

POLITECNICO DI MILANO

Corso di Laurea Specialistica in Ingegneria Biomedica

Dipartimento di Bioingegneria



**RIGENERAZIONE DI ORGANI IN VITRO:
PROGETTO E SPERIMENTAZIONE DI
METODICHE PER LA DECELLULARIZZAZIONE
E RICELLULARIZZAZIONE DEL RENE**

**Relatore :
Prof. Manuela Teresa Raimondi**

**Correlatore :
Prof. Andrea Remuzzi**

**Tesi di Laurea di
Sarah Natalia Mapelli
Matricola 750540**

Anno Accademico 2010/2011

...Ai Compagni di Questo Viaggio...

Lentamente muore
chi non capovolge il tavolo,
chi è infelice sul lavoro,
chi non rischia la certezza per l'incertezza,
per inseguire un sogno,
chi non si permette almeno una volta nella vita
di fuggire ai consigli sensati

[Martha Medeiros]

ABSTRACT *Italiano*

Nell'ingegneria dei tessuti le ricerche più ambiziose sono quelle che si pongono l'obiettivo della rigenerazione di interi organi. Vi sono attualmente molteplici ricerche che stanno continuando a dimostrare che questo progetto, al limite della credibilità per le difficoltà evidenti con cui si deve scontrare, è un traguardo meno distante delle aspettative.

L'importanza che il successo della rigenerazione degli organi avrebbe per la soluzione di svariate patologie è scontata; la possibilità di ricostruire in vitro degli organi di "ricambio", geneticamente compatibili con i pazienti a cui sono destinati, costituirebbe la svolta per tutte le problematiche fino ad ora riscontrate nei trapianti: la disponibilità degli organi, le condizioni degli stessi nel momento di raggiunta del paziente e la terapia immunosoppressiva.

Il rene è l'organo che ad oggi sembra aver ottenuto meno successi in questo settore. La sua complessità strutturale, funzionale e di composizione biologica determina la criticità della sua rigenerazione.

Questo obiettivo prevede diverse fasi: la decellularizzazione dell'organo, per ottenere una matrice extracellulare integra da utilizzare come "scaffold" per la semina e la coltura di nuove cellule; la ricellularizzazione, utilizzando cellule autologhe (endoteliali o staminali a pluripotenza indotta) o staminali embrionali allogeniche, infine il ripopolamento, che implica la proliferazione e il differenziamento (in caso di cellule precursore).

In questo lavoro ci si è soffermati sulle prime due fasi, quelle cioè di decellularizzazione e ricellularizzazione del rene. Si sono progettati e realizzati dei dispositivi per la costituzione di un sistema di perfusione e di controllo dei processi e si sono ottimizzate le metodiche e i protocolli per l'ottenimento di risultati incoraggianti e ripetibili.

In conclusione all'attività sperimentale, gli esiti ottenuti, che mostrano matrici perfettamente integre e decellularizzate e una omogenea distribuzione delle cellule di nuova immissione, hanno dimostrato che tali obiettivi sono stati conseguiti, aprendo la strada alle fasi successive della ricerca.

ABSTRACT *English*

In the field of tissue engineering, the most ambitious researches are without doubts the ones which propose the aim of full organs regeneration. Today there are lots of studies that are proving day by day that this project, in which nobody could believe because of the obvious difficulties and obstacles against its results, that the goal is closer than expected.

It's clear the big impact that its success could have in solving many diseases and late stage pathologies; the chance of having genetically compatible "recycled" organs could mean the turning point for all the problems linked with transplantations: organs availability, critical conditions of the grafts when they reach the receiver and immunosuppressive therapy.

The kidney seems to be the organ which gained less success in this field. Its structural, functional and components complexity represents the main difficulty for its regeneration.

The goal of regeneration includes different steps: decellularizing the kidney, in order to obtain an intact as possible ECM matrix, the infusion of new cells in the previously obtained scaffold (choosing among endothelial cells, inducted pluripotent cells or embrional stem cells). The last step is the complete recellularization of the organ, step that involves cells proliferation and differentiation, if using precursor cells.

This work is focused on the first two defined steps: the decellularization and the recellularization of kidneys.

Special devices have been designed and realized for the constitution of a perfusion and control system to allow the procedures. Than we focused on methods and protocols for the obtaining of encouraging and standardized results.

In conclusion to the experimental activity, all earned results which showing completely intact and decellularized matrix and an homogeneous distribution of cells in all the structures, demonstrated that the aim of the work was reached, opening the field to the last steps of the research

SOMMARIO *Italiano*

Il presente elaborato è stato redatto sulla base dell'attività sperimentale svolta presso l'Istituto Mario Negri di Bergamo, nel laboratorio di Bioingegneria dei Tessuti.

Il lavoro di ricerca svolto si inserisce all'interno di un progetto più ampio, che si pone l'obiettivo della "Rigenerazione Completa del Rene"; lo stadio qui presentato ha avuto come meta il raggiungimento di un metodo validato e ripetibile per l'ottenimento delle sole fasi iniziali: la Decellularizzazione e la Ricellularizzazione.

Per l'ottenimento di questo risultato è stato necessario suddividere il lavoro in diverse fasi correlate: un primo studio bibliografico, ha permesso di conoscere, valutare e analizzare le ricerche affini annoverate in letteratura scientifica, con i loro sviluppi, che ogni giorno conquistano straordinari successi. Contemporaneamente si è approfondita la conoscenza anatomica e funzionale del rene, l'organo di interesse per questo lavoro, la sua composizione in termini strutturali e molecolari, i suoi complessi sistemi di regolazione che ne permettono la funzionalità.

Una seconda fase, nata dalla rielaborazione delle informazioni bibliografiche, ha visto la progettazione e la realizzazione dei dispositivi costituenti il sistema sperimentale e delle metodiche, utilizzabili nell'attività pratica di Decellularizzazione e Ricellularizzazione.

Si è scelto di perseguire lo scopo con il metodo della perfusione di soluzioni chimiche e enzimatiche, infuse direttamente nelle vie d'accesso all'organo, cioè iniettate tramite un circuito di perfusione in linea con l'arteria. Si è organizzato un sistema a circuito chiuso, decidendo di far ricircolare i fluidi dalla camera di perfusione contenente il rene.

A questo stadio del lavoro, in realtà, non si può far corrispondere una conclusione: l'ottimizzazione del sistema e delle procedure è stata sviluppata nel corso di tutte le successive fasi, un'operazione in progressione continua, l'evoluzione modulata dall'ottenimento stesso dei risultati che ne conseguivano.

Pertanto, la fase sperimentale, la terza parte dello studio ha avuto inizio con la costituzione di un sistema di perfusione "preliminare", basato su dispositivi preesistenti, preventivamente sviluppati al fine della decellularizzazione del rene. Questi, congiuntamente alla strumentazione disponibile in laboratorio, sono stati utilizzati come prototipo per delle prime prove pratiche, che hanno evidenziato le difficoltà delle operazioni e i requisiti necessari per la realizzazione di altri dispositivi più funzionali allo scopo.

Solo dopo la realizzazione del nuovo sistema, costituito da una camera e un circuito di perfusione, una pompa e un trasduttore di pressione collegato ad un sistema di acquisizione multicanale, si è dato inizio all'esecuzione degli esperimenti valutati.

Lo sviluppo dei protocolli ha avuto un'evoluzione affine: si è iniziata la sperimentazione utilizzando delle sequenze di detergenti e soluzioni estrapolati dalla letteratura, per poi arrivare a validarne delle nuove combinazioni, valutandone di volta in volta i vantaggi e gli aspetti negativi, tendendo al metodo ottimale per l'integrità della matrice extracellulare associata alla completa rimozione della componente cellulare originaria e la redistribuzione omogenea e efficace delle nuove cellule iniettate.

Le osservazioni empiriche sono state i criteri di valutazione sulla base di cui di volta in volta si è proceduto a modificare il sistema, i protocolli e le metodiche.

Nel corso dell'attività vi sono state diverse fasi di raccolta e analisi dei risultati, che hanno segnato volta per volta l'orientamento della ricerca.

Questo procedimento, una sorta di retroazione dei materiali e dei metodi in funzione degli esiti sperimentali, si è rivelato funzionale all'ottenimento dello scopo prefisso: il continuo avvicinamento dei risultati fino al raggiungimento del "golden standard", che ha permesso così di validare il sistema ottimale per la Decellularizzazione e la Ricellularizzazione del rene.

Per poter descrivere in modo chiaro e sequenziale questo lavoro, in cui per la natura del procedimento seguito ogni fase risulta strettamente intrecciata alle altre, si è deciso di suddividere la ricerca in quattro parti, nel rispetto di un'organizzazione tradizionale dei lavori scientifici in *una parte introduttiva* e una di *descrizione dei materiali e dei metodi*. Successivamente si sono riassunti in una terza parte i *risultati*.

Infine, nell'ultima sezione, quella di *discussione e sviluppi futuri*, si sono commentati i risultati ottenuti e si sono affrontate le problematiche aperte per il proseguimento della ricerca.

Si vuole brevemente descrivere il contenuto delle quattro sezioni, da cui è composto l'elaborato, divise per capitoli, evidenziandone i punti rilevanti al fine della comprensione del lavoro di ricerca che sottende.

PARTE I-INTRODUZIONE

Il capitolo 1

Descrive brevemente la struttura dell'elaborato, inserendolo nel contesto del lavoro sperimentale svolto presso il Laboratorio di Bioingegneria dei Tessuti dell'Istituto Mario Negri.

Il capitolo 2

Si pone l'obiettivo di introdurre il campo di ricerca, cioè la rigenerazione di interi organi in vitro, definendone i principi su cui si basa; in particolare si descrivono e si motivano le scelte di utilizzare la matrice extracellulare come "scaffold" per la semina e coltura di nuove cellule, geneticamente compatibili con il destinatario dell'organo stesso.

Facendo poi riferimento alle molteplici ricerche attualmente in corso e i cui risultati sono disponibili in letteratura, si descrive lo "Stato dell'Arte"; si riportano a questo proposito i successi attuali della rigenerazione del Cuore, primo organo a cui è stata dedicata la proposta di riproduzione in vitro. La sua ricostruzione pressoché completa è validata dalle prime risposte funzionali dell'organo agli stimoli, elettrici e meccanici.

Viene poi descritta la situazione della ricerca sul polmone, che ha mostrato di recente di essere in grado di ripopolare completamente un organo che sappia affrontare se correttamente stimolato delle ventilazioni autonome, seppur di breve durata.

Infine si cita il caso del fegato; una volta superate le difficoltà inerenti le problematiche del trasporto di nutrienti (problema particolarmente rilevante a causa dei consumi elevati delle cellule epatiche), diversi studi hanno mostrato di saper rigenerare organi capaci di rilasciare sostanze tipiche della funzionalità epatica.

Il capitolo 3

E' dedicato specificamente al Rene, l'organo di interesse per l'intero lavoro. Vengono trattate prima di tutto le patologie renali, le disfunzioni da esse provocate e le soluzioni

attualmente percorribili: trattamento dialitico e trapianto.

Di questa seconda tecnica, ad oggi ritenuta quella con migliori risultati, si descrivono le problematiche principali, che ne limitano l'efficacia: la scarsa disponibilità degli organi, che porta spesso alla morte dei pazienti in lista d'attesa, la perdita di funzionalità del "graft" e la terapia immunosoppressiva cronica, correlata a molti effetti collaterali e complicanze quali come osservato recentemente, l'aumento di incidenza dei tumori.

Questi fattori possono essere risolti dalla possibilità di rigenerazione del rene.

Si descrivono poi l'anatomia, la sua struttura, la composizione e la funzione del rene; la sua complessità, che ne permette la sofisticatezza del sistema di controllo, ne costituisce la difficoltà per la rigenerazione.

La conoscenza della morfologia e dei meccanismi di funzionamento è fondamentale per poter intraprendere gli studi sulla sua ricostruzione in vitro.

Si riportano infine i possibili metodi per ottenere la Decellularizzazione efficace e la Ricellularizzazione dell'organo, in particolare si descrivono i detergenti utilizzabili al variare dell'effetto degradante per le cellule originarie e in seguito i tipi di cellule considerabili per il ripopolamento.

Il capitolo 4

Affronta l'indagine bibliografica sullo "Stato dell'Arte" del progetto di interesse: la Decellularizzazione e Ricellularizzazione del rene. Si riportano i soli casi presenti nella letteratura scientifica: un progetto affronta il danneggiamento di diversi detergenti su sezioni in immersione; un lavoro studia la decellularizzazione del rene porcino seminato in seguito con cellule endoteliali.

L'ultimo studio, quello di maggior rilievo per l'affinità alla ricerca di questa tesi, è quello pubblicato dal gruppo californiano di "Ross et al", nel quale si espongono i risultati della decellularizzazione del rene di ratto con una sequenza di soluzioni e la ricellularizzazione con cellule staminali embrionali murine.

I risultati mostrati sono stati utilizzati in seguito come termine di confronto.

Il capitolo 5

Sottolinea alla luce delle informazioni di natura bibliografica gli obiettivi del lavoro:

- La progettazione e realizzazione del sistema di Decellularizzazione e Ricellularizzazione in tutti i suoi componenti e la successiva realizzazione

- L'ottimizzazione dei protocolli e delle metodiche per la sperimentazione

PARTE II- MATERIALI E METODI

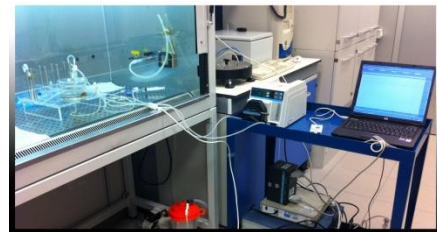
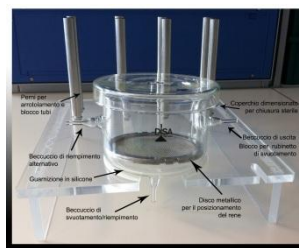
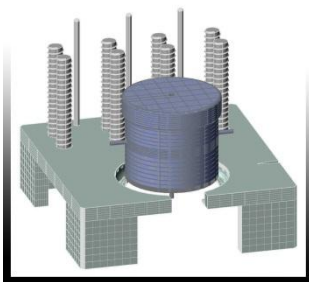
Il capitolo 6

E' dedicato al sistema di perfusione. Se ne descrive rapidamente il "concept" e se ne individuano i componenti principali, suddivisi in "Camera di Perfusione", "Circuito di Perfusione" e "Strumentazione".

Vengono chiarite preventivamente le condizioni iniziali: si mostra il sistema preliminare, allestito semplicemente utilizzando dispositivi già disponibili. Si analizza la funzionalità di questo nello svolgimento di alcune prove sperimentali, che hanno evidenziato le problematiche relative ad ogni componente. L'analisi ha condotto alla stesura dei requisiti fondamentali per la progettazione.

Si sono pertanto espresse le linee guida per lo sviluppo dei prototipi.

Infine si sono descritte le soluzioni realizzative scelte e si è mostrato il prodotto finale ottenuto: il sistema di perfusione utilizzato nelle prove sperimentali, camera di perfusione, supporto rigido, circuito, pompa, trasduttore di pressione e sistema di acquisizione.



Il Capitolo 7

Descrive invece le procedure ottimizzate nel corso della sperimentazione: i protocolli utilizzati e le metodiche per il compimento delle attività necessarie per le fasi di "Prelievo e Alloggiamento del rene", "Preparazione del circuito", "Decellularizzazione" e "Ricellularizzazione" e "Analisi biologiche".

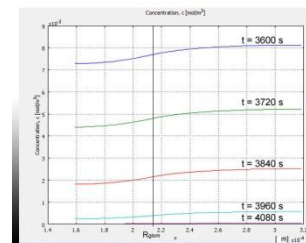
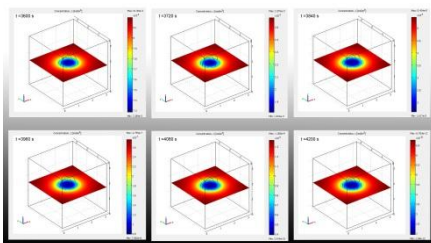
I metodi sono redatti nella forma più consona alla ripetibilità e standardizzabilità.

In seguito vengono sviluppati i modelli teorici in risposta al problema rilevato nella metodica di “Incubazione delle cellule”. Si è affrontato il problema del trasporto di nutrienti alle cellule reimmesse nei glomeruli per l’esigenza di bilanciare il tempo di incubazione statica per favorire l’adesione delle cellule e quello massimo consentito per la sopravvivenza delle stesse in condizioni di ipossia.

Sono stati sviluppati dei modelli a partire da dati sperimentali, per il calcolo della densità cellulare, del coefficiente di diffusione dell’ossigeno nella matrice decellularizzata; si è calcolato il tempo di sopravvivenza in condizioni statiche nell’ipotesi di consumo cellulare di ordine zero.

Infine si è determinato lo stesso valore nelle ipotesi di consumo cellulare concentrazione-dipendente, utilizzando le leggi di conservazione della massa e quella di Michaelis-Menten. Il modello è stato successivamente studiato con l’utilizzo di “Comsol Multiphysics”, software predisposto per la computazione di problemi dinamici con il metodo degli elementi finiti.

Si è dimostrato in questo modo la durata critica di statico di un’ora, tempo entro cui la concentrazione di ossigeno, in base alle ipotesi fatte, scende sotto il valore per cui le cellule riducono l’attività metabolica al 20%.



Il capitolo si conclude con l’elenco degli esperimenti eseguiti, precisando per ognuno di essi il protocollo applicato e il fine della ricerca, in base a cui si sono applicate le scelte procedurali (Iniezione di colorante, Infusione di cellule, etc.).

PARTE III-RISULTATI

Il capitolo 8

Espongono tutti i risultati ottenuti nella ricerca: si analizzano quelli del sistema di

perfusione prodotto valutando la verifica dei requisiti richiesti in fase di progettazione per ogni singolo componente e quelli dei protocolli e delle metodiche messe a punto, rappresentati dagli esiti stessi degli esperimenti, ordinandoli in base al protocollo di decellularizzazione utilizzato, criterio prescelto per la maggior vicinanza ad una consecuzione cronologica.

Benché sia complicato osservare e confrontare univocamente gli esiti dei singoli esperimenti, a causa delle differenti procedure utilizzate, si sono riassunti in tabelle semplificative i metodi e i risultati, basati su parametri non sempre quantificabili e valutati qualitativamente, frutto di analisi visive, osservazioni microscopiche di istologie, monitoraggio delle iniezioni di colorante, conteggio delle cellule mantenute dopo l'infusione nella matrice e analisi dei tracciati di pressione.

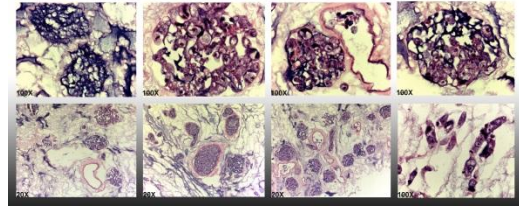
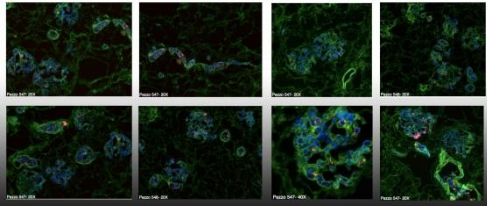
Gli esiti sono serviti a motivare le scelte delle indagini successive e contemporaneamente a monitorare l'evoluzione del percorso di ricerca.

PARTE IV-CONCLUSIONI

Il capitolo 9

Infine si sono voluti esporre e commentare tutti i risultati ottenuti: si è valutato il lavoro di progettazione e realizzazione del sistema di perfusione, indicandone il ruolo all'interno dei risultati sperimentali conseguiti e le problematiche aperte, specialmente nell'ottica delle fasi seguenti della ricerca. Poi si è voluto riflettere sulle metodiche, confrontando gli esiti degli esperimenti con le aspettative e con quanto raccolto dalle analisi bibliografiche.

In particolare valutando i risultati degli esperimenti effettuati con protocollo di Decellularizzazione D2 e di Ricellularizzazione R2, si è osservata la completa rimozione delle cellule originarie (mostrata nell'immunofluorescenza dall'assenza di marcature in solo Dapi, cioè non associate a quelle del PKH26 e nelle colorazioni di immunoistochimica dall'assenza di aloni in marrone-viola dell'Ematossilina), la conservazione della matrice e la Ricellularizzazione con alta numerosità cellulare e una distribuzione omogenea. Anche i filmati di monitoraggio dell'infusione di terreno di coltura e l'analisi dei tracciati ha permesso di riconoscere la metodica come ripetibile e efficace nell'ottenimento di queste due fasi.



Si sono in questo modo potuti decretare conseguiti gli obiettivi del lavoro, la validazione delle metodiche per le fasi di Decellularizzazione e Ricellularizzazione, basi certificate da cui poter proseguire per gli sviluppi futuri della ricerca, che si potranno avvalere di tecnologie nuove e già parzialmente sperimentate quali la Microtac e il SEM.

SUMMARY *English*

The present work has been based on the experimental activity made in the last months at Mario Negri Institute (branch of Bergamo), in Tissue Bioengineering department.

The research work took place in a wider project, which has as final goal the “Complete kidney Regeneration”. The stage here presented had the aim to find and describe a method that could allow to repeat and confirm the obtaining of the two first steps: Decellularization and Recellularization.

To reach this goal it has been necessary to divide all the work in different related stages: A bibliographical study has supplied the knowledge about closer research studies, which are published with their successes in the scientific literature, and that provide day by day exciting new results.

At the same time the anatomical and functional knowing of the kidney has been deepened.

The kidney is the organ of interest for the entire work, its structural and molecular components, its detailed and complicated regulatory systems that allow its own functionality were observed.

A second stage of the work, generated by processing all the previously collected information, was done through design and assembly of all the needed devices that were necessary for the setup of the experimental system. It has been necessary to establish all the procedures that have later been adopted in the experimental activity, optimizing them.

We decided to pursue the goal of Decellularization and Recellularization with the perfusion of different kinds of chemical solutions, injected directly into the organ through its main arteries.

We opted for a closed-circuit- system, in order to recycle all the fluids on the inside from the chamber to the kidney.

Optimization of the entire system and of the followed methods has been developed all the activity long, throughout for all the other stages. It has been a continuous work in progress modulated from the same results.

Therefore the practical experimental phase, the third part of the study started with the constitution of a preliminary perfusion system, based on already existing devices, a

previously planned bioreactor, a simple tubing system and an old peristaltic pump and a membrane pressure transducer.

All these components were used as a prototype for the first practical test, that was made in order to achieve a better understanding of all the operational difficulties that could be faced during the experiment. These difficulties provided also a starting point in the design of new components.

Only after the production and the assembly of the new system, made by a transparent glass chamber, connected with a tubing system, an inserted compliance, a pump and a pressure transducer linked in a multichannel acquisition system, we started with the evaluated experimental activity.

Protocol development had a similar evolution: we started experiments with basic protocols, a solutions sequence took from the scientific literature and after different trials we evaluated the best combination for the extracellular matrix integrity with the best degree of old cellular components removal and the most homogeneous new ones distribution.

All the empiric observations were the parameter on what we based the setup of the system, the protocols and the procedures adjustments.

In course of the work we alternated phases of data harvesting that directed time after time the research path.

This way of proceeding, a continuous modifying of materials and methods revealed itself as a good strategy in the obtaining of the final goal; we were able this way to validate an optimal solution for Decellularizing and Recellularizing the kidney.

To describe this work that is organized in phases closely weaved one to the other, it has been decided to divide the complete research in four parts complying with the traditional organization structure of scientific works.

The first one has been dedicated to the *introduction* of the field, the second one to *materials and methods* description, while the third part collects all obtained *results*.

Finally, the last part contains a *discussion* about the results and *future developments*, looking forward to the next steps of the long following open research.

We want now describe concisely all contents in the four parts composing the text, highlighting all the relevant point in each of them to allow an easy comprehension of the entire research work.

PART I-INTRODUCTION

Chapter 1

Here we describe shortly the text structure, introducing it in the experimental work context at Mario Negri Institute, in Tissue Bioengineering department.

Chapter 2

Here we want to introduce the research field, in terms of “Full Organ regeneration” and defining all the principles it is based on; particularly it is described and justified the choice regarding the use of the ECM matrix as a scaffold for the new and genetically compatible cells seeding and culture.

Referring then to the various researches whose results and developments are presented in actual scientific articles we describe the “State of Art”; recent successes about Heart regeneration are reported. Heart has been the first organ whose regeneration has been tried; its almost complete reconstruction has been demonstrated by the obtaining of the first functional answers to the appropriate electrical and mechanical stimulus.

After this the research about lung is described. These works showed to be able to fully regenerate the organ and to allow it to face up to short autonomous ventilation when stimulated.

In conclusion we reported the case of the liver; in the last research published, once got over the nutrients transport problems because of the very high consumption values of Hepatocytes, they demonstrated to be capable of regenerating organs that have been able to deliver specific hepatic substances.

Chapter 3

This chapter has been dedicated specifically to the kidney. At first we treat renal failure pathologies, with special regard to the chronic ones; then we report the clinical solutions: dialysis treatments and transplantations.

About this second solution, today considered the best one for assuring a best quality and duration of life, we describe the main problems: the meager availability of donors, which lead often to the death of patients in the waiting list, the functionality losing of the graft depending on its conditions at transplantation time and chronic immunosuppressive therapy. The last one is linked to many collateral effects, like the recently demonstrated connection to tumor increase.

All this problems could be easily solved by kidney regeneration for transplantation use. Then kidney anatomy, structure, composition and function were described, its complexity which leads to the very fine control system, is at the same time the reason of the difficulty in its regeneration.

Knowledge about its morphology and its functioning internal mechanism is fundamental to start its reconstruction project.

After this we reported all possible way to decellularize and recellularize efficiently the all organ, particularly are described all detergents and cell lines and phenotypes helpful for the aim.

Chapter 4

In this chapter we deal with the State of Art about the interest project: Kidney decellularizing and recellularizing.

A first work was made to find the damaging of monkey kidney slices in relation with the immersion in different solutions.

Another study was referred to the decellularization of a porcine kidney, than seeded in perfusion with endothelial cells.

The last research reported the closest one to our interest work was published by the Californian group "Ross et al". In their study they explain the results of rat kidney decellularization with a solutions sequence and its recellularization by seeding in perfusion embryonic stem cells.

All these results have been used to compare ours.

Il capitolo 5

In this chapter, after displaying all the collected informations, we underline all work objectives

- The designing and the achievement of the perfusion system with all its components
- The optimizing of protocols and procedures

PART II- MATERIALS AND METHODS

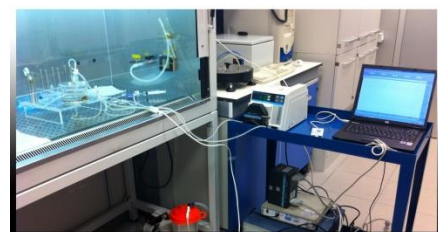
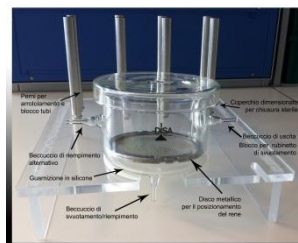
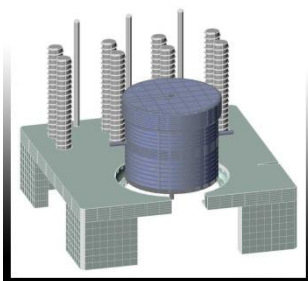
Chapter 6

In this chapter we describe the perfusion system. We start defining its “main concept” and the main components: “Perfusion Chamber”, “perfusion Circuit”, “Technological instrumentations”.

At first we clear up the initial conditions: we describe the preliminary assembled system, composed by the simple already available devices. Functionality of this system is analyzed while testing it with experimental trials that highlighted all the criticisms every component had. In this way we could fill a list of requirements to satisfy planning the new devices.

All the guide-lines for the development of the new system prototypes were expressed.

Finally we described all the productive solutions we opted for and the final product was shown: the perfusion system to be used in the experimental activity, structured in a perfusion glass chamber, a stiff support, a tubing systems with luer-lock s and luer-junctions, a pump and a new acquisition system multichannel used to register the pressure signal path.



Chapter 7

In this chapter all the optimized procedures and all the organized and used protocols in

the course of experimental activity were described.

Specifically we listed all the operations needed to carry out the different phases: “Kidney harvesting and positioning”, “Circuit staging”, “Decellularization”, “Recellularization” and “Biological analysis”

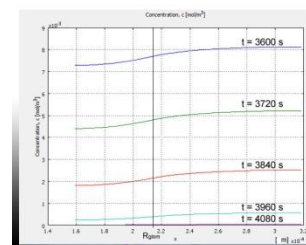
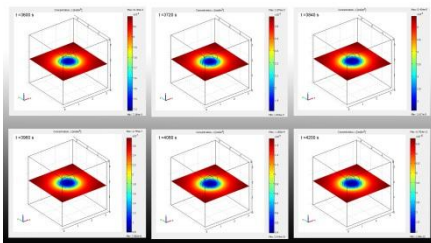
All the methods are developed in the way we found more suitable to standardize and repeat the experiments.

Subsequently we developed the theoretical models answering to the problem met in the “Seeded Kidney incubation” procedure: we face out the oxygen transport to the glomerular new cells. The need we met is balancing the time of static incubation to promote adhesion and adversely considering the maximum acceptable time to allow cells survival in hypoxia condition.

Models were developed starting from experimental data to calculate cells density, oxygen diffusion coefficient inside the decellularized matrix; we calculated the survival time in the hypothesis of cellular oxygen concentration-independent consumption.

Finally we developed the same value in the hypothesis of concentration-dependent consumption; we faced out at first the problem solving the mass conservation laws and Michaelis-Menten law. Subsequently the model was studied with computational software “Comsol Multiphysics”, which allowed solving dynamic problems with finite elements method.

We demonstrated the maximum acceptable duration of static incubation is 3600 seconds, time from the reaction that cause the oxygen concentration decrease under the critical value that corresponds to the reduction of cell metabolism at 20% of normal activity.



The chapter is concluded with the list of all made experiments, containing for each of them the applied protocols, the research aim it was done for.

PART III-RESULTS

Chapter 8

All the results are displayed in this chapter: at first we analyzed the ones related to the realized perfusion system, checking the satisfaction of previously expressed requirements. After this every protocol and procedure were evaluated, listing all the obtained results with the experimental activity.

The experiments are reported with the organization criteria of the used decellularization protocol, order closer to the chronological sequence.

Although it is not significant observing and comparing the experiments outcomes one to each other because of the different used procedures (for instance not every experiment was concluded with the cells seeding), the all results were collected in a simple table representing methods and observations. The results are based on not always quantifiable parameters often expressed in a qualitative way with a mark. The most of them derive from simple visual observations, microscopical histology analysis, colorant injection monitoring, cells count into the fluid after injection and pressure signal path checking.

All the outcomes were used in justifying following choices subsequently taken and in the monitoring of the research path evolution.

PART IV-CONCLUSIONS

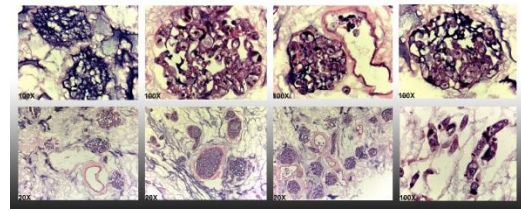
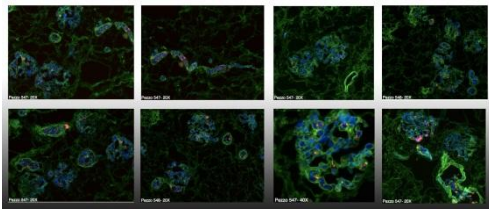
Chapter 9

In this chapter we comment all gained results, we evaluate the entire work done, starting from the projects, the realizations of devices answering to specific needs and their role in the carrying out of experimental activity and the still open needs, particularly looking at the future phases of the research. Then we reflect upon the methods: we compare the obtained experimental data with previous expectation as well as the literature reported results.

In particular, evaluating the results obtained with D2 and R2 protocols for decellularizing and recellularizing, we could observe a complete original cells removal (shown in immunofluorescences with the absence of blue dapi marked areas

not corresponding to red PKH26 signs as well as the absence of brown aloes in Ematossiline marked images), a perfectly conserved ECM matrix, a recellularization with high number of cells and homogeneous distribution.

All the registered movies monitoring medium injection and the pressure path analysis could prove the followed method is efficient and repeatable for decellularization-recellularization.



We could decree all the objective of this work achieved, we validated methods and instruments to decellularize and recellularize a rat kidney, offering certified bases to start with for the next steps and future developments of the research.

Research that could be prosecuted with new partially tested available technologies like Microtac and SEM.

INDICE

PARTE I-INTRODUZIONE

1. Sviluppo del lavoro	2
1.1. Struttura della tesi	2
1.2. Organizzazione del lavoro sperimentale	4
2. La rigenerazione di interi organi in vitro	6
2.1. Concetti fondamentali	6
2.2. Stato dell'arte, le ricerche attuali: ECM come “scaffold” e la ricellularizzazione di organi	8
2.2.1. La rigenerazione del cuore	11
2.2.2. La rigenerazione del polmone	12
2.2.3. La rigenerazione del fegato	13
3. La rigenerazione del rene in vitro	14
3.1. Le patologie renali e le terapie convenzionali	14
3.1.1. Il problema dei trapianti	17
3.2. La complessità del rene	22
3.2.1. Anatomia	22
3.2.2. Funzioni	26
3.2.3. Il sistema di controllo, modelli complessi da preservare	27
3.3. Soluzioni per la decellularizzazione	32
3.4. Soluzioni per la ricellularizzazione	36
4. Stato dell'arte	39
4.1. Metodi di decellularizzazione della matrice ECM renale, effetto dei detergenti	39
4.2. La rigenerazione del rene porcino con cellule endoteliali	40
4.3. La rigenerazione del rene di ratto con cellule staminali embrionali murine	41
5. Obiettivi del lavoro	43

PARTE II - MATERIALI E METODI

6. Realizzazione del sistema di Decellularizzazione- Ricellularizzazione	46
6.1. Condizioni preliminari	47
6.1.1. Camera di perfusione preliminare	47
6.1.2. Circuito di perfusione preliminare	49
6.1.3. Strumentazione preliminare	50
6.2. Progetto del sistema: problematiche e requisiti	52
6.2.1. Camera di perfusione: problematiche	52
6.2.2. Circuito di perfusione: problematiche	54

6.2.3. Strumentazione: problematiche	56
6.2.4. Requisiti per un nuovo sistema: linee guida di progetto	59
6.3. Realizzazione e ottimizzazione del sistema	64
6.3.1. Camera di perfusione: realizzazione	64
6.3.2. Circuito di perfusione: realizzazione	67
6.3.3. Scelta degli strumenti e metodi di calibrazione	70
7. Esperimenti di decellularizzazione-ricellularizzazione	75
7.1. Sviluppo dei protocolli sperimentali	76
7.1.1. Decellularizzazione	77
•Protocollo D1	77
•Protocollo D2	79
•Protocollo D3	79
•Protocollo D4	81
7.1.2. Ricellularizzazione	82
•Protocollo R1	82
•Protocollo R2	83
7.2. Sviluppo delle procedure sperimentali	84
7.2.1. Preparazione del circuito	84
7.2.2. Prelievo del rene	86
7.2.3. Alloggiamento	86
7.2.4. Decellularizzazione	87
•Lavaggi in circuito chiuso	87
•Lavaggi in circuito aperto	88
•Iniezione di colorante	89
7.2.5. Ricellularizzazione	90
•Iniezione delle cellule	90
•Trasporto in incubatore	91
•Perfusione in incubatore	91
7.2.6. Analisi biologiche	92
•Sezionamento	92
•Inclusioni e tagli	92
•Colorazioni	95
7.3. Modelli per l'ottimizzazione delle procedure di incubazione: la durata dell' incubazione statica	97
7.3.1. Calcolo della densità cellulare	98
7.3.2. Determinazione del coefficiente di diffusione	100
7.3.3. Calcolo del tempo di sopravvivenza in condizioni statiche	106
•Ipotesi di consumo di ordine zero	106
•Ipotesi di consumo concentrazione-dipendente	110
7.4. Organizzazione degli esperimenti	122
PARTE III - RISULTATI	
8. Risultati	131
8.1. Valutazione del sistema di perfusione, risultati operativi	132

8.2. Esiti degli esperimenti di Decellularizzazione e Ricellularizzazione	147
8.2.1. Esperimenti realizzati con protocollo D1	148
8.2.2. Esperimenti realizzati con protocollo D2	156
8.2.3. Esperimenti realizzati con protocollo D3	170
8.2.4. Esperimenti realizzati con protocollo D4	179
PARTE IV – CONCLUSIONI	
9. Discussione e sviluppi futuri	185
9.1. Il sistema realizzato, i materiali e i metodi, vantaggi e problematiche aperte	185
9.2. Analisi dei risultati sperimentali, confronti con le aspettative e la letteratura	192
9.3. Conclusioni e sviluppi futuri: nuovi mezzi, nuovi obiettivi e una ricerca ancora aperta	194
BIBLIOGRAFIA	197
APPENDICE 1	
Preparazione delle soluzioni	202
APPENDICE 2	
Tavole tecniche	208

PARTE I-INTRODUZIONE

1. SVILUPPO DEL LAVORO

1.1. Struttura della tesi

Questa tesi riassume il lavoro svolto presso il laboratorio di ingegneria dei tessuti all'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri di Bergamo nell'ambito del progetto per la rigenerazione in vitro del rene.

La struttura del presente lavoro è costituita da una prima parte in cui si espongono le problematiche attuali nell'ambito dei trapianti come unica terapia risolutiva per diverse patologie croniche a carico degli organi e dall'importantissima speranza creata dalla medicina rigenerativa con il supporto tecnico dell'ingegneria dei tessuti.

Si è svolto quindi un lavoro bibliografico attraverso la letteratura più recente sulle ricerche parallelamente svolte da diversi gruppi internazionali sull'ingegneria di molteplici tessuti in coltura su "scaffold" di origine naturale, in particolare su quelli ottenuti per decellularizzazione della matrice extracellulare; a quest'ultima sono riconosciute le proprietà interattive con le componenti cellulari, nella migrazione, nell'adesione, nella proliferazione e nel differenziamento, oltre al ruolo strutturale di sostegno, consistenza e protezione degli organi.

Si sono analizzate le ricerche più attuali nel settore, quelle animate dalla meravigliosa ambizione di ricreare gli organi in vitro. E si sono ammirati i risultati sorprendenti che molte di queste ricerche hanno raggiunto.

Si è poi esaminato il rene, le patologie che lo riguardano, che nella maggior parte dei casi non offrono soluzioni definitive e compatibili con una buona qualità della vita.

Per comprendere la complessità dell'obiettivo che ci si è posti, si sono individuate le sue funzioni e la sua anatomia, responsabile delle sofisticate soluzioni di ingegnerizzazione dei sistemi complessi naturali.

Partendo ancora una volta dalla letteratura, dai risultati di coloro che in precedenza si sono cimentati nella missione di rigenerare questo organo, si sono osservate le problematiche relative alla decellularizzazione con i diversi metodi proposti, nel sempre primario obiettivo di mantenere intatta una architettura tanto complessa e raffinata.

Successivamente si sono descritte le difficoltà rilevate da un primo approccio sperimentale al progetto e le soluzioni proposte, sulla base di cui si sono realizzati una

camera e un circuito di perfusione progettati per consentire un lavoro quanto più semplice possibile nel rispetto degli obiettivi e della GLP, la “Good Laboratory Practice”.

Sono stati studiati gli strumenti a disposizione, indispensabili per l'attuazione dei progetti e per analizzarne i risultati.

Si sono redatti dei protocolli, discussi e modificati, guidati di volta in volta dai risultati ottenuti, affrontando continuamente la problematica della variabilità biologica, che impone il rischio di fraintendimento dei dati collezionati esperimento dopo esperimento. Sono stati costruiti dei modelli teorici a partire da dati sperimentali in risposta a delle esigenze procedurali a cui si è arrivati nel corso degli esperimenti: determinare le tempistiche consentite ai protocolli dalle leggi naturali del trasporto dei nutrienti e dal comportamento cellulare.

Si sono riportati poi i dati relativi agli esperimenti svolti indicandone gli obiettivi, i metodi e i risultati, con le riflessioni che di volta in volta ne sono conseguite.

Infine, alla luce del percorso sperimentale svolto sono state tratte le considerazioni relative alla ricerca, alle problematiche irrisolte e alle soluzioni prospettate per le future indagini, con una nuova discussione delle scelte tecniche e tecnologiche nell'obiettivo continuo del miglioramento.

1.2. Organizzazione del lavoro sperimentale

La ricerca si è svolta nell'ambito di un progetto tanto importante quanto lungo, pertanto il lavoro svolto può solo vantare di avere raggiunto una delle prime tappe delle molte che la vedranno protagonista nel prossimo futuro.

L'obiettivo ambizioso a cui il lavoro è stato dedicato è la ricellularizzazione del rene utilizzando come “scaffold” la stessa matrice ECM privata della componente cellulare nativa.

Una prima fase sperimentale è stata programmata partendo da protocolli già descritti seppur approssimativamente da un gruppo di ricerca, unico ad avere pubblicato su riviste scientifiche di fama rilevante articoli riportanti dei risultati importanti (Ross et al. “Embryonic Stem Cells Proliferate and Differentiate when Seeded into Kidney Scaffolds”).

Inizialmente gli esperimenti sono stati svolti con l'utilizzo di un bioreattore precedentemente realizzato e con degli strumenti di difficile controllo.

Sulla base delle difficoltà riscontrate sono stati progettati e realizzati dei dispositivi nuovi, è stato modificato il circuito in funzione delle caratteristiche di perfusione volute e si sono adottati altri strumenti quali la pompa peristaltica idonea alle portate più basse e dalla maggiore sensibilità e il trasduttore di pressione, (componente di un sistema di acquisizione multicanale rilevabile attraverso un software predisposto anche all'analisi dei segnali).

In base ai risultati di sistemi di verifica non adottati in precedenza sono state ipotizzate delle nuove cause di criticità, pertanto si sono modificate le procedure di decellularizzazione a partire dal metodo di incannulamento del rene. Sono stati modificati i protocolli, cercando di non inficiare la significatività dei risultati effettuando variazioni scorrelate e sovrapposte, per poterne distinguere gli effetti. Seguendo questa linea si è arrivati ad utilizzare un protocollo completamente diverso da quello applicato in partenza, sia per la decellularizzazione, sia per la ricellularizzazione, fase delicata quanto costosa e strettamente dipendente dall'esito della precedente.

Solo dopo diverse prove e modifiche si sono ottenuti risultati ripetibili nel limite della variabilità biologica e confrontabili con quelli del “golden standard” dell'articolo scientifico precedentemente citato. Si sono tuttavia rilevate delle problematiche persistenti, legate principalmente alla presenza di residui di materiale genetico

frammentato come controindicazione di una procedura molto rispettosa della matrice proteica che permette di ottenerne la perfetta integrità.

La presenza abbondante di cellule nelle strutture glomerulari rilevate dopo l'iniezione seguita da condizioni statiche in incubatore e la scarsa capacità adesiva delle stesse, che richiederebbe tempi di assenza di flusso troppo alti hanno portato alla costruzione di modelli semplificativi per l'ottimizzazione del protocollo.

Il trasporto dei nutrienti e in particolare dell'ossigeno costituisce il limite principale di tale metodica.

Infine, grazie alla recente disponibilità di nuove tecniche di “imaging” come la “microtac”, si sono ampliate le prospettive di indagine.

Il lavoro è stato svolto principalmente in funzione delle ordinarie problematiche e mansioni all'interno di un laboratorio avanzato per la ricerca, nel contesto di un istituto in grado di fornire tanti dubbi quanti stimolanti strumenti di indagine.

I risultati ottenuti negli ultimi mesi di esperimenti consentono di ritenere conseguito l'obiettivo della decellularizzazione con conservazione dell'architettura della matrice extracellulare del rene di ratto, dimostrato anche dalla distribuzione delle cellule iniettate; la ripopolazione, intesa come proliferazione e differenziazione e il ripristino della funzionalità dell'organo sono delle fasi su cui ancora non si è indagato approfonditamente, benché molteplici lavori scientifici in letteratura offrano buone speranze sulla possibilità di differenziare e cellule staminali embrionali grazie al contatto con una membrana basale specifica e stimoli fisiologici di flusso. Si tratta di fasi che richiedono ancora tempo, studio e dedizione; tuttavia, per il momento, ci si può ritenere soddisfatti per avere conseguito il primo fondamentale passo per aprire la ricerca alle fasi successive, a cui contribuiranno anche altri laboratori dell'istituto con competenze specifiche, nella speranza di poter giungere a breve anche alla sperimentazione con cellule staminali a pluripotenza indotta per avvicinarsi sempre di più all'obiettivo di poter migliorare le condizioni di una vita senza sacrificarne un'altra.

2. LA RIGENERAZIONE DI INTERI ORGANI IN VITRO

2.1. Concetti fondamentali

Negli ultimi anni, l'aumento delle conoscenze mediche, biologiche, biotecnologiche e bioingegneristiche, ha portato alla sempre maggiore consapevolezza dell'importanza della medicina rigenerativa, scienza che si pone l'obiettivo di trattare ferite o danni tissutali o di interi organi con associazione di costrutti atti a favorire i naturali meccanismi di riparo di tessuti biologici o di sostituire gli stessi, parzialmente o integralmente.

Fondamentale per il successo della medicina rigenerativa è il progredire dell'ingegneria tissutale, che associando competenze ingegneristiche a quelle biologiche, permette di realizzare i sostituti tissutali.

Gli elementi fondamentali per la realizzazione dei costrutti tissutali sono gli “**scaffold**” e la **componente cellulare** in essi seminata.

I primi sono dei modelli in biomateriali biocompatibili che possono essere di origine naturale o sintetica, con geometrie e strutturazioni superficiali molto varie in funzione dell'applicazione specifica a cui sono destinati. Essi svolgono principalmente la funzione di fornire una struttura di sostegno per le cellule, dalla geometria specifica per l'adesione e dalle proprietà meccaniche stabilite. Altra funzione che viene spesso richiesta agli “scaffold” è quella di legare chimicamente delle molecole dalle capacità di interazione cellulare note, allo scopo di favorire il legame, la proliferazione o il differenziamento cellulare (per ottenerne un fenotipo specifico).

Le cellule invece sono la componente attiva del costrutto, quella che con la propria adesione, proliferazione e deposizione di matrice a seconda del proprio fenotipo, rigenera il tessuto biologico.

Vi sono svariati settori in cui l'ingegneria dei tessuti ha possibilità di impiego: nel campo della ricerca essa offre nuovi metodi di indagine sull'effetto di farmaci o sullo sviluppo delle patologie analizzandone i comportamento in vitro. Ma primariamente lo sviluppo dei prodotti tissutali è volto al fine terapeutico, mirato cioè a sostituire in vivo i tessuti biologici danneggiati o a affiancarli durante la fase di riparo.

E' doveroso precisare che i tessuti biologici oltre ad avere una marcata variabilità interindividuale e all'interno dello stesso soggetto al variare delle condizioni fisiologiche o semplicemente dell'età, mostrano un comportamento notevolmente distinto a seconda della funzione che ricoprono nel contesto biologico: composizione proteica, distribuzione cellulare e metabolismo delle stesse, architettura del sistema, vascolarizzazione e disponibilità biochimica. Proprio quest'ultimo fattore concorre a determinare una differenza notevole in termini di riparo tessutale e di rigenerazione spontanea fisiologica degli apparati e più precisamente dei tessuti che li compongono.

Gli epitelii, a titolo indicativo, sono tessuti in cui il rinnovamento cellulare è molto rapido e il riparo spontaneo è efficace; le cellule dell'epidermide, dell'epitelio intestinale, quelle germinali e quelle ematopoietiche hanno un indice mitotico alto. Altri organi hanno una capacità proliferativa relativamente bassa, generalmente ritenuta strettamente sufficiente solo per l'accrescere del peso corporeo. In alcuni casi però, nonostante la rigenerazione cellulare pressochè nulla, può essere presente un sistema di riparo molto efficiente, che permette di rimodellare anche il 70% dell'organo stesso come nel caso del fegato.

Infine, cellule quali quelle nervose e cardiache, estremamente specializzate, non hanno capacità proliferativa. Un fattore determinante questa differenza è l'assenza di cellule progenitrici che non siano separate spazialmente e morfologicamente da quelle differenziate.

Nel caso di cuore e tessuto nervoso, i precursori non sono presenti oltre la fase embrionale [1].

In molte condizioni patologiche che portano all'insufficienza degli organi, il trapianto è la strada terapeutica più percorsa, grazie ai progressi chirurgici ottenuti negli ultimi cinquant'anni.

Nei casi di malattie cardiache, epatiche e polmonari allo stadio terminale, essa è l'unica soluzione ad oggi ritenuta valida, mentre per l'insufficienza renale e pancreatiche vi sono delle alternative quali l'emodialisi e la terapia insulinica che tuttavia non offrono speranze di sopravvivenza a lungo termine né sono compatibili con una discreta qualità della vita. In questo contesto si inserisce l'ambiziosissima proposta dell'ingegneria dei tessuti di **“rigenerare gli organi in vitro”**, sostituendosi alla natura in questa operazione che autonomamente non sarebbe in grado di svolgere.

2.2. Stato dell'arte, le ricerche attuali: ECM come “scaffold” e la ricellularizzazione di organi

Nell'ultimo decennio tra le proposte più accreditate dell'ingegneria dei tessuti, c'è quella di utilizzare polimeri di origine naturale come biomateriali per gli “scaffold”. In particolare quelli che compongono fisiologicamente la matrice extracellulare (ECM).

Questa è un composto eterogeneo di diverse proteine strutturali e funzionali, glicoproteine e proteoglicani, organizzati in una soprastruttura tridimensionale molto complessa tessuto-specifica. Il suo ruolo è quello di fornire un supporto meccanico, dei siti di alloggiamento per la componente cellulare e di adesione tramite ligandi specifici per i recettori di membrana. E' inoltre un deposito di fattori biochimici di segnale che interagiscono con le cellule regolandone il comportamento e la comunicazione; includono fattori angiogenetici, di migrazione cellulare, di proliferazione, orientazione e apoptosi, di risposta infiammatoria, immunitaria e di riparo. Costituisce “l'impalcatura” naturale dei tessuti e degli organi.

E' noto inoltre che l'ECM riveste un ruolo nella differenziazione cellulare (ad esempio da mioblasti a miotubi); pertanto la si può definire una componente attiva dei processi che coinvolgono i tessuti. Vi è inoltre una “reciprocità dinamica” tra l'ECM, il citoscheletro intracellulare e gli elementi nucleari.

L'impiego della matrice proteica come scaffold per la rigenerazione dei tessuti è stato quindi una diretta conseguenza della consapevolezza della sua influenza sul comportamento cellulare. Ad esempio si sono scoperti peptidi quali l'RGD, presente nelle molecole di fibronectina, che agiscono direttamente sull'adesione delle cellule; altre proteine come laminina, collagene e fibrinogeno sono stati spesso usati nella creazione di scaffold biodegradabili contemporaneamente per il loro ruolo strutturale e funzionale.

Uno dei vantaggi di questi peptidi, utile al fine del loro uso, è la loro abbondanza nell'ambiente fisiologico di molte specie diverse, permettendo il prelievo da fonti animali senza avere intolleranze e risposte infiammatorie eccessive.

Principalmente l'utilizzo dei componenti della matrice si limita all'uso degli stessi singolarmente o al massimo in miscele di pochi peptidi diversi che vengono riarrangiati in strutture bidimensionali, in maglie tridimensionali fibrose o in spugne porose, atte alla coltura cellulare principalmente di epiteli o di lembi di tessuti specifici [2].

Una proposta molto più avanzata è quella di utilizzare l'intera matrice extracellulare che costituisce gli organi come “scaffold” per la rigenerazione dell'organo intero; è una sfida del tutto aperta, che potrebbe portare a ottenere delle matrici tridimensionali da donatore allogenico o xenogenico senza avere risposta immunitaria perchè private della componente cellulare.

La letteratura recente vede diversi studi che si sono posti l'obiettivo di ottenere l'integrità della ECM che compone gli organi sottraendone le cellule, in ottica di renderla utilizzabile per la semina di quelle nuove differenziate o staminali geneticamente compatibili con il paziente da trattare per poter rigenerare l'organo intero. Sono stati redatti diversi protocolli per la decellularizzazione degli organi e la successiva ricellularizzazione; il processo di rimozione delle cellule con mantenimento della struttura della relativa ECM, tipicamente implica l'esposizione a detergenti, proteasi e agenti chimici, attraverso una perfusione che sfrutta la presenza della vascolatura nativa.

La rimozione completa degli epitopi antigenici associati alla membrana e al citoplasma delle cellule originarie è necessaria per evitare una risposta immunitaria del destinatario dell'organo.

I metodi più utilizzati quindi sono la perfusione di agenti chimici quali soluzioni acide o alcaline, sali (soluzioni ipotoniche o ipertoniche), detergenti ionici o caotropici; spesso questa è associata a metodi enzimatici (esonucleasi e endonucleasi per la frammentazione della cromatina). Infine, seppur meno utilizzati perchè meno selettivi e quindi più dannosi anche per la matrice ECM, sono percorribili dei metodi di decellularizzazione fisica, come la sonicazione o l'agitazione meccanica.

Questi metodi sono spesso utilizzati in associazione [3], [4].

Per la fase di ricellularizzazione, la scelta del tipo di cellule da infondere è del tutto arbitrario in funzione dello scopo, della disponibilità e del tipo di organo; è da notarsi comunque che nel caso di impianto di organo nel destinatario è necessario utilizzare cellule compatibili, pertanto è preferibile l'uso delle iPS.

Anche i metodi di infusione sono arbitrari, tutti prevedono però l'iniezione delle cellule tramite la preservata vascolatura.

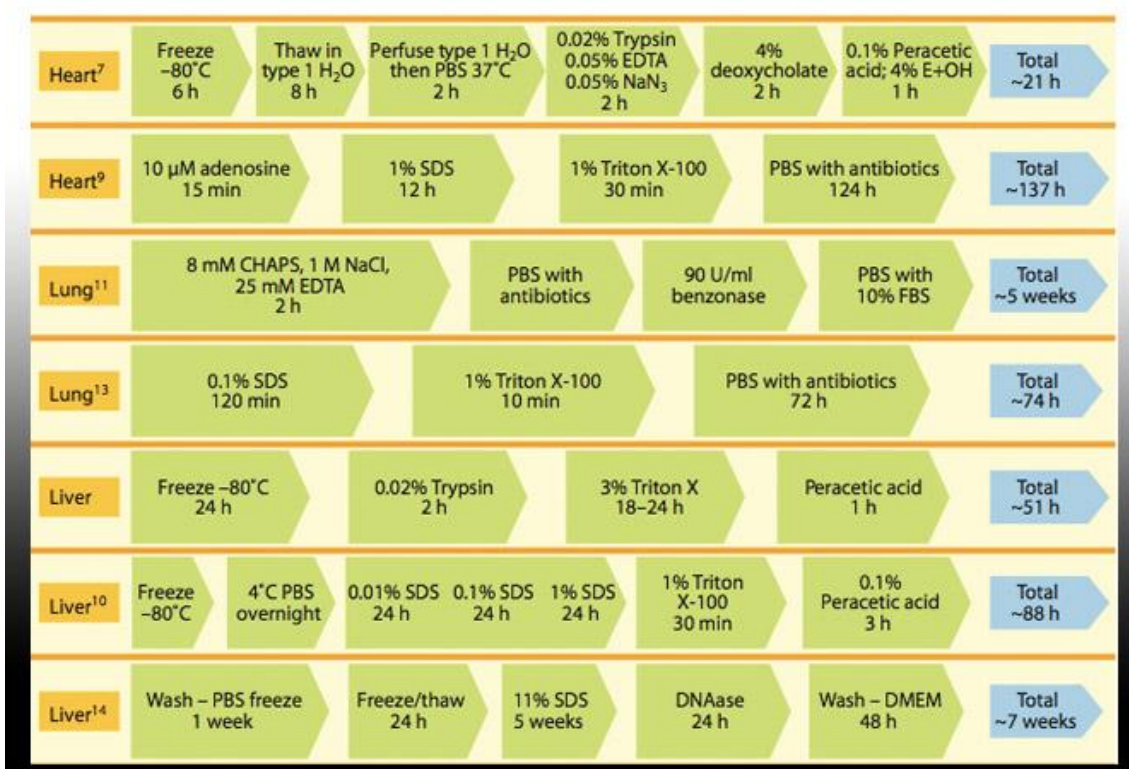


Figura 2.1: Metodi per la decellularizzazione degli organi e per il condizionamento dello “scaffold”, procedure consigliate.

2.2.1. La rigenerazione del Cuore

Una prima ricerca svolta nel settore è quella basata sulla rigenerazione del cuore, seguita da innumerevoli altri studi che stanno portando ad avere risultati incoraggianti. La decellularizzazione viene effettuata a mezzo di detergenti (SDS, PEG e tryton in combinazione con soluzioni enzimatiche) infusi in modo anterogrado attraverso le arterie coronarie. Ottenendo un'architettura intatta, vengono infuse delle nuove cellule endoteliali o cardiache, lasciate in perfusione controllata per 28 giorni. I risultati hanno mostrato contrazioni macroscopiche del rene di ratto già a partire dal quarto giorno di coltura e al ventottesimo giorno, si è rilevato l'effetto pompante in risposta a una stimolazione elettrica pari al 2% della funzione cardiaca di un adulto [5], [6].

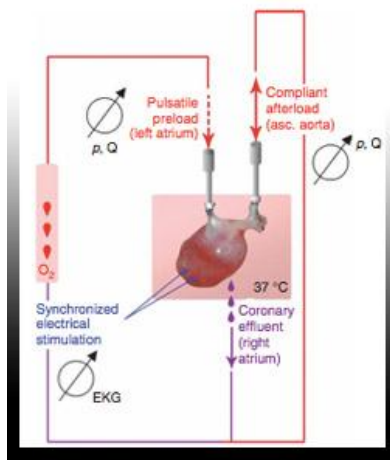


Figura 2.2: Sistema per la decellularizzazione e ricellularizzazione del cuore, modello di perfusione adottato.

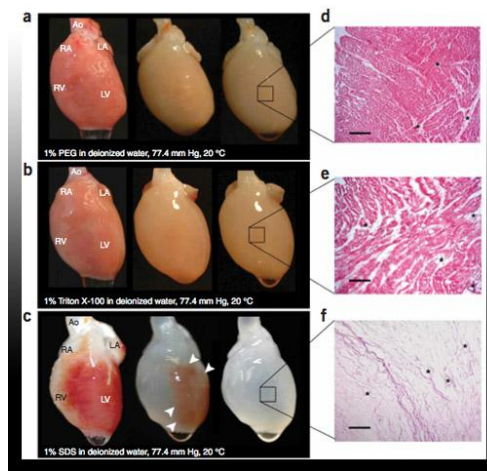


Figura 2.3: Condizioni e istologie dei tessuti cardiaci nelle fasi della decellularizzazione. a) a un giorno di decellularizzazione, b) a 3 giorni, c) a 4 giorni

2.2.2. La rigenerazione del Polmone

Con risultati altrettanto incoraggianti, sono stati condotti degli studi anche sulla decellularizzazione e ricellularizzazione del polmone. Questo organo, come il rene e il cuore, è totalmente privo di meccanismi spontanei di riparo, perciò la rigenerazione in vitro dello stesso costituirebbe una soluzione molto interessante alle innumerevoli patologie che lo riguardano. Uno studio condotto da Niklason et al. indica un protocollo di decellularizzazione che lasci intatte le ramificazioni gerarchiche delle vie aeree, contemporaneamente assicuri l'integrità del sistema vascolare e della membrana basale composta da collagene di tipo IV, laminina e fibronectina. Si utilizza un bioreattore che collega la cannula posizionata nell'arteria polmonare al circuito di perfusione, mentre una seconda cannula, posizionata nella trachea, viene regolata in apertura e chiusura da una valvola. La soluzione di decellularizzazione dopo un trattamento di PBS/SNP è composta da CHAPS, NaCl, e EDTA in PBS 1X. La portata perfusa è molto bassa (circa 0,2 mL/min), in modo da registrare pressioni inferiori a 15 mmHg.

La fase successiva, quella della ricellularizzazione avviene tramite lo stesso circuito di perfusione, infondendo dall'arteria polmonare le cellule endoteliali, seguite a distanza di qualche giorno da quelle epiteliali. Con una pompa a siringa si genera l'effetto della ventilazione, che fisiologicamente alterna pressioni positive a pressioni negative. Il risultato della stimolazione pneumatica, è quello di favorire il comportamento fisiologico delle cellule: il polmone di nuova generazione è in grado di partecipare per brevi intervalli di 45 minuti allo scambio gassoso [7].

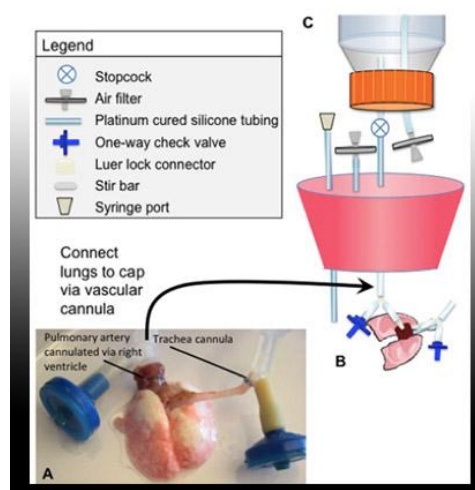


Figura 2.4: Modello di camera di perfusione per la decellularizzazione del polmone

2.2.3. La rigenerazione del Fegato

Molteplici gruppi di ricerca si sono concentrati sulla rigenerazione in vitro del fegato ottenendo ottimi risultati: con l'utilizzo del solo detergente ionico SDS (che agisce disgregando il materiale citoplasmatico), si è ottenuta una matrice completamente decellularizzata e priva di materiale genetico residuo, con la fitta rete vascolare tipica dell'organo completamente intatta. Questo ha permesso la semina attraverso la vena porta di epatociti adulti, lasciati in perfusione fino all'ottenimento della ricellularizzazione completa. Si è dimostrata la secrezione in vitro da parte del nuovo organo di albumina e la sintesi di urea, caratteristiche indicative della funzionalità epatica. Si sono effettuati anche trapianti su animale dei nuovi organi rigenerati con basso danno ischemico [8].

Altre ricerche parallele sono giunte allo stesso risultato sulla rigenerazione del fegato utilizzando un protocollo di decellularizzazione basato sulla perfusione attraverso la vena porta di acqua distillata, Tryton-X con 0,1% di idrossido di ammonio. La semina viene effettuata in due tempi successivi: inizialmente le cellule hUVEC ("Human UmbelicalEndotelialCells") e in seguito le cellule hFLC ("Human Fetal Liver Cell"). La loro coltura dopo giorni di perfusione mostra comportamento corretto, con l'espressione dei "markers" endoteliali, epatici e biliari epiteliali [9].

Organ	Simplest cells	Minimal function	Advanced endpoints
Heart	Cardiocytes	Contractility	Pumping against afterload, drug responsive, conduction systems, pacemaker activity, patent valves
Liver	Hepatocytes	Albumin, urea production	Drug metabolism, metabolic regulation, coagulation factor synthesis
Kidney	Renal medulla cells	Urine production	Blood filtration, renin angiotensin system, blood pressure maintenance
Lung	Alveolar type 2 cells	O ₂ exchange	Respiration
Pancreas	Islet α,β -cells	Insulin/glucagon secretion	Pancreatic digestive enzymes, endocrine hormone production

Figura 2.5: La rigenerazione degli organi; parametri di valutazione per i costrutti ingegnerizzati in relazione alle funzioni fisiologiche

3. LA RIGENERAZIONE DEL RENE IN VITRO

3.1. Le patologie renali e le terapie convenzionali

Le patologie che coinvolgono il rene possono essere di diversa origine e manifestarsi con sintomi e gravità differenti, tuttavia sono tutte da considerarsi progressive e attualmente non esiste una terapia non cronica che sia in grado di rimuoverne la causa e risolvere il danno. Il danno renale è sempre caratterizzato da sclerosi glomerulare, con la conseguente diminuzione del GFR (velocità di filtrazione glomerulare) e la perdita di selettività della membrana glomerulare, che porta all'escrezione indifferenziata delle proteine attraverso le urine, fenomeno noto come proteinuria.

In genere le nefropatie vengono classificate in funzione dei due parametri di proteinuria e GFR, indici del danno provocato; si riconoscono 4 livelli dalla gravità crescente:

- Stage 1: Danno renale senza variazione di GFR
- Stage 2: Danno renale con perdita moderata di GFR
- Stage 3: Riduzione severa del GFR
- Stage 4: Insufficienza renale grave comprovata, fallimento dell'organo

Gli stage 1 e 2 devono essere accompagnati da altre evidenze di danno renale quali microalbuminuria persistente, proteinuria persistente, ematuria persistente (con esclusione di altre cause), anomalie strutturali del rene rilevate con mezzi di imaging quali ECO scanner o altri test radiografici, glomerulonefriti comprovate da biopsia.

L'insufficienza renale grave è la fase più frequente all'interno dei nefropatici (il 41,8%). Nella maggior parte dei casi si tratta di una condizione cronica, le cui cause possono essere malattie glomerulari proliferative, glomerulonefriti, e di origine non infiammatoria, malattie vascolari, nefriti tubulointerstiziali, malattie a carico tubulare non infiammatorie, cistiti, infezioni. In altri casi l'insufficienza può essere di tipo acuto, manifestarsi in modo precoce e con possibile reversibilità; di questa natura sono le nefropatie provocate da alcuni tipi di infezioni e da intossicazioni. Un danno renale è frequentemente una conseguenza della malattia diabetica e dei casi gravi di sepsi.

La condizione di insufficienza renale grave non è compatibile con la vita a meno di trattamento dialitico. Questo consiste nella depurazione del sangue dei pazienti con una

ricorrenza trisettimanale a mezzo di un sistema di membrane che permettono lo scambio di massa selettivo di sostanze specifiche e acqua. Per ottenere la possibilità di filtrare esternamente il sangue è necessario reperire un sito di accesso percutaneo alla circolazione sanguigna del paziente, ottenuto congiungendo una vena ad una arteria (tramite graft o sutura diretta) allo scopo di unire i requisiti di accesso superficiale e di alta pressione per permettere la circolazione extracorporea. Si utilizzano generalmente due possibili accessi percutanei: quello peritoneale e quello radiale.

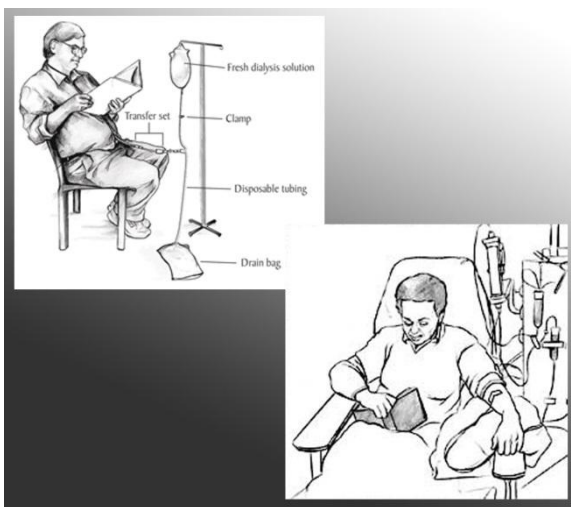


Figura 3.1: Trattamenti dialitici, le terapie convenzionali per il trattamento delle Nefropatie croniche. Sono possibili i due diversi accessi percutanei: in alto, dialisi peritoneale; in basso, dialisi radiale

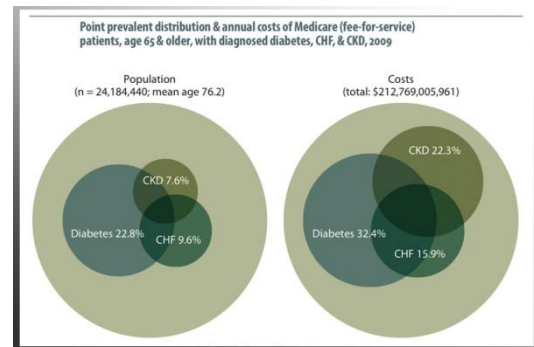


Figura 3.2: Distribuzione e costi delle terapie per malattia diabetica, cardiopatie (CHF) e nefropatie croniche (CKD)

Il trattamento dialitico è una terapia invasiva e incompatibile con una buona qualità della vita dei pazienti; inoltre la selettività propria delle membrane per determinate molecole, il funzionamento di natura osmotica, non sono sufficienti a ripristinare la totalità delle funzioni dal complesso controllo attivo del rene e tantomeno è in grado di sostituire il suo ruolo nella produzione ormonale.

Attualmente sono disponibili diverse procedure di dialisi, tra cui quella domiciliare allo scopo di avvicinarsi maggiormente alle esigenze del paziente per cui l'ospedalizzazione frequente costituisce un problema. Oltre alle problematiche in termini di reale efficacia della terapia, il trattamento dialitico costituisce un costo molto rilevante sia per il trattato sia per il sistema sanitario.

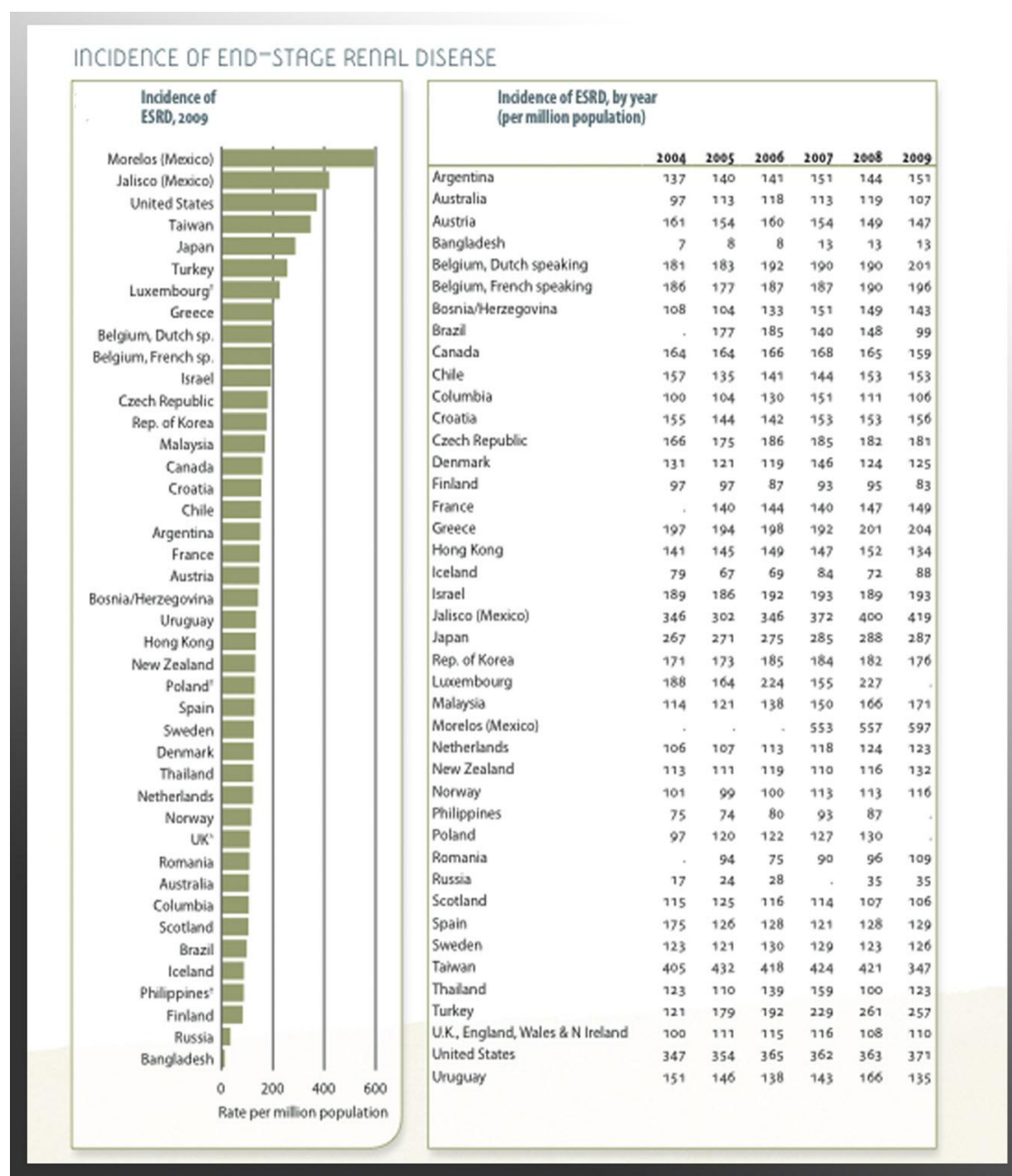


Figura 3.3: Incidenza delle patologie renali in stadio avanzato (ESRD). I dati sono riferiti ai paesi che hanno collaborato con lo "United States Renal Data System" nella redazione delle statistiche rese disponibili on-line.

3.1.1. Il problema dei trapianti

Il trapianto è la soluzione clinica ritenuta maggiormente efficace nel trattamento delle nefropatie croniche di qualsiasi tipo. Come dimostrano i dati dell'ultimo decennio, coloro che soffrendo di insufficienza renale sono stati sottoposti a trapianto hanno mostrato una mortalità inferiore e uno stato funzionale migliore rispetto agli individui trattati con emodialisi.

Come nel caso di cuore, fegato, polmone e pancreas, anche per il rene si ha una marcata differenza tra il numero dei candidati in lista d'attesa e il numero dei donatori, che porta ad una discrepanza tra il numero effettivo dei trapianti eseguiti e quello di coloro che lo richiederebbero [10].

La scarsa disponibilità di donatori e l'aumento delle richieste costituiscono un primo importante problema per i trapianti di rene, sebbene per questo organo, come per il fegato e per il polmone sussista la possibilità di avere donatori viventi.

I lunghi tempi di attesa non sono spesso compatibili con le condizioni critiche dei candidati; i dati mostrano come la mortalità prima dell'ottenimento del trapianto è molto alta, nonostante il temporaneo trattamento con emodialisi.

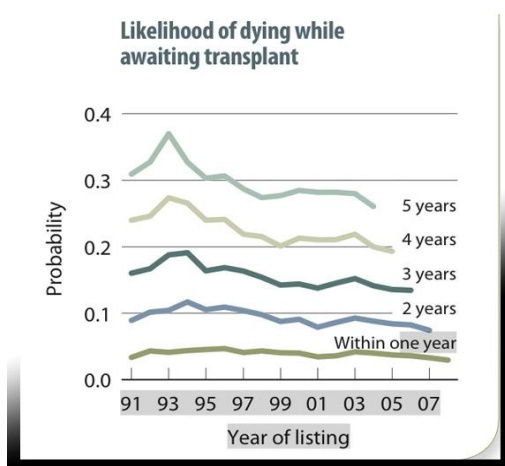


Figura 3.4: Probabilità di decesso in lista di attesa per trapianti di rene; a causa della degenerazione delle patologie, per lunghi tempi di attesa sussistono rischi molto alti

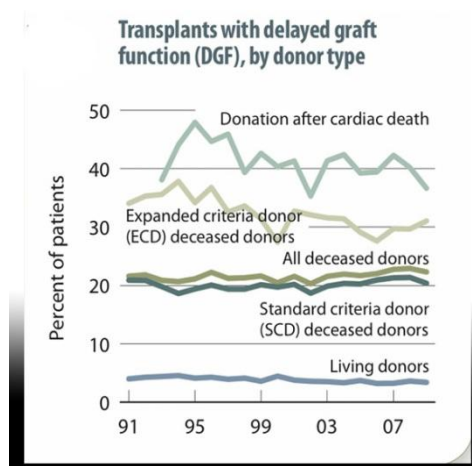


Figura 3.5 : Frequenza di perdita della funzionalità dell'organo trapiantato in funzione del tipo di donatore e per anno di trapianto

TRANSPLANT RATES



Figura 3.6 : Frequenza dei trapianti di rene nel mondo. I dati sono riferiti ai paesi che hanno collaborato con lo “United States Renal Data System” nella redazione della statistiche rese disponibili on-line

Una seconda problematica è la scarsa la crescita dell'emivita del “graft” stesso (definita come tempo dal trapianto in cui metà dell'organo perde funzionalità), che non ha subito incrementi negli anni. Ciò dipende principalmente dallo stato dell'organo trapiantato, spesso da donatori più anziani del ricevente. Questa condizione è ulteriormente aggravata nel caso di trapianto da donatore in condizione di morte cardiaca; in via dimostrativa, riferendoci ai dati relativi agli stati uniti per l'anno 2009, si rileva che il 6,4% dei pazienti adulti sottoposti a trapianto incontra un fallimento dello stesso entro i primi due anni, mentre l'incidenza di coloro che si candida nuovamente nelle liste di attesa per l'organo dopo il fallimento del precedente corrisponde al 3,1%.

Infine, una problematica di altissimo rilievo è quella legata all'immunosoppressione cronica, necessaria per tutti i trapianti allogenici per impedire un'attivazione e aggressione del sistema immunitario che porterebbe inevitabilmente alla morte del soggetto.

Sebbene la terapia immunosoppressiva, inizialmente ottenuta a mezzo di corticosteroidi e 6-mercaptopurine abbia avuto molti sviluppi negli anni, tra cui molteplici tentativi di “indurre la tolleranza dell'organo trapiantato” tramite soppressione delle cellule T con anticorpi monoclonali, tuttavia i risultati non sono ancora soddisfacenti.

La tossicità della terapia immunosoppressiva è duplice: la stessa soppressione aspecifica del sistema immunitario rende l'individuo esposto alle infezioni che possono portare al successivo fallimento multiorgano e alla morte. In aggiunta, gli stessi agenti immunosoppressivi hanno effetti collaterali quali ad esempio la nefrotossicità degli inibitori della calcineurina, l'ipertensione e il danno vascolare provocato dai corticosteroidi.

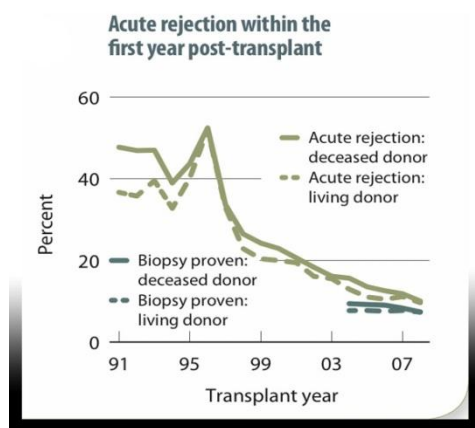


Figura 3.7: Frequenza di rigetto acuto nel primo anno dopo il trapianto

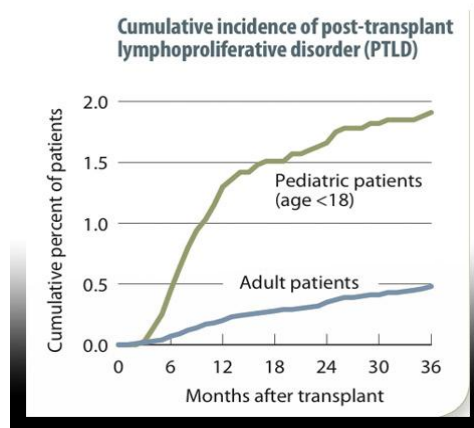


Figura 3.8: Incidenza di disturbi linfoproliferativi conseguenti alla terapia immunosoppressiva

Inoltre, benchè tale trattamento risulti approssimativamente efficace nel controllo del rigetto acuto, non è funzionale nel caso di rigetto cronico, il quale si è appurato dipendere da meccanismi sia di tipo “alloantigene-dipendenti”, sia “alloantigene-indipendenti” [11].

Recentemente inoltre, ad aggiungersi agli effetti collaterali della terapia immunosoppressiva, vi è l'esito di diversi studi che hanno rilevato una correlazione tra i trapianti e l'insorgenza di tumori: i pazienti sottoposti a trapianto mostrano un rischio 3 volte maggiore degli individui di controllo (con caratteristiche e stili di vita paragonabili). In particolare, gli studi svolti sui pazienti con trapianto di rene dimostrano che molti tipo di tumori quali il sarcoma di Kaposi, linfomi-non-Hodkin's, il cancro alle labbra e il melanoma si presentano solo durante il funzionamento dell'organo trapiantato, cioè nel periodo di forte attività della terapia immunosoppressiva, mentre il rischio si riduce alla normalità dopo il fallimento dello stesso e con ripresa della terapia di dialisi. Per altri tipi di tumori, al contrario, il rischio resta elevato anche dopo il fallimento: è questo il caso di leucemie, cancro ai polmoni e tumori correlati alla malattia renale in fase terminale (tumori al rene, tratto urinario e tiroideo). Si ritiene che i tumori di origine virale in particolar modo siano legati in modo reversibile alla terapia immunosoppressiva [12], [13].

Alla luce di questi dati appare evidente la necessità di soluzioni alternative, che permettano di ovviare il problema tanto della terapia immunosoppressiva quanto della disponibilità rapida di organi “paziente-specifici” e in condizioni ottimali, soprattutto nell'ottica di offrire delle soluzioni a lungo termine anche per i pazienti più giovani.

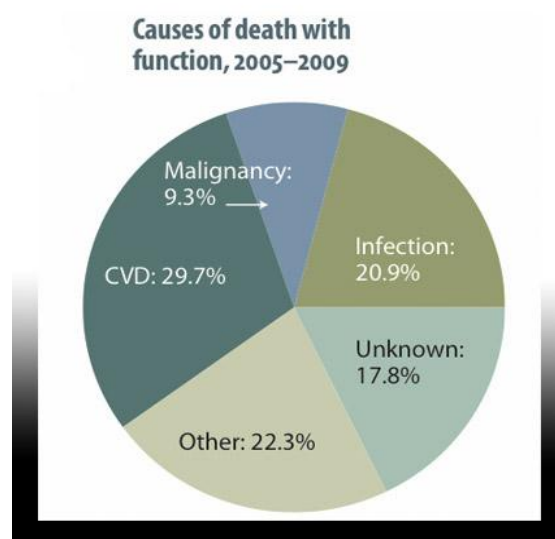


Figura 3.9 : Principali cause di morte successive a trapianto di rene non dovute alla perdita di funzionalità dell'organo trapiantato

Tuttavia, attualmente, l'operazione chirurgica di trapianto, come è statisticamente dimostrato, è particolarmente efficace nel caso del rene.

La possibilità di evitare una terapia immunodepressiva e un'attesa eccessivamente lunga con la rapida degenerazione dell'organo che ne segue, porterebbe a ridurre pressoché integralmente l'elenco delle controindicazioni.

La rigenerazione degli organi offrirebbe questa opportunità, ottenendo in aggiunta costrutti biologici in condizioni ottimali, sani, disponibili precocemente e soprattutto completamente compatibili con i destinatari.

Questa costituirebbe una soluzione perfetta alle nefropatie.

3.2. La complessità del rene

3.2.1. Anatomia

Il rene è un organo pari situato in sede retroperitoneale, nella parete posteriore dell'addome, ai lati della colonna dorso-lombare. Il polo superiore è a livello della 1/2 vertebra toracica, il polo inferiore raggiunge la terza vertebra lombare. Il rene destro è più basso per la presenza del fegato sul lato.

Ognuno dei due reni è rivestito da tessuto connettivo di sostegno e protezione: la capsula adiposa, quella renale più interna e la fascia renale, che penetrando trasversalmente gli altri due strati ancora l'organo all'ambiente circostante.

In sezione sagittale nei reni si distinguono 2 regioni distinte: la regione più interna è detta “midollare”, è formata da strutture dette piramidi di Malpighi; quella più esterna invece è detta “corticale” e contiene i nefroni e i raggi midollari. I nefroni costituiscono le unità funzionali principali del rene, (in quantità di circa un milione per ogni rene umano): sono a loro volta costituiti da due elementi distinti ognuno dei quali riveste un ruolo preciso per la funzione filtrante del rene: corpuscoli di Malpighi (glomeruli e capsule di Bowman) e tubuli.

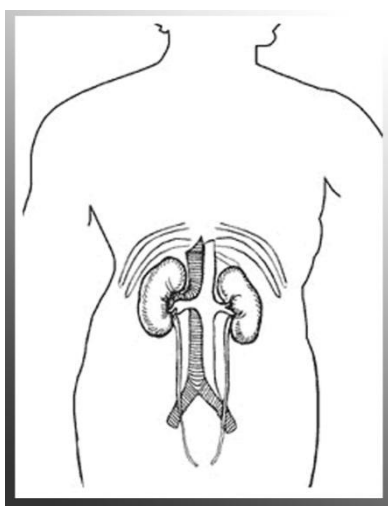


Figura 3.10 : Localizzazione anatomica del rene umano

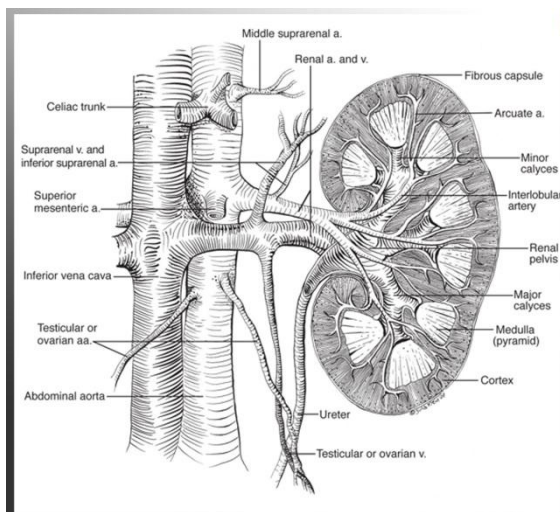


Figura 3.11 : Principali strutture vascolari in prossimità del rene e componenti anatomici dello stesso

STRUTTURE ANATOMICHE

I corpuscoli di Malpighi

I corpuscoli di Malpighi sono le strutture assimilabili funzionalmente a un filtro: sono composti da una fitta rete di capillari rivestita da cellule specifiche e che permettono il passaggio selettivo delle molecole dai vasi alla capsula esterna che li contiene, la capsula di Bowman. Nel corpuscolo si riconoscono quindi due poli, quello vascolare, entro cui si protrae l'arteriola afferente che si dirama nei capillari glomerulari fino a raccogliere il flusso d'uscita e formare l'arteriola efferente; sull'altro lato invece si trova il polo urinario, dove la capsula di Bowman si restringe a formare il tubulo.

La struttura dei corpuscoli è altamente organizzata e precisa:

- L'endotelio è fenestrato contiene dei pori di 50-100nm.
- La membrana basale glomerulare mostra sulla sua superficie delle cariche negative che influenzano la filtrazione delle macromolecole. Questa è la parte più selettiva. E' una struttura che viene continuamente rinnovata dal mesangio e dai podociti
- L' epitelio viscerale della capsula di Bowman è altrettanto fondamentale per dirigere le sostanze di scarto verso il polo urinario.

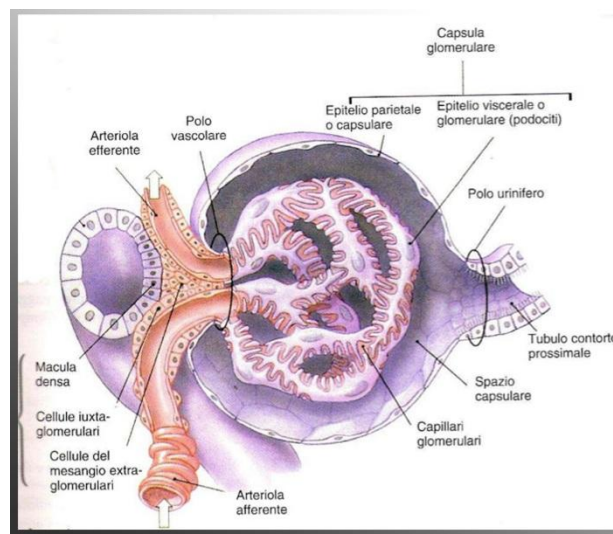


Figura 3.12 : Anatomia del corpuscolo di Malpighi, principali strutture collaboranti alla funzione di filtrazione

Il tubulo

Il tubulo invece è composto da tubulo contorto prossimale, ansa di Henle (con porzione ascendente e discendente) e tubulo contorto prossimale che sfocia nel dotto collettore e successivamente nell'uretere.

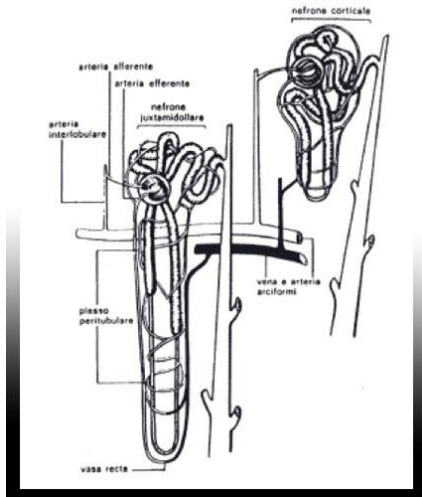


Figura 3.13: Disposizione dei nefroni: corticale e iuxtamidollare

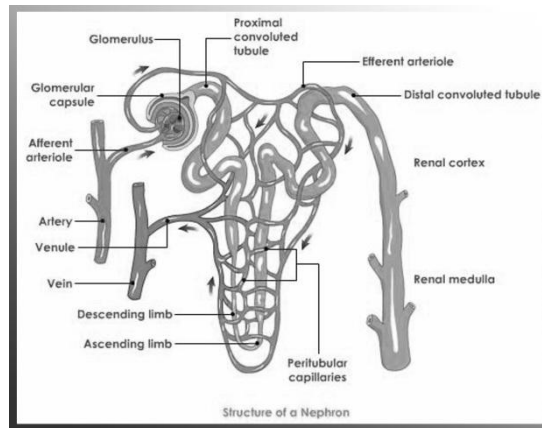


Figura 3.14 : Il nefrone corticale, organizzazione vascolare dell'unità funzionale del rene

Nel tubulo avvengono i processi di riassorbimento delle sostanze utili all'organismo, quali i sali, che per il basso peso molecolare superano il filtro del glomerulo; pertanto lungo tutta la lunghezza del tubulo, tra la sua parete composta da microvilli che favoriscono il riassorbimento aumentando la superficie e la fitta rete dei capillari peritubulari avvengono gli scambi che fondamentali per il bilancio elettrolitico. Inoltre, nel tubulo si ha la diluizione o la concentrazione dell'urina a causa del meccanismo di regolazione della permeabilità all'acqua, meccanismo che permette all'organismo intero di regolare il volume di acqua, quindi di mantenere la volemia sanguigna.

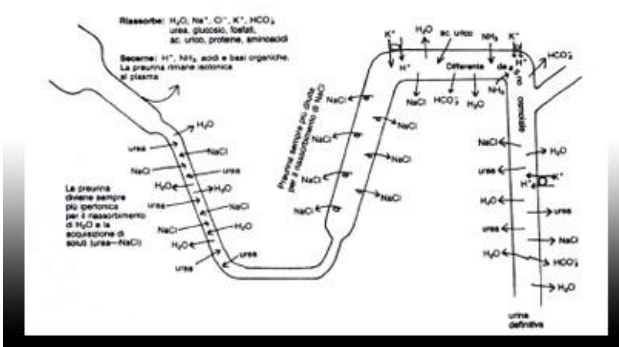


Figura 3.15 : Schema di funzionamento tubulare: meccanismi di trasporto; lungo la membrana filtrante del tubulo si hanno gli scambi molecolari per il bilancio elettrolitico, di portata e per la regolazione del pH

Sistema vascolare

Ogni rene è irrorato dall'arteria renale, ramo dell'aorta addominale che origina vicino all'arteria mesenterica superiore. All'interno dell'organo si ramifica nelle arterie segmentali, poi arterie interlobari, arcuate ed interlobulari, entrando infine nei nefroni come arteriola afferente, diventando capillari glomerulari, arteriola efferente e infine capillari peritubulari. All'uscita dei nefroni si hanno le venule, poi vene interlobulari, vene arcuate, vene interlobari e infine tutto il sangue esce dal rene attraverso la vena renale.

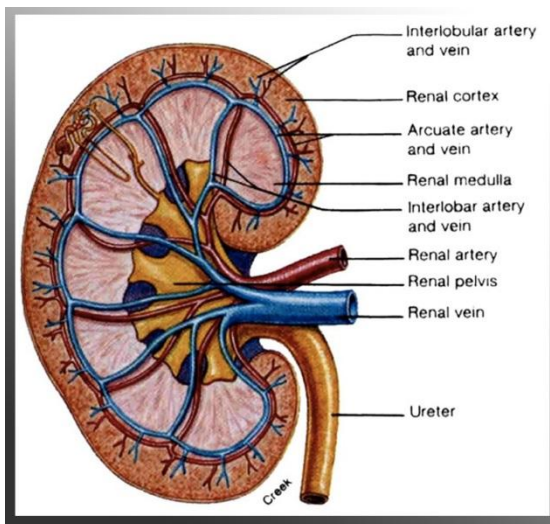


Figura 3.16: Sistema vascolare del rene . La complessa rete di vasi è fondamentale per l'adempimento delle funzioni renali; si notano l'arteria renale, diramazione dell'aorta e vaso in ingresso all'organo. La vena e l'uretere costituiscono i due condotti in uscita adibiti al flusso rispettivamente di sangue depurato e dell'urina

3.2.2. Funzioni

Il rene, come ogni struttura dell'organismo ha un'architettura morfologicamente correlata al ruolo a cui è adibito; tra le sue funzioni principali vi sono:

- Regolazione dell'espulsione dei cataboliti dell'organismo e delle sostanze tossiche e il riassorbimento delle sostanze necessarie in funzione della pressione osmotica delle stesse.
- Regolazione dell'equilibrio elettrolitico, svolto a mezzo dell'espulsione di sali in eccesso o il riassorbimento degli stessi e contemporaneamente bilancio della quantità di acqua espulsa
- Influisce nella produzione e nell'escrezione di acidi e basi
- Ha un ruolo attivo nella produzione di ormoni e molecole ausiliarie quali la vitamina D.

Nella proposta di rigenerazione del rene è fondamentale ripristinare ognuno di questi contributi di vitale importanza per l'organismo.

3.2.3. Il sistema di controllo, modelli complessi da preservare

Meccanismi di controllo fluidodinamico

Tramite le arterie renali i reni ricevono circa il 20% della portata cardiaca. L'80-90% della portata renale ematica (PRE) circola nella corticale, il rimanente nella midollare.

La frazione di portata sanguigna entrante nel rene ha varia entro un intervallo fisiologico tra il 12% e il 30%. Esistono nei reni dei meccanismi di feedback molto precisi che regolano i valori fluidodinamici al proprio interno, sistemi si riflettono su tutto l'organismo. Questi meccanismi possono essere schematizzati come nella maggior parte dei distretti corporei come un equilibrio di pressioni, affrontando il problema fluidodinamico con metodi a parametri concentrati, approssimandolo cioè al suo circuito equivalente elettrico, in cui principalmente vale

$$\Delta P = Q \cdot R \quad \text{con R determinata dalla legge di Poiseuille} \quad (3.1)$$

$$Q(t) = C \cdot \left[\frac{\partial P(t)}{\partial t} \right] \quad \text{con C compliance dei vasi} \quad (3.2)$$

$$\Delta P(t) = L \cdot \left[\frac{\partial Q(t)}{\partial t} \right] \quad (3.3)$$

Regolazione dell'ultrafiltrazione glomerulare

Nelle varie sezioni della circolazione renale vigono pressioni diverse: a livello dei grossi vasi in ingresso, le arterie interlobari, arcuate e interlobulari, la pressione è di circa 100 mmHg, mentre nelle vene, che alla fine convogliano il sangue verso la vena renale ha un valore di circa 8 mmHg, le zone di maggior resistenza al flusso sanguigno sono le piccole arteriole renali periferiche, con un comportamento simile a quello dei capillari dei distretti periferici e le arteriole che permettono al sangue di attraversare i glomeruli: l'arteriola afferente quella efferente.

A cavallo dei capillari glomerulari si ha una caduta di pressione di 40 mmHg (da 100 mmHg in ingresso a 60 mmHg in uscita). A livello dei capillari peritubulari la pressione scende ad un valore medio di 13 mmHg. Si può capire, allora, che il glomerulo operando ad una pressione di 60 mmHg, promuove una rapida filtrazione di liquido, mentre i capillari peritubulari lavorando a 13 mmHg, permettono un rapido

assorbimento di liquido per effetto dell'elevata pressione osmotica del plasma.

Questo primo bilancio pressorio è quindi alla base del meccanismo di ultrafiltrazione glomerulare; si può ritenere che tale fenomeno sia un meccanismo dinamico regolato da un sistema di forze:

- **Pressione idrostatica dei capillari glomerulari.** Promuove la filtrazione glomerulare. È la pressione ematica media all'interno dei capillari glomerulari. È stata misurata direttamente soltanto nel ratto, in cui il valore medio è di 45 mmHg. Da varie misurazioni indirette, nell'uomo è stata calcolata di circa 60 mmHg, tenendo tuttavia presente che questo valore può aumentare o diminuire considerevolmente in differenti condizioni.
- **Pressione colloidosmotica nella capsula del Bowman.** Promuove la filtrazione glomerulare. Normalmente una quota molto piccola di proteine passa nel filtrato glomerulare e quindi questo fattore non ha alcun effetto significativo e viene di solito considerato pari a zero.
- **Pressione idrostatica della capsula del Bowman.** Si oppone alla filtrazione glomerulare. Sulla base di misurazioni con micropipette si valuta che la pressione capsulare nell'uomo sia di circa 18 mmHg.
- **Pressione colloidosmotica delle proteine plasmatiche.** Anche questa pressione si oppone alla filtrazione. Poiché circa un quinto del plasma dei capillari glomerulari filtra nella capsula del Bowman, nel passaggio del sangue da un'estremità all'altra del glomerulo la concentrazione plasmatica delle proteine aumenta di circa il 20%. Se, quindi, la pressione colloidosmotica del sangue che entra nei capillari è, come di norma, pari a 28 mmHg, quando il sangue raggiunge l'estremo terminale dei capillari essa risulta aumentata a circa 36 mmHg; perciò la pressione colloidosmotica media nei capillari glomerulari può essere valutata intorno a 32 mmHg.

La pressione di filtrazione (P_f) è, quindi, il valore netto della pressione che spinge il liquido attraverso la membrana glomerulare e risulta

$$P_f = P_{\text{glomerulare}} - (P_{\text{capsulare}} + P_{\text{colloidale glom}}) = 60 - (32 + 18) = 10 \text{ mmHg} \quad (3.4)$$

Dalla pressione di filtrazione, dalla superficie glomerulare filtrante (numero di glomeruli funzionanti) e dalla permeabilità della membrana filtrante (membrana basale) dipende il valore di GFR, velocità di filtrazione glomerulare, un parametro che caratterizza la funzionalità renale. In condizioni fisiologiche la superficie glomerulare filtrante e la permeabilità della membrana filtrante sono costanti pertanto possono essere rappresentate da una costante (Kf) detta coefficiente di ultrafiltrazione.

$$GFR = Kf \cdot Pf = 125 \text{ ml/min} \quad (3.5)$$

Determinazione del valore di GFR

Per la determinazione del GFR si utilizzano metodi indiretti, basati sulla filtrazione delle sostanze di cui sono note le concentrazioni nel plasma e nelle urine. Dette

C (plasma) la concentrazione della sostanza nel plasma

C(urina) la concentrazione della stessa sostanza nelle urine

V (filtrazione) la velocità di filtrazione della sostanza dal glomerulo

V (espulsione) la velocità di secrezione della sostanza nelle urine

risultano

$$V_{\text{filtrazione}} = C_{\text{plasma}} \cdot GFR \quad (3.6)$$

$$V_{\text{espulsione}} = C_{\text{urina}} \cdot \text{flusso}_{\text{urina}} \quad (3.7)$$

Se la sostanza in questione ha la proprietà di venir filtrata completamente, ma di non venir né riassorbita né secreta dal tubulo, allora tutta quella filtrata viene escreta con le urine, cioè la velocità della sua filtrazione è uguale a quella della sua escrezione, perciò

$$GFR = \frac{C_{\text{urina}} \cdot \text{flusso}_{\text{urina}}}{C_{\text{plasma}}} \quad (3.8)$$

La sostanza che di solito viene utilizzata per tale misura è “l’inulina”

Regolazione del GFR

Esistono dei meccanismi di feedback nel rene che permettono di mantenere invariato il GFR anche in risposta a variazioni molto alte della PA sistemica e quindi in ingresso al rene.

Ciò è di estrema importanza dal momento che anche variazioni del 5% porterebbero delle disfunzioni importanti: se la velocità di filtrazione glomerulare scendesse, il filtrato passerebbe attraverso i tubuli così lentamente che verrebbe pressoché completamente riassorbito. Al contrario, se il GFR fosse eccessivamente alto, il filtrato passerebbe così rapidamente attraverso i tubuli che questi sarebbero incapaci a riassorbire quelle sostanze che devono essere trattenute nell'organismo per uno squilibrio delle tempistiche di diffusione e convezione.

L'apparato che svolge il ruolo di regolazione è quello *juxtaglomerulare*, che agisce attraverso il *meccanismo di vasodilatazione dell'arteriola afferente* ed il *meccanismo di vasocostrizione dell'arteriola efferente*.

Regolazione della portata renale ematica (PRE)

I meccanismi che fanno fronte alle variazioni della PA sistemi in ingresso al rene e che permettono

un' autoregolazione del flusso ematico renale coinvolgono ancora una volta le arteriole afferenti: oltre al fenomeno della vasodilatazione che regola il GFR, si verifica un *meccanismo miogeno*. All'aumentare della PA si genera uno stiramento delle pareti dell'arteriola con la sua conseguente contrazione e aumento della resistenza.

La diminuzione della pressione arteriosa al contrario determina un rilassamento delle fibrocellule muscolari lisce, e quindi una vasodilatazione arteriolare.

In base a quanto detto è evidente l'importanza di preservare l'integrità delle strutture renali ai fini di rigenerare l'organo; sono sufficienti piccole variazioni conformazionali a far fallire la complessa macchina autoregolata. E' altrettanto importante il mantenimento della componente proteica per indurre la ricellularizzazione dell'organo e ottenere una distribuzione cellulare tale da indurre l'acquisizione del fenotipo altamente specializzato corretto per lo svolgimento delle funzioni [14], [15], [16], [17], [18].

TABLE 1. ECM components in the mesangial matrix^a

Components	Ref. No.
Collagens	
Type III	14
Type IV	15-18
Type V	15,18
Type VI	18-20
Microfibrillar Proteins	
Fibrillin	21
MAGP	22,23
MP 78	24
MP 340	24
Fibronectin	16,25-27
Laminin	16,26,28
Entactin	29
Thrombospondin	30
HS-PG	31
CS-PG	32
IG 10 Antigen	33

^a MAGP, microfibril-associated glycoprotein; MP, microfibrillar protein; HS-PG, heparan sulfate glycoprotein; CS-PG, chondroitin sulfate proteoglycan.

Figura 3.17 : Proteine costituenti la matrice extracellulare del mesangio

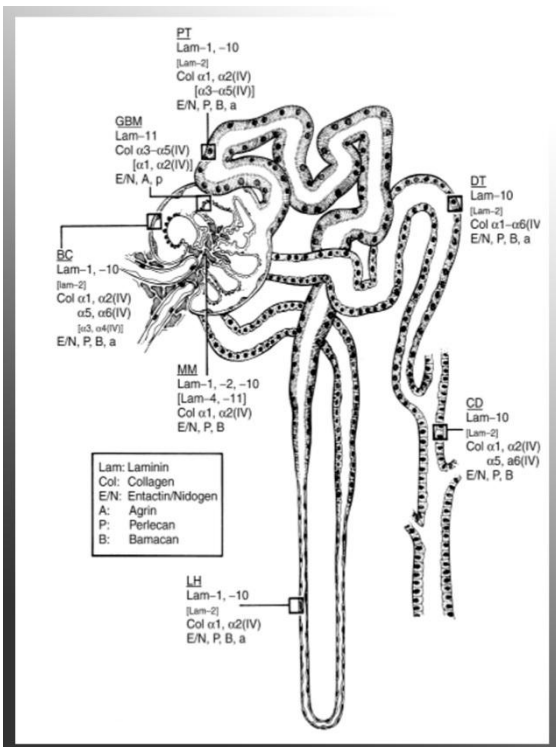


Figura 3.18 : Distribuzione delle proteine della matrice extra cellulare costituenti il nefrone

3.3. Soluzioni per la decellularizzazione

L'obiettivo della decellularizzazione di un intero rene perchè possa essere successivamente utilizzato come “scaffold” per una ripopolazione è duplice: eliminare completamente ogni residuo cellulare, (materiale citoplasmatico, frammenti di membrana e acidi nucleici) scarti che impiantati in un ospite vivente scatenerrebbero una forte reazione immunitaria e minimizzare gli effetti dannosi sulla composizione, l'attività biologica e l'integrità morfologica della rimanente matrice extra cellulare.

In realtà, tutti i metodi studiati per la rimozione della componente cellulare da un tessuto, sono inevitabilmente dannosi parzialmente anche per l'impalcatura proteica in cui questa è inserita, sia nel caso di trattamenti chimici perchè frequentemente gli stessi detergenti in grado di rompere la membrana cellulare sono dannosi anche per proteine della matrice, sia, come è ovvio, nel caso di metodi fisici o di pressioni alte nelle perfusioni, che possono agire sulle strutture molto precise e delicate. Il caso del rene, con una matrice basale molto variegata e sofisticata, aggiunta alla difficile raggiungibilità delle cellule in essa compattate, complica ulteriormente la scelta del tipo di trattamento.

Le possibili soluzioni annoverate tra i metodi utili alla decellularizzazione prevedono spesso una combinazione di tecniche chimiche, fisiche e enzimatiche.

I trattamenti fisici non sono mai completi da soli, pertanto vengono spesso affiancati a soluzioni chimiche; tra di essi ci sono la sonicazione, agitazione, applicazione pressoria o metodi di congelamento-scongelo. L'effetto di queste tecniche è quello di frammentare la membrana cellulare e favorirne la fuoriuscita di contenuto.

I trattamenti enzimatici riguardano in genere la tripsina per la rottura dei legami di connessioni intracellulari e intercellulari e nuovamente quella delle proteine transmembranal. Altri enzimi specifici vengono usati per la frammentazione di materiale nucleare.

Lo stesso scopo di frammentazione della membrana è affidato ai detergenti e alle soluzioni ioniche.

Generalmente il metodo di azione di un protocollo di decellularizzazione prevede:

- Lisi della membrana cellulare (con soluzioni ioniche o metodi fisici)
- Separazione del materiale cellulare da quello proteico della matrice extracellulare (utilizzando trattamenti enzimatici oppure solubilizzando con dei detergenti il materiale citoplasmatico e nucleare)
- Rimozione degli scarti cellulari dall'architettura della matrice (in genere con perfusione)

Tutti i passaggi possono essere amplificati nell'effetto sulla decellularizzazione come sul danno alla struttura proteica, dall'aggiunta di metodi meccanici quali l'agitazione o le alte pressioni.

Tra i metodi chimici utilizzabili ci sono i trattamenti acidi o alcalini, i detergenti ionici o non-ionici, i detergenti zwitteronici, le soluzioni ipotoniche e ipertoniche e gli agenti chelanti.

La maggior parte di questi associa vantaggi a svantaggi, che vanno considerati e bilanciati nella stesura di ogni protocollo.

I trattamenti alcalini e acidi sono prevalentemente usati per la rimozione del materiale genetico e per la solubilizzazione di quello citoplasmatico. E' un trattamento altamente efficiente e associa il vantaggio di disinfettare il costrutto prevenendo infezioni da microrganismi, tuttavia tende a danneggiare la matrice extracellulare per la disgregazione anche di peptidi importanti come i glicosamminoglicani da tessuti ricchi in collagene.

I detergenti non-ionici sono molto utilizzati per il comportamento moderatamente dannoso per la struttura proteica. Essi agiscono sulla membrana fosfolipidica, rompendo le interazioni lipide-lipide, ma lasciando intatte quelle interpreteiche. Il detergente appartenente a questa categoria più utilizzato è il Tryton X-100. I suoi effetti osservati nei casi di decellularizzazione sono positivi per quanto riguarda la rimozione di materiale genetico e l'integrità della matrice, ma negativi per la rimozione completa di scarti cellulari.

I detergenti ionici, invece sono molto efficaci nella solubilizzazione del materiale di scarto cellulare, sia citoplasmatico che nucleare, però tendono maggiormente a danneggiare le proteine rompendone le interconnessioni. I detergenti di questo tipo più utilizzati sono il "Sodio Dodecyl Solfato", comunemente definito "SDS" e il "Sodio Desossicolato". L' SDS è ritenuto molto efficiente nella rimozione completa dei detriti cellulari, non danneggia il collagene ma disgrega i glicosamminoglicani e le piccole molecole cariche. Il Sodio Desossicolato, non risulta altrettanto efficace nella decellularizzazione e provoca molti danni alla struttura proteica.

Il detergente zwitterionico più utilizzato è il "3-[(3-colamidopropil)dimetilammonio]-1-propansulfonato", comunemente definito "CHAPS"; questo si è dimostrato dannoso per la matrice extracellulare di molti tessuti, ma è risultato ottimo nella decellularizzazione degli endoteli dei vasi, di cui restituisce collagene e elastina perfettamente integri [3].

Le soluzioni ipotoniche e ipertoniche hanno lo scopo di provocare degli shock osmotici che inducono la lisi inevitabile della membrana cellulare; questo trattamento deve essere seguito dall'uso di detergenti solubilizzanti per la rimozione dei detriti cellulari.

Gli agenti chelanti vengono utilizzati nel distacco delle cellule dal substrato proteico; questo avviene grazie al sequestro da parte delle molecole strutturate ad anello, dei cationi bivalenti metallici (Ca, Mg, etc.) necessari per i legami di adesione cellulare. Anche in questo caso è richiesto l'uso di un post-trattamento con ulteriori metodi.

Dopo l'applicazione di qualsiasi trattamento di decellularizzazione è necessario procedere con abbondanti lavaggi neutri, effettuati in genere con soluzione fisiologica, per evitare che residui chimici possano persistere nello "scaffold" ottenuto e compromettere la successiva fase di ricellularizzazione [4].

Table 1
Commonly used decellularization methods and chaotropic agents

Method	Mode of action	Effects on ECM
Physical		
Snap freezing	Intracellular ice crystals disrupt cell membrane	ECM can be disrupted or fractured during rapid freezing
Mechanical force	Pressure can burst cells and tissue removal eliminates cells	Mechanical force can cause damage to ECM
Mechanical agitation	Can cause cell lysis, but more commonly used to facilitate chemical exposure and cellular material removal	Aggressive agitation or sonication can disrupt ECM as the cellular material is removed
Chemical		
Alkaline; acid	Solubilizes cytoplasmic components of cells; disrupts nucleic acids	Removes GAGs
Non-ionic detergents		
Triton X-100	Disrupts lipid–lipid and lipid–protein interactions, while leaving protein–protein interactions intact	Mixed results; efficiency dependent on tissue, removes GAGs
Ionic detergents		
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Solubilize cytoplasmic and nuclear cellular membranes; tend to denature proteins	Removes nuclear remnants and cytoplasmic proteins; tends to disrupt native tissue structure, remove GAGs and damage collagen
Sodium deoxycholate Triton X-200		More disruptive to tissue structure than SDS Yielded efficient cell removal when used with zwitterionic detergents
Zwitterionic detergents		
CHAPS	Exhibit properties of non-ionic and ionic detergents	Efficient cell removal with ECM disruption similar to that of Triton X-100
Sulfobetaine-10 and -16 (SB-10, SB-16)		Yielded cell removal and mild ECM disruption with Triton X-200
Tri(<i>n</i> -butyl)phosphate	Organic solvent that disrupts protein–protein interactions	Variable cell removal; loss of collagen content, although effect on mechanical properties was minimal
Hypotonic and hypertonic solutions	Cell lysis by osmotic shock	Efficient for cell lysis, but does not effectively remove the cellular remnants
EDTA, EGTA	Chelating agents that bind divalent metallic ions, thereby disrupting cell adhesion to ECM	No isolated exposure, typically used with enzymatic methods (e.g., trypsin)
Enzymatic		
Trypsin	Cleaves peptide bonds on the C-side of Arg and Lys	Prolonged exposure can disrupt ECM structure, removes laminin, fibronectin, elastin, and GAGs
Endonucleases	Catalyze the hydrolysis of the interior bonds of ribonucleotide and deoxyribonucleotide chains	Difficult to remove from the tissue and could invoke an immune response
Exonucleases	Catalyze the hydrolysis of the terminal bonds of ribonucleotide and deoxyribonucleotide chains	

Figura 3.19 : Metodi comunemente utilizzati per la decellularizzazione del rene; soluzioni possibili , principio di azione e effetti sulla matrice extracellulare

3.4. Soluzioni per la ricellularizzazione

La componente cellulare è la chiave della realizzazione degli organi: essa viene seminata con diverse tecniche all'interno degli "scaffold" oppure viene indotta a migrarvi nel caso di particolari applicazioni in vivo. La successiva proliferazione e deposizione di matrice proteica (variabile in base al fenotipo), determinano la formazione del nuovo tessuto.

Le cellule utilizzate per ripopolare il rene possono appartenere a due gruppi diversi per origine: possono essere "primarie", ottenute cioè per estrazione e isolamento da tessuti biologici, oppure possono appartenere a delle "linee cellulari". Queste ultime sono standardizzate, commerciali e dalle caratteristiche note, specifiche e catalogate. Spesso sono "immortalizzate", rese immuni alla senescenza, permettendo loro di proliferare illimitatamente (questa caratteristica può essere ottenuta con metodi elettrochimici o tramite il prelievo delle stesse direttamente da tessuti tumurali). Le cellule di linea offrono il vantaggio della ripetibilità degli esperimenti e della semplicità della coltura, ma contemporaneamente sono inutilizzabili nella realizzazione dei costrutti che debbano essere impiantati in vivo, poiché spesso risultano oncogene e prive di inibizione da contatto. Al contrario, le cellule di origine primaria sono ottenibili tramite procedimenti più laboriosi, sebbene più economici; non offrono la certezza della purezza (garantita nel caso delle cellule di linea) ma sono fondamentali nel caso di sostituti tessutali (in particolar modo quelle autologhe dell'individuo a cui il costrutto è destinato).

Le cellule utilizzate si distinguono in base alla loro origine, in funzione del destinatario del trattamento per cui sono utilizzate: possono essere di natura autologa, cioè provenienti dallo stesso individuo ricevente (donatore e ricevente coincidono), possono essere allogene, cioè prelevate da un donatore appartenente alla stessa specie del ricevente, singeniche, cioè con genoma coincidente con quello del ricevente, pertanto derivate con tecniche di clonazione. Infine le cellule che vengono isolate a partire da un individuo appartenente ad una specie diversa da quella del destinatario, si definiscono xenogene [19].

Ai fini della medicina rigenerativa e dell'ingegneria tissutale, la scelta del tipo cellulare non è univoca: in funzione dell'applicazione infatti è opportuno propendere per una delle soluzioni sopra descritte in funzione di diversi criteri: disponibilità, rischi, tipo di

costruito, applicazione, e fase della sperimentazione.

La soluzione di maggiore interesse, seppure costosa è quella offerta dalle cellule staminali. Esse sono cellule precursore, presenti in diversi stadi dell'ontogenesi di un organismo con delle caratteristiche di indifferenziamento decrescenti: si conoscono le proprietà di totipotenza delle cellule staminali embrionali (“ES cells”), la capacità di differenziarsi in momenti successivi, se correttamente stimolate fino all'espressione di qualunque fenotipo. Le staminali fetali e infine le adulte presentano delle caratteristiche di pluripotenza e di multipotenza, fino ad offrire la possibilità di generare solo pochi tipi di cellule. L'altra caratteristica di notevole interesse delle cellule staminali è la capacità di proliferazione molto alta [20].

Le innumerevoli problematiche etiche, la complessità delle tecniche di clonazione (il cui successo è legato all'età dell'individuo di cui si vuole preservare il genotipo, la spesso difficile reperibilità di tutti i tipi di cellule staminali, ha aperto la strada alla ricerca di soluzioni alternative che ha portato all'ottenimento di tecniche, seppure ancora non ottimizzate, per l'induzione della pluripotenza su cellule somatiche quali ad esempio i fibroblasti adulti. La riprogrammazione di cellule differenziate ad uno stato di pluripotenza, che si è dimostrato essere indistinguibile per le caratteristiche di metilazione del DNA, stato della cromatina e espressione genica da quello delle cellule staminali embrionali, si ottiene tramite espressione ectopica di specifici fattori di trascrizione [21], [22].

Come già osservato, la problematica principale delle applicazioni mediche in cui sia necessario l'impianto di una componente biologica non autologa (o singenica) è il rigetto dato dall'attivazione della risposta immunitaria precoce; per questo nelle applicazioni in cui si utilizzano donatori geneticamente diversi dal ricevente sono spesso necessarie barriere di isolamento oppure specifiche linee cellulari poco immunogeniche, da associarsi ad una terapia immunosoppressiva [3].

Perciò, ai fini della ricellularizzazione del rene, nell'ottica del risultato finale, cioè per poter realizzare un organo impiantabile, è decisamente sconsigliabile la scelta di utilizzare cellule allogene o di linea, ad eccezione di quelle staminali embrionali, che non risultano accendere risposta immunitaria nell'ambiente biologico ospite; altrettanto incompatibile con il progetto è la scelta di cellule autologhe di diretta derivazione del rene: per l'estrema varietà dei fenotipi espressi nell'organo, per la scarsa capacità proliferativa degli stessi e per la difficoltà di reperire biopsie sane nel contesto

nefropatico.

Le tipologie favorite in tutte le ricerche inerenti la ricellularizzazione del rene sono:

- Cellule staminali embrionali
- Cellule staminali a pluripotenza indotta (iPS) autologhe
- Cellule endoteliali

4. STATO DELL'ARTE

4.1. Metodi di decellularizzazione della matrice ECM renale, effetto dei detergenti

Rispetto alla rigenerazione degli altri organi e agli esiti promettenti che le ricerche in merito riportano, quella del rene sembra dare risultati meno rapidi.

Sono riportati in letteratura scientifica i casi di due unici gruppi di ricerca che hanno affrontato con procedure paragonabili il problema della rigenerazione in vitro dell'organo. E' necessario precisare che il rene è molto ricco in cellule parenchimali a scapito della matrice extracellulare che è relativamente bassa in contenuto percentuale. Anche la microarchitettura estremamente complessa dell'organo, con le sue strutture altamente specializzate costituiscono una difficoltà al processo di decellularizzazione e ricellularizzazione, sia per la perfusione ottimale e omogenea dei solventi, sia per la sua intrinseca fragilità. Inoltre, la matrice ECM è composta da una notevole varietà di proteine che supportano almeno 26 tipi diversi di cellule; tale varietà peptidica e cellulare potrebbe non rispondere omogeneamente ai metodi di decellularizzazione, inoltre, per la stessa ragione, si rende impossibile l'infusione di cellule già differenziate, che non riuscirebbero a raggiungere selettivamente la posizione corretta e a ripopolare il rene. Uno studio preliminare di Nakayama et al., effettuato su sezioni di reni di scimmia "Rhesus", ha affrontato il problema del danneggiamento arrecato alla matrice extra cellulare di organi di individui diversi per età, da differenti soluzioni di decellularizzazione (ottenuta per semplice immersione e non per perfusione), indicando come detergente migliore per il mantenimento dell'integrità delle proteine l'SDS utilizzato a 4°C. Lo stesso studio ha concluso che la matrice decellularizzata di rene appare diversa da donatore a donatore in funzione dell'età ma che in tutti i casi risulta un ambiente ottimale per una coltura interattiva di diverse linee cellulari [23].

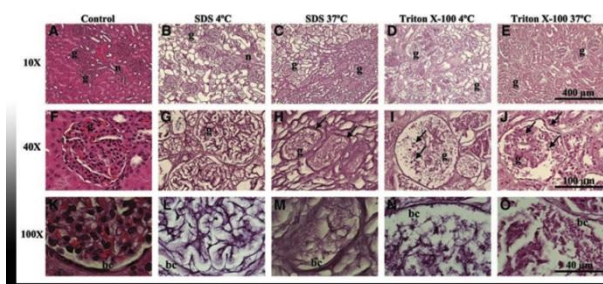


Figura 4.1 : Effetti di due diversi detergenti a diverse temperature su sezioni di rene di scimmia. Lo studio compara un detergente ionico (SDS) e non ionico (Tryton) e la degradazione della matrice occorsa dopo immersione statica dei campioni. I diversi ingrandimenti mostrano la struttura del glomerulo

4.2. La rigenerazione del rene porcino con cellule endoteliali

Un altro studio cita il rene tra altri organi di cui si è ottenuta la completa decellularizzazione; in questo caso gli organi provengono da animali di specie di taglia maggiore, quali furetto e maiale. Il protocollo utilizzato si basa su Tryton X-100 all'1% e idrossido di ammonio in acqua deionizzata. Anche in questo caso i risultati si sono limitati ad ottenere la presenza di cellule endoteliali nella matrice successiva all'iniezione [24].

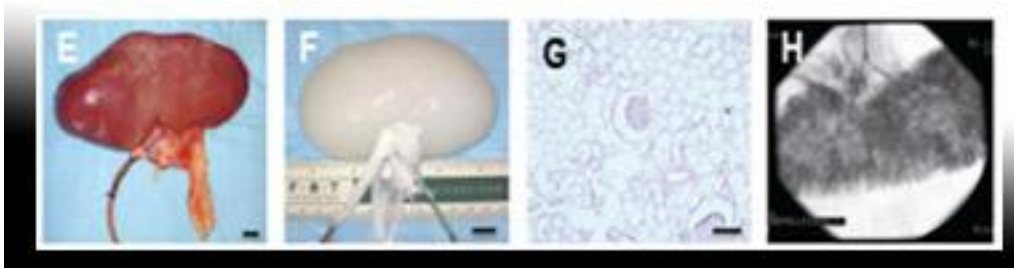


Figura 4.2 : Decellularizzazione del rene porcino: E) Organo dopo il prelievo, F) Organo a fine protocollo di decellularizzazione, G) Immunoistochimica, marcatura con Ematossilina e Eosina che denota la completa assenza di cellule, H) Immagine di fluoroscopia per infusione nei vasi di mezzo di contrasto

4.3. La rigenerazione del rene di ratto con cellule staminali embrionali murine

Uno studio per la decellularizzazione dell'intero organo è stato descritto da Ross et al. nell'articolo scientifico “Embryonic Stem Cells Proliferate and Differentiate when Seeded into Kidney Scaffolds”.

La decellularizzazione è stata inizialmente condotta con l'utilizzo di due diversi protocolli, uno basato sull'uso di “SDS” (detergente ionico), l'altro su quello di Sodio Desossicolato, detergente ionico dall'azione più blanda ma più dannosa per le proteine, che pertanto ha dato dei risultati peggiori in termini di rimozione completa delle cellule e dei detriti.

Approfondendo quindi il metodo basato sul detergente SDS, il gruppo ha redatto un protocollo approssimativamente descritto nel lavoro pubblicato, che prevede l'utilizzo in sequenza di soluzioni non ioniche, ioniche, ipertoniche (cloruro di magnesio cloruro di sodio e magnesio solfato).

Infine si sono state utilizzate soluzioni enzimatiche per la rimozione e frammentazione del materiale nucleare basate sulla DNAsi 0,0025% in “buffer” acido a pH 5.

La decellularizzazione viene indotta tramite perfusione attraverso l'arteria renale, incannolata dopo il prelievo dell'organo ; si utilizza un sistema “a gravità”, che permetta di mantenere all'ingresso del rene delle pressioni fisiologiche di far ricircolare il fluido.

Per la fase dell'iniezione cellulare viene scelto di utilizzare cellule precursore indifferenziate; si utilizzano cellule staminali embrionali di topo, iniettate manualmente dopo il condizionamento dello “scaffold” proteico con terreno di coltura.

Vengono iniettati 2 milioni di cellule, inizialmente solo in modo anterogrado attraverso l'arteria renale, in un secondo momento in modo retrogrado attraverso l'uretere.

Per studiare l'adesione, la proliferazione e il differenziamento cellulare si utilizzano tre protocolli differenti: il primo si basa su incubazione statica con ricambio del mezzo di coltura ogni 48 ore, il secondo, non attuabile nella rigenerazione del rene, prevede la coltura indipendente di “sezioni” di rene tagliate dopo l'iniezione. Infine, il terzo metodo è basato su un'incubazione statica di 24 ore e successiva infusione di terreno di coltura attraverso l'arteria renale con una pompa peristaltica.

I risultati hanno mostrato una completa rimozione della componente cellulare originale e il buon mantenimento della matrice extracellulare. Per quanto riguarda la ricellularizzazione, si è rilevata l'apoptosi delle cellule mantenute in vivo. La

coltura di quelle seminate nelle sezioni di rene hanno mostrato una proliferazione e differenziamento in cellule piatte “Endothelial-like” dopo il quarto giorno di incubazione.

Infine, il sistema di perfusione di terreno di coltura, ha mostrato la proliferazione delle cellule adese all'interno dei vasi e l'apoptosi di quelle sospese nel lumen e rimozione delle stesse attraverso il flusso. Tuttavia, il differenziamento e la ripopolazione dell'intero organo, rispetto al caso della coltura sulle sezioni sono risultati più complicati, traguardi che richiedono ulteriori studi e metodi alternativi di induzione [25].

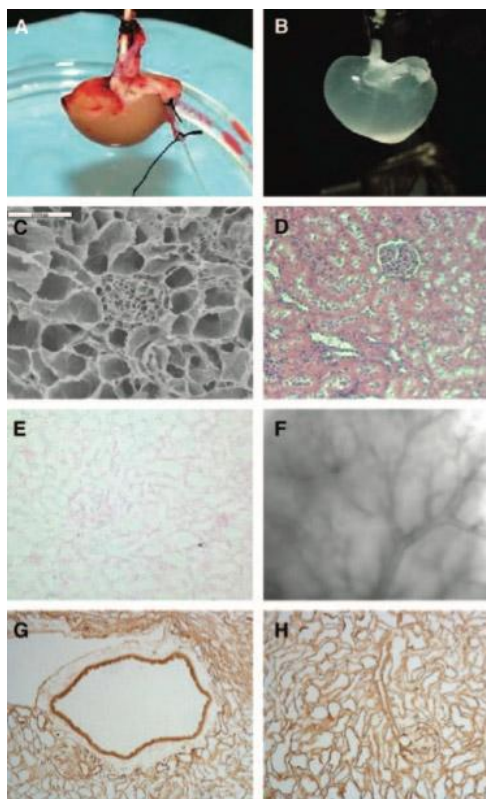


Figura 4.3 : Immagini relative alla decellularizzazione del rene di ratto ottenuta con protocolli a base di SDS e di Sodio desossicolato. A) Rene immediatamente dopo l'espanto: si notano l'incannulamento dell'arteria e dell'uretere. B) Rene dopo la decellularizzazione, C) Immagine ottenuta con SEM della matrice decellularizzata: si nota la struttura di un glomerulo e la zona tubulare adiacente. D-E) Istologie con Ematossilina e Eosina su tessuto renale prima e dopo la decellularizzazione che evidenzia la completa rimozione delle cellule. F) Immagine di fluoroscopia. F-H) Istologie con Ematossilina e Eosina su regioni rispettivamente corticale e midollare.

5. OBIETTIVI DEL LAVORO

Il fine del lavoro di ricerca è quindi quello di affrontare nuovamente il problema della rigenerazione tanto complessa del rene, individuandone gli ostacoli e fornendo delle linee guida per il conseguimento degli “step” necessari per la buona riuscita.

In particolare si è voluto affrontare in modo esaustivo il problema della decellularizzazione, fase critica del lavoro, che con il suo fallimento compromette necessariamente anche l'esito di quelle successive.

Si vuole quindi svolgere un lavoro sperimentale, che permetta di saggiare la bontà dei metodi utilizzati in letteratura per la decellularizzazione, valutandone l'effetto sulla prima fase di ricellularizzazione: l'immissione delle cellule e la distribuzione delle stesse all'interno dell'organo.

Questa fase, spesso sottovalutata nei lavori precedentemente citati, potrebbe individuare l'impedimento principale alla seguente fase di ripopolamento dell'organo e ripristino delle strutture.

Si vuole pertanto ripercorrere le procedure sviluppate e descritte dai gruppi di ricerca già impegnati nel settore, individuandone gli aspetti negativi e apportandovi delle modifiche, al fine di migliorare i processi e renderli più ripetibili.

Per poter svolgere l'attività sperimentale si incontra l'evidente necessità di disporre di dispositivi idonei alla realizzazione di un sistema di decellularizzazione e ricellularizzazione e delle metodiche con cui condurle.

Gli obiettivi del lavoro qui presentato possono quindi essere ricondotti a due principali settori operativi:

- **Il lavoro di progettazione del sistema di decellularizzazione- Ricellularizzazione e i dispositivi che lo compongono**
- **Lo sviluppo e l'ottimizzazione delle metodiche per la sperimentazione**

Il primo compito è stato svolto partendo da soluzioni semplici fino ad arrivare alla realizzazione di un sistema più specifico, comprendente una camera di perfusione per la decellularizzazione (coincidente con il bioreattore per la coltura cellulare della fase di ricellularizzazione), un circuito di perfusione e la strumentazione per l'applicazione di

flusso e la rilevazione di segnali.

Una volta realizzata l'attrezzatura e costituito il sistema di lavoro, si è potuto procedere con la sperimentazione, sviluppando e validando di volta in volta i protocolli da applicare.

Gli stessi sono stati sviluppati in base agli esiti a cui hanno portato di volta in volta, effettuando così un percorso di ottimizzazione.

Si sono contemporaneamente raccolti i dati degli esperimenti, sulla base di cui si sono formulate delle ipotesi conclusive e delle proposte, nell'ottica di fornire la base per gli sviluppi successivi della ricerca in questo ambito, che prevede ancora molti obiettivi da raggiungere.

PARTE II – MATERIALI E METODI

6. REALIZZAZIONE DEL SISTEMA DI DECELLULARIZZAZIONE-RICELLULARIZZAZIONE

L'ottimizzazione del sistema di decellularizzazione-ricellularizzazione si è svolta all'interno di un percorso in continua evoluzione che ha previsto il susseguirsi dell'alternanza delle fasi di procedure di messa a punto e di quelle di sperimentazione.

In uno stadio preliminare, ci si è basati sull'uso di dispositivi già disponibili nel laboratorio e di un prototipo di bioreattore precedentemente realizzato, assemblati a formare un sistema basilare atto a guidare nella comprensione delle difficoltà pratiche riscontrabili nella sperimentazione.

Per poter individuare i requisiti da soddisfare nel progetto e nello sviluppo di una nuova attrezzatura e di nuove metodiche di lavoro, si è scelto di adottare un primo protocollo di decellularizzazione redatto sulla base delle ricerche bibliografiche effettuate.

Si vuole in questo capitolo descrivere il percorso che si è svolto nella realizzazione del sistema di decellularizzazione-ricellularizzazione, partendo da un prototipo esistente e dalle problematiche da esso evidenziate, passando da un "metaprogetto", fino alla realizzazione del sistema definitivo, usato successivamente per la sperimentazione, influenzata dalle tecniche produttive, dalla disponibilità economica e dalle esigenze di lavoro.

Per impostare il sistema si sono effettuate delle scelte preliminari:

- Si è scelto di allestire un unico apparato in grado di decellularizzare e ricellularizzare il rene, per ridurre quanto possibile le movimentazioni e gli stress apportati all'organo.
- Si è preferito improntare la fase di decellularizzazione su metodiche chimiche, considerando come unico fattore di stress meccanico la pressione impressa al fluido

Il sistema pertanto deve essere organizzato nell'ottica della perfusione, i componenti necessari al suo funzionamento basilare sono: una camera di coltura/alloggiamento del rene, comunicante con l'esterno in modo sterile, una pompa che generi il flusso delle soluzioni, un sistema di tubi e raccordi di connessione tra i due, un sistema di rilevazioni dati di pressione.

In particolare si richiede che le soluzioni vengano perfuso direttamente nelle arterie del rene, perciò si rendono necessarie delle strutture di incannulamento, in linea con il sistema di tubi.

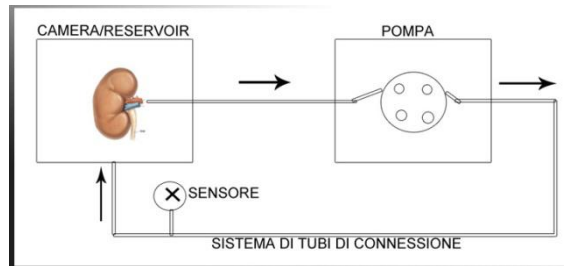


Figura 6.1 : Schema concettuale di funzionamento del sistema di perfusione che si vuole progettare, realizzare e adottare nella sperimentazione sulla decellularizzazione e ricellularizzazione del rene

6.1. Condizioni preliminari

Nella fase iniziale del lavoro, contemporaneamente alla ricerca bibliografica, è stato organizzato un sistema di perfusione basato su componenti preesistenti in laboratorio: un bioreattore in polycarbonato precedentemente realizzato e un circuito costituito basilare di tubi siliconici e di raccordi, un trasduttore di pressione e una pompa peristaltica. L'utilizzo di questo sistema ha mostrato rapidamente delle problematiche legate alla natura dei materiali, all'architettura dei dispositivi e ai limiti della strumentazione non adatti allo svolgimento della ricerca sperimentale.

6.1.1. Camera di perfusione preliminare

La camera di perfusione è composta da tre elementi: un corpo centrale cilindrico cavo, al cui interno si alloggia il rene, un basamento cilindrico per il posizionamento della camera e infine un coperchio ad avvitamento per i requisiti di sterilità

La cameretta mostra le seguenti caratteristiche:

- Foro passante di ingresso del ramo di andata dalla pompa vicino alla base : le dimensioni sono tali da poterci inserire ad incastro la cannula a cui è collegato il rene;
- Foro passante di uscita all'estremità opposta della cameretta rispetto al ramo di andata ed ad un'altezza maggiore: le dimensioni sono tali da poter consentire l'incastro del raccordo a cui è collegato il ramo di ritorno alla pompa e l'altezza è tale da minimizzare il pescaggio di detriti cellulari;
- Foro passante sulla base che costituisce lo scarico per le soluzioni ad ogni cambio: le dimensioni sono tali da consentire l'incastro di un rubinetto;
- La base è inclinata per consentire con facilità le fasi di scarico delle soluzioni;
- La parte superiore è filettata in modo tale da consentire al coperchio di avvitarsi senza difficoltà.



Figura 6.2 : Camera di perfusione utilizzata per le prove preliminari; si possono notare il basamento cilindrico, la chiusura ad avvitamento per il coperchio e i fori passanti attraverso lo spessore della camera, punti di giunzione con il circuito di tubi in silicone. L'incannulamento del rene è ottenuto tramite l'inserimento di una cannula monouso nel foro e la sua congiunzione con il catetere.

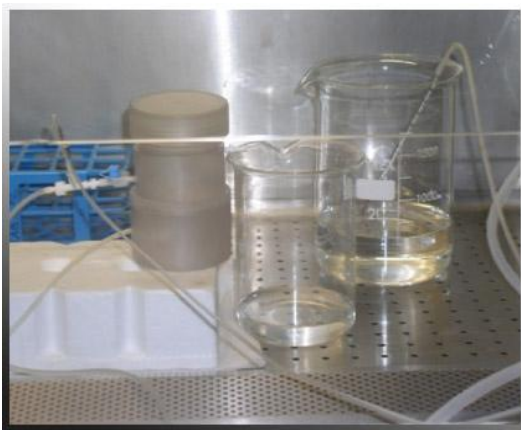


Figura 6.3 : Sistema di perfusione preliminare; si notano la cannula laterale con accesso al rene tramite un foro passante. Il basamento di appoggio della camera non è sufficientemente dimensionato per favorire la fuoriuscita per gravità dei liquidi interni alla camera, pertanto si notano lo spessore di polistirolo adottato nell'operazione di circuito aperto per evitare eccessive pressioni idrostatiche al rene.

6.1.2. Circuito di perfusione preliminare

Il circuito di perfusione è composto da un unico tubo in silicone connesso tramite giunti polimerici biconici da un lato ad un foro laterale della camera cilindrica, sull'altro ad un giunto a T alla cui uscita si è collegata la cannula rosa monouso inserita inserita a pressione in un altro foro passante sul lato opposto della camera.

La scelta del tubo in silicone è stata espressa in funzione della possibilità di sterilizzazione in autoclave, offerta dalla resistenza del materiale alle alte temperature. La lunghezza di 2 m è stata stabilita in accordo con le richieste spaziali del sistema, cioè in compatibilità con il posizionamento della pompa peristaltica e del bioreattore (sotto cappa chimica). Il diametro del tubo (esternamente pari a 4 mm e internamente pari a 2 mm, è stato determinato dalla compatibilità con la pompa peristaltica.

Il materiale monouso scelto per la semplice reperibilità e per la garanzia di sterilità è costituito dalla cannula inserita nel foro passante “di ingresso” alla camera e dai filtri utilizzati all'occorrenza come metodo di chiusura temporanea dei fori.

Inoltre, a congiungere la punta della cannula al rene, si utilizza un catetere del tipo PE50, non riciclabile, tagliato e sterilizzato in ossido di etilene a partire da una matassa. La dimensione del diametro del catetere è stata scelta perchè idonea ad incannulare in modo ottimale le arterie del rene.

6.1.3. Strumentazione preliminare

La scelta della pompa utilizzata, posizionata nel circuito tra il foro di uscita dalla camera e la cannula di ingresso al rene, è stata dettata dalla disponibilità della stessa nel laboratorio; si è utilizzata quindi una “Pompa Roller Multiflex Constant”, con portata regolabile attraverso una manopola a tacche.



Figura 6.4 : Pompa Roller Multiflex Constant con testina a due rulli. Si può notare la manopola di regolazione della portata e il semplice funzionamento. Sono disponibili due testine per lo svolgimento parallelo di due esperimenti.

Si è scelto di utilizzare come unico sensore, un sistema di acquisizione di pressione; anche in questo caso la scelta è stata guidata dalla disponibilità in laboratorio del dispositivo, pertanto si è adottato un trasduttore di pressione a membrana, con il rispettivo sistema di acquisizione a due canali “Battaglia-Rangoni”.



Figura 6.5 : Sistema di acquisizione a due canali Battaglia Rangoni con trasduttore a membrana e dispositivo con carta millimetrata per la riproduzione del tracciato pressorio

Il trasduttore a membrana è stato connesso tramite un segmento dello stesso tubo siliconico utilizzato per il circuito, con un giunto biconico all'uscita libera del raccordo a T, quindi immediatamente a monte (rispetto la direzione del flusso) della cannula.



Figura 6.6 : Sistema preliminare completo per le prime prove sperimentali. Si può notare anche il funzionamento fuori dalla cappa a flusso laminare previsto inizialmente per il protocollo D1

6.2. Progetto del sistema: problematiche e requisiti

Utilizzando il sistema precedentemente descritto sono state svolte delle prove di decellularizzazione, le quali hanno evidenziato in poche settimane molte criticità. Sulla base di queste problematiche si sono formulate delle “linee guida” progettuali per la definizione di un nuovo apparato da realizzare per la fase di sperimentazione.

6.2.1. Camera di perfusione: problematiche

Crepe

La camera in policarbonato, dopo poche prove di perfusione alla fine di cui ha subito i regolari processi di pulizia e sterilizzazione in autoclave, ha mostrato la formazione di crepe in prossimità dei fori passanti. Queste si sono accresciute di volta in volta, fino a diventare incompatibili con la perfusione. Il difetto non è da attribuirsi esclusivamente al materiale policarbonato (che vanta tra le proprie caratteristiche elevatissima tenacità in spessori sottili, ottima stabilità termica, resistenza alle radiazioni, elevata durata, scarsa infiammabilità, e una Tg pari a 150°C) ma agli stress residui di lavorazione introdotti dalla realizzazione dei fori (lavorazione meccanica a freddo successiva alla produzione). Anche la pressione esercitata manualmente nella preparazione del circuito (nell'inserimento della cannula nel foro di ingresso e del giunto bicono in quello d'uscita) ha contribuito a aggravare la condizione della parete della cameretta cilindrica.



Figura 6.7 : La problematica principale dell'utilizzo della camera di perfusione preliminare; si nota la formazione delle crepe su tutti i fori passanti della struttura

Difficoltà di alloggiamento del rene

Il rene prelevato e incannulato con catetere “PE50” deve essere posizionato all'interno della camera e una volta alloggiato, l'estremità libera del catetere deve essere fissata alla cannula rosa passante attraverso il foro laterale del bioreattore. Tale operazione, resa più complicata dalla delicatezza dell'organo e dalla fragilità del sistema di sutura del vaso al catetere, è ostacolata dall'imboccatura stretta della camera.

Difficoltà nello svuotamento della camera

Lo svuotamento della camera è stato progettato per avvenire per gravità, dopo l'apertura del rubinetto a tre-vie “Luer-Lock” posto nel foro sul fondo della stessa. La dimensione dello spessore, tuttavia, è risultata troppo piccola per favorire la fuoriuscita di tutto il liquido contenuto e contemporaneamente sufficientemente grande da creare difficoltà nelle manipolazioni iniziali del rene.

Apertura difficoltosa del rubinetto “Luer-Lock”

Anche l'apertura del rubinetto “Luer-Lock” si è dimostrata difficoltosa: essa è realizzata solo a mezzo del sollevamento manuale della camera rispetto alla base di appoggio.

Opacità

Tutti i componenti della camera di perfusione sono realizzati in policarbonato opaco; questa caratteristica impedisce il monitoraggio visivo (estremamente importante ai fini di prevedere l'esito dell'esperimento). L'impossibilità di osservare il rene si è rivelata particolarmente dannosa nei casi di perforatura del catetere o di persistenza di zone non decellularizzate, situazioni riconosciute solo alla fine dell'esperimento.

Risucchio del rene nel foro di svuotamento

La presenza del foro di sgocciolamento sul fondo del bioreattore ha provocato più volte il risucchio del rene stesso nella zona di convergenza con rischio di danneggiamento e ostruendo il foro di uscita.

6.2.2. Circuito di perfusione: problematiche

Errata distribuzione dei pesi

Nonostante l'estrema semplicità del circuito, si è riscontrata un'errata distribuzione dei pesi in prossimità del foro di ingresso alla camera: il giunto tre-vie connesso al ramo di ritorno dalla pompa e al tubo di collegamento al rilevatore di pressione esercitano uno sforzo flettente sulla cannula inserita a pressione manuale nel foro passante della camera cilindrica. Ciò ha contribuito al danneggiamento della parete di policarbonato nei pressi del foro e contemporaneamente ha provocato l'instabilità del sistema di incannulamento del rene.

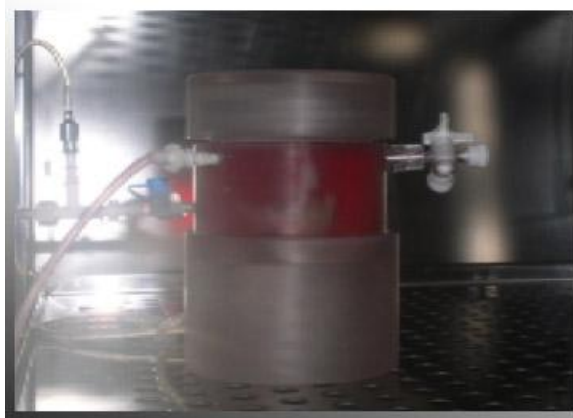


Figura 6.8 : Immagine della camera di perfusione all'interno dell'incubatore. Si nota in particolare la distribuzione dei pesi del circuito. In particolare la cannula laterale connessa ad un rubinetto a tre vie per la connessione del trasduttore di pressione, limita la stabilità del sistema.

Limitata possibilità di manipolazione del circuito

L'assenza di rubinetti a tre vie con uscite libere, ha impedito l'apertura del circuito atta allo svuotamento-riempimento volontario dello stesso

Assenza di debollatori

La semplicità del circuito non ha previsto l'inserimento in linea di un debollatore, in grado di evitare la formazione di piccole bolle la cui criticità si è rivelata altissima per l'integrità dei vasi del rene e della matrice extracellulare.

Scarsa “compliance” del circuito

La “compliance” limitata dei tubi siliconici in uso si è dimostrata insufficiente per attenuare le forti oscillazioni di pressione verificatesi a causa della pulsatilità implicita della pompa roller. I valori della differenza di pressione tra il picco massimo e il picco minimo adiacenti, in condizioni di portata fissata e di regime, hanno superato anche i 70 mmHg. Tale condizione è chiaramente dannosa per la matrice proteica.

6.2.3. Strumentazione: problematiche

Si è provveduto a calibrare e a validare l'attrezzatura prescelta, per poter generare delle curve di lettura dei valori, con delle tecniche molto semplici e economiche secondo le procedure definite successivamente nel paragrafo 6.3.3. “Scelta degli strumenti e metodi di taratura”.

In particolare si sono rilevate le curve di “Portata reale-valore indicato” e di “Portata-diametro del tubo” per la regolazione della manopola della pompa peristaltica per diversi fluidi.

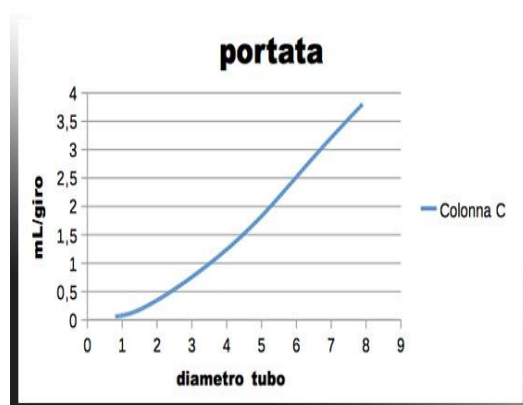


Figura 6.9 : Esempio di taratura della pompa: curva di portata in relazione al diametro dei tubi

Si sono stabilite le curve di “Pressione Rilevata-Pressione Reale” per valori crescenti e decrescenti noti, per poter interpretare correttamente il valore di pressione rilevato dal trasduttore.

Infine, applicando ancora una volta l'equivalenza tra circuiti idraulici ed elettrici, per poter utilizzare come parametro di riferimento per la decellularizzazione la resistenza idraulica opposta dal rene al flusso, si è calcolato il valore della perdita di carico dei componenti del circuito a tra il trasduttore di pressione e il rene: cannula e catetere. Tali valori devono essere sottratti a quello rilevato dal trasduttore, per indicare la pressione di cui risente il rene.

La pressione rilevata, oltre ad essere un indice dell'integrità della vascolatura renale e della matrice extracellulare, è il parametro tramite cui viene retroazionata la pompa; in particolare si regola la portata ai fini di mantenere il valore di pressione in ingresso al

rene entro valori fisiologici per evitare i danni alla matrice e in un secondo momento, nella cellularizzazione, per stimolare correttamente le cellule. L'importanza dei valori di pressione fisiologici è sottolineata anche in letteratura da "Ross et al".

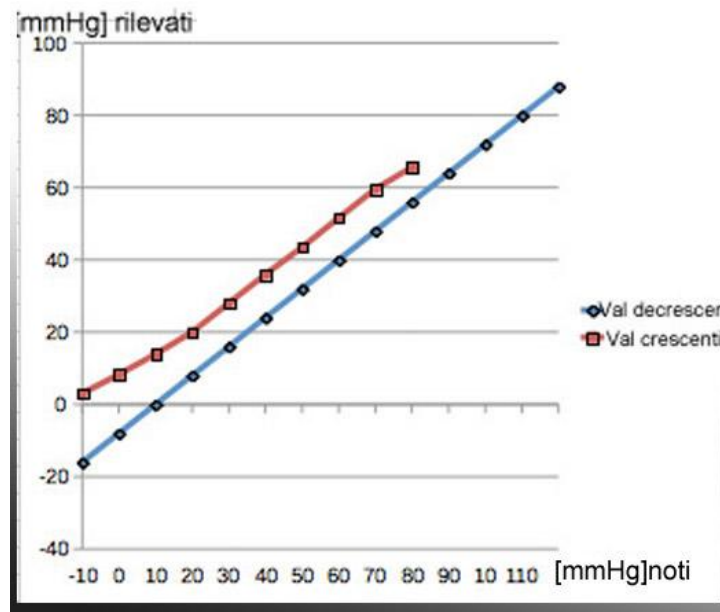


Figura 6.10 : Curve di taratura del trasduttore Pressione rilevata/ Pressione reale. La pressione reale viene controllata applicando una colonna d'acqua ad una quota nota. Si può notare l'isteresi per valori crescenti e decrescenti di pressione data.

Scarsa regolabilità della pompa

Il problema principale legato alla pompa roller adottata è il basso grado di regolazione consentito e il valore minimo di portata molto più alto di quello consono al lavoro di decellularizzazione.

Comportamento pulsatile a alte escursioni

Come già sottolineato nel paragrafo precedente, la pulsatilità data dai due rulli della pompa roller si riflette in un andamento pressorio periodico con delle escursioni molto ampie, rischiose per la conservazione della matrice e dei vasi del rene

Isteresi del trasduttore

Il trasduttore di pressione e il sistema di acquisizione mostrano invece due criticità: per quanto riguarda la rilevazione dei dati, il trasduttore mostra un comportamento diverso per valori di pressione crescenti e decrescenti, condizione che può essere rischiosa nelle fasi transitorie associate negli esperimenti ai cambi di soluzione.

Difficoltà di lettura dei dati e impossibilità di registrazione

Una mancanza del sistema di acquisizione è invece l'impossibilità di tenere memoria dei dati, rendendo da un lato complicata la lettura dei valori istante per istante data la repentinità del loro variare in funzioni delle alte escursioni e dall'altro impedendo di monitorare l'intero esperimento (con protocolli di durate fino a 5 giorni).

6.2.4. Requisiti per un nuovo sistema: linee guida di progetto

Si sono individuati sulla base delle difficoltà di sperimentazione e sulle problematiche evidenziate, i requisiti su cui improntare il progetto del nuovo sistema di perfusione; in particolare si sono voluti modificare la geometria e i materiali di realizzazione della camera. Si è inoltre deciso di sostituire il basamento con una struttura in grado di proteggere e organizzare il piano di lavoro e semplificarne gli spostamenti.

Si è voluto introdurre un componente aggiuntivo da posizionare all'interno della camera, un disco forato atto alla movimentazione del rene, in grado di favorire l'aggancio del catetere al circuito di perfusione all'esterno del bioreattore.

Nel circuito si vogliono introdurre dei componenti quali una compliance e delle vie di accesso per effettuarne lo svuotamento e il riempimento ad ogni cambio di soluzione.

Infine si propongono dei nuovi dispositivi: una pompa peristaltica e un sistema di acquisizione.

I requisiti di progetto per la nuova camera di perfusione sono:

- Sterilizzabilità in autoclave e trasparenza
- Maggiore resistenza delle aree circostanti i fori passanti sollecitate dalle pressioni manuali imposte
- Aumento del diametro della camera per favorire l'alloggiamento e la manipolazione iniziale del rene, dimensione da bilanciare per non eccedere con il volume di “priming” correlato allo spreco di solventi chimici
- Posizionamento del foro in ingresso alla camera al centro del coperchio, caratteristica che favorisce sia la stabilità del sistema, sia risulta più consona per la perfusione del rene (incannulato verticalmente)
- Chiusura del coperchio ad appoggio, (senza avvitarlo per impossibilità di rotazione del rene) dimensionamento del gioco con l'imbocco della camera tale da

assicurare la sterilità

- Posizionamento del foro di uscita dalla camera ad una quota tale da non eccedere nel volume di riempimento (si veda il punto precedente) e tale da assicurare la completa copertura del rene
- Posizionamento di un ulteriore foro diametralmente rispetto a quello di uscita; connessione dello stesso a un tubo esterno alla linea di perfusione, utilizzabile come accesso di sicurezza.
- Presenza di una conicità alla base della camera tale da consentire il posizionamento di un disco forato di supporto per il rene, in grado di allontanarlo dal foro di svuotamento, posizionato al vertice del cono stesso.
- Possibilità di rimozione e inserimento agevole e sicuro del disco di alloggiamento del rene
- Svuotamento e riempimento della camera effettuabili tramite prelievo e iniezione con siringa da 50 cc da un tubo collegato al foro alla base della camera e regolabile all'estremità da un rubinetto a tre vie "Luer-Lock", manipolabile senza dover movimentare il bioreattore
- Struttura di sostegno in grado di alloggiare in modo stabile, sicuro e versatile la camera di perfusione (anche durante le fasi di spostamento), di ordinare il sistema di tubi in linea di perfusione e quelli relativi agli accessi liberi alla camera, semplificando l'operazione di apertura dei rubinetti a tre vie
- Dimensionamento della struttura di sostegno tale da favorirne il lavoro sotto cappa a flusso laminare, la movimentazione (accesso alla cappa stessa senza difficoltà di passaggio attraverso il vetro di protezione) e il posizionamento in incubatore
- Versatilità della struttura di supporto: possibilità di adattarsi alle diverse esigenze

di lavoro e di circuito, introducendo all'occorrenza elementi di blocco e alloggiamento del sistema di perfusione o eliminandoli semplificando le manipolazioni della camera



Figura 6.11 : Prototipo di camera di perfusione; immagine tridimensionale ottenuta con il software Autocad Mechanical

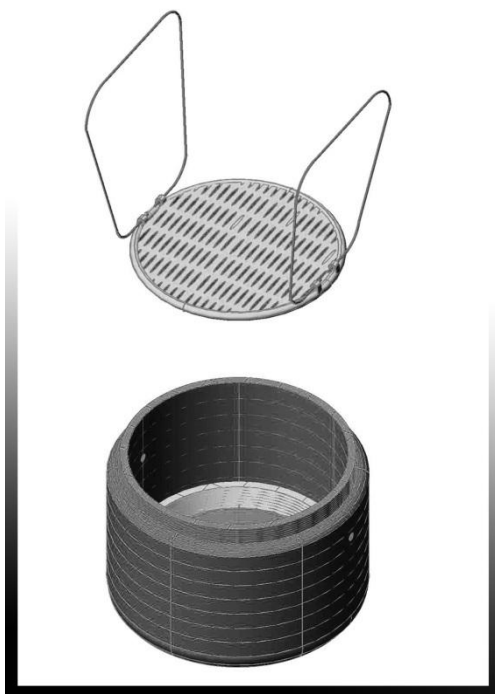


Figura 6.12 : Prototipo di camera di perfusione; la presenza di un gradino interno per l'appoggio del dischetto metallico di supporto al rene favoriscono lo svuotamento della camera per aspirazione

I requisiti di progetto per il nuovo circuito di perfusione sono:

- Redistribuzione dei pesi: foro nel coperchio per incannulare verticalmente il catetere suturato al rene; a causa dell'eccessiva lunghezza della cannula si propone l'utilizzo di un ago a punta mozza per non forare il catetere
- Connessione dell'ago inserito nel coperchio della camera con il circuito tramite giunto biconico; aggiunta di un tratto di tubo (misurabile anche in funzione dell'iniezione cellulare), per allontanare il giunto a tre vie dalla camera di perfusione
- Aggiunta di un rubinetto a tre vie con un'uscita libera per l'interazione con il circuito: svuotamento e riempimento manuale dello stesso nei cambi delle soluzioni
- Aumento della “compliance” del circuito, ottenibile tramite sostituzione di tubi con esistenti con altri a “compliance” maggiore oppure con inserimento in linea di una camera d'aria
- Inserimento di un elemento debollatore

I requisiti per la scelta di nuova strumentazione sono:

- Reperibilità e costi sostenibili
- Pompa peristaltica idonea all'uso con flussi molto bassi e regolabile nelle variazioni di portata nell'ordine del decimo di ml/min
- Sistema di acquisizione in grado di registrare anche per tempi prolungati il segnale di interesse e consentirne un'elaborazione
- Sistema di acquisizione multicanale, nell'ottica di aumentare il numero dei sensori in funzione dell'evoluzione della sperimentazione (ad es. un ossimetro a monte del rene)
- oppure di allestire dei circuiti paralleli per la perfusione contemporanea di più reni.
- Trasduttore di pressione affidabile, idoneo al “range” di pressioni di interesse: [-10mmHg, 200 mmHg], con minime non linearità e isteresi

6.3. Realizzazione e ottimizzazione del sistema

6.3.1. Camera di perfusione: realizzazione

Camera

- La scelta del materiale di produzione è ricaduta sul vetro, materiale ceramico covalente di derivazione dal silicio, molto fragile e rigido, che però mostra delle proprietà di resistenza all'acqua, all'umidità, alle alte temperature, offre inerzia chimica e termica eccellenti, duttilità, malleabilità e semplicità di lavorazione che lo rendono adatto allo scopo.



Figura 6.13 : Modello virtuale della camera di perfusione . Si notano i beccucci laterali e quello inferiore atti alla giunzione dei tubi

- Per poter far fronte al problema delle crepe circostanti i fori passanti mostrato dal precedente modello di camera di perfusione, si è inizialmente pensato di eliminare le lavorazioni meccaniche a freddo (potenziali cause di stress residui) realizzando i fori passanti con i consueti processi lavorativi del vetro; in un secondo tempo si è previsto invece di eliminare l'inserimento di giunti bicono per la connessione di tubi, realizzando in fase di foggatura, dei “beccucci” cilindrici cavi su cui fissare direttamente i tubi.

- Si è scelto di realizzare 3 punti di giunzione di tubi realizzati con la tecnica dei “beccucci” a cilindro cavo prominenti 20 mm rispetto al corpo della camera, due posizionati diametralmente lungo un diametro e uno al vertice della base a forma conica.
- Il punto di accesso per l'incannulamento del rene è stato realizzato al centro del coperchio, dimensionato in modo da fissare al suo interno degli aghi grigi (G27), accuratamente privati della punta a “becco di flauto” per limitare i rischi di danni al catetere.



Figura 6.14 : Ago grigio G27 a punta piatta utilizzato per incannulare il catetere verticalmente

- Si è aumentato il volume della camera, allargandone la sezione di imbocco per semplicità di manipolazione. Il volume di riempimento è stato portato a 350 mL, valore tale da consentire un funzionamento del circuito di quasi 12 ore senza ricircolo (limitando la possibilità di reimmissione dei detriti nel rene).
- Il bordo della camera è stato reso più spesso come lavorazione successiva per ottenere la chiusura sterile con l'appoggio del coperchio.

- E' stato realizzato un dispositivo a doppio disco metallico in acciaio inox AISI 316L, all'interno di cui è stata fissata una maglia metallica a grana di 200 μm come supporto di movimentazione del rene.

La movimentazione è favorita dalle rientranze simmetriche realizzate per poter essere afferrate con delle pinze chirurgiche.

Il disco metallico si adagia all'interno della camera alla base del fondo conico, evitando di aumentare inutilmente il volume di riempimento della camera.

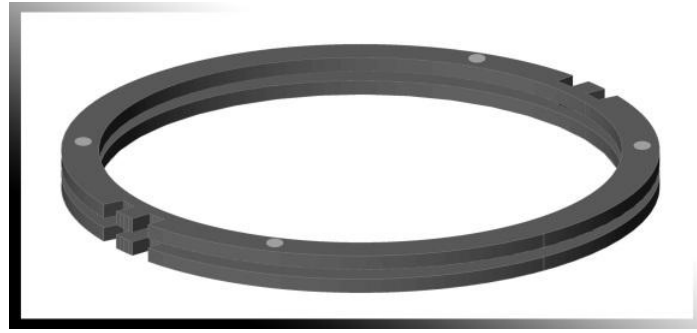


Figura 6.15 : Doppio disco metallico. Al suo interno viene fissata una maglia metallica a grana fine tramite delle viti

La realizzazione del modello in vetro, camera di perfusione e coperchio, è stata affidata all'azienda “*DISA Raffaele e F.lli s.a.s.*”

La realizzazione del disco metallico è stata affidata all'azienda “*Tec.Meca*”

6.3.2. Circuito di perfusione: realizzazione

- A valle del tubo di uscita dalla pompa, si è scelto di inserire una “compliance”. Dopo aver scartato l'opportunità di realizzare un dispositivo sterilizzabile, si è preferito l'utilizzo di deflussori monouso (del tipo ospedaliero), in grado di attenuare le escursioni di pressione date dalla pompa peristaltica (attraverso la comprimibilità dello strato d'aria al loro interno)

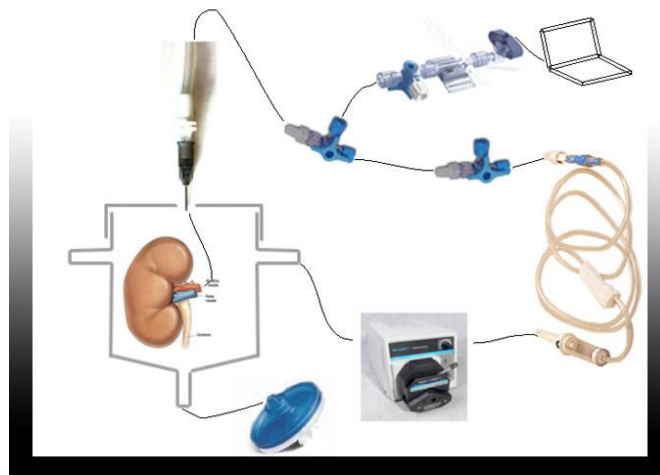


Figura 6.16 : Schema semplificato dei componenti del sistema di perfusione realizzato

- L'introduzione di una camera d'aria ha permesso di risolvere, seppur parzialmente il problema delle bolle, estremamente nocive per l'integrità del rene.
- Lo svuotamento del circuito e del deflussore è permesso da un rubinetto a tre vie posizionato immediatamente a valle di questo. Il tappo di regolazione della pressione del deflussore favorisce le operazioni di svuotamento e riempimento del circuito, portando all'equilibrio pressorio il sistema.
- E' stato realizzata una struttura di supporto per la camera di perfusione: un basamento in Polimetilmetacrilato, materiale trasparente, leggero, economico e facilmente lavorabile.

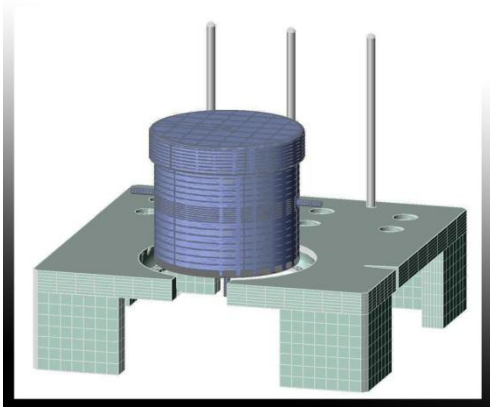


Figura 6.17 : Camera di perfusione e sistema di supporto , si nota la fessura adibita all'appoggio della camera rivestita con guarnizione siliconica

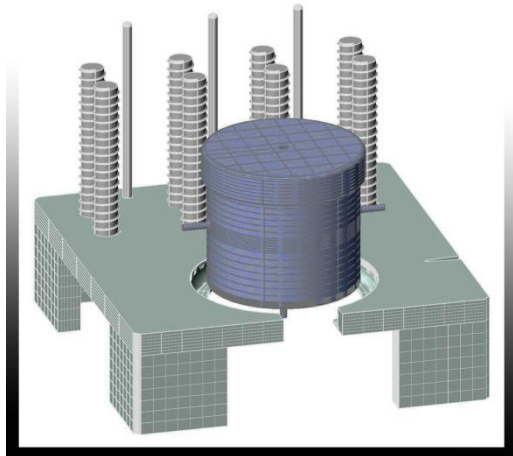


Figura 6.18 : Camera di perfusione e sistema di supporto; il sistema di barre filettate e perni removibili per avvitemento facilita la versatilità e la semplicità di lavoro

- Al centro è stata predisposta una fessura dimensionata per alloggiare agevolmente la base conica della camera (parte anteriore aperta). La guida circolare di appoggio è coperta da una guarnizione in silicone in grado di stabilizzare la camera in vetro.
- E' stata predisposta una fessura di aggancio per il rubinetto a tre vie di chiusura del foro di svuotamento/riempimento della camera, per facilitarne le operazioni a mezzo di una siringa da 50 cc.
- Posteriormente all'area di alloggiamento della camera sono predisposte delle scanalature filettate per l'avvitamento all'occorrenza di barre metalliche di due misure diverse.
Le barre metalliche removibili permettono, se posizionate, di ordinare arrotolando agevolmente attorno ad esse un sistema di tubi fino alla lunghezza di 2 m (senza sovrapposizione).
- Tramite l'utilizzo di mollette, si possono fissare le estremità di tutti i componenti del circuito di perfusione, semplificando le operazioni di aspirazione nei diversi ingressi del circuito.

- E' possibile fissare verticalmente il deflussore evitando rischi di immissione d'aria nel circuito.

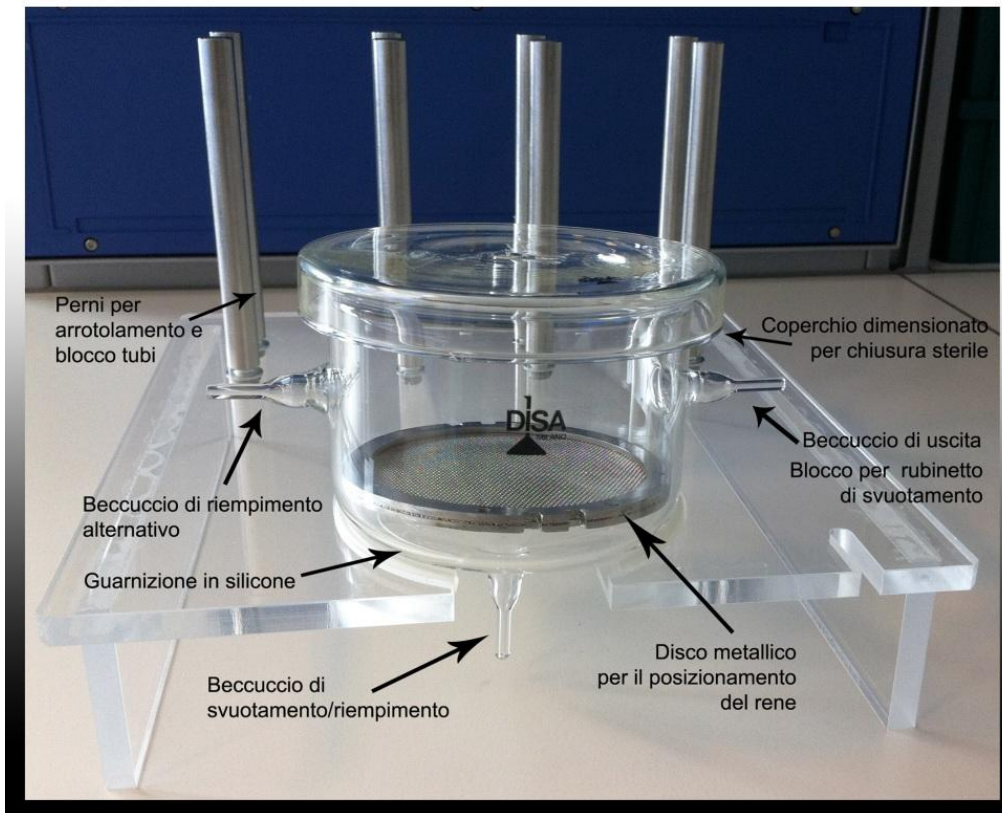


Figura 6.19 : Realizzazione dei dispositivi progettati; camera in vetro per la perfusione, dischetto metallico di supporto e struttura di sostegno in PMMA. I perni metallici sono avvitati nelle scanalature presenti sulla base polimerica.

La realizzazione della struttura in Polimetilmetacrilato e dei perni metallici è stata affidata all'azienda "Tec.Meca"

6.3.3. Scelta degli strumenti e metodi di calibrazione

La scelta della pompa è ricaduta sul modello di pompa peristaltica digitale “Masterflex” con testina L/S Easy Load” a 4 rulli, grazie ai quali l'escursione di pressione è meno ampia.

Per il funzionamento di tale pompa si è reso necessario introdurre al ramo d'uscita dalla camera un tubo L/S 13 Masterflex.



Figura 6.20 : “BLPR2 Blood Pressure Transducer” della WPI



Figura 6.21 :Pompa peristaltica digitale “Masterflex”

Tra i sistemi di acquisizione si è scelto di utilizzare il “BIOPAC Data Acquisition System” a 16 canali, interfacciabile con il software MP100 della stessa casa produttrice.

Il trasduttore di pressione acquistato invece è un modello utilizzabile anche per il monitoraggio continuo della pressione arteriosa in vivo, il “BLPR2 Blood Pressure Transducer” della WPI ; esso opera a pressioni comprese tra -50mmHg e 300mmHg e

mostra non-linearità e isteresi nel range di pressioni di interesse inferiori a 1 mmHg. Sono stati stabiliti dei metodi di calibrazione semplici e efficaci per poter verificare l'esattezza dei parametri imposti e rilevati nelle sperimentazioni

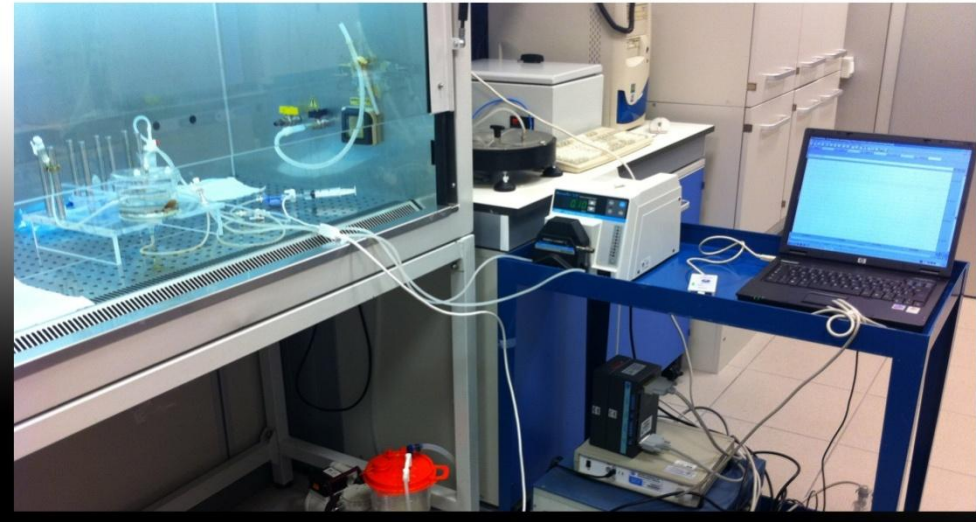


Figura 6.22 : Sistema di perfusione completo. Il supporto in PMMA, la camera e il circuito di tubi sono dimensionati per un lavoro agevole sotto cappa a flusso laminare nel rispetto della “GLP”

Calibrazione della pompa

Determinazione della curva portata effettiva-portata impostata

- Viene alloggiato nella testina peristaltica il tubo (uguale a quello utilizzato nel circuito di interesse)
- Viene disposta l'estremità “pescante” del tubo all'interno di un contenitore in cui si è inserito il fluido di interesse
- Viene effettuato il riempimento del tubo in uso in tutta la sua lunghezza (Nel caso della Pompa Peristaltica “Masterflex” ciò può essere rapidamente svolto con il pulsante “Prime”)
- Viene posta l'estremità libera del tubo in un cilindro graduato da laboratorio (di dimensioni adeguate da rilevare con precisione i volumi di interesse in riferimento alle portate valutate)
- Viene stabilito il tempo di misura (generalmente 1 minuto)
- Viene impostato il valore digitale di portata
- Viene attivato il flusso a cronometro puntato
- Dopo il tempo stabilito si rileva il volume di liquido pompato nel cilindro.
- Per portate eccessivamente basse rispetto ai contenitori graduati è possibile valutare il volume raccolto in un tempo maggiore
- L'operazione viene ripetuta per valori crescenti e decrescenti di portata impostati
- Viene verificata la linearità del sistema e viene tracciata la curva di calibrazione
- L'operazione viene ripetuta per i fluidi di interesse

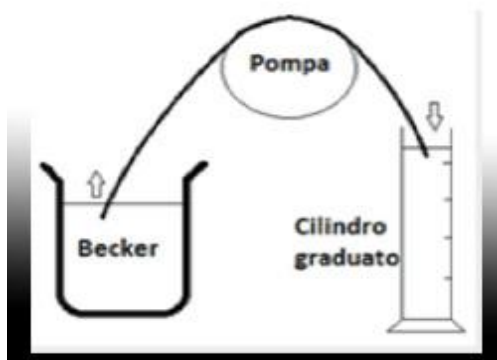


Figura 6.23: Schema semplificato del metodo di calibrazione della pompa

Calibrazione del trasduttore di pressione

Determinazione della curva pressione effettiva-pressione rilevata

- Viene utilizzato un tubo di lunghezza all'incirca di 130 cm
- Viene collegato il trasduttore di pressione ad una estremità del tubo
- Attraverso il rubinetto a tre vie del trasduttore, con una siringa da 20 mL viene riempito di acqua il tubo fino all'estremità opposta
- Viene fissata la quota del trasduttore zero relativo
- Partendo dal livello del trasduttore si misurano diverse quote relative (in cm) e se ne rilevano le corrispondenti pressioni

(E' rilevante solo la quota a cui è portata il livello dell'acqua rispetto all'estremo a cui è connesso il trasduttore, indipendentemente dal resto del tubo, tale differenza di quota fornisce il termine piezometrico della legge di Bernoulli)

- La differenza di quota tra il trasduttore e la colonna d'acqua determina il termine pressorio corrisponde alla pressione effettiva imposta al trasduttore (facilmente convertibile da cmH₂O a mmHg)
- Si effettuano le misurazioni per valori crescenti e decrescenti di quota, rilevando la pressione segnalata ad ogni pressione imposta
- Viene tracciata la curva di Pressione rilevata-Pressione effettiva
- Si verifica la stabilità nel tempo della pressione rilevata ad ogni valore di pressione imposta

Determinazione delle perdite di carico del circuito precedente il rene

- Viene allestito un circuito con i componenti del circuito di interesse compresi tra il trasduttore di pressione e il rene (tubo, giunto bicono, ago grigio, catetere)
- Viene connesso il trasduttore di pressione tramite un rubinetto a tre vie "Luer-Lock"
- Il tubo precedente il rubinetto a tre vie viene inserito nella testina peristaltica
- L'estremità libera del tubo viene disposta in un contenitore riempito del fluido di interesse

- Viene impostata la portata di lavoro della pompa
- Viene attivata la pompa
- Viene rilevato il valore di pressione
- Si ripete l'operazione per diversi valori di portata
- Si ripete l'operazione per i fluidi di interesse
- I valori delle perdite di carico rilevati devono essere sottratti al valore di pressione rilevato a circuito attivo con il rene

7. ESPERIMENTI DI DECELLULARIZZAZIONE-RICELLULARIZZAZIONE

Si vuole in questo capitolo descrivere il metodo seguito nello svolgimento del lavoro sperimentale, la scelta dei diversi protocolli utilizzati e le metodiche sviluppate con cui si è scelto di operare nelle diverse fasi. I protocolli sono stati stilati in modo progressivo, partendo cioè dai limiti riscontrati in quelli precedenti. Allo stesso modo le metodiche sono il frutto di un continuo lavoro di aggiornamento, costruito sui risultati conseguiti volta per volta e soprattutto sulle criticità incontrate, coerentemente con i regolamenti previsti dall'istituto e con le regole della “GoodLaboratoryPractice”, nell'ottica di applicazioni in sterilità.

Proprio le esigenze di sterilità hanno imposto da un lato dei vincoli temporali (tempistiche necessarie per la sterilizzazione dei dispositivi), dall'altro l'adattamento a norme comportamentali in spazi riservati e con l'utilizzo di idonee attrezzature, prima tra tutte la cappa a flusso laminare.

La preparazione di molte soluzioni previste dai protocolli ha invece richiesto l'uso di cappe chimiche e dispositivi di protezione individuali.

E' necessario precisare inoltre che molte scelte operative soprattutto per quanto riguarda l'organizzazione cronologica degli esperimenti, sono state dettate anche dalle necessità dei diversi laboratori collaboranti alla ricerca, in particolare per la disponibilità delle cellule embrionali staminali murine, utilizzate per la ricellularizzazione.

Un altro fattore di difficoltà operativa, che ha reso particolarmente complesse le scelte di strutturazione consequenziale degli esperimenti è la variabilità biologica, che ha incrementato notevolmente il rischio di fraintendimenti su un'indagine già molto ricca di parametri variabili.

Per semplicità espositiva si è voluto raggruppare gli esperimenti svolti in funzione dei protocolli utilizzati, per la decellularizzazione e successivamente per la ricellularizzazione, seppure all'interno di ogni gruppo vi siano delle variabili di sperimentazione.

7.1. Sviluppo dei protocolli sperimentali

Si vogliono descrivere i protocolli sperimentali adottati. Per quelli riguardanti la decellularizzazione, un ruolo importantissimo è stato rivestito dalla ricerca bibliografica. In particolare per il caso del protocollo “D1” primo protocollo adottato, ci si è basati su informazioni seppur parziali fornite dall'articolo scientifico “Embryonic Stem Cells Proliferate and Differentiate when Seeded into Kidney Scaffolds”, di Ross et al. [25].

Nella redazione di quelli successivi invece, si è lavorato in base a delle ipotesi supportate da dati scientifici.

Per la ricellularizzazione invece si sono valutati due protocolli differenti solo per metodica di iniezione cellulare e fattore di diluizione delle cellule stesse. Le variabili che hanno complicato la valutazione di queste diverse procedure sono state le tempistiche di incubazione statica e le portate successivamente applicate.

7.1.1. Decellularizzazione

- “Protocollo D1”

Protocollo aggressivo sia per la molteplicità di agenti decellularizzanti previsti, sia per le loro concentrazioni. La durata di 5 giorni lo rende efficace ma altrettanto impegnativo e esposto al rischio di inconvenienti quali l'allentamento del filo di sutura per l'incannulamento del rene.

Giorno 1:

Tryton X-100 3%, durata 24 ore

Giorno 2:

CaCl₂ + MgSO₄, durata 3 ore

NaCl 1M, durata 3 ore

PBS 1X, durata “over night”

Giorno 3:

DNAsi 0,0025% in NaCl 100mM, CH₃COONa 50 mM e MgCl₂ 10mM, durata 2 ore

H₂O deionizzata, durata 2 ore
(da effettuarsi in circuito aperto)

Tryton X-100 3%, durata 24 ore

Giorno 4:

SDS 4%, durata “over night”

Giorno 5:

H₂O deionizzata, durata 2 ore
(da effettuarsi in circuito aperto)

Per la preparazioni delle soluzioni si veda l'APPENDICE I

- “Protocollo D2”

Protocollo moderatamente aggressivo; la sua rapidità di svolgimento permette di aumentare la frequenza di sperimentazione, ottenendo dei risultati più statisticamente più significativi.

Giorno 1:

SDS 1%, durata 17 ore

(la soluzione deve essere sostituita, se possibile, dopo le prime ore)

Giorno 2:

H2O deionizzata, durata 2 ore

(da effettuarsi in circuito aperto)

Per la preparazioni delle soluzioni si veda l'APPENDICE1

- “Protocollo D3”

Protocollo molto efficace nella rimozione di residui nucleari; l'uso della DNAsi, seppur in concentrazioni molto basse è rischioso per l'integrità della matrice extracellulare.

Giorno 1

SDS 1%, durata 17 ore

(la soluzione deve essere sostituita, se possibile, dopo le prime ore)

Giorno 2:

H₂O deionizzata, durata 2 ore
(da effettuarsi in circuito aperto)

DNAsi 0,0025% in NaCl 100mM, CH₃COONa 50 mM e MgCl₂ 10mM, durata
2 ore
(tampone da portare a pH 5)

H₂O deionizzata, durata 2 ore
(da effettuarsi in circuito aperto)

Per la preparazioni delle soluzioni si veda l'APPENDICE1

- “Protocollo D4”

Protocollo molto efficace nella rimozione di residui nucleari; l'uso della DNAsi, seppur in concentrazioni molto basse è rischioso per l'integrità della matrice extra cellulare. La sua introduzione è stata voluta per valutare l'effetto del tampone basico sulla matrice extracellulare

Giorno 1

SDS 1%, durata 17 ore

(la soluzione deve essere sostituita, se possibile, dopo le prime ore)

Giorno 2:

H₂O deionizzata, durata 2 ore

(da effettuarsi in circuito aperto)

DNAsi 0,0025% in Tris Hcl 10 mM, MgCl₂, 2,5 mM, CaCl₂ 0,5 mM, durata 2 ore

(tampone da portare a pH 7.6)

H₂O deionizzata, durata 2 ore

(da effettuarsi in circuito aperto)

Per la preparazioni delle soluzioni si veda l'APPENDICE1

7.1.2. Ricellularizzazione

La fase di ricellularizzazione deve necessariamente seguire quella di decellularizzazione, effettuata tramite l'uso di uno dei 4 protocolli precedenti, situazione condizionante la validità del protocollo.

La fase di decellularizzazione, nell'ottica di anticipare quella di ricellularizzazione, deve necessariamente terminare con un ciclo di lavaggio in circuito aperto con acqua sterile deionizzata.

- “Protocollo R1”

Protocollo legato alla manualità dell'operatore, caratteristica che riduce la ripetibilità degli esperimenti.

Infusione tramite circuito di perfusione di:

PBS 1X + PenStrep 1%, durata 4 ore

Medium, 10-15 minuti

Marcatura delle cellule con PKH26, durata 10 minuti

Infusione manuale di:

8 milioni di cellule staminali embrionali murine diluite in 1 mL di medium, durata 6 minuti

(L'infusione viene effettuata a mezzo di una siringa da 1mL immessa direttamente nell'ago di incannulamento del rene)

Per la marcatura delle cellule con PKH26si veda l'APPENDICE1

- “Protocollo R2”

Protocollo facilmente standardizzabile e ripetibile

Infusione tramite circuito di perfusione di:

PBS 1X + PenStrep 1%, durata 4 ore

Medium, 10-15 minuti

Marcatura delle cellule con PKH26, durata 10 minuti

Infusione tramite circuito di perfusione di:

8 milioni di cellule staminali embrionali murine diluite in 1,8 mL di medium, durata 3,5 minuti

L'infusione avviene isolando il rene, disgiungendo il “luer” biconodale all'ago grigio G27.

Viene iniettata la sospensione di cellule attraverso il rubinetto a tre vie posizionato a valle della “compliance” in direzione anterograda.

Si ricongiunge successivamente il giunto bicono all'ago e si attiva il flusso della pompa a 0,5 mL/min per 10 minuti

7.2. Sviluppo delle procedure sperimentali

Si vuole procedere a questo punto descrivendo le metodiche utilizzate nella sperimentazione.

Vengono riportate esclusivamente quelle ottimizzate ottenute come rielaborazione di quelle precedenti nel corso dell'attività sperimentale.

7.2.1. Preparazione del circuito

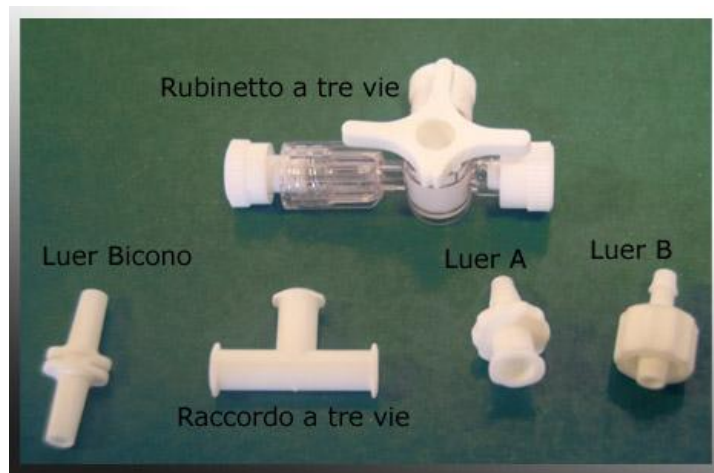


Figura 7.1 : Raccordi utilizzati nel montaggio del circuito di perfusione

- Vengono introdotti tutti i componenti del sistema di perfusione precedentemente sterilizzati e rivestiti dagli involucri di protezione, in zona sterile atta alle colture cellulari
- Vengono trasportati i componenti del circuito di perfusione e del bioreattore sotto la cappa a flusso laminare precedentemente attivata
- Viene posizionato sul piano il supporto in polimetilmetacrilato, disinfettandolo con etanolo all'ingresso della cappa

(Operazioni compiute da due operatori)

- L'operatore 1 indossa sopra i guanti di protezione, quelli sterili, essendo da quel momento l'unico autorizzato ad entrare in contatto con gli oggetti sterili)

- L'operatore 2, facendo attenzione a entrare in contatto solo con gli involucri degli oggetti sterili e rispettando le norme del lavoro in sterilità, supporta nel montaggio del circuito l'operatore 1
- Viene sollevata la camera di perfusione (privata dell'involucro protettivo)
- Viene connesso il tubo da 20 cm al beccuccio inferiore della camera, all'altra estremità di questo si collega un "luer di tipo A"
- Al "luer di tipo A" si fissa un rubinetto a tre vie chiuso
- Si alloggia la camera sulla guarnizione siliconica del supporto in Polimetilmetacrilato
- Si fissa il rubinetto nell'apposita fessura
- Viene connesso il secondo tubo da 20 cm al beccuccio laterale aggiuntivo della camera, all'altra estremità di questo si collega un "luer di tipo A"
- Al "luer di tipo A" si fissa un rubinetto a tre vie chiuso
- Viene fissato il rubinetto al perno metallico adiacente del supporto tramite una molletta
- Viene posizionato il coperchio della camera in vetro
- Si inserisce L'ago grigio G27 all'interno del foro centrale nel coperchio in vetro
- Viene connesso il tubo "Materflex" al beccuccio laterale di uscita dalla camera (prestando attenzione a sostenere anche l'altra estremità dello stesso)
- Viene connessa l'estremità libera alla cannula del deflussore
- Viene fissato il deflussore al perno metallico adiacente e viene arrotolato morbidamente il tubo d'uscita da questo ai perni metallici centrali del supporto
- Viene connesso un rubinetto a tre vie all'estremità del tubo monouso del deflussore
- Viene connesso tramite "Luer di tipo A" al rubinetto a tre vie un tubo da 10 cm
- Viene connesso tramite "Luer di tipo A" un rubinetto a tre vie al tubo
- Ad una uscita del rubinetto a tre vie si connette tramite "Luer di tipo A" un tubo da 25 cm
- All'estremità del tubo da 25 cm si connette un "Luerbicono"
- Viene congiunto il "Luerbicono" all'ago grigio fissato nel coperchio in vetro
- Viene collegato un tubo da 25 cm al trasduttore di pressione tramite "Luer di tipo A"
- Viene riempito il tubo, evitando la formazione di bolle al suo interno, tramite rubinetto a valvola presente sul trasduttore di pressione
- Viene chiuso il rubinetto adiacente all'ago grigio G27 nella direzione dell'uscita libera
- Viene fissato il tubo di connessione al trasduttore di pressione all'uscita libera e bloccata del rubinetto a tre vie tramite "Luer di tipo B"

Utilizzare camice, guanti e calzari come da disposizioni

7.2.2. Prelievo del rene

- Si effettua l'incisione lungo la linea mediana e dei laterali
- Si chiude l'aorta al di sopra della biforcazione delle renali
- Si inserisce un filo sterile nel tratto di aorta al di sotto della biforcazione renale di sinistra
- Si bloccano tutti i vasi verso le viscere facendo un nodo che includa anche la vena cava
- Si incannula l'arteria renale sx con un catetere PE50
- Si fissa il catetere con il filo sterile precedentemente inserito
- Si taglia la vena in uscita dal rene sx all'altezza della ricongiunzione delle vene renali
- Si perfonde PBS 1X per lavare i vasi

Utilizzare camice, guanti, mascherina, cuffia e calzari monouso

7.2.3. Alloggiamento

- Si trasporta il rene immerso in PBS e incannulato, all'interno di un beker sterile (Operazioni compiute da due operatori)
- L'operatore 1 indossa i guanti sterili sopra quelli di protezione
- Aiutato dall'operatore 2 estrae il rene dal beker tramite l'uso di pinze sterili e lo posiziona al centro di una piastra Petri precedentemente aperta e su cui si è disposto il dischetto di supporto
- L'operatore 1 solleva il coperchio in vetro e fissa l'estremità del catetere PE50 alla punta dell'ago grigio
- L'operatore 1 solleva con delle pinze il disco di supporto e lo alloggia nella camera di perfusione
- L'operatore 2 posiziona il coperchio una volta estratte le pinze dall'operatore 1

Utilizzare camice, guanti e calzari come da disposizioni

7.2.4. Decellularizzazione

Lavaggi in circuito chiuso

- Si effettua il riempimento della camera di perfusione iniettando con una siringa da 50 mL la soluzione prevista attraverso il rubinetto a tre vie nella fessura laterale del supporto, connesso al beccuccio inferiore della camera
- Si porta il liquido ad un livello tale da coprire l'imbocco dei beccucci laterali.
- Si effettua il riempimento manuale del circuito attraverso il rubinetto a tre vie a valle del deflussore, facendo attenzione al riempimento del deflussore stesso
- Disgiungendo il Luerbicono dall'ago e collegandolo all'uscita libera del rubinetto a tre vie laterale,
si procede attivando la pompa a flussi alti per ottenere il riempimento omogeneo di tutto il circuito
- Si procede nell'operazione finchè non saranno completamente eliminate le bolle presenti nel circuito a valle del deflussore
- Si programma la pompa per una portata di 0,5 mL/ min e la si attiva
- Si disgiunge il Luerbicono dal rubinetto a tre vie e lo si porta in prossimità dell'ago
- Facendo sgocciolare la soluzione dal Luerbicono all'interno dell'ago grigio si evita la formazione di bolle d'aria
- Si ricollega il Luerbicono all'ago
- Si apre l'uscita del rubinetto a tre vie connessa al trasduttore di pressione e se ne rileva il segnale
- Si attende la fine del tempo di transitorio per la stabilizzazione del segnale di pressione

Utilizzare camice, guanti e calzari come da disposizioni

Lavaggi in circuito aperto

- Si effettua il riempimento parziale della camera iniettando con una siringa da 50 mL la soluzione prevista attraverso il rubinetto a tre vie nella fessura laterale del supporto, connesso al beccuccio inferiore della camera
 - Si porta il liquido ad un livello tale da coprire il rene
 - Si effettua il riempimento manuale del circuito attraverso il rubinetto a tre vie a valle del deflussore, facendo attenzione al riempimento del deflussore stesso
 - Si disgiunge il tubo "Masterflex" dal beccuccio di uscita della camera in vetro
 - Si fissa il tubo "Masterflex" sull'estremità sottile di una pipetta monouso (taglia 2), precedentemente privata del cotone di occlusione
- Si introduce l'estremità libera della pipetta in una bottiglia di acqua sterile o in un contenitore sterile previo riempimento della soluzione di interesse
- Disgiungendo il Luerbicono dall'ago e collegandolo all'uscita libera del rubinetto a tre vie laterale,
- si procede attivando la pompa a flussi alti per ottenere il riempimento omogeneo di tutto il circuito
- Si procede nell'operazione finché non saranno completamente eliminate le bolle presenti nel circuito a valle del deflussore
 - Si programma la pompa per una portata di 0,5 mL/ min e la si attiva
 - Si disgiunge il Luerbicono dal rubinetto a tre vie e lo si porta in prossimità dell'ago
 - Facendo sgocciolare la soluzione dal Luerbicono all'interno dell'ago grigio si evita la formazione di bolle d'aria
 - Si ricollega il Luerbicono all'ago
 - Si posiziona un becker sterile in prossimità del beccuccio di uscita della camera in vetro lasciato aperto e se ne permette lo sgocciolamento
 - Si apre l'uscita del rubinetto a tre vie connessa al trasduttore di pressione e se ne rileva il segnale
 - Si attende la fine del tempo di transitorio per la stabilizzazione del segnale di pressione

Utilizzare camice, guanti e calzari come da disposizioni

Iniezione di colorante

- Si disattiva la pompa
- Si disgiunge il Luerbicono dall'ago grigio e se ne permette lo sgocciolamento in un contenitore
- Si chiude il rubinetto a tre vie nella direzione del trasduttore di pressione
- Si apre il rubinetto adiacente al deflussore nella direzione dell'uscita libera, avendo cura di mantenere la sterilità del tappo
- Si immette il colorante precedentemente preparato in una siringa da 5 mL nella quantità di 1,8 mL
- Si posiziona la siringa nell'apertura nel rubinetto a tre vie
- Si chiude il rubinetto nella direzione del deflussore
- Si immette il colorante fino allo sgocciolamento dall'estremità del Luerbicono, mantenuto ad un'altezza pari o superiore a quella dell'ago
- Si chiude il rubinetto a tre vie nella direzione della siringa e la si estrae, riposizionando il tappo di sicurezza
- Si attiva la pompa alla portata di 0,5 mL/min
- Si attende lo sgocciolamento del colorante dal Luerbicono all'interno dell'imbocco dell'ago e lo si ricongiunge
- Si monitorizza l'ingresso del colorante nel catetere PE50 fino al raggiungimento del rene
- Si osserva la diffusione del colorante all'interno del rene decelularizzato, osservandone il riempimento dei vasi, l'omogeneità e l'assenza di perdite

Utilizzare camice, guanti e calzari come da disposizioni

7.2.5. Ricellularizzazione

Iniezione delle cellule

(Si procede a seconda del protocollo scelto)

Nel caso di “Protocollo R2” si procede secondo le seguenti istruzioni:

- Si disattiva la pompa
- Si disgiunge il Luer bicono dall'ago grigio e se ne permette lo sgocciolamento in un contenitore
- Si chiude il rubinetto a tre vie nella direzione del trasduttore di pressione
- Si apre il rubinetto adiacente al deflussore nella direzione dell'uscita libera, avendo cura di mantenere la sterilità del tappo
- Si immette la sospensione precedentemente preparata in una siringa da 5 mL nella quantità di 1,8 mL
- Si posiziona la siringa nell'apertura del rubinetto a tre vie
- Si chiude il rubinetto nella direzione del deflussore
- Si immette la sospensione fino allo sgocciolamento dal all'estremità del Luer bicono, mantenuto ad un'altezza pari o superiore a quella dell'ago
- Si chiude il rubinetto a tre vie nella direzione della siringa e la si estrae, riposizionando il tappo di sicurezza
- Si attiva la pompa alla portata di 0,5 mL/min
- Si attende lo sgocciolamento della sospensione dal Luer bicono all'interno dell'imbocco dell'ago e lo si ricongiunge
- Si prosegue nella perfusione per 3,5 minuti

Utilizzare camice, guanti e calzari come da disposizioni

Trasporto in incubatore

- Si estrae il tubo “Masterflex” dalla testina della pompa ruotando la leva di blocco
- Si ordina lo stesso arrotolandolo intorno ai perni metallici prossimi al deflussore
- Si disgiunge il tubo di connessione al trasduttore di pressione, chiudendo l'uscita del rubinetto a tre vie con l'apposito tappo o in caso di flusso in incubazione, fissando all'estremità del tubo un rubinetto a tre vie sostitutivo o un filtro monouso
- Assicurandosi di avere chiuso tutte le aperture con l'esterno previste dal circuito, lo si estrae dalla cappa a flusso laminare tenendo saldamente la base del supporto in PMMA
- Si alloggia il supporto di PMMA all'interno dell'incubatore, avendo cura, se prevista perfusione successiva, di far fuoriuscire il tubo “Masterflex” attraverso l'apposito foro laterale dell'incubatore
- Si lascia il bioreattore in condizioni controllate di umidità, temperatura e composizione atmosferica per il tempo previsto

Utilizzare camice, guanti e calzari come da disposizioni

Perfusione in incubatore

- Si inserisce il tubo “Masterflex” all'interno della testina peristaltica della pompa
- Si estrae dall'apposito foro laterale all'incubatore il tubo di connessione al trasduttore di pressione.
- Avendo cura di far fuoriuscire le eventuali bolle d'aria lo si riconnette al trasduttore di pressione
- Si apre il rubinetto a tre vie nella direzione del trasduttore di pressione
- Mantenendo il bioreattore in incubazione si attiva il flusso della pompa a 0,5 mL/min, per la tempistica prevista

Utilizzare camice, guanti e calzari come da disposizioni

7.2.6. Analisi biologiche

Sezionamento

- Si trasferisce il rene sollevando il coperchio del bioreattore all'interno di una piastra di Petri; l'operazione può essere eseguita con la movimentazione del dischetto di sostegno oppure direttamente tramite il catetere (se ben fisso)
- Si scannula il catetere PE50 dall'ago
- Con l'uso di lame monouso si incide il rene in due punti, ottenendo tre regioni
- Cercando di disporre in modo ben riconoscibile le regioni ottenute, si effettuano tre ulteriori tagli, dividendo in due parti ognuna delle tre regioni, per effettuare due colorazioni diverse di ogni area: lobo superiore, lobo inferiore e mediana

Utilizzare camice, guanti e calzari come da disposizioni

Inclusioni e tagli

Si riportano le metodiche previste per le inclusioni in PARAFFINA e in OCT e per i rispettivi tagli al microtomo e al criostato

Inclusioni in paraffina

- Sotto cappa chimica si immergono tre sezioni del rene provenienti da tre zone diverse in contenitori anticipatamente riempiti di “soluzione di Doubosque”
- I contenitori ben sigillati vengono posti a 4°C “overnight”
- Sotto cappa chimica si preleva dai contenitori la “soluzione di Doubosque” a mezzo di pastette e si introduce etanolo al 70% (una prima immissione di risciacquo viene introdotta e espulsa); si lascia agire per un'ora a temperatura ambiente
- Si sostituisce l'etanolo con il toluene e si lascia agire per 30 minuti a temperatura ambiente
- Si rimuove il toluene

- Si adagiano i frammenti biologici in un'apposita vaschetta metallica (una per ogni campione)
- Lasciando la cappa chimica e utilizzando l'apposita macchina, si aggiunge la paraffina liquida a coprire i campioni
- Si lasciano i campioni in stufa a 60°C per almeno un'ora
- Si tolgono le vaschette dalla stufa e si posiziona l'anello di plastica precedentemente numerato per il riconoscimento
- Sovrapponendo l'anello di plastica si aggiunge ulteriore paraffina a coprire quella già distribuita fino al completo riempimento dello spessore
- Far solidificare a temperatura ambiente la paraffina

Tagli al microtomo

- Si utilizza un microtomo di tipo rotativo a lama fissa
- Si dispongono i pezzi inclusi in paraffina sull'apposito supporto di taglio
- Si impostano i valori di spessore desiderato sul display (si scelgono spessori compresi tra 3,5 e 6 μm)
- Si attiva la macchina e si toglie la paraffina in eccesso
- In prossimità del campione si procede più lentamente
- Si raccolgono con l'apposito pennello le fettine tagliate e le si depositano sui vetrini preventivamente preparati e numerati
- Si pone all'interfaccia tra vetrini e paraffina dell'acqua sterile
- Si adagiano i vetrini sulla piastra riscaldata per far distendere la paraffina
- Impugnando il vetrino dalla parte etichettata si fa scorrere l'acqua in un beker
- Si riposiziona il vetrino sulla piastra riscaldata e lo si lascia per 24 ore, favorendo l'evaporazione dei residui di acqua

Inclusioni in OCT

- Sotto cappa chimica si immergono tre sezioni del rene provenienti da tre zone diverse in contenitori anticipatamente riempiti di PLP precedentemente preparato
- I contenitori ben sigillati vengono posti a 4°C “overnight”
- Utilizzando delle pastette si preleva il PLP dai contenitori e si sostituisce con PBS 1X per 10minuti
- Si ripete l'operazione immettendo nuovamente del PBS 1X
- Per la conservazione si immergono i campioni in PBS con sodio azide 0,02%
- Per poter congelare i campioni e prepararli al taglio si immergono in saccarosio al 30% con PBS “overnight”
- Per il congelamento si versa in una scatola di polistirolo l'azoto liquido (mantenuto negli appositi contenitori in camera fredda)
- Si posiziona uno strato di OCT sulla base “mold” monouso
- Si posizionano i campioni
- Si ricopre con OCT
- Utilizzando una pinza si immerge la base “mold” in azoto liquido fino al termine delle bolle
- Si ricopre il tutto con della carta alluminio su cui si scrive il numero dei campioni contenuti
- Si immerge in azoto fino al deposito in freezer a -80°C

Taglio al criostato

- Si preparano nel criostato le lame da utilizzare
- Si posiziona dell'OCT sul piatto circolare del criostato e vi si adagia il campione
- Si aggiunge l'OCT necessario per coprire integralmente il pezzo
- Si fissa il piatto sul portacampioni
- Si attende che i campioni abbiano raggiunto la stessa temperatura del portacampioni
- Si procede con lo sgrossamento del pezzo
- Si imposta lo spessore di sezione desiderato (10-20 µm)
- Si elimina l'OTC accumulato e si procede con la delaminazione
- Si raccolgono con un pennello le sezioni rimosse sufficientemente adesive e le si fa

aderire al vetrino.

- Si ripongono di volta in volta i vetrini usati nel portavetrini all'interno del criostato per mantenere la temperatura fino al termine dell'operazione
- Si alloggiavano i vetrini in un freezer a -80°C

Utilizzare camice e guanti come da disposizioni

Colorazioni

Si descrivono le metodiche per effettuare le colorazioni in “Ematossilina e Eosina” a partire da vetrini paraffinati e per l'immunofluorescenza (per “Dapi” e “Lectina”)a partire da vetrini ottenuti dal congelamento

Colorazioni con Ematossilina-Eosina

- Si effettuano diversi passaggi previsti per la rimozione della paraffina dai vetrini
- Si immergono i vetrini all'interno dell'apposito cestello nelle vaschette predisposte sotto la cappa chimica previo riempimento delle stesse
- Si immergono i vetrini in toluene per 10 minuti
- Si ripete l'operazione immergendo i vetrini in una nuova vaschetta riempita di toluene per altri 10 minuti
- Si immergono i vetrini in una vaschetta con etanolo al 100% per 5 minuti
- Si immergono i vetrini nuovamente in una vaschetta con etanolo al 100% per 5 minuti
- Si immergono i vetrini in una vaschetta con etanolo al 90% per 5 minuti
- Si immergono i vetrini in una vaschetta con etanolo al 80% per 5 minuti
- Si immergono i vetrini in una vaschetta con acqua in passaggio rapido
- Si immergono i vetrini in una vaschetta con ematossilina per 10 minuti
- Si effettuano due passaggi rapidi in due vaschette con acqua distillata
- Si effettuano dei lavaggi con acqua corrente per 5 minuti
- Si effettua un passaggio rapido in acqua distillata
- Si immergono i vetrini in una vaschetta con eosina per 5 minuti
- Si effettuano due passaggi rapidi in due vaschette con acqua distillata

- Si effettua un passaggio per ogni singolo vetrino in alcool assoluto
- Si effettua un passaggio per ogni singolo vetrino in toluene
- Si effettua un passaggio per ogni singolo vetrino in montante e si attende l'evaporazione
- Si dispone una goccia di “DakoMounting Medium” sul coprioggetto
- Si ripone delicatamente il vetrino sul coprioggetto in modo da bloccare i campioni all'interno
- Far aderire bene il coprioggetto al vetrino eliminando le bolle d'aria

Immunofluorescenza con “Lectina” e “Dapi”

- Si dispongono i vetrini in un cestello e si lasciano all'aria per 5 minuti
- Si prepara la camera umida : in una scatola portavetrini si dispongono due “kleenex” e bagnare con acqua
- Si immergono i vetrini in una vaschetta di vetro con PBS per 5 minuti
- Si ripete l'operazione in una nuova vaschetta con PBS per 5 minuti
- Si diluisce in rapporto di 1:400 la “lectina” fluorescinata in PBS e se ne dispone un'aliquota su ogni sezione di campione
- Si immergono i vetrini in una vaschetta di vetro con PBS per 5 minuti
- Si ripete due volte l'operazione nuove vaschette di vetro con PBS fresco per 5 minuti
- Si dispone su ogni sezione del campione una quantità di 50 μ L di “Dapi” e si depositano i vetrini in stufa a 37°C per 30 minuti
- Si immergono i vetrini in una vaschetta di vetro con PBS per 5 minuti
- Si dispone una goccia di “DakoMounting Medium” sul coprioggetto
- Si ripone delicatamente il vetrino sul coprioggetto in modo da bloccare i campioni all'interno
- Far aderire bene il coprioggetto al vetrino eliminando le bolle d'aria

Utilizzare camice e guanti come da disposizioni

7.3. Modelli per l'ottimizzazione delle procedure di incubazione: la durata dell'incubazione statica

Nell'ottimizzazione delle procedure sperimentali ci si è basati su dati direttamente derivanti dagli esperimenti, ricavati dalla letteratura o emersi da modellazioni teoriche.

In particolare per la determinazione delle procedure di incubazione, fase immediatamente successiva alla ricellularizzazione, ci si è avvalsi di modelli semplificativi per determinare in modo analitico le tempistiche ottimali.

La fase di incubazione è prevista per favorire l'adesione delle cellule iniettate all'interno dello "scaffold" di matrice extracellulare ottenuto. Per favorire questo processo si dispone l'intero bioreattore e circuito di perfusione all'interno dell'incubatore in condizioni statiche, prima di poter intervenire applicando un nuovo flusso.

Le problematiche contrastanti che emergono sono "l'ossigenazione cellulare" e "l'adesione cellulare".

In particolar modo per le cellule in utilizzo nella sperimentazione, l'adesività è molto bassa, tale da richiedere dei tempi molto lunghi per avere un legame sufficiente con la matrice da non essere sciacquate da flussi anche blandi imposti successivamente.

Altrettanto di rilievo è il problema dell'ipossia a cui vanno incontro le cellule in condizioni statiche, senza disporre cioè della concentrazione di ossigeno di saturazione presente nel medium fresco e circolante.

Il trasporto di nutrienti e di ossigeno in una coltura biologica in cui non siano presenti dei "carrier" specifici delle molecole di interesse, è legato a fenomeni di pura diffusione, pertanto molto meno efficaci delle condizioni in vivo e legati alle concentrazioni dei soluti.

Nell'ipotesi di trascurare il flusso per diffusione dell'ossigeno attraverso il terreno di coltura e poi attraverso la membrana e la matrice del rene fino alle cellule, si è strutturato un modello matematico sulla base di dati sperimentali per individuare il tempo necessario alle cellule per consumare tutto l'ossigeno a disposizione fornito nell'istante T_0 , quello cioè in cui si sono iniettate le cellule stesse.

Si vuole descrivere il modello realizzato partendo dalla scelta dei dati e dalle assunzioni semplificative fatte

7.3.1. Calcolo della densità cellulare

Si è voluta ricavare la densità cellulare come parametro basilare per il calcolo del consumo totale di ossigeno e per poter determinare di conseguenza il tempo disponibile prima della condizione di ipossia.

Come assunzione semplificativa si sceglie di trascurare le cellule presenti nei vasi e considerare invece quelle di alto interesse per la ricerca svolta: le cellule presenti nei glomeruli dopo l'iniezione.

Le cellule nei glomeruli sono quelle che nelle fasi successive della ricerca dovranno ripopolare il mesangio e i podociti, pertanto hanno un ruolo chiave nella sperimentazione.

Si possono considerare anche quelle in condizioni più critiche per quanto concerne la disponibilità di sostanze in assenza di flusso.

Per determinare la densità di cellule nei glomeruli si è stabilito di fare un conteggio delle cellule statistico, a partire dalle immagini di immunofluorescenza ottenute nel corso dell'esperimento N° 20, (che prevedeva decellularizzazione, ricellularizzazione e incubazione statica di 30 minuti non seguita da flusso).

Si sono volute analizzare le immagini di 2 sezioni di rene appartenenti a due regioni distinte, una mediana e una polare.

Per ogni sezione si sono individuati tutti i glomeruli e di ognuno di questi sono stati registrati ingrandimenti a 20X nei livelli del rosso, verde e blu (indicativi rispettivamente del "PKH26", cioè del marker specifico delle cellule iniettate, della "lectina", quindi della matrice proteica e infine del "Dapi", rilevatore generico degli acidi nucleici).

Le immagini sono state successivamente analizzate, si è effettuata la conta cellulare all'interno di ogni glomerulo normalizzando il valore sull'area del glomerulo stesso (dimensione legata soprattutto al sezionamento casuale di una volume sferico). Per la determinazione dell'area ci si è basati su quella del cerchio costruito sul suo diametro medio (rilevato con il software in uso per le analisi in fluorescenza).

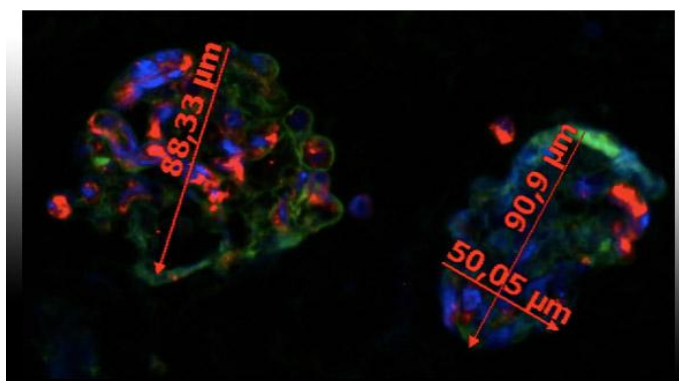


Figura 7.2 : Immagine di immunofluorescenza a 20X rappresentante due glomeruli contenenti cellule iniettate. Si notano le dimensioni ricavate con il software di acquisizione.

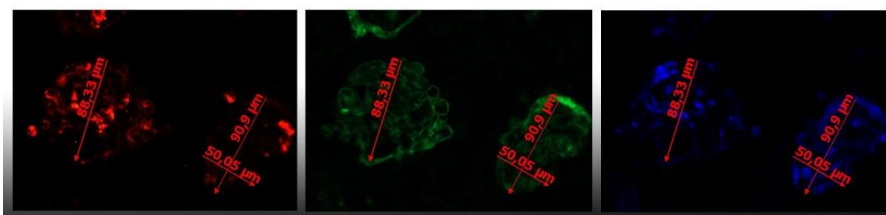


Figura 7.3 : Scomposizione dell'immagine precedente nei 3 canali di fluorescenza rappresentanti rispettivamente PKH26 (marcatore delle membrane delle cellule iniettate), Lectina, adesiva al collagene e dapi, marcatore del materiale nucleare.

Si è effettuata una media dei valori rilevati per ogni glomerulo analizzato, ottenendo il valore della densità media superficiale glomerulare delle cellule iniettate, pari a:

$$\partial_{cell} = 2,33 \cdot 10^{-3} \frac{cells}{\mu m^2} \quad (7.1)$$

7.3.2. Determinazione del coefficiente di diffusione

Un altro parametro fondamentale nei problemi di tipo diffusivo è il coefficiente di diffusività, indice della facilità con cui una sostanza diffonde all'interno di un mezzo.

I fluidi generalmente possono essere considerati isotropi, pertanto i fenomeni diffusivi avranno luogo in ogni direzione con la stessa frequenza; si può cioè individuare un unico valore di coefficiente di diffusione di una sostanza all'interno di un liquido specifico.

Per i solidi la situazione è differente; il coefficiente di diffusione è strettamente dipendente da fattori quali la geometria a livello microscopico e la densità, pertanto nei casi di materiali anisotropi il coefficiente di diffusione può assumere valori molto diversi, tali spesso da rendere completamente trascurabile la diffusione in una direzione rispetto alle altre.

Trattando i tessuti biologici si incontra una situazione ancora differente, legata alla altissima percentuale di acqua che li compone.

Nello specifico si vuole stimare il coefficiente di diffusione all'interno del rene decellularizzato dopo l'iniezione delle cellule.

Come pare evidente, la presenza delle cellule immesse non può essere rilevante per la variazione della diffusività delle molecole all'interno del volume; un discorso più approfondito va fatto invece per la struttura della matrice decellularizzata.

La struttura del rene è molto varia e eterogenea, come già mostrato nei capitoli precedenti, tuttavia, all'interno della zona corticale, essa può essere ritenuta omogenea, sia nell'organizzazione degli organelli funzionali, sia nella struttura proteica che li circonda. Inoltre, considerando un singolo glomerulo, la complessa e intricata struttura dei vasi e delle membrane che li circondano può ragionevolmente essere ritenuta isotropa, legittimando l'ipotesi che in ogni direzione il coefficiente di diffusione possa essere ritenuto costante

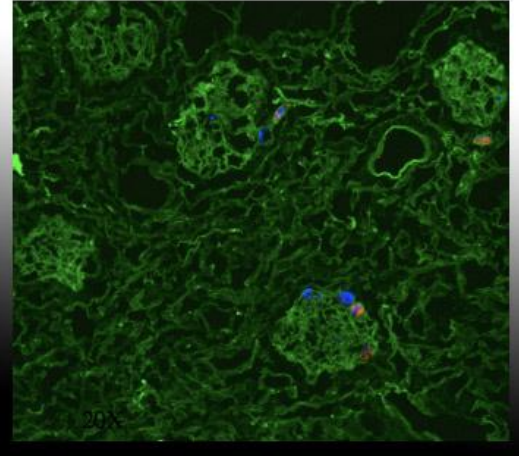


Figura 7.4 : Immagine microscopica di immunofluorescenza , In verde è caratterizzata la matrice extracellulare

Inoltre, il coefficiente di diffusione relativo alle proteine della matrice (senza considerarne la struttura poco compatta che potrebbe confondere), è molto alto rispetto a quello di tutte le molecole in mezzo acquoso, perciò si può ritenere trascurabile la diffusione all'interno della massa proteica.

Considerando le assunzioni fatte, in modo semplificato, per poter determinare il coefficiente di diffusione di una sostanza all'interno del rene è sufficiente determinare la frazione della massa totale occupata dall'acqua (nell'ulteriore ipotesi di considerare la densità della matrice proteica omogenea in tutto il rene) e moltiplicare lo stesso valore percentuale per il noto coefficiente di diffusione dell'acqua.

Benché siano noti in letteratura i valori della percentuale di acqua che costituisce i diversi distretti e organi corporei, più complicato è rintracciare dati riferiti ad organi decellularizzati, privati cioè della gran parte di materiale biologico che ne costituisce la massa.

Si decide quindi di ricavare sperimentalmente la percentuale di acqua costituente la massa del rene decellularizzato.

Si decide di utilizzare un metodo tanto semplice quanto efficace: si valuta la differenza di massa nelle condizioni di idratazione e disidratazione.

Per validare l'attendibilità del modello, si sceglie di confrontare i dati noti dalla letteratura del valore di coefficiente D di diffusione dell'ossigeno nel tessuto del rene di ratto con quello ottenuto moltiplicando il coefficiente di diffusione dell'acqua per la frazione di acqua presente nell'organo intero.

Si preleva quindi un rene, lo si seziona longitudinalmente, avendo cura di non danneggiare la struttura, per ottenere due regioni simmetriche e con un'ampia superficie di contatto con l'aria.

Si risciacqua con una pastetta per eliminare quanto possibile la componente ematica.

Con una bilancia di precisione opportunamente tarata, si pesano le due parti, ottenendo il peso iniziale del rene, costituito da acqua, matrice proteica, componente cellulare propria dell'organo e un'aliquota della componente sanguigna.

Disposte le due regioni all'interno di una piastra di Petri, le si lascia essiccare per 1 giorno entro la cappa a flusso laminare (che proprio per il flusso aumenta i processi di scambio convettivo).

A disidratazione avvenuta vengono pesate nuovamente le due frazioni del rene. Il valore ottenuto costituisce il peso della componente proteica e cellulare (e parzialmente ematica) del rene.

Sottraendo il peso di disidratazione al peso di idratazione si rileva la frazione di acqua del peso del rene di ratto. La stessa percentuale viene moltiplicata per il coefficiente di diffusione dell'acqua alla temperatura di 20°C; il valore ottenuto è confrontabile con quelli riportati in letteratura per il coefficiente di diffusione dell'ossigeno nel rene di ratto.

$$\bullet \quad \text{Peso}_{\text{rene}}^{\text{idratato}} = 1,6225 \text{ g} \quad (7.2)$$

$$\bullet \quad \text{Peso}_{\text{rene}}^{\text{disidratato}} = 0,4239 \text{ g} \quad (7.3)$$

$$\bullet \quad \text{Peso}_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{rene}} = 1,1986 \text{ g} \quad (7.4)$$

$$\bullet \quad X_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{rene}} = \frac{\text{Peso}_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{rene}}}{\text{Peso}_{\text{rene}}^{\text{idratato}}} = \frac{1,1986 \text{ g}}{1,6225 \text{ g}} = 0,738 = 73,8\% \quad (7.5)$$

$$\bullet \quad D_{\text{O}_2}^{\text{rene}} = D_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{rene}} \cdot X_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{rene}} = 1,97 \cdot 10^{-5} \frac{\text{cm}^2}{\text{sec}} \cdot 0,7387 = 1,45 \cdot 10^{-5} \frac{\text{cm}^2}{\text{sec}} \quad (7.6)$$

Come indicato da Evans et al. nel lavoro “The diffusion coefficient of oxygen in respiring kidney and tumour tissue”, [27], il valore del coefficiente di diffusione dell'ossigeno misurato è di $1,3 * 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sec}$, pertanto inferiore dell' 11% rispetto a quello calcolato.

Si decide quindi di mantenere lo stesso margine di errore e seguire la stessa procedura per la determinazione del coefficiente di diffusione dell'ossigeno all'interno della matrice decellularizzata.

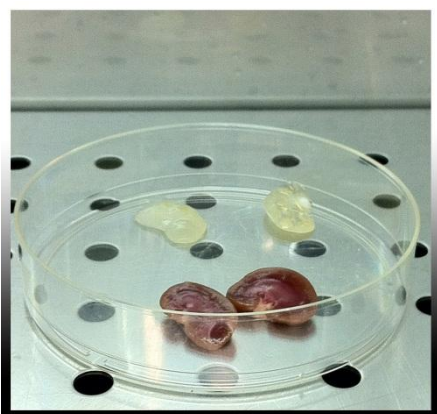


Figura 7.5 : Le sezioni longitudinali dei reni disposte sotto cappa a flusso laminare per l'essiccazione



Figura 7.6 : Le due porzioni di rene decellularizzato disposte su foglio di alluminio preventivamente pesato per l'impossibilità una volta essiccata la matrice di separarla dalla superficie di appoggio

Si avvia quindi il protocollo di decellularizzazione sul rene sinistro proveniente dallo stesso animale secondo le procedure (si sceglie a questo fine il protocollo D2), a decellularizzazione completata, dopo abbondanti lavaggi in circuito aperto con acqua deionizzata per eliminare i residui di detergenti (in questo caso SDS 1%), si seziona il rene longitudinalmente. Disponendo entrambe le porzioni su un film di alluminio dal peso noto, (passaggio necessario come verificato preventivamente per l'impossibilità di separare dopo la disidratazione i residui della matrice decellularizzata dalla superficie di appoggio), si registra il peso complessivo del rene decellularizzato idratato.

Dopo 1 giorno sotto cappa a flusso laminare si ha l'evaporazione completa dell'acqua e si replica l'operazione di pesatura.

Si ottiene in questo modo la percentuale di massa occupata dalla matrice e quella occupata dall'acqua (uniche due componenti in questa condizione).

I dati rilevati sono

- $$\frac{\text{Peso}_{\text{idratato}}}{\text{rene decell}} = 1,4516 \text{ g} \quad (7.7)$$

- $$\frac{\text{Peso}_{\text{disidratato}}}{\text{rene decell}} = 0,0243 \text{ g} \quad (7.8)$$

- $$\frac{\text{Peso}_{\text{H}_2\text{O}}}{\text{rene decell}} = 1,4273 \text{ g} \quad (7.9)$$

- $$X_{\text{H}_2\text{O}} = \frac{\frac{\text{Peso}_{\text{H}_2\text{O}}}{\text{rene decell}}}{\frac{\text{Peso}_{\text{idratato}}}{\text{rene decell}}} = \frac{1,4273 \text{ g}}{1,4516 \text{ g}} = 0,983 = 98,3\% \quad (7.10)$$

- $$D_{\text{O}_2} = D_{\text{O}_2, \text{H}_2\text{O}} \cdot X_{\text{H}_2\text{O}} = 1,97 \cdot 10^{-5} \frac{\text{cm}^2}{\text{sec}} \cdot 0,983 = 1,93 \cdot 10^{-5} \frac{\text{cm}^2}{\text{sec}} \quad (7.11)$$

Ipotizzando di poter considerare anche in questo caso un errore di eccesso pari all'11% relativo ai dati sperimentali del coefficiente di diffusione, si ha

- $$D_{\text{O}_2} = 1,73 \cdot 10^{-5} \frac{\text{cm}^2}{\text{sec}} \quad (7.12)$$

Considerando la dipendenza della diffusività dalla temperatura, applicando lo stesso modello si ottiene

Temperature	Viscosity of H ₂ O [centipoises] (Weast, 1969)	O ₂ Diffusion Coefficient [cm ² /s]
20°C	1.002	0.0000197
40°C	0.653	0.0000324
50°C	0.547	0.0000399
60°C	0.467	0.0000482

Figura 7.7 : Valori di coefficiente di diffusione dell'acqua al variare della temperatura

- $$D_{\text{rene decell } O_2} = 2,84 \cdot 10^{-5} \frac{cm^2}{sec} \quad (7.13)$$

per la matrice decellularizzata ad una temperatura pari a 40°C, (circa quella di incubazione).

Un'ultima approssimazione viene fatta per determinare il valore dello stesso parametro entro le regioni glomeruli, aree a maggior densità proteica, per cui si stabilisce un valore di diffusività dell'ossigeno pari a

- $$D_{\text{glomerulo decell } O_2} = 2,75 \cdot 10^{-5} \frac{cm^2}{sec} \quad (7.14)$$

7.3.3. Calcolo del tempo di sopravvivenza

•Ipotesi di consumo di ordine zero

Si vuole determinare il tempo di incubazione statica delle cellule all'interno dei glomeruli prima della sofferenza per ipossia.

Le approssimazioni che sono state fatte in questo modello sono:

1. Consumo cellulare di ordine zero (indipendente dalla concentrazione di O₂)
2. Ossigeno disponibile solo pari alla quantità disciolta nel fluido interno al rene
3. O₂ disponibile per le cellule nei glomeruli pari a quello disciolto in tutto il volume del rene, considerando tutto il volume pieno di liquido saturo
4. Si trascurano le cellule (consumanti) presenti nei vasi circostanti i glomeruli
5. Si considera il sopraggiungere della sofferenza cellulare solo per concentrazione nulla di ossigeno

Metodo risolutivo:

- 1) Considero la densità superficiale di cellule all'interno dei glomeruli precedentemente determinata in modo sperimentale

$$\overline{Ds} = 2,33 \cdot 10^{-3} \frac{\text{cells}}{\mu\text{m}^2} \quad (7.15)$$

Densità superficiale media:

- 2) Considero la densità media volumetrica:

$$\overline{Dv} = \frac{\left(\sqrt{\frac{2,33 \cdot 10^{-3}}{\pi}}\right)^3 \cdot 4}{3} \cdot \pi = 84,6 \cdot 10^{-6} \frac{\text{cells}}{\mu\text{m}^3} \quad (7.16)$$

- 3) Determino la quantità dell'O₂ disciolto nel terreno di coltura (calcolato per 1,5 ml di liquido nell'ipotesi che corrisponda al volume del rene e per T= 37°C).

Vale la legge di Henry:

$$C_{O_2} = P_{O_2} \cdot a \quad (7.17)$$

con: $P_{O_2} = 0,2 \text{ atm} = 152 \text{ mmHg}$ (7.18)

pressione parziale dell' O₂ in soluzione (nell'Hp che corrisponda a quella dell'aria satura),

$$a = \frac{1,3 \text{ nmol}}{\text{ml} \cdot \text{mmHg}} \quad (7.19)$$

coefficiente di solubilità dell'O₂ nel terreno di coltura a 37 ° C .

$$V_{O_2} = \frac{152 \text{ mmHg} \cdot 1,3 \text{ nmol}}{\text{ml} \cdot \text{mmHg}} \cdot 1,5 \text{ ml} = 296,4 \text{ nmol} = 7,5 \cdot 10^{-3} \text{ ml} \quad (7.20)$$

4) Determino il consumo massimo di ossigeno delle cellule ES murine:

Rilevo dai dati in letteratura [30] :

$$V_{O_2}^{\circ} = 29 \cdot 10^{-18} \frac{\text{mol}}{\text{cells} \cdot \text{sec}} \quad (7.20)$$

corrispondente al consumo di ogni cellula alla pressione parziale di O₂ nel terreno di coltura pari a 0,2 atm.

5) Determino il volume totale dei glomeruli:

Ricavo sperimentalmente il raggio medio dei glomeruli nelle sezioni di rene

$$\overline{R}_{glom} = \frac{110}{2} \mu m = 55 \mu m \quad (7.21)$$

corrispondente a un volume medio di

$$\overline{V}_{glom} = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot \overline{R}_{glom}^3 = 696910 \mu m^3 \quad (7.22)$$

Rilevando dalla letteratura il numero medio di nefroni nel rene di ratto pari a 28000 [29], si rileva il volume totale dei glomeruli nel rene:

$$\overline{V}_{tot\ glom} = 696910 \mu m^3 \cdot 28000 = 19,51 mm^3 \quad (7.23)$$

La frazione del volume totale occupata dai glomeruli è confrontabile con i dati disponibili in letteratura, per cui si ha un volume medio di tutti i glomeruli del rene di ratto pari a

$$\overline{V}_{tot\ glom\ letteratura} = 18 mm^3 \quad (7.24)$$

- 6) Determino il numero totale di cellule presenti nei glomeruli a partire dalla densità volumetrica ricavata e dal volume totale dei glomeruli:

$$\overline{N}_{cell\ tot} = \overline{V}_{tot\ glom} \cdot \overline{Dv} = 19,51 mm^3 \cdot 84,6 \cdot 10^{-6} \frac{cells}{\mu m^3} = 1,65 \cdot 10^6 cells \quad (7.25)$$

7) Determino il consumo totale di O₂ delle cellule iniettate all'interno dei glomeruli nell'Hp di consumo di ordine zero, cioè corrispondente al consumo massimo indipendentemente dalla concentrazione di O₂:

$$\overline{V_{O_2}^{\circ}}_{tot\ cell} = \overline{N}_{cell\ tot\ cell} \cdot V_{O_2}^{\circ} = 1,65 \cdot 10^6\ cells \cdot 29 \cdot 10^{-18} \frac{mol}{cells \cdot sec} \cdot 60 \frac{sec}{min} = 2,872 \frac{nmol}{min} \quad (7.26)$$

8) Il tempo massimo per cui le cellule possono sopravvivere in condizioni statiche (senza ulteriore apporto di O₂ tramite flusso di terreno di coltura ossigenato) è:

$$t_{max} = \frac{V_{O_2}}{\overline{V_{O_2}^{\circ}}_{tot\ cell}} = \frac{296,4\ nmol}{2,872 \frac{nmol}{min}} = 103,20\ min = 1\ h, 43\ min \quad (7.27)$$

Generalizzando, si ottiene la formula:

$$t_{max} = \frac{V_{O_2}^{disponibile}}{\overline{V_{O_2}^{\circ}}_{tot\ cell}} = \frac{V \cdot a \cdot P_{O_2}^{rene}}{\overline{V_{O_2}^{\circ}}_{cell} \cdot \overline{D_v}_{cell} \cdot \overline{V}_{glom} \cdot \overline{N}_{glom}} = \frac{V \cdot a \cdot P_{O_2}^{rene}}{\overline{V}_{tot\ glom} \cdot \overline{V_{O_2}^{\circ}}_{cell} \cdot \overline{D_v}_{cell}} \quad (7.28)$$

•Ipotesi di consumo concentrazione-dipendente

Si vuole considerare un consumo cellulare di ossigeno dipendente dalla concentrazione dell'ossigeno stesso nell'intorno cellulare; questa condizione più affine alla realtà è descritta dalla nota legge di Michaelis-Menten.

Questa determina il valore di consumo dell'ossigeno corrispondente al valore di concentrazione come una curva che raggiunge un valore di massimo a cui tende asintoticamente da valori di concentrazione pari a quelli di saturazione. I parametri che descrivono la curva sono i valori generalmente ricavati in modo sperimentale di consumo di ossigeno massimo e quello di concentrazione pari alla metà di quella di saturazione, che risulta quindi anche la concentrazione per cui il consumo cellulare di ossigeno è pari alla metà di quello massimo.

La legge viene così formulata:

$$\dot{V}_{cell}(C_{O_2}) = \frac{V_{cell}^{max} \cdot C_{O_2}}{k_m + C_{O_2}} \quad (7.29)$$

dove si è definito k_m il valore di metà concentrazione di saturazione.

Per quanto riguarda le cellule ES murine, i valori di consumo massimo e di metà concentrazione di saturazione sono ricavati dalla letteratura [30], [31] e sono:

$$\bullet V_{cell}^{max} = 29 \cdot 10^{-18} \frac{mol}{cells \cdot sec} \quad (7.30)$$

$$\bullet k_m = 0,44 mmHg \quad \text{espressa in termini di pressione parziale} \quad (7.31)$$

che moltiplicata per il coefficiente di diffusione dell'ossigeno nell'H₂O secondo la legge di Henry:

$$\bullet k_m = 0,44 mmHg \cdot 1,3 \frac{nmol}{ml \cdot mmHg} = 0,572 \frac{nmol}{ml} = 0,572 \cdot 10^{-12} \frac{nmol}{\mu m^3} = 0,572 \cdot 10^{-21} \frac{mol}{\mu m^3} \quad (7.31)$$

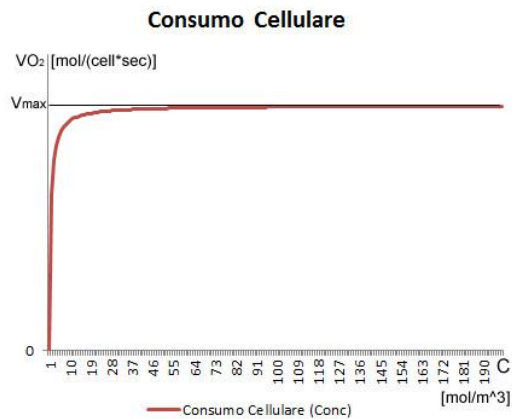


Figura 7.8 : Rappresentazione del consumo di ossigeno cellulare in funzione della concentrazione per le cellule staminali embrionali secondo l'equazione di Michaelis-Menten (per cellule staminali embrionali murine)

Si vuole determinare a questo punto la distribuzione della concentrazione dell'ossigeno all'interno di un glomerulo, nell'ipotesi di considerare un valore di concentrazione esterna pari a quella presente nel volumetto di regione corticale del rene che ne rappresenta l'intorno.

Tale volumetto viene calcolato in modo semplificato dividendo il volume del rene corrispondente alla regione corticale (circa pari al 60% del volume totale) per il numero totale di glomeruli (corrispondente a un valore medio di 28000). Lontano dalle pareti si può in buona approssimazione ritenere che per ragioni di simmetria della distribuzione dei glomeruli (ritenuta omogenea all'interno di un cubo dal volume noto).

$$\bullet \quad Vol_{\text{intorno glomerulo}} = \frac{\left(\frac{60}{100} \cdot Vol_{\text{rene}}\right)}{\bar{N}_{\text{glomeruli}}} = \frac{\left(\frac{60}{100} \cdot 1,5 \text{ ml}\right)}{28000} = 0,9 \text{ ml} = 3,214 \cdot 10^{-5} \text{ ml} = 32,14 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3 \quad (7.32)$$

La concentrazione dell'ossigeno in tale volumetto non è costante nel tempo ma diminuisce in ogni istante della quantità di ossigeno consumato dalle cellule del glomerulo nell'istante considerato.

La concentrazione dell'ossigeno all'interno del glomerulo risulta una funzione del tempo e dello spazio, (considerando la geometria sferica lo spazio viene rappresentato da r, raggio).

Pertanto risulta $C(r, t)$.

La variazione della concentrazione è legata esclusivamente alla diffusione dell'ossigeno come fenomeno di trasporto e al consumo dello stesso da parte delle cellule all'interno del glomerulo.

Tale equazione ha la forma

$$\bullet \quad \frac{\partial C(r, t)}{\partial t} = -D \nabla^2 C(r, t) - \dot{V}(C) \quad (7.33)$$

essendo l'equazione di continuità (conservazione della specie chimica)

$$\bullet \quad \frac{\partial C}{\partial t} = \text{div}(j) - \dot{V} \quad (7.34)$$

e la prima legge di Fick

$$\bullet \quad j = -D \nabla C \quad (7.35)$$

Per il caso sferico, tale equazione assume la forma

$$\bullet \quad \frac{\partial C}{\partial t} = \frac{D}{R^2} \left[\frac{\partial}{\partial r} \left[r^2 \cdot \left(\frac{\partial C}{\partial r} \right) \right] \right] + \frac{1}{\sin(\Omega)} \left[\frac{\partial}{\partial \Omega} \cdot \sin(\Omega) \cdot \left(\frac{\partial C}{\partial \Omega} \right) \right] + \frac{1}{\sin(\Omega)} \left[\frac{\partial^2 C}{\partial \beta^2} \right] - \dot{V} \quad (7.36)$$

Assumendo la condizione di diffusione con simmetria sferica, questa si semplifica in

$$\bullet \frac{\partial C}{\partial t} = \frac{D}{R^2} \left[\frac{\partial}{\partial r} \left[r^2 \cdot \left(\frac{\partial C}{\partial r} \right) \right] \right] - \dot{V} \quad (7.37)$$

Per risolvere il problema, considerando un consumo non costante ma concentrazione dipendente

$$\bullet \frac{\partial C(r, t)}{\partial t} = \frac{D}{R^2} \left[\frac{\partial}{\partial r} \left[r^2 \cdot \left(\frac{\partial C(r, t)}{\partial r} \right) \right] \right] - \dot{V}(C(r, t)) \quad (7.38)$$

si vuole utilizzare un modello numerico, suddividendo il tempo e lo spazio in intervalli discreti Δr e Δt .

Le condizioni al contorno in questo problema a due variabili, sono variabili nel tempo:

Si fanno le seguenti assunzioni:

$$\bullet C(r, t=0) = C_{\text{intorno glomerulo}} \quad (t=0) = C_{\text{saturazione}} \quad (7.39)$$

Con

$$\bullet C_{\text{saturazione}} = P_{O_2} \cdot \alpha = 152 \text{ mmHg} \cdot 1,3 \frac{\text{nmol}}{\text{ml} \cdot \text{mmHg}} = 197,6 \cdot 10^{-21} \frac{\text{mol}}{\mu\text{m}^3} \quad (7.40)$$

$$\bullet C(R, t=i+\Delta t) = C(R, t=i-1) - \frac{\dot{V}_{\text{glomerulo}}(t=i-1) \cdot \Delta t}{Vol_{\text{intorno glomerulo}}} \quad (7.41)$$

con

$$\bullet \dot{V}_{\text{glomerulo}}(t=i-1) = \sum [(r=m)^3 - (r=m+1)^3] \cdot \left(\frac{4\pi}{3} \cdot d_{\text{cell}} \cdot \dot{V}(r=m+1, t=1-1) \right) \quad (7.42)$$

dove cioè si è considerato il consumo totale del glomerulo come somma dei consumi

delle calotte di sfera di spessore Δr (ritenuto in ognuna di esse costante il consumo nel punto più esterno all'istante precedente).

Si procede facendo una nuova ipotesi semplificativa, cioè quella di ritenere costante $C(r,t)$ in ogni Δt , pertanto si assume, nel generico intervallo $\Delta r[r=i,r=i+1]$

$$\bullet \quad \frac{\partial C(r,t)}{\partial t} = \frac{D}{R^2} \cdot \left[\frac{\partial}{\partial r} \cdot \left[r^2 \cdot \left(\frac{\partial C(r,t)}{\partial r} \right) \right] \right] - \dot{V}(C(r,t)) = 0 \quad (7.43)$$

tra due istanti adiacenti $t=i$ e $t=i+1$.

Svolgendo l'equazione differenziale con tale assunzione entro ogni intervallo Δr per ogni intervallo Δt , con le condizioni al contorno

$$\bullet \text{ CC1 : } \quad \frac{\partial C(0,t)}{\partial r} = 0 \quad (\text{flusso nullo al centro della sfera}) \quad (7.44)$$

$$\bullet \text{ CC2: } \quad C(r=i+1) = \text{nota, calcolata per l'intervallo } \Delta r[r=i+1, r=i+2] \quad (7.45)$$

Partendo dall'intervallo $\Delta r = [r=i+n, r=R]$ di cui è nota per ogni istante la concentrazione esterna al glomerulo, ricavata sottraendo di volta in volta il consumo del glomerulo all'istante precedente.

L'integrale risolutivo dell'equazione risulta:

$$\bullet \quad C(r=i, t=m) = \frac{\dot{V}_{O_2}(r=i+1, t=m-1)}{6 \cdot \underset{\text{glomerulo}}{D}} \cdot [(r=i)^2 - (r=i+1)^2] + C(r=i+1, t=m) \quad (7.46)$$

Da cui si ricavano sequenzialmente i valori di consumo in ogni Δr come

$$\dot{V}(r=i, t=m) = \frac{V_{max} \cdot C(r=i, t=m)}{k_m + C(r=i, t=m)} \quad (7.47)$$

Per ovviare i limiti delle approssimazioni della soluzione analitica, la cui implementazione risulta eccessivamente complicata, si decide di utilizzare un software in grado di risolvere il problema in modo computazionale, adottando il criterio degli elementi finiti.

Si sceglie a questo scopo “COMSOL Multiphysics”, esplicitando il problema di diffusione associata a reazione chimica, in questo caso il consumo cellulare.

Si modella la geometria desiderata, mantenendo le semplificazioni precedentemente esposte, in grado di ridurre il costo computazionale grazie alle simmetrie del problema.

Il sistema prevede una sfera (simulazione del glomerulo) racchiusa nel centro di una regione cubica, corrispondente al volume della zona corticale del rene che equidistanza i glomeruli.

Vengono impostate le condizioni al contorno come richieste dal software:

Si attribuiscono le condizioni di flusso nullo attraverso le facce del cubo (“Isolamento”), imposte per ragioni di simmetria con i volumi adiacenti e si uguaglia il flusso attraverso la superficie sferica, area di interfaccia tra i due “Sottodomini”, condizione di “Continuità”.

Considerando l’entità dinamica del problema, è necessario imporre delle condizioni iniziali, specificando la concentrazione dell’ossigeno all’istante t_0 iniziale; essa si ritiene costante in tutto il volume e pari a quella di saturazione del terreno di coltura.

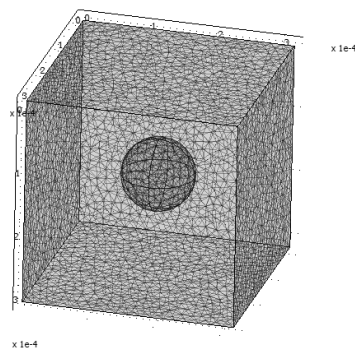


Figura 7.9 : Geometria semplificative del glomerulo e dell’intono di matrice extracellulare. Il modello è stato realizzato con il software “Comsol Multiphysics”

Si procede impostando il valore delle costanti che vengono utilizzate nel calcolo, i valori sono ripresi come precedentemente esposto da rilevazioni sperimentali e dati forniti dalla letteratura.

In particolare si fanno corrispondere ai due diversi “Sottodomini” i coefficienti di diffusione precedentemente calcolati e un differente valore di consumo (“densità di consumo, corrispondente alla reazione chimica”), nullo nel caso dell’intorno cubico.

PARAMETRI		
ρ_{cell} volumetrica	$84,6 \cdot 10^{12}$	cells/m ³
Vol intorno	$32,14 \cdot 10^{-12}$	M ³
Vol Glomerulo	$0,69 \cdot 10^{-12}$	M ³
CO2 iniziale	$197,6 \cdot 10^{-3}$	mol/m ³
R glom	$55 \cdot 10^{-6}$	M
VO2cell	$29 \cdot 10^{-18}$	mol/(cell*sec)
VO2glom(densità)	$2,453 \cdot 10^{-3}$	mol/(sec*m ³)
DO2 glom	$2,75 \cdot 10^{-9}$	m ² /sec
DO2 intorno	$2,84 \cdot 10^{-9}$	m ² /sec
Km	$0,572 \cdot 10^{-3}$	mol/m ³

Figura 7.10 : Parametri impostati per la determinazione della variazione di concentrazione di ossigeno

Come “Espressione” variabile, si introduce la legge di Michaelis-Menten precedentemente esposta, che lega il consumo di ossigeno ad ogni istante e in ogni punto del glomerulo alla concentrazione di ossigeno.

Infine viene stabilita la griglia temporale e spaziale entro cui si vuole effettuare la computazione. Si sceglie di utilizzare un intervallo temporale di 60 secondi (idoneo ai requisiti pratici del problema) e una mesh del tipo “Finer”, sufficientemente accurata per determinare con precisione l’andamento della concentrazione di ossigeno al variare del raggio micrometrico della sfera, bilanciando la raffinatezza del calcolo con il costo computazionale.

Si sceglie tra gli algoritmi di calcolo proposti il “Paradise”.

Il risultato della computazione permette di determinare l’andamento della concentrazione in ogni punto della geometria considerata al variare del tempo.

La simmetria del problema permette di osservare l’andamento della concentrazione

lungo i raggi della sfera. Si sceglie di monitorarla lungo il segmento corrispondente alla distanza minima tra la parete del cubo e il centro della sfera (condizione più critica).

Pertanto, plottando la concentrazione nei primi minuti tra i punti di coordinate

P1 (159e-6; 159e-6; 159e-6) e P2 (318e-6; 159e-6; 159e-6)

Si ottengono le seguenti curve di concentrazione:

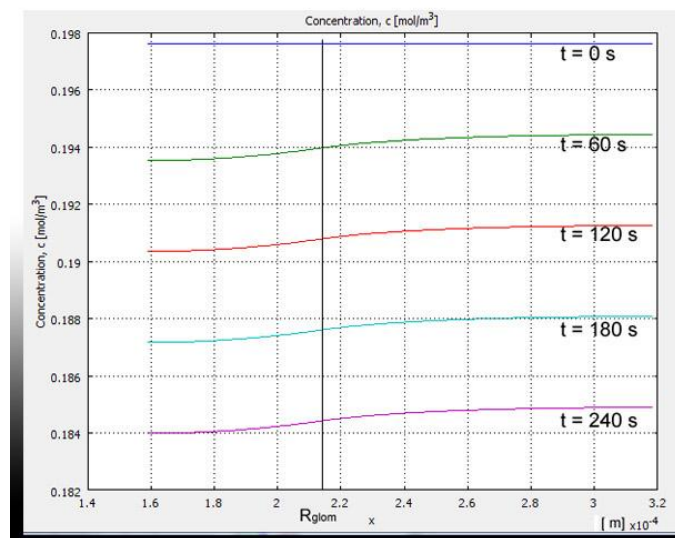


Figura 7.11 : Andamento della concentrazione di ossigeno nei primi 4 minuti di reazione lungo il segmento di congiunzione tra il centro della faccia del cubo e il centro della sfera.

Osservando le stesse curve al variare del tempo, si nota una variazione critica della concentrazione ad un'ora dall'inizio della reazione:

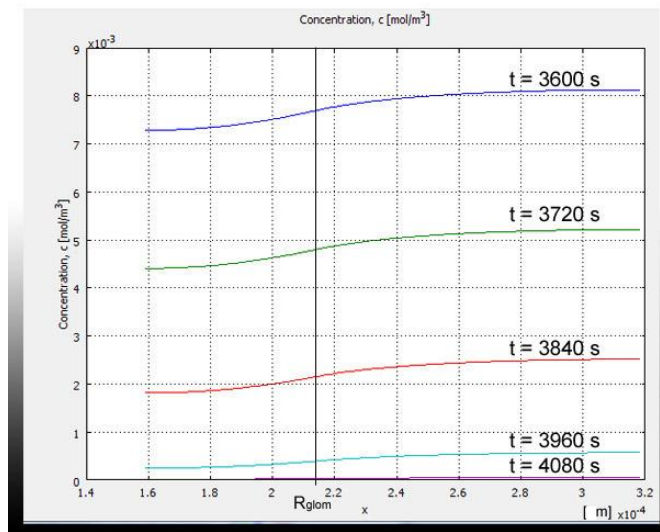


Figura 7.12 : Andamento della concentrazione di ossigeno negli istanti temporali tra $t = 3600$ e $t = 4080$ secondi dall'inizio della reazione. La distribuzione è espressa lungo il segmento di congiunzione tra il centro della faccia del cubo e il centro della sfera.

La concentrazione dell'ossigeno, come definito dalla legge di Michaelis-Menten, non raggiunge lo zero, tendendovi infinitamente. Analizzando le curve della concentrazione lungo lo stesso segmento a 6720 secondi dall'inizio della reazione si ottiene il seguente andamento, caratterizzato da valori molto prossimi allo zero

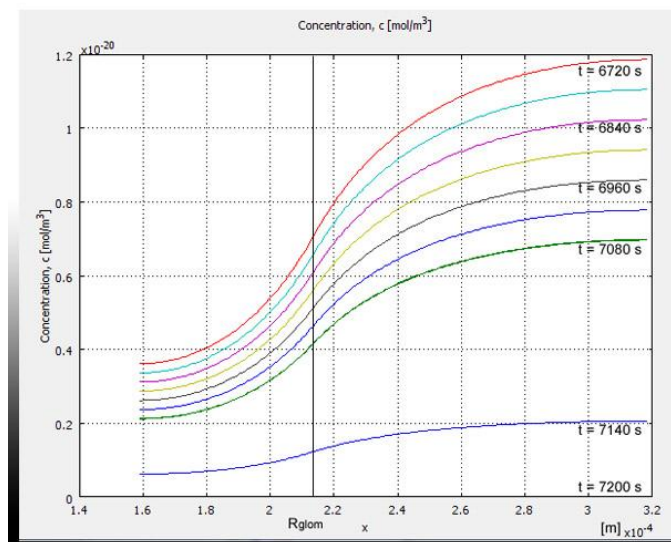


Figura 7.13.: Andamento della concentrazione di ossigeno negli istanti temporali tra $t = 6720$ e $t = 7200$ secondi dall'inizio della reazione. La distribuzione è espressa lungo il segmento di congiunzione tra il centro della faccia del cubo e il centro della sfera.

Osservando le variazioni della distribuzione della concentrazione sulla sezione trasversale del sistema, si ha la conferma del comportamento simmetrico su ogni raggio della sfera, risultando impercettibile la differenza nelle direzioni perpendicolare alla faccia del cubo (distanza minore dalla parete) e lungo la diagonale (distanza maggiore dalla parete), pertanto si può supporre che la diffusione all'interno del "Sottodominio" corrispondente alla regione corticale non sia limitante per la diffusione e per il consumo dell'ossigeno all'interno del glomerulo. In particolare, osservando la distribuzione della concentrazione negli istanti compresi tra $t= 3600$ secondi e $t= 4080$ secondi si può confermare il raggiungimento della concentrazione critica per il metabolismo cellulare.

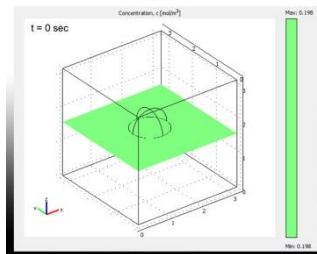


Figura 7.14 : Distribuzione della concentrazione di ossigeno nella geometria all'istante iniziale

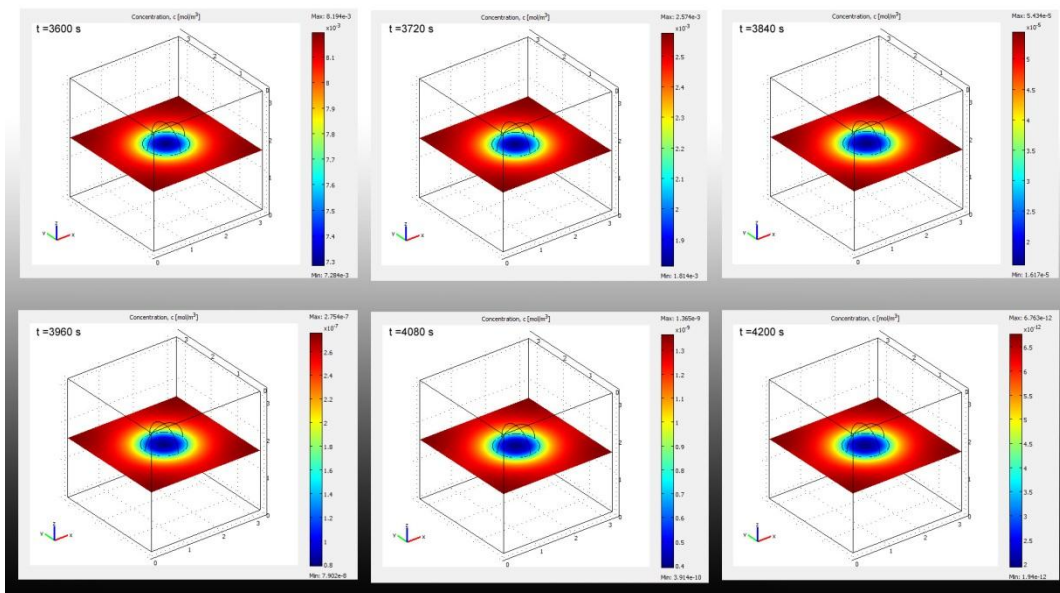


Figura 7.15 : Variazione della distribuzione della concentrazione per istanti temporali tra $t=3600$ e $t= 4200$ secondi. Si nota il raggiungimento di valori critici di concentrazione per il metabolismo cellulare

Come mostrato dalle immagini, la posizione sottoposta a condizioni più critiche è quella corrispondente al centro della sfera. Pertanto si stabilisce di riferire al punto P1 (159e-6; 159e-6; 159e-6) la curva di concentrazione di ossigeno nel tempo:

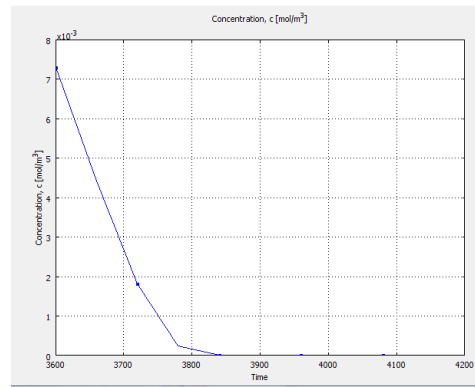
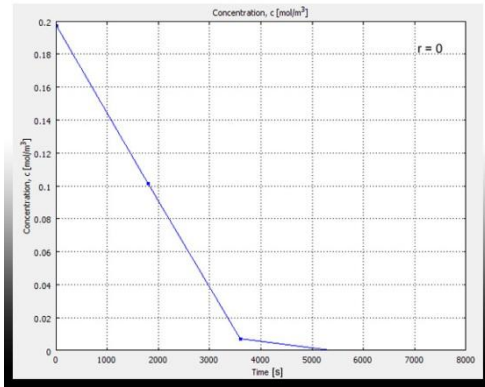


Figura 7.16-7.17: Andamento della concentrazione al centro della sfera nel tempo

Per poter valutare l'effetto delle approssimazioni fatte nel calcolo del coefficiente di diffusione ed escludere la dipendenza del risultato da essa, si è ripetuta la computazione utilizzando i valori determinati sperimentalmente con l'essiccazione del rene trascurando l'errore considerato precedentemente.

Si considerano pertanto i valori di coefficiente di diffusione

$$D_{O_2 \text{ glom}} = 3,081 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{sec}$$

$$D_{O_2 \text{ glom}} = 3,18 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{sec}$$

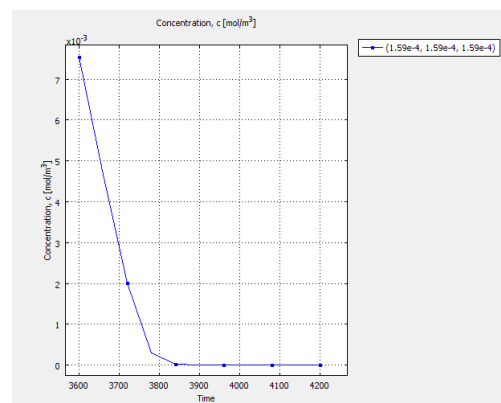
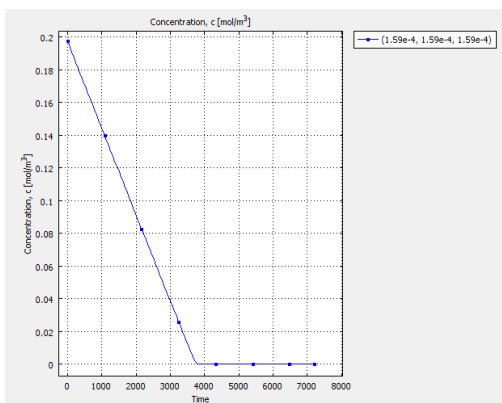


Figura 7.18-7.19 : Andamento della concentrazione al centro della sfera nel tempo. Coefficienti di diffusione teorici.

I grafici non mostrano differenze rilevanti al fine della cinetica del problema, pertanto si può confermare la diminuzione della concentrazione di ossigeno ad un valore di $7,28 \cdot 10^{-3} \text{ mol/m}^3$ a 3600 secondi dall'inizio della reazione.

In base ai valori rilevati dalla letteratura, una concentrazione pari a $9,1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/m}^3$ (data da pressione parziale di ossigeno pari a 7 mmHg), corrisponde ad una condizione di ipossia tale per cui le cellule staminali embrionali murine riducono il proprio metabolismo (rilevato come espressione genica di proteine indicative dell'attività cellulare) al 10% di quello mostrato in condizioni fisiologiche.

E' altrettanto dimostrato che questa linea cellulare può sopportare condizioni di ipossia più critiche, date da concentrazioni di ossigeno inferiori, riducendo conseguentemente le proprie attività, anche per tempi prolungati (fino a 50 ore), mostrando una percentuale di apoptosi e di rottura della membrana celebrale non superiore all'11% [30].

Questo dato, che sembrerebbe legittimare la scelta di un'incubazione statica senza rischi per tempi lunghi, si scontra con il blocco dell'attività metabolica, per cui la sopravvivenza in condizioni critiche delle cellule non corrisponde ad una maggiore adesione delle stesse.

In altre parole risulterebbe inutile ai fini dell'adesione cellulare un'incubazione statica di durata maggiore di un'ora.

7.4. Organizzazione degli esperimenti

L'attività sperimentale è stata portata avanti parallelamente all'ottimizzazione del sistema di perfusione e delle procedure; inoltre l'organizzazione delle indagini è stata programmata anche in funzione delle esigenze operative di istituto. Queste condizioni, aggiunte alla molteplicità dei parametri influenti sugli esiti degli esperimenti e alla nota variabilità biologica rendono impossibile un'esposizione lineare della sperimentazione. Tuttavia è possibile ordinare l'attività svolta in funzione dei protocolli utilizzati. Si preferisce un'organizzazione in funzione di quelli di decellularizzazione, prima delle due fasi indagate, dal momento che la suddivisione degli esperimenti con questo criterio coincide anche con l'ordine cronologico con cui sono stati svolti.

Non vengono riportati gli esperimenti effettuati nella fase preliminare della sperimentazione, quella di approccio all'attività pratica organizzata allo scopo di comprendere le problematiche legate al sistema di perfusione e alle prime scelte procedurali. In questa fase si è indagato anche sulla tossicità dei detergenti utilizzati per le cellule, ottenendo la certezza della necessità di abbondanti lavaggi in circuito aperto prima del condizionamento e della semina cellulare. Un'altra scelta apportata in questa fase è quella di operare su un solo rene ad ogni esperimento, scartando l'ipotesi iniziale di incannulare l'aorta a monte della ramificazione delle arterie renali per perfondere simultaneamente la coppia di reni. Queste prime assunzioni hanno portato alla formulazione delle basi sperimentali iniziali.

Si vuole ora schematizzare l'ordine di svolgimento degli esperimenti, per poter permettere una successiva analisi dei risultati più chiara.

Esperimenti svolti con protocollo D1:

Tryton X-100, DNAsi acida, sali, SDS 4%, lavaggi

Durata complessiva della decellularizzazione

5 giorni; metodi usati detergenti ionici, non

ionici, enzimatici e soluzioni ipertoniche

Ricellularizzazione facoltativa.

•Exp.11:

Incannulamento da aorta

Perfusione Medium per 15 minuti

Iniezione 8 milioni di cellule con protocollo R1

3 ore di incubazione in statico

60 ore di flusso a 3 mL/min

Fissato con PLP in perfusione

Exp. 12:

Incannulamento da aorta

Perfusione Medium per 15 minuti

Iniezione 8 milioni di cellule con protocollo R1

15 ore di incubazione in statico

Fissato per immersione

Exp. 13:

Incannulamento da aorta

Infusione di blu di metilene 0,05% (colorante)

(infusione manuale 1 mL in 4 minuti)

Fissato per immersione

Exp.14:

Incannulamento da arteria renale
Infusione di blu di metilene 0,05% (colorante)
(infusione manuale 1 mL in 4 minuti)
Non fissato

Exp. 15:

Incannulamento da arteria renale
Perfusione Medium
Iniezione 8 milioni di cellule con protocollo R1
Fissato per immersione

Exp. 16:

Incannulamento da arteria renale
Infusione di blu di metilene 0,05% (colorante)
(infusione secondo procedura infusione colorante)
Lavaggi in circuito aperto con acqua distillata
Fissato per immersione

Esperimenti svolti con protocollo D2:

SDS 1%, lavaggi

Durata complessiva della decellularizzazione

2 giorni; metodi usati detergenti ionici,

Ricellularizzazione facoltativa

Exp. 17:

Incannulamento da arteria renale

Infusione di blu di metilene 0,05% (colorante)

(infusione secondo procedura infusione colorante)

Lavaggi in circuito aperto con acqua distillata

Infusione di 1,5 ml lectina WGA rodaminata,
statico 30 min

Fissato per immersione

Exp. 18:

Incannulamento da arteria renale

Infusione di blu di metilene 0,05% (colorante)

(infusione secondo procedura infusione colorante)

Lavaggi in circuito aperto con acqua distillata

Fissato per immersione

Exp. 19:

Incannulamento da arteria renale

Infusione di blu di metilene 0,05% (colorante)

(infusione secondo procedura infusione colorante)

Lavaggi in circuito aperto con acqua distillata

Fissato per immersione

Exp.20:

Incannulamento da arteria renale

Perfusione Medium

Iniezione 8 milioni di cellule con protocollo R2
Fissato per immersione

Exp. 21:

Incannulamento da arteria renale
Fissazione per immersione

Exp. 22:

Incannulamento da arteria renale
No fissazione, esperimento interrotto

Exp. 23:

Incannulamento da arteria renale
Perfusione Medium
Iniezione 8 milioni di cellule con protocollo R2
Incubazione statica per 15 ore
Flusso a 0,5mL/min per 30 minuti
Fissato per immersione

Exp. 24:

Incannulamento da arteria renale
Fissazione per immersione

Exp. 25:

Incannulamento da arteria renale
No fissazione, esperimento interrotto

Exp. 30:

Incannulamento da arteria renale
Perfusione Medium
Iniezione 8 milioni di cellule con protocollo R2
Incubazione statica per 3 ore
Fissato per immersione

Exp.31:

Incannulamento da arteria renale
Infusione di “Ioexolo” (mezzo di contrasto)
(Infusione con pompa a siringa a 2 mL/min)
Analisi con microtac
Lavaggi in circuito aperto con acqua distillata
(con pompa a siringa a 1 mL/min)
Essiccazione

Exp.32:

Incannulamento da arteria renale
Lavaggi in circuito aperto con acqua distillata
Essiccazione

Esperimenti svolti con protocollo D3:

SDS 1%, DNAsi acida, lavaggi

Durata complessiva della decellularizzazione

2 giorni; metodi usati detergenti ionici e enzimatici.

Ricellularizzazione facoltativa

Exp.26:

Incannulamento da arteria renale

Lavaggi in circuito aperto con acqua distillata

Perfusione Medium

Iniezione 8 milioni di cellule con protocollo R2

Incubazione statica per 3 ore

Flusso a 0,5 mL/min per 30 minuti

Fissato per immersione

Exp.27:

Incannulamento da arteria renale

Infusione di blu di metilene 0,05% (colorante)

(infusione secondo procedura infusione colorante
prima e dopo DNAsi)

Lavaggi in circuito aperto con acqua distillata

Fissato per immersione

Exp. 28:

Incannulamento da arteria renale

Lavaggi in circuito aperto con acqua distillata

Perfusione Medium

Iniezione 8 milioni di cellule con protocollo R2

Incubazione statica per 15 ore

Flusso a 0,5 mL/min per 30 minuti

Esperimenti svolti con protocollo D3:

SDS 1%, DNAsi basica, lavaggi

Durata complessiva della decellularizzazione

2 giorni; metodi usati detergenti ionici e enzimatici.

Ricellularizzazione facoltativa

Exp. 29:

Incannulamento da arteria renale

Infusione di blu Medium (come colorante)

(infusione secondo procedura infusione

colorante, solo dopo DNAsi)

Lavaggi in circuito aperto con acqua distillata

Fissato per immersione

PARTE III - RISULTATI

8. RISULTATI

In questo capitolo si vogliono riportare i risultati ottenuti nella sperimentazione in risposta ai principali obiettivi del lavoro: la progettazione di un sistema di Decellularizzazione-Ricellularizzazione e lo sviluppo e l'ottimizzazione delle metodiche.

In primo luogo si vuole valutare il sistema progettato dal punto di vista della funzionalità, della semplicità di utilizzo e del contributo apportato al buon esito degli esperimenti.

In un secondo momento si riportano e analizzano i risultati degli esperimenti eseguiti, raggruppandoli con il criterio esposto nel paragrafo 7.4., cioè in funzione del protocollo di decellularizzazione utilizzato.

Gli esiti degli esperimenti, nei termini dei risultati di analisi visive e istologiche, di ricerca di perforazioni della matrice, di indagini di microscopia a fluorescenza per la determinazione dell'integrità della matrice, della rimozione della componente cellulare originaria e della distribuzione delle nuove cellule sono dei parametri tramite cui stilare una valutazione delle procedure utilizzate, seppure influenzate di volta in volta da un'alta variabilità.

8.1. Valutazione del sistema di perfusione, risultati operativi

Durante lo svolgimento dell'attività di sperimentazione un ruolo importante è stato rivestito dal sistema di perfusione progettato e realizzato.

Il raggiungimento di risultati incoraggianti per quanto riguarda una completa decellularizzazione e la distribuzione delle nuove cellule infuse sono indicatori oltre dell'ottimizzazione delle buone tecniche di lavoro, anche dell'efficienza dei dispositivi utilizzati.

Per poter effettuare una valutazione del sistema costituito, si vogliono confrontare i requisiti proposti in fase di “metaprogetto” con i risultati effettivamente conseguiti dalla realizzazione dei modelli.

Verifica dei requisiti della camera di perfusione:

Sterilizzabilità in autoclave e trasparenza

La scelta del vetro si è dimostrata molto valida ed efficace per l'ottenimento delle proprietà di sterizzabilità e di trasparenza.

In particolare la sterilizzazione alle alte temperature dell'autoclave (120°C) e l'alta umidità presente durante il processo non hanno evidenziato, come previsto, danni evidenti alle strutture. Nemmeno la manipolazione durante gli spostamenti previsti per la sterilizzazione è risultata un problema per la fragilità del dispositivo. Tuttavia al fine di preservare l'integrità della camera si è reso necessario prestare particolare attenzione negli imballaggi. Per ogni spostamento della stessa, in assenza del supporto in Polimetilmetacrilato è bene rivestire preventivamente i “beccucci” cilindrici con dei tubi protettivi in silicone (dallo spessore rilevante e moderatamente rigidi).

La trasparenza è stata un fattore determinante per le valutazioni nelle fasi intermedie degli esperimenti; la possibilità di monitorare visivamente l'aspetto del rene, (lo sbiancamento, la consistenza, l'omogeneità della decellularizzazione), di verificare l'assenza di danni circuitali quali perforazioni al catetere di incannulamento o l'allentamento del filo di sutura dell'arteria renale è risultata estremamente efficace nella prevenzione di fallimenti.

Una possibilità offerta dalla trasparenza della camera è stata quella di verificare con l'iniezione di colorante l'assenza di perforazioni della matrice.

Questa tecnica si è rivelata importante per la comprensione di problemi che hanno portato a scelte strategiche importanti. Un esempio di questo è la decisione di modificare il sito di incannulamento da aorta ad arteria renale con ottimi risultati. La possibilità di ripetere e osservare l'iniezione di colorante dopo ogni soluzione è stata utile nella valutazione del danno arrecato da ognuna alla matrice e ottimizzarne l'utilizzo, le concentrazioni e le tempistiche.

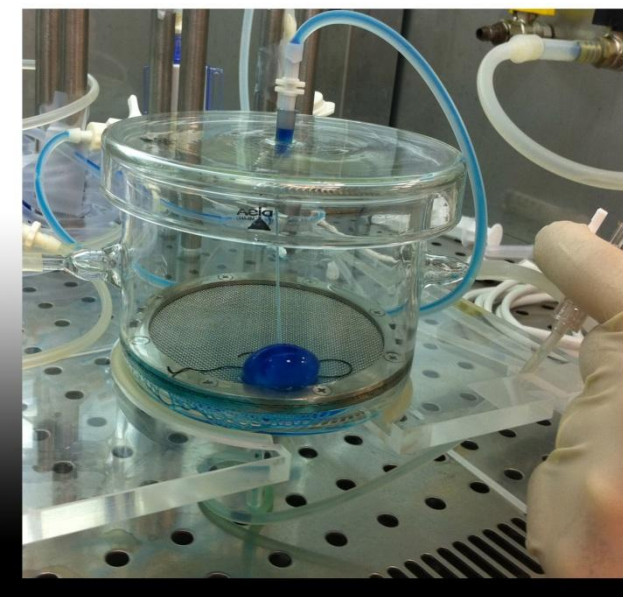


Figura 8.1 : Monitoraggio dell'iniezione di colorante attraverso la camera di perfusione in vetro

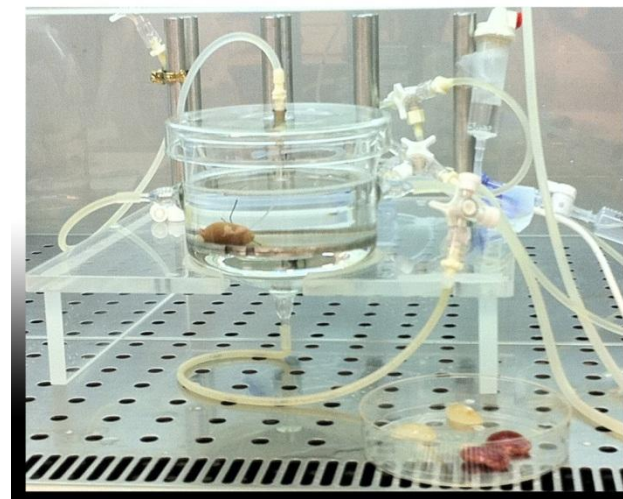


Figura 8.2: Stabilità dell'incannulamento verticale del re e maggiore controllo sulle posizioni assunte dall'organo. Si nota la maggiore stabilità di tutto il sistema, con facilità di operazioni in GLP

Resistenza delle aree circostanti i fori di ingresso e di uscita, sollecitate dalle pressioni manuali imposte

La realizzazione dei “beccucci” cilindrici in sostituzione dei fori si è dimostrata una scelta efficace nella prevenzione delle crepe e delle fessurazioni. Inoltre, grazie alla loro presenza e alla possibilità offerta di fissare direttamente i tubi evitando giunti di connessione, si è semplificata l'operazione di montaggio del circuito, risparmiando tempo e componenti, riducendo anche il numero delle aree soggette a perdita idraulica.

I beccucci, come precedentemente riportato, sono da ritenersi comunque regioni molto delicate e passibili di frattura, pertanto richiedono necessariamente molta cura nella manipolazione.

Aumento del diametro della camera per favorire l'alloggiamento e la manipolazione iniziale del rene, dimensione da bilanciare per non eccedere con il volume di “priming” correlato allo spreco di solventi chimici

Le dimensioni scelte per la realizzazione della camera prevedono un volume di riempimento per il funzionamento del sistema pari a 350 mL, tale volume è risultato ottimale per consentire il ricircolo fino a 17 ore del fluido senza ricambi.

L'altezza dei beccucci di uscita, dimensionata in modo da limitare quanto possibile lo spessore del liquido mantenendo la sicurezza della copertura del rene, è un potenziale limite, nel caso di incubazione statica delle cellule, per il trasporto dell'ossigeno. Una soluzione potenzialmente attuabile di volta in volta al variare delle esigenze è quello di utilizzare dei volumetti di riempimento da posizionarsi sul fondo della camera. La presenza del dischetto di sostegno del rene fornisce una barriera di protezione meccanica per il rene e i componenti aggiunti.

Posizionamento del foro in ingresso alla camera al centro del coperchio per favorire sia la stabilità del sistema sia una migliore perfusione del rene (incannulato verticalmente)

La presenza del foro al centro del coperchio e quindi un incannulamento verticale del rene favoriscono la stabilità del sistema, in primo luogo quella del circuito, che risulta molto meno fragile alle manipolazioni.

L'inserimento dell'ago a punta piatta (preventivamente realizzati e disostruiti) applica un flusso più omogeneo al catetere e quindi al rene, evitando il rischio di asimmetrie.

Inoltre, la stessa disposizione del foro (non sostituibile con beccucci per via della necessità di contenere l'ago) è decisamente più resistente se realizzato all'interno di uno spessore piano.

Tuttavia, le posizioni assunte dal rene non sono sempre prevedibili e gestibili, pertanto gli effetti del flusso simmetrico e omogeneo non sono sempre percepibili.

Chiusura del coperchio ad appoggio, (senza avvitaamento per impossibilità di rotazione del rene) dimensionamento del gioco con l'imbocco della camera tale da assicurare la sterilità

La semplicità di appoggio del coperchio senza eccessive manipolazioni necessarie ad esempio nel caso dell'avvitaamento dello stesso, favorisce la semplicità di lavoro e la minima movimentazione del rene (a cui il coperchio è collegato).

La realizzazione della dimensione idonea alla chiusura sterile (20 µm) è stata ottenuta tramite l'ispessimento del bordo di contatto della camera di perfusione.

Gli esiti della sperimentazione hanno confermato l'assenza di contaminazioni e inquinamenti della coltura.



Figura 8.3 : Vantaggi dell'incannulamento verticale

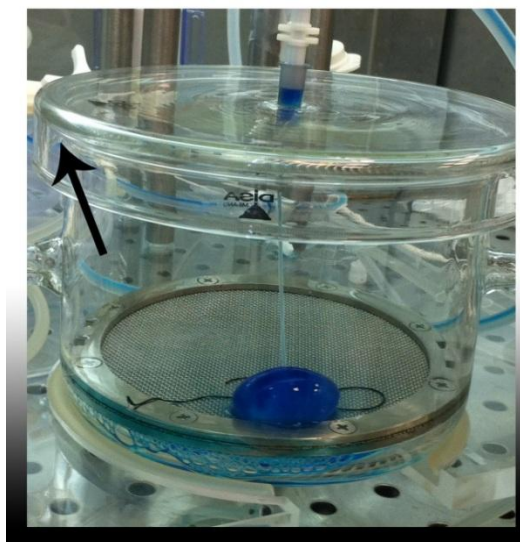


Figura 8.4 : Chiusura in sterilità del coperchio

Posizionamento di un ulteriore foro diametralmente rispetto a quello di uscita; connessione dello stesso a un tubo esterno alla linea di perfusione, utilizzabile come accesso di sicurezza

La presenza di un foro ridondante si è dimostrata molto utile nelle fasi di riempimento della camera. Il collegamento del giunto bicono in ingresso al rene al rubinetto all'estremità del tubo dell'uscita di sicurezza permette di effettuare un riempimento repentino ed efficace del circuito e della camera, favorendo la fuoriuscita delle bolle formatesi nelle manipolazioni.

Questa tecnica si è dimostrato aver ridotto notevolmente i danni provocati dall'aria al rene.

Inoltre, la presenza dell'uscita aggiuntiva perfettamente simmetrica a quella utilizzata dal circuito per prelevare il fluido dalla camera permette la versatilità di alloggiare in caso di particolari scelte sperimentali un secondo rene, realizzando un sistema a due circuiti paralleli (utilizzando un coperchio con due fori predisposti).

Presenza di una conicità alla base della camera tale da consentire il posizionamento di un disco forato di supporto per il rene, in grado di allontanarlo dal foro di svuotamento, posizionato al vertice del cono stesso

La presenza del dischetto di sostegno ha permesso di effettuare il corretto e semplice svuotamento della camera di perfusione aspirando con una siringa da 50 mL il liquido dal foro inferiore. La soluzione ha velocizzato notevolmente le operazioni di ricambio dei detergenti, evitando movimentazioni inutili (sollevamento della camera per raggiungere la quota necessaria per la fuoriuscita per gravità del fluido).

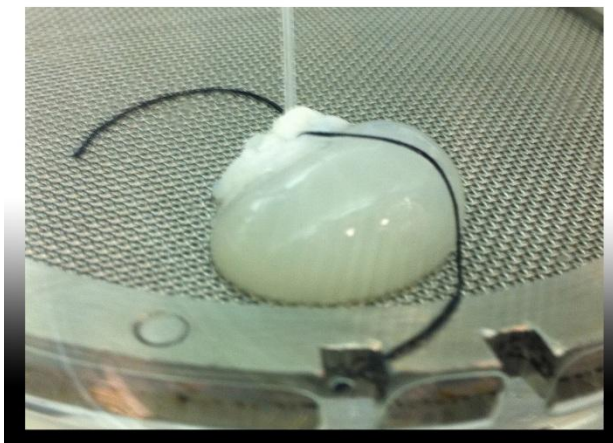


Figura 8.5 : La struttura del dischetto di sostegno per il rene; le fessure permettono la mobilità del dischetto stesso con pinze sterili a dentini.

Possibilità di rimozione e inserimento agevole e sicuro del disco di alloggiamento del rene

Benchè il disco di supporto sia risultato una soluzione molto utile per la semplificazione del lavoro sperimentale, la sua movimentazione è un punto ancora non ottimizzato.

L'utilizzo tramite pinze chirurgiche (in uso durante diverse fasi del lavoro) necessita l'operato congiunto e sincrono di due operatori. Per semplificare ulteriormente questa operazione si è proposta la realizzazione di un afferraggio ad aggancio da posizionarsi entro le rientranze laterali del disco metallico. Tale afferraggio potrebbe essere assemblato al disco in fase di montaggio e dimensionato in modo da poter essere lasciato all'interno della camera durante tutta la fase di decellularizzazione e ricellularizzazione.

Svuotamento e riempimento della camera effettuabili tramite prelievo e iniezione con siringa da 50 cc da un tubo collegato al foro alla base della camera e regolabile all'estremità da un rubinetto a tre vie "Luer-Lock", manipolabile senza dover movimentare il bioreattore

L'accessibilità del rubinetto a tre vie "Luer-Lock" congiunto ad un tubo di 20 cm che lo allontana dalla camera di perfusione assicura una agevole manipolazione dello stesso limitando le movimentazioni del rene. Il rubinetto a tre vie, comodamente fissato in una fessura del piano di appoggio del supporto in Polimetilmetacrilato, consente la semplicità delle operazioni di svuotamento e riempimento.

Struttura di sostegno in grado di alloggiare in modo stabile, sicuro e versatile la camera di perfusione (anche durante le fasi di spostamento), di ordinare il sistema di tubi in linea di perfusione e quelli relativi agli accessi liberi alla camera, semplificando l'operazione di apertura dei rubinetti a tre vie

La struttura realizzata si è dimostrata un notevole miglioramento per la semplificazione delle operazioni. La sua stabilità è risultata importante nella realizzazione di tutte le fasi della sperimentazione. La guarnizione siliconica ha fornito alla camera in vetro un'immobilizzazione che ha evitato movimenti inconsulti sia nelle manipolazioni, sia negli spostamenti.

Inoltre, grazie alla sua adattabilità, è stato possibile posizionare la camera a seconda delle esigenze, ad esempio inclinandola stabilmente per favorire lo sgocciolamento in circuito aperto.

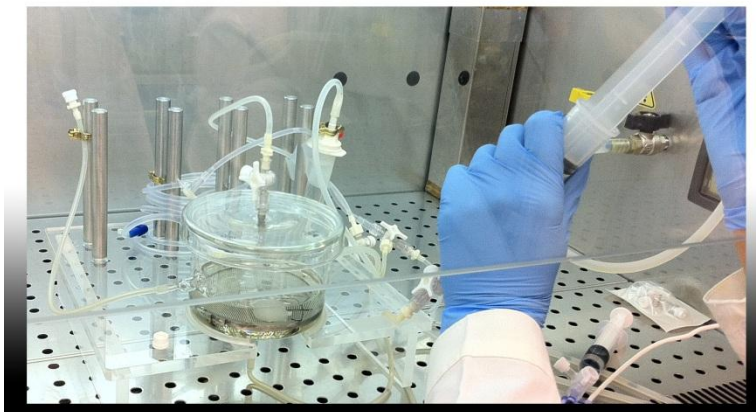


Figura 8.6 : Lo svuotamento della camera di perfusione senza rischi tramite una siringa da 50 cc semplifica l'operazione e la velocizza

Dimensionamento della struttura di sostegno tale da favorirne il lavoro sotto cappa a flusso laminare, la movimentazione (accesso alla cappa stessa senza difficoltà di passaggio attraverso il vetro di protezione) e il posizionamento in incubatore.

L'altezza dei piedini di appoggio della struttura di supporto in Polimetilmetacrilato si sono dimostrati ottimali per poter alloggiare la camera nell'area adibita e consentire la presenza del beccuccio e il di svuotamento alla base di questa senza forzare posizioni anomale e generare strozzature nel tubo di uscita.

La dimensione delle barre metalliche avvitate all'interno delle scanalature della base sono risultate sufficientemente alte da contenere l'arrotolamento lasso di tutti i tubi del circuito di perfusione e ma sufficientemente basse da non ostacolare nei movimenti per le operazioni sperimentali.

Inoltre, tutta la struttura di supporto è risultata precisamente dimensionata per essere estratta dalla cappa a flusso laminare senza difficoltà e senza richiedere il sollevamento del vetro di protezione. Il volume occupato dalla struttura risulta decisamente compatibile con gli spazi disponibili nell'incubatore.

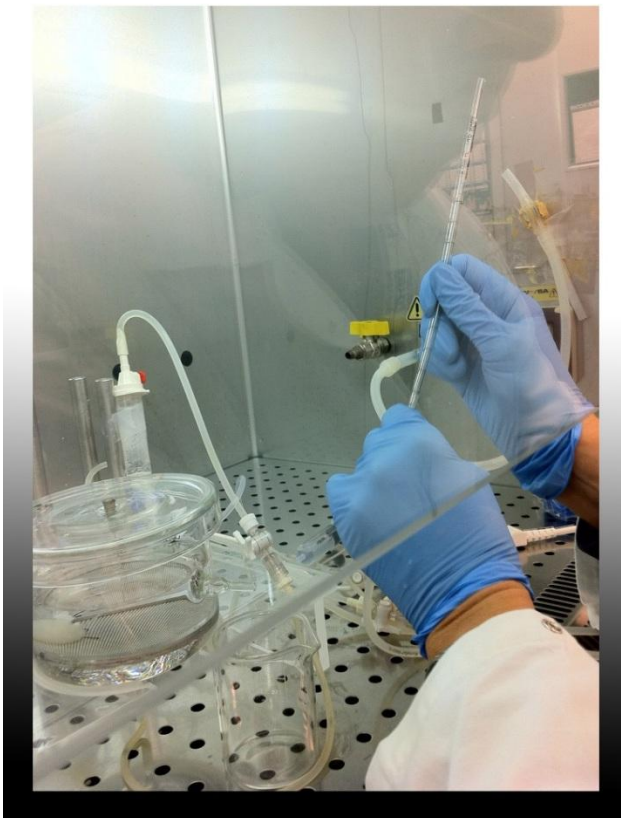


Figura 8.7 : Apertura del circuito di perfusione per i lavaggi in acqua sterile; la semplicità dell'operazione è aumentata dalla stabilità del circuito

Versatilità della struttura di supporto: possibilità di adattarsi alle diverse esigenze di lavoro e di circuito, introducendo all'occorrenza elementi di blocco e alloggiamento del sistema di perfusione o eliminandoli semplificando le manipolazioni della camera

La presenza delle barre metalliche removibili permette un buon grado di versatilità della struttura di supporto.

L'utilizzo delle mollette come mezzo per fissare i componenti del circuito è valido e adattabile alle esigenze anche transitorie delle operazioni sperimentali. E' tuttavia necessario prestare molta attenzione alla pervietà dei tubi che potrebbe essere minacciata dalla strizione delle mollette.

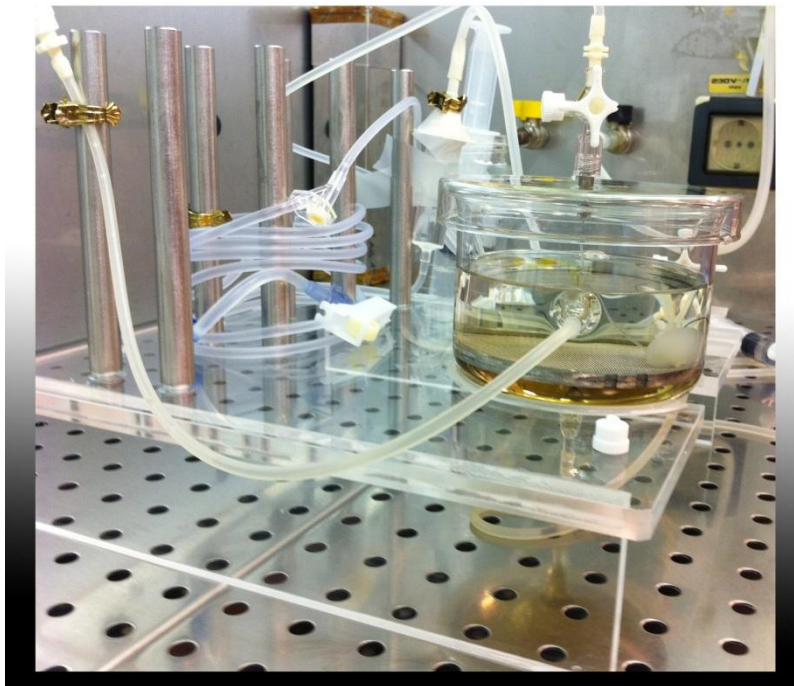


Figura 8.8 : Il sistema di mollette e perni metallici favoriscono l'ordine e il contenimento delle dimensioni del circuito

Verifica dei requisiti del circuito di perfusione:

Redistribuzione dei pesi: foro nel coperchio per incannulare verticalmente il catetere suturato al rene; a causa dell'eccessiva lunghezza della cannula si propone l'utilizzo di un ago a punta piatta per non forare il catetere

Il beneficio dell'utilizzo dell'ago è già stato precedentemente descritto per quanto riguarda il ruolo nel direzionare il flusso al rene. La sua compattezza e la saldezza del suo inserimento nel foro contribuiscono alla stabilità del circuito stesso.

Inoltre, come descritto nelle procedure, nell'attività sperimentale si è reso necessario il distacco frequente del giunto bicono di ingresso dall'ago, operazione permessa dalla stabilità di quest'ultimo.

L'aumento della stabilità è stato raggiunto anche grazie all'allontanaento del trasduttore di pressione dall'ago di immissione al rene; questa caratteristica ha permesso di bloccare lo stesso sulla struttura di supporto, impedendone i movimenti in grado di alterare le rilevazioni.

Connessione dell'ago inserito nel coperchio della camera con il circuito tramite giunto bicono; aggiunta di un tratto di tubo (misurabile anche in funzione dell'iniezione cellulare), per allontanare il giunto a tre vie dalla camera di perfusione.

Il dimensionamento del tubo di connessione del rubinetto a tre vie congiunto al trasduttore di pressione è stato fatto considerando il volume di riempimento di 1,8 mL, ritenuto la dimensione del rene. Pertanto la stessa quantità di colorante e di sospensione cellulare sono state iniettate agilmente nel corso della sperimentazione, potendo controllare, nel caso del colorante l'istante di ingresso al rene senza che il liquido fosse eccessivamente diluito.

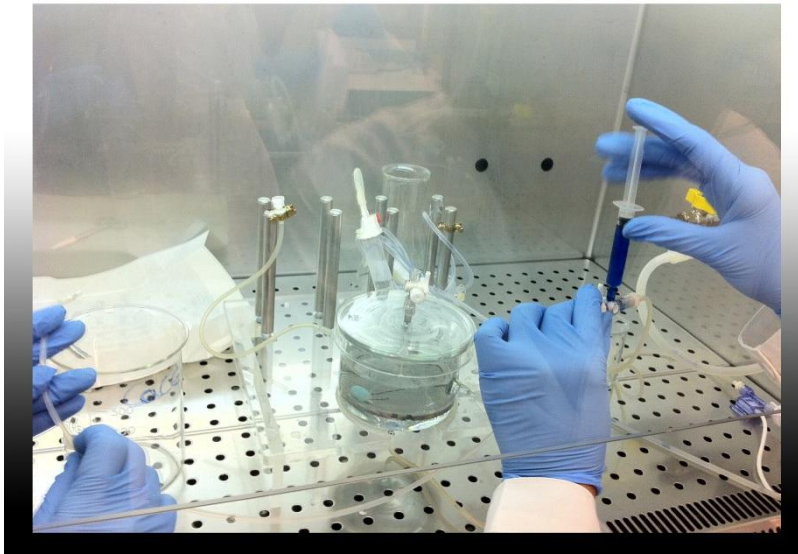


Figura 8.9 : L'iniezione del colorante all'interno del circuito appositamente dimensionato aumenta la riproducibilità degli esperimenti e offre maggior controllo delle pressioni

Aggiunta di un rubinetto a tre vie con un'uscita libera per l'interazione con il circuito: svuotamento e riempimento manuale dello stesso nei cambi delle soluzioni

L'importanza dello svuotamento e riempimento manuale del circuito è risultata evidente nel corso degli esperimenti. Un rubinetto a tre vie con un accesso libero è stato indispensabile per poter cambiare le soluzioni utilizzate nella decellularizzazione tanto quanto per fornire un sistema di sicurezza per il bilancio delle pressioni entro il circuito.

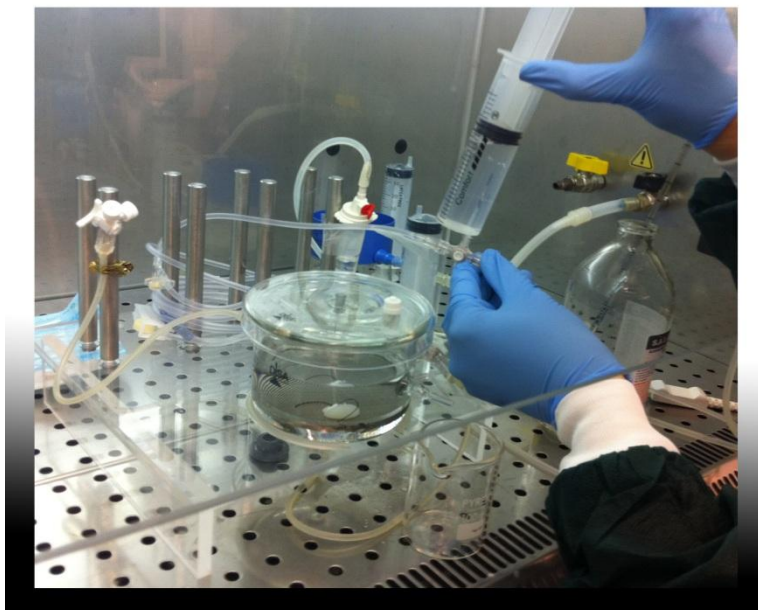


Figura 8.10 : Il riempimento del circuito è permesso dai rubinetti con uscite libere di sicurezza

Aumento della “compliance” del circuito, ottenibile tramite sostituzione di tubi con esistenti con altri a “compliance” maggiore oppure con inserimento in linea di una camera d'aria

Si è verificata l'efficacia del deflussore utilizzato come “compliance” all'interno del circuito.

L'attenuazione delle oscillazioni pressorie impresse dalla pompa peristaltica è stato evidente anche nel caso di utilizzo della modello di pompa con testina a due pistoni (con escursioni fino a 70 mmHg).

Tale oscillazione periodica è stata ridotta a pochi mmHg (per la portata di 0,5 mL/min), attenuazione ulteriormente regolabile aumentando la quantità d'aria.

La scelta di utilizzo di dispositivi monouso è risultata molto pratica al fine della sterilità. Tuttavia è risultato molto importante assicurarsi ad ogni montaggio o manipolazione, della pervietà della connessione tra l'ingresso del deflussore e il tubo "Masterflex": la collassabilità del circuito e la relativa ostruzione può danneggiare gravemente la matrice decellularizzata.

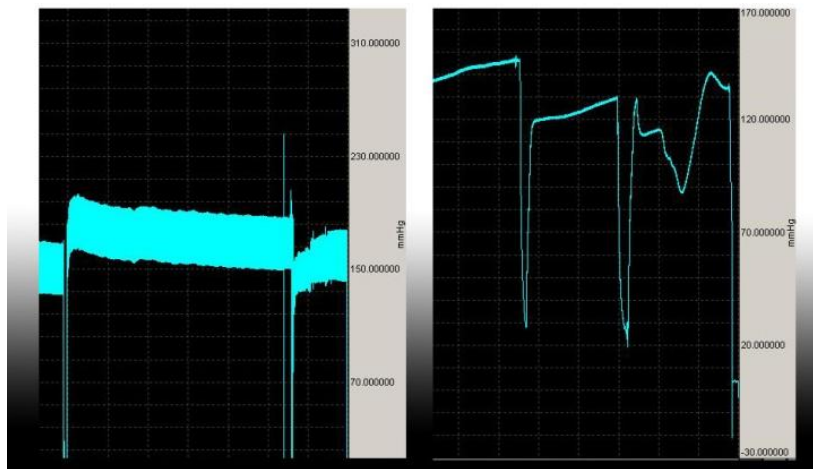


Figura 8.11 : Sbalzi di pressione precedenti all'inserimento nella linea di perfusione del deflussore come mezzo per aumentare la "compliance" del circuito

Inserimento di un elemento debollatore

La presenza del deflussore favorendo il bilancio pressorio contribuisce alla riduzione delle bolle presenti nel circuito a monte rispetto alla sua posizione.

Verifica dei requisiti per la strumentazione:

Reperibilità e costi sostenibili

La pompa peristaltica Masterflex digitale è ampiamente utilizzata nell'istituto di ricerca, pertanto in caso di guasti o manutenzione è facilmente sostituibile

Pompa peristaltica funzionante anche a flussi molto bassi e regolabile nelle variazioni di portata nell'ordine del decimo di ml/min

Le portata di funzionamento minima della pompa prescelta è quella di utilizzo, corrispondente a 0,5 mL/min; pertanto, in caso di esigenza di flussi minori, è necessario procedere con il cambiamento dei tubi utilizzati oppure gestendo una ramificazione del circuito opportunamente modificata per ottenere la partizione di portata desiderata

Sistema di acquisizione in grado di registrare anche per tempi prolungati il segnale di interesse e consentirne un'elaborazione

Il sistema di acquisizione “Biopac” può essere impostato per acquisizioni di durate illimitate, per eliminare i rischi di “black-out” che provochino la perdita dei dati è buona abitudine connettere l'alimentatore alle prese di sicurezza garantite dell'istituto.

Sistema di acquisizione multicanale, nell'ottica di aumentare il numero dei sensori in funzione dell'evoluzione della sperimentazione (ad es. un ossimetro a monte del rene)

Non si è aumentato il numero dei sensori in uso, tuttavia il sistema di acquisizione multicanale permette il rilievo di diversi segnali simultanei e visualizzabili parallelamente tramite l'interfaccia del software MP100.

Una opportunità altrettanto utile è la possibilità di sviluppare un sistema di circuiti paralleli per lo svolgimento di esperimenti simultanei.

A questo fine è necessario l'acquisto dei moduli d'acquisizione necessari per il collegamento parallelo.

Trasduttore di pressione affidabile, idoneo al “range” di pressioni di interesse: [-10mmHg, 200 mmHg], con minime non linearità e isteresi

Il trasduttore di pressione verifica i requisiti come verificato dalle calibrazioni effettuate.

L'acquisizione del segnale pressorio è affidabile a esclusione dei casi di presenza di bolle nel tubo di connessione al circuito, le quali alterano sensibilmente il risultato e i picchi di oscillazione del segnale. E' inoltre necessario evitare le condizioni di pressione eccessiva: valori maggiori di 350 mmHg possono provocare il danneggiamento del trasduttore stesso.

Questo incidente è avvenuto nelle prove di calibrazione effettuate nell'ottica di incannulare oltre all'arteria renale anche l'uretere. Tale procedimento prevede l'uso di cateteri di dimensione molto ridotta (PE10), la resistenza eccessiva ha causato pressioni superiori ai 600 mmHg.

Perciò nel caso di esperimenti di ricellularizzazione con flusso retrogrado attraverso l'uretere, il tipo di trasduttore non è utilizzabile.

8.2. Esiti degli esperimenti di decellularizzazione e ricellularizzazione

Si vogliono ora descrivere gli esiti degli esperimenti di decellularizzazione e ricellularizzazione. Gli esperimenti sono stati raggruppati con il criterio del protocollo di decellularizzazione utilizzato. Tuttavia, anche all'interno dello stesso gruppo gli esperimenti possono differire per il progetto sperimentale in base a cui sono stati svolti: per alcuni si è proseguita la sperimentazione con la fase successiva della ricellularizzazione, per altri si è utilizzata la tecnica di iniezione del colorante. In alcuni esperimenti svolti, invece si è solo applicato il protocollo per l'analisi della struttura della matrice extracellulare.

In questa sezione si vuole porre l'attenzione in particolar modo sull'esito della decellularizzazione, pertanto anche i dati relativi alla ricellularizzazione verranno interpretati come diretta conseguenza dei buoni o cattivi risultati della fase precedente.

8.2.1. Esperimenti realizzati con protocollo D1

Il protocollo ha una durata complessiva di 5 giorni (per la sola fase di

	TRATTAMENTO				RISULTATI											
	Tryton-Sali-DNase-SDS + lavaggi in H2O e PBS				P	EFFETTI MACROSCOPICI			INIEZIONE FLUIDO		CELLULE NEL FLUIDO			ANALISI COLORAZIONI		
	Accesso Aorta / Renale	COLORANTE	iniezione cell manuale statico	flusso 3mL/min	REGOLARE	SBIANCATO	CONSISTENTE	MANTIENE DIMENSIONE	ASSENZA PERDITE	RIEMPIMENTO COMPLETO	DOPO INIEZIONE	DOPO STATICO	DOPO FLUSSO	STRUTTURA INTEGRA	DECELL COMPLETA	PRESENZA NUOVE CELL
EXP 11	A	/	3h	60 h	trasdutt battaglia- rangoni	3	3	3	/	/	/	8 milioni 0	/	0	3	0
EXP 12	A	/	15h	/	trasdutt battaglia- rangoni	2	3	3	/	/	/	8 milioni 0	/	1	3	0
EXP 13	A	SI	/	/	0	3	3	3	0	0	/	/	/	/	/	/
EXP 14	R	SI	/	/	trasdutt battaglia- rangoni	2	3	3	2	1	/	/	/	/	/	/
EXP 15	R	/	30'	/	0	3	3	3	1	1	/	7 milioni 1	/	1	3	1
EXP 16	R	SI	/	/	1	3	3	3	0	2	/	/	/	1	3	/

Figura 8.12 : Tabella riassuntiva degli esperimenti di decellularizzazione e ricellularizzazione effettuati con protocollo D1

decellularizzazione) e associa detergenti di diversa natura: ionici, non ionici, enzimatici con buffer acidi e soluzioni ipertoniche. La tabella riportata sintetizza in modo molto semplificato l'esito degli esperimenti svolti con questo protocollo e i rispettivi trattamenti aggiuntivi.

I risultati sono stati in questa tabella valutati con un voto qualitativo da 0 a 3 crescente come metodo semplificato per confrontare dei parametri non quantificabili come effetti visivi e analisi delle colorazioni.

Anche l'andamento delle pressioni sono state confrontate come parametri qualitativi riassumendo nell'unico voto attribuito i parametri di ampiezza media delle oscillazioni, di valore medio, di massimo e di minimo rilevati, partendo sempre dal presupposto che i valori ottimali sono da farsi corrispondere a quelli fisiologici.

La valutazione è stata redatta retrospettivamente, cioè utilizzando come parametri di riferimento quelli migliori e peggiori di tutta l'attività sperimentale.

EXP 11-12

Gli esperimenti 11, 12, e 13 sono stati svolti con un incannulamento attraverso l'aorta, metodo sostituito con quello della arteria renale in funzione degli esiti scoraggianti a cui hanno portato.



Figura 8.13 : Rene decellularizzato e condizionato con terreno di coltura (exp.11) prima dell'iniezione di nuove cellule con protocollo R1

In particolare, gli esperimenti 11 e 12 sono stati condotti facendo seguire alla fase di decellularizzazione, quella di ricellularizzazione.

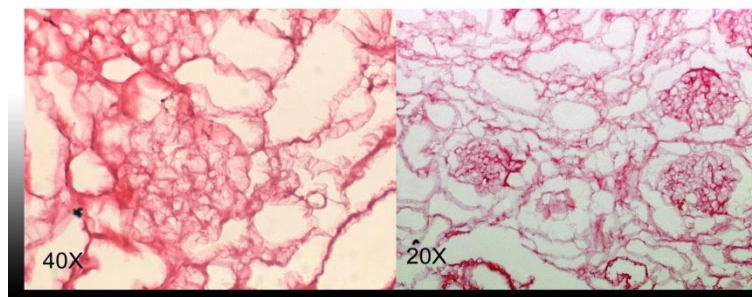


Figura 8.14 : Istologia con Ematossilina e Eosina a diversi ingrandimenti (exp 12)

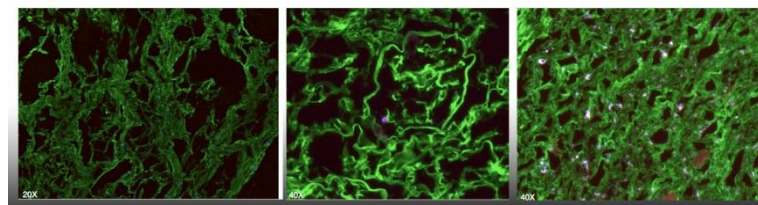


Figura 8.15 : Immagini di microscopia a fluorescenza; in verde è marcata la Lectina adesa alle proteine della matrice ECM, mentre in rosso sono visibili le poche cellule presenti marcate con PKH26 (exp.12)

Le indagini visive, durante tutta la sperimentazione, hanno rilevato lo sbiancamento avvenuto, il mantenimento della consistenza e delle dimensioni; tuttavia la successiva analisi delle immagini di microscopia delle colorazioni con “Ematossilina e Eosina” e quelle di immunofluorescenza con “Dapi”, “Lectina” e “PKH26” hanno mostrato una matrice molto danneggiata, con scarso mantenimento delle strutture glomerulari e ampie aree non colorate (assenza di collagene IV).

Inoltre dalle stesse immagini si è rilevata una bassissima presenza di cellule rimaste all'interno della struttura, come dimostrato anche dalle conte cellulari (effettuate con metodo statistico con camera di Burker su un'aliquota di terreno di coltura prelevato dalla camera) che hanno rilevato pressochè la totalità delle cellule nel fluido circostante il rene.

Le cellule sono quasi completamente assenti dalla zona glomerulare.

I risultati hanno messo in discussione in particolare modo la funzionalità del protocollo di decellularizzazione e il metodo di incannulamento.

EXP 13-14

Nell'ottica di poter chiarire il secondo punto, sono stati eseguiti i due esperimenti 13 e 14, in cui si è utilizzata la tecnica dell'iniezione di colorante per poter monitorare l'ingresso e la distribuzione dello stesso nell'organo già decellularizzato.

L'esperimento 13 è stato eseguito con incannulamento aortico; dopo la decellularizzazione, l'iniezione di colorante (Blu di Metilene 0,05%) ha evidenziato perdite importanti dal catetere in ingresso al rene, tali da impedire l'infusione del fluido nell'organo, che ha variato in modo minimo la sua colorazione. Le cause sono da imputarsi all'allentamento del filo di sutura, degradato dopo 5 giorni di immersioni e stress in ambienti aggressivi tanto quanto all'impossibilità di suturare tutte le diramazioni della grossa arteria in fase di prelievo del rene.

L'esperimento 14 è stato condotto con incannulamento dell'arteria renale, operazione più difficoltosa in fase di prelievo del rene, sia per la dimensione minore, sia per la differenza biologica tra gli animali, con distanze diverse tra le ramificazioni, che impone il rischio di occludere con l'ingresso del catetere l'ingresso ai vasi che irrorano intere porzioni di rene.

Si è ripetuta l'operazione di iniezione di colorante. Si è osservato che il fluido è entrato

nel rene, tuttavia la formazione di perforazioni e danni a carico della struttura proteica hanno impedito la completa colorazione dell'organo.

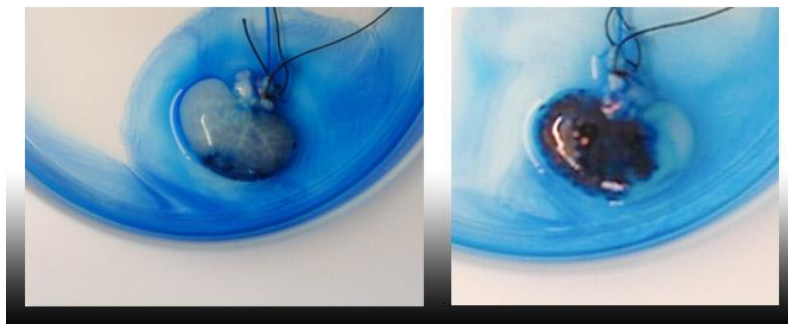


Figura 8.16 : Iniezione del colorante; colorazione parziale del rene (exp 14)

EXP 15

Nell'esperimento 15 dopo la decellularizzazione si è eseguita la fase di ricellularizzazione, con 30 minuti di statico e senza flusso successivo, per evitare di aggiungere una potenziale causa di fuoriuscita delle cellule. 7 degli 8 milioni di cellule iniettate sono state rilevate nel fluido (con la conta con camera di Burker); dalle immagini di microscopia in fluorescenza per Lectina, Dapi e PHK26 si sono potute osservare pochissime cellule all'interno della matrice, principalmente localizzate nei grandi vasi o in aree danneggiate della struttura proteica. La matrice appare danneggiata, si riconoscono difficilmente le strutture glomerulari.

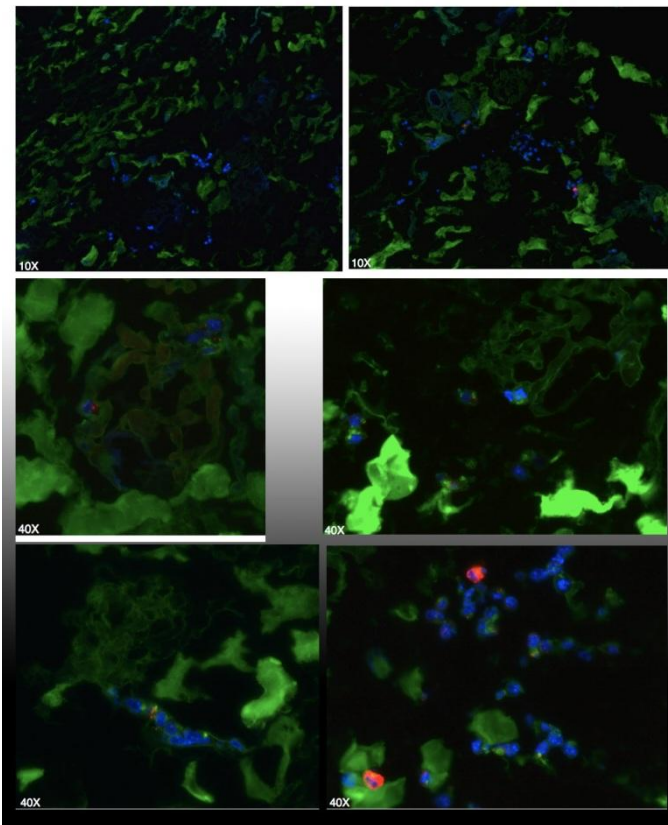


Figura 8.17 : Immagini di microscopia a fluorescenza a 10X e 40X in verde si osserva la matrice ECM marcata con Lectina, in blu i nuclei cellulari marcati con Dapi (exp15)

L'evidenza del danno a carico della matrice, conseguente al miglioramento dell'efficacia dell'incannulamento tramite arteria renale e quindi alla maggior perfusione del rene, ha accentuato i dubbi sulla eccessiva aggressività del protocollo.

EXP 16

L'esperimento 16 è stato svolto con lo scopo di verificare l'effettivo danno apportato alla matrice dalle singole soluzioni utilizzate durante il processo; per farlo si sono replicate le operazioni di iniezione di colorante (monitorate con dei filmati), dopo ogni fase della decellularizzazione.

Si è rilevata una iniziale perdita di fluido attraverso la membrana dopo la prima infusione di Tryton X-100, dopo l'utilizzo di DNAsi le perdite sono minimamente incrementate; dopo una nuova infusione di Tryton X-100 si osservano molte perdite ed infine, al termine dei lavaggi con SDS, il rene è completamente danneggiato.

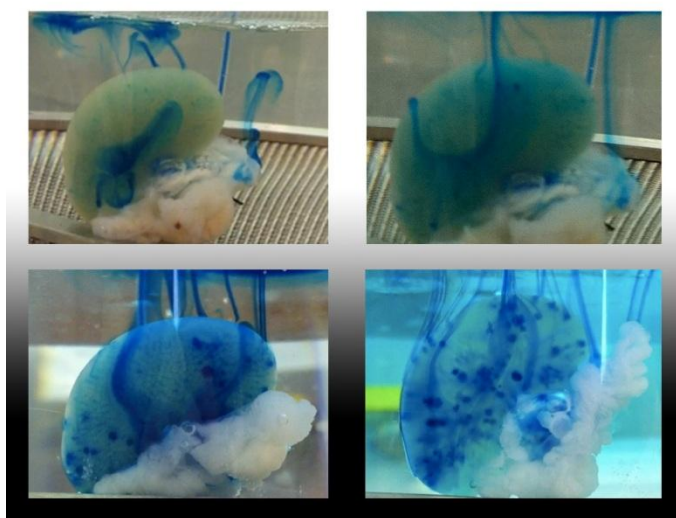


Figura 8.18 : Immagini di monitoraggio dell'infusione di colorante nel rene, (exp 16), dopo ogni soluzione decellularizzante del protocollo D1. Si notano le molteplici perdite indice del danno arrecato da ogni detergente

In base a quanto osservato, si è potuto confermare che la decellularizzazione svolta con il protocollo D1 permette di ottenere dei reni all'apparenza completamente decellularizzati, come confermato dall'assenza di fluorescenza blu del Dapi (per gli esperimenti svolti senza ricellularizzazione) compatibile solo con la totale assenza di materiale nucleare residuo.

L'aspetto degli organi trattati con questo protocollo, a fine decellularizzazione (senza iniezione di colorante) appare completamente trasparente, con la visibilità delle ramificazioni interne dei vasi;

nonostante il mantenimento della consistenza e delle dimensioni tuttavia le matrici extracellulari sono molto danneggiate, perdendo gran parte della morfologia interna e spesso mostrando delle perforazioni della membrana, che impediscono al flusso successivamente perfuso di entrare nel rene in modo omogeneo.



Figura 8.19-8.20: Aspetto del rene rispettivamente decellularizzato con protocollo D1 e in seguito all'iniezione di colorante (exp 16). Si notano i vasi all'interno della matrice proteica.

Anche i tracciati di pressione registrati con il sistema Biopac e MP100 mostrano degli andamenti non regolari della stessa, caratterizzati da valori troppo alti, distanti da quelli fisiologici; questi possono contribuire all'aggressività del protocollo e a danneggiare la matrice extracellulare.

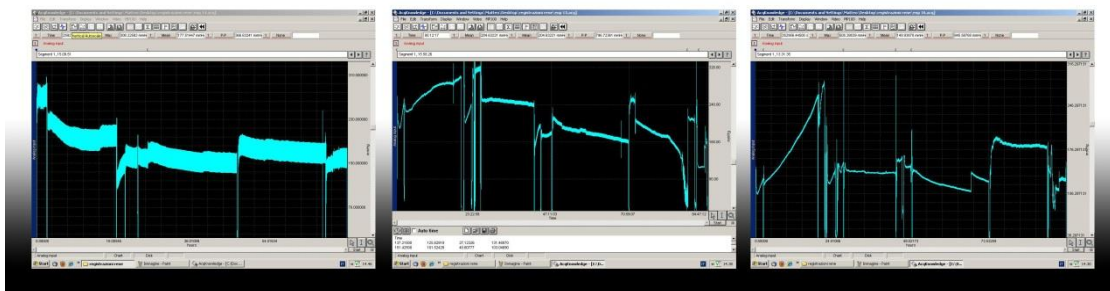


Figura 8.21 : Tracciati di pressione registrati nel corso degli esperimenti 13, 15 e 16. Si nota un pattern comune imposto dal cambio delle soluzioni come previsto dal protocollo. Lo spessore dei tratti indicat'ampiezza delle oscillazioni di pressione

Si nota inoltre la diminuzione della pressione al procedere della perfusione: a parità portata, di soluzione (di viscosità, Tryton X-100, applicato in due momenti diversi) e di circuito, la pressione varia in funzione della resistenza offerta dal rene. Questa è indicativa del grado di decellularizzazione e di degradazione della matrice.

I tracciati mostrano aree distinte in corrispondenza dei detergenti utilizzati, ad eccezione di artefatti legati alle operazioni straordinarie quali la movimentazione del trasduttore, la formazione di bolle d'aria nel tubo di raccordo dello stesso o esclusione tramite chiusura dell'uscita del rubinetto a tre vie Luer-Lock che lo collega, si evidenziano per ognuna di queste aree delle fasi iniziali a derivata positiva (potenzialmente corrispondente alla collassabilità dei vasi interni al rene dopo ogni cambio). Si è evidenziata una correlazione tra la degradazione della matrice e il rapido raggiungimento di valori eccessivamente alti nella fase iniziale della perfusione con una soluzione.

Per verificare l'ipotesi dell'eccessiva aggressività dei detergenti utilizzati come causa della scarsa integrità della matrice ottenuta e quindi del fallimento della ricellularizzazione si sono svolti esperimenti successivi con altri protocolli.

8.2.2. Esperimenti realizzati con protocollo D2

Il protocollo ha una durata di soli 2 giorni, favorendo la versatilità e l'aumento degli esperimenti eseguiti, con un conseguente incremento della significatività statistica dei risultati.

Prevede l'utilizzo di un solo detergente di tipo ionico, l'SDS, positivamente valutato dai lavori scientifici presenti in letteratura

Lo stesso detergente, presente nel protocollo D1, con il quale si è al contrario dimostrato danneggiare la matrice, è stato introdotto in concentrazioni ridotte di 4 volte nel protocollo D2.

La tabella riportata sintetizza in modo molto semplificato l'esito degli esperimenti svolti con questo protocollo e i rispettivi trattamenti aggiuntivi.

	TRATTAMENTO				RISULTATI												
	SDS 1% + LAVAGGI				P	EFFETTI MACROSCOPICI			INIEZIONE FLUIDO		CELLULE NEL FLUIDO			ANALISI COLORAZIONI			
	DNasi	COLORANTE	iniezione cellule		REGOLARE	SBIANCATO	CONSISTENTE	MANTIENE DIMENSIONE	ASSENZA PERDITE RIEMPIMENTO COMPLETO	DOPO INIEZIONE	DOPO STATICO	DOPO FLUSSO	STRUTTURA INTEGRA	DECELL. COMPLETA	PRESENZA NUOVE CELL		
EXP 17	/	SI	/	/	1	3	3	3	3	3	/	/	/	2	2	/	lectina rodam
EXP 18	/	SI	/	/	3	3	3	3	2	3	/	/	/	1	2	/	
EXP 19	/	SI	/	/	1	3	3	3	2	1	/	/	/	2	2	/	
EXP 20	/	/	30'	/	3	3	3	3	3	2	⁶⁰⁰⁰⁰⁰ 2	/	/	3	2	2	
EXP 21	/	/	/	/	2	2	3	3	/	/	/	/	/	3	1	/	
EXP 22	/	/	/	/	2	0	3	3	/	/	/	/	/	/	/	/	bloc
EXP 23	/	/	15h	30'	1	3	3	3	/	/	⁶⁰⁰⁰⁰⁰ 2	/	⁰ 3	1	2	1	
EXP 24	/	/	/	/	3	3	3	3	/	/	/	/	/	2	0	/	
EXP 25	/	/	/	/	1	0	3	3	/	/	/	/	/	3	1	/	bloc
EXP 30	/	/	3h	/	3	3	3	3	/	/	⁰ 3	⁶⁰⁰⁰⁰⁰ 2	/	3	2	3	
EXP 31	/	/	/	/	3	1	3	3	/	/	/	/	/	/	/	/	µtac
EXP 32	/	/	/	/	3	3	3	3	/	/	/	/	/	/	/	/	essic

Figura 8.22 : Tabella riassuntiva degli esperimenti effettuati con protocollo di decellularizzazione D2

Per la lettura dei dati valgono le indicazioni esposte nel paragrafo 8.2.1 relativi all'immagine 8.12

EXP 17-18-19

Gli esperimenti 17, 18 e 19 sono stati eseguiti allo scopo di analizzare la struttura della matrice extracellulare decellularizzata con il seguente protocollo e verificare l'integrità prima di poter proseguire con la fase di ricellularizzazione.

Le analisi visive, di microscopia in fluorescenza e di iniezione di colorante hanno fornito risultati positivi, benchè i traccati delle pressioni siano risultati ancora parzialmente regolari. L'esame visivo è risultato molto positivo per tutti i 3 esperimenti, per sbiancamento completo e mantenimento della consistenza e della dimensione complessiva del rene.

Anche l'esame di iniezione del colorante (1,8 mL di blu di metilene 0,05%) successiva alla perfusione del detergente ha conseguito esiti migliori rispetto a quelli precedenti: nell'esperimento 17 non si sono rilevate perdite nel rene e si è ottenuto il completo riempimento dello stesso, potendo monitorare al passare dei minuti il passaggio del colorante nei vasi superficiali.

Gli esperimenti 18 e 19 hanno mostrato un riempimento lievemente meno efficace, seppure con perdite decisamente inferiori in numero e in portata di liquido uscente rispetto a quanto osservato per il precedente protocollo.

L'infusione di colorante è stata effettuata con due criteri diversi: per l'esperimento 17 in modo manuale, per i successivi utilizzando la metodica "Infusione di colorante" esposta nel paragrafo 7.2.4.

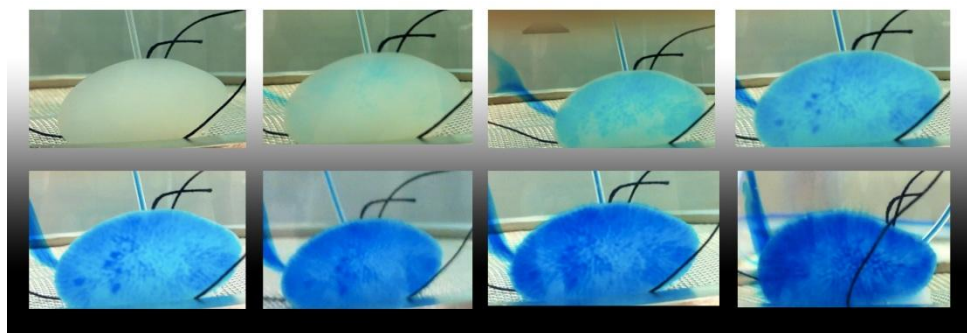


Figura 8.23: Immagini tratte dal filmato di monitoraggio dell'iniezione di colorante (exp 17)

Come si può notare dalle immagini, il rene mostra la pervietà della vena renale che costituisce la via di uscita del liquido. L'assenza di perdite attraverso la matrice esterna indica una buona preservazione del sistema vascolare all'interno dell'organo decellularizzato.

Si nota il riempimento omogeneo della struttura, ad indicare che non si sono occlusioni di vasi con corrispondente impedimento di perfusione delle aree a valle di queste.

Si osserva inoltre nelle ultime fasi del riempimento, la formazioni di flussi attraverso i micropori presenti sulla superficie esterna; questa condizioni non sempre presente negli esperimenti è stata associata al distacco opzionale della capsula renale e della membrana adiposa, con l'esposizione sulla superficie esterna dei capillari che fisiologicamente le irrorano.

Una ulteriore dimostrazione della buona perfusione del fluido all'interno del rene è l'eliminazione pressoché completa del colorante dopo i lavaggi in circuito aperto con acqua deionizzata.

L'aspetto del rene a fine trattamento ha omogeneamente riacquisito il colorito bianco a meno di lievi aloni interni.



Figura 8.24 : Efficacia dei lavaggi in circuito aperto nella rimozione pressoché completa del blu di Metilene utilizzato come colorante. Innagini dello stesso rene prima e dopo i lavaggi con acqua sterile (exp.17)

Le analisi delle strutture micrometriche effettuate con immagini di microscopia in fluorescenza mostrano un buon mantenimento della morfologia della matrice proteica, con preservazione dei glomeruli.

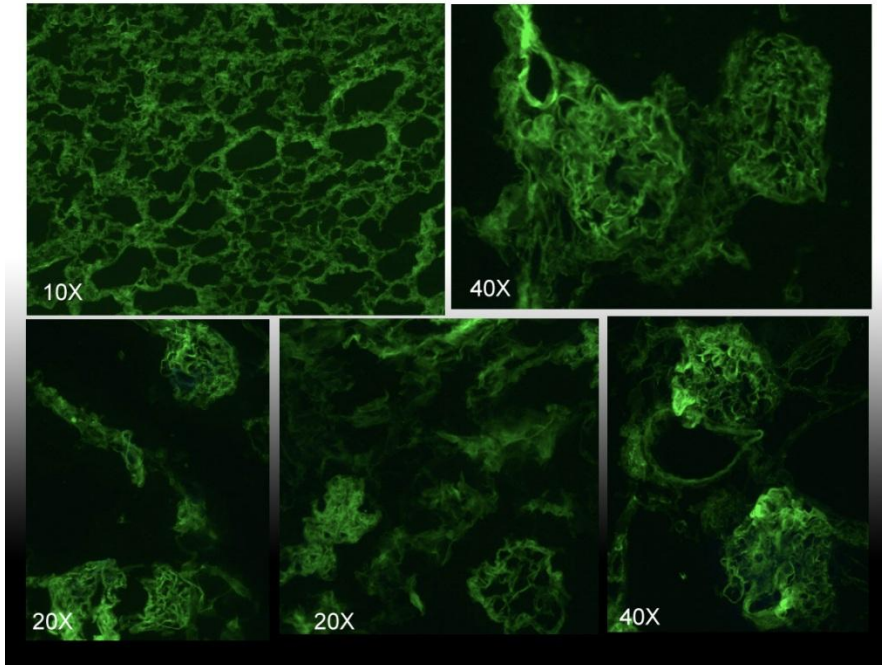


Figura 8.25 :Immagini a diversi ingrandimenti di microscopia a fluorescenza per l'analisi della matrice (in verde si nota la Lectina legata al collagene). Si osserva un buon mantenimento della struttura (exp 18)

Dalle immagini effettuate a diversi ingrandimenti con fluorescenza a tre canali di Dapi e Lectina si nota il mantenimento della complessa struttura glomerulare (fluorescenza verde della Lectina legata al collagene di tipo IV) e l'assenza di fluorescenza blu del Dapi (che rileverebbe la presenza di residui di acidi nucleici).

L'analisi dei tracciati pressori mostra tuttavia delle irregolarità non confermate dalle indagini microscopiche della matrice (nel caso degli esperimenti 17 e 19).

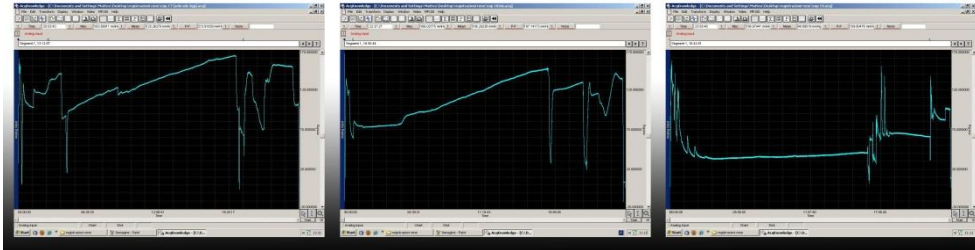


Figura 8.26 : Tracciati di pressione rispettivamente degli esperimenti 17, 18, 19

In particolare, i valori raggiunti non rientrano in quelli fisiologici per i primi due esperimenti, mentre si mantengono eccessivamente bassi per il terzo caso. E' da notare che a tutti i valori va sottratta la perdita di carico determinata in fase di calibrazione del sistema, pari a 10 mmHg per la portata perfusa di 0,5 mL/min.

PERDITE DI CARICO SISTEMA / PORTATE

CALIBRO 13		Trasduttore tarato a : 0,024 V=0 mmHg 0,4721V =73,55 mmHg		PRES LETTE CON CATETERE		PRESS SENZA CATETERE	
FLUSSO	Flusso reale			P media	P-P medio	P media	
impostato	mL/min						
1	0,5mL/min			10 mmHg		3,7 mmHg	
2	2ml/ 2min		1	14,2 mmHg		7 mmHg	
5	5,5 ml/3		2,17	23,72 mmHg		12,9 mmHg	
	14,5 ml			48 mmHg		29 mmHg	
	28ml			95 mmHg		1,4 64,5 mmHg	
	3 12ml			145 mmHg		1,65 100,8 mmHg	
	4 16ml			200 mmHg		2 147,2 mmHg	
	5 20,5 ml			261,5 mmHg		7 186,32 mmHg	
	6 24 ml			315,5 mmHg		2 236,55 mmHg	

Figura 8.27 : Tabella rappresentativa delle perdite di carico al variare della portata e dal sistema utilizzato (ricavata sperimentalmente con i sistemi di calibrazione del circuito)

EXP 20

L'esperimento successivo è stato eseguito con lo scopo di valutare la distribuzione delle cellule iniettate. Si è pertanto svolto senza iniezione di colorante e con protocollo di ricellularizzazione R2,

si è effettuata un'incubazione statica di 30 minuti senza flusso.

Un'analisi visiva ha confermato le caratteristiche positive degli esperimenti 17, 18, 19.

Una prova di iniezione del terreno di coltura, (meno evidente del blu di metilene nel

processo convettivo nei vasi) ha mostrato l'assenza di perdite attraverso la matrice, anche se il riempimento dell'organo non è risultato omogeneo.

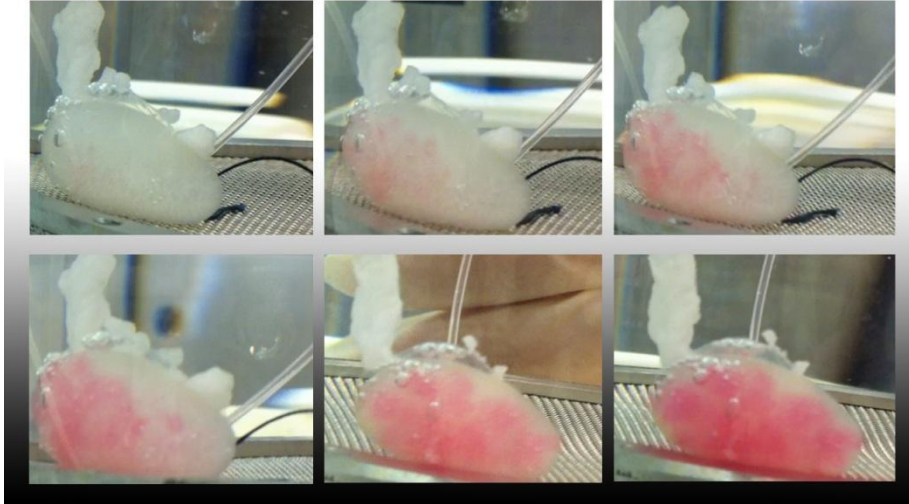


Figura 8.28 : iniezione di terreno di coltura, monitoraggio della diffusione dello stesso nel rene e del riempimento

Le analisi delle immagini rilevate in microscopia a fluorescenza per Dapi, Lectina e PKH26 hanno mostrato una struttura della matrice completamente conservata e una presenza delle nuove cellule (riconosciute per la doppia fluorescenza in rosso e in blu del PKH26 e del Dapi rispettivamente) molto numerosa.

Si è rilevata tuttavia anche la presenza di aloni blu lievemente presenti in alcune regioni del rene. Questo denota la presenza di frammenti nucleari sparsi nella matrice; non è possibile in questa fase determinare l'appartenenza alle cellule d'origine o a quelle di nuovo inserimento, dal momento che il PKH26 è un marcatore di proteine della membrana e non di elementi nucleari.

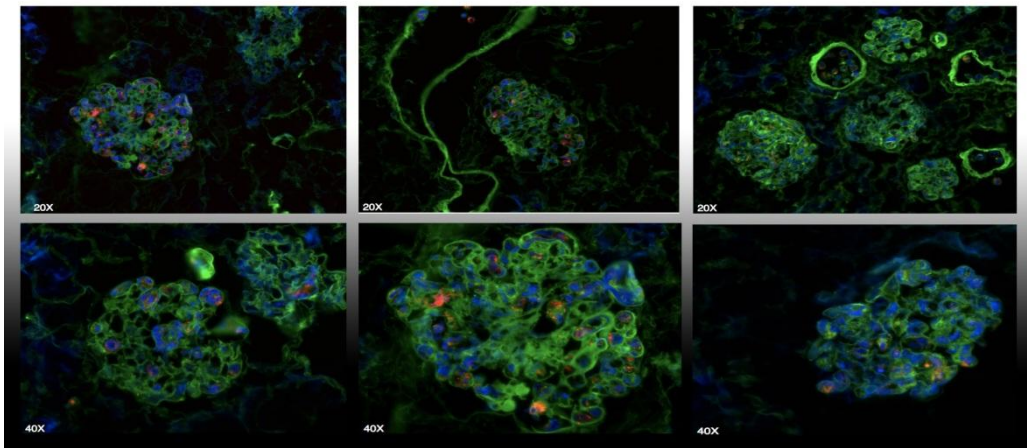


Figura 8.29 : Immagini di microscopia a immunofluorescenza a diversi ingrandimenti di alcune strutture glomerulari : si nota la matrice perfettamente conservata e la numerosità delle nuove cellule iniettate (exp 20)

Come si può notare dagli ingrandimenti a 20X e 40X, le strutture glomerulari sono perfettamente mantenute e contengono molte cellule di nuova immissione. La fluorescenza blu del Dapi ha una lieve predominanza su quella rossa del PKH26, tuttavia è riconoscibile la presenza delle sole nuove cellule nei glomeruli.

Anche nelle sezioni dei vasi si possono notare le cellule di nuova immissione, non fuoriuscite anche se impossibilitate ad aderire per l'assenza del flusso successivo.

In ulteriori ingrandimenti si nota l'assenza delle cellule dalle aree tubulari, ad indicare una corretta filtrazione da parte del glomerulo che ne prevede l'integrità morfologica.

L'analisi del tracciato di pressione dell'esperimento mostra dei valori leggermente inferiori a quelli fisiologici per tutta la fase di decellularizzazione.

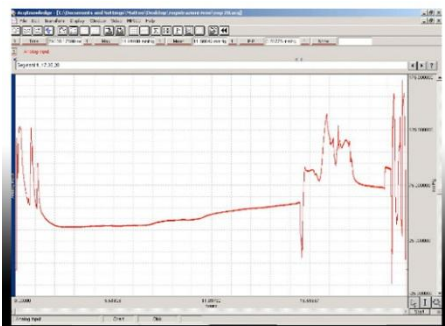


Figura 8.30 : Tracciato di pressione relativo all'esperimento 20

La notevole presenza delle cellule nuove all'interno del rene è stata confermata anche dai dati della conta cellulare con camera di Burker dopo l'iniezione

EXP 21-22-24-25

Quattro degli esperimenti svolti successivamente sono stati organizzati al fine di confermare l'integrità della struttura e la completa decellularizzazione, messa in discussione dalla presenza degli aloni blu in zone della matrice; pertanto gli esperimenti 21, 22, 24 e 25 sono stati condotti senza iniezione di colorante né di cellule.

Due di questi, il 22 e il 25 sono stati interrotti per il mancato sbiancamento dopo le 17 ore di perfusione con SDS, corrispondente alla mancata decellularizzazione.

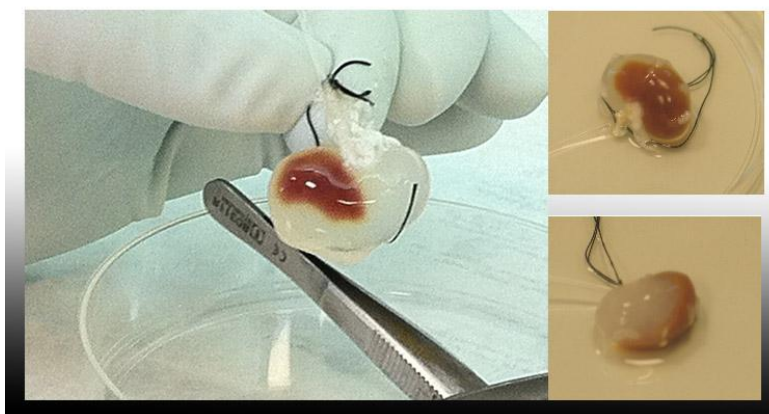


Figura 8.31 : Aspetto di un rene non completamente decellularizzato a causa di un'ostruzione dei vasi che irrorano una regione intera della corteccia; si può attribuire la il problema ad un errore di incannulamento

Gli esperimenti 21 e 22, al contrario hanno mostrato delle ottime caratteristiche visive in termini di sbiancamento e mantenimento di consistenza e dimensione; le analisi delle immagini di microscopia a fluorescenza hanno mostrato delle strutture micrometriche perfettamente integre, la morfologia e dei glomeruli correttamente mantenuta in tutte le regioni delle sezioni analizzate.

Tuttavia, come si può notare dalle immagini, la fluorescenza blu del Dapi, indice dei residui di materiale nucleare delle cellule originarie del rene è presente in ampie aree diffuse su gran parte delle sezioni.

La presenza degli aloni conferma l'ipotesi della decellularizzazione non completamente avvenuta; con questi esperimenti si dimostra che i frammenti di materiale nucleare non sono da attribuirsi alle cellule di nuova immissione (non presenti in queste prove).

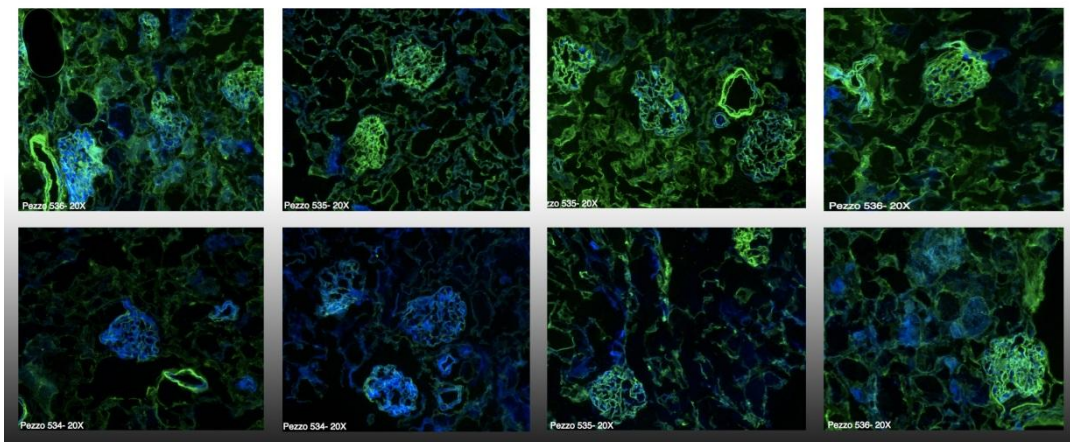


Figura 8.32 : Immagini di microscopia a fluorescenza; si osserva in verde la matrice ECM marcata con la Lectina, in blu la massa di presenza di materiale nucleare non rimosso e evidenziato dal Dapi (exp 21)

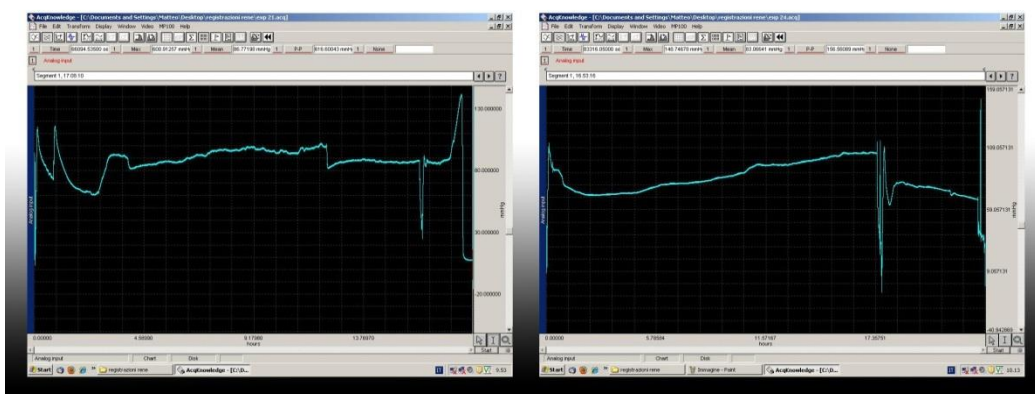


Figura 8.33 : Tracciati di pressione degli esperimenti 21 e 24

I tracciati di pressione rilevati nel corso degli esperimenti non hanno mostrato delle anomalie e si sono mantenuti in un intervallo di valori fisiologici (valore medio e picchi massimi).

EXP 23

L'esperimento intermedio tra questi, il 23 è stato condotto con fase di ricellularizzazione, per avvalorare statisticamente i buoni risultati dell'esperimento 20 e aggiungendo la variabile del flusso successivo all'incubazione statica di 15 ore.

Le proprietà visive del rene sono state mantenute positive, ottimi risultati di sbiancamento e di mantenimento di consistenza e di dimensione dopo la fase di decellularizzazione.

Sono state effettuate le conte cellulari in un'aliquota di terreno di coltura circostante il rene dopo l'iniezione di cellule e dopo il flusso; i risultati sono stati di 600 000 cellule degli 8 milioni immesse immediatamente prima dell'incubazione e 0 cellule rilevate dopo il flusso.

Questi dati sono stati confermati dalla presenza delle cellule all'interno della matrice come dimostrato dalle immagini di microscopia a fluorescenza (con Dapi, Lectina e PKH26), tuttavia la distribuzione delle stesse nelle sezioni non è omogenea.

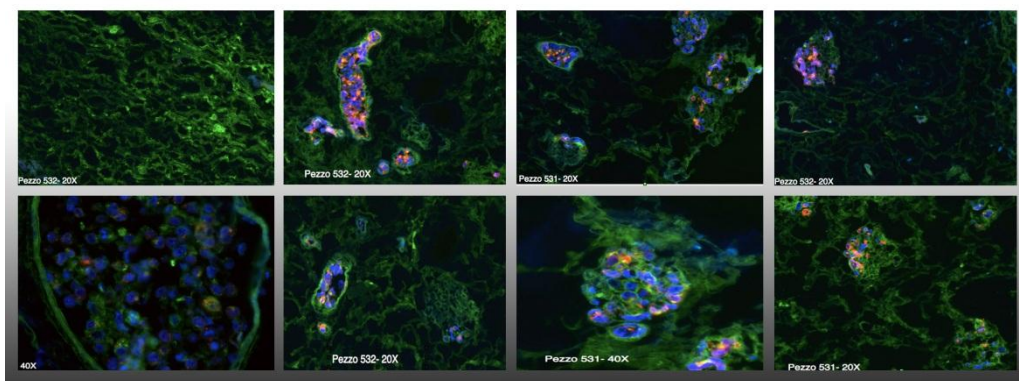


Figura 8.34 : Immagine di microscopia a fluorescenza a diversi ingrandimenti; si nota un mantenimento corretto della matrice extracellulare e una buona numerosità cellulare. La distribuzione delle cellule tuttavia non risulta omogenea (exp 23).

La presenza cellulare non è distribuita omogeneamente in tutte le strutture glomerulari.

Si rileva una forte presenza cellulare all'interno dei vasi.

La matrice, come mostrato dalla fluorescenza verde della Lectina legata al collagene di tipo IV è perfettamente mantenuta.

Si rilevano ancora degli aloni in fluorescenza blu che indicano frammenti di materiale nucleare in alcune aree della matrice.

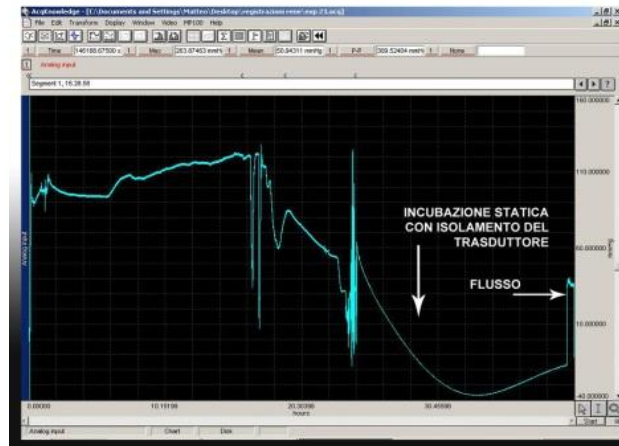


Figura 8.35 : Tracciato di pressione relativo all'esperienza 23; si notano numerosi artefatti legati alle manipolazioni del circuito

Il tracciato di pressione contiene molti artefatti da movimento, tuttavia i valori si mantengono in un intervallo fisiologico.

EXP 30

L'esperienza seguente svolta con il protocollo D2, cronologicamente successivo a quattro esperienze condotti con i protocolli D3 e D4, l'esperienza 30, ha previsto nuovamente la fase di ricellularizzazione. In questo caso si è posta particolare attenzione alla formazione di bolle d'aria e all'andamento della pressione, apportando le ultime modifiche alle procedure esposte nel capitolo 7, al fine di rendere quanto possibile controllati questi fattori.

Si sono iniettate le cellule con protocollo R2 e si è effettuata un'incubazione di 3 ore senza flusso successivo, allo scopo di verificare la sola distribuzione delle cellule iniettate.

Ancora una volta l'analisi visiva ha mostrato ottimi risultati per lo sbiancamento e per il mantenimento della consistenza e della dimensione.

L'integrità della struttura è stata dimostrata con le analisi di microscopia in fluorescenza e dalle colorazioni istologiche con Ematossilina e Eosina.

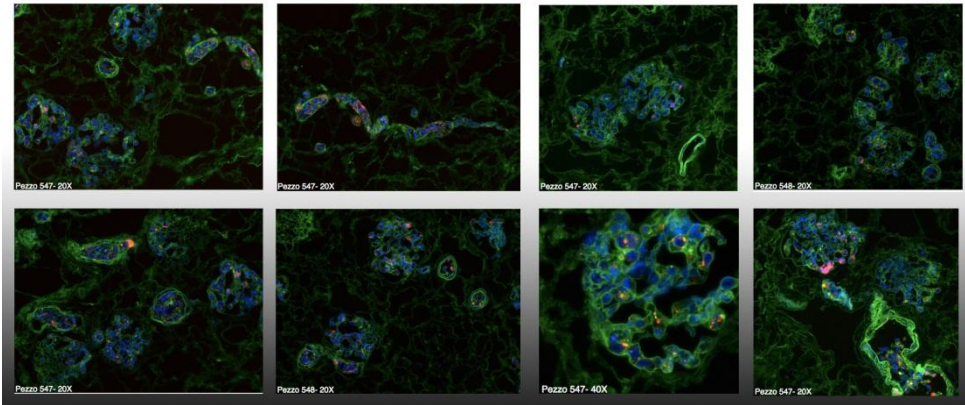


Figura 8.35 : Immagini di microscopia a fluorescenza a diversi ingrandimenti; si nota l'abbondanza e l'omogeneità di cellule di nuova immissione in tutte le strutture della matrice extracellulare ben conservata. Si può osservare la numerosità cellulare nei glomeruli e nei vasi adiacenti (exp 30)

Con le stesse analisi si è rilevata una distribuzione omogenea e consistente di cellule di nuova immissione. Le cellule sono abbondantemente presenti in quasi tutti i glomeruli.

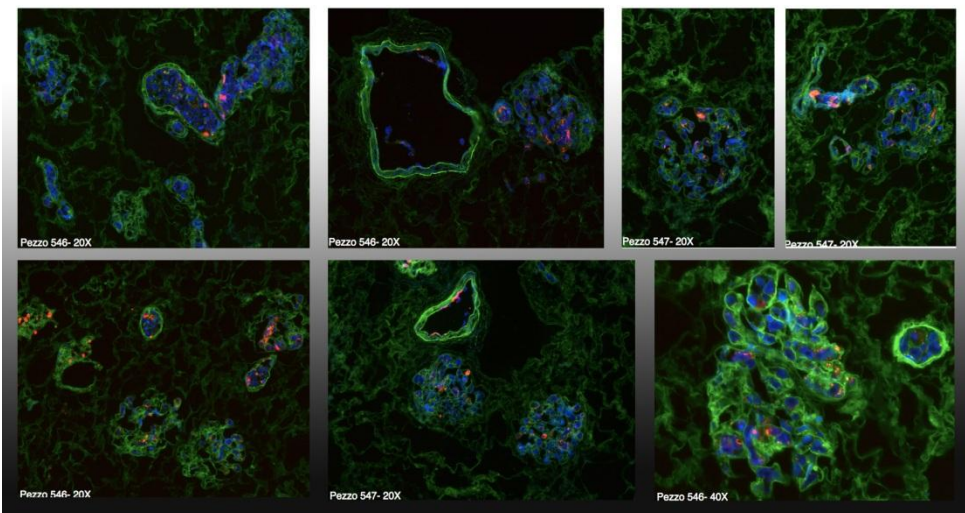


Figura 8.36 : Immagini di microscopia a fluorescenza a diversi ingrandimenti. Si può notare la struttura perfettamente conservata dei grossi vasi così come quelle glomerulari. Non si notano cellule nei tubuli adiacenti. Non si rileva la presenza di aloni blu indicativi di residui genetici precedenti all'immissione delle nuove cellule (exp.30)

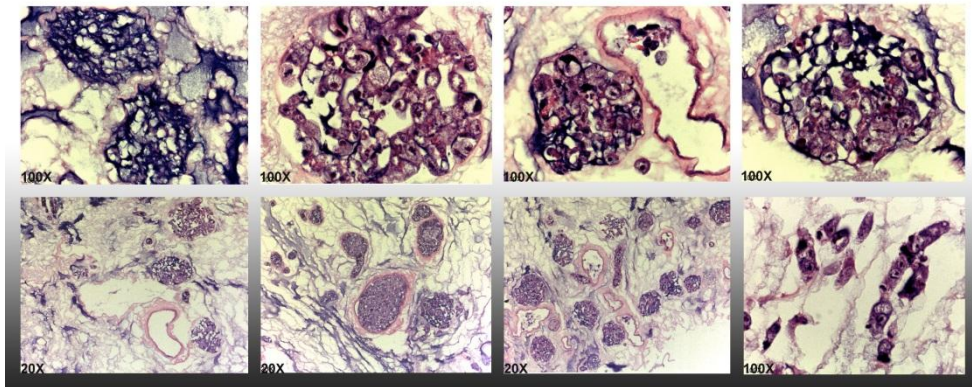


Figura 8.37 : Immagini di immunoistochimica; la marcatura con Ematossilina evidenzia l'omogeneità e l'abbondanza delle cellule all'interno dei glomeruli, l'Eosina indica una matrice perfettamente conservata (exp 30)

Dalle immagini sia di immunofluorescenza sia di immunoistochimica si nota una densità molto alta di cellule anche distribuite anche nelle arterie e arteriole renali. I glomeruli sono perfettamente conservati (confrontabili con le immagini dei campioni di controllo non decellularizzati).

Non si rilevano cellule nell'area midollare né nei tubuli, ad indicare una volta in più l'integrità della fine struttura glomerulare.

La presenza di residui genetici o detriti delle cellule precedenti non è evidenziata dalle colorazioni.

L'analisi del tracciato di pressione dell'esperimento 30 mostra un comportamento regolare e con valori fisiologici, in linea con i parametri osservati di volta in volta nel corso dell'esperimento a partire dalle fasi di sbiancamento.

I risultati ottenuti dall'esperimento 30 possono ritenersi il “golden standard” delle prove di decellularizzazione e ricellularizzazione.

EXP 31-32

I due esperimenti successivi condotti con protocollo di decellularizzazione D2 sono stati svolti senza indagini di iniezione colorante o ricellularizzazione: l'esperimento 31 è stato utilizzato per delle analisi post-decellularizzazione con microtac, pertanto gli è stato iniettato del mezzo di contrasto (Ioxolo) tramite pompa a siringa ad un flusso pari a 0.2 mL/min in fase di scansione dinamica.

L'esperimento 32 invece è stato utilizzato per le prove di essiccazione della matrice e pesato con una bilancia di precisione, come criterio sperimentale per valutare il mantenimento della matrice proteica.



Figura 8.38 : Rene decellularizzato prima e dopo il sezionamento per le prove di essiccazione

Di entrambi gli esperimenti sono disponibili i risultati delle indagini visive e dei traccati pressori, regolari in entrambi i casi.

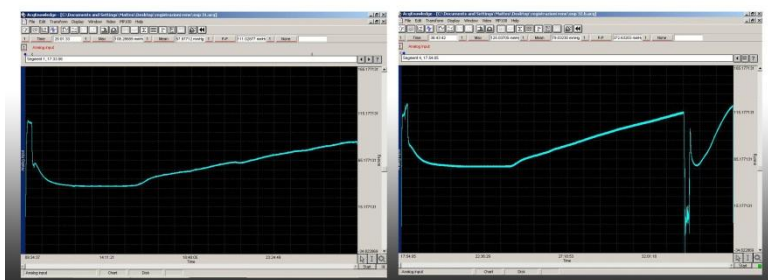


Figura 8.39 : Traccati di pressione molto regolari relativi agli esperimenti di decellularizzazione 31 e 32

8.2.3. Esperimenti realizzati con protocollo D3

Il protocollo D3 è nato dalle osservazioni delle immagini di immunofluorescenza rilevate negli esperimenti svolti con protocollo D2, per cui è risultata presente una quantità imprecisata e variabile di frammenti di acidi nucleici, marcati attraverso il Dapi.

Per poter confermare la causa della fluorescenza blu in materiale nucleare residuo e per offrire una potenziale soluzione per la sua eventuale rimozione, si è scelto di aggiungere al protocollo una soluzione enzimatica specifica per gli acidi nucleici: la DNAsi.

Come nel protocollo D1 si è scelto di utilizzarla con buffer acido, composto da un tris di sali (NaCl, CH₃COONa e MgCl₂) in acqua distillata portati a pH 5.

La durata della sperimentazione con questo protocollo è di 2 giorni, con sole due ore di perfusione con soluzione di DNAsi allo 0.0025%.

La tabella riportata sintetizza in modo molto semplificato l'esito degli esperimenti svolti con questo protocollo e i rispettivi trattamenti aggiuntivi.

	TRATTAMENTO				RISULTATI											
	SDS 1% + LAVAGGI				P	EFFETTI MACROSCOPICI				INIEZIONE FLUIDO		CELLULE NEL FLUIDO		ANALISI COLORAZIONI		
	DNAsi	COLORANTE	iniezione cellule			REGOLARE	SBIANCATO	CONSISTENTE	MANTIENE DIMENSIONE	ASSENZA PERDITE	RIEMPIMENTO COMPLETO	DOPO INIEZIONE	DOPO STATICO	DOPO FLUSSO	STRUTTURA INTEGRA	DECELL COMPLETA
EXP 26	acida	/	3h	30'	1	3	1	1	/	/	/	/	8milioni 0	3	3	1
EXP 27	acida	SI	/	/	1	2	1	1	1	1	/	/	/	3	3	/
EXP 28	acida	/	15h	30'	2	3	1	1	2	2	700000 2	/	300000 2	3	3	1

Figura 8.40 : Tabella riassuntiva degli esperimenti svolti con protocollo D3

Per la lettura dei dati valgono le indicazioni espote nel paragrafo 8.2.1 relativi all'immagine 8.12.

EXP 26-28

Gli esperimenti 26 e 28 sono stati condotti facendo seguire alla fase di decellularizzazione quella di ricellularizzazione con protocollo R2. In entrambi i casi si è somministrato un flusso dopo la fase di incubazione statica (statico di durata di 3 ore per l'esperimento 26 e di 15 ore per il 28).

Le cellule sono state iniettate dopo abbondanti lavaggi in circuito aperto con acqua sterile per eliminare i residui tossici per le cellule della soluzione di DNAsi e dopo condizionamento della matrice con antibiotici e terreno di coltura.

Dopo la fase di decellularizzazione, in entrambi i casi si sono rilevate ad una prima analisi visiva la perdita di consistenza e la riduzione notevole delle dimensioni del rene. Entrambi hanno mostrato un completo sbiancamento.

Per l'esperimento 28, prima del condizionamento a mezzo di perfusione di terreno di coltura, lo stesso è stato iniettato con il criterio dell'iniezione di colorante, per poter osservare l'andamento del fluido all'interno del rene e assicurarsi dell'assenza di perdite.

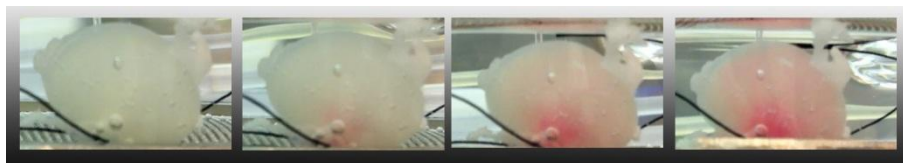


Figura 8.41 : Immagini tratte da un filmato di monitoraggio dell'iniezione di terreno di coltura all'interno del rene decellularizzato prima dell'infusione delle nuove cellule; non si notano perdite e l'organo assume una colorazione uniforme

Non si sono riscontrate perdite, segno di integrità della matrice; la colorazione è risultata omogenea a meno della regione midollare in prossimità dei vasi dove la colorazione è molto più intensa.

Si è rilevato il numero delle cellule fuoriuscite dopo l'iniezione (solo per l'esperimento 28) e dopo il flusso (per entrambi). Nell'esperimento 26, dopo un'incubazione statica di 3 ore seguita dalla perfusione con terreno di coltura a 0,5 mL/min si è contata la totalità delle cellule nel fluido circostante il rene.

Nel caso dell'esperimento 28, invece, i dati della conta con camera di Burker sono stati decisamente più incoraggianti: si sono rilevate 700 000 cellule fuoriuscite dopo

l'iniezione e 300 000 dopo il flusso.

Il risultato, che porterebbe a considerare il tempo di incubazione statica di 15 ore il fattore discriminante tra i due esperimenti, in realtà è stato smentito dalle analisi delle immagini di microscopia in fluorescenza e di immunistochemica, con Ematossilina e Eosina.

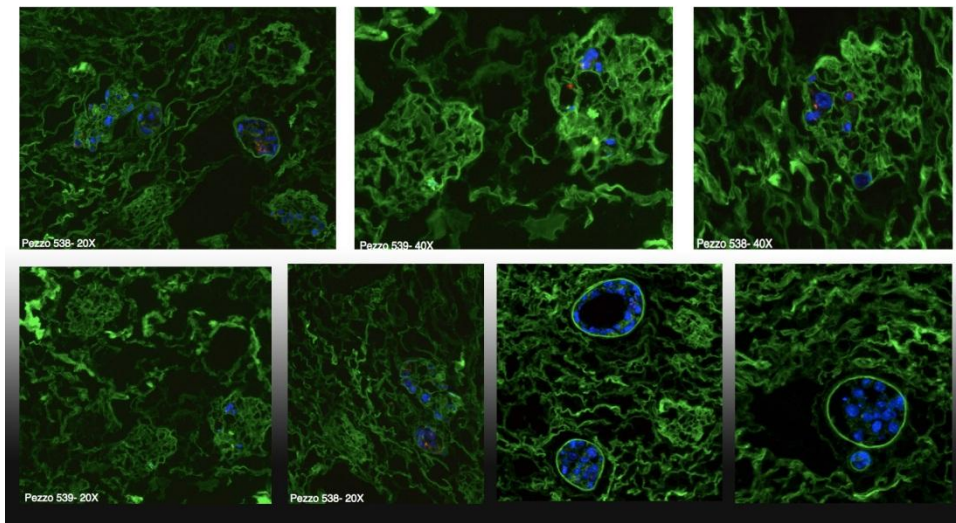
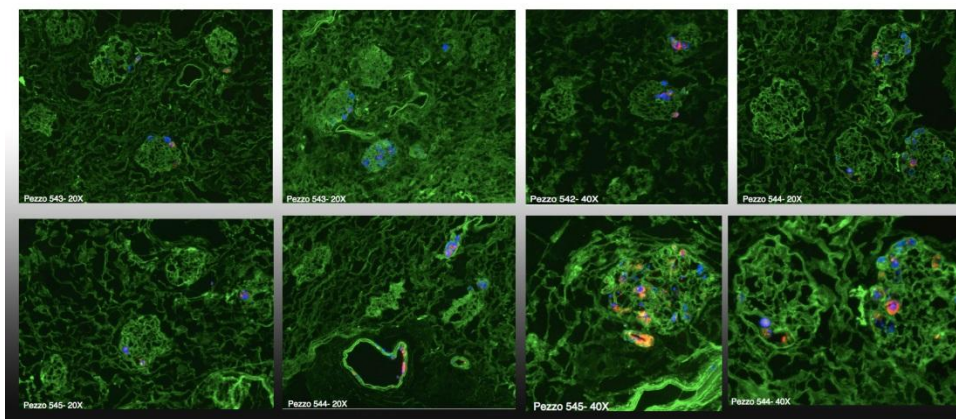


Figura 8.42 : Immagini di immunofluorescenza a diversi ingrandimenti; si osserva una scarsa presenza cellulare prevalentemente distribuita nei grandi vasi (exp 26)

Figura 8.43 : Immagini di immunofluorescenza a diversi ingrandimenti; si osserva la matrice perfettamente mantenuta e l'assenza di aloni blu tipici dei residui nucleari; tuttavia la presenza di cellule di nuova immissione è molto scarsa (exp. 28).



Si sono rilevate all'interno della matrice di entrambi gli esperimenti poche cellule, prevalentemente concentrate nei grandi vasi, quai totalmente assenti dai glomeruli. A giustificazione della discordanza dei dati nell'esperimento 28 tra quelli della conta cellulare e quelli della immagini, si sono osservate nelle aree perimetrali delle sezioni

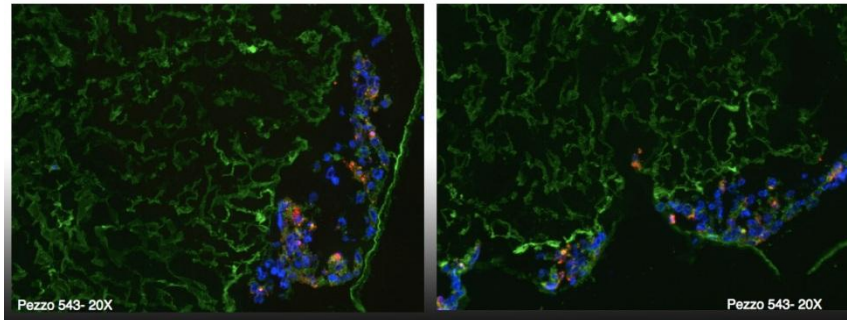
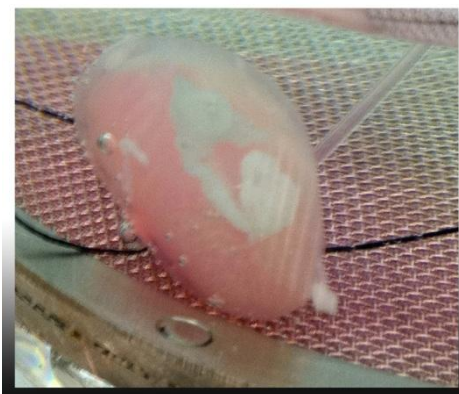


Figura 8.44 : Immagini di microscopia fluorescenza a 20X; si osserva la massiccia presenza delle cellule perimetralmente al tessuto, nella regione racchiusa dalla matrice della capsula renale

abbondanti agglomerati cellulari: il mancato distacco della capsula renale ha fornito una zona di raccolta per le cellule fuoriuscite dopo il flusso.

Il mancato distacco della capsula renale, fenomeno che avviene per molti dei reni decellularizzati è evidente anche alla semplice osservazione dell'organo. Spesso quando si verifica il distacco della capsula la sottile membrana si confonde con lo strato adiposo e giace bloccata nel punto di sutura tra il catetere e l'arteria, lasciando esposti i micropori che ne costituiscono i vasi.

Figura 8.45 : Effetto visibile della presenza della capsula renale non staccata nella fase di decellularizzazione



La scarsa presenza delle cellule nei due reni decellularizzati è evidente anche dalle immagini di Ematossilina e Eosina, che mostrano eterogeneità delle zone; si notano delle regioni contenenti agglomerati cellulari e ampie porzioni che ne sono totalmente sprovviste.

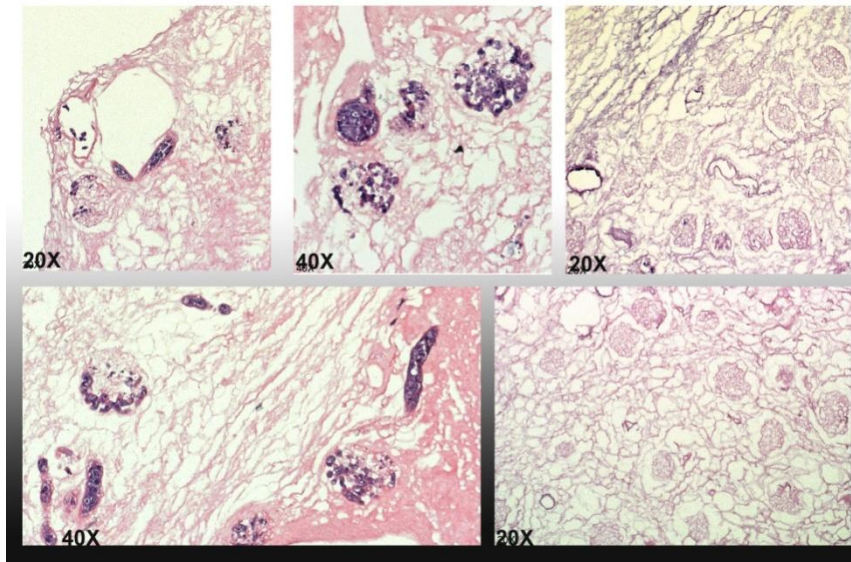


Figura 8.46 : Immagine di immunohistochemical con Ematossilina e Eosina; si nota la distribuzione non omogenea delle cellule nelle regioni glomerulari (exp 26)

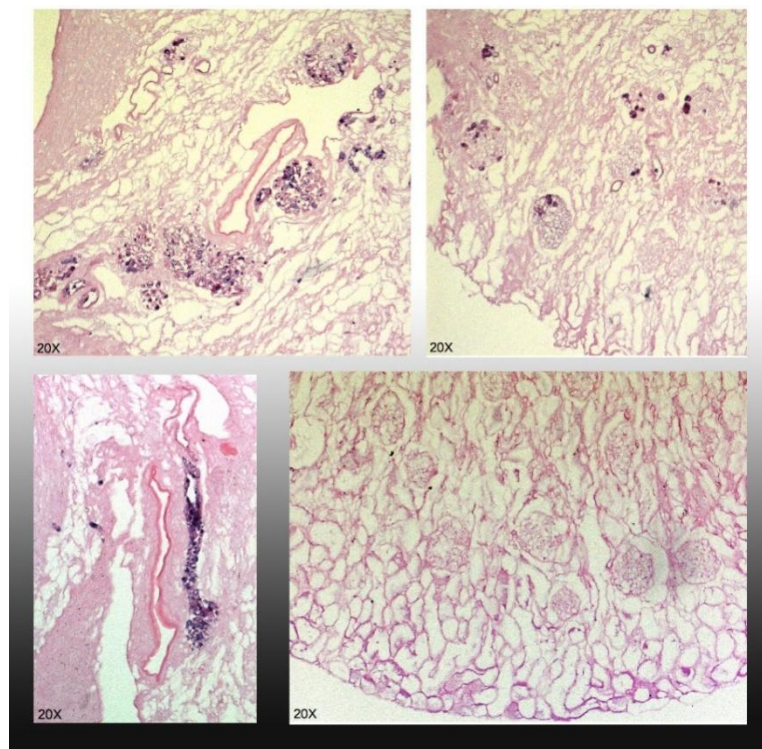


Figura 8.47 : Immagine di immunohistochemical con Ematossilina e Eosina; (exp 28)

Anche in questo caso si evidenzia una struttura perfettamente integra e ben conservata, che mantiene la morfologia fisiologica dei glomeruli.

Inoltre, l'utilizzo della DNAsi, anche a concentrazioni molto basse e in perfusione per solo 2 ore toglie completamente residui nucleari precedenti, come si può notare dalla totale assenza di aloni blu sia nell'immunofluorescenza sia di marcature viola dell'ematossilina.

I tracciati di pressione mostrano un comportamento anomalo dell'esperimento 26, con dei valori medi molto inferiori a quelli fisiologici, tipico al contrario di matrici molto danneggiate.

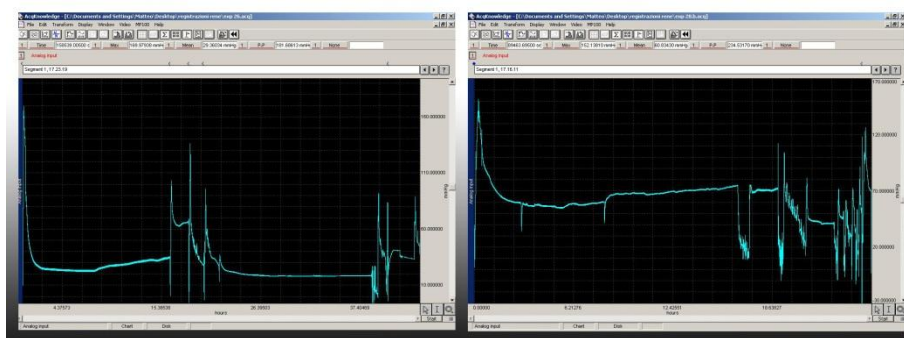


Figura 8.48 : Tracciati di pressione relativi agli esperimenti 26 e 28

EXP 27

L'esperimento 27 è stato eseguito con lo scopo di indagare il danno arrecato dal trattamento con soluzione di DNAsi a buffer acido. Si è scelto di applicare dopo il trattamento l'iniezione del colorante (blu di metilene 0,05%).

Dopo la decellularizzazione si sono rilevate le caratteristiche visive precedentemente descritte per gli esperimenti 26 e 28 condotti con lo stesso protocollo: si sono notate nella fase successiva alla soluzione enzimatica, perdita di consistenza del rene e riduzione delle dimensioni.

Al contrario degli altri esperimenti, il rene non ha mostrato dopo l'intero protocollo uno sbiancamento completo, ma si sono notate delle aree non decellularizzate.

Si è scelto nonostante ciò di proseguire con la prova di iniezione del colorante.

Si è potuto osservare che il colorante non si è distribuito omogeneamente all'interno del rene ma ha saturato delle zone anteriori, che in seguito non si sono rischiarite nemmeno con lavaggi abbondanti in circuito aperto.

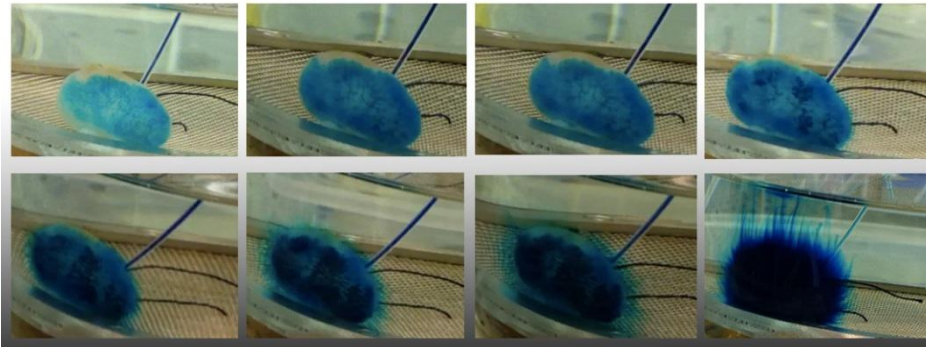


Figura 8.49 : Immagini tratte dal filmato di monitoraggio dell'iniezione di colorante (exp 27). Non si notano perdite, tuttavia si ha una distribuzione non omogenea del colorante all'interno del rene

Come si può notare dalle immagini, si è assistito al fenomeno della filtrazione del colorante attraverso i capillari micrometrici esposti a causa del distacco della capsula renale.

Non si sono rilevati tuttavia fori evidenti attraverso la membrana che inducessero il flusso a deviare dal percorso dei vasi.

Le analisi in fluorescenza hanno comunque mostrato una matrice ben conservata, con la completa integrità delle strutture.

Gli stessi esiti sono stati evidenziati dalle immagini immunosistochimiche.

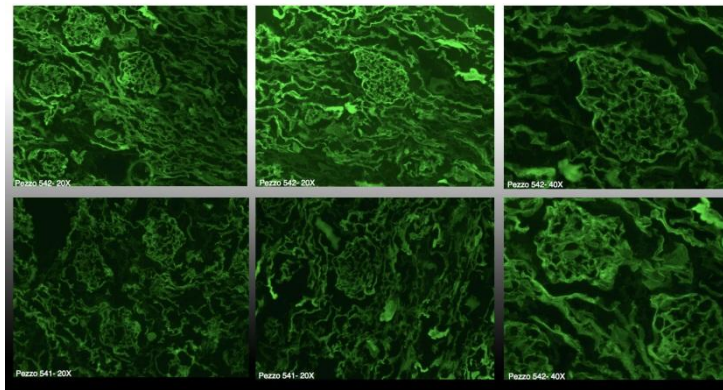


Figura 8.50: Immagini di immunofluorescenza a diversi ingrandimenti (exp 27). Si osserva la matrice perfettamente integra e l'assenza di residui nucleari

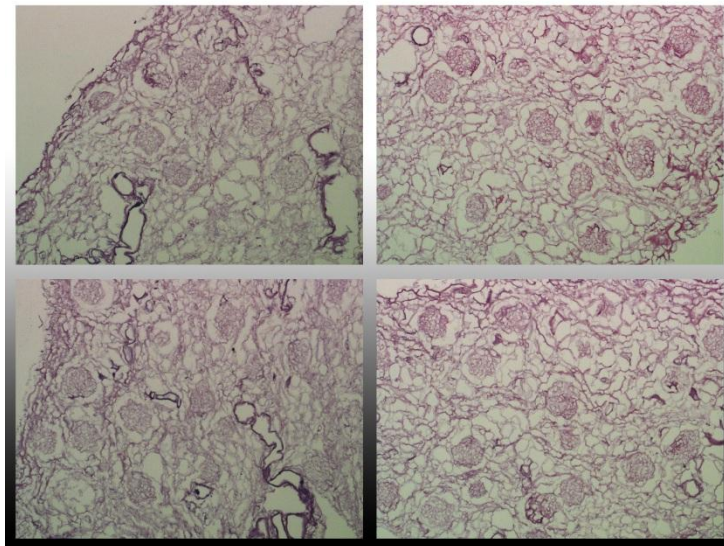


Figura 8.51: Immagini di immunostochimica ottenute con Ematossilina e Eosina. Evidenziano la struttura ben mantenuta della matrice extracellulare dopo la decellularizzazione; si osservano in particolare le strutture glomerulari ben conservate (exp 27)

Anche in questo caso, nonostante l'abbondante colorazione residua provocata dal blu di Metilene, nelle indagini microscopiche non si sono osservate gli aloni tipici della presenza di residui nucleari, in apparenza completamente rimossi dall'uso della soluzione enzimatica.

Inoltre, contrariamente a quanto suggerito dallo sbiancamento parziale dell'organo, non si notano cellule residue in nessuna regione della matrice.

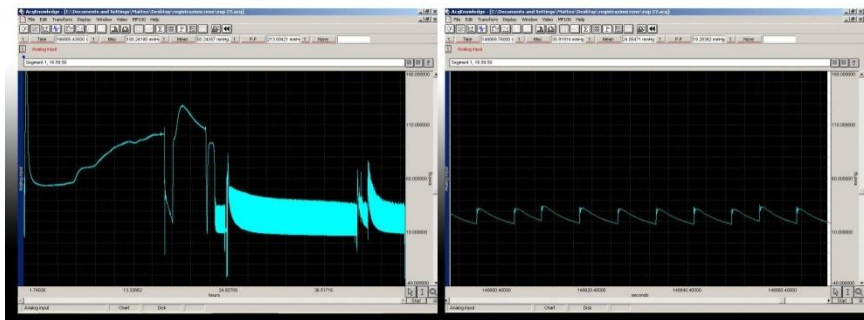


Figura 8.52 : Tracciati di pressione dell'esperimento 27 con un dettaglio ingrandito per mostrare l'ampiezza dell'oscillazione responsabile nella seconda parte del grafico di sinistra dello spessore della curva

Il tracciato di pressione dell'esperimento, ha mostrato un comportamento anomalo con delle oscillazioni molto ampie (responsabili dello spessore della curva). Il problema è dovuto ad un artefatto legato a bolle formatesi nel corso della seconda parte dell'esperimento nel trasduttore, effetti per tanto non influenti sulla struttura della membrane extracellulare. Pertanto si può ritenere attendibile il valore medio rilevato in tutta la durata della registrazione, ma non quello di ampiezza dell'escursione delle oscillazioni.

In base ai risultati ottenuti si può ritenere che il protocollo di decellulizzazione D3, con perfusione di SDS e di soluzione a base di DNAsi sia efficace nella rimozione completa dei residui nucleari; altrettanto, benchè la struttura microscopica appaia integra, quella macroscopica del rene sembra danneggiarsi, perdendo consistenza e dimensione.

Inoltre, la pessima distribuzione delle cellule al suo interno potrebbe far pensare ad una tossicità della soluzione non adeguatamente rimossa prima della semina delle nuove cellule.

In alternativa si può pensare al danno a carico di altri componenti della matrice proteica non individuabili con la marcatura con Lectina e con Ematossilina.

Una ipotesi altrettanto valutata è quella del danno arrecato a specifiche proteine, con modifica del "folding" fisiologico di queste a causa del pH acido del buffer utilizzato per la soluzione di DNAsi.

8.2.4. Esperimenti realizzati con protocollo D4

Il protocollo D4 è stato utilizzato come variante del protocollo D3, a verifica dell'ipotesi di danno proteico provocato dal pH acido del buffer utilizzato per la DNAsi. Pertanto si è scelto di utilizzare un buffer salino basico per lo scioglimento della DNAsi, utilizzata sempre nella concentrazione di 0,0025% in acqua deionizzata.

Si è previsto allora il buffer composto da Tris Hcl, MgCl₂, CaCl₂ in acqua deionizzata portata a pH 7.6.

I tempi di esecuzione della sperimentazione sono stati mantenuti della durata di 2 giorni, 17 ore per il trattamento con SDS, 2 ore per la soluzione enzimatica e 4 ore di lavaggi in circuito aperto, seguite dal trattamento di condizionamento con terreno di coltura.

Con questo protocollo, in base ai risultati ottenuti, è stato condotto un solo esperimento.

La tabella riportata sintetizza in modo molto semplificato l'esito degli esperimenti svolti con questo protocollo e i rispettivi trattamenti aggiuntivi.

	TRATTAMENTO				RISULTATI											
	SDS 1% + LAVAGGI				P	EFFETTI MACROSCOPICI				INIEZIONE FLUIDO	CELLULE NEL FLUIDO			ANALISI COLORAZIONI		
	DNAsi	COLORANTE	iniezione cellule		REGOLARE	SBIANCATO	CONSISTENTE	MANTIENE DIMENSIONE	ASSENZA PERDITE	RIEMPIMENTO COMPLETO	DOPO INIEZIONE	DOPO STATICO	DOPO FLUSSO	STRUTTURA INTEGRA	DECELL COMPLETA	PRESENZA NUOVE CELL
EXP 29	basic	/	/	/	2	3	1	1	3	3	/	/	/	1	3	/

Figura 8.53 : Tabella riassuntiva dello svolgimento dell'esperimento 29 con protocollo D4

Per la lettura dei dati valgono le indicazioni espresse nel paragrafo 8.2.1 in merito alla figura 8.12.

EXP 29

L'esperimento 29 è stato condotto allo scopo di verificare l'integrità della matrice e la completa rimozione di scarti cellulari a seguito del trattamento con soluzione di DNAsi alcalina.

Si è effettuata quindi la sola fase di decellularizzazione.

L'analisi visiva in corso d'opera ha dato esiti molto simili a quelli ottenuti negli esperimenti effettuati con protocollo D3: successivamente alla perfusione della soluzione enzimatica si verifica la perdita di consistenza dell'organo e la riduzione delle dimensioni.

Si è ottenuto lo sbiancamento completo del rene, senza

In questo caso non si è verificato, come mostrato dalle immagini, il distacco della capsula renale.

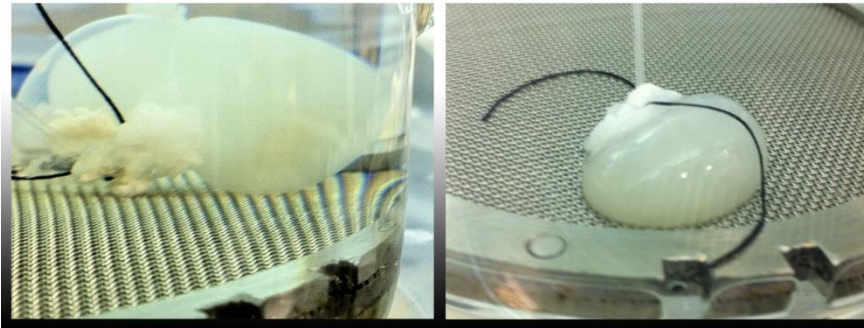


Figura 8.54 : Immagini del rene dopo la decellularizzazione con protocollo D4; non si verifica il distacco della capsula come evidente nell'immagine di sinistra.

E' stata effettuata, immediatamente dopo la perfusione con la soluzione di DNAsi, una prova di iniezione di colorante: si è scelto di utilizzare del terreno di coltura rosso, per evitare di compromettere la ricerca di fluorescenza blu del Dapi con i residui di Blu di Metilene.

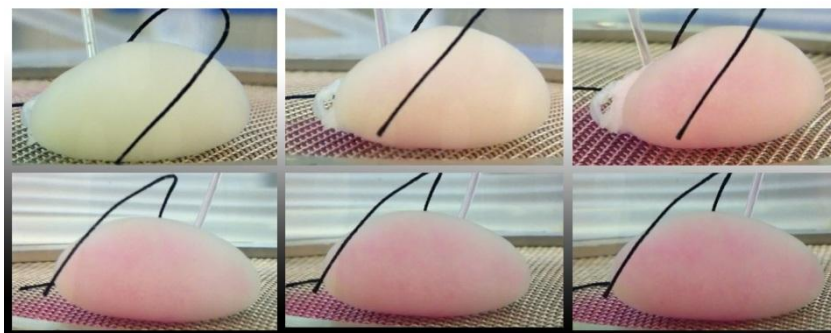


Figura 8.55 : Immagini tratte dal filmato di monitoraggio dell'iniezione di terreno di coltura nel rene (exp 29)

L'infusione, seppur meno evidente di quelle con coloranti più marcati, ha mostrato la colorazione omogenea e completa di tutto il rene.

L'assenza di perdite, benchè non se ne notino di evidenti, non può essere confermata dall'analisi del filmato, a causa delle differenze delle densità dei liquidi in gioco, per cui si ha la deposizione sul fondo del terreno di coltura, che rende meno evidenti i flussi potenziali attraverso la membrana.

La difficoltà di determinare delle perdite è ulteriormente accentuata dalla presenza della capsula, che impedisce l'osservazione diretta della membrana sottostante.

Le analisi delle immagini di microscopia hanno riportato dei risultati negativi per quanto riguarda l'integrità della matrice, decisamente peggiore di quelli ottenuti con il protocollo D3.

Sia nelle immagini di immunofluorescenza, sia in quelle di immunoistochimica si sono osservate delle matrici proteiche frammentate su tutte le sezioni, con una distribuzione non omogenea dell'intensità di fluorescenza e di colorazione (a parità di mezzi di analisi), indice di differenza in termini di quantità delle proteine stesse.

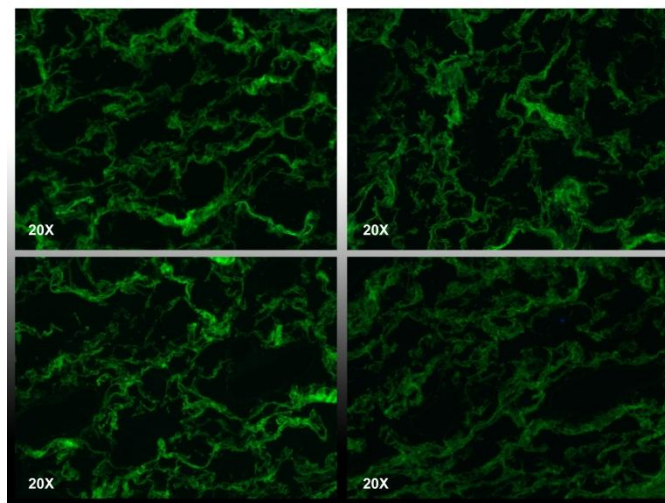


Figura 8.56 : Immagini di microscopia a fluorescenza a un ingrandimento di 20X ; si nota una matrice extracellulare molto danneggiata e l'assenza di residui cellulari (exp 29)

Si notano ampie aree non marcate, potenziali degradazioni della matrice. Anche le strutture glomerulari non appaiono morfologicamente intatte; i contorni non sono ben definiti e risultano molto diversi a seconda della regione di appartenenza.

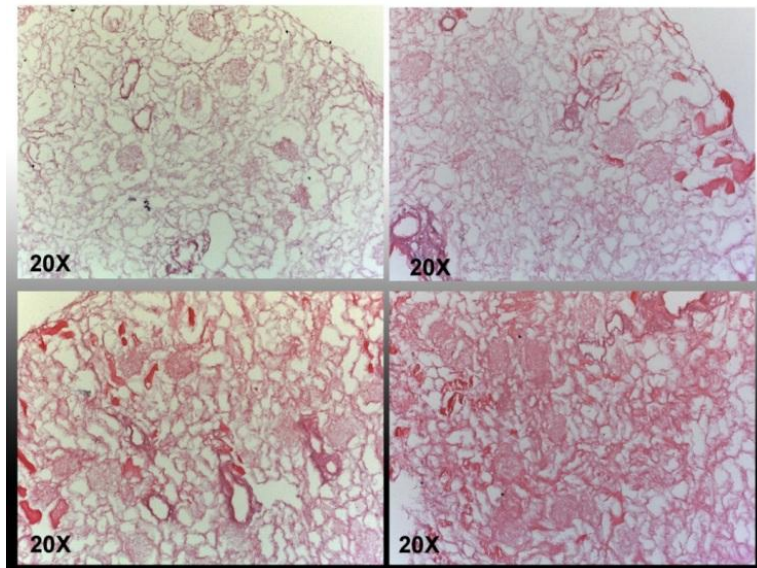


Figura 8.57 : Immagini di istologie effettuate con Ematossilina e Eosina; si nota la struttura della matrice extracellulare mal conservata e la non omogeneità della colorazione come conseguenza del danno proteico.

L'andamento del tracciato di pressione risulta molto regolare a meno del picco pressorio iniziale, che potrebbe corrispondere ad una difficoltà di perfusione iniziale provocata da coaguli di sangue all'interno dei vasi del rene. Il valore medio della pressione nel corso dell'esperimento e l'ampiezza delle oscillazioni non indicano rotture della matrice e degradazione eccessiva della stessa (con corrispondente diminuzione di resistenza e quindi della pressione rilevata).

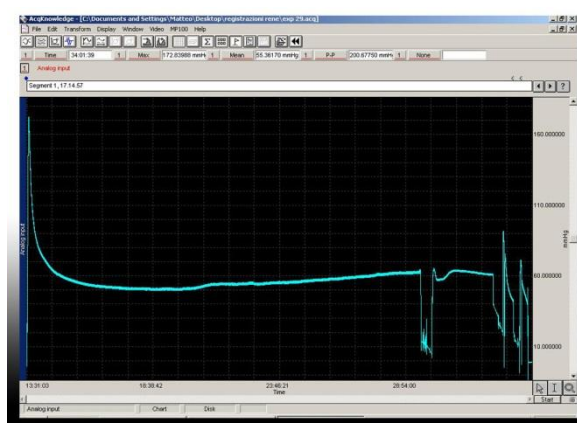


Figura 8.58 : Tracciato di pressione relativo all'esperimento 29

In base ai risultati, in particolare quelli ottenuti con l'analisi delle immagini di microscopia, si ritiene più dannoso a carico della matrice l'utilizzo della DNAsi in ambiente basico rispetto a quella in buffer acido, benchè si tratti una soluzione molto utilizzata secondo la letteratura.

PARTE IV–CONCLUSIONI

9. DISCUSSIONE E SVILUPPI FUTURI

Si vuole in questo capitolo effettuare una riflessione su quanto descritto nel lavoro: si vogliono analizzare le scelte fatte nella realizzazione dei dispositivi e delle metodiche in relazione ai risultati e trarne delle conclusioni, per poter formulare, come obiettivo prefisso, le linee guida per una attività ripetibile e standardizzabile di “Decellularizzazione e Ricellularizzazione” del rene, come basi per il proseguimento della ricerca verso la rigenerazione dell’organo intero.

E nell’ottica degli sviluppi futuri di questa ricerca si discute delle nuove possibilità che sono offerte dalle tecnologie e dall’inventiva, come mezzi per conseguire nuovi obiettivi e risolvere nuove problematiche, i traguardi che si impongono volta per volta procedendo nella sperimentazione per l’ottenimento del rene in vitro.

9.1. Il sistema realizzato, i materiali e i metodi, vantaggi e problematiche aperte

Dal confronto tra il sistema costituito e il ruolo ad esso adibito nel contesto dell’attività sperimentale, svolta con le metodiche descritte nel capitolo 7, emergono i vantaggi e i limiti della sua funzionalità.

In particolare, come rilevato nel capitolo 8, la camera realizzata si adatta perfettamente alle esigenze di sterilità e di semplicità del montaggio del circuito. Il materiale fragile di cui è costituita, il vetro, non risulta critico per l’attività di decellularizzazione né di ricellularizzazione, con tutte le operazioni che comportano. Al contrario richiede maggiore attenzione e cura nelle operazioni di pulizia successive agli esperimenti e nelle movimentazioni che queste comportano (spostamenti tra l’area di sterilità, l’autoclave, etc.). A questo scopo, l’uso di imballaggi precauzionali è consigliato.

La peculiarità dei beccucci come giunzione tra il sistema di tubi del circuito e la camera di perfusione semplifica le operazioni di montaggio antecedente il lavoro sperimentale e in corso d’opera.

La possibilità di incannulamento del rene attraverso l’ago fissato verticalmente nel coperchio, benché richieda molta manualità all’operatore, rende gli esperimenti più riproducibili, sia per il minore numero di posizioni che l’organo può assumere, sia per la minore possibilità di movimento dell’ago (e conseguentemente del catetere e del rene) .

Si può valutare positivamente anche il volume di riempimento della camera di

perfusione, pari a 350 mL di soluzioni, che come è stato dimostrato dai risultati degli esperimenti, si adatta perfettamente ai tempi di svolgimento della decellularizzazione secondo i protocolli D2, D3, D4. Al contrario, per l'attuazione del protocollo di decellularizzazione D1, i volumi delle sostanze introdotte nella camera e nel circuito di perfusione sono eccessivi per le tempistiche adottate, pertanto il rischio è quello di spreco.

L'introduzione nel circuito di perfusione del deflussore come dispositivo atto all'aumento della "compliance" del sistema e contemporaneamente come struttura utile per la raccolta delle bolle d'aria in circolo, si è rivelata molto positiva nello svolgimento delle operazioni, sia nella perfusione, di cui ha aumentato la versatilità grazie all'attenuazione di accidentali sbalzi pressori. Tuttavia, per il suo volume, il deflussore ha imposto la necessità di introdurre le operazioni di svuotamento e riempimento del circuito, altrimenti trascurata.

Per quanto riguarda il circuito, il sistema di tubi utilizzati deve essere ripristinato dopo lo svolgimento di una quantità di esperimenti dipendente dai protocolli utilizzati: nel tempo i tubi tendono ad irrigidirsi a causa degli sbalzi di temperatura imposti dalla sterilizzazione in autoclave; inoltre, nonostante il lavaggio accurato al termine di ogni sperimentazione, è possibile che vi sia deposito lungo le pareti di detriti e residui chimici.

La presenza di diverse vie di accesso al circuito, garantita dall'uso dei rubinetti posizionati alle terminazioni dei tubi secondari e di quelli interni al circuito principale, favorisce l'intervento in situazioni straordinarie, oltre allo svolgimento più semplice delle operazioni ordinarie.

Come già precedentemente osservato nel capitolo 8, il posizionamento del dischetto di supporto al rene, elemento fondamentale per la semplificazione delle operazioni di alloggiamento e spostamento dell'organo e per lo svolgimento dei cambi di detergenti previsti dai protocolli, potrà essere migliorato per merito dell'aggiunta di un afferraggio removibile da lasciarsi all'interno della camera di perfusione, rendendo possibile l'operazione ad un solo operatore.

Il sistema di supporto, costituito dalla base di PMMA e dai perni rigidi avvitabili, è risultato molto utile nella semplificazione delle operazioni ordinarie della sperimentazione, così come quelle straordinarie. La versatilità del dispositivo, le dimensioni e la semplicità della struttura, hanno facilitato tutte le fasi previste dalla

attività sperimentale: preparazione del sistema, spostamenti, alloggiamento del rene e inserimento e rimozione dei detergenti, operazioni di lavaggi in circuito aperto, operazioni da svolgersi agilmente secondo i criteri della “GoodLaboratoryPractice” in sterilità.

Anche le dimensioni del sistema si sono rivelate ottimali per le condizioni di lavoro sotto cappa e in incubatore.

La strumentazione utilizzata è risultata funzionale all’ottenimento dell’organo decellularizzato e all’iniezione di cellule; tuttavia, per una fase successiva della sperimentazione, in previsione delle metodiche ancora da ottimizzare, potrebbe rendersi necessaria la disponibilità di un funzionamento del circuito a portate inferiori rispetto alla minima ottenibile con la pompa peristaltica digitale “Masterflex”.

Altri aspetti negativi del sistema realizzato, ancora una volta legati all’adattamento alle potenziali esigenze future della ricerca, sono l’impossibilità di funzionamento del trasduttore di pressione per valori imposti molto alti quali quelli rilevabili in condizione di incannulamento dell’uretere.

Si può quindi concludere che il sistema progettato, realizzato e ottimizzato nell’attività sperimentale risulta funzionale e idoneo allo svolgimento degli esperimenti di decellularizzazione e ricellularizzazione e anzi si può ritenere un elemento chiave nell’ottenimento degli ottimi risultati conseguiti. Si può altrettanto ritenere il sistema appropriato alla standardizzabilità e alla ripetibilità degli esperimenti, congiuntamente e compatibilmente con le metodiche approvate.

Tuttavia, nella prospettiva di fasi successive della ricerca in evoluzione, lo stesso sistema dovrà essere modificato, per favorire la risoluzione di ulteriori esigenze, prima tra tutte quella di svolgere parallelamente più esperimenti. Questo requisito potrà facilmente essere ottenuto ridimensionando e riposizionando i componenti ad oggi utilizzati e integrando la strumentazione con moduli aggiuntivi (testine peristaltiche della pompa e filtri di acquisizione del sistema Biopac).

Si vuole procedere nella riflessione analizzando i protocolli e le metodiche redatti e validati con l’attività pratica.

In particolare, confrontando i protocolli utilizzati e i risultati conseguiti negli esperimenti, si possono trarre le seguenti conclusioni: tra i metodi di decellularizzazione, quello che si è dimostrato più valido è quello basato sul protocollo

D2. La breve durata dell'esperimento, aggiunta alla limitata aggressività e all'efficacia dell'SDS lo rendono adatto al conseguimento di un buon grado di decellularizzazione dell'organo, aggiunto ad un mantenimento eccellente della struttura proteica della matrice extracellulare. Tuttavia, la presenza occasionale di residui genetici impone la necessità dell'aggiunta di un metodo di rimozione mirato; come dimostrato dagli esperimenti svolti con protocollo D3 e D4, le soluzioni enzimatiche a base di DNAsi risultano completamente efficaci a questo scopo. Tuttavia, le concentrazioni utilizzate, seppur molto basse, si sono dimostrate eccessivamente dannose per la struttura complessiva dell'organo, che, seppur mostrando una morfologia della matrice extracellulare apparentemente corretta, perde consistenza e dimensione e non risulta idoneo alla semina delle cellule nuove. Inoltre, il confronto tra gli esperimenti di decellularizzazione con protocollo D3 e D4, mostra l'evidenza della superiorità dell'utilizzo di soluzioni acide rispetto a quelle alcaline, ottenute con diversi buffer salini.

E' altrettanto evidente la necessità di lavaggi prolungati in circuito aperto, che possano eliminare ogni residuo di soluzione enzimatica dalla matrice proteica, specialmente dalle strutture glomerulari, e da quelle meno raggiungibili.

Il protocollo D1 si è dimostrato eccessivamente aggressivo, sia per il mantenimento della morfologia delle strutture della matrice extracellulare, sia per l'incompatibilità con il sistema di incannulamento, effettuato suturando il catetere PE50 nell'arteria renale: la sutura subisce un'allentamento nel corso dell'esperimento a causa della degradazione del filo chirurgico usato.

Per quanto riguarda i metodi di ricellularizzazione, il protocollo R1 si è dimostrato poco standardizzabile in quanto eccessivamente legato alla manualità dell'operatore. Inoltre, come rischio implicito della procedura, c'è la possibilità di eccedere nella pressione, condizione dannosa per l'integrità della fragile matrice extracellulare.

Questo metodo, utilizzato anche da altri gruppi impegnati nella ricerca, secondo quanto descritto da Ross et al. nella pubblicazione scientifica già citata "EmbryonicStemCells Proliferate and Differentiate when Seeded into Kidney Scaffolds" è quindi meno valido di quelli che prevedono l'iniezione delle cellule a mezzo di pompe (con il circuito di perfusione o tramite pompa a siringa).

Inoltre, gli esiti degli esperimenti hanno dimostrato che il protocollo R1, con l'infusione di 8 milioni di cellule in 1 mL di terreno di coltura, risulta meno valido del protocollo

R2, a causa dell'eccessiva densità di cellule in sospensione che tendono ad aggregare ancora prima di penetrare nella matrice, condizione aggravata dalla durata eccessivamente lunga dell'iniezione.

Il protocollo R2, invece, che prevede l'iniezione preliminare di 1,8 mL di sospensione cellulare, (pari al volume medio del rene) nel tubo di perfusione e l'attivazione del flusso di 0,5 mL/min dato dalla pompa, potrebbe indurre al rischio di adesione delle cellule stesse alle pareti del tubo. Però è da notarsi la scarsa capacità adesiva della linea cellulare iniettata, che aggiunta alla forza di trascinamento del liquido in movimento impedisce questa eventualità, come confermano gli esiti degli esperimenti.

Il tempo di infusione, 3,5 minuti è ottimizzato per permettere a tutta la sospensione di essere introdotta nella matrice decellularizzata e di limitare il rischio di esserne espulsa.

Il metodo, come dimostrato dai risultati sperimentali risulta efficace e ripetibile per la semina delle cellule nello "scaffold" proteico.

Nell'intento di fornire una metodica sicura e dagli effetti prevedibili, tuttavia, è necessario analizzare i protocolli con una criticità che esuli dai risultati eccellenti ottenuti sperimentalmente (riportati nel capitolo 8 in particolare per gli esperimenti 20 e 30).

Pertanto va osservato che anche con questo protocollo, benché gli esiti degli esperimenti siano molto soddisfacenti per l'omogeneità della distribuzione delle cellule nell'organo, sussiste il rischio di aggregazione a monte dell'ago, nel tubo di perfusione o addirittura nella siringa utilizzata per immetterle nel circuito.

Per scongiurare questo eventualità, che potrebbe portare ad una distribuzione delle cellule eterogenea, privilegiando le aree a semplice accessibilità da parte degli aggregati, quindi alla ripopolazione privilegiata di grandi vasi, si propone di ridurre il numero delle cellule iniettate.

Questa soluzione, compatibile con le scelte descritte dal lavoro di Ross et al (nel quale si prevede l'infusione di 2 milioni di cellule), oltre a ridurre la densità cellulare in 1,8 mL di liquido introdotto e il rischio di aggregazione precoce, risulterebbe più favorevole anche per il bilancio del tempo disponibile per l'adesione e quello concesso dal consumo di ossigeno. Infatti, come mostrato nei modelli presentati nel capitolo 7, il tempo per cui si può attuare un'incubazione statica della coltura, in attesa dell'adesione cellulare, è limitato dall'incorrere della situazione di ipossia, e risulta dipendente dalla densità delle cellule stesse.

Si potrebbe quindi procedere ad una infusione sequenziale di cellule, alternata alle fasi di statico necessarie per l'adesione, oppure affidare il ripopolamento del rene alla capacità proliferativa illimitata delle cellule staminali iniettate (scelta sostenuta dal gruppo di Ross et al).

Analizzando invece le metodiche sviluppate per l'esecuzione degli esperimenti, si possono identificare tre principali limiti alla standardizzabilità e alla ripetibilità degli esperimenti, intesa in modo multicentrico: l'operazione di prelievo e incannulamento del rene, la fase di sezionamento dell'organo per le indagini microscopiche e le fasi di riattivazione del flusso successive al riempimento.

Per le prime due fasi, la criticità è strettamente collegata alla manualità richiesta dalle procedure all'operatore, fattore che limita la multicentricità delle operazioni.

Come spesso sottolineato, in queste fasi, la variabilità dei tessuti biologici e l'abilità dell'operatore rischiano di influenzare irrimediabilmente l'esito degli esperimenti, nel primo caso compromettendo la decellularizzazione e la ricellularizzazione vere e proprie, occludendo vasi o lasciando dei meati nella sutura tra arteria e catetere, nel secondo caso danneggiando a posteriori l'organo prima dei riscontri microscopici e inficiandone gli esiti.

Per quanto riguarda la riattivazione del flusso, è fondamentale evitare la presenza di bolle d'aria che possano arrivare al rene. Queste potrebbero compromettere l'integrità della matrice indipendentemente dai protocolli utilizzati e vanificare le operazioni di decellularizzazione e ricellularizzazione attuate secondo le procedure.

Per chiarezza si riportano le immagini tratte da un filmato che monitorizza l'iniezione del colorante.

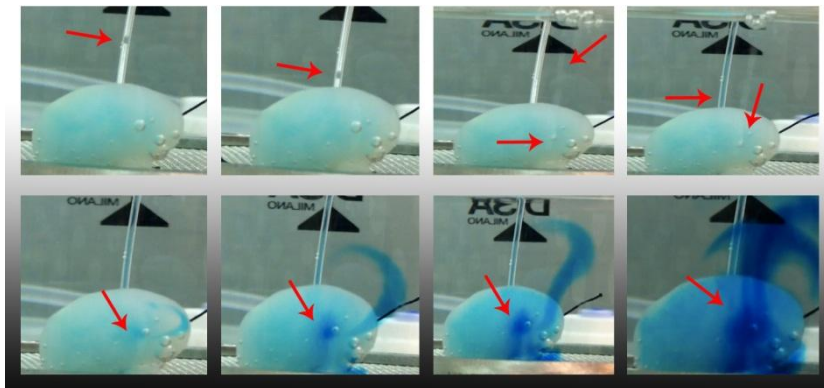


Figura 9.1 : Immagini tratte da un filmato di monitoraggio dell'iniezione di colorante; si può osservare l'effetto di una bolla d'aria, visibile nel catetere PE50, che giunta al rene provoca una rottura immediata della struttura, generando una perdita di flusso attraverso la matrice

Un ultimo accorgimento necessario per aumentare la ripetibilità degli esperimenti è da adottarsi in fase di decellularizzazione, nell'esecuzione della procedura di apertura del circuito per i lavaggi con acqua. E' importante assicurarsi della completa pervietà della pipetta fissata al tubo "Masterflex" prima di introdurla nel circuito: residui di cotone (benché molto rari) potrebbero danneggiare la matrice.

Pertanto si consiglia di risciacquare abbondantemente la stessa con dell'acqua iniettata a mezzo di una siringa da 50 cc.

Questa problematica potrebbe essere alternativamente risolta con l'introduzione nella linea di perfusione di un filtro, in posizione compatibile con i requisiti dei protocolli di ricellularizzazione.

9.2. Analisi dei risultati sperimentali, confronti con le aspettative e la letteratura

I risultati ottenuti nell'attività sperimentale costituiscono uno spunto per la validazione del metodo con cui la ricerca è stata condotta, in particolare forniscono un termine di confronto tra le aspettative preliminari, i traguardi già raggiunti nello stesso campo e il conseguimento degli obiettivi.

I risultati più incoraggianti sono quelli conseguiti con la sperimentazione con protocollo di decellularizzazione D2, seguiti dal protocollo di ricellularizzazione R2.

Gli esperimenti che rispondono a queste caratteristiche sono i numeri 20, 23 e 30.

In particolare il 20 e il 30 mostrano il conseguimento dei requisiti stabiliti per la verifica della decellularizzazione e della ricellularizzazione del rene posti come obiettivo iniziale: il mantenimento dell'integrità della matrice, il riscontro della morfologia vascolare integra, la completa rimozione della componente cellulare autologa e la distribuzione di quella allogenica iniettata.

Confrontando le immagini di microscopia dei suddetti esperimenti con quelle rilevate dall'articolo "Embryonic StemCells Proliferate and Differentiate when Seeded into Kidney Scaffolds" del gruppo di Ross et al, [25], unico lavoro con risultati specifici sulla rigenerazione del rene, si può notare una differenza.

In particolare le immagini di immunoistochimica con marcatura di "Ematossilina e Eosina" pubblicate dal gruppo californiano, mostrano delle matrici lievemente meno fitte e compatte, con una maggiore presenza di aree vuote, ad indicare l'assenza di collagene.

Invece, la densità cellulare da essi ottenuta, mostrata nelle immagini riprese a 4 giorni di coltura, indica una confrontabilità del numero effettivo di cellule seminate nel rene dopo l'iniezione (in proporzione al diverso numero di cellule iniettate).

Il confronto delle immagini indica anche una distribuzione omogenea delle cellule, raggiunta in entrambi i lavori, in particolare nei glomeruli.

Anche nello studio citato, si è rilevata l'assenza di cellule nelle aree tubulari, problematica affrontata con un'infusione di cellule in modo retrogrado attraverso l'uretere.

Un unico dubbio emerso nel confronto tra lo studio pubblicato in letteratura e la ricerca sperimentale svolta è legato al tempo di incubazione statica prevista: come riportato da Ross et al, il tempo previsto per gli esperimenti di ricellularizzazione è di 24 ore,

necessarie per l'adesione. Tale metodica contrasta marcatamente con le condizioni di ipossia cellulare ricavate con i modelli precedentemente esposti.

In conclusione, dal confronto tra i lavori, si può ritenere raggiunto con metodiche differenti o stesso risultato, che può quindi essere considerato un buon punto saldo per la programmazione delle fasi successive della ricerca, che prevedono la proliferazione cellulare e il differenziamento delle stesse, indotto con precisi sistemi di stimolazione biochimica e fisica, al fine di sviluppare le strutture complesse del rene.

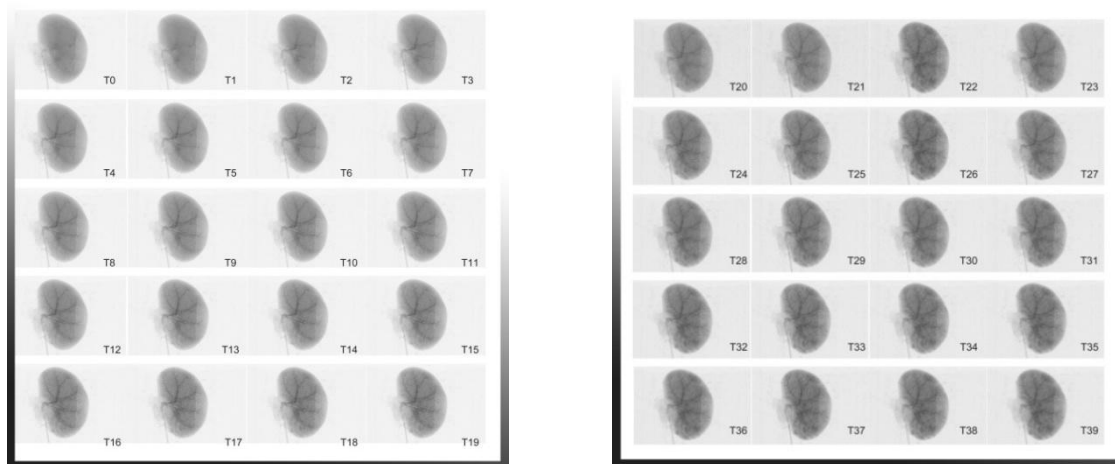
9.3. Conclusioni e sviluppi futuri: nuovi mezzi, nuovi obiettivi e una ricerca ancora aperta

In conclusione a questo lavoro, si vogliono tracciare delle linee guida per i passi successivi della ricerca volta alla rigenerazione completa del rene.

L'attività svolta in questa prima parte dello studio si era prefissata gli obiettivi di fornire un sistema e delle metodiche per le operazioni di “Decellularizzazione e Ricellularizzazione” dell'organo. I risultati conseguiti devono fungere da punto di partenza per gli sviluppi futuri di questa importante missione, a cui si devono dedicare ancora innumerevoli sforzi e iniziative.

La complessità dell'organo, descritta nei precedenti capitoli, rende molto lento l'incedere della ricerca, che mira a ripristinare ogni singola struttura, dedicata a ben precise funzioni. A favore degli scienziati che si apprestano a proseguire lo studio e in particolare per i gruppi di ricerca del Mario Negri, si aprono delle nuove prospettive offerte dalla tecnologia in rapida evoluzione e dalla condivisione delle competenze all'interno dell'Istituto. Tra queste, un nuovo interessante strumento di indagine è quello offerto dalla “Microtac” strumento di “imaging” ad alta risoluzione, in grado di evidenziare dettagli fino a 8 micrometri. Come delle prove preventivamente effettuate dimostrano, essa è in grado di fornire indicazione non solo di tipo statico sull'integrità del sistema vascolare all'interno dell'organo, ma può dare anche informazioni dinamiche sull'avanzare del mezzo di contrasto iniettato tramite sistema di perfusione.

Figura 9.2 – 9.3 : Immagini ottenute tramite ripresa dinamica dell'avanzare del mezzo di contrasto iniettato nel sistema vascolare del rene decellularizzato (iniezione di Ioxolo)

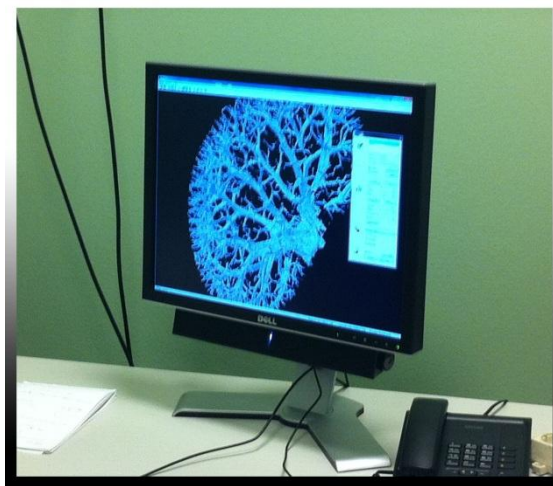


I benefici di questa tecnologia, contemporaneamente potente, rapida e versatile, al fine della ricerca, sono innumerevoli; primo tra tutti quello di monitorare l'integrità della struttura del rene con l'iniezione di mezzi di contrasto.

Il mezzo utilizzato fino ad ora nella fase di prove preliminari è lo "Ioxolo", mezzo a densità relativamente alta. Una possibilità aperta è quella di approfondire uno degli stessi fissativi previsti dai protocolli esposti e in uso: il PLP.

Un'altra importante possibilità offerta dalla tecnologia della "Microtac" è quella di ottenere dei dati molto specifici sulla morfologia dei campioni analizzati: gli algoritmi di ricostruzione dell'immagine su cui è basato il funzionamento, permettono la realizzazione di modelli tridimensionali delle strutture, in grado di fornire informazioni numeriche dettagliate. La possibilità di attribuire dei valori ai diametri dei vasi, permette la generazione di ulteriori modelli, ad esempio quelli fluidodinamici, molto importanti per la funzionalità renale.

Figura 9.4 : Modello tridimensionale di un rene di ratto effettuato tramite iniezione di mezzo di contrasto



Un'altra tecnica che saprà fornire indicazioni in grado di orientare le ricerche, sarà l'uso del microscopio elettronico a scansione, uno strumento estremamente raffinato per la determinazione di morfologie superficiali e composizioni, utile anche per riconoscere la distribuzione e la conformazione cellulare.

Delle problematiche che dovranno essere affrontate riguarderanno nuovamente l'ossigenazione cellulare, non più per il caso dell'incubazione statica ma per la coltura delle cellule differenziate o parzialmente differenziate e proliferate a ricomporre la popolazione dell'organo; sarà indispensabile assicurare l'apporto di nutrienti, in particolare quello dell'ossigeno. Sarà necessario bilanciare meticolosamente il flusso in ingresso al rene mantenendo da un lato le condizioni fisiologiche degli stimoli, dall'altro studiando i problemi del trasporto, della diffusione, della convezione e delle reazioni, in questo caso il consumo.

Lo sviluppo di dispositivi per la sperimentazione parallela potrà aumentare la significatività statistica dei risultati, accelerando le indagini e riducendo la possibilità di errori legati al disturbo della variabilità.

Infine si potranno progettare e attuare dei nuovi sistemi di veicolazione dei fattori biochimici di differenziamento e di proliferazione, attingendo dal vasto campo dei biomateriali e della biochimica.

Anche i dispositivi di rilevazione dei segnali dovranno essere incrementati secondo le esigenze e le disponibilità.

Molte possibilità da proporre in risposta alle molte sfide che si interpongono all'ottenimento del risultato finale, una strada ancora lunga ma ricca di gratificazioni per chi la perseguirà e con l'imperdibile invito a raggiungere la meravigliosa consapevolezza di essersi impegnati per qualcosa di buono.

BIBLIOGRAFIA

- [1] **“Cells renewal in adult mouse tissues”**, Joshua L. Edwards. and Robert E. Klein , pag. 437-453, 10 Ottobre 1960
- [2] **“The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction”**, Stephen F. Badylak, CELL & DEVELOPMENTAL BIOLOGY, Vol. 13, 2002: pag. 377–383
- [3] **“Decellularization of tissues and organs”** Thomas W. Gilbert, Tiffany L. Sellaro, Stephen F. Badylak, Biomaterials 27 (2006) 3675–3683, 14 Febbraio 2006
- [4] **“Whole-Organ Tissue Engineering: Decellularization and Recellularization of Three-Dimensional Matrix Scaffolds”** , Stephen F. Badylak, Doris Taylor, and Korkut Uygun, The Annual Review of Biomedical Engineering, 2011, vol 13, pag 27–53, 8 Marzo 2011
- [5] **“Perfusion-decellularized matrix: using nature’s platform to engineer a bioartificial heart”** Harald C Ott, Thomas S Matthiesen, Saik-Kia Goh, Lauren D Black, Stefan M Kren, Theoden I Netoff & Doris A Taylor, NATURE MEDICINE VOLUME 14, NUMBER 2, FEBRUARY 2008, 13 pag 213- 221, gennaio 2008
- [6] **“Heart regeneration”** Michael A. Laflamme & Charles E. Murry, NATURE ,VOL 473 , MAY 2011, pag 326-335, 19 Maggio 2011
- [7] **“Procedure for Lung Engineering”** Elizabeth A. Calle, Thomas H. Petersen, Laure E. Niklason, Journal of Visualized Experiments, 49, e2651, 8 Marzo 2011
- [8] **“Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix”**, Basak E Uygun¹, Alejandro Soto-Gutierrez, Hiroshi Yagi, Maria-Louisa Izamis, Maria A Guzzardi, Carley Shulman, Jack Milwid, Naoya Kobayashi, Arno Tilles, Francois Berthiaume, Martin Hert, Yaakov Nahmias, Martin L Yarmush & Korkut Uygun, NATURE MEDICINE JUNE 2010, 13 Giugno 2010

- [9] **“The Use of Whole Organ Decellularization for the Generation of a Vascularized Liver Organoid”**, Pedro M. Baptista, Mohummad M. Siddiqui, Genevieve Lozier, Sergio R. Rodriguez, Anthony Atala and Shay Soke, HEPATOLOGY, Vol. 53, No. 2, 2011, pag 604-616, Febbraio 2011
- [10] **“Trends in Organ Donation and Transplantation in the United States, 1999–2008”**, R. A. Wolfe, E.C.Roys and R. M. Merion, American Journal of Transplantation 2010; 10 (Part 2), pag. 961–972, Wiley Periodicals Inc, 18 Dicembre 2009
- [11] **“Organ transplantation—how much of the promise has been realized?”**, Robert I Lechler, Megan Sykes, Angus W Thomson & Laurence A Turka, NATURE MEDICINE VOLUME 11, NUMBER 6, JUNE 2005, 3 Giugno 2005
- [12] **“Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation”**, Claire M. Vajdic and Marina T. van Leeuwen, Int. J. Cancer, Vol 125, pag. 1747–1754 (2009), 2 Marzo 2009
- [13] **“Effect of reduced immunosuppression after kidney transplant failure on risk of cancer: population based retrospective cohort study”**, Marina T van Leeuwen, lecturer, epidemiologist, Angela CWebster, Margaret R E McCredie, John H Stewart, Stephen P McDonald, Janaki Amin, John M Kaldor, Jeremy R Chapman, Claire M Vajdic, Andrew E Grulich, BMJ, ONLINE FIRST, 2010; 340:c570
- [14] **“Structure stabilizing forces in the glomerular tuft”**, Wilhelm Kritz., Marlies Elger, Peter Mundel, Kevin V. Lemley, Journal of the American society of nephrology, Vol.5, Numero 10, 1995, pag. 1731-1739, 3 Novembre 1994
- [15] **“Modeling Transport in the Kidney: investigating Function and Dysfunction”**, Aurélie Edwards, American Physiological Society, Am J Physiol Renal Physiol, 4 Novembre 2009
- [16] **“A mathematical model of O₂ transport in the rat outer medulla. I. Model formulation and baseline results”**, Jing Chen, Anita T. Layton and Aurelie Edwards, American Physiological Society, Am J Physiol Renal Physiol, AJP-Renal Physiol • VOL 297 • AUGUST 2009, pag. 517-536, 29 Aprile 2009

[17] **“A mathematical model of O₂ transport in the rat outer medulla. II. Impact of outer medullary architecture”**, Jing Chen, Aurelie Edwards, and Anita T. Layton, *Am J Physiol Renal Physiol*, *AJP-Renal Physiol* • VOL 297 • AUGUST 2009, pag. 537-547, 29 Aprile 2009

[18] **“Oxygen transport across vasa recta in the renal medulla”**, Whensheng Zhang, Aurelie Edwards, *AJP-Heart Circ Physiol* • VOL 283 • SEPTEMBER 2002, pag.1042-1055, 10 Maggio 2002

[19] **“Cell and biomolecule delivery for regenerative medicine”**, Ian O Smith and Peter X Ma, *SCIENCE AND TECHNOLOGY OF ADVANCED MATERIALS*, Vol.11 2010, 014102, 22 Febbraio 2010

[20] **“Adult Stem Cell Lines in Regenerative Medicine and Reconstructive Surgery”**, Claudius Conrad and Ralf Huss, *Journal of Surgical Research* 124 (2005), pag.201–208, 1 Giugno 2004

[21] **“Defining Molecular Cornerstones during Fibroblast to iPS Cell Reprogramming in Mouse”**, Matthias Stadtfeld, Nimet Maherli, David T. Breault and Konrad Hochedlinger, *Cell Stem Cell* 2, March 2008, Elsevier Inc., pag. 230–240, Marzo 2008

[22] **“In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state”**, Marius Wernig, Alexander Meissner, Ruth Foreman, Tobias Brambrink, Manching Ku, Konrad Hochedlinger, Bradley E. Bernstein & Rudolf Jaenisch, *Nature*, Vol 44, pag. 318-324, 19 Luglio 2007

[23] **“Decellularized Rhesus Monkey Kidney as a Three-Dimensional Scaffold for Renal Tissue Engineering”**, Karina H. Nakayama, B.S., Cynthia A. Batchelder, Ph.D., Chang I. Lee, Ph.D. and Alice F. Tarantal, *TISSUE ENGINEERING: Part A*, Volume 16, Number 7, 2010, pag.2207-2216.

[24] **“Whole Organ Decellularization - A Tool for Bioscaffold Fabrication and Organ Bioengineering”**, Pedro M. Baptista, Giuseppe Orlando, Sayed-Hadi Mirmalek-Sani, Mohummad Siddiqui, Anthony Atala and Shay Soker, 2009 IEEE, 978-1-4244-3296- 7/09, pag 6526-6529, 2 Settembre 2009

[25] **“Embryonic Stem Cells Proliferate and Differentiate when Seeded into Kidney Scaffolds”**, Edward A. Ross, Matthew J. Williams, Takashi Hamazaki, Naohiro Terada, William L. Clapp, Christopher Adin, Gary W. Ellison, Marda Jorgensen, And Christopher D. Batich, *J Am Soc Nephrol, JASN*, Vol 20, pag. 2338–2347, 22 Luglio 2009

[26] **“Detailed characterization of the mouse embryonic stem cell transcriptome reveals novel genes and intergenic splicing associated with pluripotency”**, Galih Kunarso, Kee-Yew Wong, Lawrence W Stanton and Leonard Lipovich, *BMC Genomics* 2008, 9,155, 10.1186/1471-2164-9-155, 9 Aprile 2008

[27] **“The diffusion coefficient of oxygen in respiring kidney and tumour tissue”**, N.T.S. Evans, P.F.D. Naylor, T.H. Quinton, *Respiration Physiology*, Vol.43, issue 3, Marzo 1981, pag.179-188, 8 Gennaio 2003

[28] **“Glomerular dimensions in spontaneously hypertensive rats: effects of AT1 antagonism”**, Michelle M. Kett, Daine Alcorn, John F. Bertram, Warwick P. Anderson, *Journal of Hypertension*, 1996, Vol. 14, No 1, pag.107-113, 13 Ottobre 1995

[29] **“Effect of angiotensin II antagonism on the regression of kidney disease in the rat”**, Andrea Remuzzi, Elena Gagliardini, Chiara Donadoni, Anna Fassi, Fabio Sangalli, Maria Serena Lepre, Giuseppe Remuzzi and Ariela Benigni, *Kidney International* (2002) 62, pag.885–894, 19 Aprile 2002

[30] **“Effects of Oxygen on Mouse Embryonic Stem Cell Growth, Phenotype Retention, and Cellular Energetics”**, Daryl E. Powers, Jeffrey R. Millman, Ryan B. Huang, Clark K. Colto, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 101, No. 2, October 1, 2008, pag. 241-254, 12 Maggio 2008

[31] **“Oxygen supply and oxygen-dependent gene expression in differentiating embryonic stem cells”**, Max Gassmann, Joachim Fandrey, Sandrine Bichet, Maria Wartenbergs, Hugo H. Marti, Christian Bauer, Roland H. Wenger and Helmut Acker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 93 (1996), pag 2867-2872, 21 Dicembre 1995

Dati statistici tratti dal sito dello **“United States Renal Data System”**

APPENDICE 1

Preparazione delle soluzioni

PBS + SODIO AZIDE 0,05%

PM = 65,01 g/mol

E' utile preparare una madre al 5% da diluire poi 1:100 quando necessario.

Es. pesare 2 g. di sodio azide (TOSSICA, PESARE SOTTO CAPP A CHIMICA)

Sciogliere in 40 ml di PBS 1X

Quando serve diluire 1:100 in PBS 1x (preparare 1 L per ogni esperimento)

Il PBS + sodio azide allo 0,05% viene utilizzato per la preparazione della maggior parte delle soluzioni necessarie negli esperimenti di decellularizzazione.

TUTTE LE SOLUZIONI CONTENENTI SODIO AZIDE VANNO PREPARATE SOTTO CAPP A CHIMICA.

TRYTON X- 100 3%

Per 200 ml di soluzione:

Sciogliere 6 ml di Tryton x-100 in 200 ml di PBS + sodio azide 0,05%

CaCl₂ 5 mM + MgSO₄ 5 mM

Per un volume totale di 200 ml di soluzione:

CLOCURO DI CALCIO :

PM = 147,02 g/mol

$(5 \times 10^3 \text{ mol}/1000 \text{ ml}) \times 200 \text{ ml} = 10^3 \text{ mol}$

$$10^3 \text{ mol} \times 147,02 \text{ g/mol} = 0,147 \text{ g}$$

SOLFATO DI MAGNESIO

$$\text{PM} = 246,48 \text{ g/mol}$$

$$(5 \times 10^3 \text{ mol/1000 ml}) \times 200 \text{ ml} = 10^3 \text{ mol}$$

$$10^3 \text{ mol} \times 246,48 \text{ g/mol} = 0,247 \text{ g}$$

Sciogliere i due Sali in 200 ml di PBS + sodio azide 0,05%

NaCl 1M

$$\text{PM} = 58,44 \text{ g/mol}$$

$$(1 \text{ mol/1000 ml}) \times 200 \text{ ml} = 0,2 \text{ mol}$$

$$0,2 \text{ mol} \times 58,44 \text{ g/mol} = 11,688 \text{ g}$$

Sciogliere in 200 ml di PBS + sodio azide 0,05 %

DNase 0,0025% in NaCl 100 mM, CH₃COONa 50 mM e Mg Cl₂ 10mM

Preparare 200 ml di NaCl 100 mM, CH₃COONa 50 mM e Mg Cl₂ 10mM

NaCl 100 mM

$$\text{PM} 58,44 \text{ g/mol}$$

$$(100 \times 10^3 \text{ mol/1000 ml}) \times 200 \text{ ml} = 20 \times 10^3 \text{ mol}$$

$$20 \times 10^3 \text{ mol} \times 58,44 \text{ g/mol} = 1,169 \text{ g}$$

Acetato di Sodio CH₃COONa 50 mM

$$\text{PM} = 82,03 \text{ g/mol}$$

$$(50 \times 10^3 \text{ mol/1000 ml}) \times 200 \text{ ml} = 10 \times 10^3 \text{ mol}$$

$$10 \times 10^3 \text{ mol} \times 82,03 \text{ g/mol} = 0,820 \text{ g}$$

Cloruro di magnesio Mg Cl₂ 10mM

PM = 203,31 g/mol

$(10 \times 10^3 \text{ mol}/1000 \text{ ml}) \times 200 \text{ ml} = 2 \times 10^3 \text{ mol}$

$2 \times 10^3 \text{ mol} \times 203,31 \text{ g/mol} = 0,407 \text{ g}$

Portare la soluzione a PH 5

DNase 0,0025%

Pesare 5 mg di DNase con la micro bilancia e sciogliere nella soluzione preparata

SDS 4 %

Per 200 ml di soluzione :

Pesare 8 g di SDS (sotto cappa) e sciogliere in 200 ml di PBS + sodio azide 0,05 %

COLORAZIONE CON PKH26

(colorante di membrana -SIGMA)

Per 2×10^7 cells (vedi data sheet nel flacone)

10. Staccare le cellule con la tripsina indicata per il tipo di cellulare in uso e, dopo aver bloccato l'azione della tripsina, pellettare la sospensione cellulare;
11. Aspirare il sovrnatante e lavare con Medium serum free;
12. Centrifugare 1'200 rpm per 5 min.
13. Aspirare il sovrnatante e risospendere in 1 ml di *Diluente C*;
14. Preparare 1 ml di soluzione 1:250 di *PKH26* (concentrazione finale di 4uM) in *Diluente C* e risospendere;
- 15.

Soluzione madre (1mM) PKH26 4ul \longrightarrow Soluzione 4uM (1ml
volume finale) 996 ul Diluente C

Aggiungere la soluzione di PKH26 e Diluente C e risospendere

1. Incubare a temperatura ambiente per 2-5 min invertendo di tanto in tanto il tubo per omogenare la soluzione;
2. Stoppare le staining aggiungendo un uguale volume di FCS, in questo caso 2 ml, e incubare per 1 min;
3. Diluire in un uguale volume di medium completo, 4 ml;
4. Centrifugare 1200 rpm per 5 min;
5. Aspirare il sovrnatante, risospendere in 10 ml di Medium Serum free e trasferire le cellule in una nuova provetta per iniziare i lavaggi
6. Lavare in totale 3 volte con 10 ml Medium serum free;
7. Procedere con una conta sia per la tossicità sia perchè la colorazione dimezza il numero delle cellule;
8. Dopo la conta le cellule possono essere risospese in medium completo o in fisiologica se iniettate.

Tecnica alternativa di colorazione istologica
IMMUNOPEROSSIDASI ANTICOLLAGENE IV

- Vetrini : Rene ratto CD sano (controllo)
- : Rene decellularizzato
- : Rene ricellularizzato

- Metanolo + H₂O₂ 100 : 1 (200 ml + 2 ml) 30' RT

- PROTEINASI 1 : 1000 10' 37° C

- **Ab I** : rabbit anti-mammalian collagen IV 1: 50 o/n 4° C

- **Ab II** : goat anti rabbit biotinilato 1:150 1h RT

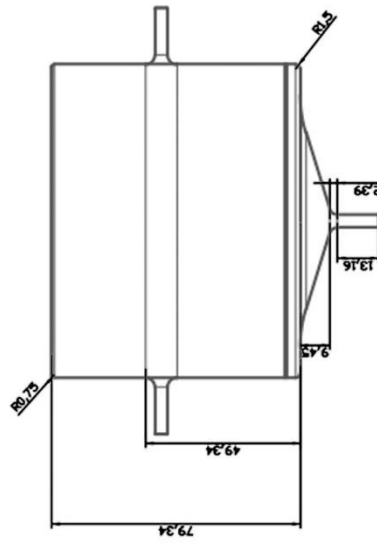
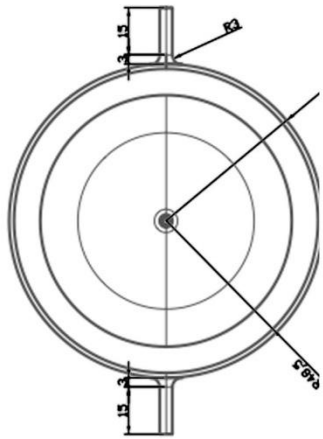
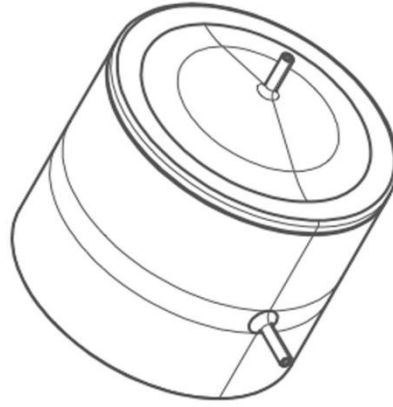
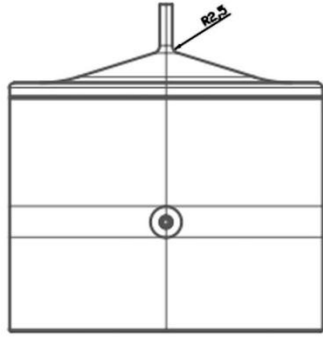
- **DAB** : sviluppo bloccato a 3'

OSSERVAZIONI : Colorazione

matrice è Rene decellularizzato: indica se la rete di collagene nella
integra o se il tessuto è rovinato.

Rene ratto di controllo: si nota la presenza di collagene
a libello dei tubuli e della capsula di Bowman.

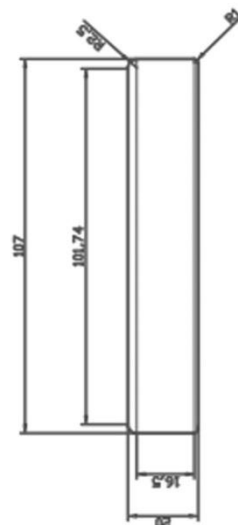
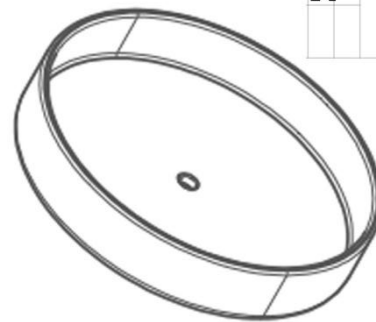
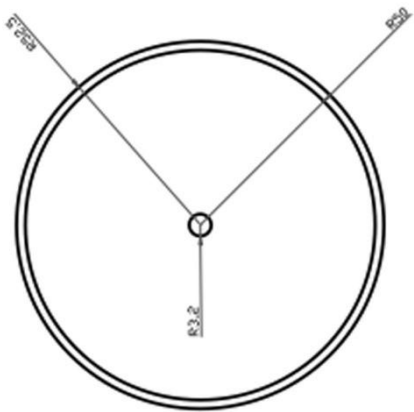
APPENDICE 2



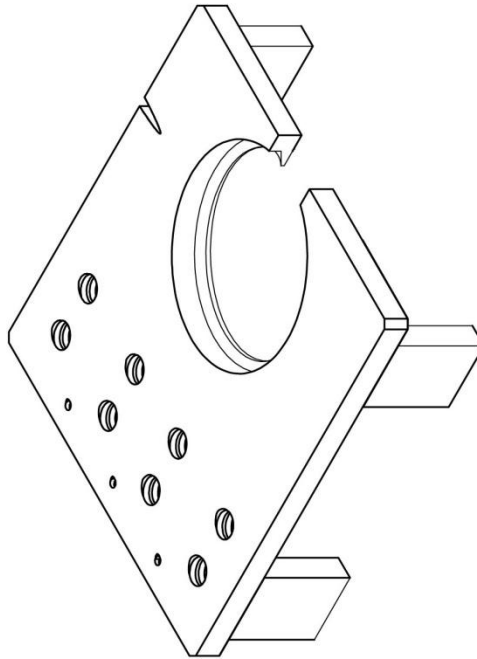
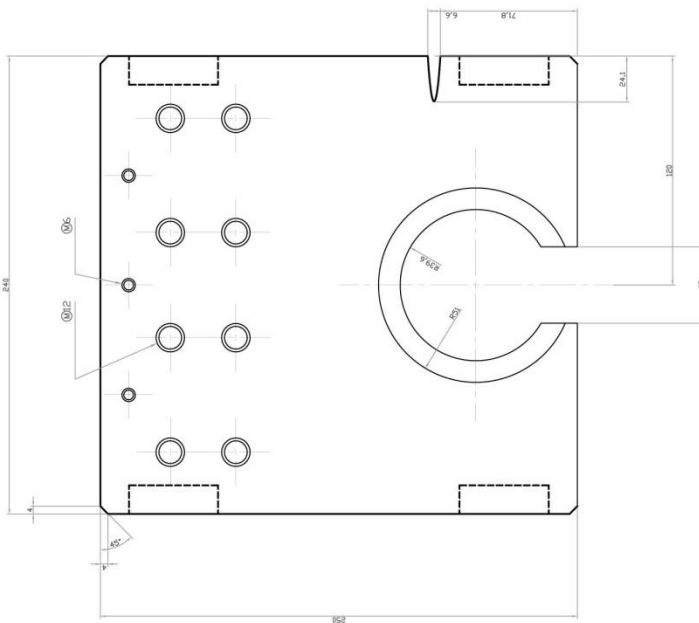
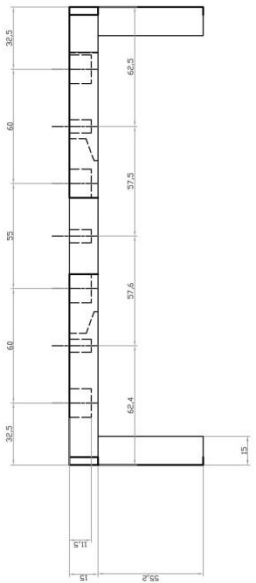
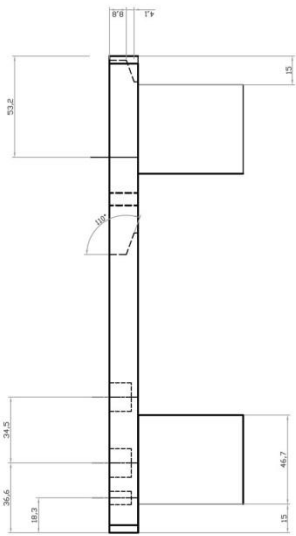
Rigenerazione di organi in vitro; progetto e sperimentazione di metodiche per la decellularizzazione e ricellularizzazione del rene

DESCRIZIONE		CAMERA		Tavola n° 1	
Descrizione articolo:	AA 2010/2011	Descrizione articolo:	Camera in vetro per perfusione rene	Scala:	1:1
Data di creazione:	21-03-2011	Data di creazione:	21-03-2011	Tolleranze Generali:	
Materiale:	Vetro	Quote senza cifre decimali: ±0.2			
Creato da:	Sarah Mapelli	Quote con una cifra decimale: ±0.1			
Relatore:	Manuela Teresa Raimondi	Quote con due cifre decimali: ±0.05			



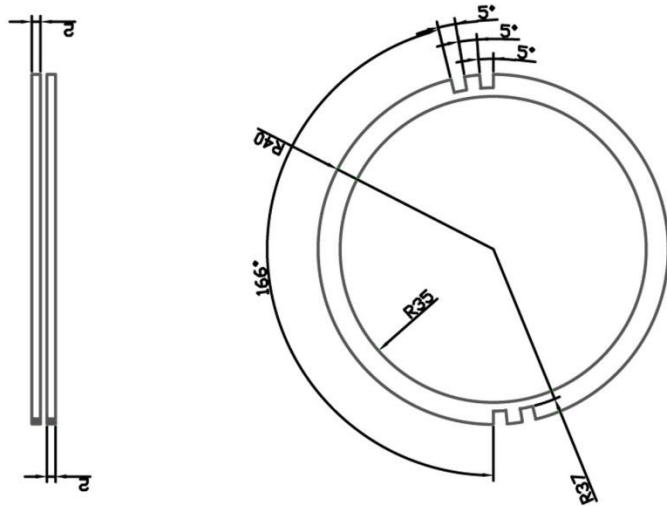


Rigenerazione di organi in vitro: progetto e sperimentazione di metodiche per la decellularizzazione e ricellularizzazione del rene		DESCRIZIONE COPERCHIO CAMERA	
AA 2010/2011	Descrizione articolo: Coperchio in vetro per camera di perfusione	Tavola n° 2	
	Data di creazione: 21-03-2011	Scala: 1:1	
	Materiale: Vetro	Tolleranze Generali:	
	Creato da: Sarah Mapelli	Quote senza cifre decimali: ±0.2	
	Relazione: Manuela Teresa Raimondi	Quote con una cifra decimale: ±0.1	
		Quote con due cifre decimali: ±0.05	

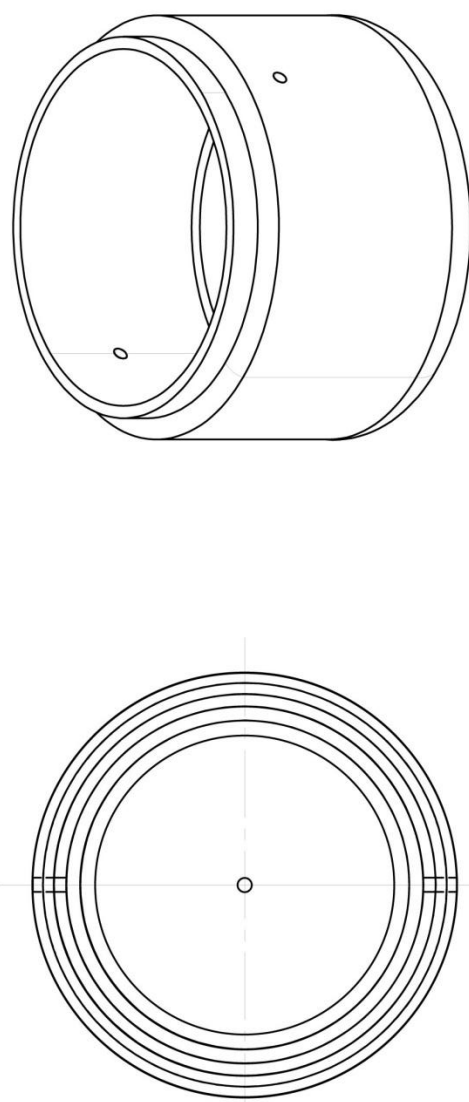
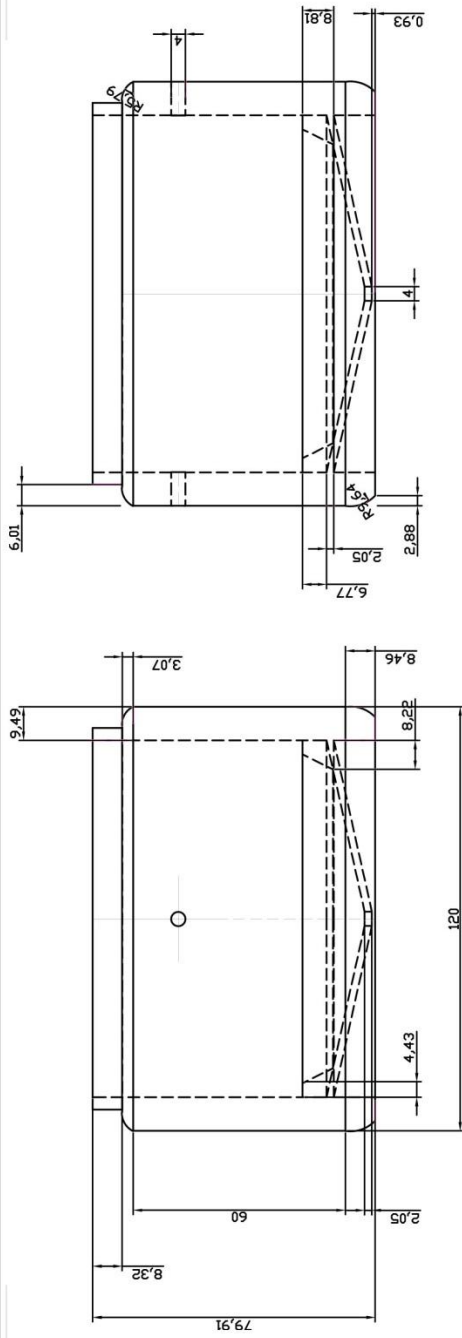


Rigenerazione di organi in vitro: progetto e sperimentazione di metodiche per la decellularizzazione e ricellularizzazione del fegato

Descrizione		SUPPORTO		Tavola n° 3	
Descrizione articolo:	Base per supporto bioreattore e tubi			Scale:	1:1
Data di creazione:	17-02-2011			Tolleranze Generali:	
Materiali:	PMMA			Quote senza cifre decimali: ±0.2	
Creata da:	Sarah Mapelli			Quote con una cifra decimale: ±0.1	
Relatore:	Manuela Teresa Raimondi			Quote con due cifre decimali: ±0.05	

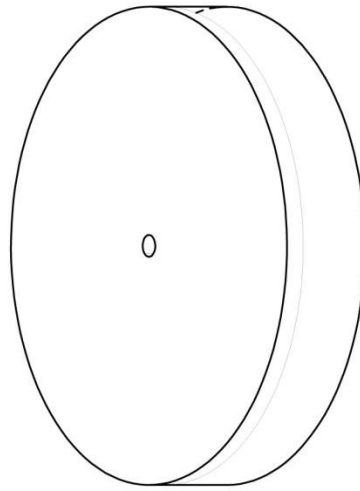
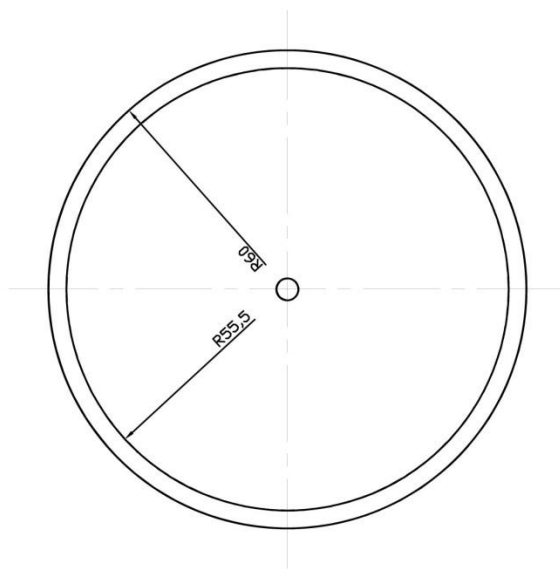
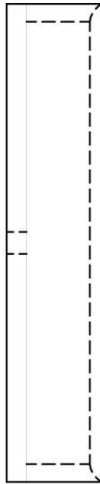
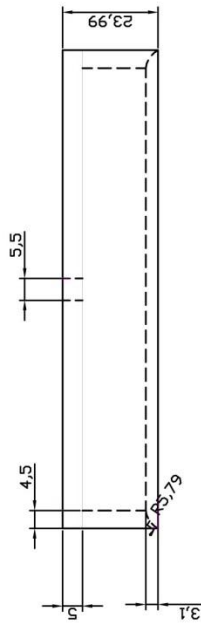


Rigenerazione di organi in vitro: progetto e sperimentazione di metodiche per la decellularizzazione e ricellularizzazione del rene		Tavola n° 4	
Ind. Data	AA 2010/2011	Descrizione	DISCO DI SUPPORTO
Descrizione articolo:		Doppio disco metallico di supporto rene	
Data di creazione:		25-03-2011	
Scala:		1:1	
Materiale:		Acciaio AISI 316L	
Creato da:		Sarah Mapelli	
Relatore:		Manuela Teresa Raimondi	
Tolleranze Generali:		Quote senza cifre decimali: $\pm 0,2$ Quote con una cifra decimale: $\pm 0,1$ Quote con due cifre decimali: $\pm 0,05$	



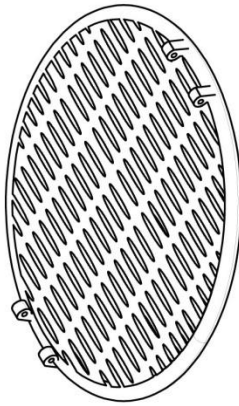
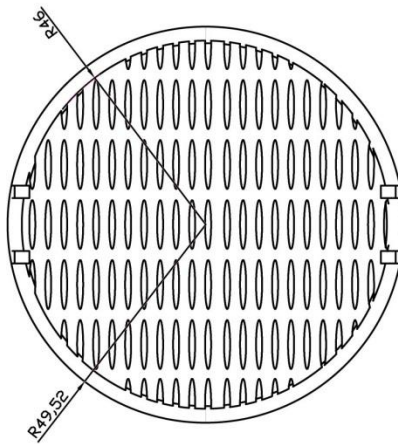
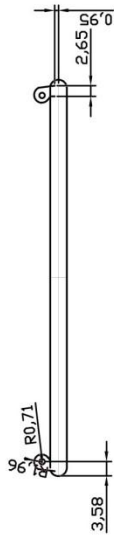
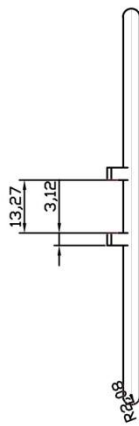
Rigenerazione di organi in vitro: progetto e sperimentazione di metodiche per la decellularizzazione e ricellularizzazione del rene

AA 2010/2011		Descrizione articolo: Camera di perfusione rene, primo prototipo		Tavola n° 5	
Data di creazione: 15-02-2011		Descrizione: PRIMO PROTOTIPO-CAMERA		Scale: 1:1	
Materiale:	Vetro	Tolleranze Generali:			
Creato da:	Sarah Mapelli	Quote senza cifre decimali: ±0.2			
Relatore:	Manuela Teresa Raimondi	Quote con una cifra decimale: ±0.1			
		Quote con due cifre decimali: ±0.05			



Rigenerazione di organi in vitro: progetto e sperimentazione di metodiche per la decellularizzazione e ricellularizzazione del rene

DESCRIZIONE		COPERCHIO PROTOTIPO	
AA 2010/2011	Descrizione articolo:	Coperchio camera in vetro primo prototipo	Tavola n° 6
	Data di creazione:	15-02-2011	Scala: 1:1
	Materiale:	Vetro	Tolleranze Generali: Quote senza cifre decimali: ±0.2 Quote con una cifra decimale: ±0.1 Quote con due cifre decimali: ±0.05
	Creato da:	Sarah Mapelli	
	Relatore:	Manuela Teresa Raimondi	



Ripiegatura di organi in vitro: progetto e sperimentazione di metodiche per la decellularizzazione e ricellularizzazione del rene

AA 2010/2011	Descrizione articolo:	Disco metallico primo prototipo
	Data di creazione:	15-02-2011
	Materiale:	Acciaio AISI 316L
	Creato da:	Sarah Mapelli
	Relatore:	Manuela Teresa Raimondi
	Descrizione	PROTOTIPO DISCO
		Tavola n° 7
	Scale:	1:1
	Tolleranze Generali:	
	Quote senza cifre decimali: ±0.2	
	Quote con una cifra decimale: ±0.1	
	Quote con due cifre decimali: ±0.05	

RINGRAZIAMENTI

*Vorrei ringraziare l'Istituto Mario Negri di Bergamo
per l'opportunità di frequentare un
ambiente lavorativo e dei laboratori
all'avanguardia
per tecnologie e conoscenze*

In particolare ringrazio

*La Dott.sa Marina Figliuzzi,
che per la gentilezza e la disponibilità infinita
ad insegnare e a capire
è un'ottima Maestra*

*Le Dott.se Barbara Bonandrini,
Irene Cattaneo e
Cristina Cavagnini,
che con il loro impegno,
dedizione e competenza
rappresentano l'essenza della Ricerca.*

*... E un doveroso ringraziamento a
Chi mi ha accompagnato in questi anni..*

*...A Toni per tutti i tè alla vaniglia
..A Gruosso per il sostegno
...Alla Tib, a Luca Vianello, alla Gens Julia, a Ema
...A Bolis, che mi aiuta a non smettere di crederci...
... e alla mia famiglia....se mai capirà la mia scelta...*