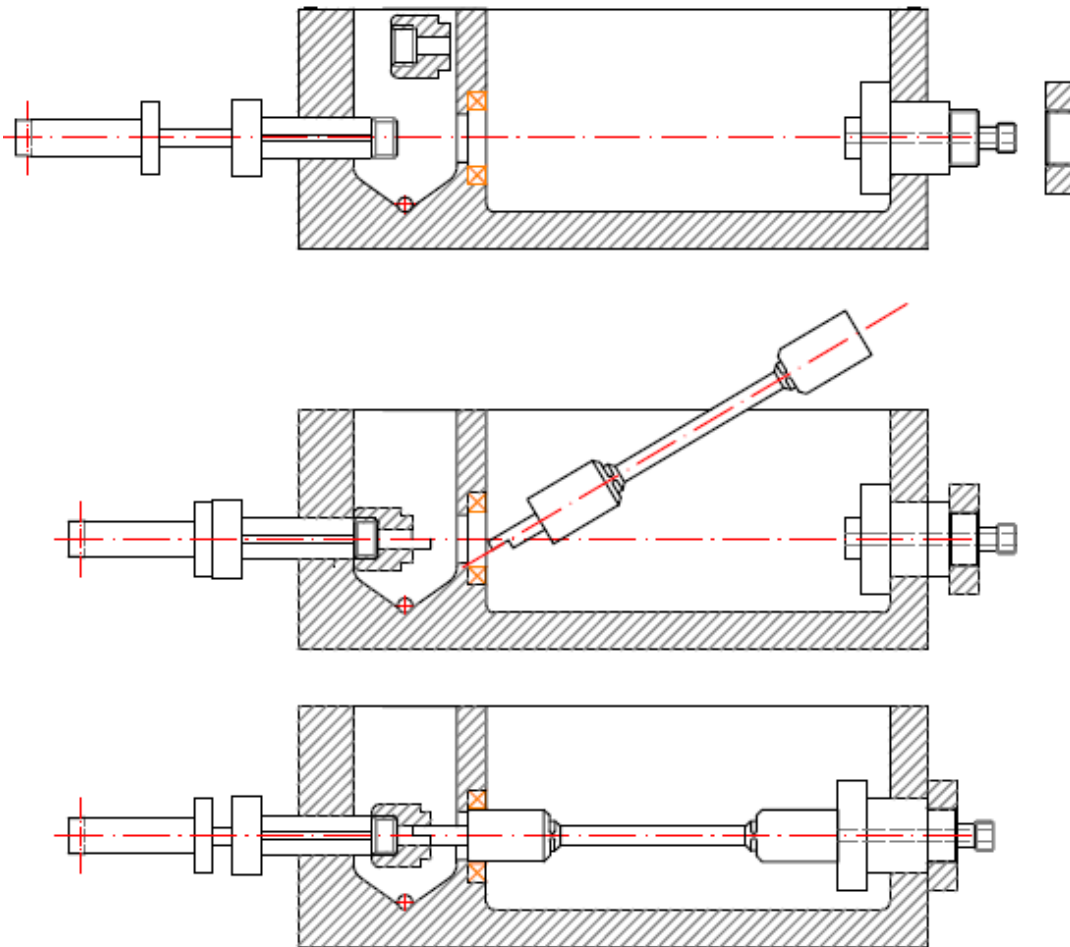


Figura 5. Montaggio del bioreattore, sviluppato nel secondo progetto.

Il medium di coltura che fluisce all'interno del costruito, passa dall'albero di coltura alla camera di raccolta e viene re – immesso nel circuito di perfusione tramite un foro sulla base del bioreattore. Le dimensioni della parete della camera di coltura, sono tali da impedire che le superfici degli elementi mobili all'esterno del bioreattore, possano trovarsi all'interno dopo una corsa assiale.

L'albero di coltura presentato in questo secondo progetto, non prevede un circuito interno dell'aria, pertanto ne viene presentato uno alternativo in cui è presente, compatibile con lo stesso dispositivo. Come nel caso del primo progetto, questo albero di coltura possiede alcune parti che devono essere ricoperte da membrane ossigenanti, risultando quindi critica la separazione dei circuiti.

Viene infine progettato un setto mobile, che può essere inserito in una scanalatura all'interno della camera di coltura del bioreattore iniziale, con l'obiettivo di ottenere una separazione in due settori, rendendolo analogo al dispositivo del secondo progetto.

Il bioreattore per i vasi di piccolo calibro (fig. 6) presentato, è quello realizzato dagli ingegneri V. Ballotta e I. Stefani nella tesi di laurea specialistica. Il dispositivo possiede le seguenti caratteristiche:

- possibilità di perfondere il lume dello scaffold durante la coltura;
- ottimizzazione del trasporto di massa;
- modularità dei componenti;
- minimizzazione degli ingombri del dispositivo (per permettere il posizionamento dello stesso nell'incubatore) e del volume di priming;
- ottimizzazione delle procedure di assemblaggio e posizionamento del costruito per rendere minima la possibilità di contaminazione.

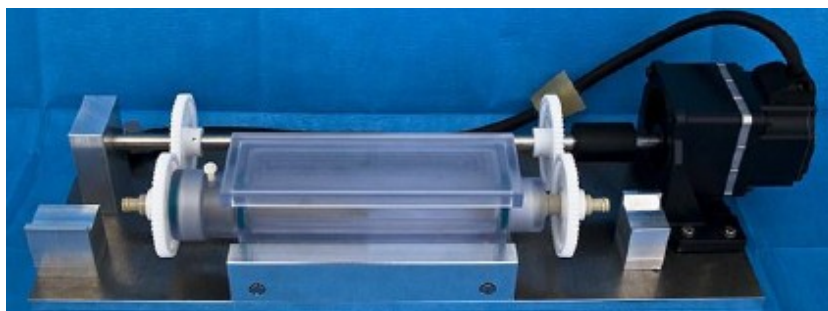


Figura 6. Bioreattore per i vasi di piccolo calibro, montato sulla base di alluminio sulla quale è presente il motore brushless.

Il costrutto è posto all'interno di una camera di coltura in PC (policarbonato) e ruota attorno al suo asse, passando dall'interfaccia liquida a quella gassosa, analogamente a quanto accade nel bioreattore per la trachea. Lo scaffold è montato fra due alberi di coltura in PEEK posti in rotazione sincrona tramite un sistema di ingranaggi. Date le piccole dimensioni del costrutto, gli alberi non occupano spazio nel lume, che quindi può essere perfuso.

Con riferimento a questo bioreattore ed al circuito di perfusione, sono stati fatti alcuni calcoli dello shear stress e del profilo di concentrazione dell'ossigeno.

In primo luogo è stata calcolata la portata del circuito in funzione dello sforzo di taglio idrodinamico, per tre diversi valori di diametro interno del costrutto (fig. 7).

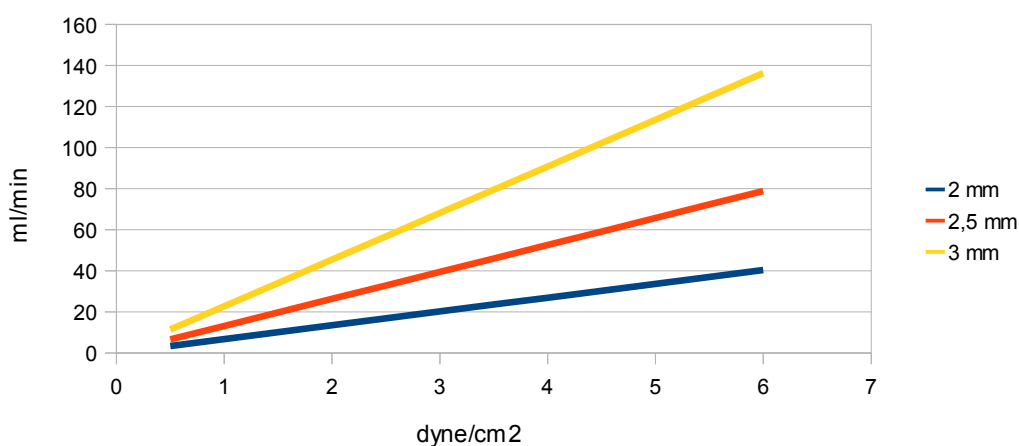


Figura 7. Variazione della portata al variare dello sforzo di taglio per costrutti di diametro 2 mm, 2.5 mm e 3 mm.

I valori di shear stress in letteratura variano tra meno di 1 dyne/cm² (Soletti et al., 2006; Nasser 2003), fino ad 6 – 8 dyne/cm² (O'Cearbhaill et al., 2008; Chrysanthi et al., 2004). Si nota dalla figura 7 un aumento del coefficiente angolare delle rette all'aumentare del diametro interno.

In secondo luogo si fa l'ipotesi che l'ossigenazione del costrutto sia dovuta solo al flusso interno di medium e che la superficie esterna non effettui nessuno scambio di

massa. Sotto questa considerazione si applica il modello di Krogh semplice e si ricava il profilo di concentrazione dell'ossigeno nella parete (fig. 8).

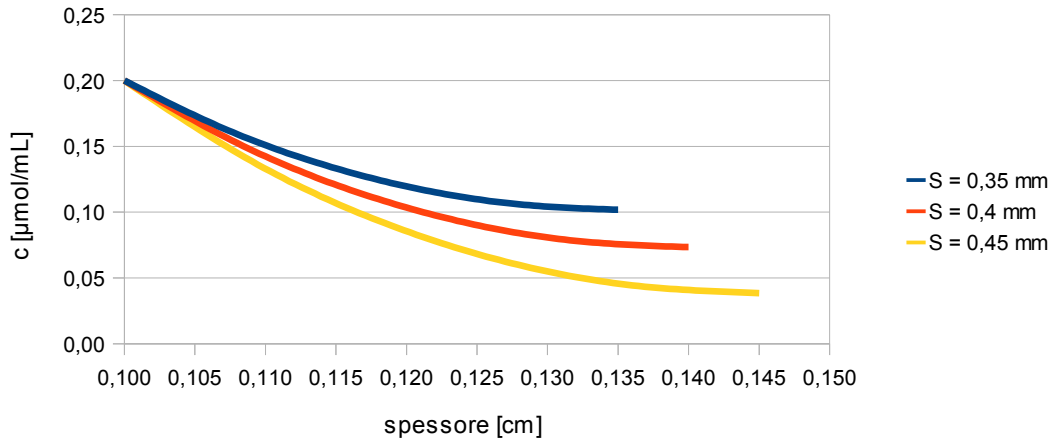


Figura 8. Profilo di concentrazione di ossigeno nella parete dello scaffold di diametro pari a 2 mm con tre diversi spessori.

Appare chiaro che la concentrazione di ossigeno è fortemente dipendente dallo spessore del costruito (e quindi dal volume della biomassa che consuma ossigeno), più che dalla portata di perfusione e dal diametro interno dello scaffold.

Siccome il modello di Krogh rispecchia poco la situazione che si viene a creare all'interno del bioreattore per i vasi di piccolo calibro, si sviluppa un modello alternativo cambiando una condizione al contorno. Tenendo conto che durante la rotazione, la superficie esterna si trova a diretto contatto con la fase gassosa, si impone che su di essa ci sia una concentrazione di ossigeno pari alla saturazione. La nuova equazione ottenuta con questa assunzione è la seguente:

$$c(r) = c_0 + \frac{V}{4D}(r^2 - R^2) + \frac{\ln\left(\frac{r}{R}\right)}{\ln\left(\frac{a}{R}\right)} \left(\frac{V}{4D}(R^2 - a^2) - \frac{V}{\bar{v}} \left(\frac{R^2}{a^2} - 1 \right) z \right) \quad (1)$$

Sulla base della (1), è stato costruito un grafico che mostra l'andamento del profilo di concentrazione per 5 spessori diversi di scaffold (fig. 9).

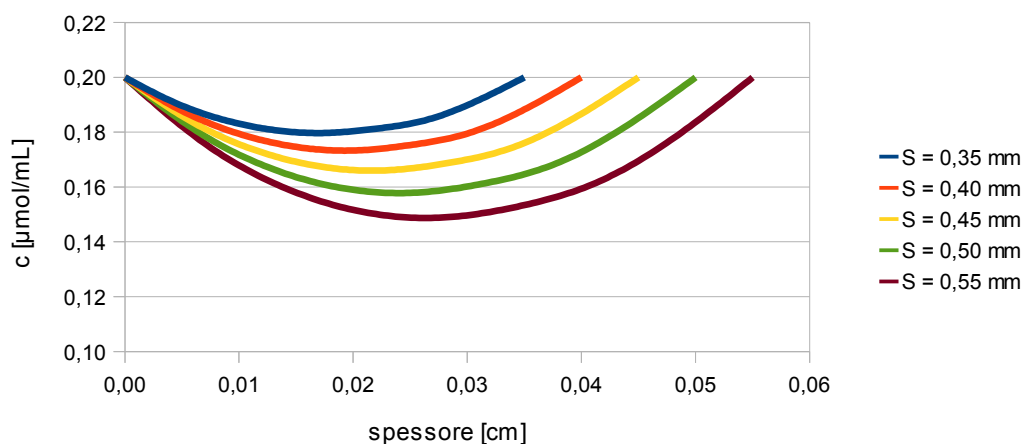


Figura 9. Curve di concentrazione per cinque diversi spessori di parete dello scaffold con diametro interno 2 mm.

Come si nota anche in questo caso, la concentrazione di ossigeno è fortemente dipendente dallo spessore del costruito. Le curve si spostano verso il basso all'aumentare dello spessore di parete, ma l'ossigenazione risulta più efficace rispetto al caso in cui sia dovuta solo alla perfusione (fig. 8), pertanto questa configurazione permette di impiegare scaffold con un maggiore spessore.

Concludendo, risulta necessaria l'implementazione di un modello computazionale complesso per indagare la fluidodinamica locale sull'albero di coltura del bioreattore per la trachea. Il dispositivo stesso necessita inoltre di validazione in laboratorio, sia per il meccanismo sia per verificare l'isolamento dei terreni. In secondo luogo, sarebbe interessante indagare l'effetto dello shear stress su tessuti differenti dall'endotelio dei vasi, sia sull'orientamento cellulare, sia sulla proliferazione. In ultimo luogo, risulta utile, anche se complesso, un riscontro empirico dei profili di concentrazione ricavati con l'equazione (1).

Abstract

Tissue engineering is a valid alternative to traditional organ transplant techniques and prosthesis implants, widely used for the restoration of a pathological tissue functionality. The aim of this discipline is the creation of a vital construct able to grow, regenerate and adapt itself to the biological system, starting from patient's cells. This subject makes use of 3 main elements:

- cells: the choice of the correct cellular source is an important point for the tissue creation;
- scaffold: it guarantee a tridimensional support to cells. Shape, structure and materials are chosen according to the specific application;
- bioreactor: it consists in the culture conditioning system, which provides suitable stimulus and keeps the construct in a sterile chamber.

This thesis focuses on the third element: the bioreactor. Particularly two devices for the creation of tubular constructs are presented: the former for the trachea and the latter for small diameter vessels. A perfusion circuit is also described; it is able to carry out a better exchange of metabolites and catabolites compared with a static culture and give a hydrodynamic construct stimulation, which can affect the correct tissue grow (McCulloch et al., 2004; Eoin et al., 2008; Hoerstrup et al., 2001).

Perfusion circuit (fig. 1) is able to adapt itself to different devices, so it is very essential. It is composed of:

- a small Shuttle pump (Harvard Apparatus), with a flow rate range of 1,25 – 50 mL/min which can be placed in the incubator;
- a tube system (Tygon® SI Silicone 3350 Platinum) with a rolling up, which allows medium oxygenation. Length of pipes is calculated with the model described by David E. Orr et al., 2008 up to 8,48 m assuming a flow rate of 20 mL/min;
- a reservoir which must be dimensioned for the specific application;
- a system of connection elements between circuit and bioreactor.

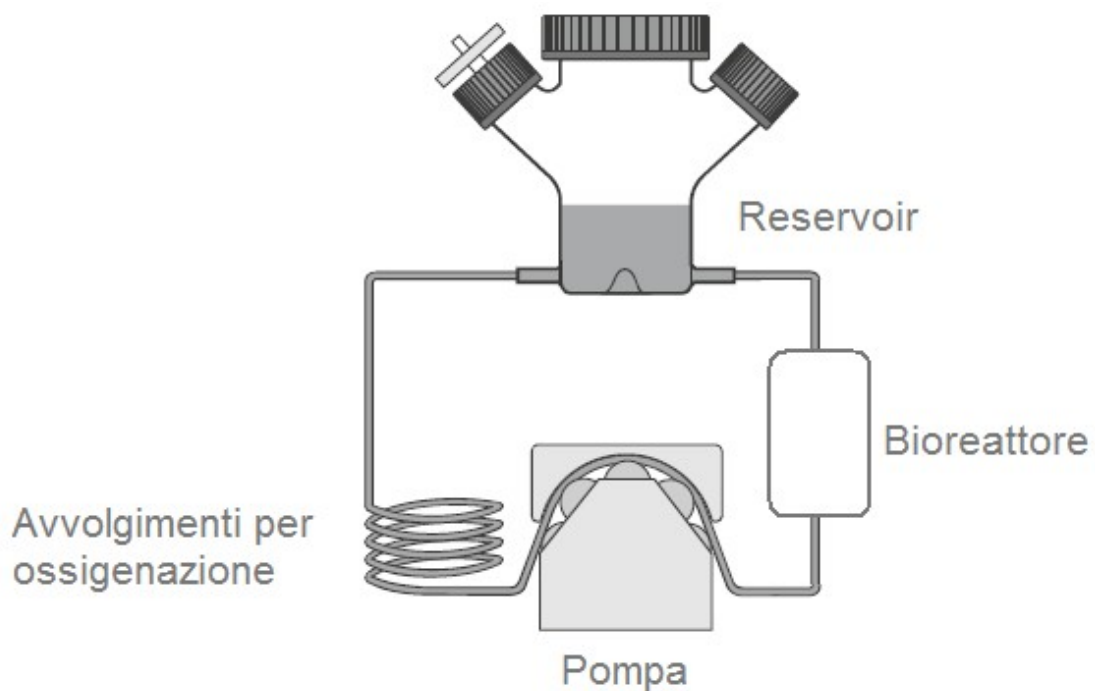


Figure 1. Perfusion circuit scheme.

The trachea bioreactor (fig. 2) taken into consideration as been realized from the one developed by ing. M. A. Asnaghi for the LS thesis. The tubular construct, in this device, is placed inside a PSU (polysulfone) culture chamber and half immersed in the medium. The scaffold rotates on its own axis thanks a brushless engine. The external surface is alternatively exposed to the liquid and air phases, this guarantees both

metabolites and catabolites exchange and oxygen saturation.

The construct is set on a PEEK (polyaryletheretherketone) culture shaft used as a mechanical support. The culture medium is placed inside the scaffold lumen, which remains between the shaft and the internal surface. The internal culture medium substitution is made by opening the chamber, creating therefore risks for the sterility.

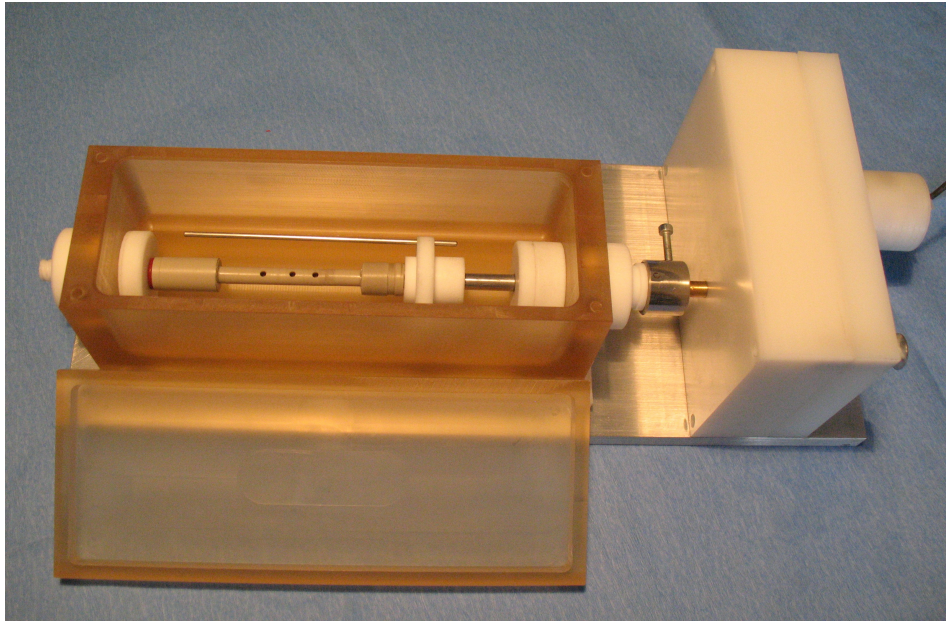


Figure 2. Image of the bioreactor. Culture chamber and cover (yellow components), culture shaft (grey component in the middle) and one medium mixing (metallic bar parallel to the shaft) are well evident.

The lumen perfusion in the scaffold is not allowed in this device therefore projects for device modification are presented in order to make it compatible with the perfusion circuit.

The project goals are:

- tubular construct perfusion;
- axial scaffold rotation;
- possibility of internal lumen cell seeding;
- volumes separation;
- air internal circuit ;

- absence of hardly reachable sharp corners points medium accumulation.

The first main point is the culture shaft modification to allow perfusion. On this purpose axial holes on the shaft sides have been projected. This holes have a profile suitable for the optimization of the medium flow (fig. 3).

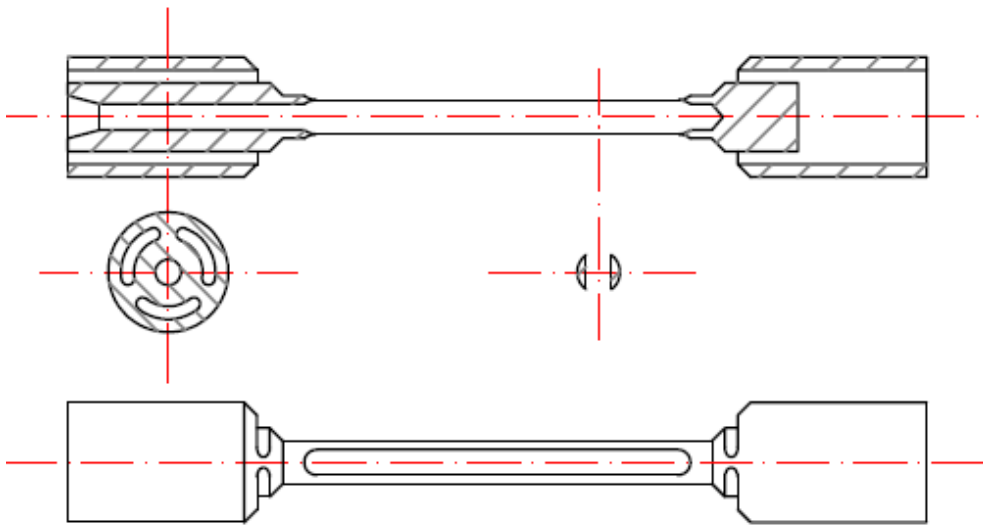


Figure 3. Drawing of the first project culture shaft. A lengthened hole is visible which is covered by an oxygenating membrane and allows the contact between the air circuit and the scaffold lumen.

An air circuit is present in the culture shaft. The circuit is made of an axial hole inside the shaft and 2 lengthened holes in the central stem, which are covered by an oxygenating membrane. Both air and perfusion circuit are placed in the driving shaft too, the former ends with a filter in contact with incubator atmosphere and the latter ends in a storage chamber.

The bioreactor assembly takes place thanks to the mobile components (fig. 4). This device needs a disassociation of the engine and bioreactor axes and it shows some disadvantages:

- the shafts connection is a critical point both for the motion transmission and isolation of the two circuits;
- the oxygenating membrane needs a difficult positioning and it critical for

maintenance of isolation between the two circuits;

- the bioreactor doesn't allow the internal cell seeding of the scaffold.

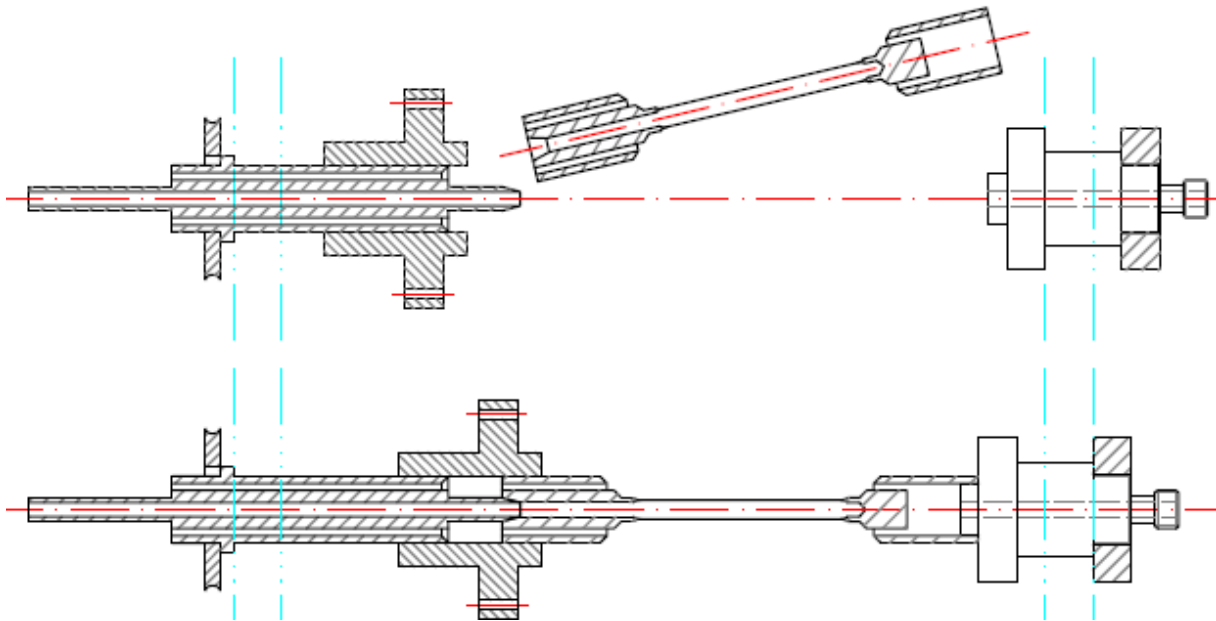


Figure 4. Bioreactor assembly scheme.

In the light of such considerations an alternative project as been developed.

The second project (fig. 5) preserves the same section shape for the flow drawn for the previous project and shows the following characteristics:

- priming volume reduction caused by the splitting of the culture chamber into to sectors made up of a separator. The bigger sector contains the external culture medium and the construct; the smaller one stores the internal medium flowing out of the culture shaft;
- the possibility of passing from the seeding phase to the flowing one and *vice versa* by moving an external component, without opening the culture chamber;
- the bioreactor doesn't need the disassociation of the axes and it can be placed on the support system of the original device.

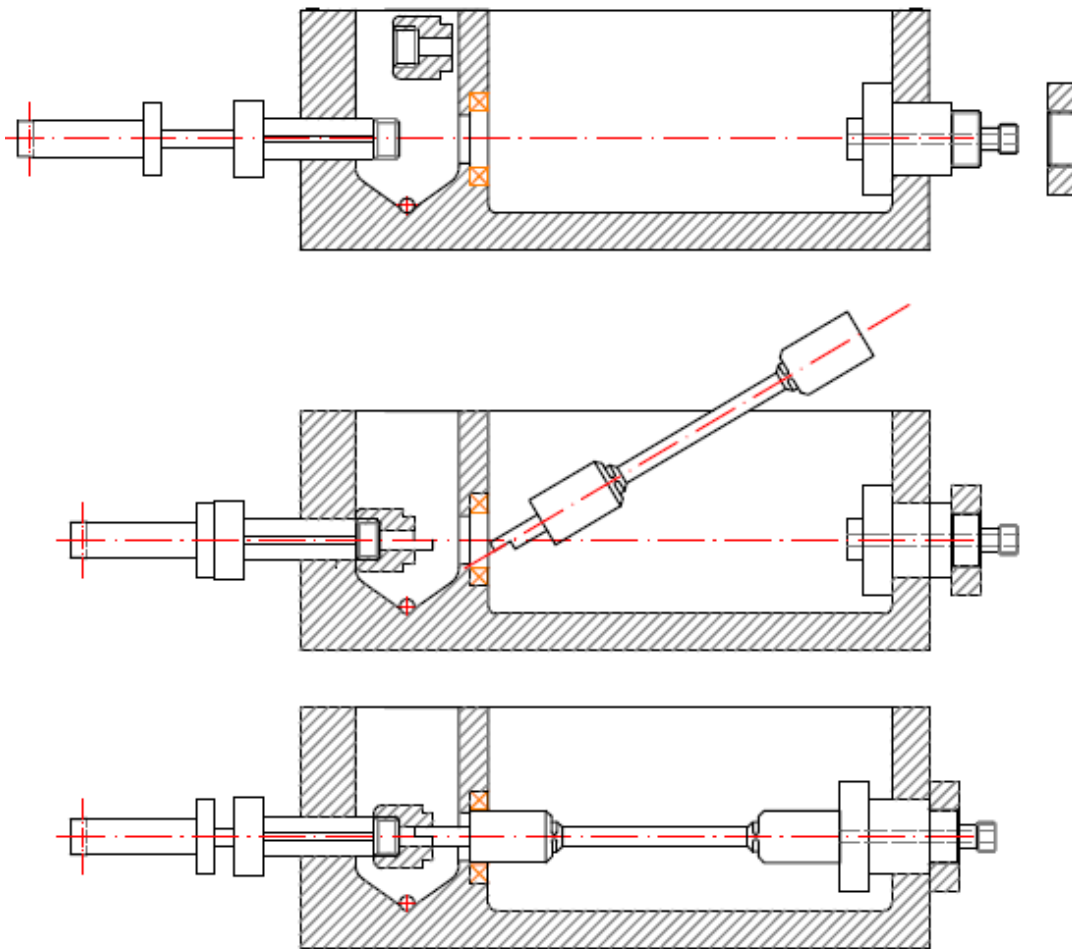


Figure 5. Second project bioreactor assembling.

The culture medium flowing inside the construct drops from the culture shaft into the storage chamber where it is reintroduced in the perfusion circuit through a hole placed on the bioreactor basement. Thanks to the thickness of the culture chamber walls the external surface of mobile elements cannot be found internally after an axial movement.

The culture shaft presented in this second project does not have an internal air circuit, therefore an alternative compatible shaft in which it can be found is presented. As in the first project this culture shaft has some parts which have to be covered with an oxygenating membranes; so the circuit separation is a critical point.

Finally a mobile separator is projected; it can be inserted in a groove inside the

original bioreactor culture chamber, in order to obtain the separation into two sectors like the second project device.

The small caliber vessel bioreactor (fig. 6) presented is the one developed by ing. V. Ballotta and ing. I. Stefani for the LS thesis. The device shows the following characteristics:

- the possibility of scaffold lumen perfusion;
- the optimization of mass exchanging;
- the component modular structure;
- the minimization of priming volume and device dimensions in order to make the place in incubator easier;
- the assembly procedure and the construct positioning optimization to minimize the contamination risk.

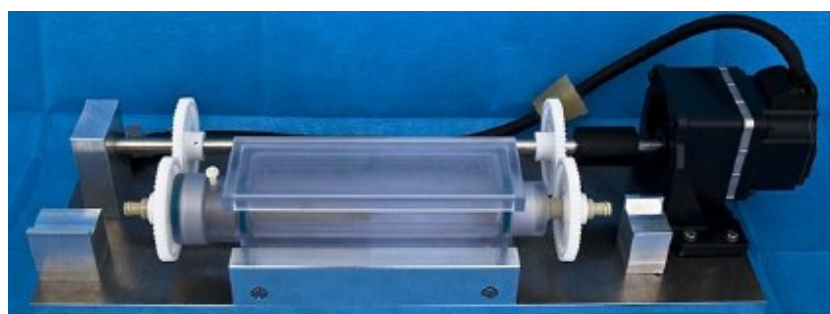


Figure 6. Small caliber vessels bioreactor placed on the aluminium basement with the brushless engine.

The construct is placed inside the PC (polycarbonate) culture chamber and rotates on its own axis, passing from liquid to air interface like in the the trachea bioreactor. The scaffold is assembled between two PEEK culture shafts which rotate synchronically thanks to a gear system. As the construct is small, the shafts do not occupy any space inside the lumen which can be perfused.

With reference to this bioreactor and the perfusion circuit, some calculus about shear stress and oxygen concentration profile have been done.

Firstly the circuit flow rate has been calculated from the shear stress for three different internal diameter values of the construct (fig. 7).

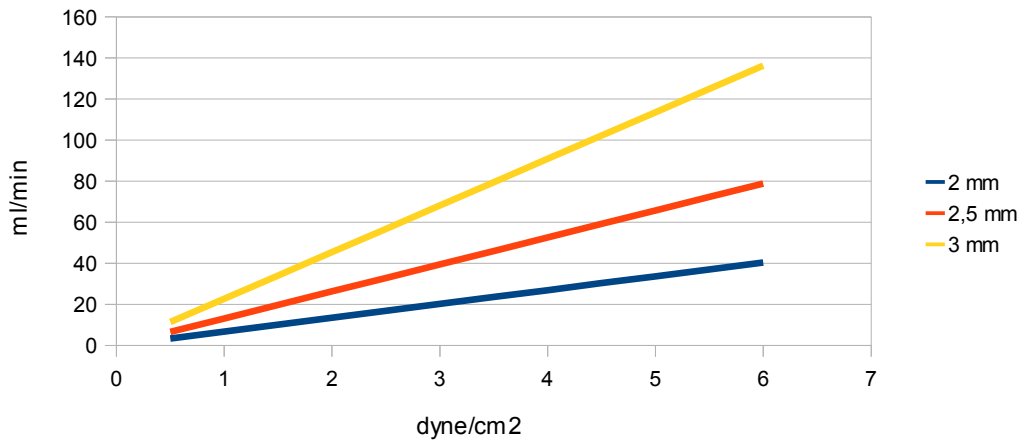


Figure 8. Variation of flow rate in function of shear stress for 3 different internal diameter constructs.

Shear stress value in literature vary from less than 1 dyne/cm² (Soletti et al., 2006; Nasser 2003), up to 6 – 8 dyne/cm² (O'Cearbhaill et al., 2008; Chrysanthi et al., 2004). As shown in figure 7 there is an increase of lines direction coefficient following the internal diameter increasing.

Secondly the following hypothesis are assumed:

- the construct oxygenation is obtained only from the internal medium flowing;
- the external surface cannot realize any mass exchange.

The simple Krogh model is therefore used to obtain the oxygen concentration profile in the wall thickness (fig. 8).

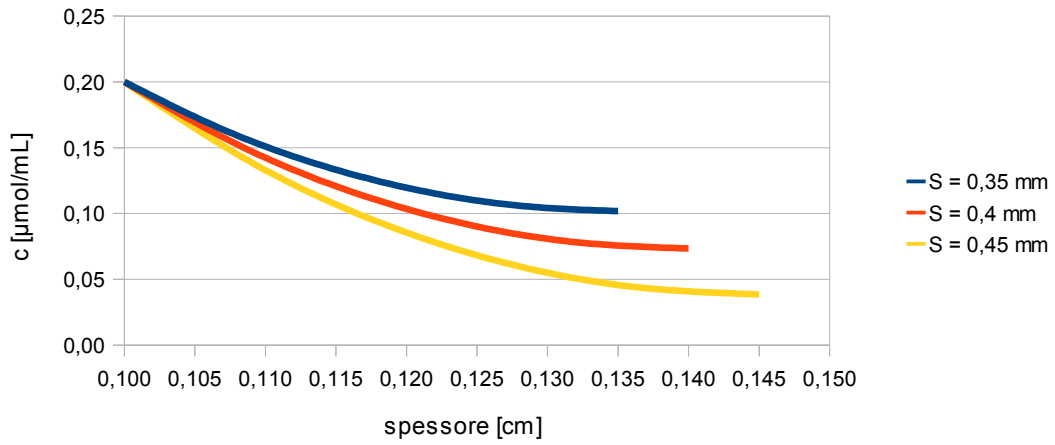


Figure 8. Oxygen concentration profile in for 3 different value of wall thickness.

It is clear that oxygen concentration greatly depends on the construct thickness (and therefore on the biomass volume) more than on the perfusion flow rate and internal scaffold diameter.

The Krogh model bad fits the internal situation of the small caliber vessels bioreactor, so an alternative model is presented changing a border condition. Considering the external surface in direct contact with the air phase a saturation oxygen concentration is imposed. A new equation is obtained considering this condition:

$$c(r) = c_0 + \frac{V}{4D}(r^2 - R^2) + \frac{\ln(\frac{r}{R})}{\ln(\frac{a}{R})} \left(\frac{V}{4D}(R^2 - a^2) - \frac{V}{\bar{v}} \left(\frac{R^2}{a^2} - 1 \right) z \right) \quad (1)$$

A graph which shows the concentration oxygen profile for 5 different scaffold wall thickness has been realized following the (1).

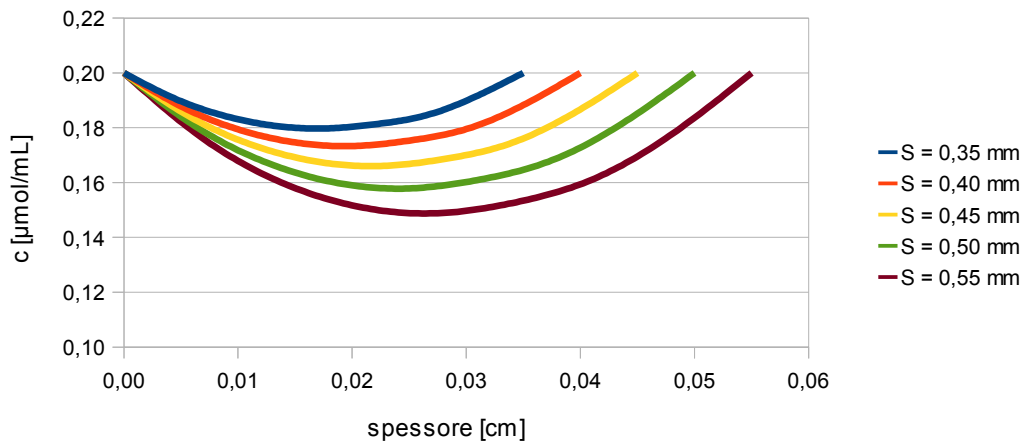


Figure 9. Oxygen concentration profile in for 5 different value of wall thickness.

Also in this case it is clear that oxygen concentration widely depends on the construct thickness. As the wall thickness increase the curves drop but the oxygenation is more suitable than the one driven only by the perfusion. Therefore this configuration allows the use scaffolds with higher thickness.

In conclusion, the implementation of a complex computational model is necessary to investigate the local fluid dynamics on the trachea bioreactor culture shaft. The device itself needs a laboratory validation both for mechanism and isolation medium test. Secondly it could be interesting to investigate the effect of shear stress on tissues types different form vessel endothelium both for cells orientation and proliferation. Finally, an empiric checking of concentration profiles obtained from the (1) is useful even if complex.

Introduzione

L'ingegneria dei tessuti nasce nei primi anni '90 e si propone come una valida alternativa alle tecniche, quali il trapianto e l'impianto di una protesi, largamente impiegate per ristabilire la funzione di un tessuto od un organo danneggiato. Il fine ultimo di questa disciplina è quello di creare un costrutto vitale, in grado di integrarsi e crescere nel paziente, ripristinando la funzionalità fisiologica, partendo da cellule autologhe, eliminando quindi i rischi di rigetto caratteristici dei trapianti e le criticità legate all'introduzione nel sistema biologico di un materiale estraneo come nel caso delle protesi.

L'ingegneria tissutale si basa su uno degli assiomi della biologia, secondo il quale: qualsiasi fenomeno biochimico o metabolico che ha luogo in un organismo vivente, può essere descritto in termini molecolari, identificando ciascuna specie chimica e considerando il ruolo di forze fisiche, coinvolti nella crescita e organizzazione spaziale delle cellule in un tessuto.

Il procedimento impiegato per ottenere un tessuto ingegnerizzato (fig.1) può essere schematizzato in sei fasi principali:

- fabbricazione di supporti tridimensionali realizzati in materiale biorassorbibile o biointegrabile;
- prelievo ed espansione delle cellule di un donatore;
- semina sullo scaffold;
- proliferazione e differenziazione cellulare in condizioni dinamiche all'interno di un bioreattore, che fornisca stimoli adeguati e ne monitori i parametri utili;

- impianto chirurgico nel paziente;
- integrazione ed adattamento dell'impianto da parte del sistema biologico.

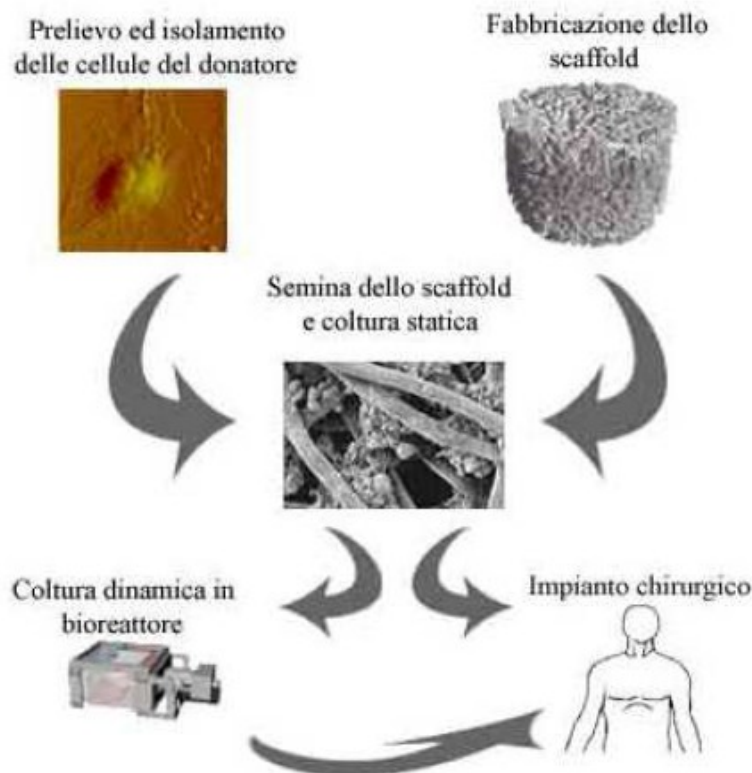


Figura 1. Schema del procedimento per ottenere un tessuto ingegnerizzato.

Alla luce dello schema appena fornito, possiamo identificare i tre elementi fondamentali per l'ingegneria dei tessuti: le cellule, gli scaffold ed i bioreattori.

La scelta della corretta fonte cellulare è senza dubbio il passo iniziale per l'ingegnerizzazione di un tessuto. Il fenotipo cellulare influenza pesantemente la scelta dello scaffold e degli stimoli a cui la coltura deve essere sottoposta, quindi il bioreattore. Un'ideale fonte cellulare deve possedere le seguenti caratteristiche:

- reperibilità;
- buona capacità proliferativa *in vitro*;
- espressione e mantenimento del corretto fenotipo;
- non – immunogenicità (cellule autologhe);

- eventuale pluripotenza, cioè capacità di dare origine a differenti fenotipi sotto opportuni stimoli.

Le cellule possono essere divise in due principali tipi: differenziate ed indifferenziate. Le cellule differenziate sono quelle del tessuto maturo, che esprimono già il fenotipo ed in generale non possono convertirsi in altri tipi di cellule, eccezion fatta alla propensione generale delle cellule al di fuori del contesto fisiologico, le quali tendono a diminuire il metabolismo diventando fibroblasti. Possono essere elencati una serie di svantaggi legati all'impiego di cellule mature per l'ingegnerizzazione di un tessuto:

- difficile reperibilità di cellule sane in un tessuto patologico;
- possibile danneggiamento, in fase di prelievo, del tessuto già affetto da patologia;
- bassa capacità proliferativa, generalmente 10 – 12 duplicazioni prima della senescenza o della morte;
- possibile perdita permanente del fenotipo.

Le cellule indifferenziate sono le staminali, le quali possono essere ulteriormente suddivise in embrionali ed adulte. Queste cellule possiedono un grande potenziale poiché possono differenziarsi assumendo differenti fenotipi e hanno una capacità proliferativa virtualmente illimitata. Possiamo identificare tre tipi di cellule staminali:

- cellule totipotenti, possono differenziarsi in qualsiasi fenotipo cellulare, ne fanno parte le staminali embrionali e quelle del cordone ombelicale;
- cellule pluripotenti, possono differenziarsi assumendo una serie limitata di fenotipi cellulari, ne sono esempio le ematopoietiche che generano la quasi totalità della parte corpuscolata del sangue;
- cellule unipotenti, possono dare origine ad un solo fenotipo cellulare, differente dal proprio, sono spesso precursori di cellule mature come le staminali dell'epidermide che generano cheratinociti.

In generale una fonte staminale è preferibile per gli innumerevoli pregi, tuttavia il più grosso problema legato all'utilizzo di queste cellule è senza dubbio la reperibilità. Le staminali embrionali si ottengono da *blastocisti*, generate *in vitro* con tecniche di fecondazione o clonazione terapeutica, che producono accesi dibattiti etici. Le staminali adulte, siano esse pluripotenti od unipotenti, possono essere rintracciate a bassissime percentuali in innumerevoli distretti dell'organismo, come il midollo osseo, il sangue ed il tessuto adiposo. Per ultimo, la coltura delle staminali risulta anch'essa piuttosto complessa, in quanto vi è la necessità di farle proliferare e differenziare nel fenotipo desiderato tramite particolari e specifici stimoli biochimici.

Il secondo elemento fondamentale per l'ingegneria dei tessuti è lo scaffold. Esso è un supporto tridimensionale sul quale le cellule aderiscono e proliferano, pertanto deve possedere delle caratteristiche generali per essere introdotto in un contesto biologico e delle caratteristiche specifiche legate al fenotipo cellulare che si considera:

- il materiale con cui è fabbricato lo scaffold deve avere adeguate caratteristiche superficiali, quali bagnabilità, per promuovere l'adsorbimento di proteine e favorire adesione e proliferazione cellulare;
- la struttura dello scaffold deve possedere caratteristiche geometriche, come interconnessione dei pori e corretta dimensione degli stessi, atte a favorire la crescita e la differenziazione cellulare ed il corretto scambio di cataboliti, metaboliti ed ossigeno;
- lo scaffold deve essere biocompatibile e biorisorbibile, con velocità di degradazione compatibili alla crescita del tessuto sullo stesso;
- le caratteristiche fisiche e meccaniche devono decadere nel tempo, in linea con l'aumentare di quelle del tessuto neoformato;
- deve possedere una struttura tridimensionale adatta a fornire gli adeguati stimoli meccanici e morfologici.

Attualmente per la produzione di scaffold vengono impiegate innumerevoli tecniche di fabbricazione e differenti materiali. Indipendentemente da struttura ed

origine, il materiale deve possedere come già detto caratteristiche di biocompatibilità e biorisorbibilità adeguate all'applicazione. Queste due fondamentali proprietà non possono essere quantificate numericamente perché variano e cambiano di significato a seconda delle esigenze e delle caratteristiche del sistema biologico con cui il materiale deve venire a contatto.

L'ultimo elemento fondamentale per l'ingegneria dei tessuti è il bioreattore. Questo dispositivo è in grado di fornire un adeguato supporto alla coltura ed adeguati stimoli per il corretto sviluppo del tessuto. Generalmente garantiscono un migliore e più attento apporto di nutrienti, promuovendo la creazione di un costrutto omogeneo. Possiamo dividere i bioreattori in 4 principali categorie:

- **Mixed Flasks:** sono utilizzati per la semina e la coltura di cellule su scaffold sospesi nel medium messo in movimento da un agitatore (fig. 2). Il moto del fluido attorno allo scaffold è di tipo turbolento, le velocità e lo shear stress deve essere mantenuto al di sotto di valori che possano innescare il distacco od il danneggiamento cellulare. I costrutti ottenuti con questo dispositivo risultano spesso disomogenei, con una presenza cellulare compatta sulla superficie e scarsa all'interno del supporto.

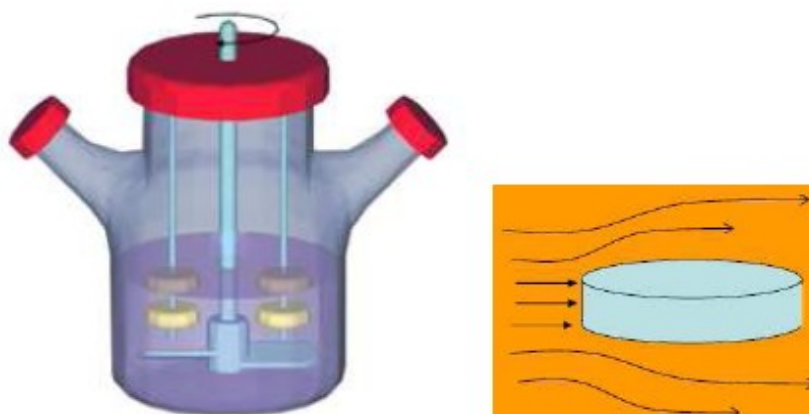


Figura 2. Esempio di Mixed Flask.

- **Rotating Wall Vessels:** viene generato un flusso laminare ottenuto tramite un

ambiente rotante. Questo flusso sviluppa una diffusione uniforme dei nutrienti e produce bassi livelli di sforzo di taglio viscoso, che potrebbe danneggiare le cellule poste sulla superficie dello scaffold. In questo bioreattore, gli scaffold vengono mantenuti in sospensione nel medium grazie al bilanciamento fra forza di gravità (F_g), forza centrifuga (F_c) e forza di trascinamento (F_d) (fig. 3).

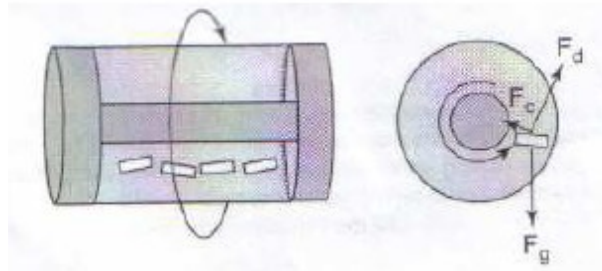


Figura 3. Rotating Wall Vessels (a sinistra) e bilanciamento di forze che mantengono sospeso lo scaffold nel medium di coltura (a destra).

- Bioreattori a perfusione diretta: sviluppano un flusso forzato direttamente all'interno dei pori dello scaffold (fig. 4). La semina risulta essere altamente uniforme. I supporti sono fissati all'interno della camera nella quale scorre il medium a velocità controllata, in questo modo le cellule possono raggiungere tutti i pori e depositarvisi. In questo bioreattore gli sforzi di taglio sono mantenuti sufficientemente bassi da non provocare distacco o lisi cellulare.

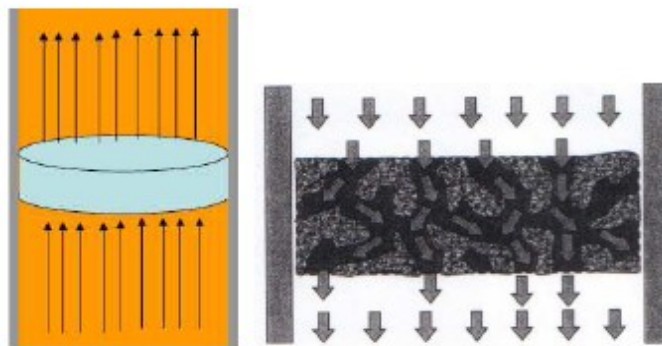


Figura 4. Flusso del medium all'interno di un bioreattore a perfusione diretta.

- Bioreattori che applicano stimoli meccanici: in questa categoria trovano

classificazione tutti quei bioreattori che non possono trovare localizzazione nelle precedenti. Fanno parte di questa classe innumerevoli dispositivi molto diversi tra loro a causa della loro alta specificità. In generale, sono formati da una camera contenente medium, in cui sono posti gli scaffold fissati ad un supporto e ad un attuatore in grado di fornire uno stimolo meccanico. La maggioranza di questi bioreattori hanno un controllo on – line dei parametri e sono in grado di sviluppare un pattern di stimolazione predeterminato e variabile nel tempo.

Questo lavoro di tesi, si focalizza su un circuito di perfusione adattabile a diversi bioreattori per costrutti di forma tubolare. Il circuito, oltre a garantire migliori scambi di cataboliti, metaboliti ed ossigeno rispetto ad una coltura statica, è in grado di introdurre un'ulteriore stimolazione meccanica dovuta allo shear stress che si viene a creare sulla superficie a diretto contatto con il flusso. In particolare vengono presentati due bioreattori che utilizzano costrutti tubolari, uno per la trachea ed uno per i vasi di piccolo calibro. Mentre il dispositivo per i piccoli vasi risulta già compatibile con il circuito di perfusione, la geometria e la meccanica del bioreattore per la trachea non permettono il flusso all'interno del lume del costrutto, pertanto verranno presentati dei progetti di modifica dello stesso, in modo da renderlo accoppiabile al circuito.

Cap. 1: Bioreattori per costrutti tubolari

L'ambizione dell'ingegneria tissutale di ricreare *in vitro* tessuti con un'organizzazione tridimensionale funzionale partendo da singole cellule, si è dovuta confrontare con la difficoltà nel gestire, interpretare e monitorare gli innumerevoli parametri legati ad esempio alla coltura stessa, al fenotipo cellulare ed al tessuto preso in considerazione. Molti di questi parametri si influenzano a vicenda e di molti altri non si conosce ancora specificatamente la funzione, rendendo la pianificazione di una coltura ancora più ardua. Per questi motivi i bioreattori hanno preso sempre più piede in ingegneria dei tessuti, in quanto possono essere progettati in modo da creare un microambiente ottimale per la formazione del tessuto fornendo stimoli controllati di vario genere (meccanici, elettrici, chimici, ecc.) e monitorando una vasta gamma di parametri definiti fondamentali per la corretta formazione del tessuto in oggetto (Martin I et al., 2004).

A causa della loro alta specificità i bioreattori vengono progettati ed utilizzati per una specifica applicazione e molto spesso sono in grado di monitorare e variare solo alcuni degli innumerevoli parametri che possono influenzare la coltura, con l'obiettivo di valutare l'azione degli stessi sul costrutto oppure perché il progettista li ritiene preponderanti per il corretto sviluppo del tessuto.

Molti studi dimostrano lo stretto legame tra corretto sviluppo del tessuto e ambiente in cui è inserita la componente cellulare, in particolare è facile evincere che ogni tipo di tessuto necessita di una particolare combinazione di stimoli molto diversi fra loro e di un differente supporto (scaffold), tutti con la generale intenzione di *mimare* l'ambiente fisiologico in cui un tessuto si sviluppa naturalmente (Mironov et al., 2003;

Arrigoni et al., 2008; O'Cearbhaill E. D. et al., 2008). Gli stimoli meccanici dati al costruito non solo aiutano a mantenere il corretto fenotipo cellulare, ma giocano un ruolo fondamentale anche durante la differenziazione e la maturazione delle cellule (McFetridge et al., 2007).

In questo lavoro di tesi vengono presi in considerazione due bioreattori per l'ingegnerizzazione di costrutti tubolari, in particolare uno per la trachea e uno per i vasi di piccolo calibro. In questi dispositivi, lo scaffold è posto in rotazione all'interno di una camera di coltura contenente il medium, in cui si trova immerso solo per metà. La rotazione assiale, fa sì che la superficie esterna alterna il contatto diretto con il terreno a quello con la fase gassosa: il primo garantisce lo scambio di metaboliti e cataboliti, il secondo assicura l'ossigenazione.

Mentre il bioreattore per i vasi di piccolo calibro è già predisposto per la perfusione, quello per la trachea prevede la presenza di un medium statico all'interno del lume. Pertanto viene presentato un progetto di modifica al secondo dispositivo al fine di permettere l'accoppiamento con un circuito di perfusione adattabile ad entrambi, sulla linea di alcuni lavori che osservano effetti positivi della perfusione sullo sviluppo dei tessuti (McCulloch et al., 2004; O'Cearbhaill et al., 2008; Hoerstrup et al., 2001).

1.1 Bioreattore per la trachea

1.1.1 Struttura della trachea e principali patologie

Per anni la ricostruzione di difetti tracheali di rilevanti dimensioni si è rivelato un problema chirurgico di grande rilevanza, sia per la criticità dell'applicazione, sia per l'inadeguatezza, l'incompatibilità e la bassa disponibilità di graft eterologhi per i trapianti. A questo proposito l'ingegneria dei tessuti può sopperire a questi problemi tramite la creazione *in vitro* di un costrutto bioartificiale compatibile, adattabile alla specifica applicazione e funzionale.

La forma della trachea è assimilabile a quella di un cilindro cavo, che in un uomo adulto raggiunge i 10-12 cm di lunghezza ed in diametro di circa 23 mm sul piano frontale e 18 sul piano sagittale, naturalmente le dimensioni possono variare a seconda di età e sesso e vengono influenzate dall'atto respiratorio e da movimenti del corpo.

La trachea è costituita da 15 a 20 semi-anelli sovrapposti, connessi da tessuto fibroso detto legamento anulare ed aperti nella parte posteriore che viene chiamata parte membranosa ed è costituita da tessuto fibroso e fibre muscolari non striate (fig. 1.1).

Il tessuto muscolare liscio nel lato posteriore della trachea, è costituito da due strati sovrapposti, uno longitudinale e uno trasversale. Mentre il primo mostra solo pochi fasci dispersi di fibre, il secondo si avvale di una ben più alta densità di fasci e di una maggiore organizzazione in fibre parallele e adiacenti che corrono da un'estremità all'altra dei semi-anelli.

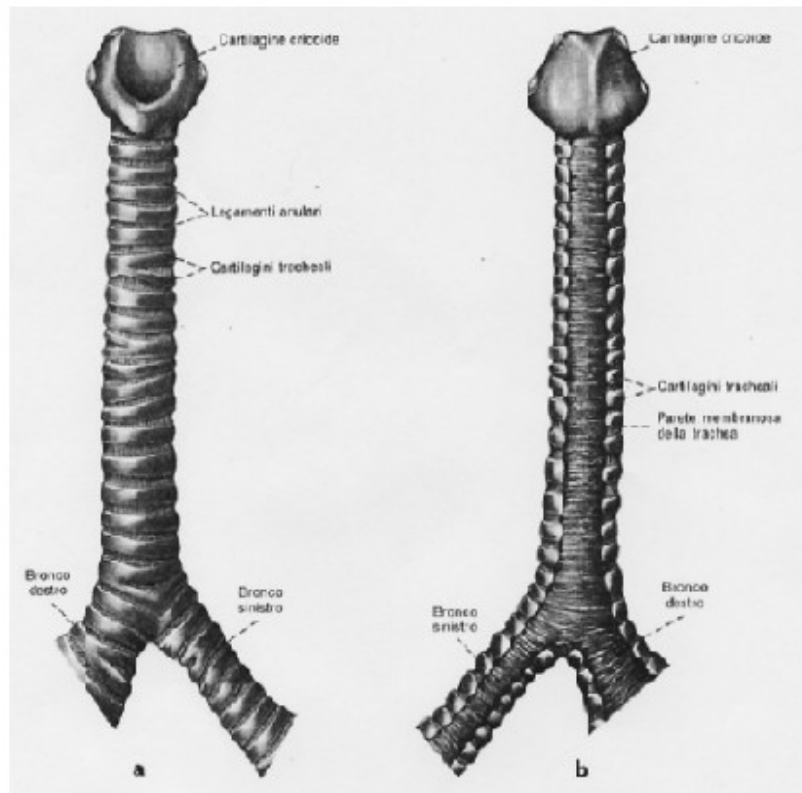


Figura 1.1. Morfologia della trachea nel lato anteriore (a sinistra) e nel lato posteriore (a destra). Sono visibili gli anelli cartilaginei frontali che forniscono il supporto strutturale, e la parte membranosa che le fornisce elasticità.

Il lume interno della trachea (fig. 1.2) è costituito da una mucosa che si estende anche a laringe e bronchi. Essa presenta una membrana basale molto sviluppata sulla quale è presente un epitelio stratificato con cellule colonnari ciliate in superficie e cellule tondeggianti più in profondità.

Lo strato compreso tra la mucosa interna e le parti cartilaginee esterne alla trachea, è costituito da tessuto connettivo che contiene vasi, nervi ghiandole e mucose, i cui dotti raggiungono la superficie sterna degli anelli cartilaginei.

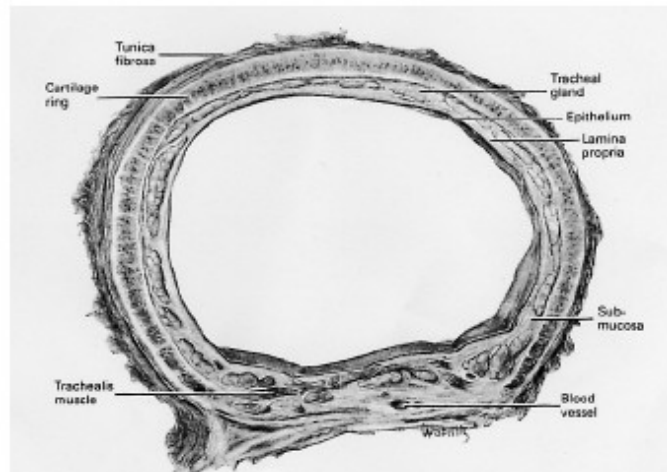


Figura 1.2. Sezione trasversale della trachea.

Le patologie a carico della trachea possono essere divise in due gruppi: patologie congenite e patologie acquisite. Le seconde possono avere quattro principali origini:

- traumi;
- infiammazioni;
- intubazione prolungata;
- tumori.

Mentre le patologie congenite sono generalmente estese ed interessano la quasi totalità della trachea risultando non compatibili con la vita, le lesioni acquisite sono solitamente meno estese e di più rilevante interesse terapeutico anche a causa della loro rilevante incidenza.

Una gran parte dei difetti tracheali locali, possono essere trattati con la resezione tracheale e successiva anastomosi. Con questa tecnica può essere applicata quando la lesione interessa fino alla metà dell'organo nell'adulto, e un terzo nel bambino, ma tali limiti variano considerevolmente in relazione ad età, anatomia locale, patologie e precedenti terapie a carico della trachea (Grillo HC, 2002). Lesioni più estese che non possono essere rimosse e non hanno origine neoplastica, possono essere trattate sul lungo termine con tubi tracheali e stent (Wood DE, 2003). Le patologie tumorali sono invece normalmente trattate con radioterapia ed, in alcuni casi, con una resezione laser

per ripristinare la pervietà del canale se la formazione neoplastica si sviluppa nello stesso (Dionigi R, 1995).

Come appena detto, esistono procedure terapeutiche per il trattamento della maggior parte delle patologie a carico della trachea, tuttavia la necessità di un sostituto tracheale permane nei casi in cui la lesione non sia asportabile a causa della sua estensione o di altri fattori. In generale un costrutto biologico funzionale, compatibile ed adattabile è preferibile all'impianto di graft non biologici che dovranno essere portati per tutta la vita, la cui affidabilità è sicuramente inferiore a quella di un tessuto vitale in grado di adattarsi e rigenerarsi.

1.1.2 Ingegnerizzazione della trachea

Perché un costrutto tracheale bioartificiale sia applicabile in ambito clinico deve possedere alcune caratteristiche generali. Dal punto di vista meccanico deve mimare le fisiologiche caratteristiche tracheali, cioè deve associare una buona flessibilità longitudinale, ad una adeguata rigidità per prevenire il collasso durante l'atto inspiratorio. Il costrutto deve potersi integrare adeguatamente ai tessuti circostanti in modo da prevenire la dislocazione dello stesso, la formazione di tessuto che possa inficiare la pervietà del lume e una risposta infiammatoria cronica (Grillo HC, 2004). Inoltre l'impianto deve essere il più possibile non-immunigenico per evitare il rigetto ed il ricorso a massicce terapie immunosoppressive. La presenza nel lume interno di un fisiologico strato di endotelio e della mucosa può inoltre prevenire la formazione di colonie batteriche migliorandone l'applicazione clinica.

In quanto a procedura clinica, la creazione e l'impianto del costrutto dovrebbe essere il meno invasivo ed il più veloce possibile, prevedendo quindi una sola biopsia per l'isolamento della fonte cellulare ed un'unica procedura chirurgica per l'applicazione dello stesso (Walles T, 2004).

1.1.3 Il bioreattore per l'ingegnerizzazione della trachea

Il bioreattore preso in considerazione per la trachea è stato costruito sulla base di quello realizzato dall'ingegner M. A. Asnagli nella tesi di laurea specialistica. Questo si avvale di tre elementi principali (fig. 1.3):

- una camera di coltura: nella quale è presente il sistema di supporto della componente cellulare, il medium di coltura e la componente cellulare stessa;
- un sistema di attuazione: con il quale si genera e si trasmette il movimento al costruito;
- un sistema di controllo: con il quale si possono gestire e monitorare i parametri dinamici.

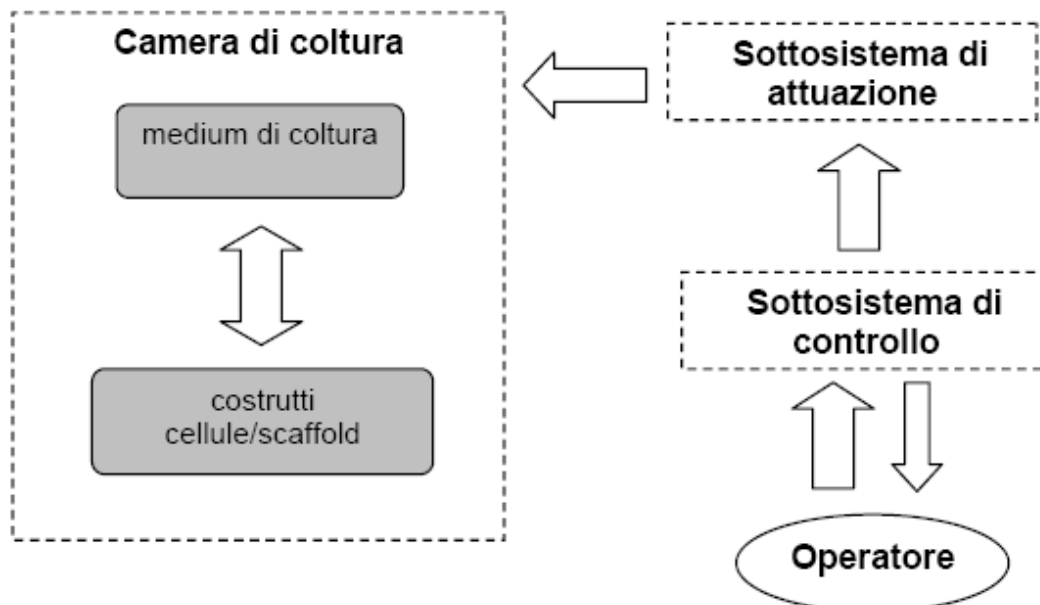


Figura 1.3. Schema rappresentativo del bioreattore.

Il bioreattore è costituito da una camera di coltura nella quale il costruito è montato su un albero che può ruotare liberamente (fig. 1.4). Il medium bagna la metà sottostante del costruito posto in rotazione il quale, passando dal contatto col medium al

contatto con l'aria, garantisce un'ottima ossigenazione della superficie esterna. Sono inoltre presenti due bacchette metalliche che ruotano solidalmente con l'albero in modo da rimescolare il medium di coltura esterno.

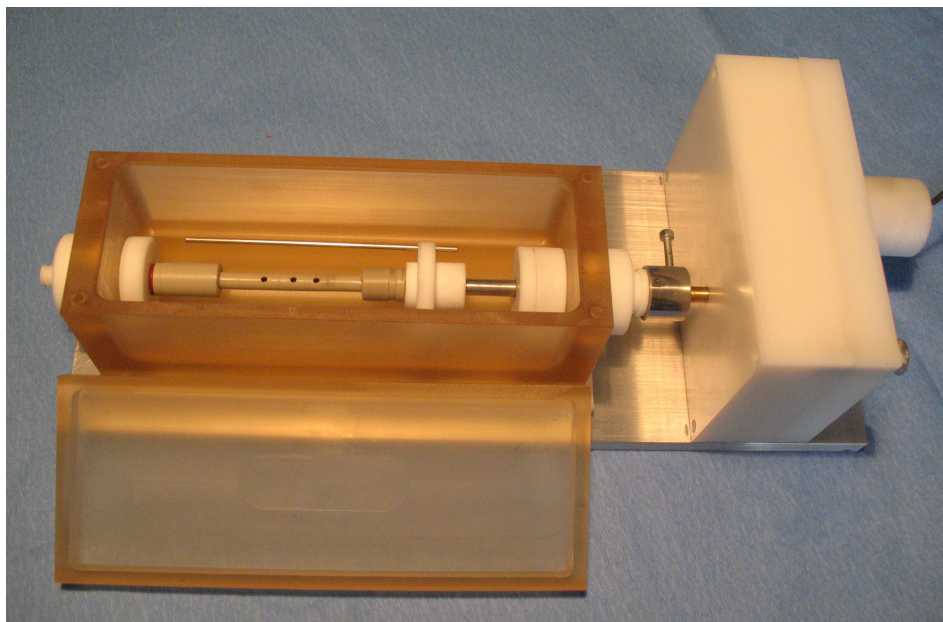


Figura 1.4. Foto del bioreattore assemblato. È ben visibile la camera di coltura ed il coperchio (parti gialle), l'albero su cui viene alloggiato lo scaffold (al centro in grigio) e uno dei due agitatori del medium (barretta metallica parallela all'albero).

La camera di coltura (fig. 1.5) è realizzata in PSU (polisulfone) che rispetta i requisiti fondamentali per la stessa. La biocompatibilità e la non tossicità sono alla base di tutto, in quanto la camera di coltura entra in contatto con la componente cellulare anche se non direttamente ma mediante il medium, quindi non deve rilasciare alcun componente che possa influire sullo sviluppo del costrutto. Se ne ricava che il materiale deve inoltre essere inerte e risultare insensibile all'eventuale corrosione da ambiente aggressivo quale può essere il medium.

Un'altra importante caratteristica del PSU è la sterilizzabilità in EtOssido ed autoclave, requisito fondamentale ed intrinseco per l'applicazione in ingegneria dei tessuti. L'ultima caratteristica richiesta è la facile lavorabilità alle macchine utensili, in modo da poter realizzare la forma desiderata senza troppe complicazioni.

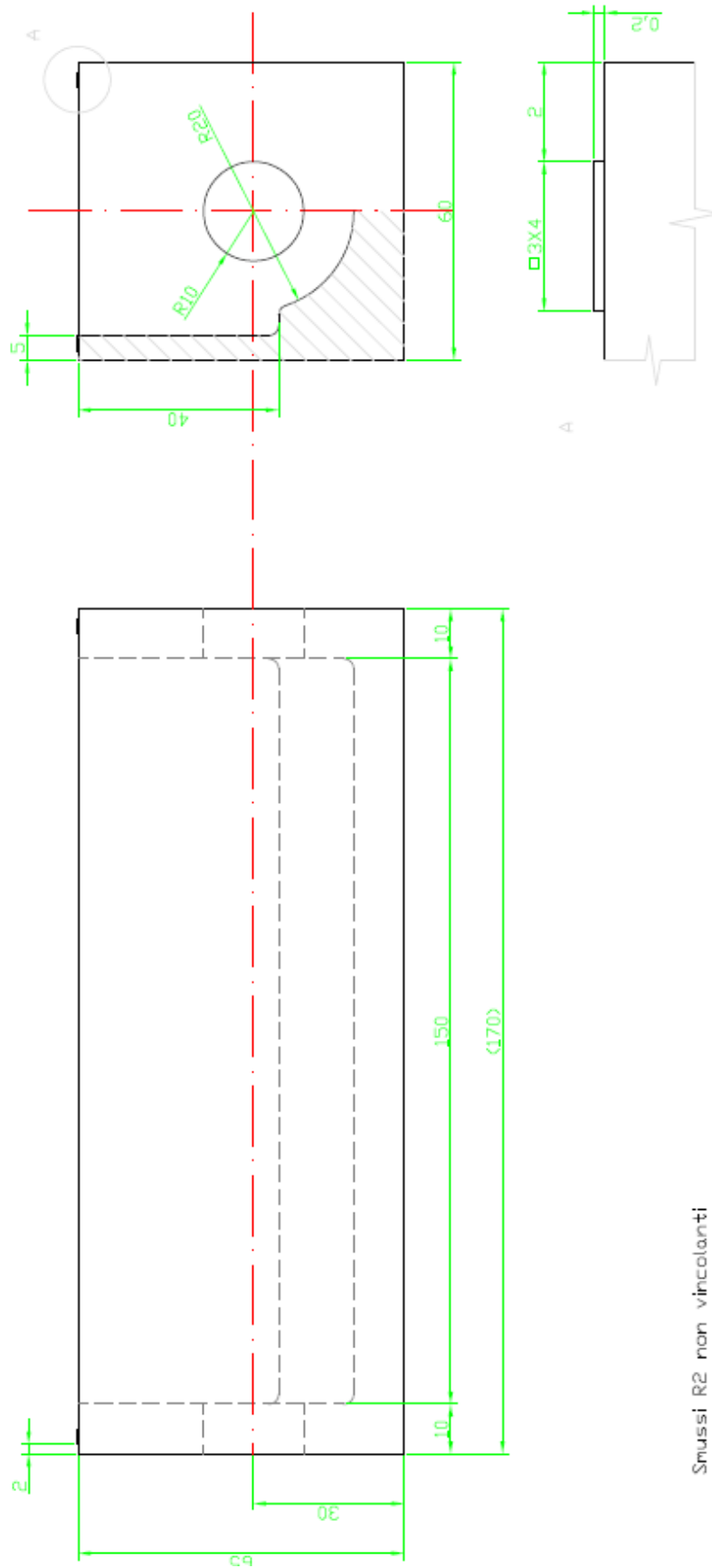


Figura 1.5. Disegno quotato della camera di coltura.

Sul bordo superiore della camera di coltura sono presenti quattro piccoli rialzi di profilo quadrato spessi 0,2 millimetri (indicati dal particolare A nella fig. 1.5) i quali tengono leggermente rialzato il coperchio (fig. 1.6) e creano un percorso tortuoso in grado di mettere a contatto l'atmosfera interna alla camera con quella dell'incubatore, garantendo lo scambio gassoso ed evitando il passaggio di batteri (principio enunciato da Pasteur).



Figura 1.6. Disegno quotato del coperchio della camera di coltura.

La camera di coltura è inoltre priva di spigoli vivi e interstizi interni, per impedire l'accumulo di sostanze tossiche e la proliferazione di batteri causati dalla difficoltà di sterilizzazione e ricambio del medium. Il particolare profilo interno, visibile nello spaccato a destra della figura 1.5, ha l'obiettivo di mantenere basso il volume di priming del medium contenuto.

L'albero su cui è montato lo scaffold (fig. 1.7) è realizzato in PEEK (poliariletereterchetone) che condivide con il materiale della camera caratteristiche come la biocompatibilità, l'inerzia al terreno di coltura e la non citotossicità, garantendo inoltre un supporto meccanico adeguato al costruito e la rotazione solidale ad esso.

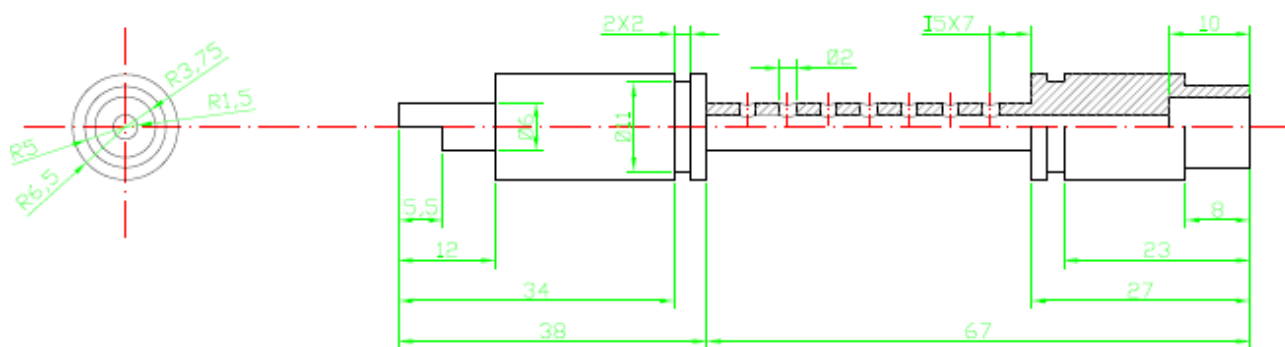


Figura 1.8. Disegno quotato dell'albero di coltura.

Lo scaffold tubolare viene montato sull'albero di coltura fissandolo alle due estremità con dei fili per sutura, stringendoli negli appositi incavi a destra ed a sinistra della parte centrale nella quale sarà presente il medium di coltura interno.

La semina è realizzata sul lato esterno per gocciolamento della sospensione cellulare mentre, per seminare l'interno, lo scaffold viene montato sull'albero nel bioreattore, viene riempito con la soluzione contenente la sospensione cellulare e viene ruotato di alcuni gradi in un lasso di tempo stabilito, in modo da seminare successivamente diverse porzioni della superficie interna fino ad ottenere la semina completa su tutta l'area

Il terreno di coltura viene introdotto all'interno del lume dello scaffold dall'esterno del bioreattore. La parte a destra dell'albero di coltura in figura 1.8 si associa ad un inserto (fig. 1.9) realizzato in Teflon, che presenta un canale interno a cui è collegata una siringa contenente il medium.

Il medium viene immesso nel canale interno dell'inserto in figura 1.10 tramite una siringa dall'esterno del bioreattore, passa all'interno dell'albero di coltura tramite l'accoppiamento mostrato in figura 1.9 e si raccoglie nello spazio tra lo scaffold e l'albero, fuoriuscendo dai fori mostrati in figura 1.8. Il ricambio del medium interno risulta piuttosto difficoltoso, poiché prevede la fuoriuscita dello stesso da alcuni fori sulla parte sinistra dell'albero (non mostrati in figura 1.8) una volta disaccoppiato con l'inserto porta agitatori che ne garantisce l'isolamento durante il moto rotatorio e media la trasmissione dello stesso tra albero di coltura e albero motore (descritto più avanti). La procedura appena descritta richiede quindi l'apertura della camera di coltura e differenti operazioni manuali dirette all'interno di essa, rendendo molto critico questo passaggio a causa dell'invasività e della possibilità di contaminazione del costruito.

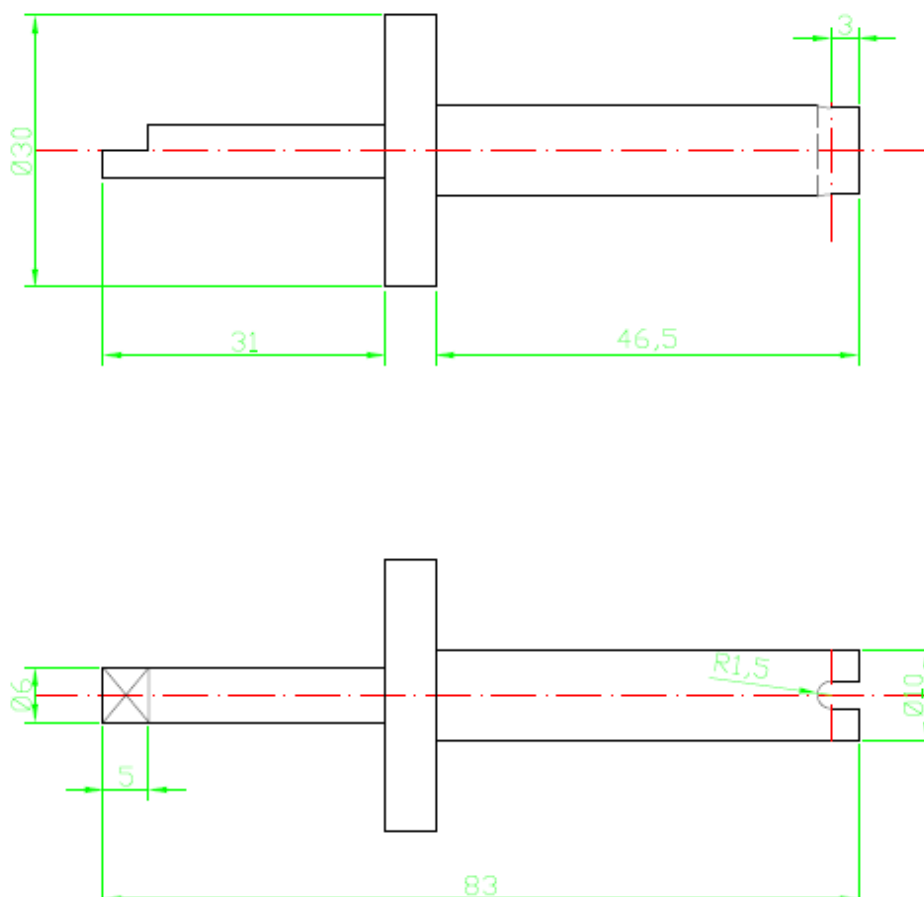


Figura 1.11. Disegno quotato dell'albero motore. La parte sinistra è realizzata in acciaio, mentre la destra è in Teflon.

Il moto rotatorio viene trasmesso all'albero di coltura dall'accoppiamento con l'albero motore (fig. 1.11), costruito in Teflon per quanto riguarda la parte esterna al bioreattore ed in acciaio per la porzione che si accoppia con l'albero di coltura.

L'accoppiamento tra i due alberi avviene tramite il dente presente su entrambi (visibile a sinistra delle figure 1.8 e 1.11). Il moto viene trasmesso dal motore assiale all'esterno del bioreattore, a cui è collegato l'albero motore che è libero di ruotare all'interno di un inserto in Teflon nella camera (fig. 1.12), che permette il movimento relativo e garantisce la tenuta della camera interna.

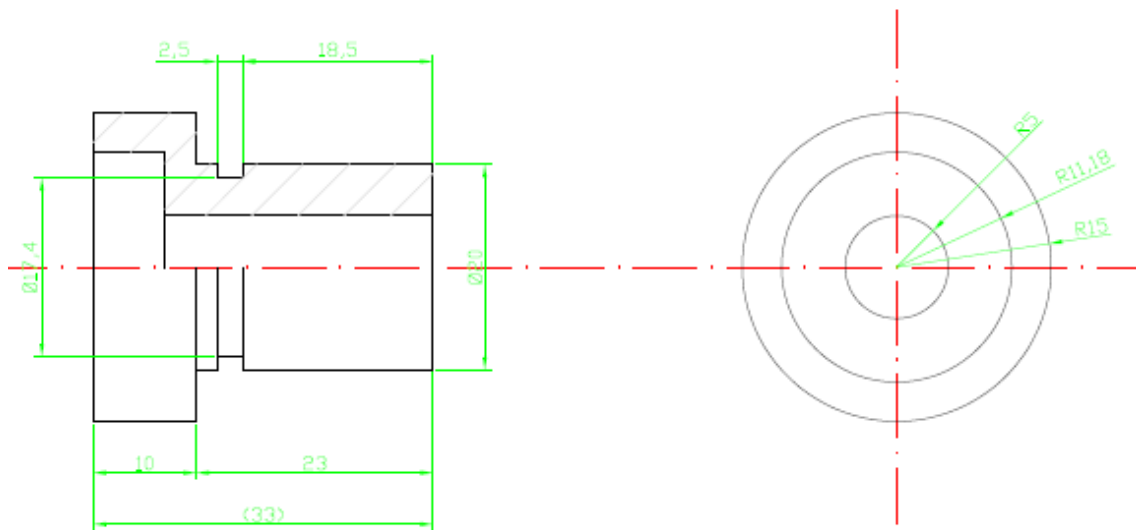


Figura 1.12. Disegno quotato dell'inserto lato motore, il quale presenta una battuta interna (a sinistra) nella quale si accoppia dall'interno della camera l'albero motore, garantendo il moto relativo e mantenendo la tenuta interna della camera.

Il mantenimento dell'accoppiamento tra albero motore e albero di coltura è garantito da un'ulteriore inserto (fig. 1.13) che scorre sulla parte metallica dell'albero motore ed ha la doppia funzione di aiutare la trasmissione del moto e di mantenere rimescolato il medium nella camera di coltura, in quanto presenta due barrette metalliche che ruotano parallele agli alberi e fungono da agitatori.

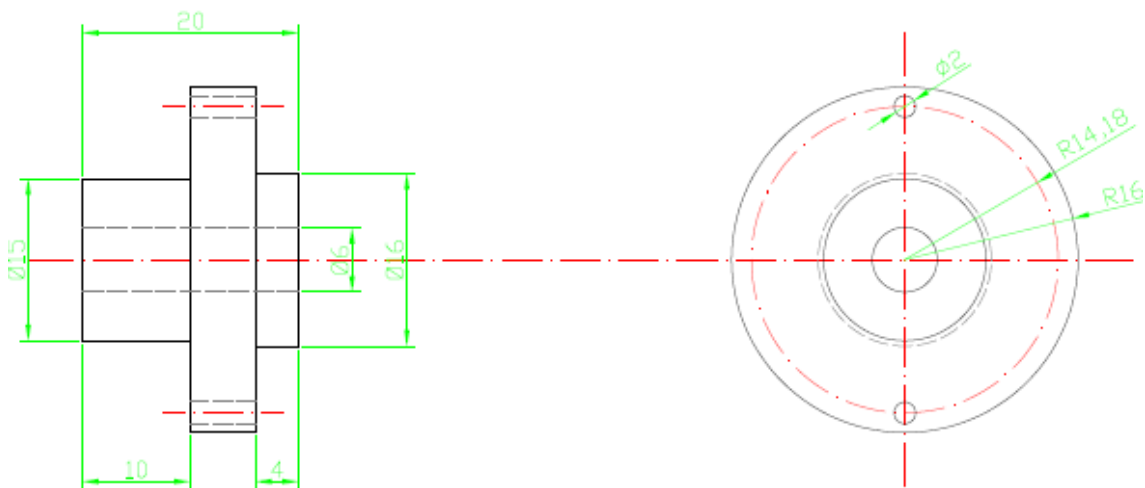


Figura 1.13. Disegno quotato dell'inserto interno alla camera. Scorrendo sulla parte metallica dell'albero motore garantisce la trasmissione del moto rotatorio e tiene movimentato il medium grazie a due barrette metalliche che si inseriscono nei due fori (in alto ed in basso).

Come anticipato, il sistema di attuazione meccanica consiste in un motore passo passo che consente di mettere in movimento il costruito all'interno della camera senza influenzare la sterilità della stessa, l'entità della rotazione è variabile, ma non supera uno o due giri al minuto. Siccome la camera è riempita di medium solo fino a metà costruito circa, ruotando, la superficie esterna dello scaffold viene a contatto alternativamente con il terreno e con l'aria, garantendo nella prima fase un corretto scambio di metaboliti e cataboliti, mentre nella seconda fase una saturazione completa dell'ossigeno in quanto le cellule vengono poste a diretto contatto con l'atmosfera della camera di coltura. Lo stesso ragionamento può essere fatto anche per il lume del costruito, poiché anche all'interno il medium occupa solo la metà inferiore.

La separazione dei due ambienti, interno ed esterno allo scaffold, le due distinte semine e la possibilità di impiegare due terreni di coltura differenti, rendono possibile la coltura di due fenotipi cellulari distinti, in particolare condrociti all'esterno e cellule endoteliali all'interno, nel tentativo di creare un costruito il più simile possibile alla trachea.

Come detto all'inizio di questo capitolo e come è emerso dalla descrizione del

dispositivo, questo bioreattore non è compatibile con un flusso interno di medium. A questo proposito, nel prossimo capitolo verranno descritte le modifiche da apportare allo stesso, per ottenere una pervietà del lume mantenendo e migliorando le sue caratteristiche generali.

1.2 Bioreattore per i vasi di piccolo calibro

La rigenerazione del tessuto vascolare si è dimostrata, fin dagli albori dell'ingegneria tissutale, uno dei più rilevanti ambiti di studio, a causa dell'alta incidenza e dell'ampia gamma di malattie a carico del sistema circolatorio, che risultano essere la prima causa di decessi nei paesi più sviluppati, Europa compresa (Allender et al., 2008).

I problemi a carico di vasi di grande calibro sono generalmente ovviati con protesi di materiale sintetico come Dacron[®] (polietilentereftalato) o ePTFE (politetrafluoroetilene espanso) il cui impiego ha portato a buoni risultati sul medio-lungo termine, ma non per vasi così detti di piccolo calibro, cioè quelli inferiori a 6 mm di diametro, i quali vanno generalmente incontro a stenosi ed occlusione del lume provocando il fallimento dell'impianto.

Per vasi di piccolo calibro è quindi necessario trovare delle soluzioni alternative che si traducono spesso in trapianti autologhi effettuati solitamente con la vena safena, per la chirurgia del sistema circolatorio periferico, o con l'arteria mammaria, per l'esecuzione di bypass coronarici (Pietrabissa, ed. Pàtron). Tuttavia, in circa il 10% dei casi, non è possibile reperire tessuti autologhi nel paziente, a causa di traumi estesi, patologie vascolari o precedenti interventi. Per questo motivo vi è la necessità di creare impianti biocompatibili in grado di adattarsi ed autorigenerarsi con l'obiettivo di risolvere il problema sul lungo termine con un'alta affidabilità.

1.2.1 Struttura dei vasi arteriosi e principali patologie

I vasi arteriosi sono costituiti da tre strati concentrici, i quali si differenziano per composizione e funzione (fig. 1.14).

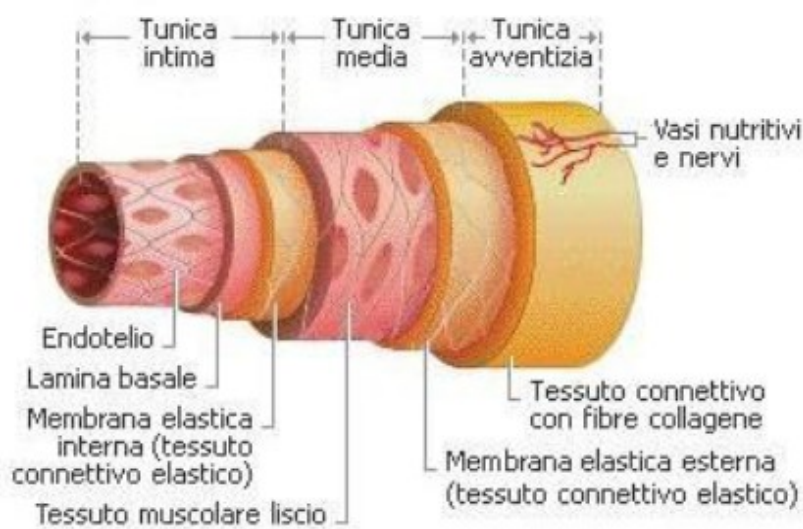


Figura 1.14. Struttura generale di un vaso arterioso.

Lo strato più interno è la tonaca intima, costituita da un monostrato di cellule endoteliali a diretto contatto con il sangue orientate lungo il flusso sanguigno, che poggiano su una membrana basale costituita da collagene e fibroblasti. Il danneggiamento dell'intima, quindi l'esposizione di strati sottostanti, segnala una lesione nel vaso e viene rapidamente innescato il processo di coagulazione.

Lo strato intermedio prende il nome di tonaca media, è costituita da fibre muscolari ordinate in senso circonferenziale e di fibre elastiche costituite da elastina ed è separata dall'intima dalla lamina elastica interna. Lo spessore di questo strato può variare enormemente a seconda del distretto del corpo che si prende in considerazione, ma generalmente è lo strato più spesso dei tre. La funzione della media è quella di fornire elasticità alla parete del vaso, in modo da smorzare le onde pulsatili provenienti dal cuore e rendere il flusso meno discontinuo, per questo motivo i distretti più vicini al cuore come l'aorta possiedono una tunica media molto sviluppata.

Lo strato più esterno è l'avventizia, che è separata dalla tonaca media dalla lamina elastica esterna ed è costituita da tessuto connettivo organizzato in fibre longitudinali, con la funzione di contenere il vaso e permettere l'ancoraggio ai tessuti interni. Nei vasi di piccolo calibro la tunica avventizia risulta spesso più spessa della media.

I vasi di spessore superiore a 1 millimetro, sono irrorati da un sistema di *vasa*

vasorum che originano da arterie vicine e costituiscono una rete capillare nell'avventizia ed hanno la funzione di portare nutrimento alle cellule dei vasi quando la loro distanza dal flusso interno o la velocità dello stesso non permette gli scambi di massa diretti.

Le patologie legate ai vasi sono spesso di due tipi:

- stenosi, riduzione patologica del lume di passaggio di un vaso;
- aneurisma, allargamento del diametro del vaso dovuto ad un cedimento progressivo della parete vascolare.

Per i piccoli vasi la patologia di maggiore interesse è l'occlusione dovuta a diversi fattori, prima fra tutte l'aterosclerosi.

L'aterosclerosi è dovuta alla formazione di placche aterosclerotiche all'interno della parete del vaso, che influiscono sulla pervietà del lume e possono portare alla totale occlusione (fig. 1.15). Possiamo identificare in generale due epiloghi della patologia aterosclerotica:

- occlusione totale del lume, con conseguente ischemia dei tessuti a valle della stessa causata dal mancato apporto di ossigeno;
- aneurisma, causato dall'indebolimento della parete, con conseguente rottura dello stesso (Shoen, 1994).

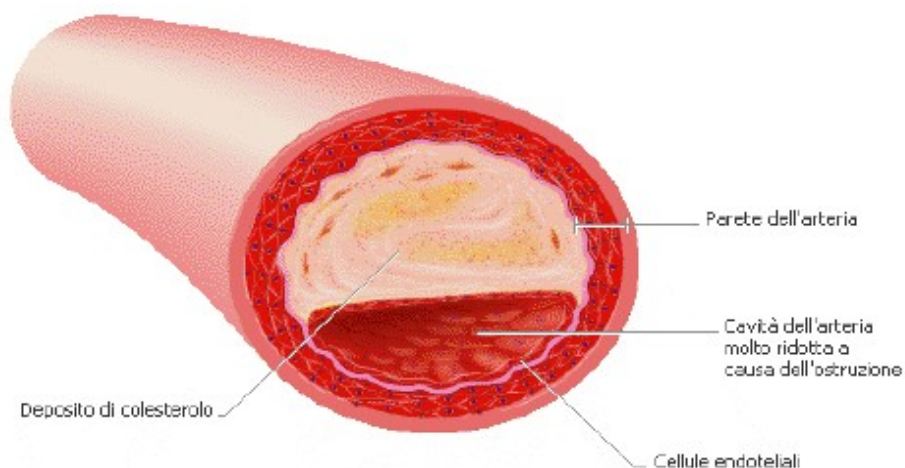


Figura 1.15. Occlusione di un'arteria.

Sono stati identificati innumerevoli fattori che possono portare alla patologia aterosclerotica, fra questi possiamo trovare la predisposizione genetica ed altri elementi legati al tenore di vita come colesterolo, fumo, obesità, diabete, ipertensione e scarsa attività fisica.

Il trattamento della patologia oclusiva risulta generalmente essere il bypass o la sostituzione del vaso occluso, mentre nel caso di restringimento del lume si ricorre spesso ad angioplastica a palloncino o posizionamento di stent, a seconda dell'entità della patologia.

L'angioplastica a palloncino, consiste nella dilatazione dell'arteria parzialmente occlusa. In questa procedura, viene inserito un catetere che porta sull'estremità un palloncino sgonfio, il catetere viene guidato fino a raggiungere l'occlusione, quindi viene gonfiato il palloncino solitamente con della soluzione fisiologica sterile in modo da comprimere la placca e ripristinare almeno parzialmente la pervietà del lume (fig. 1.16).

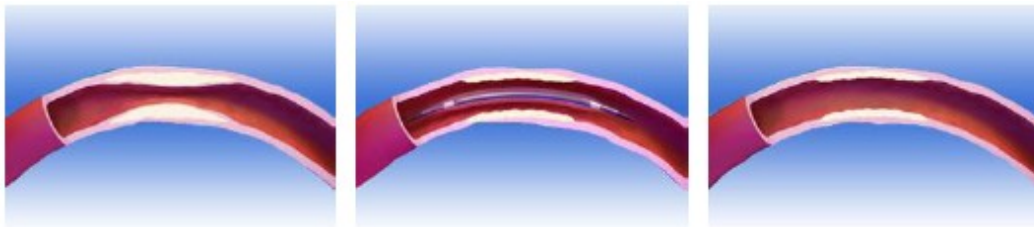


Figura 1.16. Procedura di angioplastica a palloncino. Viene inserito un catetere con un palloncino sull'estremità che, gonfiato, è in grado di comprimere la placca aterosclerotica ripristinando parzialmente la pervietà del vaso.

In una buona parte delle operazioni, viene inserito uno stent costituito da una maglia metallica che circonda il palloncino e che è in grado di espandersi insieme ad esso ancorandosi alla parete del vaso con il fine di mantenere aperto il lume. La procedura di posizionamento comporta dei rischi dovuti alla possibilità di lesionare il vaso e provocare risposte coagulative acute od iperplasia dell'intima.

Il bypass è una procedura chirurgica molto più invasiva dell'angioplastica, che

consiste nel creare un percorso alternativo per il sangue in modo che arrivi ad irrorare i tessuti a valle dell'occlusione. Il bypass viene eseguito spesso con un'anastomosi terminale laterale a valle della stenosi, con un vaso che può essere parte della rete di vasi locali, come il caso dell'arteria mammaria per i bypass coronarici, oppure autologo espuntato da un distretto diverso, come nel caso della vena safena, la quale è però spesso soggetta a stenosi dovuta ad iperplasia dell'intima.

La sostituzione del tratto è anch'esso una procedura chirurgica molto invasiva, si realizza con la resezione della porzione di vaso interessato dalla patologia e l'applicazione di una protesi sostitutiva con due anastomosi terminale terminali. La protesi può essere biologica, come nel caso degli impianti autologhi, eterologhi o xenogenici, oppure sintetica, come Dacron o PTFE che, come già detto, non sono adatti per la sostituzione di vasi di piccolo calibro poiché vanno facilmente incontro ad occlusione. Anche nel caso dei grandi vasi le protesi possono andare in contro a fallimento dovuto a stenosi per iperplasia dell'intima, oppure a danneggiamento della parete del vaso ed aneurisma in prossimità delle anastomosi causati dal *mismatch* di caratteristiche meccaniche, quali compliance, tra la protesi ed il vaso stesso.

1.2.2 Ingegnerizzazione dei vasi di piccolo calibro

Per ovviare ai problemi sopra citati è possibile ricorrere all'ingegneria dei tessuti per ricreare vasi di piccolo calibro. L'obiettivo è quello di ricreare un costrutto cellularizzato vitale che può essere impiantato senza la necessità di terapie antirigetto.

Possono essere identificate alcune caratteristiche fondamentali che il costrutto deve possedere per essere impiegato in un contesto clinico (Isenberg B. et al., 2006):

- emocompatibilità, non – trombogenicità, non – immunogenicità e resistenza alle infezioni: queste caratteristiche sono raggiungibili con la presenza di un monostrato endoteliale confluyente di cellule autologhe, che non innesci processi di rigetto e coagulazione, garantendo la pervietà del lume;
- induzione di una moderata risposta infiammatoria, promuovendo la guarigione e

l'integrazione dell'impianto senza portare ad iperplasia e prevenendo la formazione della capsula fibrotica;

- adeguate caratteristiche meccaniche simili a quelle dei vasi naturali, come valori fisiologici di compliance, resistenza al creep per prevenire la formazione di aneurismi, resistenza a rottura nel lungo termine per sopportare gli stress emodinamici fisiologici e capacità di rimodellamento per un'adeguata risposta agli stimoli esterni di degradazione e deposizione di matrice;
- permeabilità selettiva a soluti, acqua e cellule;
- risposta agli stimoli chimici e neurali con attivazione vasomotoria generando vasocostrizione e vasodilatazioni;
- maneggiabilità, suturabilità ed adattabilità in sede operatoria.

Un ideale bioreattore per la l'ingegnerizzazione dei vasi di piccolo calibro, dovrebbe permettere l'impiego di almeno due fenotipi cellulari, con l'obiettivo di generare internamente un monostrato endoteliale ed esternamente una tunica muscolare liscia, con la possibilità di fornire adeguati stimoli chimici e meccanici ad entrambe.

1.2.3 Il bioreattore

Il bioreattore preso in considerazione è quello realizzato dagli ingegneri V. Ballotta e I. Stefani nella tesi di laurea specialistica. Questo dispositivo è stato costruito ponendosi le seguenti specifiche progettuali:

- possibilità di perfondere il lume dello scaffold durante la coltura;
- ottimizzazione del trasporto di massa;
- modularità dei componenti;
- minimizzazione degli ingombri del dispositivo (per permettere il posizionamento dello stesso nell'incubatore) e del volume di priming;
- ottimizzazione delle procedure di assemblaggio e posizionamento del costruito

per rendere minima la possibilità di contaminazione.

Data l'entità della dimensione del costrutto, 2 – 4 mm di diametro interno, deve essere minimizzato l'ingombro della struttura portante nel lume e lo scaffold deve esporre la maggior parte della superficie interna per permettere una corretta semina e perfusione. L'ossigenazione sulla superficie esterna è garantita dallo stesso meccanismo del bioreattore per la trachea, cioè la rotazione del costrutto la espone alternativamente alla fase liquida ed a quella gassosa.

La camera del bioreattore rappresenta l'elemento strutturale principale, in quanto, oltre ad alloggiare il costrutto e contenere il medium di coltura esterno, funge da supporto ai componenti interni ed al sistema di condizionamento meccanico. Essa è realizzata in policarbonato che soddisfa le caratteristiche di resistenza, biocompatibilità ed inerzia intrinseche dell'impiego, è costituita da una base rettangolare con due accessi laterali che permettono l'inserimento dei vari componenti e del costrutto (fig. 1.17).



Figura 1.17. Camera di coltura del bioreattore per i piccoli vasi.

Il coperchio della camera poggia su dei rialzi analoghi a quelli del bioreattore per la trachea, che sfruttano il principio delle piastre petri e permettono il passaggio di ossigeno ma non di microorganismi.

Per minimizzare il volume di priming, il fondo della camera è stato realizzato

con geometria emicilindrica e gli spigoli interni sono smussati per impedire l'accumulo di sostanze e favorire il ricambio del terreno e la sterilizzazione. I due fori visibili in figura 1.17 permettono l'inserimento degli alberi, la trasmissione del moto rotatorio al costruito e la perfusione. La camera possiede inoltre un meccanismo di pretensionamento dello scaffold posto in coltura.



Figura 1.18. Afferraggi per il fissaggio dello scaffold ai supporti.

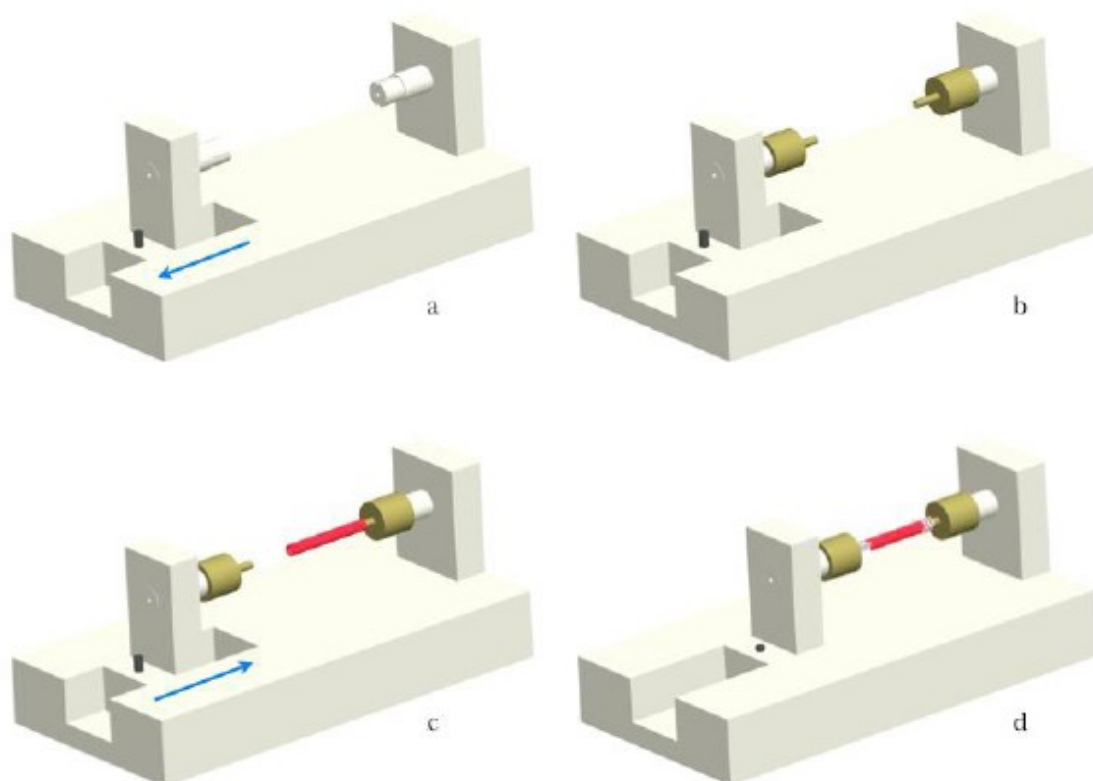


Figura 1.19. Montaggio dello scaffold. Sul sistema di supporto [a] vengono inseriti gli inserti porta scaffold [b], successivamente viene montato lo scaffold sul lato fisso e viene posizionato il lato opposta alla giusta distanza [c]. Per ultimo lo scaffold viene fissato con gli afferraggi [d].

Lo scaffold viene fissato con gli afferraggi (fig. 1.18) tra due supporti costruiti in PEEK opportunamente sagomati, avvalendosi di un sistema di supporto ausiliario indipendente dal bioreattore come mostrato in figura 1.19.

Gli alberi (fig. 1.20), realizzati anch'essi in PEEK, sono collegati all'esterno della camera di coltura con degli ingranaggi che trasmettono il moto da un motore disassato e ne permettono la rotazione sincrona. Lungo l'asse di entrambi gli alberi è realizzato un canale di 2 mm di diametro al fine di permettere la perfusione del lume del costruito. L'utilizzo di due alberi distinti in sincrona rotazione e non di un solo albero come nel caso del bioreattore per la trachea, si è resa necessaria per garantire la pervietà del lume data la dimensione ridotta dello scaffold. Uno dei due alberi è vincolato alla parete ed è solo libero di ruotare, mentre l'altro è collegato al sistema di pretensionamento e può compiere una breve corsa assiale.



Figura 1.20. Fotografia dei due alberi del bioreattore per piccoli vasi.

Il sistema di pretensionamento appena citato ha il fine di mimare il fisiologico pretensionamento normalmente presente in tutti i vasi dell'organismo. La soluzione costruttiva si avvale di un inserto nel foro di diametro maggiore della camera, in cui è alloggiato un elemento cilindrico cavo nel quale sono incastrati due cuscinetti a sfere (fig. 1.21), questo sistema permette la libera rotazione dell'albero e una corsa assiale di 10 mm, nonché il bloccaggio dello stesso alla distanza voluta con un grano.

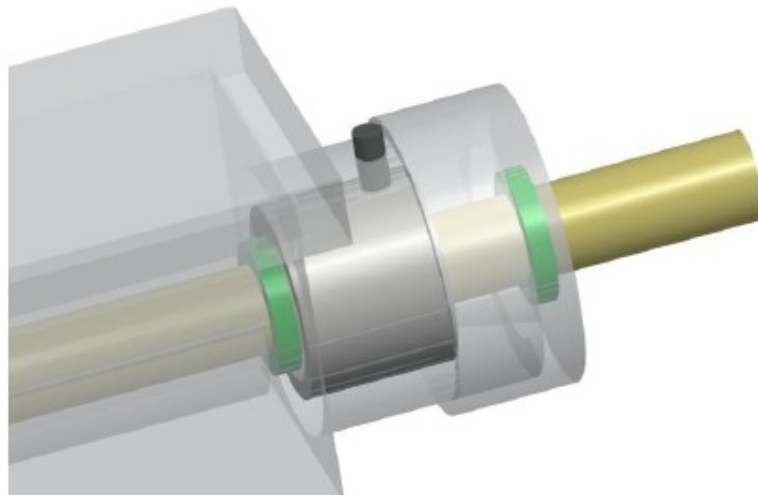


Figura 1.21. Particolare del sistema di pretensionamento del bioreattore per piccoli vasi.

Tutte le parti del bioreattore sono sterilizzabili in autoclave ed il montaggio può avvenire sotto cappa laminare, grazie anche al meccanismo di assemblaggio laterale che permette di non passare direttamente con le mani al di sopra della camera mantenendo la sterilità (fig. 1.22).

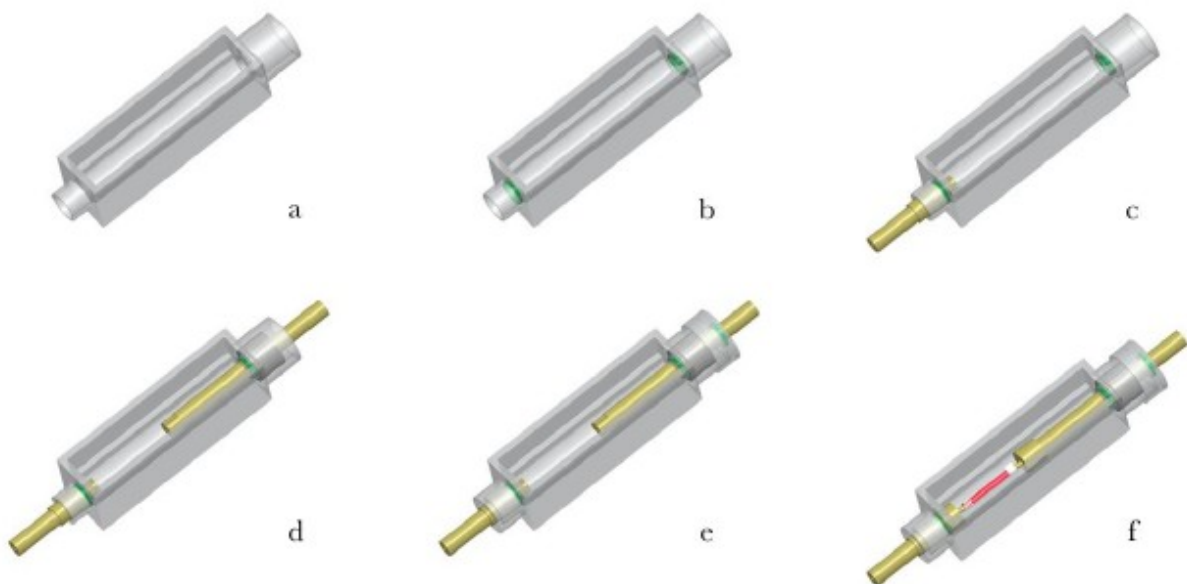


Figura 1.22. Sequenza di assemblaggio del bioreattore. Nella camera [a] vengono montati gli anelli di tenuta [b], successivamente viene inserito l'albero fisso [c] seguito da quello mobile [d] e dal meccanismo di pretensionamento [e]. Infine vengono montati agli alberi i porta scaffold sui quali è stato precedentemente montato lo scaffold [f].

Infine il bioreattore si avvale anche di una base in alluminio sulla quale è presente un motore brushless ed un motoriduttore che offre la possibilità di regolare finemente la velocità di rotazione ed assicura un'adeguata affidabilità all'interno dell'incubatore (fig. 1.23).

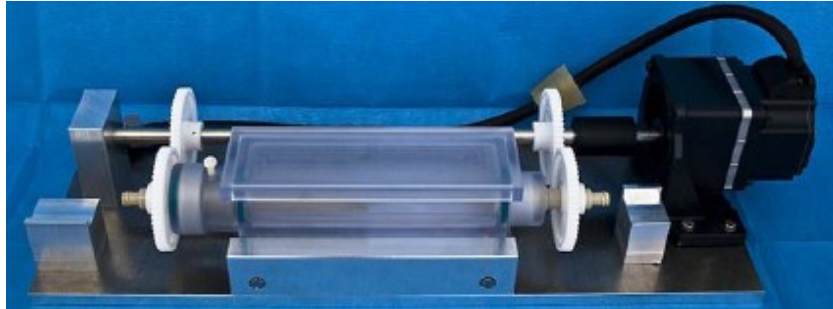


Figura 1.23. Bioreattore montato sulla base di alluminio sulla quale è presente il motore brushless.

Come detto all'inizio del capitolo e come è emerso in questo paragrafo, il bioreattore per i piccoli vasi appena presentato è già predisposto all'accoppiamento con il sistema di perfusione descritto nel prossimo paragrafo, pertanto non sono necessarie delle modifiche strutturali come nel caso del bioreattore per la trachea.

1.3 La perfusione nei bioreattori

In questo paragrafo viene presentato un circuito di perfusione accoppiabile ai due bioreattori presentati precedentemente. I dimensionamenti dello stesso sono discussi nel capitolo 3.

1.3.1 I vantaggi della perfusione

L'idea di perfondere il lume del costrutto, nasce dalla volontà di riprodurre all'interno del bioreattore delle condizioni di coltura che mimano il sistema fisiologico, che può essere il flusso sanguigno. Da questo punto di partenza possiamo identificare tre caratteristiche generali che la perfusione può introdurre nella coltura:

- applicazione di uno sforzo idrodinamico tangenziale al costrutto (τ) e distensione radiale nel caso in cui il flusso interessi l'intera area del lume (come nel bioreattore per vasi di piccolo calibro);
- miglior scambio di ossigeno, metaboliti e cataboliti rispetto ad una coltura statica;
- possibilità di perfondere il costrutto con la sospensione cellulare per ottenere una semina più uniforme.

In letteratura è possibile trovare innumerevoli studi riguardanti la perfusione nei bioreattori, in particolare si citano alcuni articoli significativi.

In figura 1.24 è mostrato un bioreattore per la semina in perfusione (Williams C. et al., 2004), composto da moduli cilindrici di vetro disposti in serie e due pompe a siringa alle estremità del dispositivo, mentre una pompa peristaltica perfonde i costrutti perpendicolarmente (fig. 1.25). La semina con cellule SMC bovine su uno scaffold di PGA (acido poliglicolico) viene eseguita pompando e aspirando alternativamente la sospensione cellulare attraverso lo scaffold ed imponendo per 24h un flusso di 4ml/min.

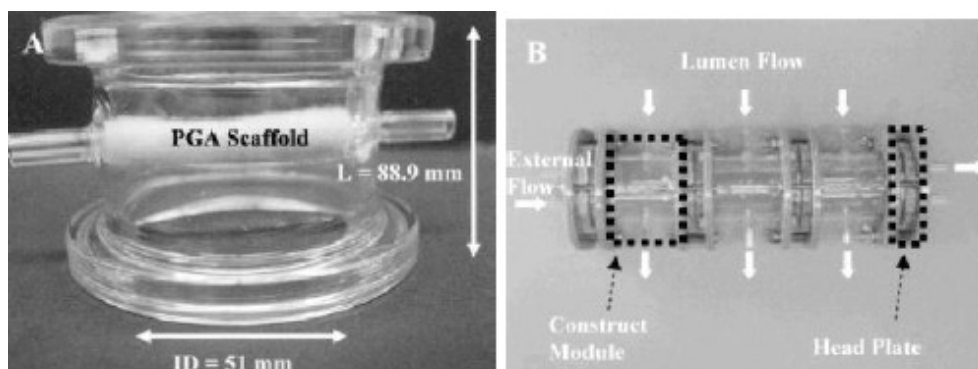


Figura 1.24. Moduli del bioreattore per la semina a perfusione realizzato da Williams C. et al., 2004.

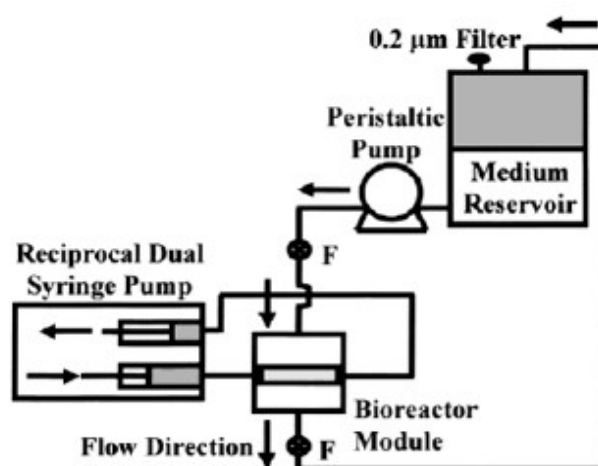


Figura 1.25. Circuito per la perfusione del bioreattore realizzato da Williams C. et al., 2004.

Il bioreattore una volta seminato è stato posto in coltura a perfusione con portate variabili tra i 37 ed i 46 ml/min che corrispondono ad uno shear stress di 2,2 – 8,8 dyne/cm², dopo 13 giorni sono state seminate con un processo analogo delle cellule endoteliali nel lume e già entro le 48h si è evidenziato un monostrato confluento.

Un altro interessante caso è il bioreattore a perfusione sviluppato da Herstrup et al., 2001 (fig. 1.26), che grazie ad una pompa ad aria permette l'ampio controllo di pressioni e portate. Le prove di coltura, fatte con miofibroblasti e cellule endoteliali seminate su uno scaffold di PGA/P4HB, hanno mostrato un incremento di caratteristiche meccaniche al crescere dei tempi di condizionamento rispetto alla coltura statica, all'aumentare dei valori di pressione e portata. Da questo possiamo evincere che la

stimolazione idrodinamica ha un'influenza non trascurabile sullo sviluppo delle cellule e quindi del costrutto.

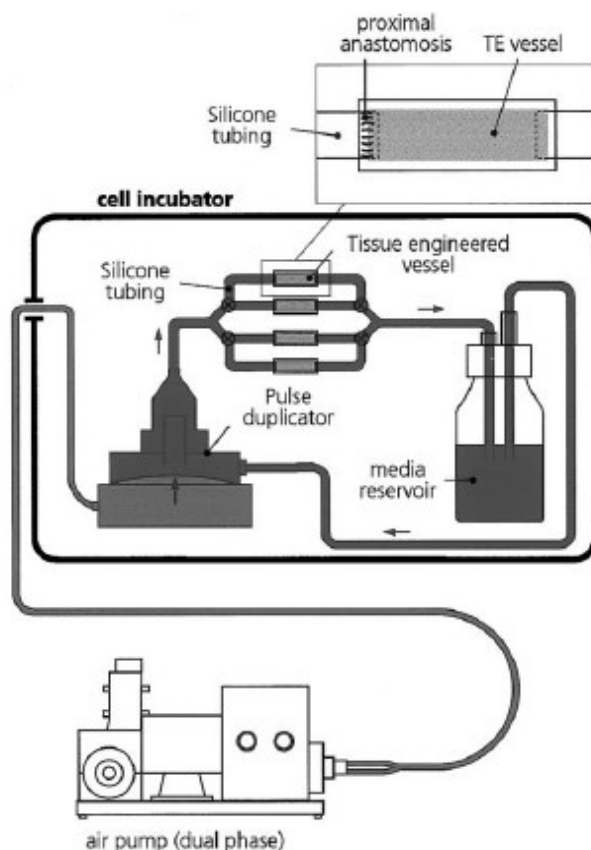


Figura 1.26. Schema del bioreattore a perfusione realizzato da Herstrup et al., 2001.

Un ulteriore conferma del fatto che la stimolazione meccanica ottenuta con la perfusione incide sulla coltura, si può avere dal bioreattore preso in esame da Arrigoni C. et al., 2008 (fig. 1.27). Il dispositivo, per la semina e coltura di cellule muscolari lisce su uno scaffold di HYAFF, è stato sviluppato presso l'istituto Mario Negri ed è in grado di modulare la portata e la pressione di un flusso pulsatile, mimando i valori ottenuti sperimentalmente per i vasi arteriosi di piccolo calibro. Il flusso genera uno shear stress sulla parete del lume ed una stimolazione di pressione pulsatile sulle pareti del costrutto. Il bioreattore è costituito da una camera di plexiglass nella quale è alloggiato il costrutto tubolare, la possibilità di seminare e porre in coltura lo scaffold direttamente nella camera rappresenta un grande vantaggio prevenendo la contaminazione dovuta alla

manipolazione dello stesso. I costrutti posti in coltura per 2 settimane hanno mostrato strati cellulare compatti e ben adesi allo scaffold oltre a caratteristiche meccaniche nettamente superiori a quelli posti in coltura statica.

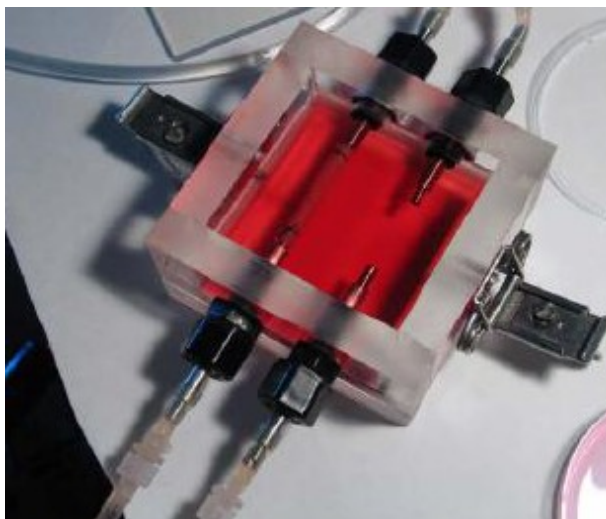


Figura 1.27. Bioreattore realizzato da Arrigoni C. et al., 2008, all'istituto Mario Negri.

L'ultimo bioreattore che si cita è stato sviluppato da McFetridge et al., 2007 (fig. 1.28), il quale ha permesso di simulare il flusso del sangue modulando la pressione e la frequenza del terreno circolante sia all'interno del lume del costrutto, sia all'esterno. Sono state poste in coltura cellule muscolari lisce su un supporto costituito da un vaso porcino decellularizzato, dopo 5 settimane solo la superficie del costrutto è risultata densamente popolata e si è presentata liscia ed uniforme. La configurazione di questo bioreattore permette l'imposizione di una pressione transmurale, variando le pressioni intra ed extra lumenali, con l'obiettivo di controllare ed ottenere una distribuzione cellulare voluta nel volume del costrutto.

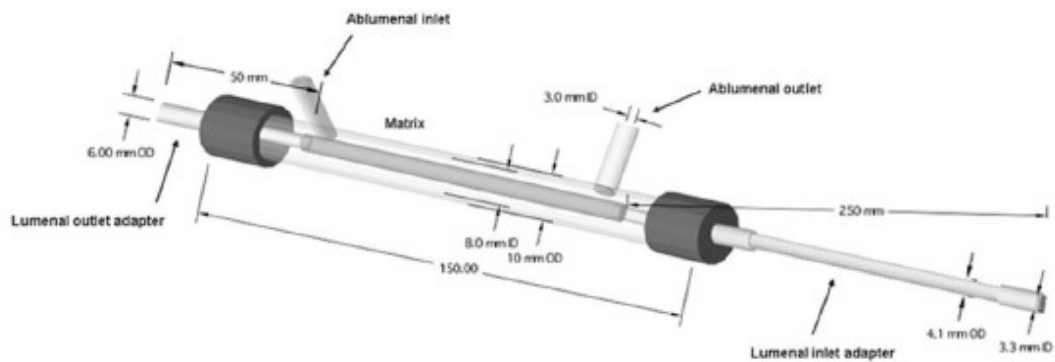


Figura 28. Bioreattore a perfusione sviluppato da McFetridge et al., 2007.

1.3.2 Il circuito di perfusione

Il circuito di perfusione, schematizzato in figura 1.29, è stato pensato per l'accoppiamento con differenti bioreattori che necessitano di un flusso di medium interno al lume del costrutto, si è quindi voluto il più semplice ed adattabile possibile pur rimanendo ancorato a delle caratteristiche cardine.

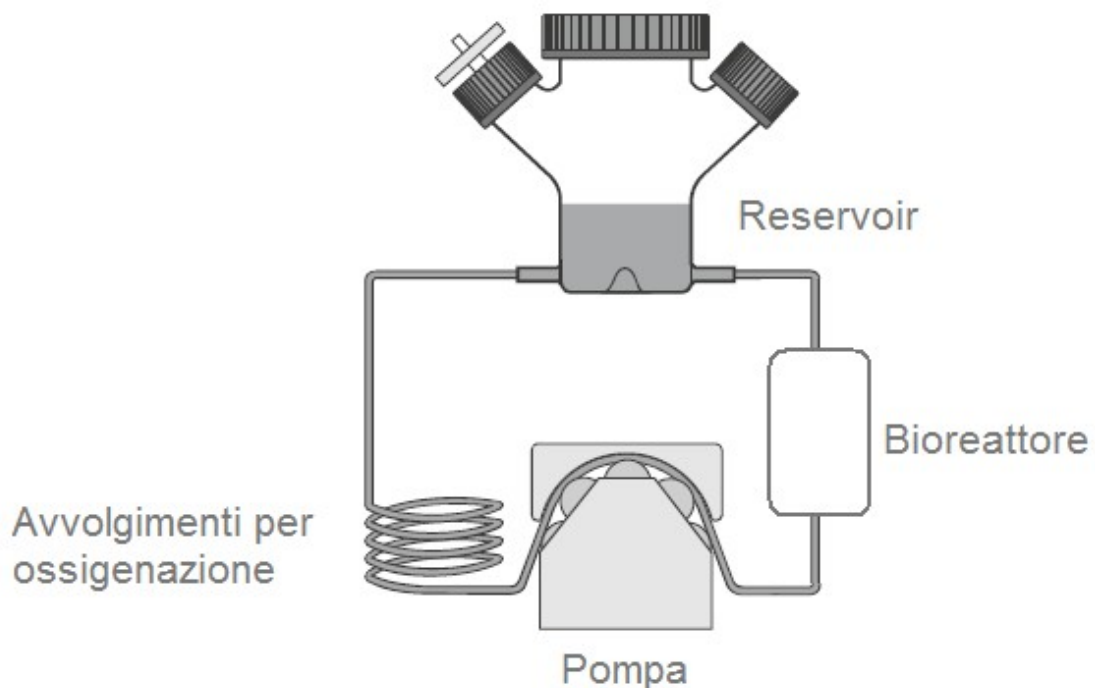


Figura 1.29. Schematizzazione del circuito di perfusione.

Il circuito proposto si avvale dei seguenti elementi, discussi successivamente:

- pompa peristaltica;
- tubi ossigenanti;
- reservoir;
- eventuali elementi di collegamento con il bioreattore.

La pompa peristaltica ha la funzione di generare il flusso di medium senza compromettere la sterilità dello stesso. Le caratteristiche generali ricercate sono:

- ampio range di flusso, adattabile alla specifica applicazione;
- dimensioni contenute, per essere inserita all'interno dell'incubatore assieme al bioreattore ed al resto del circuito;
- ridotto sviluppo di calore con l'uso prolungato;
- eventuale possibilità di inversione del flusso.

Tra le pompe prese in esame, è stata scelta la Shuttle Pump dal catalogo Harvard Apparatus, così chiamata perché ha trovato impiego nei test di colture cellulari svolti sullo Space Shuttle. Le dimensioni di questa pompa sono molto contenute (3.3 x 11.4 x 7.2 cm) ed il range di portata varia tra gli 1.25 e i 50 ml/min, adatti per il nostro impiego. Il movimento peristaltico non comprime mai i tubi fino ad occluderli, il che la rende adatta anche per il pompaggio di sangue o sospensione cellulare. L'autonomia è di 50 ore di operatività continua con una batteria al litio da 9 V e le emissioni di calore sono molto ridotte.

I tubi proposti per il circuito sono i Tygon® SI Silicone 3350 (Platinum) che presentano le seguenti caratteristiche:

- sterilizzabilità in autoclave, EtOssido e radiazioni;
- inerzia chimica ai componenti dei medium e biocompatibilità;
- basso livello di adsorbimento proteico;
- non – tossico, non – emolitico e non – pirogeno;

- bassissima fotodegradabilità.

Siccome uno dei ruoli principali dei tubi è quello di garantire l'ossigenazione del medium, si sono cercati con un buon coefficiente di permeabilità all'ossigeno ed è stato previsto un avvolgimento, data la lunghezza necessaria per avere un'adeguata superficie di scambio. La lunghezza dei tubi verrà discussa nel capitolo 3.

L'ultimo elemento del circuito è il reservoir, che necessita di un dimensionamento per la specifica applicazione e non può essere quindi generalizzato, così come gli eventuali elementi di collegamento con il bioreattore, che possono essere delle semplici valvole di intercettazione, dei rubinetti a tre vie o dei disaccoppiatori di moto in caso di elementi rotanti (come nel caso del bioreattore per vasi di piccolo calibro).

Cap. 2: Modifica del bioreattore per la trachea

Come già detto nel precedente capitolo, il bioreattore per la trachea presentato non è compatibile con un ricircolo interno del medium, pertanto non può essere accoppiato con il circuito di perfusione. Per questo motivo, è stata sviluppata l'ipotesi di un bioreattore analogo, con opportune modifiche al fine di rendere possibile il flusso all'interno del lume del costrutto.

2.1 Specifiche di progetto

Il primo passo è stato quello di identificare alcune specifiche di progetto. La prima grande caratteristica è già stata ampiamente enunciata, si tratta ovviamente della possibilità di garantire una continuità del flusso all'interno del costrutto tubolare, questo significa che il flusso deve correre parallelamente all'asse di rotazione. La presenza di una perfusione porta differenti vantaggi: in primo luogo non sarebbe più necessario aprire il sistema per cambiare il terreno di coltura interno, diminuendo quindi i rischi di contaminazione della coltura; in secondo luogo la perfusione comporta un miglior apporto di metaboliti ed esporto di cataboliti rispetto ad un medium statico; l'ultimo vantaggio consiste nella possibilità di applicare uno stimolo del tutto nuovo alle cellule, lo sforzo di taglio, il quale potrebbe influire positivamente sulla proliferazione cellulare.

Un'altra caratteristica identificata come specifica di progetto, è la possibilità di passare dalla fase di semina interna alla fase di coltura dinamica senza dover intervenire

direttamente all'interno della camera, modificando quindi la configurazione dall'esterno in modo da non rischiare di compromettere la sterilità della coltura.

La terza specifica di progetto, è un eventuale circuito dell'aria interno per mettere in comunicazione la fase gassosa all'interno del lume del costrutto, con l'atmosfera dell'incubatore, in modo da garantire la saturazione dell'ossigeno. Questa ulteriore aggiunta non risulta però vincolante, in quanto il flusso interno del medium, se opportunamente dimensionato, garantisce al costrutto un adeguato apporto di ossigeno, rendendo la saturazione dello stesso nella fase gassosa non strettamente necessaria. Il circuito dell'aria può però essere vantaggioso in fase di semina, poiché la sospensione cellulare deve permanere all'interno del costrutto per un lasso di tempo non trascurabile, nel quale non è possibile attuare la perfusione. L'integrazione di questo circuito nel bioreattore è risultata alquanto complessa in fase di progetto, poiché si deve garantire un isolamento dello stesso dal circuito di perfusione, impedendo il passaggio non voluto del medium da un sistema all'altro. Per questi motivi, verranno presentate due alternative progettuali simili, una con e una senza il circuito dell'aria.

In ultimo luogo, è possibile identificare una serie di caratteristiche generali che possiede anche il bioreattore di partenza e che si vogliono mantenere, in quanto risultano essere i punti di forza dello stesso:

- *volume di priming contenuto*, in modo da impiegare un basso quantitativo di fattori di crescita, riducendo i costi;
- *assenza di spigoli vivi ed asperità interne*, per facilitare la sterilizzabilità ed il ricambio del medium, evitando l'accumulo di sostanze tossiche;
- *materiali adatti*, che devono possedere una serie di caratteristiche adatte all'impiego, sia dal lato chimico – biologico (biocompatibilità, non citotossicità, ecc.) sia dal lato meccanico (rigidità, lavorabilità, ecc.);
- *separazione dei volumi*, tra medium esterno ed interno al costrutto, con la possibilità di coltivare due fenotipi cellulari differenti ed impiegare due terreni diversi evitando il mescolamento;
- *rotazione assiale del costrutto*, per mantenere il medium esterno “well mixed”, e garantire la saturazione di ossigeno della superficie esterna grazie al contatto

diretto con l'aria.

Alla luce delle caratteristiche sopracitate, sono stati realizzati diversi progetti al fine di ricercare una soluzione ottimale che assolve al meglio tutti i requisiti voluti. A questo proposito ne vengono presentati tre differenti, che introducono idee per la risoluzione dei vari problemi riscontrati, e descrivono il percorso logico intrapreso.

2.2 Il primo progetto: *flusso interno*

Sin dall'inizio si è deciso di non modificare le dimensioni totali del bioreattore, in modo da renderlo adattabile al sistema di attuazione e controllo di quello presentato nel capitolo 1. Per questo motivo le modifiche sono state affrontate nell'ottica di mantenere la stessa camera di coltura e modificare solo i componenti interni.

2.2.1 *L'albero di coltura*

Il primo problema da affrontare è stato come sarebbe dovuto entrare ed uscire il flusso dall'albero di coltura. E' apparso subito chiaro che il medium non poteva uscire radialmente da dei fori posti sull'albero come nel caso del precedente bioreattore, ma doveva necessariamente correre assialmente per tutta la lunghezza del costruito. Immaginando quindi di modificare funzionalmente il precedente, la figura 2.1 mostra un'idea di quello che dovrebbe essere il percorso del medium.

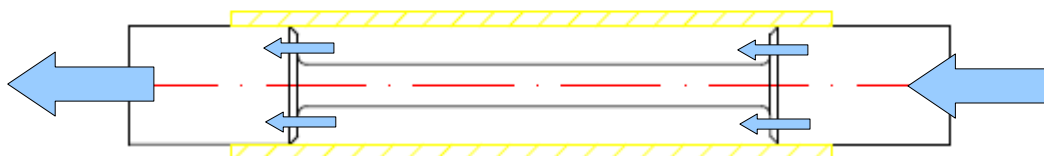


Figura 2.1. *Ipotesi del percorso del medium (frecce azzurre) nell'albero di coltura su cui è montato lo scaffold (giallo).*

Una volta deciso come il terreno di coltura debba fluire all'interno dello scaffold, è stato necessario ricercare una soluzione tecnologica per ottenerlo.

All'imbocco dell'albero (lato destro della figura 2.1), il medium può entrare sfruttando lo stesso meccanismo che ha dato buoni risultati nel bioreattore di partenza. L'idea è quella di un inserto alla camera di coltura che permette al flusso di entrare dall'esterno e si accoppia con l'albero di coltura come mostrato in figura 2.2,

permettendo la libera rotazione del sistema pur garantendo la tenuta grazie ad una eventuale guarnizione.

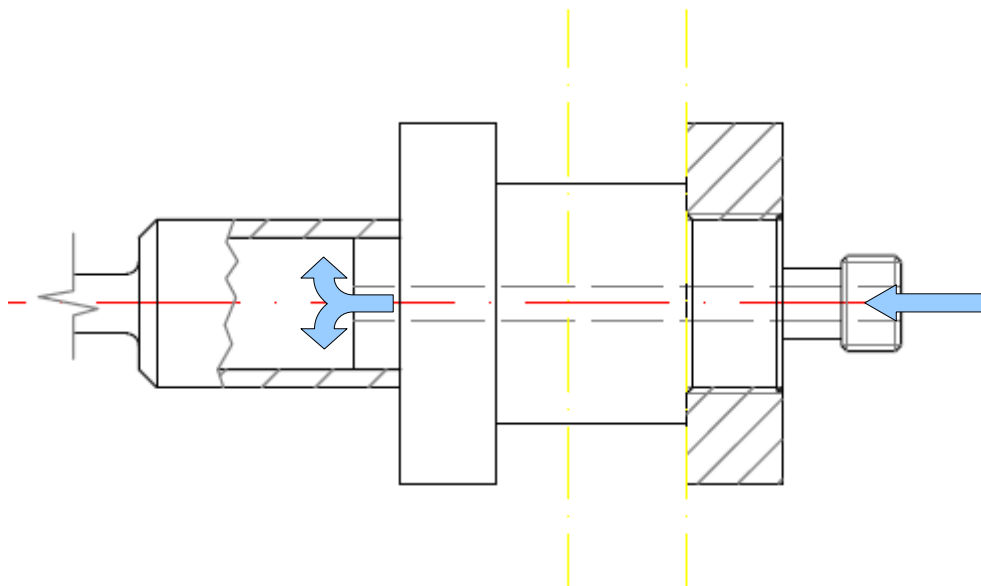


Figura 2.2. Percorso del medium all'interno dell'inserto sulla parete della camera di coltura (tratteggio giallo), che si inserisce all'interno di un'estremità dell'albero dove il fluido si raccoglie prima di arrivare allo scaffold. L'accoppiamento inserto – albero permette la rotazione relativa.

Una volta all'interno dell'albero, il flusso deve passare attraverso dei fori orizzontali. Il punto critico è stato decidere come dovesse essere la sezione di passaggio, poiché doveva offrire una bassa resistenza e doveva permettere al medium di assumere un regime il più possibile laminare. A questo proposito è risultato subito evidente che una serie di fori circolari semplici, avrebbero offerto una resistenza troppo elevata, a causa dei numerosi setti che li separano, pertanto è stata proposta una sezione come quella mostrata in figura 2.3.

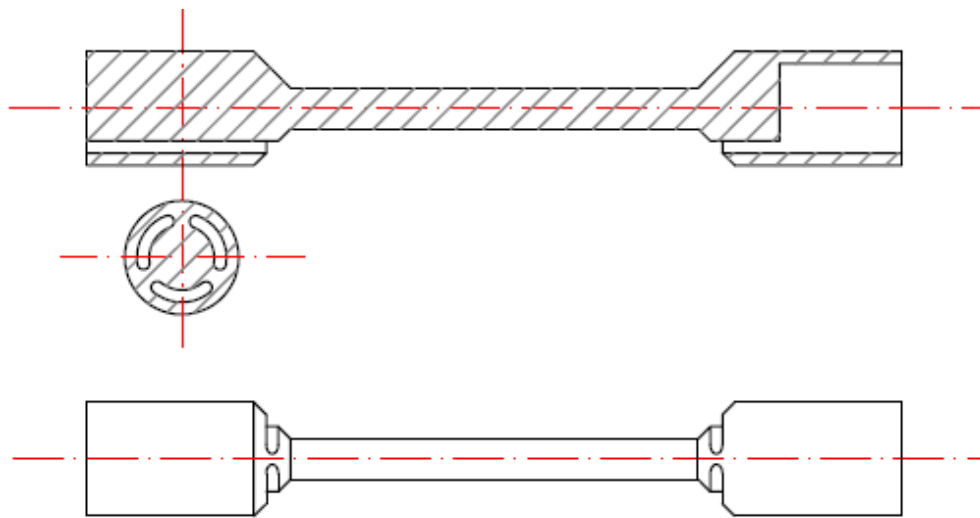


Figura 2.3. Modello dell'albero di coltura che mostra la forma della sezione di passaggio del medium interno.

Questa sezione di passaggio presenta 3 fori allungati separati solo da tre setti, in modo da coniugare una ridotta resistenza fluidodinamica, un'adeguata stabilità meccanica del componente e una realizzabilità del pezzo alle macchine utensili. Purtroppo a causa della complessità del disegno, del percorso del medium e della rotazione dell'albero, risulta molto complessa l'implementazione di un modello computazionale con l'obiettivo di descrivere il comportamento esatto del fluido all'interno del sistema.

Ultima aggiunta all'albero di coltura è il circuito dell'aria. Appare chiaro che esso debba essere ricavato dal moncone centrale e provenire dal lato opposto rispetto al medium. L'idea è quella di costruire un canale interno, che proseguirà anche nell'albero motore, successivamente descritto, all'interno del quale è presente aria posta a contatto con l'atmosfera dell'incubatore. Questo circuito può attuare uno scambio di massa con l'ambiente interno al lume dello scaffold tramite dei fori ricoperti di una membrana ossigenante, come ad esempio quella per dialisi. In figura 2.4 è mostrato l'albero finale con tutti i suoi componenti.

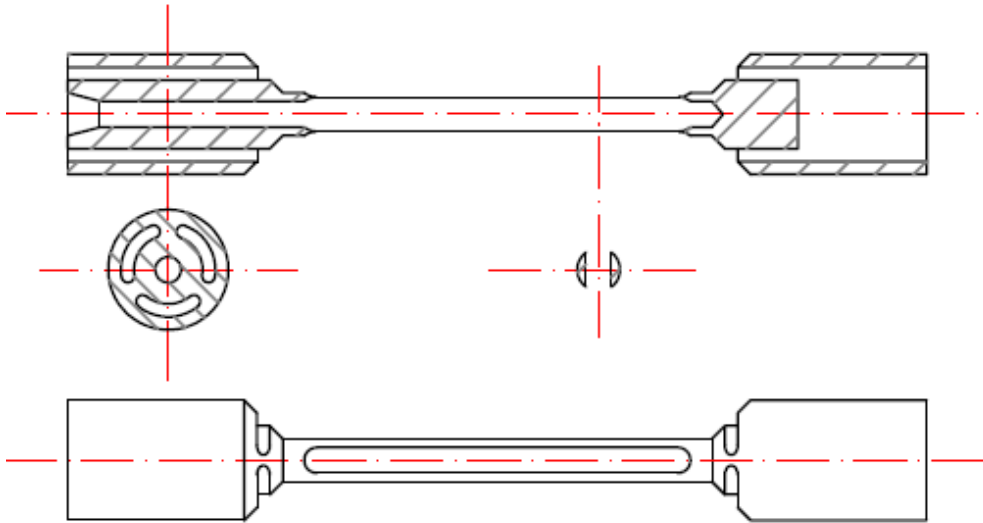


Figura 2.4. Disegno dell'albero di coltura finale, è visibile il foro allungato, ricoperto di membrana ossigenante, che mette in comunicazione il circuito dell'aria con il lume dello scaffold.

Come si vede dalla figura 2.4, i fori che fungono da interfaccia tra il circuito dell'aria e l'interno dello scaffold sono solo due, allungati in modo da ottenere una superficie di scambio più ampia possibile, garantendo comunque la stabilità meccanica dell'albero. Lo svaso conico presente a sinistra serve per permettere l'accoppiamento con l'albero motore, il quale presenta anch'esso un canale interno.

2.2.2 L'albero motore ed il blocco agitatori

L'albero motore è il componente che trasferisce il moto rotatorio del motore all'albero di coltura. Come già detto nel precedente paragrafo, esso deve garantire anche la continuità del circuito dell'aria e quella del flusso interno di medium. Per garantire questi punti chiave si accoppia con l'albero di coltura ed un altro componente, il blocco agitatore, come mostrato in figura 2.5.

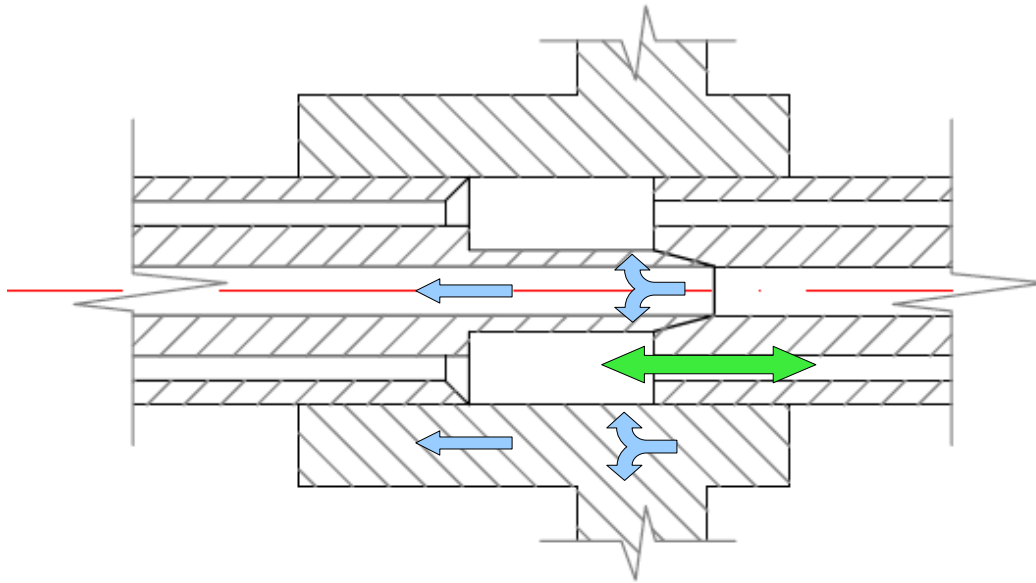


Figura 2.5. Accoppiamento tra albero di coltura (moncone a destra), albero motore (moncone a sinistra) ed il blocco agitatore (moncone centrale). Con le frecce azzurre è schematizzato il percorso del medium, con la freccia verde è visualizzato il circuito dell'aria.

Come si vede dalla figura 2.5, tra i due alberi c'è un accoppiamento conico che serve per garantire l'isolamento tra i circuiti ed assicurare la continuità del circuito dell'aria. Il sistema forma un intercapedine in cui si raccoglie il medium in uscita dall'albero di coltura, per poi fluire all'interno dell'albero motore ed essere trasportato all'esterno della camera di coltura, questo per evitare eventuali infiltrazioni non volute, che si sarebbero potute formare nel caso le superfici laterali degli alberi fossero state poste a diretto contatto. Il blocco agitatore, mostrato in dettaglio in figura 2.6, ha tre principali funzioni:

- garantisce l'isolamento del medium che scorre all'interno del sistema da quello presente nella camera di coltura;
- garantisce una continuità meccanica al sistema, permettendo la trasmissione del moto rotatorio per attrito con le superfici degli alberi;
- presenta due fori paralleli all'asse di rotazione nei quali sono montate due barrette metalliche che permettono di mantenere rimescolato il medium nella camera di coltura.

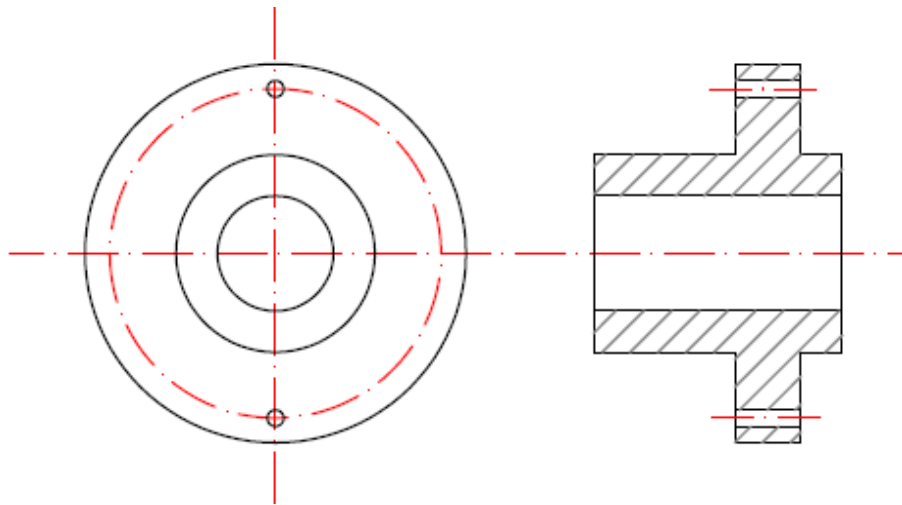


Figura 2.6. Blocco agitatore, i due piccoli fori assiali servono per montare le bacchette metalliche che mantengono rimescolato il medium.

Rimane quindi da specificare come terminano i due circuiti interni e come viene trasmesso il moto. Partendo da quest'ultimo è evidente che l'accoppiamento motore – albero motore non può avvenire assialmente a causa della presenza del circuito dell'aria, quindi è necessario un disassamento del motore ed una trasmissione del moto laterale ad esempio con un sistema di cinghie e pulegge, oppure con un sistema di ruote dentate.

Per quanto riguarda la terminazione dei due circuiti, in figura 2.7 viene mostrata una possibile soluzione.

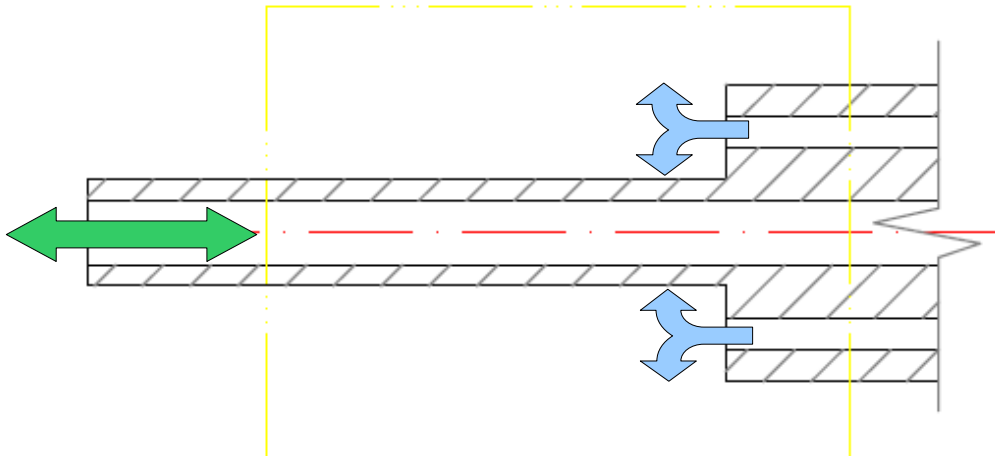


Figura 2.7. Ipotetica camera di raccolta esterna (in giallo) come terminazione del circuito di ricircolo interno del medium.

Ciò che viene mostrato in figura 2.7, è un'ipotetica camera esterna nella quale il medium viene raccolto all'uscita dell'albero motore e ri – convogliato nel circuito. Grazie alla particolare forma dell'albero, il circuito dell'aria esce da questa camera e mette in diretta comunicazione il sistema con l'atmosfera dell'incubatore, avvalendosi di un filtro per impedire il passaggio di contaminanti.

In figura 2.8 è mostrato l'albero motore complessivo, che accomuna tutte le caratteristiche sopra – descritte.

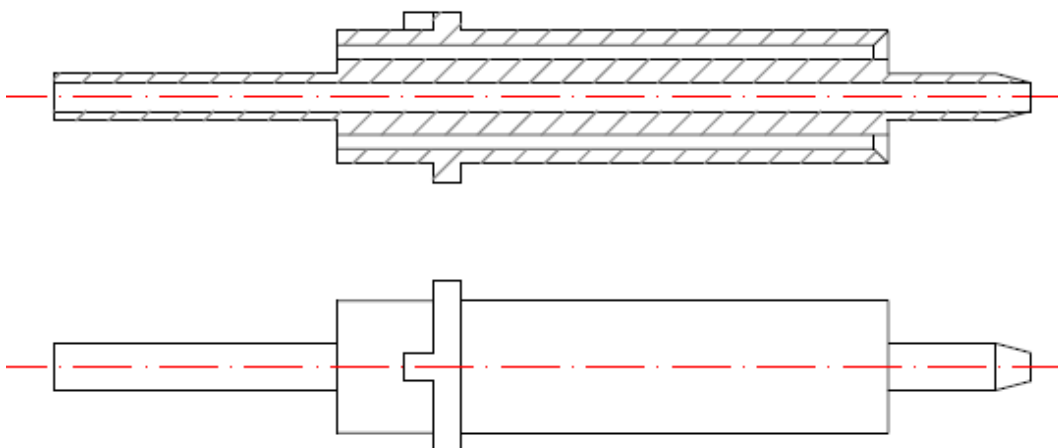


Figura 2.8. Complessivo dell'albero motore, è visibile la battuta su cui è montata la puleggia per permettere la trasmissione del moto con il motore disassato.

Il moto viene trasmesso all'albero tramite una puleggia (fig. 2.9) montata nella battuta visibile in figura 2.8. In questo caso si prevede un sistema di trasmissione con cinghia, ma come detto in precedenza, è possibile prevedere anche un sistema di ruote dentate.

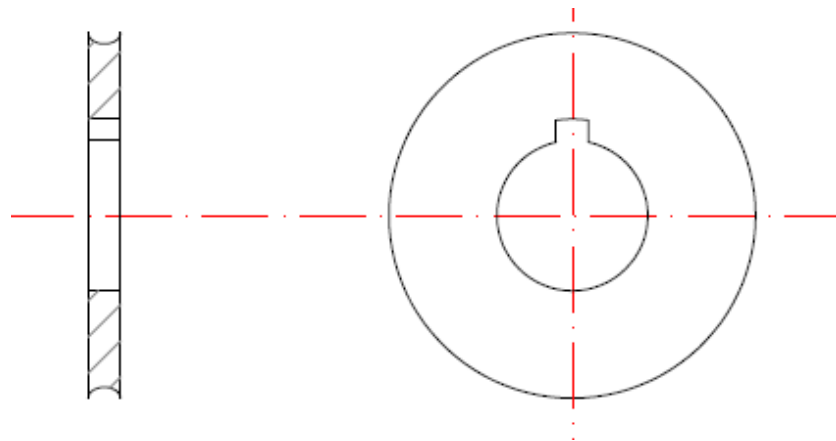


Figura 2.9. Puleggia per la trasmissione del moto all'albero dal motore disassato.

2.2.3 Sistema complessivo e considerazioni

Nei paragrafi precedenti sono stati analizzati i pezzi singolarmente e i meccanismi che permettono ad essi di interagire, in questo paragrafo viene fornita una visione di insieme del progetto e vengono definiti pro e contro dello stesso.

Il montaggio del dispositivo (fig. 2.10) avviene facendo scorrere sull'albero motore il blocco agitatore e sfilando verso l'esterno l'inserito di entrata medium, il quale ha una dimensione tale che la superficie esposta verso l'esterno in questa fase non viene mai a diretto contatto con l'interno del bioreattore in modo da garantire la sterilità. L'albero di coltura viene incastrato all'albero motore con l'accoppiamento conico e viene fissato all'altra estremità spostando l'inserito per l'entrata del medium. Facendo scorrere infine il blocco agitatore sull'albero di coltura in modo da fissare stabilmente i due alberi, l'assemblaggio è completato.

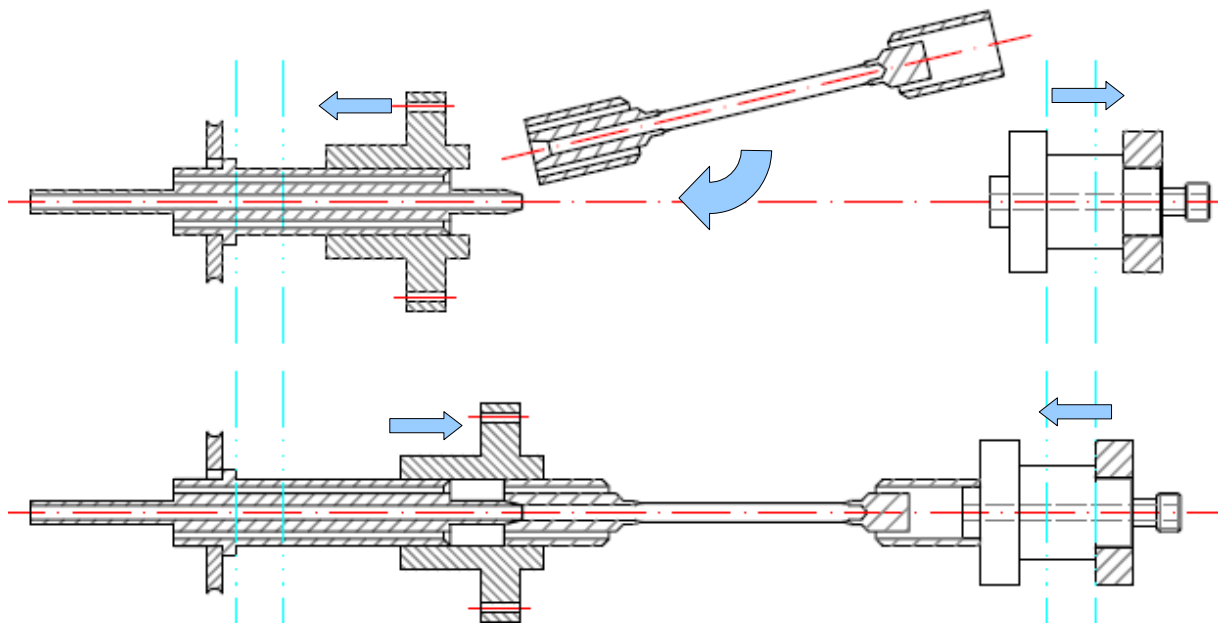


Figura 2.10. Schema di montaggio del bioreattore.

Il sistema qui descritto soddisfa quasi tutti i requisiti che ci siamo prefissati inizialmente:

- permette l'accoppiamento del bioreattore con il circuito di perfusione generando un flusso parallelo all'asse del costruito tubolare;
- garantisce un circuito dell'aria interno in grado di effettuare scambi di massa con il lume dello scaffold pur rimanendo isolato dal medium;
- permette l'isolamento dei due terreni (interno ed esterno) impedendo la contaminazione fra di essi;
- ha un contenuto volume di priming poiché sfrutta la stessa camera di coltura del bioreattore precedente;
- permette la libera rotazione assiale del sistema e garantisce il rimescolamento del medium esterno;
- si avvale dell'ottima ossigenazione della superficie esterna dello scaffold come nel precedente bioreattore.

Questo progetto tuttavia presenta anche dei contro e delle criticità non

trascurabili:

- l'accoppiamento fra i due alberi è critico sia per la trasmissione del moto sia per la tenuta del sistema poiché si devono mantenere isolati 3 ambienti differenti;
- la membrana ossigenante è difficilmente applicabile ed è critica per l'isolamento tra circuito dell'aria e flusso di medium interno;
- il bioreattore non è utilizzabile per la semina del costrutto o comunque il passaggio da semina a perfusione necessita dell'apertura della camera non rispettando un requisito enunciato all'inizio;
- il disassamento del motore rende inutilizzabile il sistema complementare di cui si avvaleva il bioreattore di partenza poiché necessita di collegamenti geometricamente differenti, violando il requisito voluto di utilizzare il sistema di attuazione e controllo già a disposizione.

Alla luce delle considerazioni appena enunciate è stato sviluppato un secondo progetto mantenendo le soluzioni tecnologiche positive del primo e cercando di risolvere i problemi e le criticità che lo stesso presentava.

2.3 Secondo progetto: camera di raccolta interna

Nello sviluppo del secondo progetto si è tenuto conto della soluzione con cui è stato risolto il problema del flusso assiale nel primo, tentando di mantenerla invariata in quanto si è dimostrata adeguata. Le nuove idee proposte possono essere riassunte in tre obiettivi:

- realizzazione di una camera di raccolta interna mantenendo quindi invariate le dimensioni di ingombro totale del bioreattore;
- possibilità di variare la configurazione del bioreattore da semina a perfusione intervenendo dall'esterno dello stesso;
- non disassare il motore, in modo da poter utilizzare il sistema ausiliario di supporto del bioreattore di partenza.

2.3.1 Camera di raccolta interna

La decisione di sviluppare una camera di raccolta interna e non esterna del medium passante per il lume del costrutto, oltre ad avere il vantaggio già enunciato di mantenere invariate le dimensioni complessive del bioreattore, presenta anche due ulteriori punti di forza:

- possibilità di raccogliere il medium direttamente in uscita dall'albero di coltura, in modo da ovviare al problema legato alla criticità della tenuta nel punto di accoppiamento tra i due alberi;
- diminuzione del volume di priming esterno, in quanto vengono creati due compartimenti separati.

La nuova camera di coltura (fig. 2.11), ricalca il profilo interno di quella del bioreattore di partenza per quanto riguarda il compartimento dove è posto il costrutto, mentre il compartimento di raccolta ha un profilo atto a convogliare il medium in un

foro alla base dello stesso, con l'obiettivo di prelevare il terreno in uscita dall'albero e re – immetterlo nel circuito di perfusione.

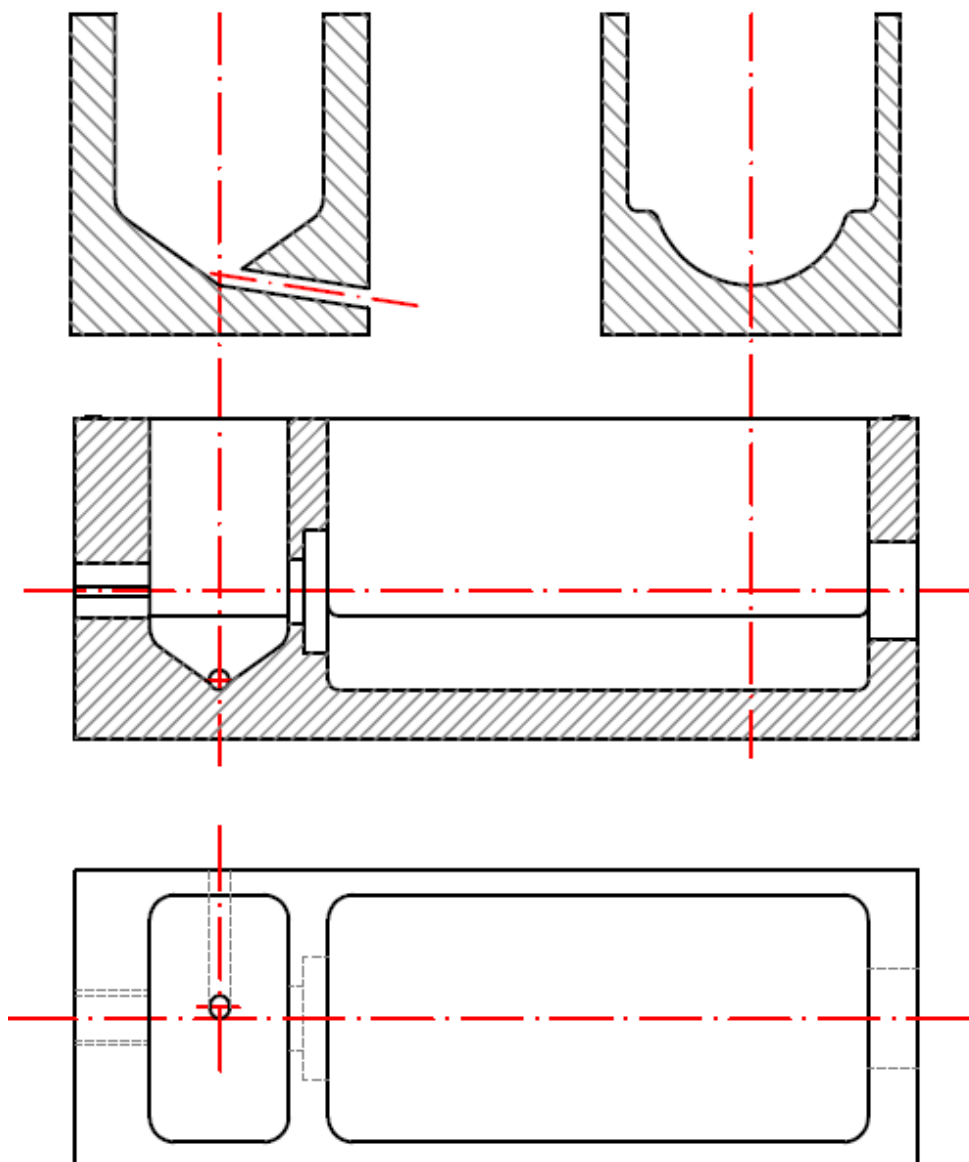


Figura 2.11. Disegno della nuova camera di coltura a due compartimenti. Il compartimento a destra contiene l'albero di coltura ed ha un profilo che ricalca quello del bioreattore di partenza. Il compartimento a sinistra raccoglie il medium in uscita dall'albero e lo convoglia in un foro sul fondo per re – immetterlo nel circuito di perfusione.

Come nel caso del primo progetto, mantenendo un profilo dell'albero di coltura

analogo, l'immissione del medium all'interno del lume avviene con lo stesso meccanismo già descritto nel precedente paragrafo e prevede un inserto alla camera a sinistra della figura 2.11.

Il moto rotatorio è trasmesso dall'albero motore all'albero di coltura tramite in accoppiamento a dente simile a quello del bioreattore di partenza, senza la necessità di un motore disassato. L'albero di coltura si inserisce sul setto di separazione tra le due camere interne poggiando su una guarnizione che aiuta a mantenere la tenuta ed ad impedire il mescolamento dei due medium (fig. 2.12).

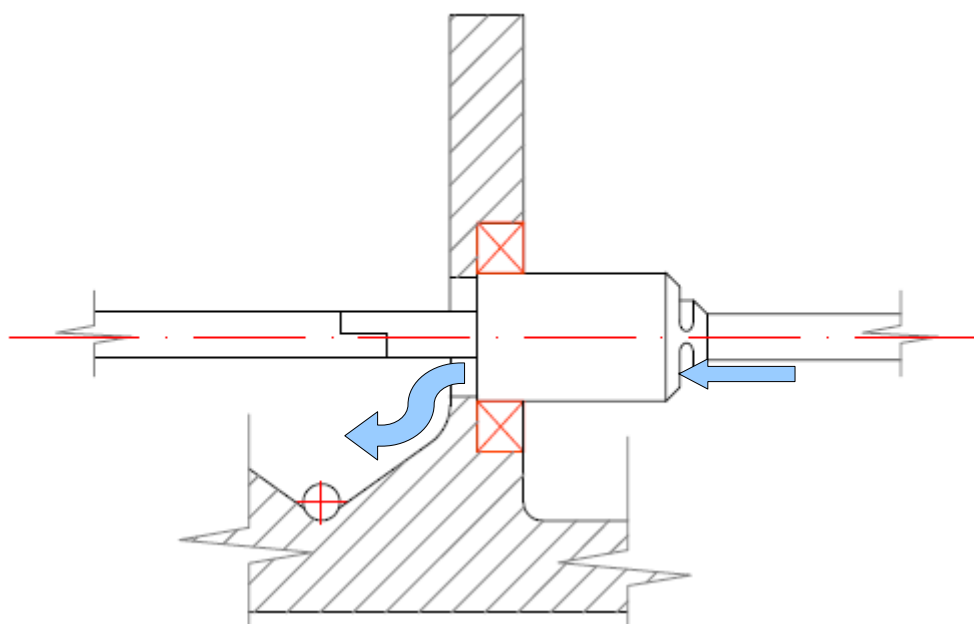


Figura 2.12. L'albero di coltura (moncone a destra) si inserisce sul setto di separazione poggiando su una guarnizione di tenuta e si accoppia con un dente all'albero motore (moncone a sinistra). Il medium fluisce dall'albero di coltura alla camera di raccolta (freccie blu) per poi essere re-immesso nel circuito di perfusione.

Il meccanismo di trasmissione del moto rotatorio ed il setto di separazione, impediscono la presenza di un inserto che possa portare gli agitatori per il medium esterno, per questo motivo ne è stata prevista la presenza direttamente sull'albero di coltura (fig. 2.13 alto). Il progetto prevede degli agitatori composti da barrette metalliche incastrate sull'estremità a destra dell'albero, posti in fori non passanti e

removibili per facilitare il montaggio dello scaffold. L'albero motore (fig. 2.13 basso) possiede una forma analoga a quello del bioreattore di partenza, con l'obiettivo di rendere il sistema perfettamente compatibile con la base di supporto che monta il motore.

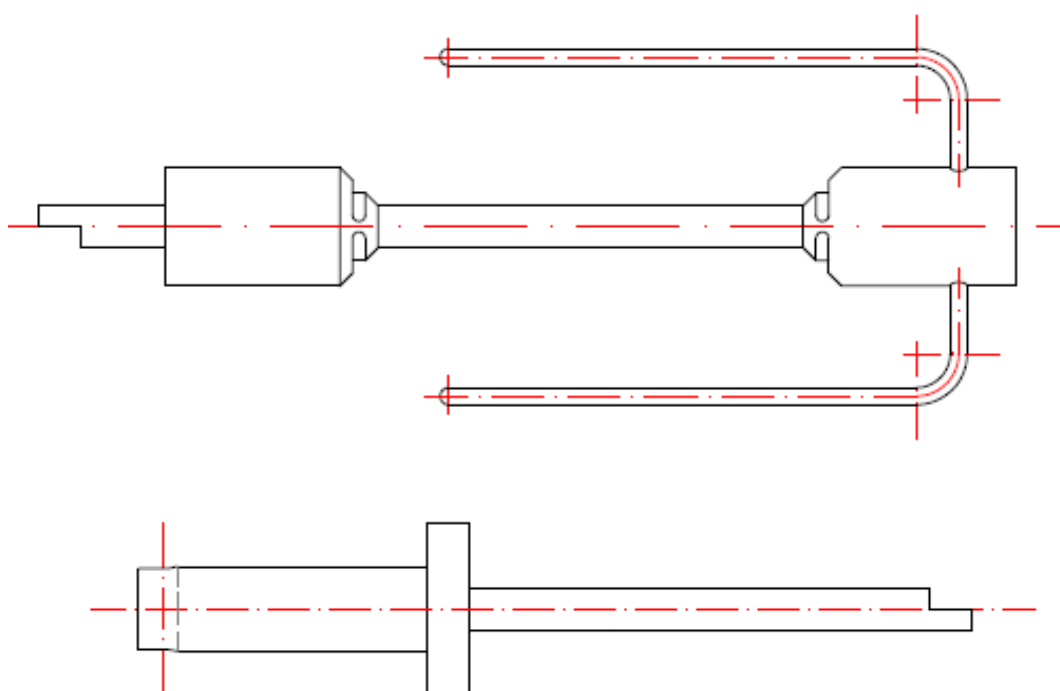


Figura 2.13. Albero di coltura (in alto) con incastrati gli agitatori per il medium esterno. Albero motore (in basso) di forma analoga a quella del bioreattore di partenza in modo da renderlo compatibile con la base di supporto.

Per quanto riguarda i materiali, per la camera si propone il PSU od il PC in quanto si sono già dimostrati adatti all'impiego nei bioreattori presentati nel capitolo 1. Gli inserti lato entrata medium e lato motore (presentato nel prossimo paragrafo), possono essere realizzati in Teflon® in quanto garantisce una buona tenuta come già visto per il bioreattore per la trachea. Per l'albero di coltura si prevede il PEEK in quanto assicura un ottimo supporto al costruito e possiede le adeguate caratteristiche biochimiche per entrare a diretto contatto con il costruito. Per ultimo, l'albero motore che già condivide una forma analoga a quello del bioreattore di partenza, può condividerne anche i materiali di cui è costituito, pertanto acciaio per la parte che si

accoppia con l'albero di coltura e Teflon® per il resto.

2.3.2 Insetto lato motore

L'insetto lato motore è la vera novità di questo secondo progetto ed ha tre principali funzioni:

- rendere stabile l'accoppiamento tra i due alberi analogamente al blocco agitatore del bioreattore di partenza;
- permettere di passare dalla configurazione di semina a quella di flusso agendo dall'esterno della camera;
- si inserisce nella parete della camera e permette l'ingresso dell'albero motore nel bioreattore mantenendo la sterilità.

Il componente (fig. 2.14) è costituito da due pezzi separati, uniti da un accoppiamento filettato. La sezione presenta un foro centrale che permette l'alloggiamento dell'albero motore. Sulla superficie esterna sono presenti due scanalature che si inseriscono su due binari presenti nella parete della camera, con l'obiettivo di impedirne l'eventuale rotazione dovuta al trascinarsi dell'albero motore.

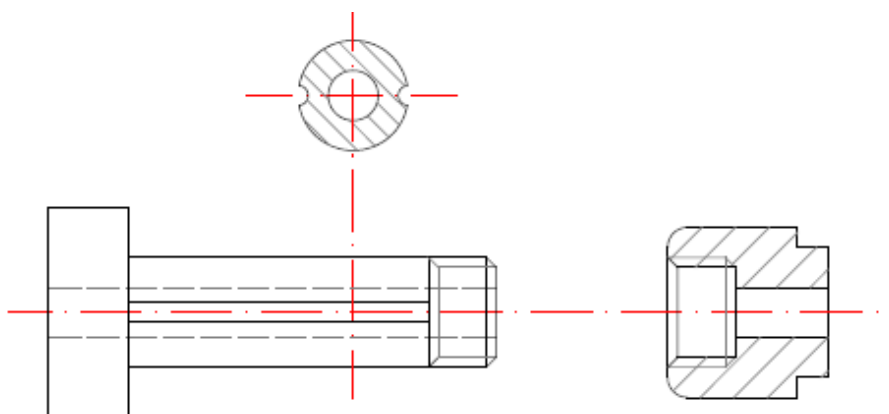


Figura 2.14. Insetto lato motore, composto da due pezzi uniti con un accoppiamento filettato. Il foro al centro della sezione permette l'alloggiamento dell'albero motore, le due scanalature all'esterno impediscono la rotazione.

L'inserto è in grado di compiere movimenti assiali gestibili dall'esterno, con l'obiettivo di permettere od impedire la fuoriuscita del medium dall'albero di coltura, passando così dalla fase di semina a quella di flusso senza la necessità di aprire il bioreattore. La parete della camera ha una dimensione adatta ad impedire che la superficie dell'inserto all'esterno del bioreattore possa ritrovarsi all'interno dopo un movimento assiale, in modo da garantirne la sterilità. In figura 2.15 sono mostrate le tre principali posizioni che l'inserto può assumere nel bioreattore.

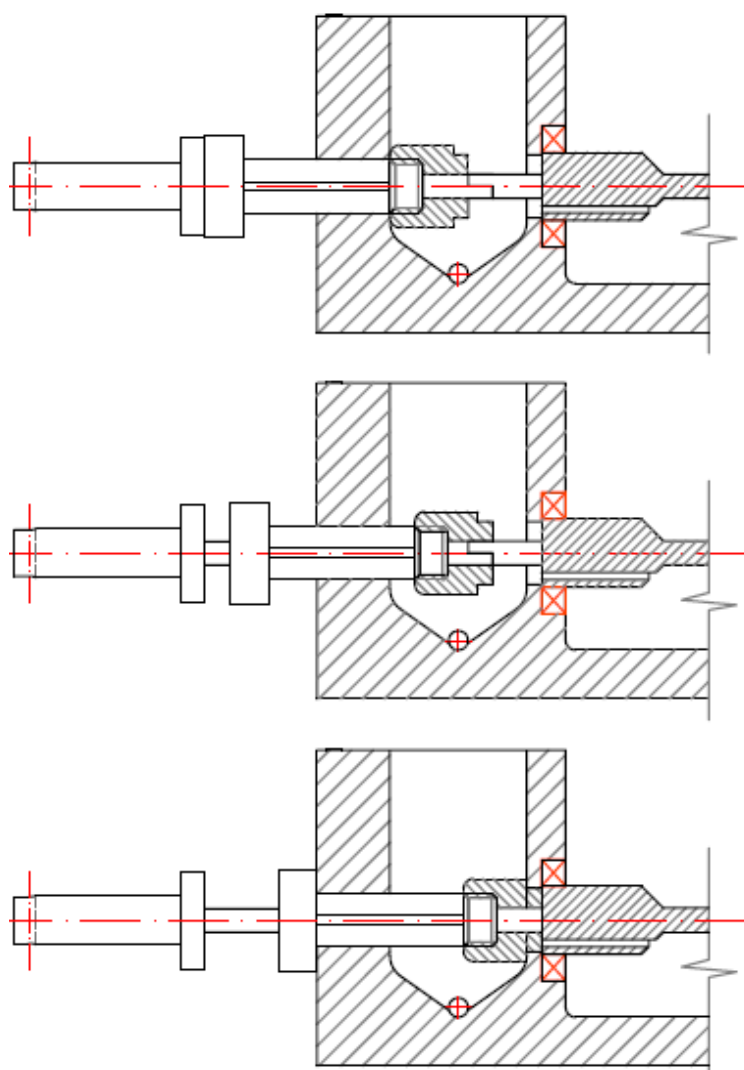


Figura 2.15. Le tre principali posizioni dell'inserto lato motore: in alto l'inserto è a fine corsa verso sinistra durante la fase di montaggio; al centro è in una posizione intermedia che permette il flusso; in basso è a fine corsa verso destra ed occlude i canali di uscita dell'albero di coltura.

Come appena detto l'inserito può assumere tre principali posizioni, visibili in figura 2.15, ognuna con una particolare funzione:

- la posizione a fine corsa verso sinistra permette l'accoppiamento tra i due alberi, questo avviene in fase di montaggio del bioreattore ed in qualsiasi altra situazione che preveda la rimozione dell'albero di coltura;
- la posizione intermedia garantisce il mantenimento dell'accoppiamento tra i due alberi e permette la perfusione;
- la posizione a fine corsa verso destra chiude i canali di uscita del medium sull'albero di coltura, in modo da contenere il medium all'interno del lume dello scaffold e permettere quindi la semina.

La posizione dell'inserito è modificata direttamente dall'operatore agendo sulla parte esterna al bioreattore, raggiungendo uno degli obiettivi che sono stati assunti all'inizio del secondo progetto.

2.3.3 Sistema complessivo e considerazioni

Con questo secondo progetto sono stati realizzati tutti e tre gli obiettivi che sono stati palesati all'inizio, riducendo quindi i rischi di contaminazione della coltura ed adattandolo al sistema ausiliario del bioreattore di partenza, pur mantenendo le innovazioni introdotte dal primo progetto.

In figura 2.16 viene mostrato come avviene il montaggio che può essere diviso in tre fasi:

- nella prima fase vengono montati sulle pareti della camera i due inserti a destra ed a sinistra, composti entrambi da due parti, unite con un accoppiamento filettato e viene inserito l'albero motore nel foro al centro dell'inserito lato motore;
- nella seconda fase, gli inserti vengono posti a fine corsa verso l'esterno e viene inserito l'albero di coltura che andrà a poggiare sulla guarnizione presente nel

setto e si accoppierà con l'albero motore;

- nell'ultima fase, l'inserto a sinistra viene portato a fine corsa verso l'interno, bloccando i movimenti assiali dell'albero di coltura e l'inserto lato motore viene posto nella posizione intermedia od a fine corsa verso l'interno, a seconda se si desidera la configurazione di perfusione o quella di semina.

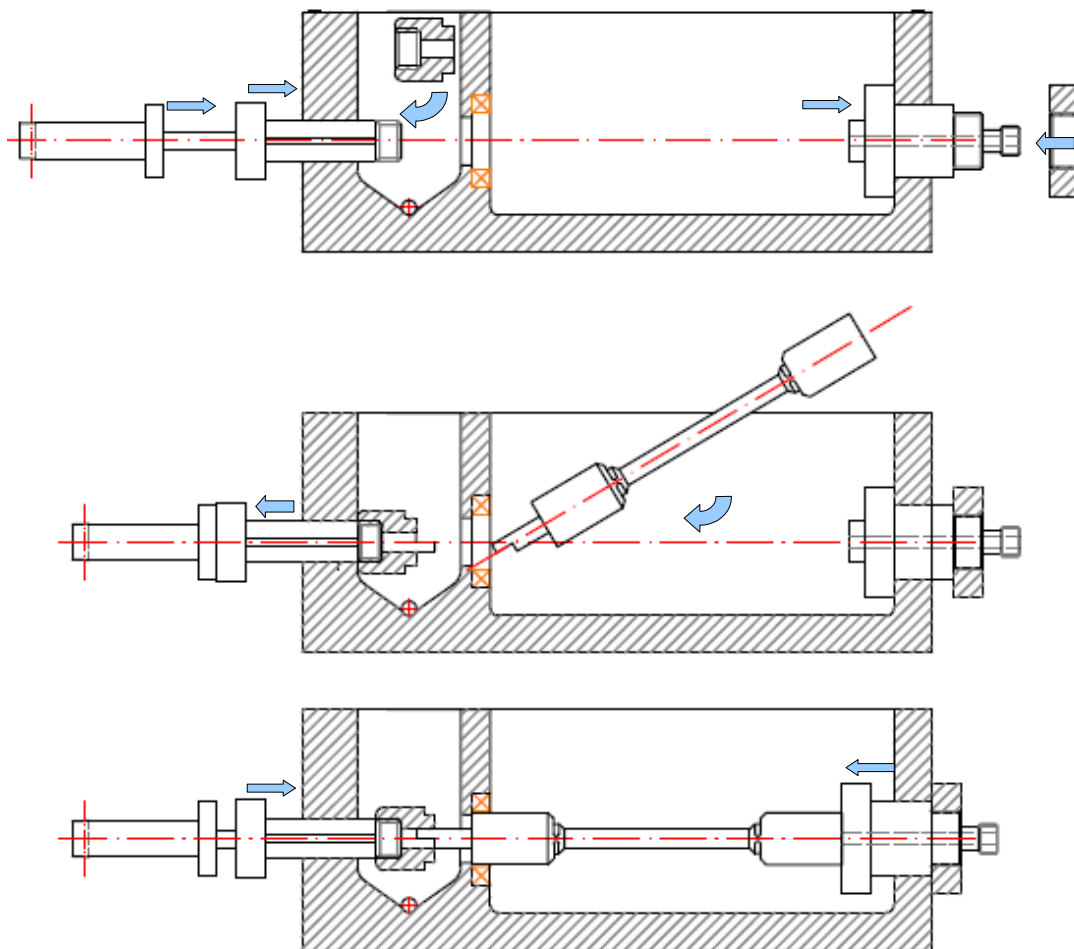


Figura 2.16. Montaggio del bioreattore. Nella prima fase (in alto) vengono montati i due inserti e viene inserito l'albero motore; nella seconda fase (al centro) è inserito l'albero di coltura; nella terza fase (in basso) viene fissato l'albero di coltura agendo sui due inserti.

Possiamo ora fare un quadro generale dei vantaggi e svantaggi che caratterizzano questo bioreattore, alcuni sono in comune con quello presentato nel primo progetto o con quello di partenza, altri sono invece intrinseci e ricercati all'inizio

del progetto.

Vantaggi:

- accoppiamento del bioreattore con il circuito di perfusione con generazione di un flusso parallelo all'asse del costruito;
- permette l'impiego di due medium di coltura (interno ed esterno) impedendo il mescolamento degli stessi;
- riduzione ulteriore del volume di priming per quanto riguarda la camera di coltura;
- permette la libera rotazione assiale del sistema e garantisce il rimescolamento del medium esterno;
- ossigenazione ottimale grazie al contatto diretto delle cellule con l'aria durante la rotazione;
- non necessita di disassamento del motore;
- permette di cambiare la configurazione del bioreattore (da semina a flusso e viceversa) agendo dall'esterno della camera e quindi non mettendo a rischio la sterilità;
- dimensioni esterne identiche a quelle del bioreattore di partenza che rendono quindi utilizzabile la base di supporto.

Svantaggi:

- tenuta critica a livello del setto nel punto in cui si inserisce l'albero di coltura, con possibilità di contaminazione fra i terreni;
- montaggio del sistema complesso in quanto prevede alcune operazioni dirette all'interno della camera;
- assenza di un circuito interno dell'aria.

In sede di lavorazione dei singoli componenti del dispositivo, si possono trovare difficoltà nel realizzare la camera di coltura, sia per ricavare i settori interni, visti gli spazi ristretti e la complessità geometrica, sia per la realizzazione del foro e della sede per la guarnizione sul setto di separazione. Anche la lavorazione dei fori assiali

sull'albero di coltura può risultare piuttosto critica, a causa della posizione e del complesso profilo.

In sede di assemblaggio del dispositivo, il montaggio dell'albero di coltura potrebbe risultare complesso data la presenza dello scaffold e degli agitatori, che devono essere posizionati con precisione nel ristretto spazio della camera, cercando di non compromettere la sterilità della stessa.

Nonostante le criticità appena enunciate, questo bioreattore presenta innumerevoli vantaggi in più rispetto a quello descritto nel primo progetto ed appare molto più adeguato per l'impiego in un laboratorio di ricerca.

Nel prossimo paragrafo verrà presentato un terzo progetto concettualmente identico a questo, ma atto a introdurre alcune alternative ed a modificare la camera del bioreattore di partenza in modo da poterla utilizzare al posto di una camera completamente nuova.

2.4 Terzo progetto: modifiche albero e camera

Il terzo progetto è in realtà una modifica di quello appena presentato ed ha due obiettivi:

- creazione di un albero di coltura alternativo che preveda un circuito dell'aria;
- modificare la camera di coltura del bioreattore di partenza, in modo che possa essere utilizzata per la creazione di un dispositivo analogo a quello presentato nel precedente paragrafo.

2.4.1 Modifica all'albero di coltura

Come enunciato nel primo obiettivo, si vuole ricercare una soluzione tecnologica che permetta di implementare un circuito interno dell'aria anche nel bioreattore presentato nel secondo progetto. L'idea è quella di progettare un albero di coltura intercambiabile con quello già descritto, in modo da fornire due alternative e permettere all'operatore di scegliere quella che più si adatta allo specifico contesto.

Oltre al circuito dell'aria, questo nuovo albero deve possedere altre caratteristiche generali:

- deve mantenere l'isolamento tra il circuito dell'aria ed il medium;
- deve avere un ingombro tale da poter essere alloggiato nella camera;
- deve avere gli accoppiamenti sulle due estremità identici a quelli dell'albero presentato nel secondo progetto, in modo da permettere il corretto assemblaggio con gli altri componenti;
- deve possedere un sistema di agitazione del medium esterno.

Come nel caso del primo progetto, il circuito dell'aria consiste in un foro assiale all'interno dell'albero di coltura messo a contatto con il lume dello scaffold tramite due fori allungati opposti che corrono lungo lo stelo. Il problema più complesso da risolvere

è come mettere a contatto questo canale con l'atmosfera esterna. Appare chiaro da subito che la soluzione non può essere analoga a quella del primo progetto, in quanto non c'è modo di prolungare il canale anche all'interno dell'albero motore e metterlo in comunicazione con l'esterno, sia per un problema di dimensioni ed accoppiamenti, sia per il fatto che non si vogliono apportare modifiche ad altri componenti eccetto l'albero di coltura.

Una volta esclusa la possibilità di mettere a contatto il circuito interno dell'aria direttamente con l'atmosfera dell'incubatore, si è cercata una soluzione per metterlo in comunicazione l'interno della camera. In figura 2.17 è mostrata la soluzione proposta.

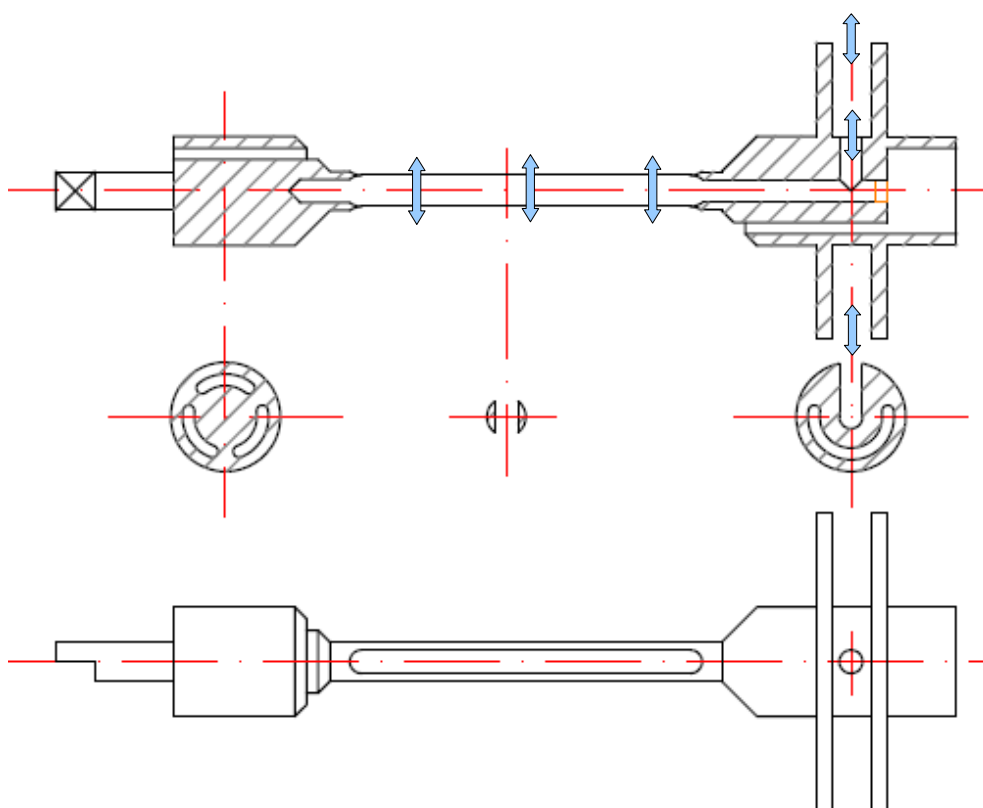


Figura 2.17. Albero con circuito interno dell'aria.

Il canale interno allo stelo è messo in comunicazione con l'atmosfera interna alla camera di coltura tramite un foro aperto in un intercapedine formata su due alette circolari solidali con l'albero di coltura. Alle estremità di queste corone circolari è posta una membrana ossigenante come quella che ricopre i due fori sullo stelo. La sezione di

uscita del medium è identica a quella dei due alberi già descritti, mentre quella di entrata è differente a causa della presenza del foro radiale tra le due alette.

Data la forma delle alette, è possibile ricavare due fori paralleli all'asse dell'albero in cui possono essere inseriti gli agitatori per il medium esterno. Analogamente a come già detto nel secondo progetto, le barrette metalliche devono essere removibili dall'operatore, per facilitare le operazioni di montaggio dello scaffold. La forma e le dimensioni di questo albero lo rendono perfettamente compatibile con tutti gli altri componenti del bioreattore.

2.4.2 Modifiche alla camera di coltura

Il secondo obiettivo di questo paragrafo è quello di ipotizzare delle modifiche alla camera di coltura del bioreattore di partenza in modo da renderlo analogo a quello presentato nel secondo progetto.

Il primo problema da affrontare è la divisione della camera in due settori separati, che deve essere realizzata evidentemente con l'interposizione di un setto. Il setto andrà ad alloggiare poi in un'opportuna sede ricavata nella camera.

L'idea è quella di creare un setto che possa incastrarsi stabilmente ma essere anche facilmente removibile, pertanto si è deciso che debba avere un accoppiamento rastremato con la sede. In figura 2.18 è mostrata la forma che dovrebbe avere il setto.

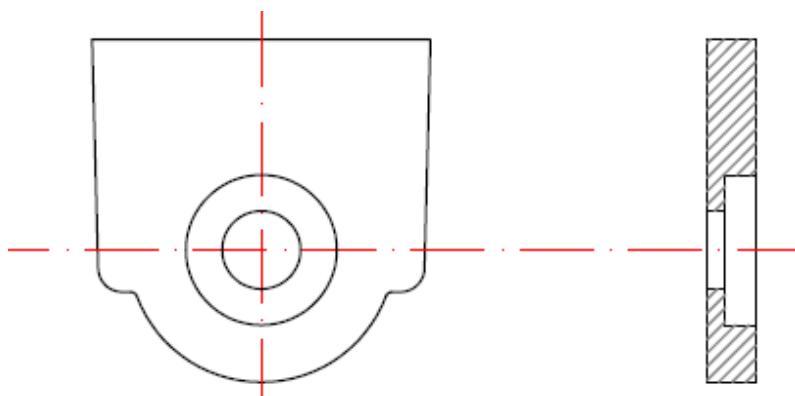


Figura 2.18. Setto di separazione per la camera modificata.

Il profilo del setto ricalca quello della camera di coltura e presenta, come già detto, le superfici laterali rastremate per favorire l'incastro stabile. Sono presenti inoltre due fori concentrici di cui uno passante, per permettere l'alloggiamento della guarnizione e dell'albero di coltura, analogamente a come è previsto per il secondo progetto.

Per quanto riguarda il materiale di cui dovrebbe essere costituito il setto ci sono due alternative: polimero rigido o silicone. Nel caso del polimero rigido, come ad esempio il PSU od il PC, i vantaggi sarebbero sicuramente un adeguato supporto al sistema ed una stabilità nel tempo, tuttavia per garantire la tenuta tra le due camere sarebbe richiesta l'interposizione di un materiale che funga da guarnizione tra il setto e la camera, poiché l'interfaccia rigida dei due componenti non è in grado di impedire infiltrazioni. Nel caso invece di un polimero siliconico come il PDMS (polidimetilsilossano), si possono identificare i seguenti vantaggi:

- adeguata tenuta senza l'interposizione di un terzo materiale, in quanto il PDMS può adattarsi alle microasperità della camera impedendo le infiltrazioni;
- rigidità sufficiente per garantire un adeguato supporto al sistema;
- lavorabilità in stampi con la possibilità di ottenere geometrie complesse;
- adeguata stabilità nel tempo.

Oltre alle caratteristiche appena enunciate si possono annoverare anche un'ottima inerzia chimica e biologica, nonché un largo impiego a contatto con i sistemi biologici in quanto possiede la certificazione Medical Grade. Il più grande svantaggio di questo polimero è un transitorio non trascurabile, ma compensabile, in autoclave che rende quindi necessaria un'attenta progettazione del componente.

Come già detto all'inizio del paragrafo, nella camera di coltura deve essere realizzata una sede nella quale viene alloggiato il setto di separazione. Questa sede viene creata con una asportazione di materiale all'interno della camera seguendo un profilo analogo a quello del setto. Viene inoltre ricavato un foro sul fondo del settore più piccolo per permettere l'uscita del medium e la successiva re – immissione nel circuito

di perfusione (fig. 2.19).

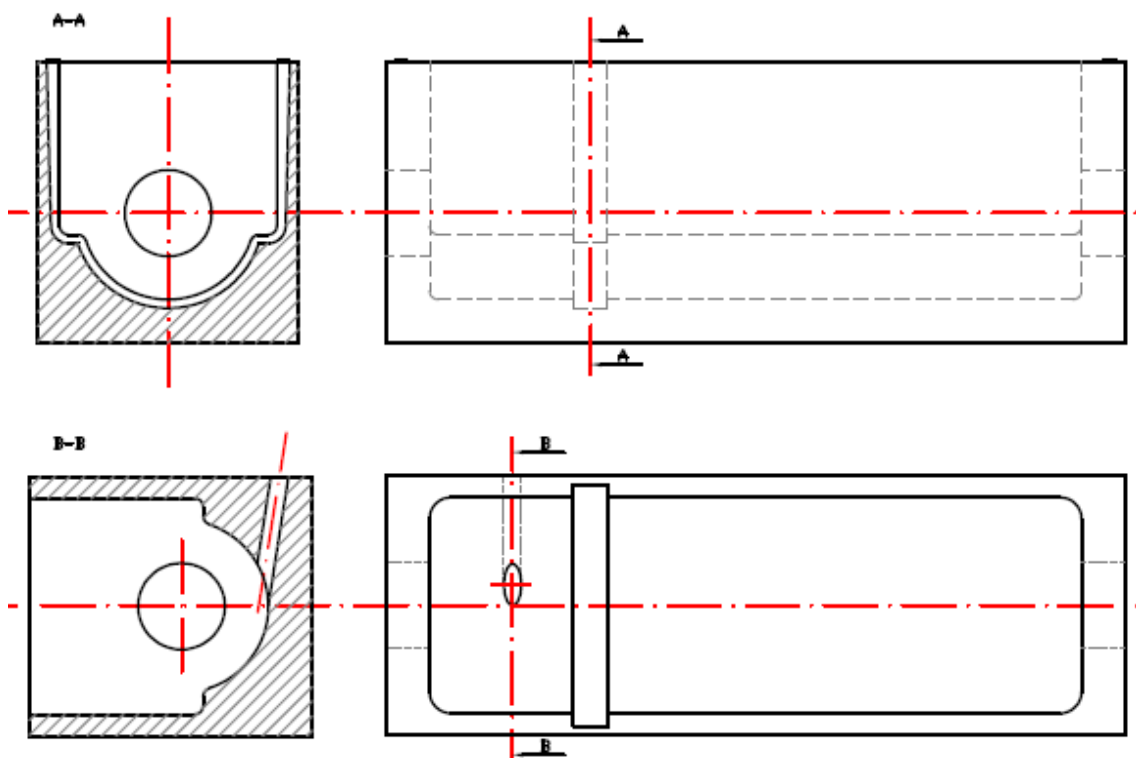


Figura 2.19. Modifica alla camera di coltura: sono visibili la sede per il setto ed il foro nel settore a sinistra, che permette l'immissione del medium uscente dall'albero nel circuito di perfusione.

Per quanto riguarda i componenti interni alla camera, i due alberi e l'inserto sul lato destro (quello per l'entrata del medium), sono perfettamente compatibili con questa camera, mentre l'inserto lato motore non risulta utilizzabile e pertanto deve essere riprogettato in modo adeguato.

Siccome la parete a sinistra della camera ha uno spessore minore rispetto a quella del bioreattore presentato nel secondo progetto, la corsa assiale che può compiere l'inserto lato motore è minore, sempre in virtù del principio che la superficie esterna non può ritrovarsi all'interno dopo lo spostamento dello stesso, per garantire la sterilità. Questa considerazione comporta al fatto che l'inserto può assumere solo due posizioni: una di flusso e una di semina. La conseguenza è che l'albero di coltura deve inserirsi all'interno dell'inserto per accoppiarsi con l'albero motore, ma questa difficoltà nel

montaggio è mitigata dalla presenza del setto mobile, come sarà più chiaro nel prossimo paragrafo.

In figura 2.20 è mostrato l'inserto lato motore, si noti la forma analoga a quello presentato nel secondo progetto.

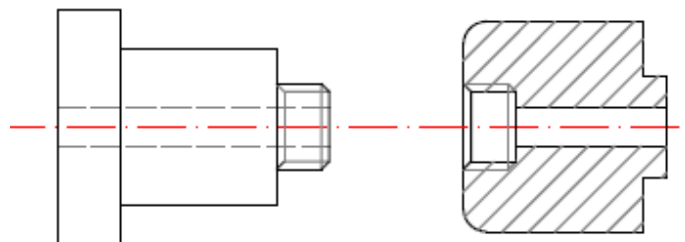


Figura 2.20. Inserto lato motore, composto da due pezzi separati che si uniscono con un accoppiamento filettato; è visibile il canale interno in cui si inserisce l'albero motore.

Anche in questo caso, l'inserto è composto da due elementi separati che vengono uniti con un accoppiamento filettato in sede di montaggio. Da notare che il filetto deve avere la direzione di serraggio nello stesso verso del moto rotatorio dell'albero, in modo da impedire un disaccoppiamento dei due elementi durante la coltura.

2.4.3 Sistema complessivo e considerazioni

La compatibilità dell'albero di coltura descritto nel precedente paragrafo fa sì che il montaggio dello stesso sia esattamente equivalente a quello presentato nel secondo progetto, pertanto costituisce una perfetta alternativa a quella descritta precedentemente.

Per quanto riguarda la camera modificata, l'impiego del setto mobile e del nuovo inserto lato motore, comporta un meccanismo di montaggio ben diverso che può essere riassunto in tre passi principali (fig. 2.21):

- in primo luogo vengono montati i due inserti avvitando le parti filettate e viene inserito l'albero motore, in questo caso il montaggio dell'inserto lato motore risulta facilitato dall'assenza del setto;

- successivamente viene posto in sede il setto insieme all'albero di coltura già parzialmente inserito nel foro, che poi scorrerà fino ad accoppiarsi con l'albero motore all'interno dell'inserto a sinistra;
- per ultimo viene fatto scorrere l'inserto a destra in modo da bloccare il sistema.

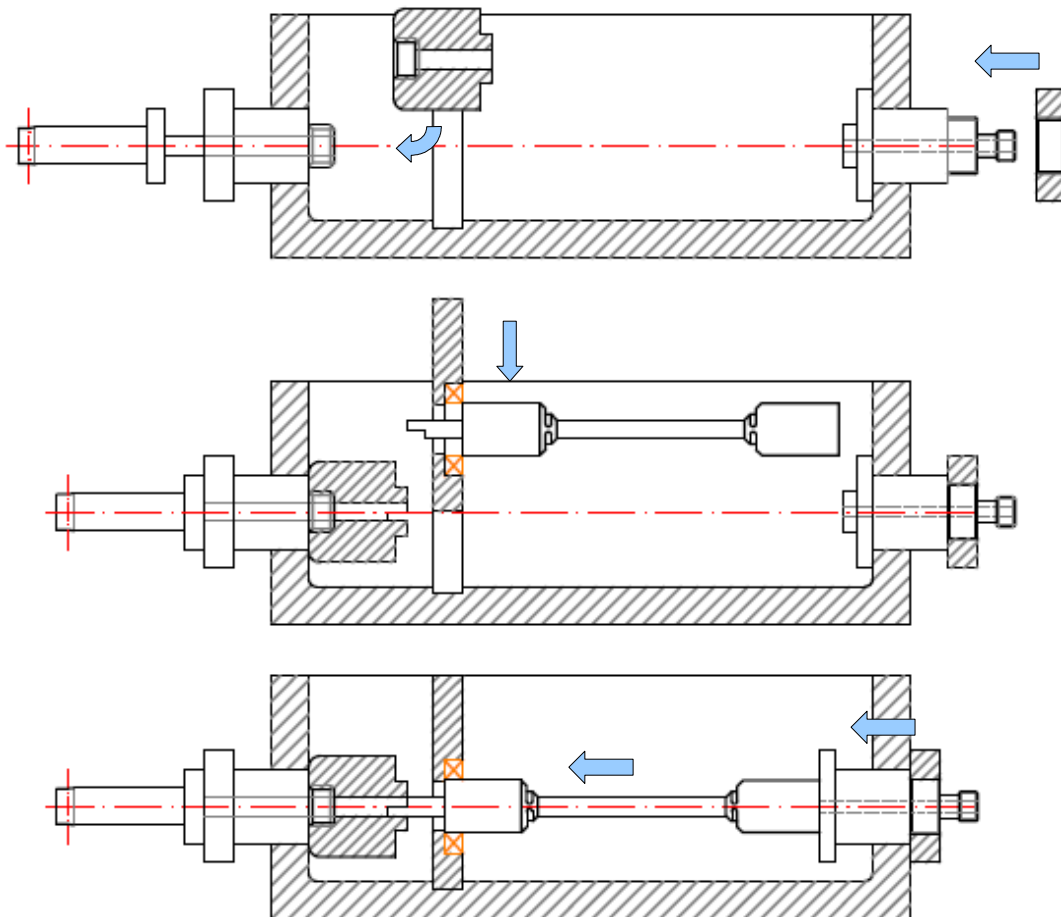


Figura 2.21. Montaggio del bioreattore: vengono inseriti ed assemblati gli inserti (in alto); viene inserito successivamente il setto e l'albero di coltura (al centro); lo spostamento assiale dell'inserto a destra permette il bloccaggio del sistema.

Il bioreattore così progettato mantiene i vantaggi caratterizzanti quello presentato nel secondo progetto, ma in più possiamo identificare i seguenti:

- praticità di montaggio dovuta al setto mobile;
- intercambiabilità degli alberi di coltura, con o senza circuito interno dell'aria;

- utilizzo di una camera di coltura già esistente.

Come è emerso durante questo paragrafo uno dei principali svantaggi è la criticità dell'isolamento tra i due terreni a livello del setto, che può essere tuttavia garantita da una corretta progettazione dimensionale e da un materiale adeguato.

Alla luce di queste considerazioni appare quindi chiara l'equivalenza dei due bioreattori, pertanto si potrebbe ipotizzare un test di coltura su camera modificata per evidenziare ulteriori vantaggi, svantaggi e criticità, oltre che per documentare l'effetto che il flusso intraluminale ha sulle cellule endoteliali della trachea. Se questi test risultassero soddisfacenti può essere prevista la realizzazione della camera presentata nel secondo progetto, che nel complesso presenta meno criticità.

Un'altra importante valutazione che deve essere fatta è l'efficacia della sezione di passaggio del medium interno che, data la sua particolare forma e la rotazione attorno all'asse, rende complesso lo studio fluidodinamico e l'implementazione di un corretto modello computazionale.

Cap. 3: Dimensionamento del sistema di perfusione

3.1 Lunghezza dei tubi ossigenanti

Uno degli aspetti critici di un bioreattore, è garantire un'ossigenazione adeguata al costruito, in modo da evitare l'insorgere di problemi legati ad una cattiva ossigenazione come la morte cellulare o la crescita disomogenea del tessuto (Martin I et al., 1999). Parallelamente all'ossigenazione, un bioreattore dovrebbe garantire un efficace trasporto di metaboliti e cataboliti poiché anch'essi sono fortemente responsabili del corretto sviluppo del costruito (Martin I et al., 1999).

Qui di seguito viene descritto un modello in grado di dimensionare i tubi ossigenanti in modo da garantire un adeguato apporto di ossigeno al costruito (David E. Orr et al., 2008).

Semplificando il sistema (fig. 3.1), è possibile identificare 3 stadi nei quali avviene uno scambio gassoso. Il primo stadio è la camera di coltura, nella quale il medium cede ossigeno al costruito e assorbe l'anidride carbonica prodotta dalle cellule. Il secondo stadio sono i tubi ossigenanti, mentre il terzo è il reservoir, nei quali il medium si arricchisce di ossigeno attuando uno scambio gassoso con l'atmosfera dell'incubatore. In questi due casi lo scambio avviene tramite la parete dei tubi e tramite il pelo libero del reservoir, il quale essendo di piccolissima entità si è deciso di

trascurarlo.

L'ossigeno gassoso nell'atmosfera dell'incubatore si considera costante, mentre quello disciolto nel medium si incrementa lungo la lunghezza Δx nel verso del flusso di medium (fig. 3.1).

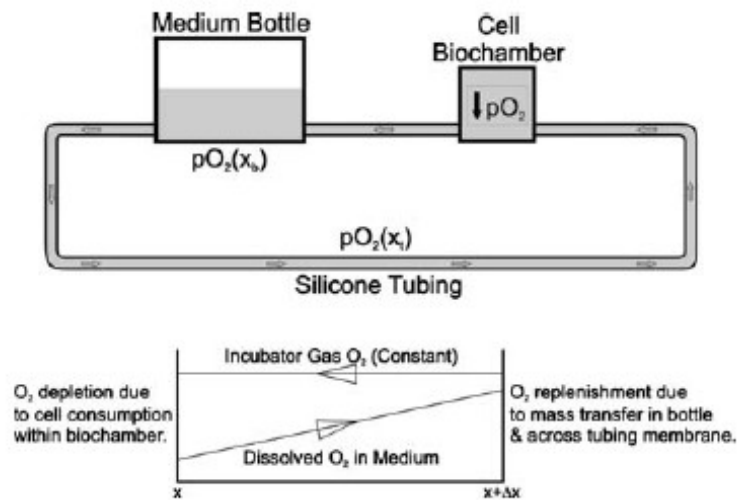


Figura 3.1: Schema semplificato degli scambi gassosi nel sistema.

Il bilancio del sistema è in primo luogo ridotto ad un bilancio di ossigeno entrante ed ossigeno uscente:

$$\text{Rate of } O_2 \text{ IN} - \text{Rate of } O_2 \text{ OUT} \quad (1.1)$$

$$\left(\frac{Q}{H_{oss}} pO_2(x) + N_{Avg}\right) - \left(\frac{Q}{H_{oss}} pO_2(x + \delta x)\right) = 0 \quad (1.2)$$

Viene usata la legge di Henry per correlare la pressione parziale dell'ossigeno pO_2 , con la concentrazione di ossigeno disciolto nel medium C_{oss} :

$$pO_2 = H_{oss} C_{oss} \quad (1.3)$$

Il valore della costante di Henry per il plasma sanguigno a 37°C è pari a 0.74 mmHg/ μ M e viene assunta tale anche per il medium vista la composizione analoga.

Il trasporto volumetrico dell'ossigeno attraverso la parete di silicone del tubo N_{Avg} , è generato dalla differenza di pressione parziale di ossigeno tra quella costante nell'atmosfera dell'incubatore pO_2° e quella del medium nel punto considerato $pO_2(x_t)$. La pressione parziale dell'ossigeno nel medium varia con la lunghezza del tubo x_t e viene considerata come la rappresentazione della media radiale nella sezione trasversale interna del tubo. L'area della parete del tubo viene calcolata come la media logaritmica delle circonferenze intera ed esterna del tubo, W .

$$W = \frac{\pi(d_o - d_i)}{\ln\left(\frac{d_o}{d_i}\right)} \quad (1.4)$$

Il fattore di trasporto volumetrico dell'ossigeno N_{Avg} è funzione della circonferenza media logaritmica, della porzione di tubo considerata, della differenza di pressione parziale a cavallo della parete e di un fattore intrinseco dovuto alla configurazione del sistema:

$$N_{Avg} = K_{OL} W \Delta x_t (pO_2^\circ - pO_2(x_t)) \quad (1.5)$$

Il fattore K_{OL} rappresenta il trasporto di massa globale dei tubi ed è funzione delle caratteristiche del tubo stesso e della conformazione del sistema in cui avviene lo scambio di massa:

$$\frac{1}{K_{OL}} = \frac{H_{oss}}{k_i} + \frac{t_m W_i}{\rho_{stp} P_m W} + \frac{RT W_i}{k_o W_o} \quad (1.6)$$

Nella quale, i termini non ancora specificati sono:

- t_m è lo spessore del tubo;

- W_i e W_o sono rispettivamente la circonferenza interna ed esterna;
- ρ_{stp} è la densità del gas a 0°C e $1\text{ ATM} = 4.46 \times 10^{-5}\text{ mol/cm}^3$;
- R è la costante dei gas pari a $82,06\text{ cm}^3\text{ atm/mol K}$;
- T è la temperatura dell'incubatore (310 K);
- P_m è la permeabilità del tubo all'ossigeno, normalizzata sullo spessore del tubo stesso;
- k_i è il coefficiente dello strato interno;
- k_o è il coefficiente dello strato esterno.

Il fattore K_{OL} è quindi rappresentato dall'inverso della somma di tre termini distinti che esplicitano, in forma algebrica, lo schema del modello fisico a layer multiplo mostrato in figura 3.2.

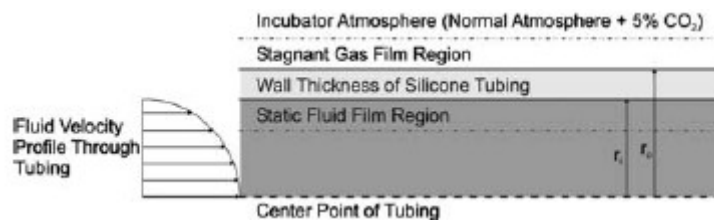


Figura 3.2: Modello a layer multiplo assunto per caratterizzare lo scambio gassoso attraverso la parete del tubo.

Questo modello si avvale di tre strati che rappresentano le ideali barriere attraverso le quali avviene lo scambio di massa fra l'atmosfera dell'incubatore ed il medium all'interno dei tubi. Come già detto, questi tre strati possono essere associati singolarmente con i tre addendi presenti nella (1.6).

Lo strato centrale è la parete del tubo ed è associato al termine centrale della (1.6):

$$\frac{t_m W_i}{\rho_{stp} P_m W}$$

Questo termine rappresenta la permeabilità all'ossigeno della parete del tubo e, come prevedibile, ne indica la stretta dipendenza con lo spessore ed il coefficiente di permeabilità dello stesso.

Il primo termine della (1.6) è associato allo strato interno la tubo e rappresenta la regione di fluido fermo a ridosso della parete:

$$\frac{H_{oss}}{k_i}$$

Questa regione stazionaria è generata dall'attrito tra il fluido in flusso laminare e la parete interna del tubo, essa rappresenta una barriera alla diffusione proprio a causa della sua staticità, poiché permette solo uno scambio di massa radiale.

Per determinare se il sistema è soggetto a flusso laminare è necessario calcolare il numero di Reynold:

$$Re = \frac{\rho V d_i}{\mu} \quad (1.7)$$

La densità ρ e la viscosità μ per il calcolo del numero di Reynold, sono assunte pari rispettivamente a 1 g/mL e 0.01 g/cm*sec, il termine V rappresenta la velocità media del fluido nella sezione del tubo. Se risulta $Re < 2100$ il flusso può essere considerato laminare e siamo in presenza dello strato di fluido stagnante a ridosso della parete. Inoltre, tenendo conto della seguente equazione:

$$l_e = 0.06(Re)(d_i) \quad (1.8)$$

se il valore di l_e è trascurabile rispetto la lunghezza dei tubi, il flusso può essere sempre considerato completamente sviluppato.

Il coefficiente k_i può essere calcolato tenendo conto del numero di Sherwood, il quale è l'analogo del numero di Nusselt per il trasferimento di massa ed è definito come

il rapporto tra scambio di massa convettivo e scambio di massa diffusivo. Nel caso di tubi a sezione circolare e flusso completamente sviluppato, il numero di Sherwood può essere assunto pari a 3.66.

Partendo dalla definizione si può scrivere:

$$k_i = \frac{Sh D_m}{d_i} \quad (1.9)$$

Nella quale D_m rappresenta la diffusività di ossigeno nel medium che si assume pari a $2,18 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$. Risulta evidente che, essendo il numero di Sherwood costante per geometria ed essendo la diffusività costante nel medium, per variare il termine k_i si deve necessariamente variare il diametro interno, pertanto lo strato limite di fluido stagnante a ridosso della parete è fortemente dipendente dalla dimensione radiale del tubo.

Un discorso analogo può essere fatto per lo strato più esterno del modello di figura 2 e rappresentato dal terzo termine della (1.6):

$$\frac{RT W_i}{k_o W_o}$$

In questo caso siamo di fronte ad uno strato di aria stagnante all'esterno dei tubi, caratterizzata dal termine k_o , che può essere calcolato in modo simile a k_i . Per il calcolo del numero di Sherwood in questo caso, ci si avvale della relazione che lega il numero di Sherwood ai numeri di Reynolds e Schmidt nel caso di flusso attorno ad un cilindro, che in questo caso è rappresentato dalla superficie esterna dei tubi:

$$Sh = 0.43 + 0.53 (\text{Re})^{\frac{1}{2}} (\text{Sc})^{0.31} \quad (1.10)$$

Per questo calcolo è necessario definire il numero di Reynold nell'ambiente esterno, cioè nell'atmosfera controllata dell'incubatore, il quale può essere assunto pari a zero poiché l'aria si suppone ferma. Da quest'ultima considerazione risulta che il numero di

Sherwood valido per il calcolo dello strato limite gassoso esterno è pari a 0.43 ed il k_o risulta essere:

$$k_o = \frac{Sh D_a}{d_o} \quad (1.11)$$

nella quale il termine, D_a rappresenta la diffusività dell'ossigeno in aria. Anche in questo caso, l'unico parametro che può essere variato facilmente per ottenere un differente strato limite, è il diametro (in questo caso esterno) del tubo. In realtà può essere variato anche il numero di Sherwood mettendo in movimento l'aria all'interno dell'incubatore, tuttavia risulta alquanto difficile prevedere i risvolti sul sistema di questa azione, a causa della complessa geometria del sistema stesso, della difficoltà nel definire l'esatta posizione dei tubi rispetto al flusso e nell'impossibilità di generare un flusso d'aria ben definito e costante.

Facendo un analogo elettrico, siamo in presenza di tre resistenze in serie ed anche qui, la diffusione dell'ossigeno è limitata dagli strati con maggiore resistenza. Nel sistema costituito da strato fluido, parete del tubo e strato gassoso, i primi due sono altamente preponderanti e possono essere assunti come fattori limitanti del processo di diffusione, invece lo strato gassoso risulta molto più permeabile e può essere trascurato.

Una volta determinato il fattore di trasporto di massa globale K_{OL} è possibile riscrivere l'equazione di bilancio (1.2):

$$-\frac{Q}{H_{oss}} pO_2|_x + K_{OL} W \Delta x_t (pO_2^\circ - pO_2(x_t)) + \frac{Q}{H_{oss}} pO_2|_{x+\Delta x} = 0 \quad (1.12)$$

Dividendo per Δx :

$$-\frac{Q}{H_{oss} \Delta x_t} (pO_2|_x - pO_2|_{x+\Delta x}) + K_{OL} W \Delta x_t (pO_2^\circ - pO_2(x_t)) = 0 \quad (1.13)$$

Calcolando il limite per $\Delta x_t \rightarrow 0$ ed integrando:

$$\frac{dpO_2}{dx} = -\frac{K_{OL} W H_{oss} (pO_2^\circ - pO_2(x_t))}{Q} \quad (1.14)$$

$$\int_0^{x_t} \frac{dpO_2}{(pO_2^\circ - pO_2(x_t))} = -\int_0^{x_t} \frac{K_{OL} W H_{oss}}{Q} dx \quad (1.15)$$

$$pO_2(x_t) = pO_2^\circ - (pO_2^\circ - pO_{2i}) e^{-\frac{K_{OL} W H_{oss}}{Q} x_t} \quad (1.16)$$

In questa equazione $pO_2(x_t)$ rappresenta la pressione parziale di ossigeno disciolto nel medium ad una data lunghezza x_t , dove pO_{2o} è il livello di ossigeno nel medium all'entrata del tubo.

Dalla (1.16) possiamo ottenere l'equazione per calcolare la lunghezza effettiva dei tubi ossigenanti:

$$x_t = -\frac{Q}{K_{OL} W H} \ln \frac{pO_2^\circ - pO_2(x_t)}{pO_2^\circ - pO_{2i}} \quad (1.17)$$

Per i calcoli si fanno le seguenti assunzioni:

- diametro interno tubi: 2 mm;
- diametro esterno tubi: 4 mm;
- permeabilità del tubo normalizzata sullo spessore $4,72 \times 10^{-8} \text{ cm}^3 \text{ mm/sec cm}^2 \text{ mmHg}$;
- pressione parziale dell'ossigeno alla fine dei tubi pari al 99% di quella di saturazione.

Il dimensionamento dei tubi si esegue sulla portata massima della pompa, 50 mL/min e ne risulta una lunghezza dei tubi pari a 17,60 m, valore piuttosto elevato. Se tuttavia teniamo conto che il medium parte da una concentrazione di ossigeno pari a 0 solo nel primo giro nel circuito e che non sempre si impiega la portata massima per perfondere il costruito (soprattutto all'inizio della coltura), appare ragionevole

dimensionare i tubi ad un valore di portata più basso, che può essere 20 mL/min. In questo caso la lunghezza dei tubi risulta pari a 8,48 m.

3.2 Trasporto di ossigeno e Shear Stress

Nei prossimi paragrafi, saranno affrontati due aspetti fondamentali della perfusione: lo sforzo di taglio viscoso e l'apporto di ossigeno alle cellule. Oltre alla formalizzazione dei modelli, verranno fatte alcune considerazioni numeriche riferendosi al circuito di perfusione collegato al bioreattore per vasi di piccolo calibro.

3.2.1 Dimensionamento della portata

Come sostenuto da numerosi articoli, alcuni tipi di cellule si organizzano in strutture ordinate se sottoposti ad opportuni stimoli fisici. Tra questi, è interessante il caso delle cellule endoteliali che compongono l'intima dei vasi, le quali si dispongono lungo la direzione del flusso di fluido, sangue nel sistema biologico e medium nel caso delle colture, generando un monostrato confluyente (Chrysanthi et al., 2004). La “stimolazione fisica” a cui sono sottoposte queste cellule è identificabile nello sforzo di taglio viscoso (shear stress) agente sulla parete del vaso. A questo proposito, appare utile partire proprio da valori desiderati di shear stress per dimensionare la portata.

Il flusso di medium che perfonde il lume del costruito e genera lo sforzo di taglio viscoso sul monostrato cellulare, può essere schematizzato come in figura 3.3.

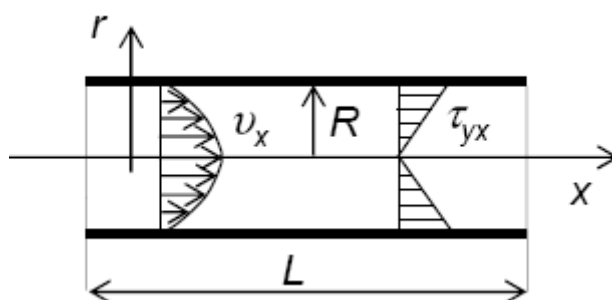


Figura 3.3. Flusso di medium all'interno del costruito tubolare.

Il legame tra sforzo di taglio e portata è dato dalla legge di Newton:

$$\tau_{yx} = -\mu \frac{dv_x}{dr} \quad (2.1)$$

Si assume una viscosità del fluido (medium) uguale a quella dell'acqua a 37°C pari a 0.007 g/cm sec.

Al fine di determinare il profilo di velocità lungo il raggio, si applica l'equazione di Navier – Stokes:

$$\rho \left(\frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + (\vec{v} \nabla) \vec{v} \right) = -\nabla p + \mu \nabla^2 \vec{v} + \vec{f} \quad (2.2)$$

Ponendo a zero le accelerazioni (parte a sinistra dell'uguaglianza) e le forze di massa, possiamo riscrivere:

$$0 = -\nabla p + \mu \nabla^2 \vec{v} \quad (2.3)$$

L'equazione semplificata appena scritta è soggetta a due condizioni al contorno: la prima impone la staticità del fluido immediatamente a ridosso della parete, la seconda è conseguenza della simmetria cilindrica del sistema:

$$r = R \quad v_x = 0 \quad (2.4)$$

$$r = 0 \quad \frac{\partial v_x}{\partial r} = 0 \quad (2.5)$$

Proiettando l'equazione (2.3) sull'asse x otteniamo:

$$\frac{\partial p}{\partial x} = \mu \left[\frac{1}{r} \left(\frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial v_x}{\partial r} \right) \right) + \frac{1}{r^2} \frac{\partial v_x}{\partial \vartheta^2} + \frac{\partial^2 v_x}{\partial x^2} \right] \quad (2.6)$$

Poniamo uguali a zero gli ultimi due termini della somma: il primo per simmetria cilindrica e quindi invariabilità della velocità al variare dell'angolo, il secondo perché si considera il flusso completamente sviluppato all'interno del lume.

Partendo dalla (2.6), separando le variabili e calcolando il primo integrale otteniamo:

$$\frac{\partial p}{\partial x} = \frac{\mu}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial v_x}{\partial r} \right) \quad (2.7)$$

$$\int \frac{r}{\mu} \frac{\partial p}{\partial x} = \int \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial v_x}{\partial r} \right) \quad (2.8)$$

$$\frac{r^2}{2\mu} \frac{\partial p}{\partial x} + k_1 = r \frac{\partial v_x}{\partial r} \quad (2.9)$$

Applicando la seconda condizione al contorno (2.5), si ricava che $k_1=0$. Integrando lungo il raggio la (2.9) possiamo ottenere il profilo di velocità:

$$\int \frac{r}{2\mu} \frac{\partial p}{\partial x} = \int \frac{\partial v_x}{\partial r} \quad (2.10)$$

$$v_x(r) = \frac{r^2}{4\mu} \frac{\partial p}{\partial x} + k_2 \quad (2.11)$$

Il valore della seconda costante può essere ricavato dall'applicazione della prima condizione al contorno (2.4), andando così a completare la (2.11):

$$k_2 = -\frac{R^2}{4\mu} \frac{\partial p}{\partial x} \quad (2.12)$$

$$v_x(r) = \frac{1}{4\mu} (r^2 - R^2) \frac{\partial p}{\partial x} \quad (2.13)$$

Per determinare la portata totale Q, è necessario integrare il profilo di velocità su tutta l'area di passaggio. A questo proposito, vengono integrate lungo il raggio le circonferenze concentriche caratterizzate da uguale velocità puntuale:

$$Q = \int_0^R v_x 2\pi r dr \quad (2.14)$$

$$Q = \frac{\pi}{2\mu} \frac{\partial p}{\partial x} \int_0^R r^3 - rR^2 dx \quad (2.15)$$

$$Q = \frac{\pi}{2\mu} \frac{\partial p}{\partial x} \left(-\frac{R^4}{4}\right) \quad (2.16)$$

Ricavando dalla (2.16) il rapporto tra differenziali e sostituendolo nella (2.9) possiamo scrivere:

$$\frac{\partial v_x}{\partial r} = -r \frac{4Q}{\pi R^4} \quad (2.17)$$

Sostituendo infine la (2.17) nella (2.1) e ponendo $r = R$, possiamo ottenere l'equazione che lega direttamente lo sforzo di taglio fluido, alla portata:

$$\tau_{rx} = \frac{4\mu}{\pi R^3} Q \quad (2.18)$$

In letteratura, è possibile trovare shear stress agenti su cellule endoteliali che variano da valori inferiori a 1 dyne/cm² (Soletti et al., 2006; Nasser 2003), fino ad 6 – 8 dyne/cm² (O'Ceirbhail et al., 2008; Chrysanthi et al., 2004).

Con riferimento al bioreattore per vasi di piccolo calibro, si considerano dei costrutti tubolari con diametro interno di 2 – 3 millimetri e si calcola la portata per sforzi di taglio fluido tra i 0,5 ed i 6 dyne/cm².

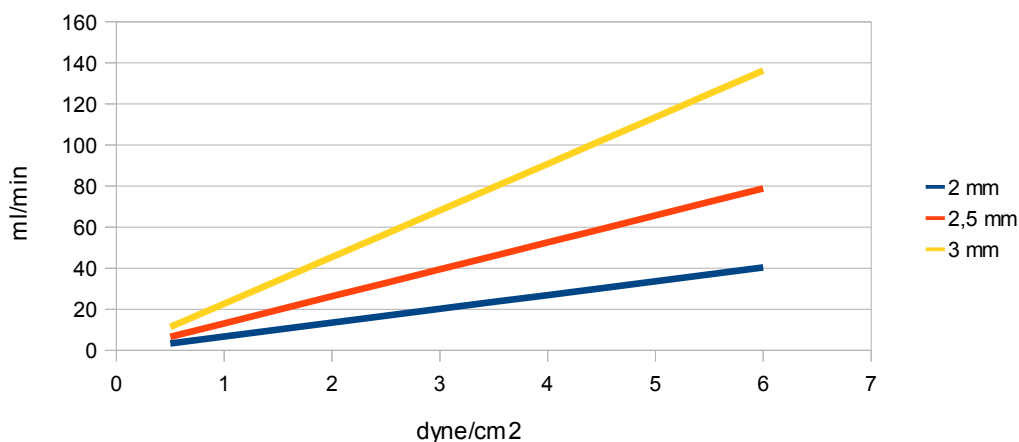


Figura 3.4. Variazione della portata al variare dello sforzo di taglio per costrutti di diametro 2 mm, 2.5 mm e 3 mm.

Il grafico in figura 3.4 mostra il legame tra sforzo di taglio e portata per costrutti di diverso diametro. Risulta evidente una rapida crescita del fattore angolare delle rette all'aumentare del diametro, dovuta alla proporzionalità diretta tra la portata ed il cubo del raggio.

Come detto nel capitolo 1, la pompa Shuttle scelta per il circuito di perfusione può erogare una portata massima di 50 ml/min quindi, già nel caso di costrutti di 3 mm, lo sforzo di taglio massimo che è in grado di generare è poco superiore ai 2 dyne/cm² rendendola inadatta per scaffold di dimensioni superiori. Se tuttavia la specifica applicazione richiede sforzi di taglio compresi tra 0 e 1 dyne/cm² oppure non necessita di un valore specifico, il circuito può comunque essere utile per attuare un adeguato scambio di massa, garantendo una distribuzione più uniforme di ossigeno e metaboliti, insieme ad un'eliminazione più efficace dei cataboliti, promuovendo una crescita di tessuto più omogenea rispetto ad una coltura statica.

Di particolare interesse è la valutazione della portata massima che è possibile immettere nel lume dello scaffold senza danneggiare le cellule. A questo proposito si assume come shear stress critico di distacco 12 dyne/cm² (Tissue Engineering, ed. Pearson). Questo valore risulta essere ben oltre quelli generabili dalla pompa Shuttle per i costrutti considerati nel grafico in figura 3.4, infatti calcolando la portata critica di

distacco per lo scaffold di 2 millimetri di diametro otteniamo:

$$Q_{cr} = \frac{\pi R^3}{4\mu} \tau_{cr} = 80,74 \text{ ml/min} \quad (2.19)$$

Possiamo inoltre calcolare qual'è il diametro minimo del costruito per il quale la portata massima genera sforzi di taglio al di sotto della soglia critica:

$$R = \sqrt[3]{\frac{4 Q_{max} \mu}{\pi \tau_{cr}}} = 0,85 \text{ mm} \quad (2.20)$$

Quindi nel caso di scaffold con un diametro minimo di 1,7 mm la pompa non è in grado di provocare il distacco delle cellule, considerazione di grande interesse se si tiene conto che in genere, man mano che si sviluppa il tessuto, la parete si inspessisce riducendo di conseguenza il lume perfuso. Per questo stesso motivo si rende necessario il monitoraggio della crescita del costruito, al fine di determinare l'effettivo valore di shear stress agente su di esso ed apportando, se necessario, le opportune modifiche alla portata.

3.2.2 Trasporto di ossigeno

Uno degli aspetti fondamentali da prendere in considerazione durante una coltura cellulare è il trasporto di ossigeno. I dispositivi impiegati in ambito tissutale devono essere progettati in modo da garantire un'adeguata ossigenazione in ogni punto del costruito, evitando che la concentrazione di ossigeno cada al di sotto di una soglia critica compromettendo la vitalità delle cellule. Questo stesso ragionamento può essere fatto anche per altri metaboliti, come il glucosio, necessari per il corretto sviluppo del tessuto. Generalizzando possiamo dire che la diffusione delle specie chimiche di interesse deve essere maggiore del loro consumo da parte delle cellule, in modo da

garantirne sempre un'adeguata disponibilità locale.

Nel sistema biologico, l'apporto di ossigeno ai tessuti è garantito dal sistema circolatorio e quindi dal sangue. Il sangue è un tessuto altamente specializzato che è in grado di trasportare ossigeno sia disciolto nella sua frazione liquida (plasma), sia legato all'emoglobina contenuta nei globuli rossi. Il salto di concentrazione artero – venoso è di circa $2 \mu\text{mol/mL}$, mentre il medium di coltura si satura di ossigeno alla concentrazione di $0,2 \mu\text{mol/mL}$, ne consegue che, per fornire un'ossigenazione fisiologica in un bioreattore, è necessaria una portata circa 10 volte maggiore rispetto a quella sanguigna.

Nel caso generale di un costrutto tubolare perfuso, è possibile utilizzare il modello di Krogh per determinare la concentrazione di ossigeno in ogni punto del costrutto. Il modello consiste in un capillare all'interno del quale scorre il terreno di coltura, circondato da una biomassa cilindrica che consuma ossigeno (costrutto) (fig. 3.5).

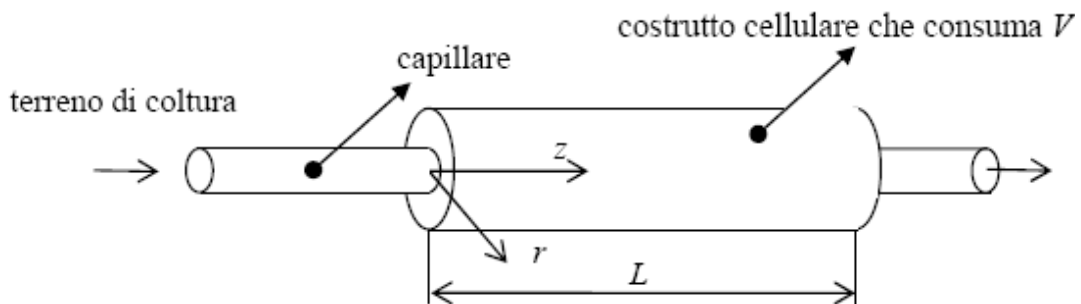


Figura 3.5. Schematizzazione del modello di Krogh.

Il modello di Krogh, descrive il decadimento di concentrazione assiale e radiale nel costrutto dovuta al consumo cellulare:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \nabla^2 c - V(c) \quad (2.21)$$

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \left(\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial c}{\partial r} \right) + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right) - V(c) \quad (2.22)$$

Nella (22) D indica il coefficiente di diffusione dell'ossigeno nel tessuto e $V(c)$ è il consumo della specie chimica da parte della biomassa.

Il modello è soggetto a due condizioni al contorno:

$$r=R \qquad \frac{\partial c}{\partial r}=0 \qquad (2.23)$$

$$r=a \qquad (c-c_0)=-\frac{V}{\bar{v}}\left(\frac{R^2}{a^2}-1\right)z \qquad (2.24)$$

Nelle quali :

- R è il raggio esterno del costruito;
- a è il raggio interno del costruito;
- c_0 è la concentrazione all'entrata del costruito;
- \bar{v} è la velocità media del flusso;
- z è la quota assiale.

La prima condizione al contorno (2.23) impone il flusso zero sulla superficie esterna del costruito, mentre la seconda (2.24) tiene conto del decadimento assiale della concentrazione (soluzione di Blum).

Per semplificare i calcoli, è necessario valutare se la diffusione assiale del costruito è trascurabile rispetto a quella radiale. A questo fine può essere applicato il numero di Péclet, che fornisce un bilancio tra convezione nel capillare e diffusione nel tessuto:

$$Pe = \frac{a\bar{v}}{D_r} \sqrt{\frac{D_r}{D_z}} \qquad (2.25)$$

D_r e D_z sono rispettivamente la diffusività radiale ed assiale nel tessuto, che si riducono semplicemente a D nel caso sia un tessuto omogeneo.

- se $Pe > 1$ la diffusione assiale è trascurabile rispetto alla convezione;

- se $Pe < 1$ la diffusione assiale è dominante sulla convezione.

Sotto l'ipotesi di $Pe > 1$ e sistema stazionario, la (2.22) può essere riscritta in questo modo:

$$D\left(\frac{1}{r}\frac{\partial}{\partial r}\left(r\frac{\partial c}{\partial r}\right)\right) - V = 0 \quad (2.26)$$

Separando le variabili e risolvendo il primo integrale otteniamo:

$$\int \frac{\partial}{\partial r}\left(r\frac{\partial c}{\partial r}\right) = \int \frac{Vr}{D} \quad (2.27)$$

$$r\frac{\partial c}{\partial r} = \frac{Vr^2}{2D} + k_1 \quad (2.28)$$

La costante k_1 è calcolabile applicando la prima condizione al contorno (2.23) e risulta:

$$k_1 = -\frac{VR^2}{2D} \quad (2.29)$$

Separando ancora una volta le variabili e risolvendo il secondo integrale, otteniamo l'andamento della concentrazione in funzione delle quote assiale e radiale:

$$\int \frac{\partial c}{\partial r} = \int \frac{Vr}{2D} - \frac{1}{r} \frac{VR^2}{2D} \quad (2.30)$$

$$c(r) = \frac{Vr^2}{4D} - \frac{VR^2}{2D} \ln(r) + k_2 \quad (2.31)$$

La costante k_2 è calcolabile tramite la seconda condizione al contorno (2.24):

$$k_2 = c_0 - \frac{V}{\bar{v}} \left(\frac{R^2}{a^2} - 1\right) z - \frac{V}{2D} \left(\frac{a^2}{2} - R^2 \ln(a)\right) \quad (2.32)$$

Sostituendo la (2.32) nella (2.31) e facendo opportuni raccoglimenti, possiamo ottenere una forma della legge di Krogh, agevole per eseguire calcoli:

$$c - c_0 = \frac{V}{2D} \left(\frac{1}{2}(r^2 - a^2) - R^2 \ln\left(\frac{r}{a}\right) - \frac{V}{\bar{v}} \left(\left(\frac{R}{a}\right)^2 - 1 \right) z \right) \quad (2.33)$$

Da questa equazione è possibile ottenere una stima del consumo totale di ossigeno da parte del costrutto, ponendo $r = a$ e valutando quindi la concentrazione in uscita.

Il consumo V di ossigeno è legato sia al tipo di cellule poste in coltura, sia alla numerosità e può essere pertanto calcolato in questo modo:

$$V = V_{MAX} N_v \quad (2.34)$$

Nella quale V_{MAX} è il consumo cellulare massimo in $\mu\text{mol}/10^6 \text{ cells/h}$ e N_v è la densità cellulare espressa in 10^6 cells/cm^3 .

Con il fine di presentare alcuni risultati numerici relativi al circuito di perfusione presentato nel capitolo 1, vengono fatte le seguenti assunzioni:

- l'ossigenazione del costrutto è ottenuta dalla sola perfusione, pertanto si pongono a zero gli scambi di massa attuati dalla superficie esterna;
- si considera il costrutto omogeneo, con un coefficiente di diffusione dell'ossigeno pari a quello medio dei tessuti $D = 2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sec}$;
- il range di consumo cellulare massimo è $0,05 - 1,0 \text{ mol}/10^6 \text{ cells/h}$ a seconda del tipo di cellule preso in considerazione (Tissue Engineering, ed. Pearson). Per i calcoli viene assunto il valore medio dei tessuti $V_{MAX} = 0,5 \text{ mol}/10^6 \text{ cells/h}$;
- si considera come soglia critica di concentrazione dell'ossigeno il 5% di c_0 , quindi $c_{cr} = 0,01 \text{ } \mu\text{mol/mL}$;
- densità cellulare del costrutto (N_v) pari a $20 \cdot 10^6 \text{ cells/cm}^3$;
- lunghezza dei costrutti pari a 25 mm, compatibili con il bioreattore per i vasi di

piccolo calibro;

- diametro interno dei costrutti e portata del circuito di perfusione in linea con i valori calcolati nel precedente paragrafo;
- spessore dei costrutti pari a 0,4 mm.

La valutazione dell'apporto di ossigeno al costrutto, viene fatta sulla base dei dati utilizzati per il grafico in figura 3.4. I valori di portata presi in considerazione sono quelli relativi ad uno shear stress pari a 0,5 dyne/cm² in quanto sono i più bassi (tabella 1). Se per questi valori, l'ossigenazione è ottimale, lo sarà anche per qualsiasi valore di portata più elevato.

Tabella 1. Valori di portata a parità di shear stress per tre diversi diametri interni, con riferimento al grafico in figura 3.4.

τ	Q ₁ (d=2mm)	Q ₂ (d=2,5mm)	Q ₃ (d=3mm)
0,5 dyne/cm ²	3,36 mL/min	6,57 mL/min	11,35 mL/min

In primo luogo, va valutato nei tre casi il numero di Reynold per stabilire se il flusso è laminare. Con riferimento ai valori dei diametri in tabella 1, si calcola il numero di Reynold sulla portata massima della pompa:

$$\text{Re}_{2\text{mm}} = \frac{\rho \bar{v} d}{\mu} = 4 \frac{\rho Q}{\pi d \mu} = 755 \quad (2.35)$$

$$\text{Re}_{2,5\text{mm}} = \frac{\rho \bar{v} d}{\mu} = 4 \frac{\rho Q}{\pi d \mu} = 604 \quad (2.36)$$

$$\text{Re}_{3\text{mm}} = \frac{\rho \bar{v} d}{\mu} = 4 \frac{\rho Q}{\pi d \mu} = 504 \quad (2.37)$$

Assumendo 2200 come valore di soglia del numero di Reynold, possiamo affermare di operare in regime laminare.

La seconda verifica che deve essere fatta è quella sul numero di Péclet. Con riferimento alla (2.25) ed ai valori in tabella 1:

$$Pe_{2\text{mm}} = \frac{a \bar{v}}{D_r} \sqrt{\frac{D_r}{D_z}} = \frac{Q_1}{\pi r D} = 8900 \quad (2.38)$$

$$Pe_{2,5\text{mm}} = \frac{a \bar{v}}{D_r} \sqrt{\frac{D_r}{D_z}} = \frac{Q_2}{\pi r D} = 14000 \quad (2.39)$$

$$Pe_{3\text{mm}} = \frac{a \bar{v}}{D_r} \sqrt{\frac{D_r}{D_z}} = \frac{Q_3}{\pi r D} = 30000 \quad (2.40)$$

Questi valori risultano essere molto maggiori di 1, pertanto può essere applicato il modello di Korgh trascurando la diffusione assiale all'interno del costruito.

L'andamento della concentrazione di ossigeno viene valutato con la (2.33) lungo una linea retta sulla superficie esterna, che risulta essere il luogo più distante della fonte di ossigeno, e quindi la zona con la più bassa concentrazione (fig. 3.6).

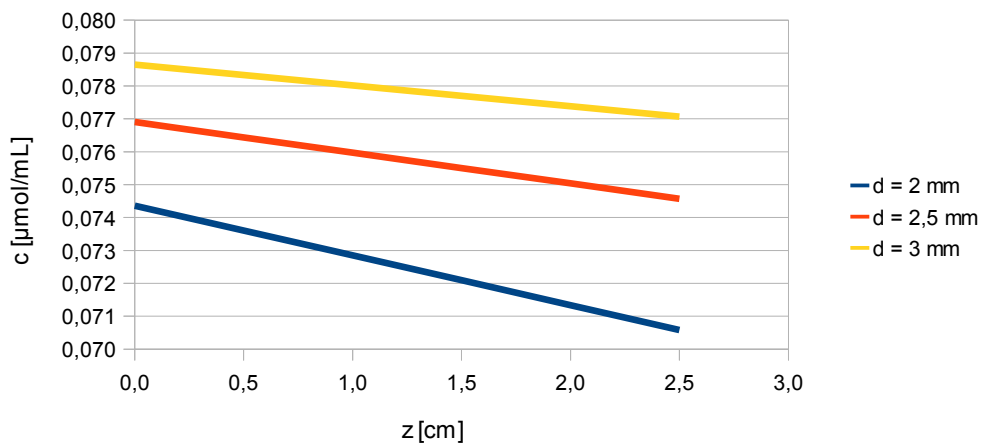


Figura 3.6. Grafico che mostra l'andamento della concentrazione di ossigeno lungo una linea posta sulla superficie esterna del costruito, con riferimento ai diametri e alle portate in tabella 1.

Come si vede chiaramente dal grafico in figura 3.6, a parità di sforzo di taglio, man mano che cresce il diametro del costruito la concentrazione di ossigeno aumenta, poiché aumenta anche la portata. Nei tre casi presi in esame, la concentrazione di ossigeno non

scende mai sotto la soglia critica di $0,01 \mu\text{mol/mL}$ in nessun luogo del costruito, pertanto l'ossigenazione risulta adeguata. Un'ultima interessante osservazione, è l'aumento del coefficiente angolare delle rette all'aumentare del diametro, che indica una diminuzione del decadimento assiale di concentrazione a livello della superficie interna, imposto dalla (2.24). Questo è dovuto all'aumento della portata e ad una conseguente diminuzione della frazione di ossigeno rimossa.

In figura 3.7 è mostrato l'andamento della concentrazione radiale nella parete dello scaffold per i tre diametri presi in esame.

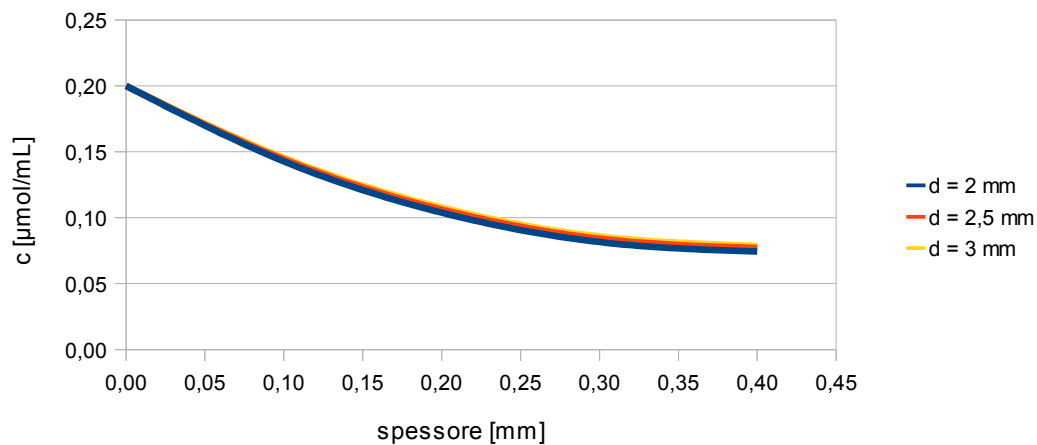


Figura 3.7. Profilo di concentrazione dell'ossigeno lungo lo spessore della parete alla quota $z=0$.

A parità di spessore del costruito, le curve che definiscono il profilo di concentrazione nei tre diversi diametri risultano essere molto vicine. Come si vede in figura 3.7, la concentrazione di ossigeno decade rapidamente, per poi assestarsi su un valore minimo a livello della superficie esterna.

Altre interessanti osservazioni possono essere fatte variando lo shear stress (quindi la portata) e lo spessore del costruito a parità di diametro interno. Nella tabella 2, sono mostrate le portate per tre diversi valori di sforzo di taglio riferiti al costruito di diametro interno pari a 2 mm.

Tabella 2. Valori di portata per differenti sforzi di taglio nel costrutto di diametro interno pari a 2mm.

τ [dyne/cm ²]	0,5	2	4
Q [mL/min]	3,36	13,46	26,91

Sulla base dei valori in tabella 2, è possibile costruire un grafico analogo a quello in figura 3.6, che mostra il decadimento assiale della concentrazione di ossigeno sulla superficie più esterna del costrutto al variare della portata (fig. 3.8).

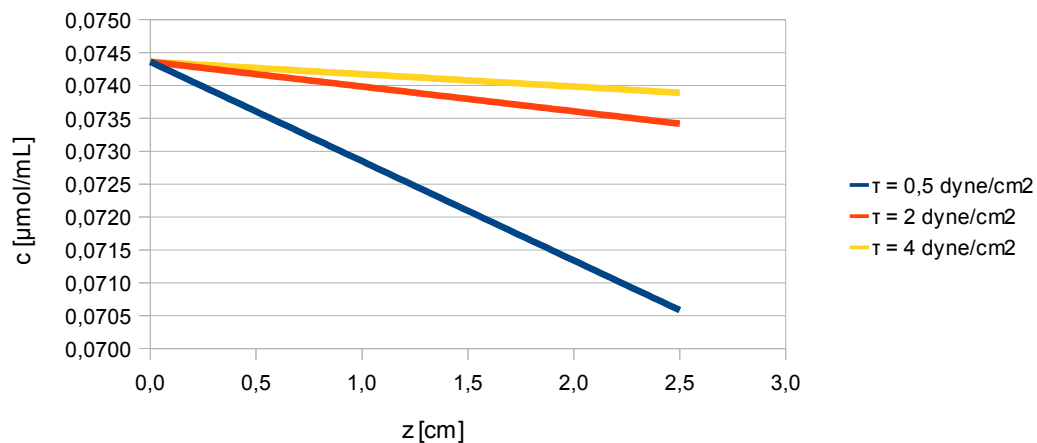


Figura 3.8. Decadimento assiale della concentrazione di ossigeno sulla superficie esterna del costrutto da 2 mm di diametro, a tre diversi valori di shear stress.

Risulta evidente dalla figura 3.8 che, all'aumentare della portata, il decadimento assiale della concentrazione di ossigeno nel costrutto è sempre meno marcato, in linea con le considerazioni fatte per la figura 3.6.

Sempre nel caso del costrutto con diametro interno pari a 2mm, si considerano ora tre differenti spessori della parete: 0,35 mm, 0,40 mm e 0,45 mm alla portata di 3,36 mL/min (fig. 3.9).

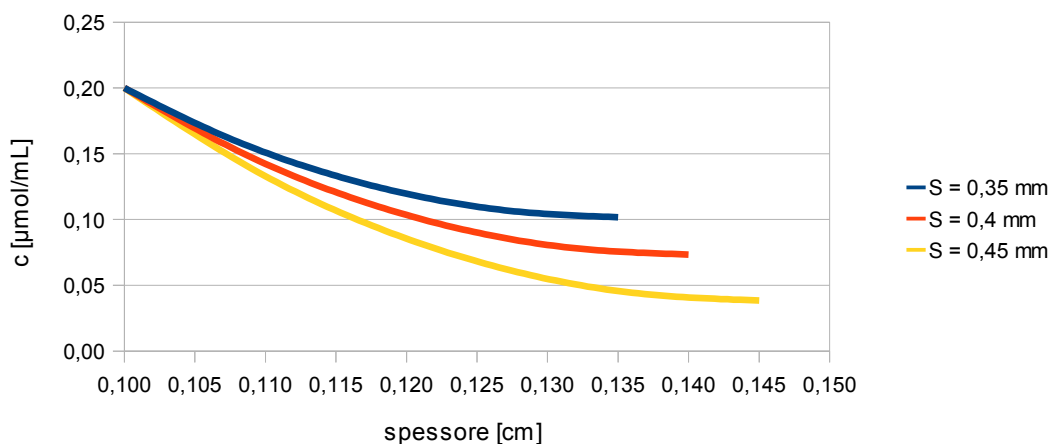


Figura 3.9. Profilo di concentrazione nella parete del costrutto di diametro pari a 2 mm con tre diversi spessori.

Appare subito chiaro dalla figura 3.9 che, il profilo di concentrazione dell'ossigeno all'interno della parete del costrutto, è fortemente dipendente dallo spessore della parete stessa. All'aumentare dello spessore, le curve si abbassano rapidamente a causa di un maggior volume di biomassa che consuma ossigeno.

Alla luce delle considerazioni fatte, lo spessore dello scaffold risulta essere il fattore più rilevante per quanto riguarda il corretto apporto di ossigeno al costrutto, molto più incedente rispetto la portata ed al il diametro interno. Tutto questo può essere giustificato considerando il basso rapporto tra il coefficiente di diffusione dell'ossigeno all'interno del tessuto ed il consumo di questa specie chimica da parte delle cellule.

3.2.3 Modello alternativo per il trasporto di ossigeno

Il modello di Korgh presentato nel precedente paragrafo, ipotizza che la superficie esterna dello scaffold non possa attuare scambi di massa, quindi l'ossigeno diffonde solamente dall'interno del costrutto. Il modello così formulato non risulta rispecchiare adeguatamente le condizioni di coltura del bioreattore per i vasi di piccolo

calibro, presentato nel capitolo 1, in quanto la superficie esterna del costruito è a diretto contatto con l'atmosfera e vi è quindi una diffusione di ossigeno anche dall'esterno.

Al fine di sviluppare un modello adatto a descrivere il profilo di concentrazione di ossigeno nel caso appena citato, si prende in considerazione la (2.26) e si sostituisce la prima condizione al contorno (2.23) con la seguente:

$$r = R \qquad c = c_0 \qquad (2.41)$$

La (2.41) introduce uno scambio di massa attuato dalla superficie esterna, che è posta a diretto contatto con la fase gassosa e quindi ha una concentrazione di ossigeno pari a quella di saturazione.

Integrando la (2.26) otteniamo:

$$\frac{\partial c}{\partial r} = \frac{V r}{2D} + \frac{k_1}{r} \qquad (2.42)$$

Integrando ancora una volta si ottiene:

$$c(r) = \frac{V r^2}{4D} + k_1 \ln(r) + k_2 \qquad (2.43)$$

Sostituendo una per volta le condizioni al contorno (2.24) e (2.41) otteniamo le seguenti:

$$c_0 = \frac{V R^2}{4D} + k_1 \ln(R) + k_2 \qquad (2.44)$$

$$c_0 - \frac{V}{\bar{v}} \left(\frac{R^2}{a^2} - 1 \right) z = \frac{V a^2}{4D} + k_1 \ln(a) + k_2 \qquad (2.45)$$

Sviluppando i calcoli si ottengono i seguenti valori delle costanti:

$$k_1 = \frac{1}{\ln\left(\frac{a}{R}\right)} \left(\frac{V}{4D} (R^2 - a^2) - \frac{V}{\bar{v}} \left(\frac{R^2}{a^2} - 1 \right) z \right) \quad (2.46)$$

$$k_2 = c_0 - \frac{V R^2}{4D} - \frac{\ln(R)}{\ln\left(\frac{a}{R}\right)} \left(\frac{V}{4D} (R^2 - a^2) - \frac{V}{\bar{v}} \left(\frac{R^2}{a^2} - 1 \right) z \right) \quad (2.47)$$

Sostituendo nella (2.43) le costanti e facendo opportuni raccoglimenti, otteniamo l'equazione del profilo di concentrazione in funzione di r e z:

$$c(r) = c_0 + \frac{V}{4D} (r^2 - R^2) + \frac{\ln\left(\frac{r}{R}\right)}{\ln\left(\frac{a}{R}\right)} \left(\frac{V}{4D} (R^2 - a^2) - \frac{V}{\bar{v}} \left(\frac{R^2}{a^2} - 1 \right) z \right) \quad (2.48)$$

Sulla base della (2.48) è possibile valutare il profilo di concentrazione dell'ossigeno nel caso del bioreattore per i vasi di piccolo calibro.

Con riferimento ai dati in tabella 1, si calcola il profilo di concentrazione di ossigeno nella parete del costruito (fig. 3.10).

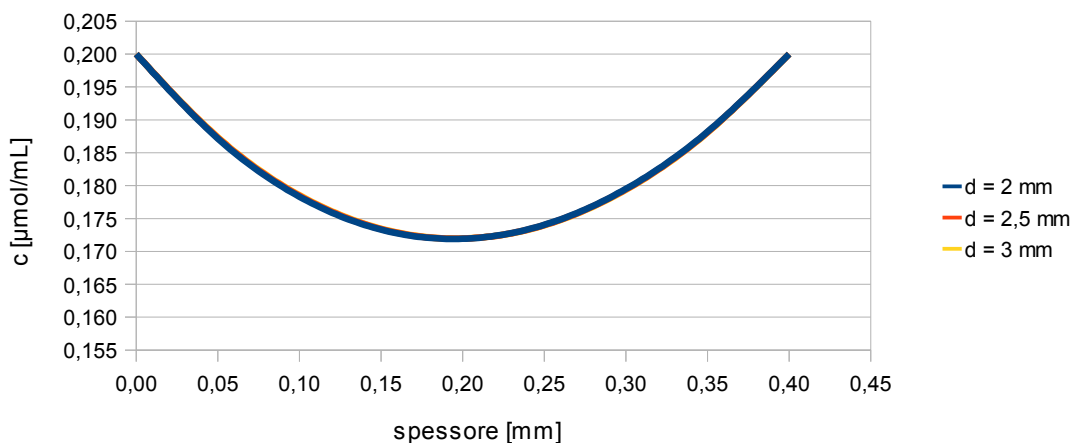


Figura 3.10. Profilo di concentrazione di ossigeno all'interno della parete dei costrutti.

Come si vede dalla figura 3.10, le curve di profilo relative ai costrutti di diverso diametro sono pressoché sovrapposte e presentano un andamento parabolico con un minimo a 0,194 mm dalla superficie interna. Si nota come, in questo caso, la concentrazione si mantiene più alta rispetto a quella del modello di Krogh semplice, grazie all'ossigeno che diffonde anche dalla superficie esterna. Risulta evidente che, con questa configurazione, è possibile aumentare lo spessore del costrutto garantendo comunque un'adeguata ossigenazione. La sovrapposizione delle curve, indica ancora una volta la forte dipendenza delle stesse dal coefficiente di diffusione dell'ossigeno, piuttosto che dalla portata e dal diametro interno.

Analogamente a quanto fatto per il modello di Krogh semplice, è interessante osservare la variazione delle curve di concentrazione al variare dello spessore. In questo caso si considera il costrutto di diametro interno pari a 2mm e 5 spessori differenti: 0,35 mm, 0,40 mm, 0,45 mm, 0,50 mm, e 0,55 mm (fig. 3.11).

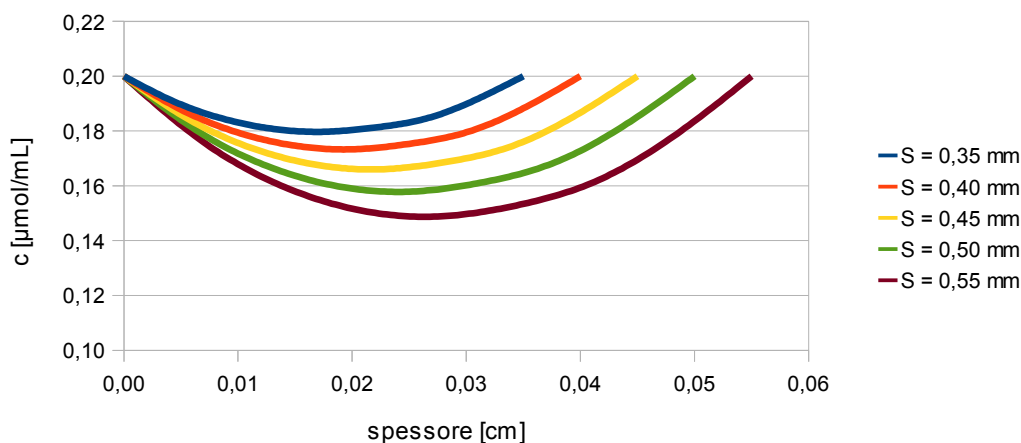


Figura 3.11. Curve di concentrazione per cinque diversi spessori di parete del costrutto con diametro interno 2 mm.

In figura 3.11 è visibile la traslazione verso il basso delle curve di concentrazione all'aumentare dello spessore, analogamente a quanto osservato nella figura 3.9. In questo caso però, l'entità dell'abbassamento delle curve in rapporto all'aumento dello

spessore è minore rispetto a quanto rilevato nel modello di Krogh semplice. Ne consegue che l'ossigenazione sulle due superfici è molto più vantaggiosa rispetto a quella attuata dalla sola perfusione, pertanto è possibile l'utilizzo di scaffold di maggiore spessore.

Conclusioni e sviluppi futuri

Il progressivo invecchiamento della popolazione mondiale, l'incidenza di malattie rare e la bassa disponibilità di organi da donatori, sono alcuni dei fattori che spingono la medicina a ricercare strade diverse dal trapianto e dall'impianto di protesi, per sopperire a disfunzioni tissutali. La medicina rigenerativa costituisce un'alternativa valida, che mira a sostituire l'organo patologico o danneggiato con un tessuto vivente perfettamente compatibile, funzionale ed in grado di crescere ed adattarsi all'ambiente biologico.

Esistono innumerevoli fattori che influenzano e caratterizzano il corretto sviluppo dei tessuti sia *in vivo* sia *in vitro*, molti di questi non sono ancora stati scoperti e molti altri sono difficili da monitorare. In generale si cerca di fornire al tessuto in sviluppo stimoli che mimano quelli del sistema biologico, siano essi chimici, meccanici od elettrici.

In questo lavoro è stato presentato un circuito di perfusione, adattabile a diversi dispositivi, che è in grado di garantire un adeguato scambio di massa con il costruito e di fornire una stimolazione idrodinamica allo stesso. In letteratura sono presenti alcuni studi che sostengono l'effetto positivo di sforzi di taglio idrodinamico su cellule endoteliali vascolari, osservando orientamento e confluenza, a partire da valori inferiori a 1 dyne/cm^2 (Soletti et al., 2006; Nasser 2003), fino ad un massimo di $6 - 8 \text{ dyne/cm}^2$ (O'Cearbhaill et al., 2008; Chrysanthi et al., 2004).

Può risultare interessante fornire lo stimolo idrodinamico a cellule di differente fenotipo, in modo da osservare gli effetti positivi o negativi dello stesso. Su questa linea, l'elaborato prende in considerazione un bioreattore per la trachea che non prevede

perfusione del lume dello scaffold, ma un medium di coltura statico all'interno del costruito. Vengono proposti dei progetti di modifica a questo bioreattore, per rendere possibile l'accoppiamento con il circuito di perfusione e quindi il flusso di terreno all'interno del lume dello scaffold, migliorando lo scambio di metaboliti e cataboliti e fornendo una stimolazione idrodinamica alle cellule endoteliali della trachea seminate sulla superficie interna.

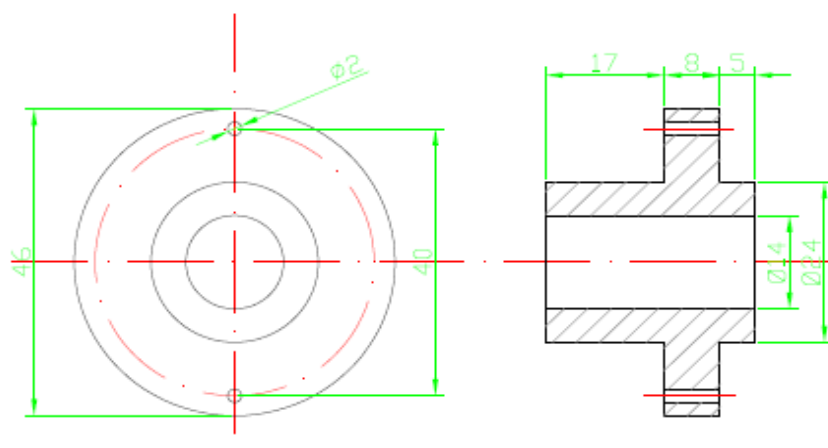
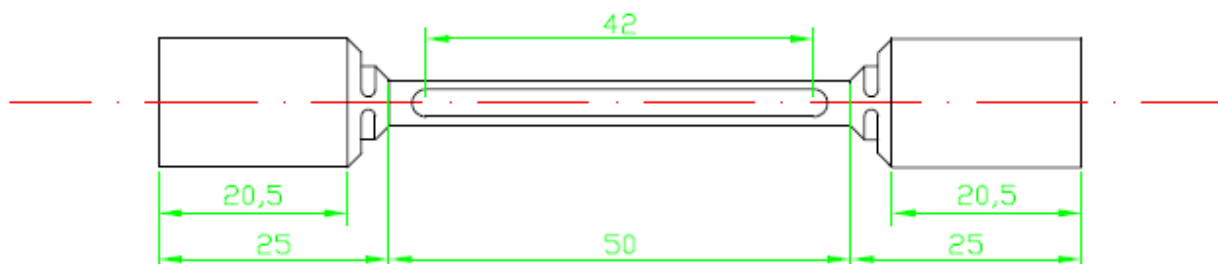
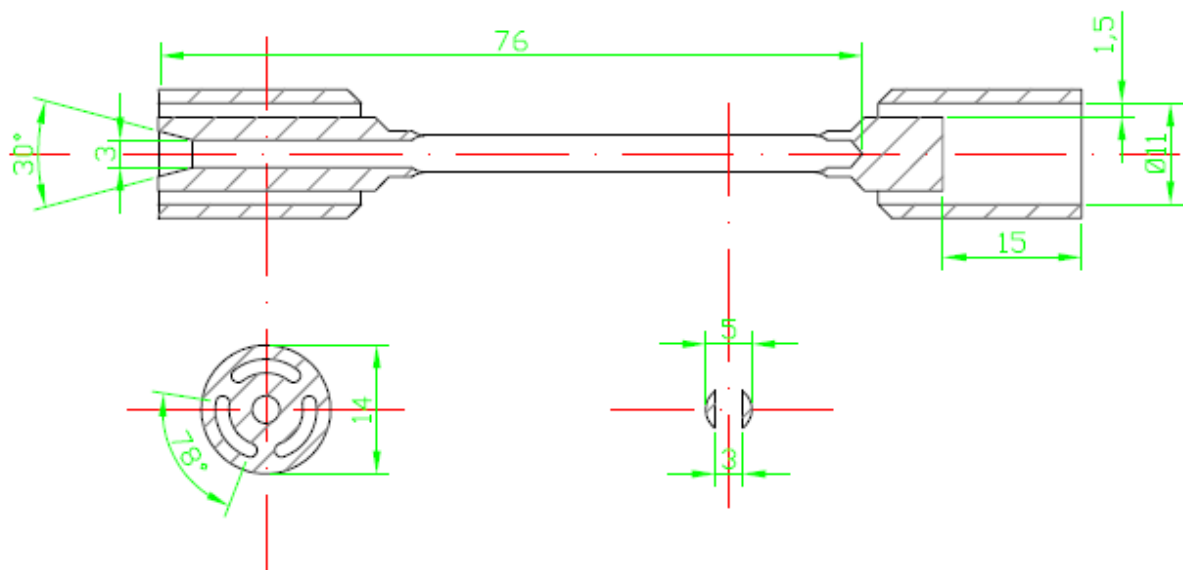
I progetti di modifica del bioreattore per la trachea, si avvalgono di una sezione di passaggio del medium di perfusione geometricamente complessa, pertanto risulta necessaria l'implementazione di uno modello computazionale tridimensionale, al fine di studiarne la fluidodinamica locale e verificare la laminarità del flusso.

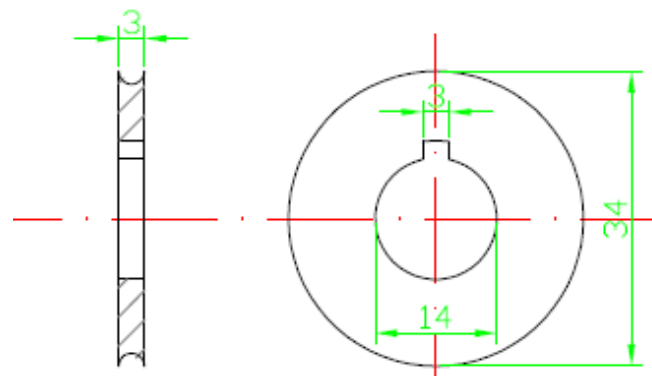
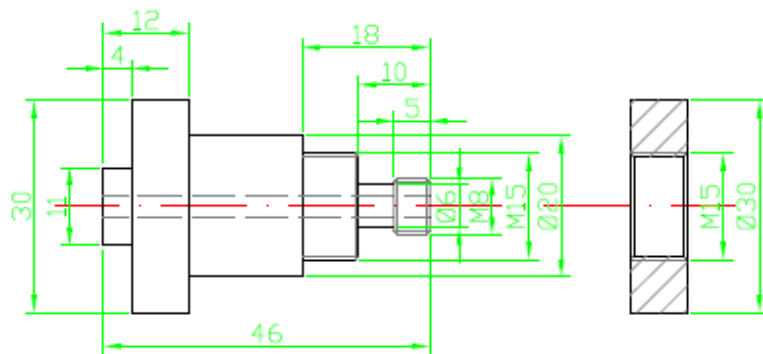
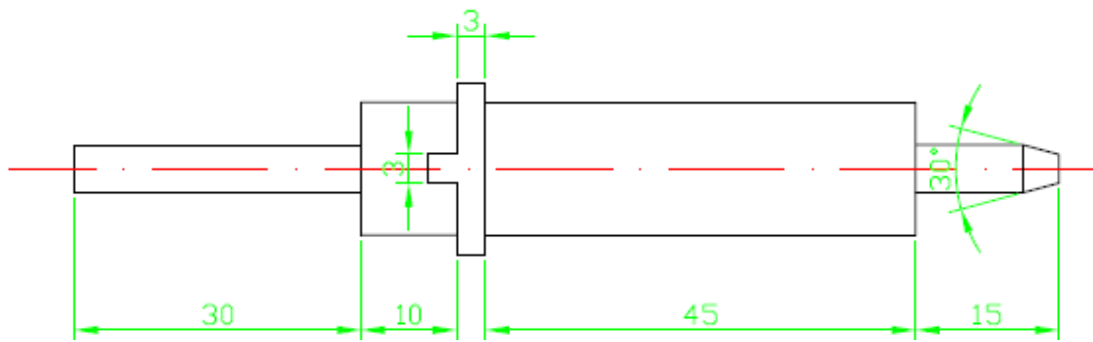
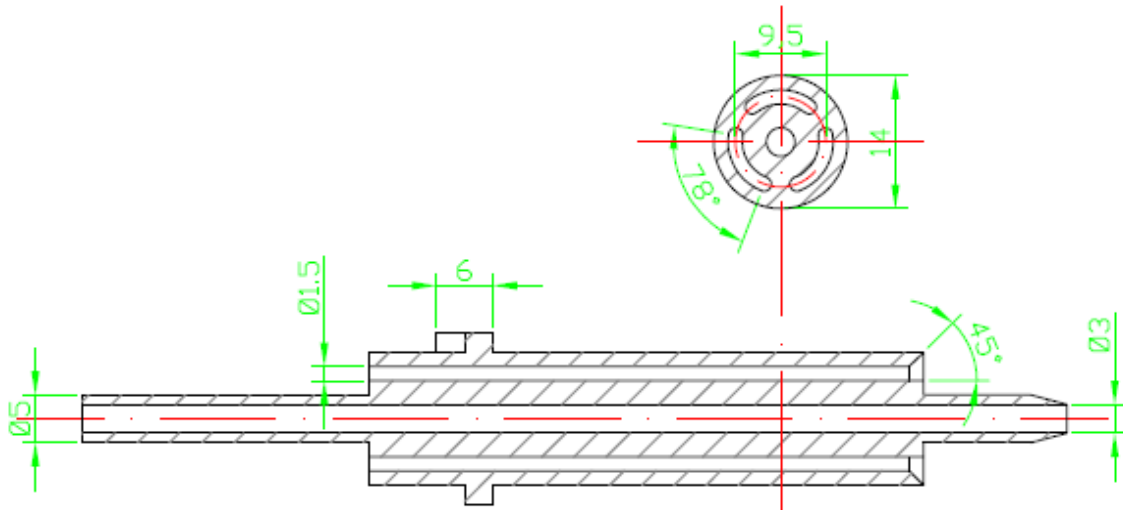
La validazione del bioreattore in laboratorio, è necessaria sia per verificare il corretto funzionamento del dispositivo (montaggio, stimolazione ed isolamento dei terreni), sia per indagare l'effetto della stimolazione idrodinamica su cellule dell'endotelio tracheale.

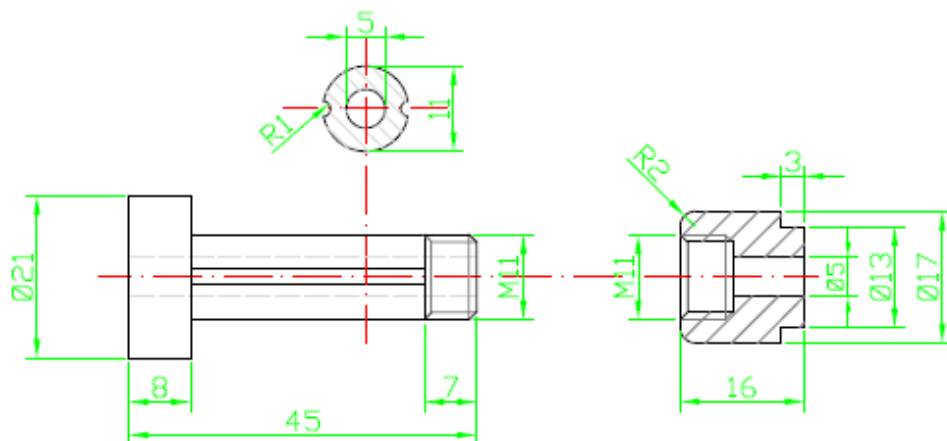
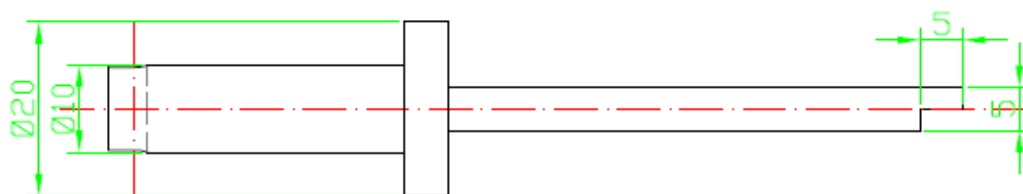
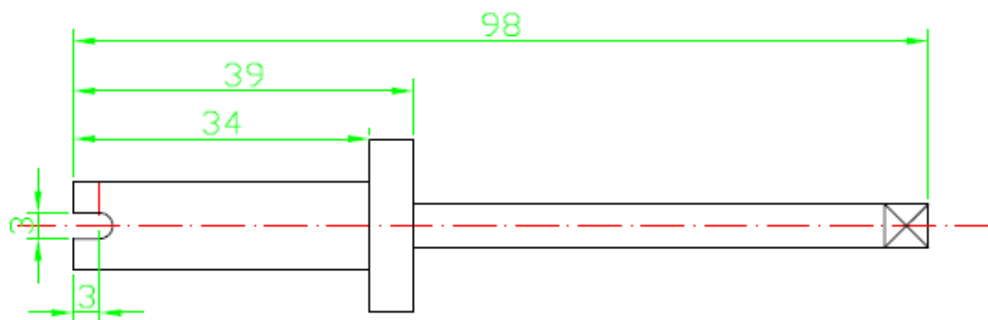
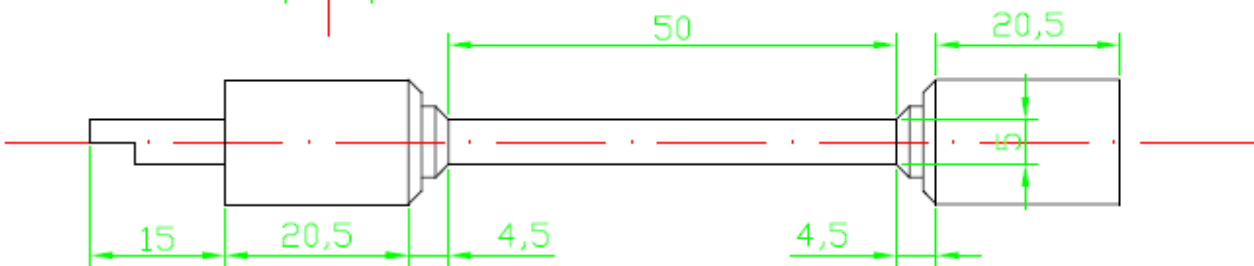
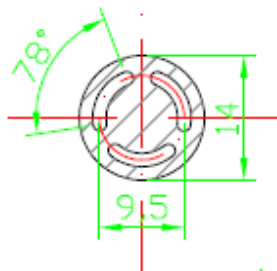
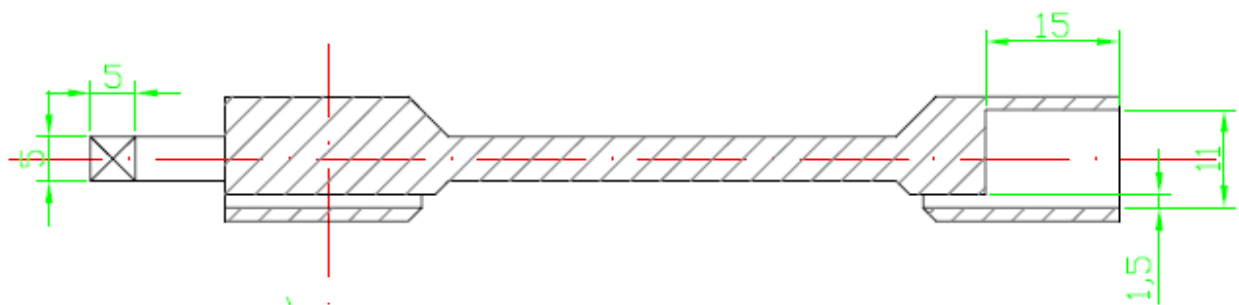
Infine, considerando che un alto grado di automazione nelle procedure garantisce sicurezza, affidabilità e riproducibilità dei risultati, è possibile prevedere un ricambio automatizzato anche del medium esterno al costruito ed un sistema di monitoraggio on – line dei parametri di coltura, riducendo gli interventi diretti dell'operatore sul bioreattore e favorendo il passaggio dal laboratorio all'ambito clinico.

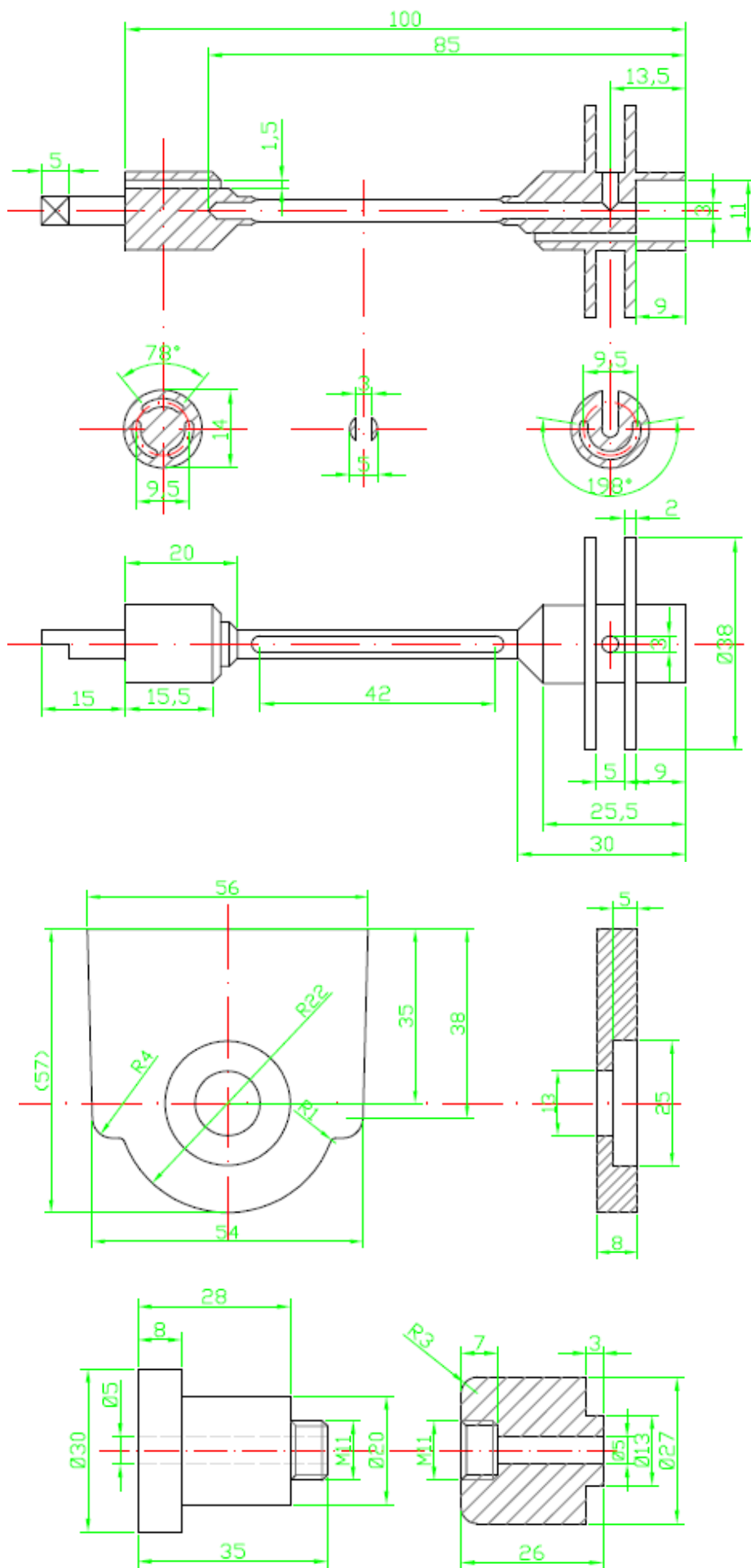
Appendice

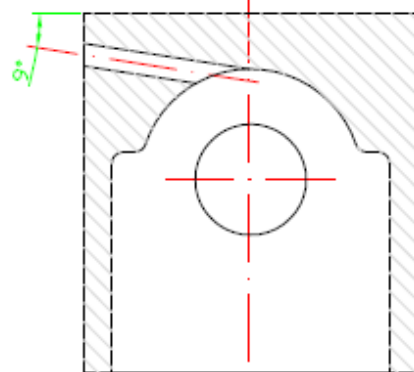
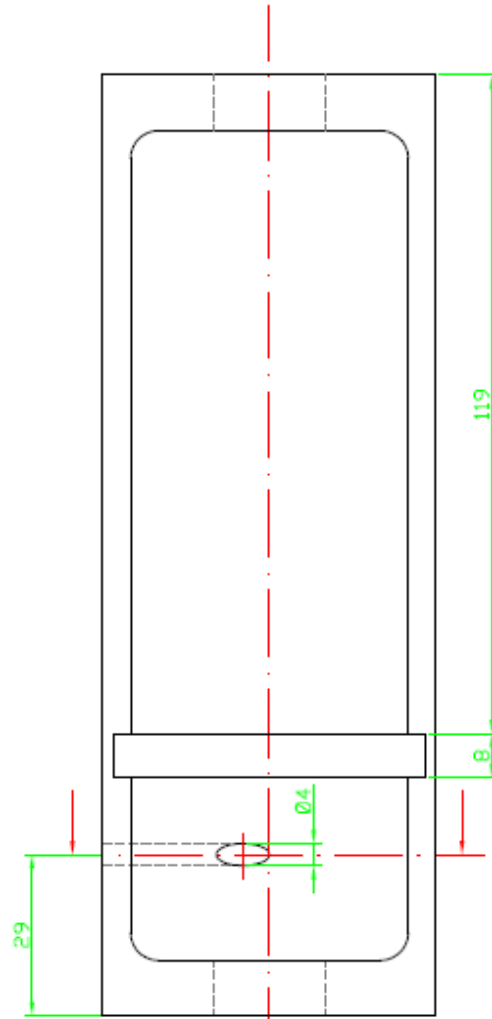
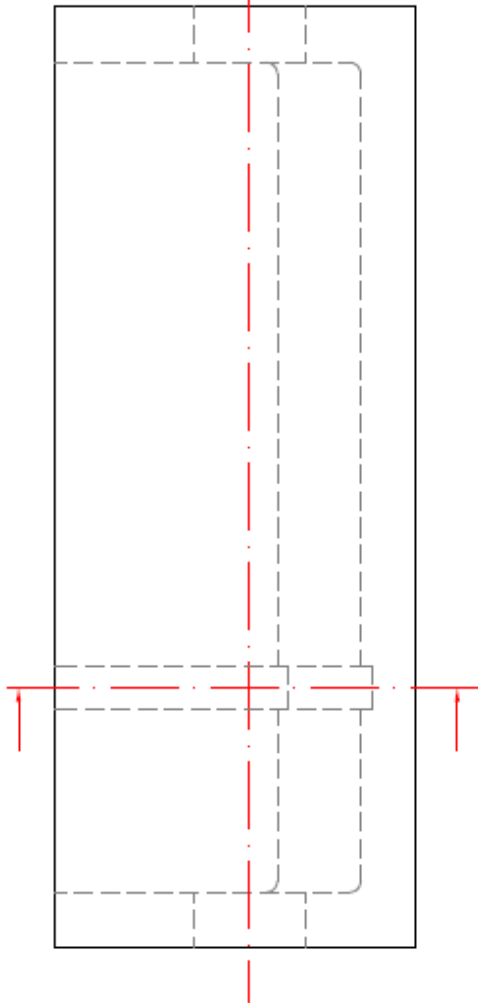
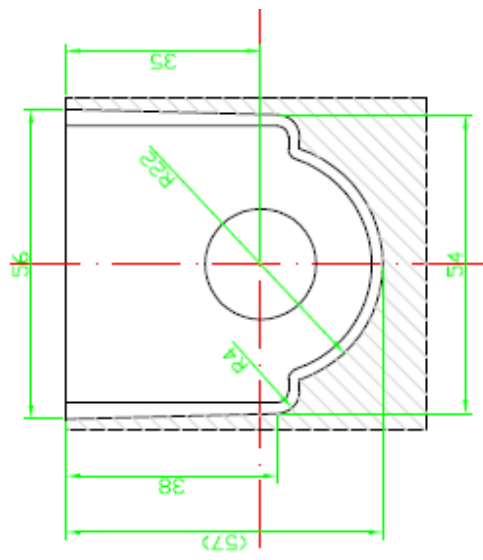
Disegni quotati dei progetti, realizzati in AutoCAD.











Bibliografia

Allender S., Scarborough P., Peto V., Rayner M., *European cardiovascular disease statistics*, 2008.

Arrigoni C. et al., *Rotating versus perfusion bioreactor for the culture of engineered vascular constructs based on hyaluronic acid*. **Biotechnol Bioeng.** 2008 Aug 1; 100 (5): 988-997.

Asnaghi M.A., *Ingegneria della cartilagine tracheale: progettazione e sviluppo di un bioreattore per la coltura dinamica e test cellulari in vitro*. **Tesi di laurea in Ingegneria Biomedica , Politecnico di Milano, A.A.2005-06.**

Ballotta V., Stefani I, *L'alternativa dell'ingegneria dei tessuti biologici alle protesi vascolari di piccolo calibro: sviluppo e valutazione di un bioreattore multifunzione*. **Tesi di laurea in Ingegneria Biomedica , Politecnico di Milano, A.A.2008-09.**

Bilodeau K. et al., *Design of a perfusion bioreactor specific to the regeneration of vascular tissues under mechanical stresses*. **Artif Organs.** 2005 Nov; 29(11): 906-912.

Chrysanthi W. et al., *Perfusion bioreactor for small diameter tissue-engineered arteries*. **Tissue Eng.** 2004 May-Jun; 10 (5-6): 930-941.

Dionigi R, *Chirurgia*. **Masson 1995, Milano: 687-691.**

Freed LE et al., *Frontiers in tissue engineering. In vitro modulation of chondrogenesis.* **Clin Orthop Relat Res 1999; 367 Suppl: S46-S58.**

Freyria AM et al., *Optimization of dynamic culture conditions: effects on biosynthetic activities on chondrocytes grown in collagen sponges.* **Tissue Eng 2005; 11 (5/6): 674-684.**

Grillo HC, *Tracheal replacement: a critical review.* **Ann Thorac Surg 2002; 73: 1995-2004.**

Grillo HC, *Tracheal replacement. In: Surgery of the trachea and bronchi.* **Grillo HC (Ed.) Bc Decker Inc. 2004, Hamilton: 839-854.**

Guyton A. C., Hall J. E., *Fisiologia medica.* **Ed. EdiSES 2004.**

Hoerstrup S. P. et al., *Tissue engineering of small caliber vascular grafts.* **European Journal of Cardio-thoracic Surgery 2001; 20 (1): 164-169.**

Isenberg B., Williams C., Tranquillo R., *Small-Diameter Artificial Arteries engineered in vitro.* **Circ Res. 2006; 98:25-35.**

Martin I et al., *Method for quantitative analysis of glycosaminoglycan distribution in cultured natural and engineered cartilage.* **Ann Biomed Eng 1999; 27: 656-662.**

Martin I et al., *The role of bioreactors in tissue engineering.* **Trends in Biotech 2004; 22 (2): 80-86.**

McCulloch A. D. et al., *New multi-cue bioreactor for tissue engineering of tubular cardiovascular samples under physiological conditions.* **Tissue Eng. 2004 Mar-Apr; 10 (3-4): 565-573.**

McFetridge P. S. et al., *Vascular tissue engineering: Bioreactor design considerations for extended culture of primary human vascular smooth muscle cells*. **ASAIO Journal** 2007; Sep-Oct;53(5):623-630.

Mironov V. et al., *Perfusion bioreactor for vascular tissue engineering with capacities for longitudinal stretch*. **Journal of Craniofacial Surgery** 2003; 14 (3): 340-347.

Nasseri B. A. et al., *Dynamic rotational seeding and cell culture system for vascular tube formation*. **Tissue Engineering** 2003; 9 (2): 291-299.

Novelli S., Pensa G., *Scaffold tridimensionali porosi ed esempi di applicazioni*. **Tesi di laurea di primo livello in Ingegneria Biomedica , Politecnico di Milano, A.A.2006-07**.

O'Cearbhaill E. O. et al., *Response of mesenchymal stem cells to the biomechanical environment of the endothelium on a flexible tubular silicone substrate*. **Biomaterials** 2008; 29: 1610-1619.

Orr D. E. et al., *Design of a modular bioreactor to incorporate both perfusion flow and hydrostatic compression for tissue engineering applications*. **Ann Biomed Eng.** 2008 Jul; 36 (7): 1228-1241.

Palsson B. Ø., Bhatia S. N., *Tissue Engineering*. **Ed. Pearson, Prentice Hall Bioengineering 2004**.

Pietrabissa R., *Biomateriali per protesi e organi artificiali*. **Ed. Pàtron**.

Shoen F.J., Blood vessels, *Robbins pathologic basis of disease*. 1994, **R.S. Cotran, V. Kumar, S.L. Robbins eds**.

Sodian R. et al., *Tissue-engineering bioreactors: a new combined cell-seeding and perfusion system for vascular tissue engineering*. **Tissue Engineering** 2002 Oct; 8 (5) : 863-870.

Soletti L. et al., *A seeding device for tissue engineered tubular structures*. **Biomaterials** 2006; 27: 4863-4870.

Vunjak-Novakovic G et al., *Bioreactor studies of native and tissue engineered cartilage*. **Biorheology** 2002; 39: 259-268.

Walles T et al., *Expansion of chondrocytes in a three-dimensional matrix for tracheal tissue engineering*. **Ann Thorac Surg** 2004; 78: 444-449.

Wood DE, *Airway stenting*. **Chest Clin North Am** 2003; 13: 175-191.