

POLITECNICO DI MILANO

Facoltà di Ingegneria dei Sistemi

Corso di Laurea Specialistica in Ingegneria Biomedica



**INGEGNERIA DEL TESSUTO UROVESCICALE:
CARATTERIZZAZIONE DELLA MATRICE
DECELLULARIZZATA E SVILUPPO DI UN SISTEMA DI
COLTURA PER LA SUA SOLLECITAZIONE MECCANICA IN
FASE DI RICELLULARIZZAZIONE *IN VITRO***

Relatore:

Prof. Ing. Monica SONCINI

Correlatore:

Ing. Filippo CONSOLO

Tesi di laurea di:

Alberto URBAN

Matr. 751767

Anno Accademico 2011 - 2012

INDICE

SOMMARIO	I
ABSTRACT	X
INTRODUZIONE	1
CAPITOLO 1: MEDICINA RIGENERATIVA E INGEGNERIA DEI TESSUTI NELL'APPARATO UROVESCICALE: STATO DELL'ARTE	4
1.1 Anatomia e fisiopatologia della vescica	5
1.1.1 Anatomia	5
1.1.2 Fisiologia	7
1.1.3 Patologia	9
1.2 Scaffold utilizzati per la rigenerazione del tessuto di vescica	12
1.2.1 Scaffold sintetici	13
1.2.2 Scaffold biologici	16
1.2.2.1 Scaffold ottenuti da polimeri naturali	17
1.2.2.2 Scaffold ottenuti da tessuti decellularizzati	20
1.3 Decellularizzazione dei tessuti di vescica	24
1.3.1 Processo di decellularizzazione: stato dell'arte	24
1.3.1.1 Agenti chimici	26
1.3.1.2 Agenti biologici	27
1.3.1.3 Agenti fisici	28
1.3.2 Tecniche di decellularizzazione	29
1.3.3 Caratterizzazione del tessuto decellularizzato	30
1.4 Sistemi di coltura per il tessuto di vescica: coltura statica vs. coltura dinamica ...	33
CAPITOLO 2: CAMPAGNE DI DECELLULARIZZAZIONE DELLA VESCICA: SET-UP E PROTOCOLLI PER L'OTTENIMENTO E LA CARATTERIZZAZIONE DI MATRICI DECELLULARIZZATE	41
2.1 Set-up e protocollo di decellularizzazione	42
2.1.1 Set-up	42
2.1.2 Protocollo di decellularizzazione	46
2.2 Caratterizzazione della matrice decellularizzata	49
2.2.1 Analisi istologica	50

2.2.2	Analisi del contenuto di DNA e RNA.....	51
2.2.3	Caratterizzazione meccanica.....	52
2.2.3.1	Prova di cistometria.....	52
2.2.3.2	Prova di trazione monoassiale.....	58
2.2.3.3	Prova di permeabilità	61
2.3	Analisi statistica	67
CAPITOLO 3: PROGETTAZIONE DEL SISTEMA DI COLTURA DINAMICA DI CAMPIONI DI VESCICA DECELLULARIZZATI E RICELLULARIZZATI.....		69
3.1	Progettazione del sistema di coltura dinamica: definizione delle specifiche di progetto del bioreattore.....	70
3.1.1	Progettazione del bioreattore per la perfusione di patch di vescica da ricellularizzare	72
3.1.1.1	Modifica dell'alloggiamento per lo scaffold.....	74
3.1.1.2	Modifica del reservoir	79
3.1.2	Set-up del sistema di coltura	83
3.2	Protocollo di stimolazione del campione di tessuto nel sistema di coltura.....	86
3.2.1	Determinazione delle condizioni di lavoro del sistema di coltura	86
3.2.1.1	Modello analitico dello stato di sollecitazione sul patch di vescica.....	88
3.2.1.2	Modellizzazione computazionale dello stato di sollecitazione del patch di vescica nel bioreattore	93
3.2.2	Collaudo e messa in opera del prototipo di sistema di coltura realizzato	96
3.2.2.1	Prove di tenuta idraulica.....	96
3.2.2.2	Prove di verifica del mantenimento della sterilità.....	97
CAPITOLO 4: RISULTATI E DISCUSSIONE.....		105
4.1	Processo di decellularizzazione dell'organo intero di vescica.....	105
4.1.1	Protocollo di decellularizzazione	105
4.1.2	Caratterizzazione della matrice decellularizzata.....	107
4.1.2.1	Analisi istologica.....	107
4.1.2.2	Analisi del contenuto di DNA e RNA.....	110
4.1.2.3	Prova di cistometria.....	112
4.1.2.4	Prova di trazione monoassiale.....	116
4.1.2.5	Prova di permeabilità	123

4.2	Protocollo di stimolazione del campione di tessuto nel sistema di coltura	126
4.2.1	Determinazione delle condizioni di lavoro del sistema di coltura	126
4.2.1.1	Modello analitico dello stato di sollecitazione sul patch di vescica.....	126
4.2.1.2	Modellizzazione computazionale dello stato di sollecitazione del patch di vescica nel bioreattore	128
4.2.2	Collaudo e messa in opera del prototipo di sistema di coltura realizzato	134
4.2.2.1	Prove di tenuta idraulica.....	135
4.2.2.2	Prove di verifica del mantenimento della sterilità.....	136
	CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI.....	138
	APPENDICE A.....	146
	APPENDICE B	147
	APPENDICE C.....	151
	APPENDICE D	155
	Bibliografia.....	157

SOMMARIO

Introduzione

L'ingegneria del tessuto urovescicale si è focalizzata negli ultimi anni nell'identificazione di materiali alternativi al tessuto gastro-intestinale per le operazioni di *cistoplastica*, ossia la pratica chirurgica gold standard che prevede la rimozione della parte di vescica patologica e la sua sostituzione con un patch in grado di ripristinare la funzionalità dell'organo. L'utilizzo come sostituto di una porzione di tessuto gastrointestinale infatti mostra numerose complicazioni, soprattutto in termini di assorbimento da parte del patch dell'urina accumulata all'interno dell'organo (con conseguente sviluppo di disturbi metabolici) e di infezioni nei tessuti circostanti dovute alla filtrazione di urina.

Le esperienze riportate in letteratura nel campo dell'ingegneria del tessuto dimostrano che i materiali da utilizzare per la realizzazione di un patch che funga da sostituto del tessuto danneggiato devono essere biocompatibili, biodegradabili e devono avere proprietà meccaniche adeguate, in grado di permettere la sostituzione del tessuto di vescica patologico, sia con impianto diretto *in vivo*, sia in seguito a un periodo di coltura cellulare pre-impianto *in vitro* mirato alla ingegnerizzazione della porzione di tessuto da impiantare.

Tra gli approcci analizzati in letteratura per lo sviluppo di nuovi biomateriali, di particolare interesse è il processo di decellularizzazione del tessuto nativo, che genera una matrice priva di cellule e con la sovrastruttura, ossia l'organizzazione delle fibre elastiche e del tessuto connettivo, tipica del tessuto nativo di partenza [1-3]. I vantaggi di questa matrice stanno nelle sue proprietà meccaniche e nelle proprietà di riconoscimento biologico: sono preservate infatti le caratteristiche biomeccaniche del tessuto, dovute principalmente alle fibre della matrice extracellulare che caratterizza l'organo, così come i fattori di bioinduzione, quali ad esempio le sequenze amminoacidiche della matrice, in grado di promuovere l'adesione cellulare al substrato e di guidare la sintesi di nuova ECM. Inoltre,

il processo di decellularizzazione consente di eliminare dal tessuto la componente cellulare e nucleica così da minimizzare le reazioni immunitarie dell'organismo ricevente in seguito a impianto *in vivo*. Infatti, essendo le componenti proteiche della ECM compatibili tra le differenti specie, è possibile utilizzare fonti xenogeniche per le operazioni di cistoplastica nell'uomo.

Il processo di decellularizzazione del tessuto nativo può essere di tipo chimico, fisico o enzimatico. Tra gli agenti più comunemente utilizzati in letteratura ci sono detergenti chimici quali il *Sodiododecilsolfato* (SDS) o soluzioni ipotoniche, enzimi come la *tripsina* o trattamenti fisici come i processi di congelamento e scongelamento del tessuto [4]: l'SDS, così come la tripsina e la variazione di temperatura, nonostante riesca a rimuovere in maniera efficace le cellule dal tessuto, danneggia notevolmente le proteine di membrana, con conseguente compromissione delle proprietà meccaniche della matrice [4]; gli agenti ipotonici invece, pur lisando le cellule senza danneggiare la ECM, non riescono a rimuovere efficacemente i residui cellulari, suscitando così reazioni immunitarie avverse post impianto [4]. Tra tutti i protocolli descritti in letteratura dunque non ce n'è uno che permetta di ottenere una completa rimozione del contenuto cellulare garantendo allo stesso tempo il mantenimento dell'integrità della matrice.

Il presente lavoro di tesi ha come obiettivo la valutazione dell'efficacia di un nuovo protocollo di decellularizzazione, sviluppato nell'ambito di un progetto di ricerca del Laboratorio di Micro e Biofluidodinamica (μ BS Lab) del Politecnico di Milano, andando a caratterizzare le proprietà meccaniche della matrice decellularizzata ottenuta, in modo da definire le potenzialità del tessuto ottenuto come biomateriale per applicazioni di ingegneria dei tessuti della vescica.

Inoltre, questo lavoro di tesi si pone come scopo la progettazione, la realizzazione e il collaudo di un prototipo di camera di coltura (bioreattore) per la sollecitazione *in vitro* di un patch di tessuto decellularizzato e ricellularizzato, e la definizione delle condizioni di lavoro che riproducano una

sollecitazione meccanica del tessuto, in modo da stimolare le cellule seminate in maniera fisiologica.

Materiali e metodi

Protocollo di decellularizzazione di organo intero di vescica

Il protocollo di decellularizzazione valutato in questo lavoro di tesi, realizzato nel contesto di un progetto di ricerca presso il μ BS Lab in collaborazione con il Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie dell'Università degli Studi di Milano, prevede una sollecitazione dinamica ciclica (riempimento e svuotamento dell'organo trattato) con i) una soluzione ipotonica (acqua deionizzata), per causare lisi cellulare per shock osmotico e ii) detergenti non ionici (Triton X-100 e NH_4OH) per rimuovere i residui cellulari dagli strati più interni del tessuto. Cicli di lavaggio con i due agenti decellularizzanti sono stati applicati a diverse durate temporali (9, 13 e 17 ore) e con diversi valori di portata (5 ml/min e 3 ml/min). Il protocollo è stato inoltre confrontato con un protocollo di decellularizzazione statico (incubazione della vescica in soluzione contenente gli stessi agenti decellularizzanti per una durata pari a quella del protocollo dinamico).

Valutazione dell'efficacia del protocollo di decellularizzazione

Per valutare qualitativamente l'efficacia del protocollo utilizzato sono state effettuate analisi istologiche della matrice ottenuta a seguito della decellularizzazione e sono state confrontate con le analisi istologiche del tessuto nativo. Le analisi si sono basate principalmente su tre colorazioni: i) *Ematossilina & Eosina (H&E)*, per osservare la presenza di residui nucleici; ii) *Tricromia di Mallory*, per identificare l'organizzazione delle fibre di collagene all'interno del tessuto connettivo; iii) *Orceina*, per definire presenza e distribuzione delle fibre elastiche nella ECM.

Al fine di valutare in maniera quantitativa l'efficacia del protocollo di decellularizzazione in considerazione, sono state eseguite anche delle analisi del contenuto di DNA ed RNA residuo

all'interno della matrice ottenuta. Tali analisi sono state compiute presso i Laboratori del Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie dell'Università degli Studi di Milano.

La caratterizzazione meccanica della matrice, effettuata per verificare quali siano le sue proprietà meccaniche, quanto si discostino da quelle del tessuto nativo e quindi stabilire se la matrice è idonea ad essere utilizzata come scaffold per la rigenerazione del tessuto, si è basata principalmente su tre prove:

- Test di cistometria: permette di valutare la distensibilità dell'organo intero sia nativo che decellularizzato, andando a misurare la pressione intravesicale (P_{i-v}) che si genera durante il riempimento *ex-vivo* dell'organo stesso. Il set-up utilizzato è mostrato in Figura 1:

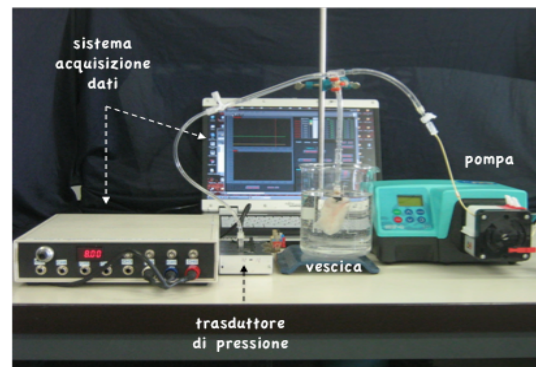


Figura 1: Set-up per le prove di cistometria.

Il set-up di Figura 1 permette: i) il riempimento dell'organo tramite infusione di volumi noti attraverso l'uretra incannulata con un apposito catetere; ii) la misura *real-time* del valore di P_{i-v} tramite un trasduttore di pressione. I risultati delle prove di cistometria corrispondono a curve pressione-volume (curve P-V) che mettono in relazione l'incremento dell' P_{i-v} in risposta all'aumento del volume interno dell'organo. La caratterizzazione dell'organo nativo ha previsto l'infusione di un volume di fluido inferiore al volume di *overstretching*, ossia il volume di riempimento limite oltre il quale si avrebbe una sollecitazione del tessuto non fisiologica al fine di evitare di compromettere l'integrità del tessuto (gli organi nativi sottoposti a cistometria infatti vengono successivamente sottoposti a processo di decellularizzazione). A valle del trattamento di decellularizzazione invece, il volume

infuso nelle vesciche decellularizzate è maggiore del volume di *overstretching* al fine di quantificare i fenomeni di ultrafiltrazione del fluido attraverso le pareti dell'organo. Le analisi condotte hanno permesso di confrontare le curve P-V delle vesciche native con quelle delle vesciche decellularizzate (sia per via statica che per via dinamica), per valutare eventuali alterazioni delle proprietà di distensibilità dell'organo post trattamento di decellularizzazione.

- Prove di trazione monoassiale: sono stati prelevati dalla regione basale dell'organo dei campioni di tessuto secondo diverse direzioni di taglio (longitudinale e trasversale) e su questi sono state eseguite prove di trazione monoassiale fino a rottura del campione. Campioni di tessuto sono stati prelevati ed analizzati sia da organi nativi che decellularizzati (post-trattamento statico e dinamico). Dopo aver acquisito i dati della prova tramite software dedicato, è stata ricavata tramite foglio di calcolo la curva sforzo-deformazione (curva σ - ϵ) associata al campione sottoposto a trazione (Figura 3). Dalla curva σ - ϵ , sono stati estratti e valutati i 6 parametri rappresentati in Figura 2 (definiti in letteratura [5]), rappresentativi del comportamento meccanico del tessuto.

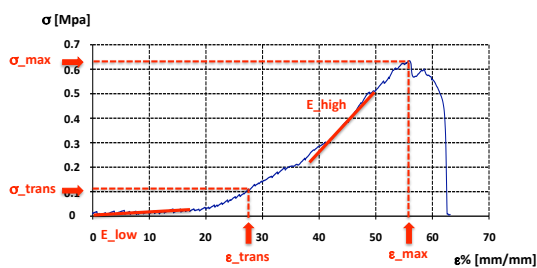


Figura 2: Curva σ - ϵ ricavata dalle prove di trazione monoassiale, con i 6 parametri che sono stati valutati per caratterizzare meccanicamente il tessuto.

Tale analisi ha permesso di eseguire un confronto fra i parametri ricavati da campioni di vescica nativa e quelli dei campioni di matrice decellularizzata, in modo da individuare eventuali differenze nel comportamento meccanico del tessuto a valle del processo di decellularizzazione. Sono stati confrontati anche i parametri relativi ai provini ottenuti in direzione longitudinale ed in direzione trasversale per verificare la

presenza di anisotropie nel comportamento meccanico della matrice decellularizzata.

- Prove di permeabilità: campioni di tessuto sono stati prelevati dalla regione basale di organi nativi e decellularizzati. I campioni sono stati alloggiati in un'apposita camera in grado di generare una perfusione confinata sui campioni (Figura 3).

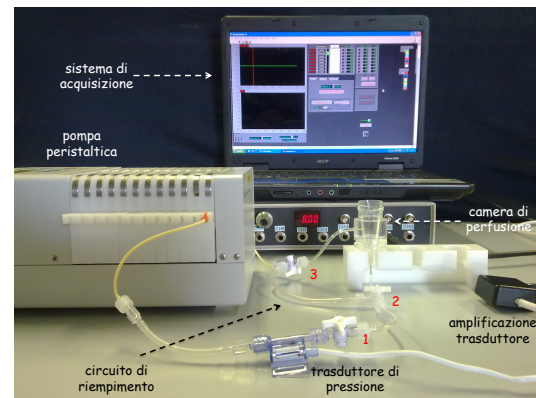


Figura 3: set-up per le prove di permeabilità.

Il set-up sperimentale per la misura del coefficiente di permeabilità (K) ha consentito di effettuare delle prove di permeabilità in controllo di portata, grazie all'utilizzo di una pompa volumetrica per la perfusione dei campioni e di un trasduttore di pressione, di tipo *flow through* che, collegato a una scheda di acquisizione con interfaccia software ha consentito il monitoraggio *real-time* della pressione a cavallo del campione. Le prove sono state effettuate a diverse portate di perfusione, sia per le vesciche native, sia per le vesciche decellularizzate con entrambi gli approcci (statico e dinamico). Dalle prove di permeabilità sono state così estratte delle rette di regressione pressione-portata (curve P-Q). Il valore di K è stato calcolato come l'inverso della pendenza delle rette ottenute.

Progettazione del sistema di coltura dinamica della matrice di vescica ricellularizzata

In Figura 4 è mostrato il disegno CAD del prototipo della camera di coltura (bioreattore) per la sollecitazione dinamica della matrice di vescica progettato, realizzato e collaudato in questo lavoro di tesi.

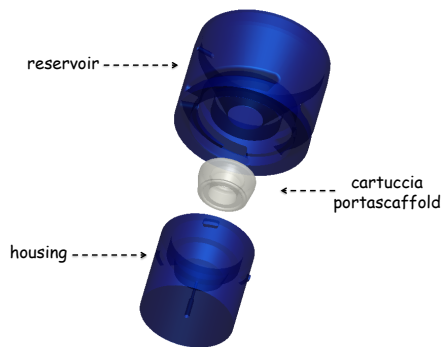


Figura 4: Disegno CAD del prototipo della camera di coltura per la sollecitazione dinamica della matrice di vescica decellularizzata.

Il prototipo è costituito da: i) una cartuccia portasccaffold, dove alloggiare la porzione di matrice decellularizzata (patch) da sottoporre a perfusione (coltura dinamica); ii) un housing, sede di alloggiamento della cartuccia portasccaffold e del canale di ingresso del fluido che va a stimolare il campione; iii) un reservoir, dove viene posizionato il medium per nutrire le cellule seminate nella parte superiore della matrice.

Il prototipo è stato ottenuto apportando modifiche ad un bioreattore, realizzato in un precedente lavoro di tesi, per la co-coltura di cellule stromali e cellule staminali ematopoietiche [6]. Le modifiche sono state effettuate principalmente per adattare la camera sia al tipo di scaffold differente (matrice con basso spessore, deformabile, impermeabile vs. matrice 3D porosa e rigida), sia al tipo di sollecitazione da applicare allo scaffold (distensione e rilassamento di tessuto impermeabile vs. perfusione confinata attraverso uno scaffold poroso); le modifiche hanno permesso inoltre di garantire la specifica di progetto di trasparenza della camera per consentire l'ispezione visiva real-time della sollecitazione imposta sul campione durante il funzionamento del dispositivo.

La modifica principale applicata alla camera di partenza riguarda il portasccaffold: rispetto a quello del bioreattore di partenza, è stata infatti generata nella parte superiore una cava in grado di alloggiare un o-ring per il fissaggio del patch. Le configurazioni con e senza o-ring della cartuccia sono mostrate in Figura 5.



Figura 5: Cartuccia modificata, senza o-ring in disegno CAD (a sinistra) e con o-ring che fissa il patch (a destra).

Un'ulteriore modifica apportata ha riguardato l'aumento del diametro superiore del reservoir: tale modifica è stata introdotta per consentire la chiusura della camera di coltura con un coperchio Petri di diametro interno 35 mm, per garantire in fase di coltura del tessuto ricellularizzato oltre l'ossigenazione e il mantenimento della sterilità anche la visibilità del patch (grazie alla trasparenza del coperchio). Ciò si è verificato essere importante al fine di poter osservare la dinamica di sollecitazione e il comportamento del campione in tempo reale, ed intervenire in maniera tempestiva in caso di imprevisti malfunzionamenti del sistema per la sollecitazione durante la coltura dinamica del patch.

Realizzato il bioreattore, è stato definito, a partire da protocolli descritti in letteratura [6], un protocollo di stimolazione del patch ricellularizzato: il protocollo definito è di tipo ciclico e prevede una fase di distensione lenta del patch (per riprodurre la condizione di riempimento della vescica) della durata di 30 minuti, e una fase di scarico (per riprodurre la condizione di svuotamento rapido dell'organo) della durata di 3 minuti. Successivamente il lavoro di tesi si è concentrato sulla determinazione delle condizioni di lavoro del sistema di perfusione che garantissero una sollecitazione meccanica del patch in grado di stimolare le cellule seminate su di esso in maniera fisiologica (con una stimolazione simile a quella che ricevono *in vivo*). Ciò è stato effettuato in due step: 1) identificazione di un modello analitico, basato sulla legge di Laplace, in grado di mettere in relazione i valori di sforzo e deformazione sviluppati sulle pareti dell'organo (ricavati dalla curva σ - ϵ della prova di trazione monoassiale) con i valori di pressione e volume descritti della curva P-V cistometrica. In particolare, per la

modellizzazione attraverso legge di Laplace sono state considerate due differenti assunzioni riguardo alla geometria della vescica (geometria sferica e geometria sferoidale), in modo da capire quale delle due permettesse di riprodurre più fedelmente il comportamento descritto dalle prove di cistometria; 2) un modello computazionale, utilizzando il software Comsol©, in grado di simulare la sollecitazione meccanica della matrice indotta attraverso il bioreattore a perfusione (Figura 6).

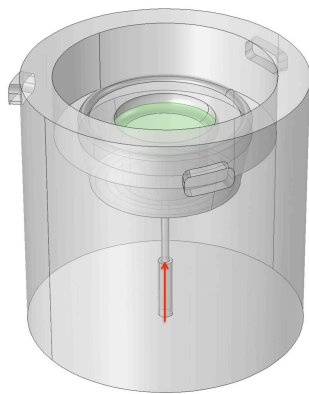


Figura 6: Modello geometrico della cartuccia portasccaffold, con all'interno la matrice (in verde), inserito nell'housing. Il flusso che va a sollecitare il patch segue la direzione della freccia rossa.

Dopo aver identificato il modello analitico migliore per riprodurre, a partire dai valori di σ e ϵ delle prove di trazione monoassiale, il comportamento descritto dalle curve P-V cistometriche (step 1), nello step 2 il modello computazionale ha permesso di valutare lo stato di sollecitazione sviluppato sul patch con 5 differenti valori di portata di ingresso del bioreattore. In particolare, ha permesso di individuare la portata in grado di generare sul patch valori di σ e ϵ che, convertiti in valori di P e V grazie al modello definito nello step 1, identificassero sulla curva P-V cistometrica uno stato di sollecitazione fisiologico (ossia a pressioni inferiori alla pressione massima di riempimento e volumi inferiori del volume di *overstretching*). Quel valore di portata è stato quindi definito come condizione di lavoro da utilizzare per la sollecitazione fisiologica del patch da ricellularizzare.

Infine, il sistema di coltura dinamico è stato messo in opera al fine di effettuare una prova di verifica del mantenimento della sterilità. Tale prova, eseguita riproducendo le condizioni di lavoro da utilizzare in fase di stimolazione del patch ricellularizzato, era mirata a valutare se il sistema, preventivamente sterilizzato in ogni sua componente, fosse in grado di mantenere la sterilità in fase di sollecitazione del patch in condizioni non sterili (cioè all'interno dell'incubatore). Il set-up utilizzato nelle prove di verifica del mantenimento della sterilità è mostrato in Figura 7.

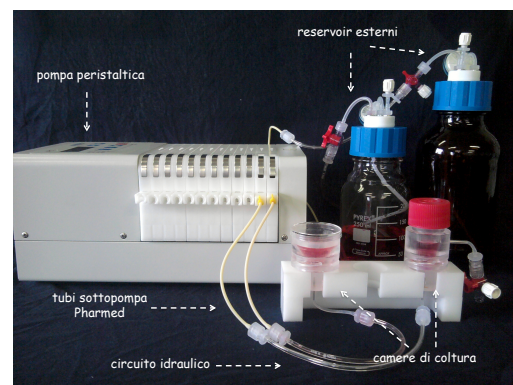


Figura 7: Set-up delle prove di sterilità.

Il sistema prevede l'utilizzo di una pompa peristaltica per il prelievo del medium da due reservoir esterni e la perfusione del patch alloggiato nelle due camere di coltura (quella di partenza e quella modificata, entrambe con all'interno il portasccaffold modificato ed un provino ottenuto da un guanto sterile) con un protocollo ciclico di stimolazione.

Il sistema è stato mantenuto in funzionamento all'interno di un incubatore per un periodo pari a 7 giorni. Prelievi di medium sono stati effettuati a set-point temporali definiti (tempo 0, dopo 5 ore di sollecitazione sotto cappa e dopo 7 giorni di sollecitazione in incubatore); i campioni di medium prelevati dalle due camere sono stati analizzati microbiologicamente al fine di valutare eventuale contaminazione batterica all'interno della camera di coltura.

Risultati

Analisi istologiche e caratterizzazione meccanica della matrice decellularizzata

I risultati delle tre colorazioni istologiche sono mostrati in Figura 8.

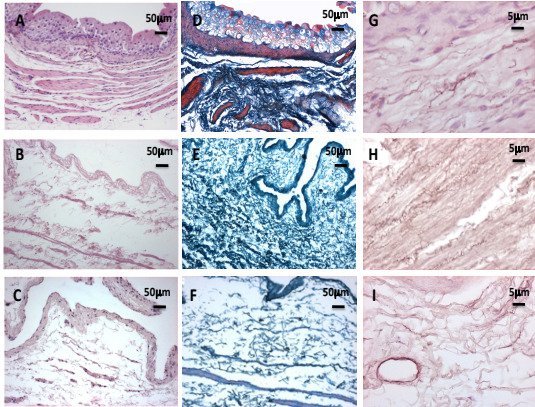


Figura 8: Immagini istologiche di tessuto nativo (A, D, G), decellularizzato per via dinamica (B, E, H), e decellularizzato per via statica (C, F, I) rispettivamente con colorazione H&E, tricromia di Mallory e Orceina.

Dalle istologie di Figura 8 si può osservare che rispetto al tessuto nativo (Figura 8A, D, G), nel tessuto decellularizzato per via dinamica con protocollo di 17 ore a 5 ml/min non sono visibili nuclei cellulari (Figura 8B); inoltre il tessuto decellularizzato per via dinamica mantiene una buona conservazione della distribuzione della fibre di collagene (Figura 8E) sebbene sia visibile una parziale degradazione dell'urotelio rispetto al caso nativo e una alterazione della stratigrafia del tessuto a seguito del trattamento di decellularizzazione (Figura 8B); il tessuto decellularizzato per via statica presenta invece dei residui cellulari (Figura 8C), e la matrice di collagene appare più disorganizzata rispetto al caso dinamico (Figura 8F), evidenziando così un maggiore danneggiamento della matrice. Dall'analisi istologica è possibile osservare comunque come entrambi i protocolli di decellularizzazione (statico e dinamico) non abbiano alterato in maniera significativa la distribuzione e l'integrità delle fibre elastiche (Figura 8H, I).

Macroscopicamente, la parziale perdita di stratigrafia delle fibre di collagene nel tessuto decellularizzato fa sì che la vescica decellularizzata (sia per via statica che per via dinamica) assuma una dimensione

maggiore, dovuta all'azione degli agenti decellularizzanti in fase di decellularizzazione, come mostrato in Figura 9.



Figura 9: Vescica nativa (a sinistra) e decellularizzata (a destra)

L'analisi quantitativa del contenuto di DNA ed RNA residuo nella matrice decellularizzata ha confermato l'efficacia del processo dinamico di decellularizzazione: il DNA infatti è stato ridotto del 95.04% attraverso processo di decellularizzazione dinamica e solo dell' 89.38% nel processo di decellularizzazione statica, mentre l'RNA ha subito una riduzione del 99.91% nel caso dinamico e del 99.70% nel caso statico.

I risultati delle prove di cistometria sono presentati in Figura 10. Come si osserva, il comportamento delle vesciche decellularizzate (Figura 10B per il caso statico, Figura 10C per il caso dinamico), rispetto a quello delle vesciche native, presenta un tratto di curva iniziale a bassa pendenza che corrisponde al riempimento dell'organo, in seguito all'aumento di dimensioni causato dall'azione degli agenti decellularizzanti (Figura 9); il riempimento iniziale è necessario per distendere le pareti dell'organo. Una volta distese, in corrispondenza di un volume chiamato *Zero Pressure Volume (ZPV)*, le vesciche decellularizzate rispondono all'incremento di volume con un effettivo aumento del valore di pressione: i valori di pressione massima registrati durante la prova sono all'interno di un range comparabile con quello osservato nel caso nativo. Il tratto finale a bassa pendenza è dovuto poi alla permeabilità della

matrice, causata dall'eliminazione delle cellule uroteliali dal tessuto (che rendono il tessuto nativo impermeabile).

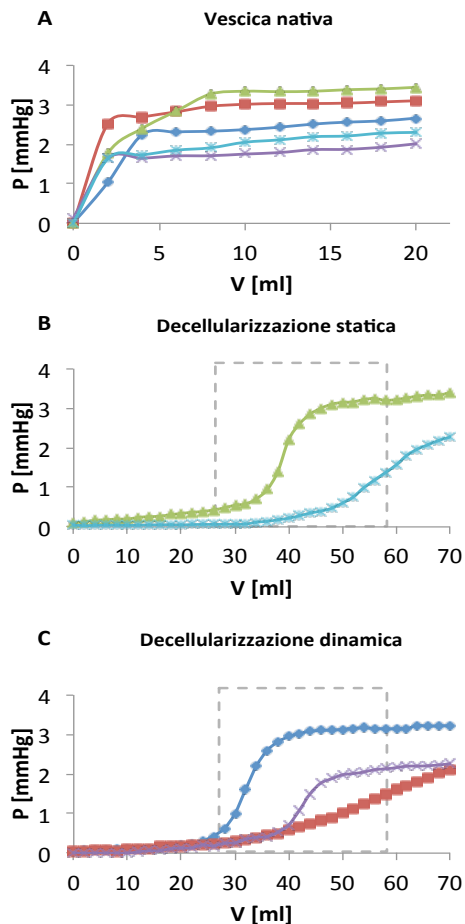


Figura 10: Risultati delle prove di cistometria per le vesciche native (sopra), decellularizzate per via statica (al centro) e per via dinamica (in basso).

Le curve σ - ε ricavate dalle prove di trazione monoassiale, pur caratterizzate da andamenti molto variabili rispetto ai campioni analizzati, hanno fornito valori dei parametri che non evidenziano né differenze significative tra campioni nativi e decellularizzati, né anisotropia del comportamento meccanico della matrice (sia per i tessuti nativi che per i tessuti decellularizzati per via statica e per via dinamica).

Nelle prove di permeabilità, non è stato possibile calcolare il valore di K nei campioni di vescica nativi dal momento che la pressione misurata a cavallo del campione non ha mai raggiunto un valore di regime: il continuo incremento di pressione registrato,

d'altra parte, è coerente con l'impermeabilità caratteristica del tessuto di vescica nativo. Per quanto riguarda i campioni decellularizzati con protocollo statico e dinamico, i valori di K calcolati sono riportati in Figura 11.

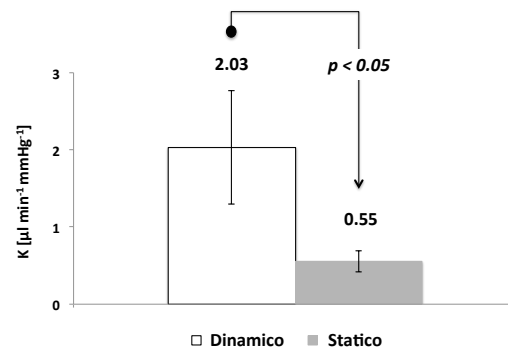


Figura 11: Confronto fra K del tessuto decellularizzato in condizioni dinamiche e statiche.

Come si osserva in Figura 11, il valore del coefficiente K è significativamente minore nel caso di tessuto decellularizzato con protocollo statico; ciò è probabilmente dovuto alla non completa rimozione delle cellule uroteliali (che rendono impermeabile il tessuto nativo) al termine del protocollo statico: la presenza di cellule residue all'interno del tessuto, determina infatti una minore porosità, e quindi una minore permeabilità della matrice rispetto al caso dinamico.

Progettazione del sistema di coltura dinamica della matrice di vescica ricellularizzata

Il bioreattore, dopo essere stato realizzato attraverso lavorazioni alle macchine utensili, è stato collaudato per confermare l'efficacia del progetto in termini di tenuta idraulica della camera di coltura. Le prove di tenuta effettuate sul bioreattore realizzato non hanno evidenziato perdite e/o trafiletti di fluido all'interno della camera.

Per quanto riguarda la definizione delle condizioni di lavoro da applicare all'interno del bioreattore, nello step 1 il modello analitico basato sulla legge di Laplace, con assunzione di geometria sferoidale dell'organo, è stato definito come modello di riferimento in grado cioè di riprodurre più fedelmente il comportamento delle curve P-V

cistometriche. Le curve P-V modellizzate confrontate con la curva P-V sperimentale media sono presentate in Figura 12.

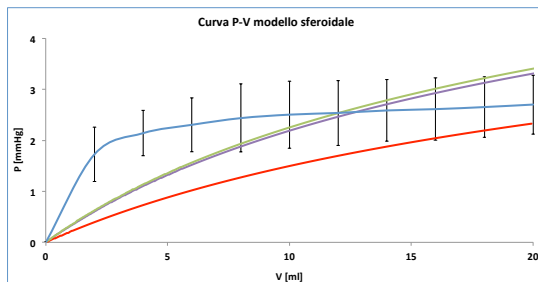


Figura 12: Curva P-V cistometrica media (blu) confrontata con le curve P-V modellizzate tramite legge di Laplace

Nello step 2, il modello computazionale ha permesso di definire, tra tutte quelle analizzate, la portata di 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ come condizione di lavoro del sistema di coltura dinamico. I risultati della simulazione infatti hanno mostrato che una perfusione con portata di 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ per un intervallo di 30 minuti (in base al protocollo assunto dalla letteratura [6]), è in grado di generare sul patch perfuso un range di deformazioni che, convertite in valori di volume teorico tramite il modello di Laplace definito nello step 1, identificano nelle curve P-V cistometriche di vescica nativa volumi corrispondenti alla fase di riempimento fisiologica della vescica, e quindi con pressioni simili alla pressione massima raggiunta dalla vescica in fase di riempimento e con volumi inferiori al volume di *overstretching*, come mostrato in Figura 13.

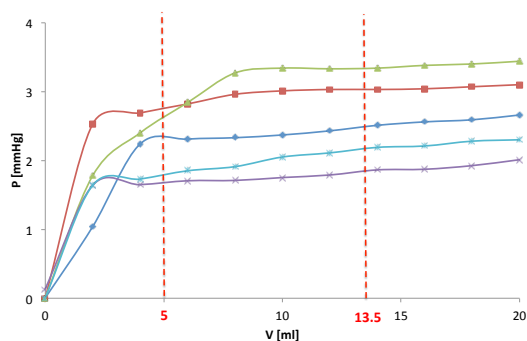


Figura 13: L'intervallo di volumi ricavati dalla simulazione identifica dei tratti delle curve P-V cistometriche di vescica nativa corrispondenti alla fase di riempimento fisiologico dell'organo.

Le prove di verifica del mantenimento della sterilità infine hanno mostrato la capacità del

sistema di mantenere la sterilità dopo 7 giorni di attività in ambiente non sterile (incubatore) sia nel circuito idraulico sia nella parte superiore della camera (disaccoppiata dal circuito a causa della presenza del patch impermeabile), confermando così l'efficacia del coperchio Petri da un punto di vista del mantenimento della sterilità all'interno del bioreattore. Un effetto negativo riscontrato nella messa in opera del sistema durante le prove è stato lo svuotamento del circuito idraulico in fase di sollecitazione. Tale fenomeno potrebbe essere dovuto a evaporazione del medium attraverso le pareti dei tubi del circuito (permeabili per garantire l'ossigenazione del medium al loro interno), a causa di un livello di umidità non appropriato all'interno dell'incubatore. Nonostante ciò, il patch è stato sollecitato per i primi 3 giorni secondo le aspettative, e per i restanti giorni in maniera ridotta, ma in grado di simulare comunque la deflessione di un patch di vescica decellularizzato sollecitato all'interno della camera.

Conclusioni

L'analisi istologica delle matrici ottenute in seguito all'utilizzo del protocollo di decellularizzazione dinamica valutato in questo lavoro di tesi non ha evidenziato nuclei cellulari visibili nel tessuto decellularizzato e ha mostrato un buon mantenimento dell'organizzazione e della sovrastruttura delle fibre della matrice, nonostante un lieve scompaginamento delle stesse che ha portato a un incremento di dimensioni dell'organo rispetto alla vescica nativa. D'altro canto, un lieve scompaginamento della matrice del tessuto è un requisito fondamentale per consentire ai detergenti chimici di penetrare in profondità all'interno del tessuto.

La caratterizzazione meccanica, tramite prove di cistometria, di trazione monoassiale e di permeabilità, ha evidenziato il mantenimento delle proprietà meccaniche e di distensibilità simili a quelle native e la presenza di un coefficiente di permeabilità non nullo dovuto alla (necessaria) eliminazione delle cellule dell'urotelio e allo scompaginamento delle fibre della matrice. A valle di queste osservazioni, può essere dunque affermato che il protocollo di

decellularizzazione dinamico della durata di 17 ore a una perfusione di 5 ml/min sembra essere un valido approccio per ottenere matrici decellularizzate tali da essere utilizzate come scaffold per applicazioni dell'ingegneria del tessuto urovescicale.

Il bioreattore realizzato ha soddisfatto i requisiti di tenuta idraulica, di trasparenza di semplicità di posizionamento dello scaffold e di mantenimento della sterilità in ambiente non sterile per almeno 7 giorni. Il modello matematico e quello computazionale hanno permesso inoltre di identificare come condizione di lavoro per la sollecitazione del patch di vescica nel bioreattore una portata di 1 μ l/min.

In conclusione, da questo lavoro di tesi emerge che sia la matrice risultante dal protocollo di decellularizzazione, sia il bioreattore progettato e realizzato sembrano strumenti validi per applicazioni nel campo dell'ingegneria del tessuto urovescicale. Ulteriori studi sono comunque necessari, quali ad esempio un test di immunogenicità per verificare che la quantità di DNA e proteine residue nella matrice non generino risposte infiammatorie e immunitarie avverse, e campagne sperimentali di ricellularizzazione del patch di matrice decellularizzata, per verificare che le condizioni di lavoro definite nel presente lavoro di tesi sollecitino in maniera efficace il costruito durante la ricellularizzazione della matrice.

Bibliografia

1. Bolland, F., et al., *Development and characterisation of a full-thickness acellular porcine bladder matrix for tissue engineering*. Biomaterials, 2007. **28**(6): p. 1061-70.
2. Rosario, D.J., et al., *Decellularization and sterilization of porcine urinary bladder matrix for tissue engineering in the lower urinary tract*. Regenerative Medicine, 2008. **3**(2): p. 145-156.
3. Yang, B., et al., *Development of a porcine bladder acellular matrix with well-preserved extracellular bioactive factors for tissue engineering*. Tissue Eng Part C Methods, 2010. **16**(5): p. 1201-11.
4. Crapo, P.M., T.W. Gilbert, and S.F. Badylak, *An overview of tissue and whole organ decellularization processes*. Biomaterials, 2011. **32**(12): p. 3233-43.
5. Korossis, S., et al., *Regional biomechanical and histological characterisation of the passive porcine urinary bladder: Implications for augmentation and tissue engineering strategies*. Biomaterials, 2009. **30**(2): p. 266-75.
6. Wallis, M.C., et al., *Feasibility study of a novel urinary bladder bioreactor*. Tissue Eng Part A, 2008. **14**(3): p. 339-48.

ABSTRACT

Introduction

In the last decade, tissue engineering of the urinary bladder focused mainly on the discover of new materials to replace gastrointestinal tissue for bladder surgical procedure known as *augmentation cystoplasty*. Cystoplasty, gold standard for the repair of pathological bladder, includes the removal of bladder damaged tissue and its replacement with a substitute, able to totally re-establish bladder function. Gastrointestinal segments, used as donor tissue for augmentation cystoplasty, show multiple complications, such as urine absorption (with metabolic disturbances) and inflammation of surrounding tissues due to urine ultrafiltration.

According to literature, the ideal materials for replacing damaged tissue must be biocompatible, biodegradable, with adequate mechanic properties, allowing the substitution of the pathological tissue either directly *in vivo* or after a culture period *in vitro* to provide the development of a functional tissue to be implanted.

Among the different approaches considered in previous studies, native tissue decellularization process seems to be a fancy solution, able to remove cells from the extracellular matrix (ECM) of the tissue, keeping the sovrastructure (i.e: matrix 3D architecture) of the native tissue [1-3]. This technique shows different vantages, such as: i) retention of mechanical properties, which rely mainly on ECM fibers; ii) preservation of bioinduction factors, such as aminoacidic sequences, promoting cellular adhesion on the substrate, leading the synthesis of new ECM and minimizing immune reactions after *in vivo* implantation. In addition, since ECM proteins are similar among different species, xenogeneic sources can be utilized for cystoplastic purposes notably increases.

Decellularization process can be handled either with chemical, physical and enzymatic agents. Common agents from these categories are *Sodium dodecyl sulfate (SDS)* and hypotonic solutions as chemical agents, *trypsin* as enzymatic agent and freezing and

thawing as physical agent [4]: *SDS*, like trypsin and the temperature variation, can effectively remove nuclear remnants from the tissue, but tends to disrupt matrix ultrastructure, compromising its mechanical properties [4]; instead, hypotonic agents are able to induce cells lysis without damaging ECM, but can not remove effectively cellular residues, evoking immune reaction [4]. Thus, within all the decellularization protocols developed so far, no one is able at the same time to completely remove cell contents and to preserve ECM integrity.

In this thesis work, the main goal was to evaluate the effectiveness of a new dynamic decellularization protocol, developed by a reasearch group at the μ BS Lab of the Politecnico of Milan, characterizing the mechanical properties of the *Bladder Acellular Matrix (BAM)* obtained, in order to assess its potential use as scaffold for bladder tissue engineering application.

Furthermore, this work aimed to design, realize and test a prototype for a dynamic culture chamber (bioreactor), able to deliver a physiological stimulation *in vitro* to a patch of decellularized tissue seeded with cells, and to define the proper working conditions to induce cellular activity upon the decellularised matrix.

Materials and methods

Dynamic protocol for whole-organ bladder decellularization

A new decellularization protocol, developed by a research group of μ BS Lab in collaboration with the Department of Veterinary Pathology, Hygiene and Public Health of University of Milan, involve a dynamic cyclic infusion of decellularization agents, replicating the natural cyclic filling/voiding dynamics of bladders. The decellularization agents are: i) hypotonic solution (deionized water) to induce cells lysis by osmotic shock and ii) non ionic detergents (Triton X-100 e NH_4OH) to remove cellular residuals from the deeper layers of the native tissue. Washing cycles with those two agents have been applied to whole-organ native bladders with different time periods (9, 13 and 17 hours) and with different flow rates (5 ml/min and 3 ml/min).

A static decellularization campaign was also conducted in order to evaluate the effectiveness of the dynamic decellularization protocol upon static incubation of the native organs in the same decellularization solution with the same time periods.

Evaluation of the decellularization protocol efficiency

Histological analysis on the decellularized matrix has been used to qualitatively evaluate the efficiency of decellularization protocol, in comparison with native tissue. Three stains have been used: i) *Haematoxylin and Eosin (H&E)* staining to evaluate if nucleic structures could be observed within the decellularized tissue; ii) *Mallory's trichrome* stain to visualize collagen fibers within the connective tissue and iii) *Orcein* stain to evaluate the presence and orientation of elastic fibers within the ECM at the end of the decellularization process.

Besides, a quantitative analysis of the DNA and RNA residual content has been performed to evaluate the decellularization efficiency in terms of cell removal. These analyses have been performed within Laboratories belonging to the Department of Veterinary Pathology of University of Milan. Mechanical characterization has been performed to verify if mechanical properties of ECM were different from native ones, and thus to define its possible use in regenerative medicine applications. The characterization consisted in three tests:

- Cystometric analysis: it allows the investigation of whole-organ wall distension properties of both native and decellularized tissue, measuring the intravesical pressure (P_{i-v}) developed during *ex-vivo* organ filling. The experimental set-up, shown in Figure 1, allows to: i) fill the bladder with defined volumes by a catheter through the bladder urethra; ii) measure *real-time* P_{i-v} values with a pressure sensor. Results of this analysis are pressure-volume (P-V) curves that put into relationship P_{i-v} variations with the increase of the volume of fluid within the bladder.

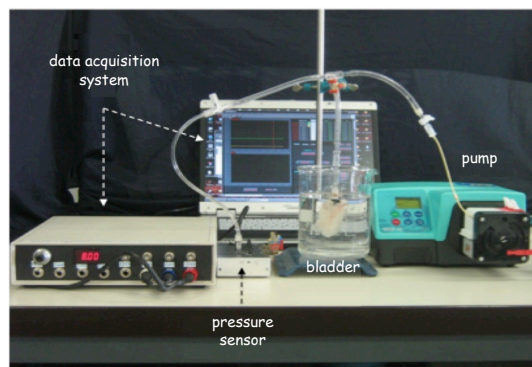


Figure 1: Experimental set-up for cystometric analysis.

The maximum volumes infused in cystometric analysis of native bladder correspond to the *overstretching* volume, i.e. the filling volume after which a non-physiologic stimulation of the organ occurs.

This condition was required not to compromise tissue integrity, since native organs underwent decellularization process at the end of the cystometric test. Instead, the maximum volume infused in cystometric analysis of decellularized bladders overcome the *overstretching* volume, in order to observe any ultrafiltration phenomena of the infused fluid through the bladder wall.

Cystometric analysis allowed comparing P-V curves from both native and decellularized tissues (either with static or dynamic decellularization protocol), in order to evaluate potential differences in the organ distention behaviors due to the decellularization treatment.

- Uniaxial tensile loading (UTL) tests: specimens have been retrieved from the lower body region of bladders (native and decellularized) along both the apex-to-base and the transversal direction. Specimens have been loaded on a testing machine and uniaxial load has been applied until rupture of the specimens. Data of stress (σ) and strain (ϵ) values have been acquired by software, and stress-strain curves for each specimen have been plotted on graph by a spreadsheet (Figure 2). From those curves, 6 parameters previously defined [5], characterizing the non-linear elastic biomechanical behavior of the bladder wall, have been calculated.

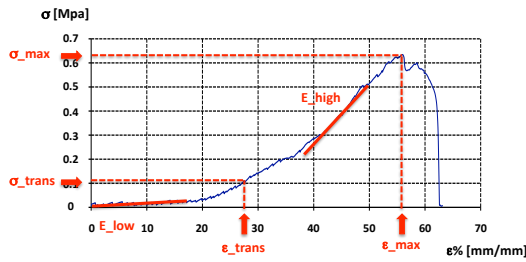


Figure 2: Stress-strain curves obtained from UTL test. 6 parameters, evaluated to characterize the tissues, are represented on the curve.

This analysis allowed comparing the parameters obtained from either native tissue, decellularized tissue with dynamic perfusion and decellularized tissue with static incubation, in order to underline possible differences in the biomechanical behavior of the tissues after decellularization protocol. Parameters have been compared between apex-to-base and transverse direction as well, to investigate directional anisotropy of the BAM biomechanical properties.

- Permeability test: from bladder tissue, either native or decellularized, circular specimens have been retrieved from the lower body region and placed within a perfusion chamber. The experimental set-up for measuring permeability coefficient (K) is shown in Figure 3.

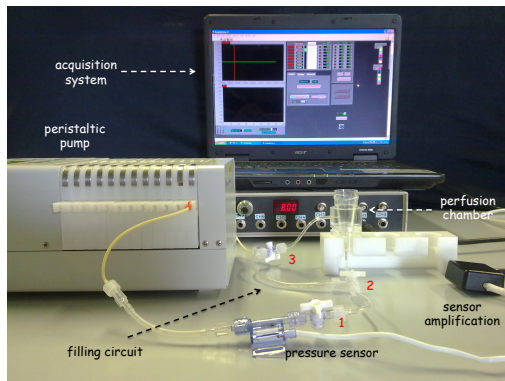


Figure 3: Experimental set-up for permeability test.

The experimental set-up allowed carrying out permeability test imposing a constant flow rate (Q) inside the chamber thanks to a volumetric pump, and measuring *real-time* the pressure variation with a *flow through* pressure sensor connected to a I/O hardware and to a software interface. Different flow rates have been imposed; for each of them, the stabilized pressure has been measured. P-

Q regression lines have been plotted on graph, and K has been obtained inverting the slope of the regression lines.

Design of the culture chamber

Figure 4 shows CAD model of the culture chamber (bioreactor) prototype for the dynamic stimulation of BAM, designed, realized and tested in this thesis work.

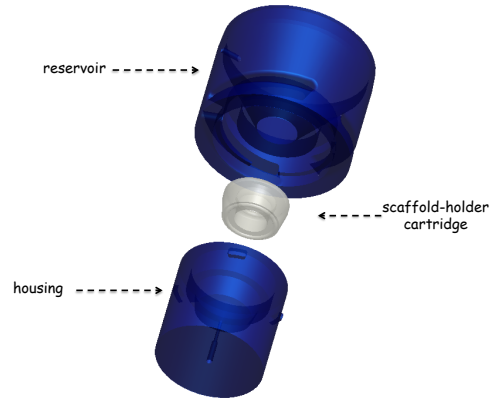


Figure 4: CAD model of the culture chamber prototype for the dynamic stimulation of BAM.

The prototype includes: i) scaffold-holder cartridge, where a patch of BAM is constrained; ii) housing, inlet of the chamber and where the cartridge accommodates; iii) reservoir, where the medium used to feed cells positioned in the upper part of the BAM is placed.

The prototype has been obtained modifying a bioreactor for the co-culture of stromal cells and hematopoietic stem cells previously realized in another thesis work [6]. Modifications were needed for two reasons: i) Adaption of the chamber to a different scaffold type (low-thickness, deformable and impermeable bladder matrix vs. 3D, porous and rigid synthetic scaffold); ii) adaption of the chamber to a different kind of stimulation (cyclic distention and relaxation of the patch, mimicking the filling/voiding dynamics of bladders vs. confined perfusion through a porous scaffold). Modifications improved the transparency of the chamber as well (absent in the original prototype), in order to see *real-time* the evolution of patch stimulation when the system is working.

Modifications involved mainly the cartridge, creating in the inner part a hollow profile were to place an o-ring in order to constrain

the BAM during perfusion within the bioreactor. The modified cartridge, with and without the o-ring positioned, is shown in Figure 5.



Figure 5: Modified cartridge, without o-ring in CAD model (left) and with the o-ring constraining the BAM (right).

Another modification lays on the enlargement of the reservoir upper diameter in order to place onto it a cover of a 35 mm Petri dish as the chamber closure system, to allow, apart from oxygenation and sterility maintenance within the chamber, patch visibility during culture (thanks to the cover transparency). That is important in order to observe *real-time* the patch behavior during the stimulation, and to intervene in case of any malfunctioning during the stimulation process.

After the bioreactor was realized, a cyclic stimulation protocol, with a distention phase of 30 minutes (replicating the filling) and a discharge phase of 3 minutes (replicating the rapid bladder voiding), has been defined, adapted from literature [6]. After that, this thesis work focused on the definition of the perfusion system working conditions that guaranteed a physiological stimulation of the BAM (in analogy with the one that the cells experience *in vivo*).

This process has been articulated in two steps: 1) Definition of an analytical model, based on Laplace's law, able to bond stress and strain values from bladder wall, obtained from UTS test, and whole-organ pressure and volume values, described by the cystometric curve. In particular, the Laplace's law has been considered with two different geometrical hypothesis of the organ, spherical and spheroidal, in order to evaluate which of the two geometrical assumptions identified a closer representation to the experimental cystometric behavior; 2) a computational model (in Comsol©

environment), able to simulate the mechanical stimulation with a constant flow rate of a BAM patch within the bioreactor (Figure 6).

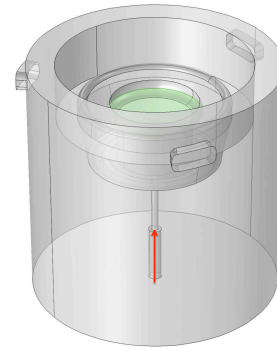


Figure 6: Geometrical model of the cartridge, with inside the BAM patch (in green), positioned within the housing of the bioreactor. The flow rate which stimulates the BAM follows the direction indicated by the red harrow.

After the identification of the analytical model that better reproduce the P-V cystometric trend (step 1), in the second step the computational model allowed testing five different inlet flow rates for the patch perfusion within the bioreactor. In particular, it found the flow rate that could generate on the patch a distribution of physiological σ - ϵ values. It means that these values, converted in P-V values through Laplace's law defined in step 1, must identify on the cystometric curve a physiological state of stimulation (with filling pressure lower than maximum physiological filling pressure and filling volumes lower than *overstretching* volume). That flow rate has been thus defined as the optimized working condition of the culture system for a physiologic *in vitro* stimulation of the BAM.

Finally, the dynamic culture system has been installed in order to verify the maintenance of sterility within the chamber. The maintenance of sterility has been tested reproducing the working condition that must be applied during stimulation of the cell-seeded BAM, in order to evaluate if the system, previously sterilized in each of its components, could keep the sterility during stimulation in a non-sterile environment (i.e: incubator). The experimental set-up used is shown in Figure 7.

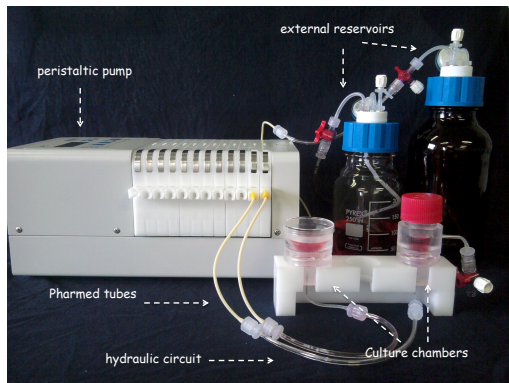


Figure 7: Experimental set-up for sterility maintenance test

The system includes a peristaltic pump that withdraws culture medium from two external reservoirs and stimulates a sterile patch within two culture chamber (the modified culture chamber and the original one were both tested with the modified cartridge) with a defined cyclic stimulation protocol.

The system has been kept in working conditions for 7 days. Samples of medium, microbiologically analyzed in order to evaluate bacterial contamination within the culture chamber, have been taken at specific temporal set-point (time 0, 5h after time 0 working under sterile conditions and 7 days after time 0 working under non-sterile conditions).

Results

Histological analysis and mechanical characterization of BAM

Histological analysis results are shown in Figure 8.

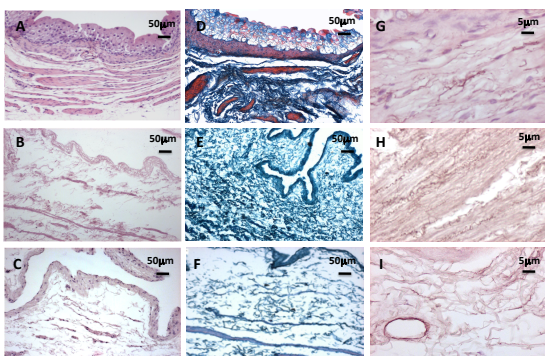


Figure 8: Histological images of native tissue (A, D, G), decellularized with dynamic perfusion (B, E, H) and with static incubation (C, F, I), respectively with H&E, Mallory’s trichrome and Orcein.

Histologic images show that cellular nuclei are not visible in BAM obtained with dynamic approach (Figure 8B), compared with native tissue (Figure 8A, D, G); furthermore, distribution of the collagen fibers is maintained (Figure 8E), even if a little bit disarranged after decellularization protocol (Figure 8B). Instead, static incubated BAM shows cellular residuals (Figure 8C), and the collagen matrix appears disorganized compared with the one in the dynamic approach (Figure 8F), underlying a higher disruption of the matrix due to prolonged static incubation. However, from histological analysis it could be seen that both decellularization protocols (either static or dynamic) did not show significant alteration of elastic fibers integrity (Figure 8H, I).

Macroscopically, the disarrangement of the matrix fibers, observed after both static and dynamic decellularization approaches due to decellularization agents, makes the whole-organ BAM more distended, as shown in Figure 9.

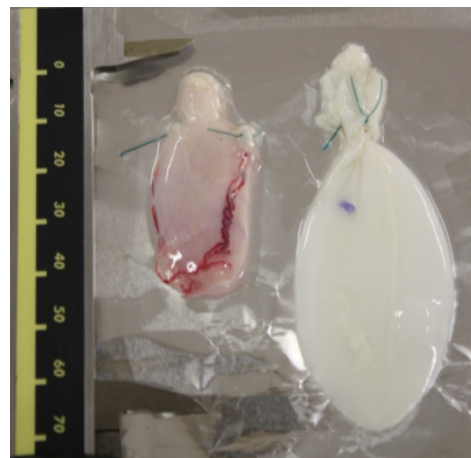


Figure 9: Native (left) and decellularized bladder (right).

Quantitative analysis of DNA and RNA residuals in the BAM confirmed the efficiency of the dynamic decellularization process: indeed, the dynamic protocol resulted in a DNA reduction of 95.04% against 89.38% in the static process, while RNA has been reduced by 99.91% in the dynamic process, by 99.70% in the static process.

Results from cystometric test are shown in Figure 10. The P-V curve from decellularized

bladders (Figure 10B for the static approach, 10C for the dynamic approach), compared with the native bladder, shows an initial region with a low slope, which identifies the filling of the organ, enlarged due to decellularization agents action (Figure 9); this filling is needed to stretch tissue walls. Once stretched, after a filling volume called *Zero Pressure Volume (ZPV)*, decellularized bladders react to the increase of volume with an effective pressure increment: remarkably, maximum pressure values are comparable with the ones observed for native organs. The final region of the curve, characterized by a decreased curve slope, is representative of fluid ultrafiltration through bladder walls, which is consistent after urothelial cell removal; in native organs, indeed, urothelial cells assure tissue impermeability.

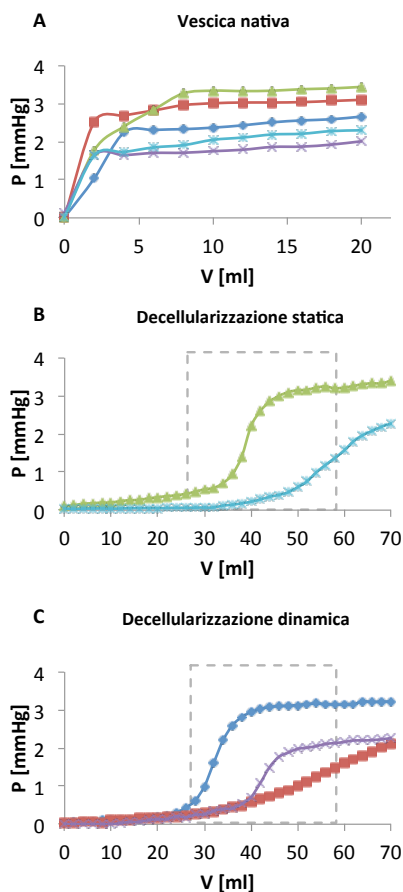


Figure 10: Cystometric results for native (up), static decellularized (middle) and dynamic decellularized (bottom) bladders.

σ - ϵ curves from UTS test, even if with high variability in trends, did not revealed

statistically different values of the six investigated parameters for each specimen of native and decellularized tissues. Thus, neither significant difference in the biomechanical properties of the decellularized tissue nor anisotropy has been observed.

In permeability test, a continuous increase of the pressure value (for each of the imposed flow rates) during the test did not permit the K value of native tissue sample to be measured. On the other hand, this was representative of characteristic wall impermeability of the native bladder tissue. The K values obtained from decellularized tissue samples are shown in Figure 11.

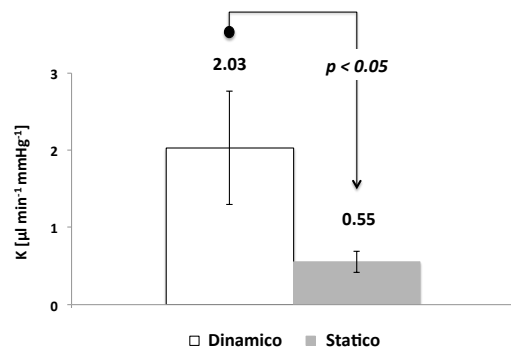


Figure 11: Static and dynamic values of K compared.

As it can be seen in Figure 11, a K significantly lower in BAM obtained through the static decellularization protocol was observed, mainly due to incomplete cell removal, i.e., to the presence of residual urothelial cells within the tissue. On the contrary, in the dynamic group, the complete cell removal resulted in increased tissue permeability.

Design of the culture chamber and definition of bioreactor working conditions

The bioreactor, realized with a milling machine, has been tested, proving the design efficiency in avoiding fluid leakage within the chamber.

For the definition of the bioreactor working conditions, in step 1, the Laplace's law-based model with the assumption of spheroidal geometry has been defined as the reference

model, since the P-V theoretical curve is in good agreement with the experimental curve. Theoretical P-V curves obtained with the spheroidal model, compared with mean experimental cystometric curve, are shown in Figure 12.

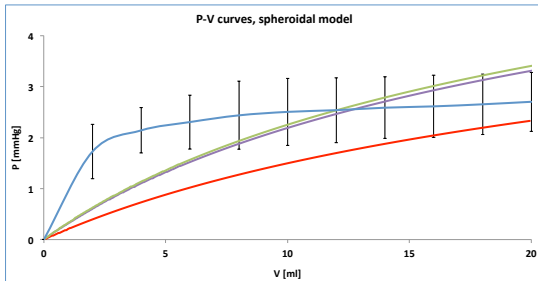


Figure 12: Theoretical P-V curves compared with mean P-V cystometric curve (in blue).

In step 2, the computational model allowed defining, among others, the flow rate of 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ as the working condition of the dynamic culture system. Indeed, the stimulation given by 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ flow rate for 30 minutes, according to the stimulation protocol defined from literature [6], generated σ and ε corresponding to a physiologic stimulation, with intravesical volumes lower than *overstretching* volume, as shown in Figure 13.

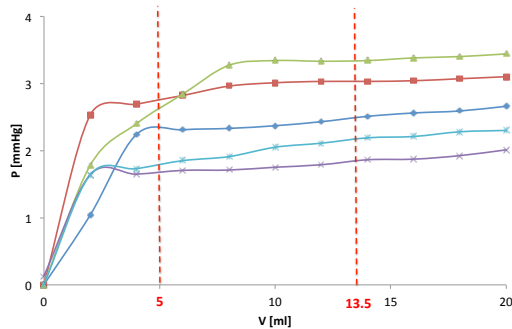


Figure 13: Range of volumes identified by computational model with 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ flow rate. It matches the region within the experimental cystometric curve associated with the physiological filling of the bladder.

The maintenance of the sterility inside the dynamic culture system has been confirmed after 7 days in working condition, both inside the hydraulic circuit and inside the upper part of the culture chamber (separated by the circuit due to the presence of the impermeable patch). This result confirms the ability of Petri dish cover to maintain sterility

inside the bioreactor. However, gradual emptying of the hydraulic circuit has been observed during the stimulation process. This phenomenon could be mainly due to medium evaporation from tubes' walls, since the level of humidity inside the incubator was not appropriate. Nevertheless, patch has been fully stimulated in the first three days, and for the rest of the time it has been stimulated enough to reproduce the distension of a seeded BAM patch inside the bioreactor.

Conclusions

The histological analysis of BAM obtained through the dynamic decellularization protocol evaluated in this thesis work did not show residual cellular nuclei within the decellularized tissue, with a good maintenance of the sovrastructure of organ ECM, even if a low disarrangement of ECM collagen bundles has been noticed. Anyway, a partial ECM degradation was an essential requisite in order to allow the detergents to penetrate within the deeper layers of the bladder wall.

Mechanical characterization showed the maintenance of mechanical properties with great similarities to the native tissue, and a permeability coefficient coherent to the urothelial cell removal.

The designed bioreactor resulted in transparency of the culture chamber, ease positioning the BAM patch, absence of fluid leakage during perfusion and maintenance of sterility inside a non-sterile environment thanks to the Petri dish cover. The analytical and computational models allowed to identify a flow rate of 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ as the optimized working condition of the culture system, in order to physiologically stimulate the BAM patch.

In conclusion, both the BAM resulting from the dynamic decellularization protocol and the realized bioreactor seem to be promising tools for urological tissue engineering applications. However, further studies are required, such as immunologic tests, in order to evaluate the risk of inflammatory or immune responses due to DNA, RNA and protein residuals within the BAM, and dynamic culture campaigns, in order to assess whether the culture systems defined in

this thesis work correctly stimulates the seeded cells.

Bibliography

1. Bolland, F., et al., *Development and characterisation of a full-thickness acellular porcine bladder matrix for tissue engineering*. Biomaterials, 2007. **28**(6): p. 1061-70.
2. Rosario, D.J., et al., *Decellularization and sterilization of porcine urinary bladder matrix for tissue engineering in the lower urinary tract*. Regenerative Medicine, 2008. **3**(2): p. 145-156.
3. Yang, B., et al., *Development of a porcine bladder acellular matrix with well-preserved extracellular bioactive factors for tissue engineering*. Tissue Eng Part C Methods, 2010. **16**(5): p. 1201-11.
4. Crapo, P.M., T.W. Gilbert, and S.F. Badylak, *An overview of tissue and whole organ decellularization processes*. Biomaterials, 2011. **32**(12): p. 3233-43.
5. Korossis, S., et al., *Regional biomechanical and histological characterisation of the passive porcine urinary bladder: Implications for augmentation and tissue engineering strategies*. Biomaterials, 2009. **30**(2): p. 266-75.
6. Wallis, M.C., et al., *Feasibility study of a novel urinary bladder bioreactor*. Tissue Eng Part A, 2008. **14**(3): p. 339-48.

INTRODUZIONE

La *Medicina Rigenerativa* è una branca della Medicina che studia come riparare organi e tessuti patologici piuttosto che sostituirli, e per questo motivo nasce come valida alternativa ai trapianti [1]. Il vantaggio principale di questo approccio sta nell'utilizzo, al fine di rigenerare l'organo/tessuto danneggiato, di cellule autologhe del paziente (ossia cellule prelevate dal paziente stesso tramite biopsia): in questo modo si evitano le problematiche tipiche dei trapianti, quali il rigetto, la necessità di terapie immunosoppressive e la scarsità di organi disponibili.

Tra le varie applicazioni della medicina rigenerativa, si trovano le terapie cellulari (con utilizzo di cellule primarie o staminali), le terapie geniche e l'ingegneria dei tessuti [1]. In particolare, l'ingegneria dei tessuti consiste nel seminare e coltivare cellule autologhe del paziente su determinati supporti (*scaffold*) in grado di permettere adesione, proliferazione e attività cellulare, con conseguente deposito di nuova matrice extracellulare e formazione di tessuto ingegnerizzato funzionale per la sostituzione di quello danneggiato nel paziente. Negli ultimi vent'anni sono stati condotti molti studi per individuare, nei diversi tessuti, quali siano i materiali migliori per svolgere il ruolo di scaffold, quali siano le tecniche ideali per coltivare le cellule al fine di garantirne la conservazione del fenotipo e l'attività *in vitro*, quali cellule seminare (cellule staminali vs. cellule primarie) e che sostanze fornirgli per mantenerle vitali. In particolare, passi da gigante sono stati fatti per tessuti come pelle [2] e osso [3, 4]. Mentre però per i tessuti questa branca della medicina rigenerativa è già approdata alla pratica clinica, per il trattamento di organi le difficoltà sono maggiori a causa della grande complessità che li contraddistingue, dovuta alla presenza di numerosi fenotipi cellulari differenti, ciascuno con una funzione precisa per il mantenimento dell'omeostasi dell'organo. I supporti per la ripopolazione cellulare e la formazione di nuovo tessuto dunque non devono più solo garantire sostegno alle cellule, ma devono essere anche funzionali alla riorganizzazione del tessuto secondo la topologia propria dell'organo, favorendo la corretta interazione fra i vari tipi di cellule. Da questo punto di vista, scaffold molto promettenti analizzati in letteratura sono le matrici ottenute tramite processo di decellularizzazione dell'organo intero. I vantaggi di queste matrici decellularizzate, rispetto ad esempio a materiali di tipo sintetico, sono la presenza di elementi biologici naturali (come proteine e fattori di crescita) e il mantenimento

dell'architettura tridimensionale della matrice extracellulare, aspetti che agevolano l'adesione e l'attività delle cellule che vi vengono seminate, permettendo così la formazione di nuovo tessuto generato grazie al deposito di nuova matrice e quindi la sostituzione del tessuto danneggiato. Protocolli di decellularizzazione di organo intero sono stati implementati in modelli animali con risultati incoraggianti per cuore [5], fegato [6], esofago [7], trachea [8], rene [9] e polmoni [10], come mostrato in Figura I:

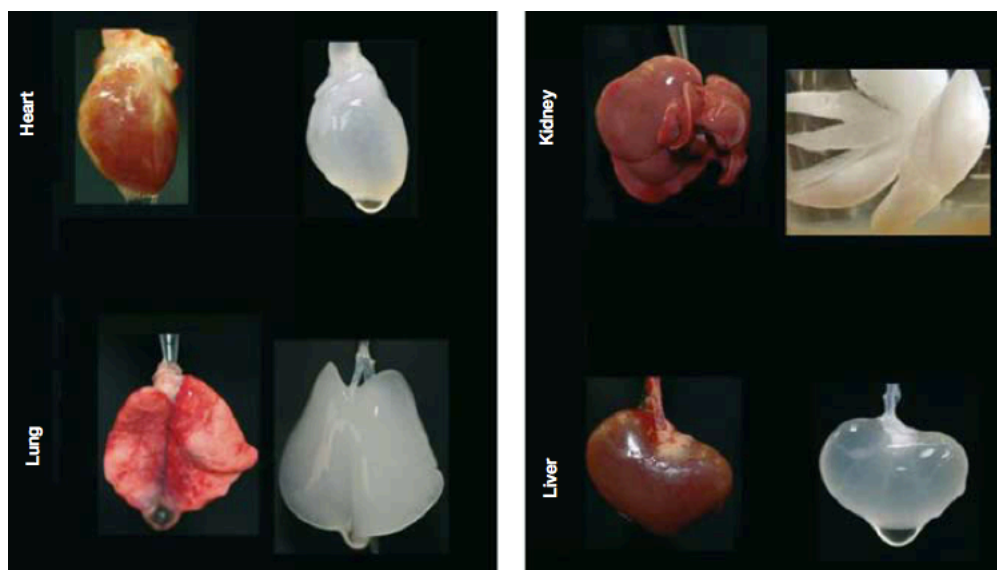


Figura I: Organi interi (cuore, rene, polmoni, fegato) prima e dopo il processo di decellularizzazione. La matrice decellularizzata potrà essere in futuro usata come *scaffold* per la rigenerazione di organo intero [9].

La vescica, organo adibito all'accumulo e alla conseguente espulsione di urina dall'organismo, è interessata dall'ingegneria dei tessuti in quanto diverse patologie di natura traumatica, neurologica e tumorale richiedono la rimozione o, se possibile, la sostituzione del tessuto danneggiato. Solo recentemente però sono stati studiati per la vescica approcci di decellularizzazione di organo intero [11, 12], con dei protocolli che non sono ancora ottimizzati riguardo alla scelta degli agenti decellularizzanti, alle tecniche con cui devono essere applicati e alle tempistiche del processo.

Lo scopo di questo lavoro di tesi dunque consiste i) nella valutazione della matrice ricavata da un nuovo protocollo di decellularizzazione dell'organo intero di vescica, sviluppato presso il Laboratorio di Micro e Biofluidodinamica (μ BS Lab) del Dipartimento di Bioingegneria del Politecnico di Milano in collaborazione con il Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie dell'Università degli Studi di Milano, in modo da caratterizzarla

completamente dal punto di vista meccanico per verificarne la possibilità di utilizzo come scaffold per la rigenerazione del tessuto di vescica; ii) nella progettazione, realizzazione e nel collaudo di una camera di coltura (bioreattore) volta a sollecitare meccanicamente un patch di tessuto di vescica da ricellularizzare, al fine di riprodurre sul tessuto le sollecitazioni dinamiche fisiologiche dovute alle fasi di riempimento e svuotamento dell'organo.

In particolare, per quanto riguarda la caratterizzazione delle matrici decellularizzate, sono state condotte sull'organo intero decellularizzato delle prove di cistometria (ossia di misura della pressione intravesicale in seguito a riempimento dell'organo), al fine di valutarne le proprietà di distensibilità rispetto al tessuto nativo, utilizzando un set-up già allestito in precedenza. In seguito, su campioni del tessuto, sono state condotte prove di trazione monoassiale e, tramite un set-up sperimentale specificatamente progettato e realizzato, prove di permeabilità, le prime per verificare il mantenimento nel tessuto decellularizzato delle proprietà meccaniche tipiche dell'organo nativo (oltre ad indagare l'eventuale presenza di anisotropie nel tessuto di vescica di coniglio), le seconde per definire il coefficiente di permeabilità del tessuto decellularizzato e rilevare così il grado di ultrafiltrazione di fluido attraverso le pareti della matrice.

In una seconda fase del lavoro, è stato progettato, realizzato e collaudato un bioreattore per la coltura dinamica di patch di tessuto di vescica da ricellularizzare. Sono stati poi sviluppati un modello analitico (tramite legge di Laplace) e un modello computazionale (tramite software Comsol©) per definire le condizioni di lavoro ideali per la stimolazione meccanica del patch di matrice all'interno del bioreattore a partire dalle condizioni di sollecitazione fisiologica ricavate dalle prove di cistometria. Infine il sistema di coltura è stato messo in funzione per effettuare delle prove di verifica del mantenimento della sterilità della camera, al fine di verificare l'assenza, in ambiente non sterile (ossia l'incubatore), di infiltrati batterici all'interno del sistema.

Questo lavoro di tesi ha permesso quindi di caratterizzare il tessuto decellularizzato ottenuto con il protocollo di decellularizzazione testato, riscontrandone una maggiore efficacia in termini di rimozione delle cellule dall'organo rispetto agli approcci descritti in letteratura [11, 12], e di realizzare una camera di coltura dinamica, definendo le condizioni di lavoro migliori per la futura sollecitazione *in vitro* di un patch del tessuto ricellularizzato.

CAPITOLO 1

MEDICINA RIGENERATIVA E INGEGNERIA DEI TESSUTI NELL'APPARATO UROVESCICALE: STATO DELL'ARTE

La vescica è un organo che svolge il ruolo fondamentale di accumulo e conseguente espulsione di urina. Questo compito, sinergicamente con l'attività degli altri organi, permette di mantenere l'omeostasi dell'organismo.

L'instaurarsi di alterazioni patologiche al comparto vescicale induce fenomeni di incontinenza o difficoltà di minzione, i quali a loro volta portano il soggetto a subire disturbi fisici e psicologici, nonché danni ai reni e all'apparato gastro-intestinale [13]. È importante dunque trattare opportunamente queste disfunzioni, in modo da ripristinare il comportamento fisiologico della vescica e quindi l'omeostasi complessiva dell'organismo.

Il trattamento ad oggi più utilizzato per la sostituzione o la riparazione del tessuto vescicale è detto "*bladder augmentation*" e consiste in un'operazione di cistoplastica in cui la porzione di tessuto danneggiato della vescica viene sostituita con un patch prelevato dal tessuto gastrointestinale. Essendo però il tessuto gastrointestinale caratterizzato per assorbire soluti specifici, quando viene utilizzato per sostituire parte del tessuto di vescica (che invece prevede l'escrezione di soluti) spesso porta a complicanze quali infezioni, disturbi metabolici, sovrapproduzione di muco e tumorigenicità [14].

Negli ultimi anni, sono stati fatti progressi nel campo dell'ingegneria dei tessuti: l'idea rivoluzionaria di utilizzare *scaffold*, ossia matrici di supporto funzionali, tridimensionali e organizzate in modo tale da permettere alle cellule del paziente di proliferare e generare un nuovo tessuto autologo *ingegnerizzato*, ha permesso di sviluppare nuovi sostituti per la cura di organi danneggiati più idonei al ripristino della funzione compromessa.

Numerosi studi hanno quindi investigato, con riferimento alla vescica, approcci alternativi che prevedessero l'utilizzo come scaffold sia di materiali naturali, sia di materiali sintetici, sia di tessuti decellularizzati da impiantare *in vivo* in alternativa ai sostituti gastrointestinali. Sono stati valutati anche diversi approcci di coltura delle cellule sugli scaffold *in vitro*, per esaminare l'effetto che possono avere una semina e un eventuale pre-condizionamento (fisico o chimico) del tessuto coltivato pre-impianto *in vivo* sul recupero della funzionalità dell'organo.

Nel presente capitolo sarà presentato in un primo paragrafo l'organo trattato, la vescica, descrivendone l'anatomia e la fisiopatologia. Verrà poi analizzato lo stato dell'arte dell'ingegneria del tessuto vescicale, descrivendo i principali approcci utilizzati fino ad ora. Ci si soffermerà principalmente sulle procedure utilizzate per ottenere scaffold da tessuti biologici, in particolare sulle tecniche di decellularizzazione della vescica definite in letteratura, analizzando i vantaggi e gli svantaggi di ciascun approccio in riferimento all'influenza che il processo ha sia sulla rimozione della componente cellulare, sia sugli effetti indotti sulla matrice extracellulare (ECM) del tessuto trattato. Inoltre, nell'ultima parte del capitolo verranno descritti i lavori di letteratura relativi alla messa a punto di camere di coltura finalizzate alla stimolazione di matrice acellulare di vescica durante la fase di ricellularizzazione in vitro. In particolare verranno esaminate le modalità di stimolazione meccanica applicate alle cellule seminate sullo scaffold durante la coltura dinamica per incentivare la ricellularizzazione e il ripristino funzionale del tessuto in fase di maturazione.

1.1 Anatomia e fisiopatologia della vescica

1.1.1 Anatomia

La vescica urinaria (Figura 1.1), organo cavo posto nella cavità pelvica del bacino, ha la funzione principale di immagazzinare l'urina, prodotta dai reni e inviata alla vescica tramite gli ureteri, e di espellerla periodicamente attraverso l'uretra. Come altre componenti del sistema urinario, essa è retroperitoneale. Mentre nei maschi giace davanti al retto, nelle femmine è situata anteriormente rispetto all'utero e alla parte superiore della vagina [15].

Quando è piena, la vescica assume una forma simil-sferica; quando è vuota, assume la forma di piramide invertita.

Come si osserva in Figura 1.1 (zoom, muovendosi dall'interno verso l'esterno), la parete della vescica è costituita da uno strato di membrana *mucosa*, formata da un epitelio di transizione (o urotelio), caratterizzato da cellule larghe e ombrelliformi, connesse fra di loro da giunzioni per creare una barriera impermeabile all'urina, e da uno strato di tessuto connettivo che la riveste chiamato *lamina propria*; a ciò, separata da uno strato di tessuto connettivo ed elastico chiamato *submucosa*, segue una tunica media costituita da tre strati di muscoli lisci detti *detrusori*: gli strati esterni sono orientati longitudinalmente, lo strato

interno invece è orientato trasversalmente. Esternamente l'organo è ricoperto da uno strato di tunica avventizia, porzione del peritoneo che riveste l'intero organo.

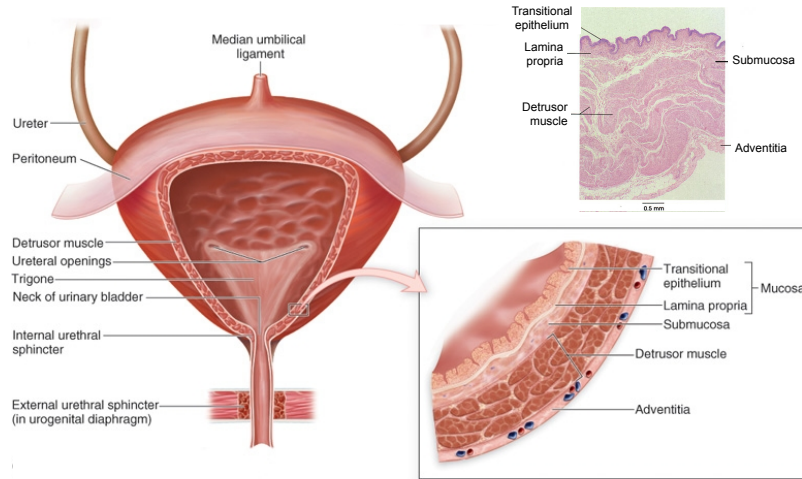


Figura 1.1: Vescica urinaria e sue componenti. Nello zoom: strati della parete vescicale. Nel riquadro in alto: istologia del tessuto di vescica. Si possono osservare tutti gli strati descritti nello zoom (adattato da [16]).

Come si osserva in Figura 1.1, nella maggior parte della superficie vescicale la mucosa è attaccata al rivestimento muscolare con minor aderenza, apparendo raggrinzita in fase di contrazione dell'organo. L'apertura interna dell'uretra e le aperture laterali degli ureteri definiscono i vertici di un'area triangolare, dove la mucosa è saldamente attaccata allo strato muscolare e dove appare sempre liscia. Questa regione è chiamata *trigono vescicale*. I canali d'ingresso alla vescica sono i due ureteri, che dal rene immettono lateralmente l'urina nel sacco vescicale. La via d'uscita invece consiste nell'uretra, canale muscolare che si innesta sulla parte inferiore della vescica e che ha la funzione di espellere l'urina dall'organismo. All'interfaccia tra vescica e uretra, i muscoli lisci della vescica circondano l'uretra e agiscono come uno sfintere (prendendo il nome di *sfintere uretrale interno*). Lo sfintere uretrale interno ha il compito di mantenere chiusa l'uretra fino al momento dello svuotamento, quando la contrazione dei detrusori porta i muscoli dello sfintere a contrarsi a loro volta. Questi, accorciandosi, vanno così ad aprire il canale. A valle dello sfintere interno, l'uretra è circondata da muscoli scheletrici, appartenenti al diaframma genitourinario, che costituiscono lo *sfintere uretrale esterno*. Quando è contratto (tramite controllo volontario), esso è in grado di mantenere chiuso il canale uretrale anche contro forti contrazioni della vescica, impedendo quindi l'espulsione dell'urina.

1.1.2 Fisiologia

La vescica è l'organo alla base del processo di espulsione dell'urina dall'organismo, un insieme di atti fisiologici, volontari o involontari, che vanno sotto il nome di *minzione*: nella fase di riempimento della vescica, le pareti vengono distese, e i meccanorecettori presenti nella parete iniziano a incrementare il numero di impulsi nervosi trasmessi alla regione sacrale del midollo spinale. Questi impulsi stimolano a livello del sistema nervoso centrale i neuroni parasimpatici, che a loro volta inviano impulsi alla vescica tramite i nervi pelvici (Figura 1.2).

In questo modo si portano alla contrazione involontaria i muscoli detrusori, che determinano l'apertura dello sfintere uretrale interno. Allo stesso tempo, gli impulsi lanciati dai meccanorecettori della parete vescicale vanno a inibire i motoneuroni somatici che innervano i muscoli scheletrici dello sfintere uretrale esterno, permettendone così il rilassamento. L'insieme di tutti questi passaggi identifica il *riflesso di minzione*.

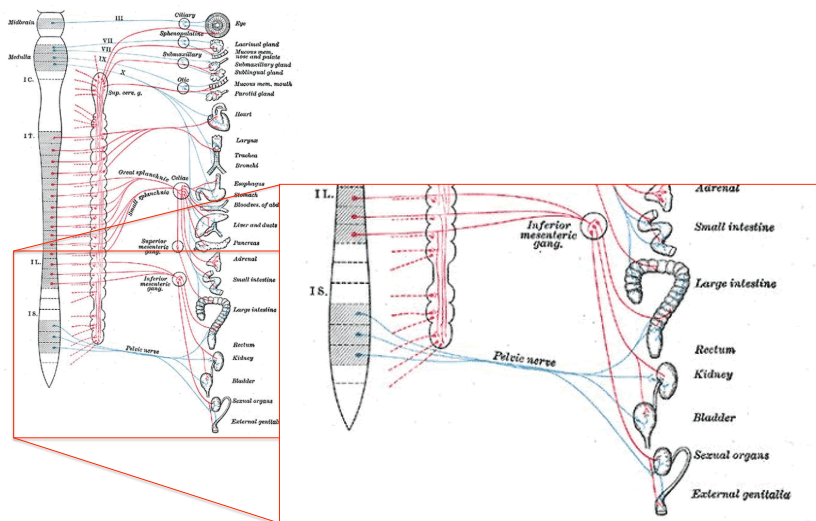


Figura 1.2: Sistema nervoso autonomo (simpativo e parasimpatico). Nello zoom: i nervi che interessano la vescica sono il nervo pelvico (parasimpatico, in blu) e il ganglio mesenterico inferiore (simpativo, in rosso).

La minzione però, oltre ad essere un riflesso spinale, è influenzata anche dai centri cerebrali superiori, soprattutto a livello del tronco encefalico e della corteccia cerebrale: gli impulsi dei meccanorecettori, infatti, oltre ad essere inviati al midollo spinale, raggiungono anche il livello corticale; questi sono gli impulsi che portano alla sensazione di vescica piena e alla necessità di urinare. A loro volta, gli impulsi che dalla corteccia sono inviati alla vescica possono favorire o inibire il riflesso di minzione, promuovendo o inibendo

l'attività dello sfintere uretrale esterno e determinando così un controllo della vescica di tipo volontario. Con l'allenamento è possibile acquisire un elevato grado di volontarietà sul processo di minzione, inducendola volontariamente o posticipandola in momenti opportuni. Tuttavia, fintanto che il sistema nervoso centrale non è allenato a sufficienza da sviluppare un controllo volontario, il riflesso in sé è il fattore dominante che governa lo svuotamento della vescica; per questo motivo i neonati, nei quali alcuni tratti del sistema nervoso centrale superiore non sono ancora sviluppati completamente, urinano ogni volta che la vescica è sufficientemente piena da innescare il riflesso di minzione [15].

Durante la fase di riempimento della vescica, l'accumulo di volume di liquido genera un incremento della pressione interna (*Pressione intra-vescicale, P_{i-v}*). Tale pressione si mantiene ad un valore contenuto fino al raggiungimento di una quantità limite di volume immagazzinato (volume di *overstretching*), oltre alla quale la pressione inizia a salire rapidamente. Questo incremento di P_{i-v} , non fisiologico, viene evitato con l'apertura degli sfinteri, lo svuotamento della vescica e il conseguente ritorno della P_{i-v} al valore di partenza. La vescica umana ha un volume di *overstretching* di circa 300-400 ml; riesce comunque a raggiungere volumi di 500 ml, sebbene di solito sia svuotata molto prima di raggiungere tale capacità. Le pressioni interne fisiologiche si assestano intorno ai 15 cmH₂O, incrementando fino a 40-60 cmH₂O in fase di contrazione [17]. Nel grafico di Figura 1.3 è mostrata la curva pressione-volume (*curva P-V*) rappresentativa del comportamento della vescica.

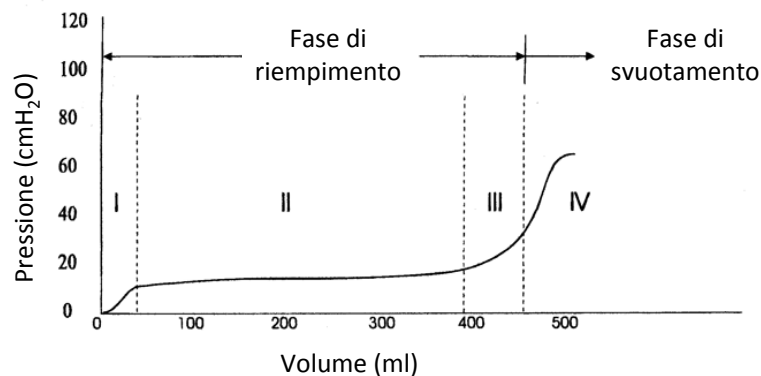


Figura 1.3: Curva pressione volume che descrive il comportamento fisiologico della vescica. Nella fase di riempimento abbiamo un primo incremento di pressione interna (I), il mantenimento ad un valore contenuto di pressione (circa 15 cmH₂O, II) e un rapida salita intorno ai 400 ml (III), che può continuare (IV) ma che in condizioni fisiologiche viene compensata con lo svuotamento dell'organo.

1.1.3 Patologia

Diverse patologie interessano la vescica, andando a compromettere le funzioni di immagazzinamento di urina e di minzione. Le patologie possono colpire direttamente il tessuto vescicale, oppure verificarsi in seguito alla presenza di complicanze in altri sistemi (ad esempio, nel sistema nervoso). Le patologie del primo tipo sono principalmente di natura infettiva, traumatica, tumorale; le patologie del secondo tipo invece sono principalmente neurologiche [13].

Natura infettiva: A questa categoria appartiene la *cistite batterica acuta*, infezione aspecifica della vescica dovuta a contaminazione batterica (principalmente di *Escherichia Coli*), caratterizzata da progressivo aumento di sangue, edema e presenza di infiltrati neutrofilo a livello della mucosa vescicale. Ciò porta alla sostituzione della mucosa con una superficie granulosa, friabile, emorragica, tappezzata da ulcere contenenti essudato (mentre lo strato muscolare non è coinvolto). Da un punto di vista sintomatologico, l'esordio è caratterizzato da sintomi irritativi: pollachiuria (ossia l'emissione frequente di piccole quantità di urina), nicturia (ossia la necessità notturna di eliminare quantità di urina maggiore di quella diurna), ematuria (ossia la presenza di sangue nelle urine), bruciori minzionali, accompagnati da dolore soprapubico, incontinenza da sforzo e stato di malessere. La persistenza di infezioni vescicali oltre la fase acuta porta alla *cistite cronica*, che si differenzia dalla acuta per alcuni caratteri dell'infiltrato infiammatorio. Negli stadi iniziali della cistite cronica, la mucosa vescicale diventa progressivamente più edematosa, eritematosa e friabile e può essere ulcerata. Negli stadi più tardivi dell'infezione cronica, la *submucosa* è infiltrata da fibroblasti, plasmacellule e linfociti: la parete vescicale si inspessisce, diventa fibrotica ed anelastica. Queste infezioni tendono a colpire principalmente soggetti di sesso femminile [13].

Di natura infettiva specifica invece (ossia determinata da micro-organismi "specifici") sono la *tubercolosi vescicale* e la *cistite abatterica*. La tubercolosi vescicale, infezione data dal micobatterio della tubercolosi, raggiunge gli organi genitourinari per via ematogena dai polmoni, creando a livello della vescica tubercoli che si ulcerano, portando irritazione e sanguinamento, oltre a rendere fibrosa e contratta la vescica. La cistite abatterica, infiammazione acuta della vescica, dovuta ad agenti non batterici quali ad esempio adenovirus, rende la mucosa iperemica ed ematosa con ulcerazioni superficiali, e genera emorragie a livello della *submucosa*. La cistite abatterica colpisce prevalentemente soggetti

di sesso maschile, portando a secrezioni uretrali purulente, oltre che a urgenza, frequenza e dolore alla minzione.

Natura traumatica: Le lesioni della vescica dipendono molto da traumi esterni e sono spesso associate a fratture pelviche: quando la pelvi viene fratturata da un trauma, frammenti ossei dalla sede di frattura possono perforare la vescica. Queste perforazioni solitamente producono una rottura extraperitoneale (se l'urina è infetta, le perforazioni vescicali extraperitoneali possono produrre un ascesso pelvico profondo ed una grave infiammazione pelvica). Quando la vescica è riempita fino alla massima capacità, un altro trauma che può lacerarla è quello diretto al basso addome. La lacerazione derivante in questo caso è solitamente intraperitoneale, e permette alle urine di refluire nella cavità addominale (se l'urina è infetta, si svilupperà immediatamente una peritonite). Lesioni iatrogene possono derivare da interventi ginecologici o da altre procedure pelviche, così come da interventi per ernia o operazioni transuretrali. Mentre le patologie di natura infettiva hanno bisogno di cure antibatteriche per ripristinare totalmente la funzionalità dell'organo, le patologie di natura traumatica richiedono intervento chirurgico per riparare la zona lesionata e, nel caso non fosse possibile, per sostituirla.

Natura tumorale: Il *carcinoma vescicale* è il secondo tumore del tratto genitourinario per frequenza. La trasformazione neoplastica delle cellule uroteliali è un fenomeno che consiste di diversi stadi: un iniziatore, oppure un suo metabolita, induce l'alterazione del DNA normale in una singola cellula e questo permette la sua trasformazione in cellula maligna. Si verifica così un'alterazione del trasferimento dell'informazione genetica dal DNA all'RNA ed, in ultimo, della formazione di proteine. Gli iniziatori non sono sostanze cancerogene ma si legano ai recettori della superficie cellulare e in questo modo provocano la proliferazione delle cellule già trasformate. Una volta che si è verificata la trasformazione neoplastica, il tumore può rimanere di tipo superficiale, può progredire verso una forma invasiva oppure in malattia metastatica. Oltre al carcinoma a cellule di transizione appena descritto, ci possono essere carcinomi a cellule non transizionali, come l'*adenocarcinoma*, preceduto da cistite e da metaplasia, o il *carcinoma a cellule squamose*, associato all'infezione cronica, alla calcolosi vescicale ed al cateterismo cronico. Tra le terapie di base, oltre alla radioterapia e alla chemioterapia, il tumore vescicale prevede anche l'intervento chirurgico, che può limitarsi alla resezione endoscopica delle regioni tumorali (*TURB, Trans Urethral Resection of Bladder*), oppure nei casi peggiori consistere

direttamente nell'asportazione di una parte (*Cistectomia parziale*) o della totalità (*Cistectomia radicale*) degli organi pelvici anteriori (vescica con tessuti adiposi perivescicali, peritoneo, prostata e vescicole seminali per l'uomo, vescica con tessuti adiposi perivescicali, peritoneo, cervice, utero, uretra, ovaie e parete vaginale anteriore per la donna).

Natura neurologica: le disfunzioni vescicali di questo tipo possono derivare da danni sopra la regione del midollo spinale associata alla minzione (segmenti S3-S4 a livello delle vertebre T11-L1, mostrati nello zoom di Figura 1.2), oppure da danni ai nervi pelvici o al centro della minzione midollare. Nel primo caso, lesioni come demenza, sclerosi multipla, tumori, encefaliti, meningiti o mieliti portano a quella che viene chiamata *vescica neurologica spastica*, caratterizzata da ridotta capacità, contrazioni involontarie del detrusore, ipertrofia della parete vescicale e alta pressione minzionale intra-vescicale. Ciò si traduce in modificazioni funzionali come pollachiuria, residuo urinario post-minzionale ma soprattutto incontinenza.

Nel secondo caso, danni ai segmenti S3-S4 (come traumi, infezioni, mielodisplasie) oppure neuropatie delle vie afferenti (come diabete mellito, tabe dorsale, anemia perniziosa, lesioni dei nervi pelvici) portano a quella che viene detta *vescica neurologica flaccida*, caratterizzata da grande capacità, nessuna contrazione volontaria del detrusore, tono dello sfintere esterno diminuito e bassa pressione intra-vescicale. Ciò spesso comporta una difficoltà alla minzione volontaria, con perdite e gocciolamento continui [13].

Oltre alle patologie finora descritte, ce ne sono altre non ricollegabili alle categorie menzionate: patologie congenite come l'*estrofia*, dove la porzione centrale inferiore dell'addome è occupata dalla superficie centrale della parete posteriore della vescica, i cui margini mucosi si sono fusi con la cute; patologie acquisite come l'*erniazione vescicale esterna*, patologia femminile che prevede la protrusione della vescica attraverso l'uretra dilatata, o l'*erniazione vescicale interna*, dove un lato della vescica può essere coinvolto in un'ernia inguinale (nell'uomo) o in un'ernia femorale (nella donna); infine patologie secondarie (cioè che derivano una patologia principale), come i *diverticoli vescicali*, formazioni cave dovute alle penetrazioni della mucosa tra i fasci muscolari ipertrofici in seguito a ostruzione distale al collo vescicale, e le *fistole vescicali*, canali patologici di natura non urologica che mettono in comunicazione la vescica con cute, intestino (*fistola*

vescico-intestinale) o, per le donne, con gli organi genitali interni (*fistola vescico-vaginale*), portando a infezioni e perdite continue di urina.

Tutte queste patologie richiedono per la cura un intervento chirurgico di rimozione, sostituzione o riparazione dei tessuti vescicali danneggiati.

1.2 Scaffold utilizzati per la rigenerazione del tessuto di vescica

Molte delle patologie introdotte nel paragrafo precedente richiedono un intervento chirurgico di rimozione, parziale o totale, o di riparazione del tessuto vescicale. Questo comporta la sostituzione del tessuto originale per ripristinare le caratteristiche fisiologiche della vescica. Come descritto in precedenza, la pratica più utilizzata per la sostituzione o la riparazione del tessuto vescicale è la tecnica nota come “*bladder augmentation*”, ossia l'applicazione di un sostituto gastrointestinale, fissato tramite punti di sutura, al posto della parte di vescica patologica che viene rimossa; si parla di *enterocistoplastica* quando viene utilizzato come sostituto una porzione di intestino (*ileocistoplastica* nel caso di intestino tenue), *gastrocistoplastica* se invece viene utilizzata una porzione dello stomaco.

Sebbene quest'approccio permetta un buon ripristino delle funzionalità della vescica a breve termine, diverse sono le complicazioni che può indurre a lungo termine [18]:

- Disturbi metabolici, dovuti ad alterazioni del bilancio acido-base in seguito a assorbimento di ammoniaca e cloruro d'ammonio (presenti nell'urina) e secrezione di bicarbonato.
- Diverticolarizzazione in seguito ad un cattivo fissaggio del patch intestinale. I diverticoli accumulano urina in fase di riempimento e si svuotano nella vescica in seguito alla minzione, portando all'accumulo di urina residua in quantità rilevanti.
- Produzione di muco intestinale che, accumulato in vescica, porta alla formazione di calcoli.
- Tumorigenicità: le complicazioni precedentemente elencate spesso diventano fattori di rischio che aumentano la possibilità di generazione di tumori.
- Perforazione della vescica, soprattutto a livello delle suture tra tessuto vescicale e patch intestinale.

Per risolvere questi problemi, negli ultimi vent'anni sono stati effettuati molti studi nel campo dell'ingegneria del tessuto vescicale [18], in particolare mirati all'identificazione di nuovi materiali da utilizzare in alternativa al tessuto intestinale o dello stomaco nei

trattamenti terapeutici di *bladder augmentation*. Questi studi hanno messo in luce le potenzialità sia di alcuni materiali sintetici, sia dei materiali naturali, sia delle matrici biologiche decellularizzate, utilizzati come scaffold per permettere la ricostruzione del tessuto danneggiato [14]. Nei paragrafi successivi saranno presentati, per ogni categoria di materiale (sintetici, naturali, matrici decellularizzate), gli approcci principali affrontati in letteratura, con le rispettive modalità di utilizzo e i risultati ottenuti nel campo dell'ingegneria dei tessuti della vescica.

1.2.1 Scaffold sintetici

In campo urologico i materiali sintetici sono stati ampiamente utilizzati. Tra i vari materiali sintetici, il silicone è stato utilizzato come sfintere artificiale per trattamenti dell'incontinenza urinaria e micro particelle di silicone sono state usate per bloccare il reflusso vescicouretrale [14]. In realtà, l'obiettivo principale per la ricerca nel campo dei materiali è quello di realizzare scaffold che facciano da matrici di supporto all'attività cellulare. Poiché la maggior parte delle cellule nei mammiferi è ancoraggio-dipendente e senza un substrato che consenta la sua adesione non sarebbe in grado di sopravvivere, il compito dello scaffold è quello di fornire una superficie di ancoraggio e dare supporto alle cellule, seminate *in vitro* oppure migrate dal tessuto nativo *in vivo*, in modo che queste siano in grado di infiltrarsi, proliferare e svolgere la loro funzione biologica specifica. Le matrici devono essere poi in grado di favorire la produzione di nuova ECM e organizzare il nuovo tessuto ingegnerizzato in maniera funzionale.

Sono stati testati come scaffold diversi materiali sintetici non degradabili: *Politetrafluoroetilene (PTFE o Teflon)*, spugne in *Polivinile (PV)*, *Polietilenterenftalato (PET)*. Tutti però hanno evidenziato complicazioni come il restringimento del patch impiantato, infezioni croniche, reazioni da corpo estraneo, rigetto. La ricerca nel ambito dei biomateriali si è così rivolta esclusivamente a materiali degradabili [19].

I più utilizzati nel campo della riparazione della vescica sono i *poliesteri alifatici*, quali l'*acido poliglicolico (PGA)*, l'*acido polilattico (PLA)*, il copolimero dei due, ovvero l'*acido polilattico-co-glicolico (PLGA)* e il *poli-ε-caprolattone (PCL)*, nonché i *poliuretani (PU)* [20].

Lai et al. [21, 22] e *Basu et al.* [23] hanno mostrato come un patch in PGA, ricoperto da PLGA liquido, fosse in grado, previa semina cellulare *in vitro*, di ripristinare in maniera

sufficiente la funzionalità e la capacità della vescica, intesa come volume massimo di liquido immagazzinabile all'interno dell'organo, in seguito all'operazione di cistoplastica. In tutti e tre i lavori il biomateriale, oltre a incrementare il volume vescicale, ha anche favorito la formazione dello strato muscolare, grazie alla semina di cellule muscolari lisce (SMC, *Smooth Muscle Cells*) ottenute da diverse sorgenti (biopsia di vescica di coniglio [21], tessuto muscolare intestinale di coniglio [22], tessuto muscolare dei vasi periferici [23]), e dello strato uroteliale, per migrazione, infiltrazione e colonizzazione delle cellule uroteliali presenti sulla vescica ai bordi del patch (Figura 1.4).

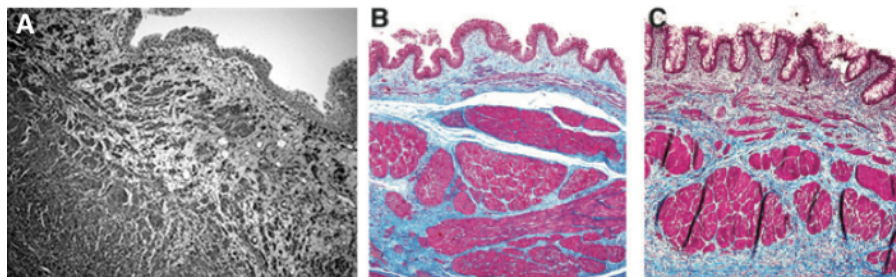


Figura 1.4: Immagini istologiche dello strato uroteliale e muscolare rigenerato su patch in PLGA a partire da cellule muscolari autologhe di vescica (colorazione con *Ematossilina & Eosina (H&E)*) (A) [21], da cellule muscolari dei vasi tessuto adiposo (B) e della rete vascolare periferica (C) (colorazione *tricromica di Masson*) [23].

Nel 2009 *Baker et al.* [24] hanno confrontato le proprietà di schiume di PLGA e di PCL come scaffold per la semina *in vitro* (7 giorni di coltura statica) di cellule stromali umane di vescica. Con i loro risultati hanno evidenziato una migliore adesione cellulare sulla schiuma in PCL piuttosto che su quella in PLGA (Figura 1.5). Questo risultato è probabilmente dovuto alla minore rigidità della schiuma di PCL rispetto al PLGA, simile a quella della vescica, che ha permesso alle cellule di insediarsi più agevolmente nello scaffold tridimensionale di PCL.

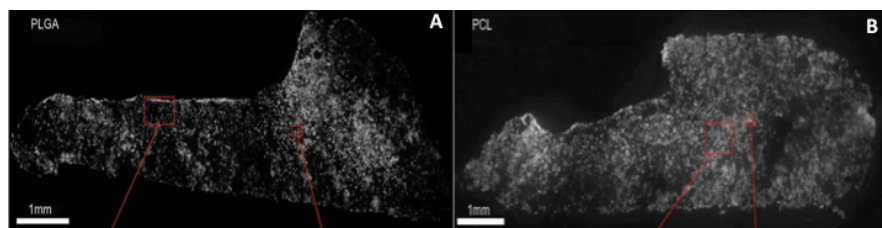


Figura 1.5: La colorazione con Hoechst 33258 (colorazione dei nuclei cellulari) evidenzia la distribuzione di cellule stromali di vescica sulle schiume di PLGA (A) e di PCL (B) [24].

Danielsson et al. invece hanno valutato l'efficacia di scaffold poliestere-uretanici degradabili (*Degrapol*®) [19]. In questo studio, cellule muscolari lisce umane sono state seminate su schiuma in *Degrapol*® e lasciate in coltura statica per 4 giorni: i risultati (Figura 1.6) mostrano una buona penetrazione delle cellule nello scaffold, assenza di reazione infiammatoria e immunologica, ma un tasso di proliferazione molto basso, motivato principalmente dalle condizioni di coltura statica (colture in spinner flask hanno infatti dimostrato una proliferazione leggermente migliore).

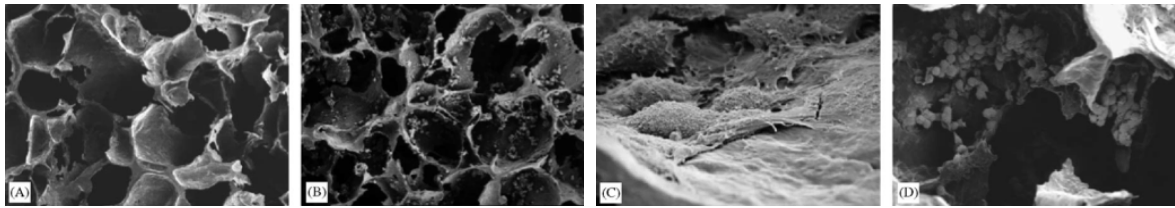


Figura 1.6: Immagini a microscopio elettronico dello scaffold in *Degrapol*® (A, 100x), seminato con cellule muscolari umane dopo 2 ore (C, D, 2000x e 350x) e dopo 2 giorni (B, 100x) [19].

Il vantaggio dei biomateriali sintetici rispetto ai materiali di origine naturale sta principalmente nella grande riproducibilità della morfologia (in quanto realizzati sinteticamente attraverso procedure di laboratorio standardizzabili), nella velocità di produzione e nel controllo delle proprietà meccaniche, della velocità di degradazione, della porosità e della microstruttura. Vista la loro termoplasticità, possono essere realizzati come scaffold tridimensionali con topologia e dimensioni specifiche utilizzando diverse tecniche (tra cui stampaggio, estrusione, *solvent casting*, tecniche a separazione di fase e *gas-foaming*). In più i prodotti della degradazione sono metaboliti naturali, non tossici eliminati dall'organismo sotto forma di CO₂ o di H₂O [14]. L'aspetto fondamentale che manca però è il riconoscimento biologico (spesso lo sviluppo di tessuto fibroso e cicatriziale viene osservato a causa di questa carenza), nonché la bioattività che permette l'adsorbimento delle proteine, che a loro volta incentivano l'adesione cellulare.

In questo senso, diversi studi si sono concentrati sulla microstrutturazione e nanostrutturazione (Figura 1.7) della superficie del biomateriale [20, 25-28], facendo riferimento al concetto di *contact guidance*: è stato infatti dimostrato come la micro e nanostrutturazione della superficie del biomateriale svolge un ruolo fondamentale nella adesione, nella proliferazione e nell'attivazione cellulare in quanto uno scaffold nanostrutturato, grazie alle dimensioni della sua rugosità superficiale simili a quelle delle

proteine di adesione (come ad esempio le integrine), va a simulare l'ambiente extracellulare adatto per l'adsorbimento delle proteine stesse, incrementando così le proprietà bioattive del materiale. Rispetto alle superfici non trattate sono stati osservati miglioramenti sia nell'adesione di SMCs [27], sia nell'adesione di cellule uroteliali (UCs, *Urothelial Cells*) [28].

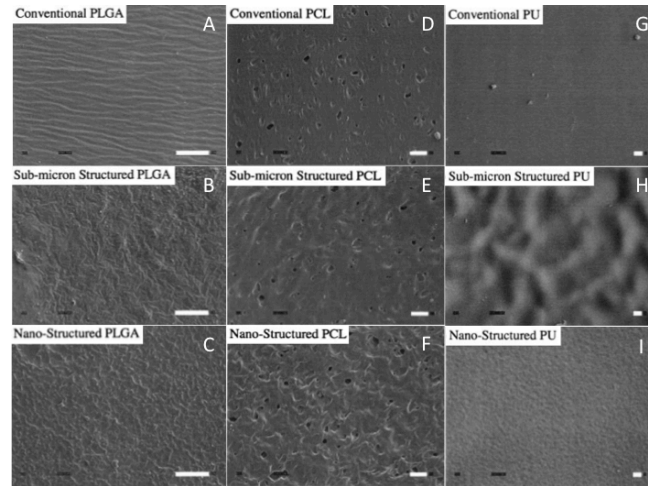


Figura 1.7: Superficie in PLGA non trattata (A), microstrutturata (B) e nanostrutturata (C); superficie in PCL non trattata (D), microstrutturata (E) e nanostrutturata (F); superficie in PU non trattata (G), microstrutturata (H) e nanostrutturata (I) [27].

1.2.2 Scaffold biologici

L'utilizzo di materiali di origine biologica, oltre a limitare il verificarsi dei fenomeni indesiderati dovuti all'utilizzo di matrici sintetiche (scarsa biocompatibilità dell'impianto a lungo termine, possibile formazione di capsula fibrotica, ecc.), è vantaggioso in quanto consente di ottenere scaffold bioartificiali con spiccate caratteristiche di *biointegrazione e bioinduzione*, aspetti tipici del processo di riconoscimento a livello biologico. La presenza di opportune sequenze amminoacidiche all'interno dello scaffold biologico consente infatti di promuovere una adeguata adesione cellulare al substrato di crescita e guidare la sintesi di nuova ECM da parte delle cellule su di esso coltivate. Inoltre, l'elemento biologico consente una corretta integrazione ottimale post-impianto *in vivo* tra il patch ingegnerizzato e il tessuto nativo del paziente.

A questa categoria appartengono sia gli scaffold ottenuti da materiali di derivazione naturale (collagene, alginato), sia le matrici di tessuti decellularizzati (vescica e intestino).

1.2.2.1 Scaffold ottenuti da polimeri naturali

Di tutti i polimeri naturali, il *collagene* è il più abbondante e ubiquitario nell'organismo, e può essere purificato direttamente da tessuti sia umani sia animali con trattamenti enzimatici ed estrazioni acido/sale. Il collagene contiene nella sua sequenza amminoacidica domini specifici per l'adesione cellulare (ad esempio la sequenza RGD): questo permette a diversi tipi cellulari di mantenere il loro fenotipo e la loro attività, sia quando vengono coltivati *in vitro* sulla matrice, sia quando lo scaffold seminato viene poi impiantato *in vivo* [14]. Il collagene *in vivo* viene degradato con attacchi sequenziali di enzimi lisosomiali, per cui il tasso di riassorbimento può essere regolato variando la densità dell'impianto e l'estensione dei cross-link intermolecolari [29]. Nonostante queste caratteristiche, ad oggi scaffold ottenuti a partire da proteine naturali sono principalmente i) idrogeli deboli, non in grado di supportare meccanicamente la formazione di nuova matrice [30], ii) matrici insolubili che garantiscono il supporto meccanico, ma la cui microarchitettura non è né biomimetica né facilmente rimodellabile da parte delle cellule [31].

Le tecniche di lavorazione del collagene permettono di ottenere scaffold strutturati come spugne, gel o film. *Becker et al.* [32] hanno realizzato una matrice di collagene a due strati (con differenti porosità) che hanno chiamato *UroMaix*. La coltura di SMCs e UCs sulla matrice *UroMaix* ha mostrato il mantenimento del fenotipo di entrambi i tipi di cellule; in più è stato osservato un orientamento definito sia della parte uroteliale che di quella muscolare, grazie principalmente alle porosità differenti specifiche dei due strati per i diversi tipi cellulari.

Hattori et al. [33] si sono invece concentrati sulla realizzazione di spugne di collagene, con o senza l'aggiunta del *grande omento* (membrana di rivestimento degli organi nella cavità addominale) in fase di fabbricazione. Le spugne sono state impiantate *in vivo* in un modello di maiale. I risultati hanno mostrato come le spugne senza grande omento non avessero le proprietà meccaniche necessarie per sostenere la funzionalità del tessuto; quelle con omento invece, pur mostrando assenza di perdite di urina e crescita di urotelio nella superficie interna, hanno evidenziato dopo 4 settimane numerose infiammazioni nella regione muscolare, con formazione di tessuto lenta ed incompleta.

Differenti lavori hanno preso in considerazione l'utilizzo di gel di collagene, sottoposti ad un processo di compressione confinata per migliorare le loro proprietà meccaniche generalmente scarse a causa della grande quantità di liquido trattenuta al loro interno [30,

31, 34]. Il processo di compressione confinata, in grado di rimuovere il 99% del liquido presente nel gel, è osservabile in Figura 1.8.

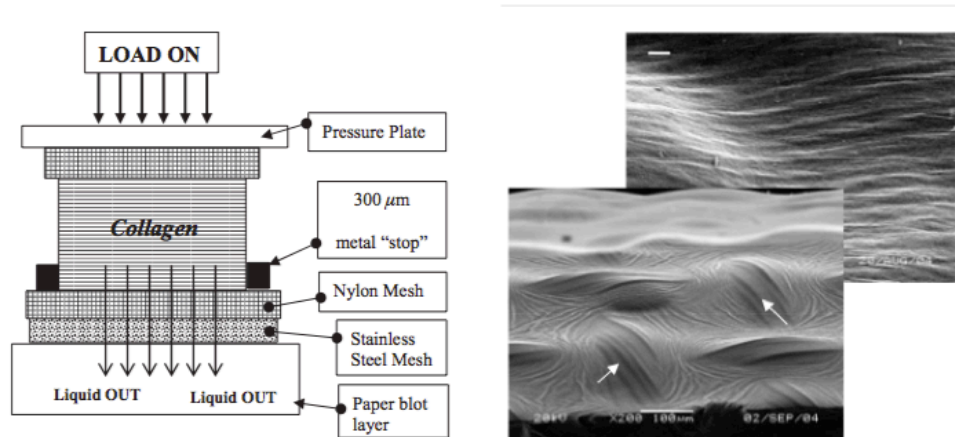


Figura 1.8: Compressione confinata. A sinistra: Il carico genera una compressione confinata sul gel di collagene, che inizia a compattarsi essudando dal basso il liquido che conteneva. Il liquido viene assorbito dalla carta assorbente, impedendo così un retro flusso; a destra: Immagini SEM del gel di collagene compresso non pretensionato (immagine in basso) e dopo (immagine in alto) un pretensionamento a 25% di deformazione. Le frecce individuano i solchi lasciati dalla mesh di Nylon in fase di compressione [31].

Il processo prevede l'applicazione di un carico in grado di comprimere il collagene su una mesh di Nylon, attraverso la quale il liquido può essudare ed essere assorbito dalla carta assorbente a valle della mesh (Figura 1.8, a sinistra). Con questo trattamento le cellule hanno mostrato buona vitalità e proliferazione sia su scaffold impiantati direttamente *in vivo* [31, 34], sia su scaffold seminati *in vitro* pre-impianto [30]. In particolare, *Engelhardt et al.* [30] sono riusciti a seminare su gel di collagene compresso sia UCs che SMCs, ottenendo una composizione del tessuto ingegnerizzato molto simile a quella fisiologica della vescica.

Un approccio alternativo per incrementare le proprietà meccaniche delle matrici di origine naturale è quello di creare scaffold ibridi, in parte naturali per ottenere *biointegrazione* e *bioinduzione*, in parte sintetici, per garantire adeguate proprietà meccaniche tali da supportare la rigenerazione del tessuto [17, 35]. In particolare, *Atala et al.* [35] hanno utilizzato uno scaffold ibrido in collagene e PGA seminato con UCs e SMCs e ricoperto con grande omento (Figura 1.9) in interventi chirurgici di cistoplastica su 7 pazienti affetti da patologia neurologica della vescica in seguito a mielomeningocele.

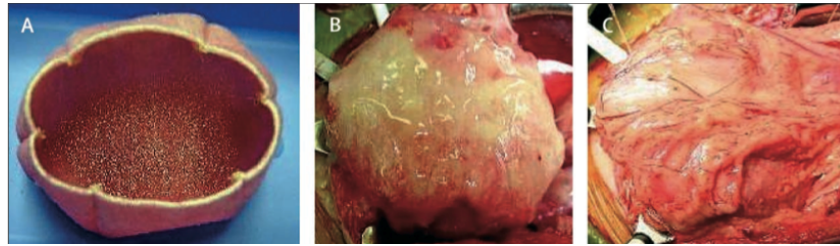


Figura 1.9: (A) Scaffold in collagene-PGA con forma simile a quella della vescica seminato con UC e SMC; (B) vescica ingegnerizzata anastomizzata con la vescica nativa; (C) impianto ricoperto con colla di fibrina e grande omento [35].

I risultati hanno mostrato un parziale recupero della funzionalità delle vesciche malate di tutti i pazienti, in particolare capacità e distensibilità del tessuto sono migliorate. Lo scaffold ibrido dunque, grazie alle sue proprietà meccaniche e bioinduttive, ha permesso un ripristino della continuità tissutale soddisfacente e il recupero della funzionalità della vescica.

Un altro polimero naturale esplorato nell'ambito dell'ingegneria tissutale urovescicale è l'*alginato*: polisaccaride isolato dalle alghe marine che è stato spesso utilizzato come *microcarrier* iniettabile in applicazioni di *cell delivery*. *Pariente et al.* [36] hanno confrontato le potenzialità di diversi tipi di biomateriale, tra cui l'alginato, come scaffold per la crescita cellulare *in vitro*. I risultati però mostrano come, di tutti i materiali utilizzati, lo scaffold in alginato sia l'unico che mostra bassa vitalità cellulare e bassa attività metabolica, determinando così un fallimento totale dell'impianto, e quindi una scarsa potenzialità dell'alginato ad essere utilizzato come scaffold per l'ingegneria del tessuto vescicale (Figura 1.10).

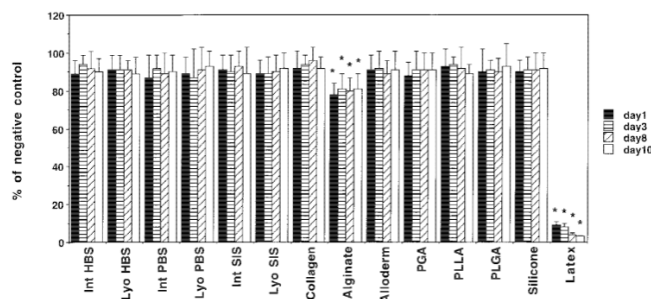


Figura 1.10: Vitalità delle UC umane a diversi istanti di tempo (1, 3, 8, 10 giorni) tramite saggio *Neutral red*. I risultati sono mostrati in % rispetto al controllo negativo (medium fresco). Il controllo positivo è il lattice. L'alginato è il peggiore tra gli scaffold considerati (in termini di vitalità cellulare) [36].

1.2.2.2 Scaffold ottenuti da tessuti decellularizzati.

Le matrici di tessuto decellularizzato sono matrici biologiche ottenute rimuovendo la componente cellulare tramite processi chimici, fisici o enzimatici [14]. Un lavoro pionieristico dell'utilizzo di matrici decellularizzate è rappresentato da *Southgate et al.* [37], dove viene descritta la sostituzione della procedura enterocistoplastica con un'operazione di *enterocistoplastica composita* (Figura 1.11): invece di utilizzare l'intero tessuto intestinale, si procede a una de-epitelializzazione tramite raschiamento del tessuto epiteliale intestinale e a una semina al suo posto di cellule uroteliali espanse *in vitro*.

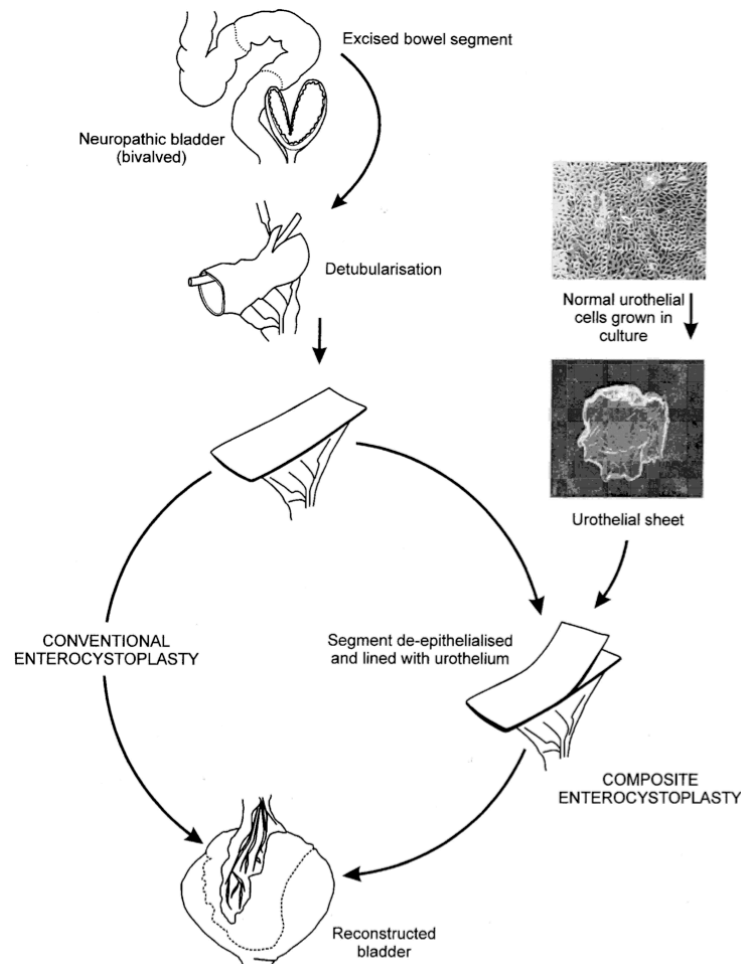


Figura 1.11: Diagramma che confronta i processi di enterocistoplastica tradizionale e composita. Nella procedura convenzionale, un segmento vascolarizzato di intestino viene isolato, detubularizzato e utilizzato per ricostruire la vescica malata. I problemi clinici conseguenti derivano dall'interazione del tessuto epiteliale intestinale con l'urina. Nell'enterocistoplastica composita, il segmento intestinale viene de-epitelializzato e seminato con uno strato uroteliale espanso *in vitro*. Le immagini mostrano le cellule uroteliali e il foglietto di urotelio che va a sostituire l'epitelio intestinale [37].

In questa specifica applicazione viene mantenuto il tessuto muscolare intestinale in quanto derivante dallo stesso organismo. Gli scaffold decellularizzati invece, nella loro concezione più generale, prevedono la rimozione di tutte le componenti cellulari presenti nel tessuto, in modo che anche tessuti di origine xenogenica possano essere utilizzati in organismi umani senza generare alcun tipo di reazione infiammatoria o immunitaria.

Come è noto da diverso tempo, la ECM è una componente vitale, dinamica e indispensabile per tutti i tessuti e gli organi, ed è lo “scaffold naturale” nei processi di morfogenesi e di ricostruzione in seguito a lesione. Le proteine che la compongono infatti non hanno solo il compito di supporto strutturale, ma mediano anche i meccanismi di attacco cellulare; in più sono un bacino di fattori molecolari che, con i loro segnali, modulano diversi processi come l'angiogenesi, la migrazione cellulare, la proliferazione cellulare, le reazioni infiammatorie o immunitarie e la riparazione del tessuto [38]. L'utilizzo della ECM come scaffold per l'ingegneria dei tessuti dunque mostra numerosi vantaggi:

- Incrementa in maniera pressoché illimitata la disponibilità di tessuto (essendo una sorgente xenogenica) senza suscitare reazioni immunitarie nell'organismo ricevente;
- Considera materiale biologico con una varietà di molecole perfettamente adatte a supportare i processi cellulari necessari per garantire una funzionalità ottima del tessuto da cui sono stati raccolti.
- L'arrangiamento delle proteine strutturali viene conservato, quindi le proprietà meccaniche delle matrici acellulari non dovrebbero essere significativamente differenti da quelle del tessuto nativo.
- La conservazione della sovrastruttura del tessuto, ossia l'organizzazione tridimensionale delle proteine strutturali, permette di mantenere anche le caratteristiche microscopiche e ultrastrutturali (come ad esempio la porosità), importanti nel modulare il comportamento delle cellule a contatto con lo scaffold, in modo da controllare l'abilità delle cellule di migrare nello scaffold o indurre nelle cellule il fenotipo specifico del tessuto [39].

Le matrici acellulari che sono state studiate maggiormente in letteratura sono la *submucosa* dell'intestino tenue (SIS, *Small Intestinal Submucosa*) e la matrice acellulare di vescica (BAM, *Bladder Acellular Matrix*, detta anche UBM, *Urinary Bladder Matrix*).

La SIS è una matrice biologica xenogenica, ricca di collagene, acellulare e biodegradabile ed è stata introdotta per la prima volta nel 1989 da *Badylak et al.* come matrice per la sostituzione tissutale in campo vascolare. Questa matrice deriva dall'intestino tenue del maiale nel quale la mucosa viene meccanicamente rimossa dall'interno, mentre la tunica muscolare e l'avventizia vengono rimosse dalla superficie esterna [14]. Gli scaffold in SIS sono composti per il 90% da collagene (principalmente di tipo I, ma anche di tipo III, IV, V e VII), e per il restante 10% da glicosamminoglicani (GAGs), molecole di adesione (fibronectina e laminina) e fattori di crescita di diverso tipo. Analisi dell'orientamento delle fibre di collagene hanno invece confermato come le proprietà meccaniche della matrice, sebbene pensate per i processi di peristalsi, siano funzionali anche per il ripristino del tessuto vescicale [39]. Nonostante ciò, i risultati in letteratura non sono così incoraggianti: sebbene venga riconosciuto il mantenimento della vitalità cellulare sia di UCs che di SMCs [36], in numerosi studi viene sottolineata la capacità solo parziale da parte della SIS di ripristinare uno strato muscolare funzionale e simile a quello originale [14, 21, 40]. Si è passati così a considerare direttamente il tessuto decellularizzato di vescica. A differenza della SIS, la BAM non è associata ad un unico processo di fabbricazione né ad un'unica composizione del tessuto: le matrici decellularizzate di vescica infatti possono riferirsi alla sola *mucosa* [41, 42], alla sola *submucosa* [43] alla *lamina propria* e alla *tunica muscolare* [44, 45] (Figura 1.12) o al tessuto vescicale nel suo complesso [11, 12, 46].

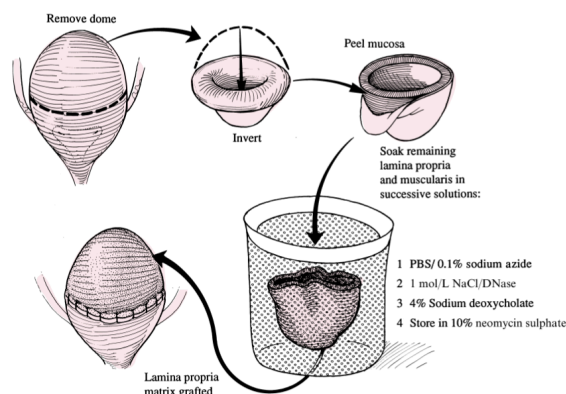


Figura 1.12: Schema con i passaggi da seguire per ottenere BAM a partire dalla *lamina propria* e dalla *tunica muscolare* [33]. Dopo aver rimosso la parte superiore della vescica (duomo), viene rimossa la *mucosa* interna. I restanti strati sono poi trattati con agenti decellularizzanti, in modo da poter generare la BAM, che a questo punto può essere impiantata *in vivo*.

Il vantaggio nel considerare il tessuto nel suo complesso rispetto agli altri approcci sta nel fatto che l'organizzazione della ECM è funzionale alla sua collocazione spaziale all'interno di tessuti ed organi e al tipo di cellule con cui viene a contatto [38]: nella vescica, la ECM della *mucosa* è caratterizzata da componenti proteiche in quantità e organizzazione spaziale diverse rispetto a quelle della matrice della *tunica muscolare*, per questo conservarle entrambe nello scaffold consente di creare un ambiente favorevole all'adesione e proliferazione tanto di UCs quanto di SMCs.

Numerosi studi hanno permesso di caratterizzare la BAM in maniera approfondita: nella membrana decellularizzata sono stati individuati gli stessi tipi di collagene della SIS, però con una quantità maggiore di collagene III (importante per garantire una struttura meno rigida alla vescica [38]) e VII [39]. Anche da un punto di vista della caratterizzazione meccanica sono stati condotti diversi studi, che hanno mostrato ad esempio come la BAM mostri poco tempo dopo l'impianto una notevole riduzione delle proprietà meccaniche, dovuta alla rapida degradazione *in vivo* dello scaffold, per poi avere un recupero delle proprietà a lungo termine, dopo che la nuova ECM è stata depositata (Figura 1.13) [39]. Per maggiori approfondimenti a tal riguardo si consulti il *Paragrafo 1.3.3*.

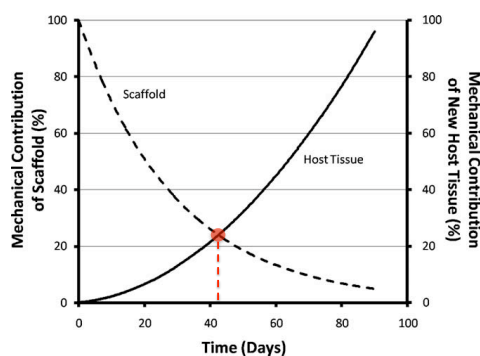


Figura 1.13: Evoluzione del contributo meccanico dello scaffold (linea tratteggiata) e del tessuto di nuova generazione (linea continua) nel tempo per la sostituzione di vescica in un modello canino; la degradazione dello scaffold viene compensata con la produzione di nuovo tessuto. La combinazione dei due identifica un punto di minimo contributo meccanico dello scaffold (in rosso) dopo 40 giorni dall'impianto [39].

I test cellulari in questo caso sono stati più incoraggianti per la BAM rispetto alla SIS: *Piechota et al.* [47] hanno impiantato BAM (non ricellularizzata) ottenuta da diverse fonti xenogeniche (criceto, coniglio e cane) su un modello di ratto, e hanno osservato non solo che il tessuto vescicale si ripristinava in maniera pressoché simile a quello originale, ma

anche che la neo-vascularizzazione ha dato origine nel tessuto ingegnerizzato a vasi molto ben organizzati. *Kim et al.* [43] hanno misurato la vitalità di SMCs umane seminate su BAM sia *in vitro* sia *in vivo* impiantando il costrutto a livello subcutaneo in un modello murino: in entrambi i casi i risultati hanno mostrato la formazione sia *in vitro* sia *in vivo* di tessuto con proprietà contrattili simili a quelle della vescica. Gli stessi risultati sono stati ottenuti da *Chen et al.* [46], da *Gabouev et al.* [45] e da *Yang et al.* [12].

1.3 Decellularizzazione dei tessuti di vescica

1.3.1 Processo di decellularizzazione: stato dell'arte

La decellularizzazione è il processo che sta alla base dell'ottenimento della BAM. L'obiettivo principale della decellularizzazione consiste nel rimuovere la componente cellulare dal tessuto, preservandone la sovrastruttura nativa e la composizione della ECM [48]. Un esempio di tessuto decellularizzato è mostrato in Figura 1.14.

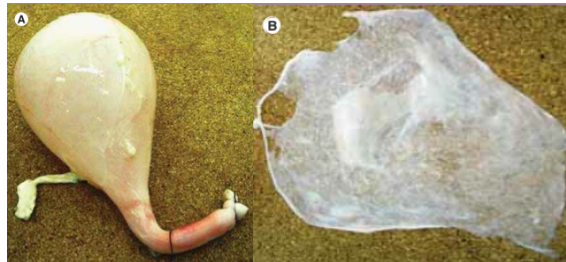


Figura 1.14: (A) Vescica intera; (B) Tessuto di vescica decellularizzato [41].

In generale un protocollo di decellularizzazione prevede prima un'azione litica sulle cellule, in modo da favorirne il distacco dalla matrice; conseguenza di questo passaggio solitamente è la formazione di vuoti all'interno della matrice, dovuti all'assenza delle cellule, e quindi un aumento della permeabilità del tessuto. In seguito deve essere effettuata una rimozione delle componenti cellulari e nucleiche per far sì che il tessuto rimanga privo di residui in grado di indurre risposte infiammatorie o immunitarie. Un'ultima fase di lavaggio permette di rimuovere dalla matrice ottenuta sia i residui nucleici non rimossi nella fase precedente, sia gli eventuali residui (chimici o enzimatici) degli agenti decellularizzanti utilizzati. L'efficacia del processo di decellularizzazione di ciascun organo o tessuto dipende da molti fattori, tra i quali la densità cellulare, lo spessore e l'organizzazione del tessuto preso in considerazione. Ogni metodo o agente di rimozione

cellulare utilizzato per decellularizzare il tessuto va ad alterare la composizione dell'ECM e va a causare un certo grado di danneggiamento della sovrastruttura dell'organo. L'obiettivo di un buon processo di decellularizzazione dunque consiste nel minimizzare questi effetti indesiderati [48]. Tre sono i tipi di agenti comunemente utilizzati nei protocolli di decellularizzazione: *agenti chimici*, *biologici* e *fisici*. Un elenco completo di tutti gli agenti utilizzati con le loro caratteristiche si trova in Tabella 1.1:

Agent/Technique	Mode of action	Effects on ECM
Chemical Agents		
Acids and bases	Solubilizes cytoplasmic components of cells, disrupts nucleic acids, tend to denature proteins	May damage collagen, GAG, and growth factors
Hypotonic and hypertonic solutions	Cell lysis by osmotic shock, disrupt DNA-protein interactions	Effectively lyses cells, but does not effectively remove cellular residues
Non-ionic detergents	Disrupt DNA-protein interactions, disrupt lipid-lipid and lipid-protein interactions and to a lesser degree protein-protein interactions	
- Triton X-100		Mixed results with efficacy dependent on tissue, more effective cell removal from thin tissues, some disruption of ultrastructure and removal of GAG, less effective than SDS
Ionic detergents	Solubilize cell and nucleic membranes, tend to denature proteins	
- Sodium dodecyl sulfate (SDS)		Effectively removes nuclear remnants and cytoplasmic proteins from dense tissues, tends to disrupt ultrastructure, removes GAG and growth factors and damages collagen
- Sodium deoxycholate		Mixed results with efficacy dependent on tissue thickness, some disruption of ultrastructure and removal of GAG
- Triton X-200		More effectively removes cells from thin tissues but with greater disruption of ultrastructure compared to other detergents
Zwitterionic detergents	Exhibit properties of non-ionic and ionic detergents	
- CHAPS		Effectively removes cells with mild disruption of ultrastructure in thin tissues
- Sulfobetaine-10 and -16 (SB-10, SB-16)		Effectively removes cells with mild disruption of ultrastructure in thin tissues
Solvents		
- Alcohols	Cell lysis by dehydration, solubilize and remove lipids	Effectively removes cells from dense tissues and inactivates pyrogens, but crosslinks and precipitates proteins, including collagen
- Acetone	Cell lysis by dehydration, solubilizes and removes lipids	Effectively removes cells from dense tissues and inactivates pyrogens, but crosslinks and precipitates proteins, including collagen
- Tributyl phosphate (TBP)	Forms stable complexes with metals, disrupts protein-protein interactions	Mixed results with efficacy dependent on tissue, dense tissues lost collagen but impact on mechanical properties was minimal

Tabella 1.1: Elenco dei principali agenti chimici, enzimatici e fisici utilizzati nei protocolli di decellularizzazione presenti in letteratura (la tabella continua nella pagina seguente). Nell'ultima parte della tabella è riportato l'elenco delle tecniche utilizzate per applicare gli agenti [48].

Agent/Technique	Mode of action	Effects on ECM
Biologic Agents		
Enzymes		
- Nucleases	Catalyze the hydrolysis of ribonucleotide and deoxyribonucleotide chains	Difficult to remove from the tissue, could invoke an immune response
- Trypsin	Cleaves peptide bonds on the C-side of Arg and Lys	Prolonged exposure can disrupt ECM ultrastructure, removes ECM constituents such as collagen, laminin, fibronectin, elastin, and GAG, slower removal of GAG compared to detergents
- Dispase	Cleaves specific peptides, mainly fibronectin and collagen IV	Prolonged exposure can disrupt ECM ultrastructure, removes ECM components such as fibronectin and collagen IV
Chelating Agents (EDTA, EGTA)	Chelating agents bind metallic ions, thereby disrupting cell adhesion to ECM	Typically used with enzymatic methods (e.g. trypsin) but can be used with other agents, ineffective when used alone
Physical and Miscellaneous Agents		
Temperature (freezing and thawing)	Intracellular ice crystals disrupt cell membrane	Ice crystal formation can disrupt or fracture ECM
Direct application of force	Removal of tissue eliminates cells and force can burst remaining cells	Force can directly damage ECM
Pressure	Pressure can burst cells and aid in removal of cellular material	Pressure can disrupt ECM
Electroporation	Pulsed electrical fields disrupt cell membranes	Electrical field oscillation can disrupt ECM
Techniques to Apply Agents		
Perfusion	Facilitates chemical exposure and removal of cellular material	Pressure associated with perfusion can disrupt ECM
Pressure gradient across tissue	Facilitates chemical exposure and removal of cellular material	Pressure gradient can disrupt ECM
Supercritical fluid	Pressure can burst cells, supercritical fluid facilitates chemical exposure and removal of cellular material	Pressure necessary for supercritical phase can disrupt ECM
Agitation	Can lyse cells, but more commonly used to facilitate chemical exposure and removal of cellular material	Aggressive agitation or sonication can disrupt ECM

Tabella 1.1: (continuazione dalla pagina precedente) Elenco dei principali agenti chimici, enzimatici e fisici utilizzati nei protocolli di decellularizzazione presenti in letteratura. Nell'ultima parte della tabella è riportato l'elenco delle tecniche utilizzate per applicare gli agenti [48].

1.3.1.1 Agenti chimici

Gli agenti di tipo chimico più comuni sono riportati in Tabella 1.1 [48]. Come si può osservare, nessuno di quelli a disposizione è in grado di rimuovere totalmente le componenti cellulari mantenendo allo stesso tempo intatta la sovrastruttura della ECM. Di tutti, il detergente ionico *Sodio dodecilsolfato* (*SDS*) è quello più efficace e in grado di fare la differenza nella completa rimozione della componente cellulare, ma allo stesso tempo danneggia pesantemente la ECM, causando rigonfiamento irreversibile, denaturazione delle proteine e perdita delle proprietà meccaniche rispetto al tessuto nativo. In più, è indicato anche come possibile causa di eventi citotossici e responsabile di una bassa

ricellularizzazione della matrice *in vitro* [49]. Danni ingenti alla matrice sono arrecati anche da fissatori del tessuto come *alcohol* e *acetone* (che fanno precipitare le proteine della ECM), da acidi e da basi (che denaturano le proteine come il collagene). Ciò, in applicazioni dove le proprietà meccaniche della matrice sono fondamentali per la rigenerazione del tessuto (come nel caso della rigenerazione del tessuto vescicale), va ad annullare tutti i vantaggi derivanti dall'utilizzo di ECM acellulare come scaffold. È importante dunque identificare agenti in grado di indurre cambiamenti minimi di architettura e composizione della matrice. Da questo punto di vista, le soluzioni ipotoniche sono le più affidabili in quanto, mediante lisi delle cellule tramite shock osmotico, non agiscono in alcun modo sulle proteine strutturali; la loro bassa efficacia nella rimozione delle componenti cellulari può essere compensata applicando diversi risciacqui, oppure associandogli l'azione di agenti più efficaci. Il detergente non ionico *Triton X-100* ad esempio permette una rimozione adeguata dei residui cellulari là dove l'effetto osmotico è insufficiente, con una modifica minima della sovrastruttura della matrice.

Per i detergenti, la rimozione di DNA (e anche di proteine della ECM) aumenta all'aumentare del tempo di esposizione e varia al variare dell'organo considerato.

Alla fine del processo di decellularizzazione, è fondamentale poi assicurarsi di eliminare i residui chimici presenti nella ECM, in quanto anche a basse concentrazioni manifestano elevata citotossicità e porterebbero dunque a un fallimento sicuro dell'impianto.

1.3.1.2 Agenti biologici

Gli agenti biologici, come suggerisce la Tabella 1.1, possono essere divisi in due categorie: enzimatici e non enzimatici [48].

Tra gli agenti enzimatici ci sono le *nucleasi*, come la *DNAsi* e l'*RNAsi*, le quali spaccano le sequenze degli acidi nucleici e permettono di rimuovere i frammenti nucleotidici in seguito a lisi cellulare, oppure *tripsina* e *collagenasi* che vanno a distruggere l'organizzazione delle proteine strutturali (in particolare il collagene) della matrice, rimuovendo la componente cellulare con tempistiche molto lente. Gli enzimi sono in grado dunque di rimuovere residui cellulari o costituenti indesiderati della ECM con grande specificità. Tuttavia, la completa rimozione cellulare con il solo trattamento enzimatico è molto difficile e gli eventuali residui enzimatici possono ostacolare la ricellularizzazione ed evocare una risposta immunitaria avversa. In più, compromettendo notevolmente la

matrice, possono essere utilizzati come agenti decellularizzanti solo quando il mantenimento della sovrastruttura della matrice non è un parametro critico per la specifica applicazione clinica dello scaffold.

Gli agenti non enzimatici (come ad esempio l'*EDTA*), più ancora di quelli enzimatici, sono inefficaci nella rimozione cellulare, soprattutto se usati da soli.

1.3.1.3 Agenti fisici

I principali agenti di tipo fisico sono mostrati in Tabella 1.1 [48]. I processi di congelamento-scongelo del tessuto lisano le cellule in maniera efficace, ma per rimuovere i detriti membranosi e intracellulari sono necessari processi successivi. Numerosi cicli di congelamento-scongelo non incrementano in maniera significativa la perdita di proteine della ECM dal tessuto, sebbene vengano creati piccoli danneggiamenti alla sovrastruttura del tessuto.

Una qualsiasi applicazione diretta di forza meccanica (ad esempio l'abrasione) permette invece di rimuovere le cellule sulla superficie di un organo (urotelio, epitelio, ecc.), ma va a danneggiare irrimediabilmente gli strati sottostanti e la membrana basale. Un approccio migliore è l'applicazione di una pressione idrostatica, la quale agisce in poco tempo e può essere più efficace di detergenti o enzimi nel rimuovere le cellule da tessuti sottili.

Infine, l'*elettroporazione irreversibile non-termica (NTIRE)* prevede l'applicazione di impulsi elettrici (di durata di qualche μs) attraverso il tessuto che si vuole decellularizzare. In questo modo si induce la formazione di micropori nella membrana cellulare a causa della destabilizzazione del potenziale elettrico transmembrana. La presenza dei pori causa la perdita di omeostasi cellulare e quindi la morte della cellula. Sebbene il meccanismo di rimozione dei detriti non sia del tutto chiaro (alcune ipotesi dicono che la rimozione sia immuno-mediata), alcuni studi hanno dimostrato che il tessuto così processato è completamente privo di cellule [48]. Selezionando in maniera appropriata i parametri per ridurre la generazione di calore, si possono mantenere l'integrità e la morfologia della ECM. I limiti principali di questo approccio sono la possibilità di utilizzo solo su campioni di piccole dimensioni (e quindi c'è una limitazione alla dimensione dello scaffold che si può ottenere ed utilizzare) e, nel caso in cui la rimozione dei detriti sia effettivamente immuno-mediata, la necessità di applicare il processo *in vivo*, senza quindi la possibilità di associare all'elettroporazione altri agenti decellularizzanti.

1.3.2 Tecniche di decellularizzazione

L'efficacia degli agenti di decellularizzazione dipende dalle caratteristiche del tessuto, come spessore e densità, dalla sua organizzazione e dal tipo di agente utilizzato. La complessità e la durata del protocollo di decellularizzazione invece sono proporzionali al grado di conservazione strutturale e biologica richiesto per il tessuto post-processato.

Le tecniche di decellularizzazione sono principalmente quattro (Tabella 1.1):

- **Perfusione di organo intero:** la perfusione anterograda e retrograda attraverso la rete vascolare è una tecnica valida per decellularizzare l'organo preservandone l'architettura tridimensionale, in quanto permette di diffondere l'agente decellularizzante in tutti i tessuti e allo stesso tempo di risciacquare l'organo per raccogliere i detriti cellulari. Questa tecnica è stata usata in particolare per la decellularizzazione degli organi che hanno una rete vascolare ben strutturata e che permette di raggiungere tutti gli strati interni dell'organo (cuore, fegato, rene) [48].
- **Fluido in stato supercritico:** un fluido si dice in stato supercritico quando ha un valore di pressione e di temperatura che superano quelli del punto critico. L'anidride carbonica in stato supercritico è stato dimostrato essere capace di rimuovere i residui cellulari quando attraversa il tessuto in quantità controllata. I vantaggi di questa tecnica consistono nell'utilizzo di una sostanza inerte (anidride carbonica) per la rimozione delle cellule e nell'alterazione minima delle proprietà meccaniche della ECM.
- **Immersione e agitazione:** non tutti i tessuti hanno una rete vascolare tale da permettere la decellularizzazione per perfusione. L'approccio più comune per questo tipo di tessuti è l'immersione nell'agente decellularizzante associata ad agitazione (*shaking* orbitale). La durata di questo protocollo, utilizzato per diversi tipi di tessuto, è funzione della densità, dello spessore e del tipo di tessuto, del detergente usato e dell'intensità di agitazione.
- **Gradiente di pressione:** l'induzione di un gradiente di pressione a cavallo del tessuto durante la decellularizzazione può migliorare l'azione dell'agente decellularizzante, con mantenimento ottimale della sovrastruttura della ECM e quindi delle proprietà meccaniche. La perfusione luminale di organi cavi con una pressione transmurale può forzare gli agenti decellularizzanti all'interno di tessuti anche densi, e spingere così i residui cellulari all'esterno della ECM. In questa maniera non solo l'efficacia della decellularizzazione aumenta, ma anche la durata del processo complessivo di

decellularizzazione viene ridotta, limitando gli effetti collaterali che l'agente decellularizzante può avere sulle proteine della matrice.

1.3.3 Caratterizzazione del tessuto decellularizzato

Il materiale cellulare residuo in seguito a decellularizzazione presente nella matrice può creare sia problemi di citocompatibilità *in vitro*, sia risposte immunitarie *in vivo*, in seguito all'impianto del tessuto ingegnerizzato, da parte delle cellule autologhe del paziente. Dato che le tecniche sopra menzionate non sono in grado di rimuovere il 100% del materiale cellulare, è importante definire un valore soglia del contenuto cellulare residuo tale per cui alla semina su scaffold corrisponda una crescita e un rimodellamento del tessuto ottimale, e definire "buon processo di decellularizzazione" quello che genera un residuo inferiore al valore di soglia definito. Basandosi su studi i cui risultati hanno mostrato una buona risposta di rimodellamento e un'assenza di risposta immunitaria, sono stati definiti i seguenti criteri per caratterizzare un buon processo di decellularizzazione [5-7, 11, 12, 41, 48]:

- Quantità di DNA a doppio filamento (*dsDNA*, *double stranded DNA*) residuo $\leq 5\%$ della quantità iniziale;
- Assenza di materiale nucleare visibile in sezioni di tessuto colorate con 4',6-diamidin-2-fenilindolo (*DAPI*) o con *Ematossilina&Eosina (H&E)*;

Il focus sul materiale nucleico è giustificato dal fatto che il DNA è direttamente correlato alla reazione infiammatoria e immunitaria avversa dell'ospite, dal fatto che è ubiquitario in tutti i tessuti e tipi cellulari ed è facilmente misurabile tramite saggi.

Il primo criterio è facilmente quantificabile, utilizzando kit commercialmente disponibili come PicoGreen, ioduro di propidio, e bisbenzimidide (Hoechst 33258) [11] oppure tecniche di elettroforesi su gel. Il secondo criterio serve come verifica qualitativa del primo ed è valutato con colorazioni istologiche tra cui *Ematossilina & Eosina (H&M)* [11, 12, 41, 45, 46, 50], tricromia di Masson [43], *DAPI* [12], tricromia di Mallory, pentacromia di Movat, Safrin O, Neutral Red [43]. *Polymerase Chain Reaction (PCR)* e microscopia elettronica sono metodi possibili ma raramente utilizzati per valutare la presenza di eventuali detriti cellulari [51].

Oltre all'assenza di DNA, è importante valutare anche la presenza delle proteine di interesse all'interno della matrice, tra cui ad esempio le proteine strutturali funzionali del

tessuto connettivo: per fare ciò la pratica più comune è l'immunohistochimica, la quale si basa sull'utilizzo di anticorpi monoclonali specifici per determinate componenti tra cui, nel caso specifico della vescica, l'actina muscolare (*SMA, Smooth Muscle Actin*) [11, 12, 45, 50], collagene I e IV [11, 41, 45, 50], laminina [11, 41], desmina [11, 12] e GAG [11]. Gli anticorpi vengono marcati con molecole fluorescenti la cui emissione è visibile al microscopio a fluorescenza.

Un'ulteriore valutazione sulla matrice decellularizzata riguarda le sue proprietà meccaniche. Come già affermato in precedenza, lo scaffold deve garantire un supporto adatto, il più simile possibile a quello dato dalla ECM nativa, per l'adesione cellulare, la proliferazione e la conseguente deposizione di nuova matrice al fine di ricreare tessuto funzionale [14]. La caratterizzazione meccanica della matrice decellularizzata ha dunque il fine principale di verificare quali siano le sue proprietà meccaniche, quanto si discostino da quelle del tessuto nativo e quindi stabilire se la matrice è idonea a essere utilizzata come scaffold per la rigenerazione del tessuto. L'approccio universalmente utilizzato è la prova di trazione monoassiale, durante la quale un campione del tessuto da caratterizzare è sottoposto a trazione con velocità costante fino a rottura. Durante la trazione, viene registrata la curva sforzo-deformazione (o curva σ - ϵ), come mostrato in Figura 1.15 (a destra).

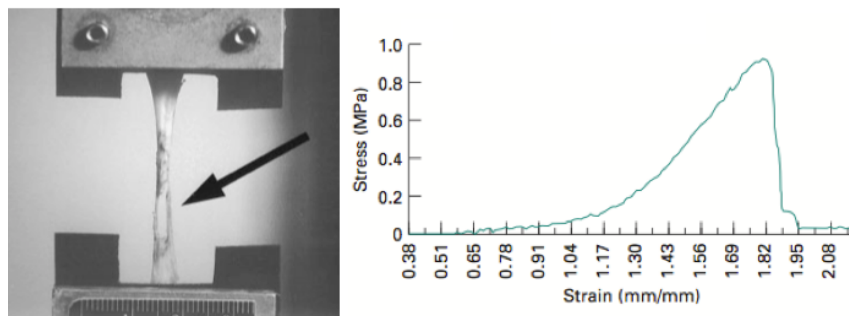


Figura 1.15: A sinistra: campione di BAM posizionato tra due morse di una macchina a trazione monoassiale e sottoposto a trazione fino a rottura. La freccia individua il punto di rottura; a destra: curva sforzo-deformazione corrispondente alla prova di trazione [50].

A partire dalla curva σ - ϵ , possono essere valutati differenti parametri meccanici in grado di definire il comportamento della matrice: tra i più comuni, il modulo di Young [11, 41, 43, 50], lo sforzo e la deformazione di transizione (sforzo e deformazione corrispondenti al

passaggio da bassa pendenza ad alta pendenza della curva) [11], lo sforzo e la deformazione a rottura [11, 42, 50].

Altre prove più raramente utilizzate sono il test di *ball burst* [42], dove una punta metallica sollecita al centro il campione di tessuto vincolato su tutti i lati fino a rottura, e il test di *burst pressure* [11], specifico per organi cavi, che prevede il riempimento dell'organo intero decellularizzato fino alla rottura e la misura della pressione a rottura.

Inoltre, è importante valutare il comportamento meccanico in seguito al processo di sterilizzazione, necessario per inattivare endotossine e DNA batterici e virali eventualmente presenti nella matrice [48], per verificare che non ci sia un peggioramento delle proprietà meccaniche nello scaffold, soprattutto dovuto a perdita della sovrastruttura tridimensionale della matrice e dell'organizzazione delle fibre strutturali. *Freytes et al.* [42] hanno verificato le proprietà meccaniche della BAM in seguito a 3 tecniche di sterilizzazione: *ossido di etilene (ETO)*, *radiazione gamma* e *fasci di elettroni accelerati (e-beam)*, con prove di trazione sia monoassiale che biassiale, misurando cinque parametri indicativi (Forza sviluppata in seguito a trazione sia monoassiale sia biassiale, allungamento massimo, rigidità massima ed energia dissipata). I risultati sono mostrati in Tabella 1.2:

	Biaxial Strength	Uniaxial Strength	Maximum Elongation	Maximum Stiffness	Energy Dissipated
ETO	No change	No change	64% increase	60% decrease	No change
Gamma	48% decrease	56% decrease	No change	48% decrease	53% decrease
E-Beam	68% decrease	62% decrease	19% decrease	52% decrease	50% decrease

Tabella 1.2: Risultati dei test meccanici su BAM trattate con tre differenti agenti sterilizzanti. I valori dei cinque parametri analizzati sono definiti come variazione percentuale rispetto al comportamento della matrice decellularizzata non sterilizzata [42].

Come si può osservare dai dati in Tabella 1.2, nessun metodo di sterilizzazione mantiene inalterati, rispetto alla matrice non trattata con agenti sterilizzanti, i cinque parametri strutturali analizzati. Tra tutti, l'ETO sembra avere influenza minima sulle le proprietà meccaniche della matrice, e quindi appare essere il più idoneo per la sterilizzazione di scaffold decellularizzati.

Infine, un'ultima valutazione sulla BAM riguarda la misura della sua permeabilità, dovuta in particolare alla rimozione dello strato cellulare uroteliale. La valutazione della permeabilità è importante principalmente per verificare il grado di ultrafiltrazione di fluido

che caratterizza le pareti della matrice. *Farhat et al.* [52] e *Cartwright et al.* [53] nei loro lavori hanno infatti misurato la permeabilità della BAM per definire il grado di ultrafiltrazione di urina attraverso le pareti della matrice in seguito a impianto *in vivo*, in modo da sviluppare delle strategie che consentissero di evitare il conseguente verificarsi di fenomeni infiammatori. In particolare, *Cartwright et al.* [53] hanno osservato come liofilizzando la BAM insieme ad acido ialuronico, si ottiene una matrice con un coefficiente di permeabilità molto basso (circa $0.5 \mu\text{l min}^{-1}\text{mmHg}^{-1}$), in grado dunque di rendere il costrutto più impermeabile e quindi più funzionale al contenimento dell'urina all'interno della vescica. L'approccio utilizzato nei due lavori per la misura della permeabilità consiste in una prova in controllo di pressione: in entrambi i lavori è stata imposta sul campione di BAM di maiale una pressione idrostatica costante ($10 \text{ cmH}_2\text{O}$, ossia il valore massimo di pressione che si sviluppa fisiologicamente all'interno della vescica di maiale [53]) ed è stato misurato, a istanti di tempo definiti (ogni ora per tre ore), il volume ultrafiltrato [52, 53]. La permeabilità infine è stata misurata con un indice dato dal volume ultrafiltrato misurato, normalizzato per la durata della prova e la sezione del campione. In particolare, per la BAM non trattata sono stati raggiunti dei valori di permeabilità corrispondenti a circa $68 \mu\text{l min}^{-1}\text{mmHg}^{-1}$ [53] e di circa $9 \mu\text{l min}^{-1}\text{mmHg}^{-1}$ [52].

1.4 Sistemi di coltura per il tessuto di vescica: coltura statica vs. coltura dinamica

Una volta conclusi i processi di decellularizzazione e caratterizzazione, come descritto in precedenza, la matrice, sotto forma di patch, può essere direttamente impiantata *in vivo*, in modo da essere ripopolata dalle cellule autologhe presenti nel tessuto circostante, oppure può prevedere una fase di ricellularizzazione *in vitro*, dove le cellule autologhe, prelevate dal paziente (ad esempio con biopsia), vengono seminate e coltivate sulla matrice pre-impianto.

Dalla letteratura si apprende che i biomateriali su cui sono state seminate le cellule *in vitro* mostrano *in vivo* una migliore rigenerazione del tessuto rispetto a quella indotta da scaffold acellulari; ad esempio, da uno studio è emerso che la matrice BAM ottenuta dalla *submucosa* coltivata con UCs e SMCs e poi impiantata nel modello animale ha mantenuto inalterata la propria morfologia, mentre la matrice acellulare impiantata nelle stesse condizioni ha mostrato un significativo restringimento e fallimento del graft [14].

Il metodo più comunemente utilizzato per la crescita *in vitro* di cellule su matrici decellularizzate consiste nella *coltura statica*, in cui la ricellularizzazione avviene in maniera passiva, senza alcun tipo di sollecitazione, a meno delle sollecitazioni biochimiche fornite con soluzioni specifiche. Nella coltura statica infatti, le matrici seminate sono semplicemente immerse in *medium* di coltura, ossia una soluzione contenente una serie di sostanze (elementi nutritivi, fattori di crescita, amminoacidi, ecc.) necessarie per favorire vitalità e attività cellulare, e mantenute, per un periodo di tempo definito, in incubatore, a valori di umidità e concentrazione di O₂ e CO₂ fisiologici (tipicamente T=37°C, umidità al 95%, 20% di O₂, 5% di CO₂). Questa tecnica però ha sempre mostrato un limitato successo nel formare un tessuto funzionale: le cause principali sono una parziale de-differenziazione delle cellule coltivate, con conseguente incapacità di compensare la degradazione dello scaffold con la produzione di nuova ECM, portando così al fallimento del costrutto. È stato mostrato che, quando fatte crescere in monocultura, le UCs umane sane non esprimono marker associati al citodifferenziamento terminale uroteliale, ma acquisiscono un fenotipo di tipo proliferativo, migratorio, aspecifico. Ciò suggerisce che qualche fattore nell'ambiente della coltura statica sia inappropriato. Questo "fattore mancante" è stato identificato con l'assenza di stimolazione meccanica del tessuto [54].

Il concetto di *meccanotrasduzione* nell'ingegneria dei tessuti è ben noto: forze trasmesse bidirezionalmente tra citoscheletro e matrice extracellulare influenzano l'espressione genica, la sintesi proteica, così come il differenziamento e la proliferazione cellulare. L'esempio più noto di questo processo è il rimodellamento dell'osso: in base allo stato di sollecitazione dell'osso, le cellule presenti nel tessuto (*osteoblasti* e *osteoclasti*) vanno a riassorbire la vecchia matrice ossea e a sintetizzarne di nuova per adattare la struttura al grado di sollecitazione sentito. Per questo motivo gli astronauti di ritorno dallo spazio (dove c'è assenza di gravità) hanno le ossa più fragili [55]. Oltre che nell'osso, mediata da osteoblasti e osteoclasti, questa trasduzione da stimolo meccanico a segnale chimico è stata osservata negli epatociti [56], nei fibroblasti [57], nelle cellule vascolari [58] e nei condrociti [59]. Numerose evidenze sperimentali hanno portato a concludere che a sua volta l'urotelio sia caratterizzato da canali per il sodio meccanosensibili che fungono da trasduttori del sistema nervoso parasimpatico coinvolto nelle sensazioni associate alla vescica. Allo stesso modo, le SMCs della vescica sono sensibili allo stimolo meccanico, e la deformazione ciclica induce sintesi di nuovo tessuto connettivo [54].

La possibilità che lo stimolo fisico moduli la funzione cellulare e lo sviluppo del tessuto ha portato i ricercatori a sviluppare quella che viene definita *coltura dinamica*, attraverso sistemi di stimolazione funzionale, comunemente detti *bioreattori*, in grado di ricellularizzare il tessuto *in vitro* esponendolo a una stimolazione meccanica o idrodinamica simile a quella tipica che il tessuto sperimenta *in vivo* in condizioni fisiologiche. Lo scopo principale dei bioreattori è quello di generare *in vitro*, in maniera corretta e riproducibile, un tessuto in grado di esercitare *in vivo* la funzione per cui è stato progettato. Per fare ciò, il bioreattore deve fornire alle cellule uno stimolo fisico appropriato, un continuo apporto di nutrienti (glucosio, amminoacidi), ossigeno e fattori biochimici, e allo stesso tempo rimuovere costantemente i prodotti di scarto dell'attività metabolica cellulare (come ad esempio acido lattico) [54].

Negli ultimi 10 anni, diversi sono stati gli approcci utilizzati per fornire alle cellule della vescica una stimolazione meccanica *in vitro* simile a quella che le cellule subiscono nell'organo [45, 60-67]. Solo alcuni però hanno applicato la stimolazione attraverso l'utilizzo di un bioreattore. Di questi, *Wallis et al.* [64] hanno sviluppato un bioreattore per la sollecitazione di UCs e SMCs di maiale seminate su patch circolare di BAM in grado di riprodurre la fase di riempimento/svuotamento della vescica (Figura 1.16).

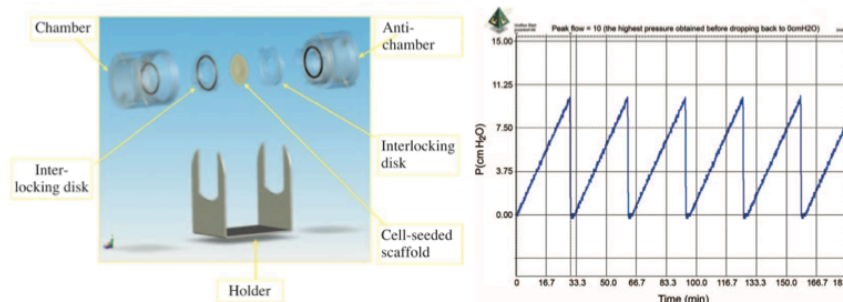


Figura 1.16: A sinistra: schema del bioreattore sviluppato per la sollecitazione di patch di vescica che simula il riempimento e lo svuotamento dell'organo. Il bioreattore è composto da due dischi per il fissaggio del patch e da un sistema camera/anticamera per perfondere il patch; a destra: forma d'onda di pressione applicata al patch di vescica. La forma d'onda prevede un incremento della pressione da 0 a 10 cmH₂O in 30 minuti, seguito da un ritorno alla condizione iniziale della durata di 10 secondi [64].

Come si osserva in Figura 1.16, il bioreattore è costituito da una camera e da un'anticamera, all'interfaccia delle quali viene posizionato il patch, fissato in un disco portasccaffold. La stimolazione meccanica avviene investendo il patch ricellularizzato con

un flusso di *medium* immesso nella camera tramite una pompa controllata via software. Il controllo permette di impostare i valori di portata che consentono di applicare al patch di vescica incrementi lineari di pressione che vanno da 0 a 10 cmH₂O in 30 minuti (in modo da simulare la fase di riempimento della vescica), seguiti da un rapido abbassamento della pressione (che simula lo svuotamento) e quindi da un ritorno alle condizioni iniziali che avviene in 10 secondi (Figura 1.16 a destra). Questo protocollo è stato definito al fine di applicare una sollecitazione alle cellule simile a quella che avrebbero *in vivo*. L'anticamera ha il compito principale di raccogliere il medium ultrafiltrato dal patch (costituito da una matrice decellularizzata porosa) per valutare il valore di permeabilità della matrice in seguito al processo di sollecitazione: infatti, se la stimolazione ha effetto sull'adesione e proliferazione cellulare, la permeabilità dovrebbe con il passare del tempo ridursi sia perché viene sintetizzata nuova matrice, e quindi il tessuto funzionale inizia a formarsi, sia perché le UCs, che impermeabilizzano la matrice, proliferano e colonizzano tutto il patch. I risultati ottenuti hanno mostrato un notevole miglioramento negli scaffold sollecitati meccanicamente rispetto alla coltura statica, sia da un punto di vista dell'espressione genica, sia da un punto di vista di sviluppo ed organizzazione del tessuto. Per quanto riguarda l'espressione genica, analisi tramite PCR hanno mostrato nel tessuto coltivato con SMCs nel bioreattore una maggiore quantità di RNA messaggero che codifica collagene I, collagene III e collagene IV rispetto al caso statico. Per quanto riguarda l'organizzazione del tessuto, il confronto tra tessuto ingegnerizzato tramite coltura statica o tramite bioreattore è osservabile in Figura 1.17, dove si può vedere come la sollecitazione meccanica data dal bioreattore permetta di ottenere dei tessuti con strato epiteliale o strato muscolare ben definiti.

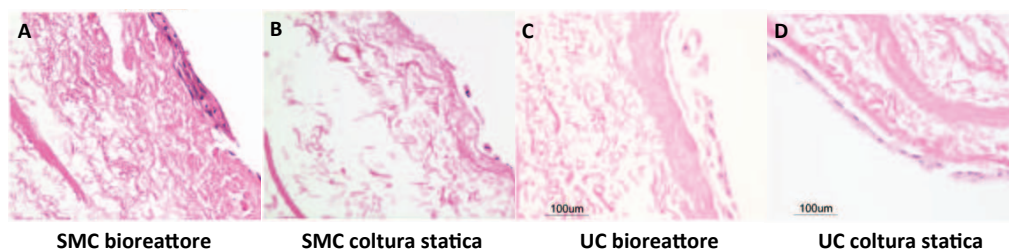


Figura 1.17: Colorazione istologica tramite *H&E* di scaffold seminati con SMCs in bioreattore (A), con SMCs in coltura statica (B), con UCs in bioreattore (C) e con UCs in coltura statica (D). Le colture in bioreattore permettono di ottenere un tessuto meglio organizzato (adattato da [64]).

Un altro bioreattore progettato per applicare stimoli meccanici a matrici acellulari durante il processo di ricellularizzazione è stato sviluppato da *Bouhout et al.* [65] (Figura 1.18).

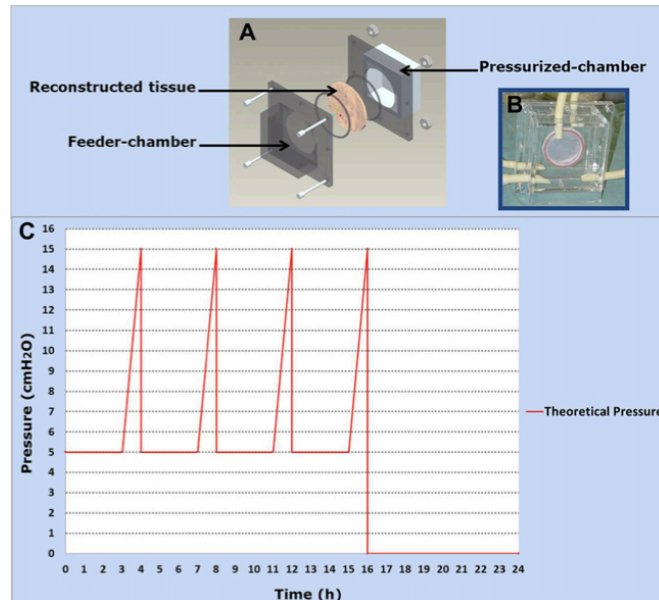


Figura 1.18: (A) Schema del bioreattore per la sollecitazione di patch di vescica in modo da riprodurre riempimento e svuotamento dell'organo. Il bioreattore è composto da o-ring per il fissaggio del patch e da un sistema camera/anticamera per perfondere il patch; (B) Foto del bioreattore; (C) forma d'onda di pressione applicata al patch di vescica. La forma d'onda prevede, dopo una fase di resting di 3 ore a 5 cmH₂O, un incremento della pressione da 5 a 15 cmH₂O in 60 minuti, seguito da un ritorno alla condizione iniziale della durata di 10 secondi. Dopo 4 cicli vi è un periodo di riposo a pressione nulla per 8 ore che simula la bassa attività vescicale notturna [65].

Come si osserva in Figura 1.18, il patch di matrice, questa volta fissato tra due o-ring, viene posizionato fra una camera ed un'anticamera. Anche in questo caso la sollecitazione meccanica è data da un flusso di medium che, tramite apposito circuito idraulico, investe il patch all'interno della camera, deformandone le pareti secondo una forma d'onda di pressione definita (Figura 1.18, in basso). Lo scaffold in questo caso è una matrice di collagene prodotto da 3 strati di fibroblasti su cui sono state depositate le UCs di maiale. La forma d'onda di pressione è più complessa rispetto a quella presentata da *Wallis et al.* [64], in quanto, in 24 ore di coltura, prevede 16 ore di stimolazione con oscillazione fra 5 cmH₂O (pressione minima) e 15 cmH₂O (pressione massima) per riprodurre i cicli di riempimento/svuotamento diurno della vescica, e 8 ore di assenza di stimolazione (pressione nulla ai capi del patch) per riprodurre la bassa attività vescicale nelle ore

notturne. Anche in questo caso i risultati hanno mostrato un grado di funzionalizzazione del tessuto maggiore rispetto alla coltura statica e un livello di permeabilità minore per i campioni coltivati in condizioni dinamiche rispetto a quelli coltivati in statica. In particolare, la permeabilità è stata misurata con cella di diffusione di Franz, che prevede il posizionamento del patch orizzontalmente fra due camere, entrambe riempite di medium, diluito in quella superiore con urea marcata radioattivamente (^{14}C -urea). La permeabilità è stata dunque valutata misurando il contenuto radioattivo della camera sottostante a istanti di tempo definiti (1, 2, 4 ore). I risultati ottenuti sono mostrati in Figura 1.19. Come si può osservare in Figura 1.19, la stimolazione della matrice ha permesso di ottenere costrutti con un grado di permeabilità molto più basso (colonna blu) rispetto a quello ottenuto con la semplice incubazione statica (colonna verde) e molto vicino al grado di permeabilità del tessuto di vescica nativa.

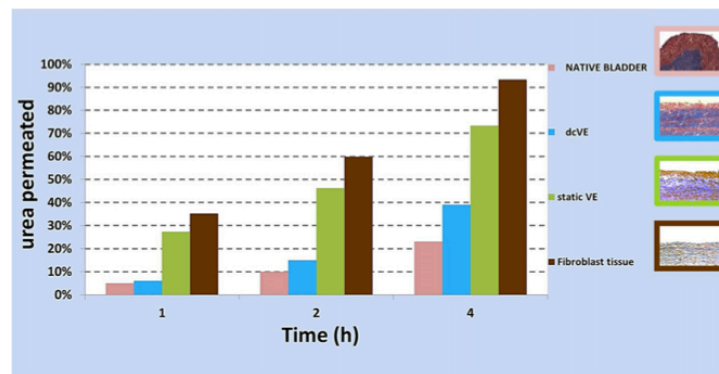


Figura 1.19: Misura della percentuale di urea permeata (rispetto alla quantità di urea immessa inizialmente) da patch di vescica nativa, la patch di tessuto ingegnerizzato in bioreattore, da patch di tessuto ingegnerizzato tramite coltura statica e da patch di tessuto generato da fibroblasti. L'azione del bioreattore consente di ottenere patch con un livello di permeabilità basso, simile a quello nativo [65].

Infine, altri due bioreattori per la coltura dinamica di BAM ricellularizzato sono stati progettati da *Wei et al.* [66] e da *Davis et al.* [67], mostrati in Figura 1.20. Il primo sfrutta un sistema a quattro camere per sollecitare il patch (elastomero in silicone o in gomma naturale seminato separatamente con UCs e SMCs umane). In particolare, lo scaffold, collocato in un disco porta-scaffold, è posizionato all'interfaccia fra due camere di coltura riempite di medium, a loro volta collegate tramite membrane elastomeriche a due camere di pressione (Figura 1.20A). Le camere di pressione sono riempite di gas in modo da distendere le membrane elastomeriche che a loro volta generano variazioni di pressione,

differenti e indipendenti fra loro, nelle due camere di coltura (P_1 e P_2). Come mostrato in Figura 1.20B, la combinazione delle due pressioni genera una sollecitazione meccanica sul patch che permette di definire una forma d'onda di pressione complessa, molto simile alla relazione pressione-volume fisiologica della vescica (Figura 1.3).

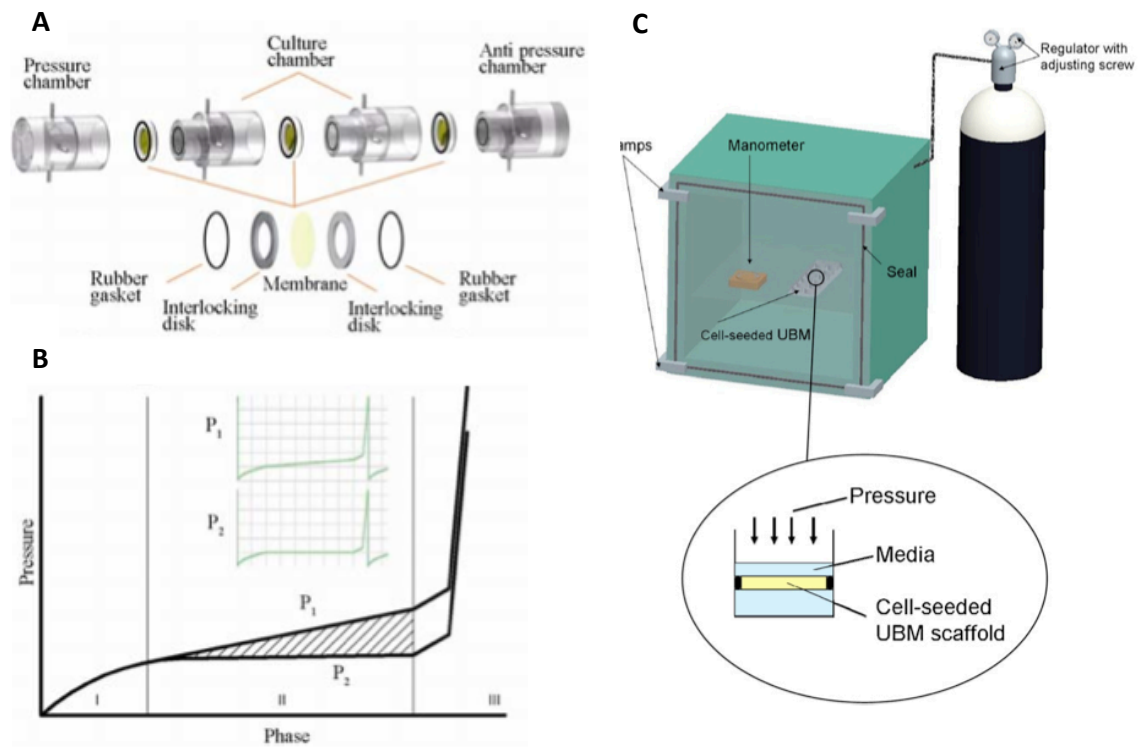


Figura 1.20: (A) Schema del bioreattore di *Wei et al.* Sviluppato per la sollecitazione di un patch di vescica in modo da simulare riempimento e svuotamento dell'organo. Il bioreattore è composto da due dischi per il fissaggio di una membrana elastica (solo quello centrale è seminato con cellule), da due camere di coltura riempite di medium messo in movimento dalle membrane laterali, e da un sistema camera/anticamera di pressione per muovere le membrane e perfondere il patch; (B) Onda di pressione che agisce sulla membrana cellularizzata, generata da due pressioni differenti, P_1 generata dalla camera di pressione, P_2 generata dall'anticamera di pressione. L'onda di pressione è caratterizzata da 3 fasi differenti, ciclicamente ripetute [66]; (C) Schema del bioreattore di *Davis et al.* per la sollecitazione del patch di vescica. La camera di pressione viene controllata da un contenitore di gas, che tramite un regolatore di pressione permette l'aumento o la riduzione della pressione, misurato da un manometro, che va a deformare lo scaffold seminato [67].

Il bioreattore di *Davis et al.* [67] invece colloca la matrice (BAM) seminata con UCs in una camera di pressione con contenitore di gas che, controllato da un regolatore di pressione, permette di aumentare/ridurre la pressione esercitata sul patch tra 0 e 10

cmH₂O, deformando meccanicamente lo scaffold in maniera ciclica, con durate variabili imposte dall'utente (Figura 1.20C).

Davis et al. [67] hanno mostrato risultati soddisfacenti in termini di mantenimento del fenotipo cellulare e di crescita del tessuto all'interno del bioreattore, *Wei et al.* [66] invece hanno evidenziato una bassissima efficacia della stimolazione meccanica. L'esito negativo è dovuto ai materiali utilizzati come scaffold, silicone e gomma naturale, non ottimali per ottenere un tessuto ingegnerizzato funzionale, ma funzionali per permettere esperimenti ripetibili in modo da definire gli aspetti tecnici di stimolazione necessari per ottenere la curva di pressione fisiologica mostrata in Figura 1.20B, vero obiettivo del loro lavoro.

CAPITOLO 2

CAMPAGNE DI DECELLULARIZZAZIONE DELLA VESCICA: SET-UP E PROTOCOLLI PER L'OTTENIMENTO E LA CARATTERIZZAZIONE DI MATRICI DECELLULARIZZATE.

Dall'analisi della letteratura è emerso che, tra tutti gli scaffold impiegati in applicazioni di medicina rigenerativa della vescica, il tessuto vescicale decellularizzato (*BAM*) è sicuramente uno di quelli che ha mostrato risultati più promettenti per poter essere utilizzato come sostituto della porzione di tessuto nativo danneggiato (*Paragrafo 1.2.2.2*).

Inoltre, tra i diversi metodi di decellularizzazione analizzati, le soluzioni ipotoniche e i detergenti non ionici sembrano essere gli agenti che meno compromettono l'integrità della matrice extracellulare, a differenza dei detergenti ionici (come l'*SDS*) o degli agenti enzimatici, come già descritto in precedenza (*Paragrafo 1.3.1*). Sulla base di queste osservazioni, il presente lavoro si è concentrato sulla valutazione di matrici decellularizzate, ottenute dal tessuto nativo di vescica, tramite processi di decellularizzazione basati sull'azione combinata di soluzioni ipotoniche e di detergenti non ionici.

In questo capitolo saranno descritti i set-up, i metodi e i protocolli utilizzati per il processo di decellularizzazione del tessuto di vescica e per la caratterizzazione, principalmente meccanica, della matrice ottenuta.

Come primo step sono stati considerati un set-up e un protocollo per la decellularizzazione dell'organo intero, definiti e messi in opera nel contesto di un progetto di ricerca presso il Laboratorio di Micro e Biofluidodinamica (μ BS Lab) del Dipartimento di Bioingegneria del Politecnico di Milano, mirati a ottenere una matrice priva di materiale cellulare. In particolare, il protocollo introduce nel processo di decellularizzazione l'innovazione data dalla perfusione dinamica dell'organo intero trattato con la soluzione contenente gli agenti decellularizzanti; ciò non è mai stato descritto nei lavori di letteratura riguardanti la decellularizzazione di organo intero, che generalmente utilizzano come approccio per la decellularizzazione l'incubazione statica dell'organo, riempito di soluzione decellularizzante, e immerso nella soluzione stessa [11, 12].

Per verificare l'efficienza del trattamento di decellularizzazione, in questo lavoro di tesi è stata eseguita sulle matrici decellularizzate ottenute una caratterizzazione istologica e meccanica, insieme a una misura del contenuto di DNA ed RNA residui nella matrice. In particolare, le analisi istologiche (*H&E*, *tricromia di Mallory*, *Orceina*) hanno permesso di osservare in maniera qualitativa la presenza di nuclei sia nel tessuto nativo sia in quello decellularizzato. La misura del contenuto di DNA ed RNA residui ha fornito un riscontro quantitativo alle osservazioni istologiche. La caratterizzazione meccanica invece si è basata su diverse prove sperimentali che hanno permesso di definire il comportamento del tessuto in termini di distensibilità (prove di cistometria su organo intero), i parametri meccanici (prove di trazione monoassiale) e il coefficiente di permeabilità (prove di permeabilità su patch) del tessuto decellularizzato. Le campagne sperimentali mirate alla caratterizzazione meccanica sono state svolte presso il μ BS Lab: sono stati utilizzati un set-up e un protocollo già messi a punto in precedenza per le prove di cistometria e per le prove di trazione monoassiale, mentre sono stati definiti un set-up e un protocollo *ad hoc* per le prove di permeabilità. Le campagne sperimentali di decellularizzazione, l'analisi istologica e l'analisi del contenuto di DNA e RNA invece sono state condotte presso il Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie dell'Università degli Studi di Milano.

2.1 Set-up e protocollo di decellularizzazione

2.1.1 Set-up

In Figura 2.1 è mostrato il set-up del sistema dinamico multicanale, progettato e realizzato presso il μ BS Lab in collaborazione con il Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie dell'Università degli Studi di Milano nel contesto di un progetto di ricerca più ampio, utilizzato per la decellularizzazione dinamica dei campioni di vescica da caratterizzare nel presente lavoro di tesi.

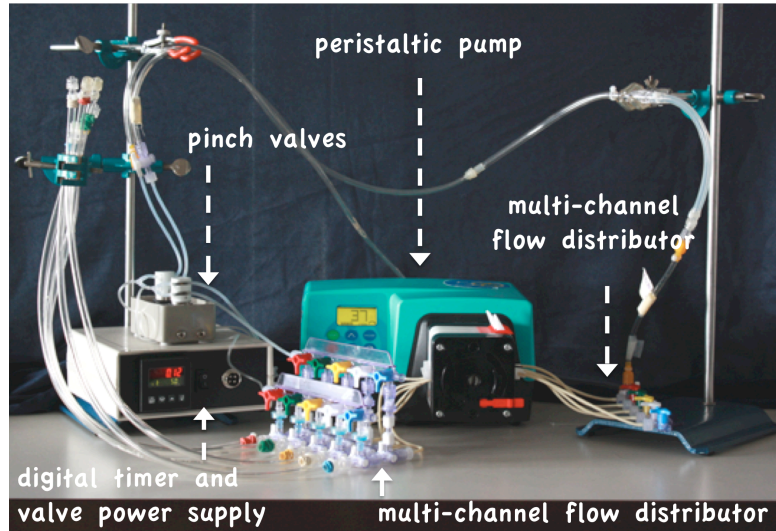


Figura 2.1: Sistema dinamico multicanale impiegato per la decellularizzazione della vescica: tale sistema consente la decellularizzazione contemporanea di cinque organi in una stessa campagna sperimentale. Il set-up è costituito da una pompa per infusione, due elettrovalvole collegate ad un alimentatore integrato in un timer digitale per scandire le varie fasi del processo di decellularizzazione e un distributore di flusso a 5 canali per trattare contemporaneamente 5 vesciche.

Il sistema multicanale, in grado cioè di consentire il trattamento simultaneo di più organi nell'ambito della stessa campagna sperimentale, è composto da:

- Una pompa peristaltica (323D, Watson-Marlow, USA) con testa pompante multicanale (modello 318MC) utilizzata per la perfusione della vescica e il monitoraggio del volume di fluido insufflato all'interno dell'organo. È stata utilizzata una pompa di tipo volumetrico al fine di garantire una portata costante in ingresso alla vescica indipendente dal post-carico durante il processo di decellularizzazione.
- Due elettrovalvole ad attuazione elettromagnetica (*3-way pinch valve* OM075P3MP1202S, BioChem Valve, Boonton, NJ, USA) per la canalizzazione del flusso di soluzione decellularizzante all'interno del circuito idraulico durante le varie fasi del processo di decellularizzazione.
- Un modulo di alimentazione delle valvole (TXL-25 12S, TracoPower, Zurigo, Svizzera) e un timer digitale (C48T, Red Lion, York, PA, USA) per il controllo dell'apertura/chiusura delle elettrovalvole, integrati in un unico dispositivo che riduce l'ingombro del set-up.
- Un distributore multicanale del flusso: in tale configurazione, ogni singolo canale

collegato a ciascun organo trattato è indipendente dagli altri.

In Figura 2.2 è riportato lo schema del circuito idraulico del set-up sperimentale di Figura 2.1.

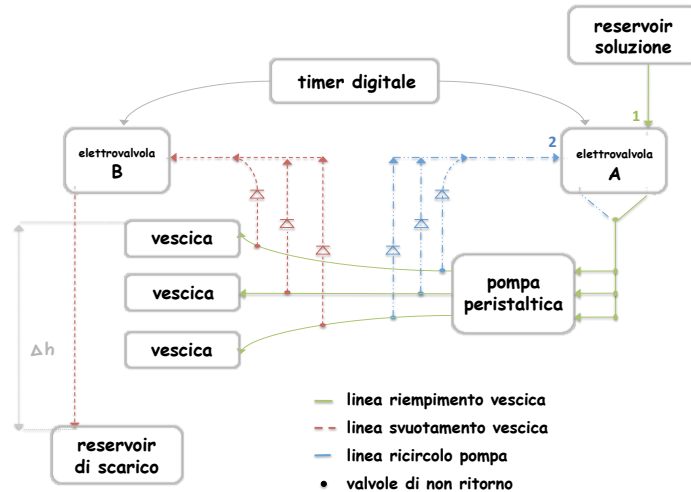


Figura 2.2: Schema del circuito idraulico del sistema multicanale per la decellularizzazione della vescica. Il Δh rappresenta la differenza di quota che c'è tra il pelo libero del becker contenente la vescica e il pelo libero del reservoir di scarico. Ciò permette lo svuotamento della vescica per gravità.

Il sistema prevede l'esecuzione di continui cicli di perfusione della vescica, replicando così la naturale dinamica di riempimento e svuotamento dell'organo *in vivo*. Gli organi considerati sono vesciche espantate da conigli bianchi maschi di 6 mesi di vita, presi da un allevamento e trasportati presso il laboratorio in soluzione *Eurocollins* (Eurocollins solution kit, Monico S.p.A., Italia) per preservare la vitalità delle cellule. Dopo essere stato prelevato dalla soluzione Eurocollins e dopo che gli ureteri sono stati suturati, l'organo viene incannulato inserendo un catetere nella vescica attraverso l'uretra e serrando il collo uretrale al catetere tramite fascettatura per evitare scivolamenti della vescica in fase di decellularizzazione; in seguito, l'organo è immerso all'interno della soluzione decellularizzante e perfuso ciclicamente con la stessa soluzione.

In particolare, la procedura di decellularizzazione della vescica, completamente automatizzata, è costituita da due diverse fasi, che si ripetono in maniera ciclica alternata, per intervalli temporali definiti dall'utente all'inizio della procedura sperimentale:

- i) **Riempimento della vescica:** in questa fase il timer mantiene aperto il canale 1 della elettrovalvola A (Figura 2.2, in verde), consentendo il riempimento della vescica che riceve dalla pompa la soluzione decellularizzante, per un intervallo di tempo

preselezionato dall'utente. In questa fase, il canale 2 della elettrovalvola A (Figura 2.2, in blu) e il canale della elettrovalvola B (Figura 2.2, in rosso) sono chiusi. La suturazione degli ureteri impedisce alla soluzione decellularizzante infusa di fuoriuscire dall'organo.

- ii) **Svuotamento della vescica:** in questa fase il timer digitale attiva la chiusura del canale 1 e l'apertura del canale 2 della elettrovalvola A e l'apertura del canale della elettrovalvola B. In tale configurazione la vescica si svuota per gravità, avendo predisposto una differenza di quota (Δh) tra il pelo libero del becker in cui è posta la vescica e il pelo libero del reservoir di scarico (Figura 2.2). In tal modo il fluido contenuto all'interno della vescica viene incanalato nel reservoir di scarico. L'apertura del canale di ricircolo della pompa (canale 2 dell'elettrovalvola A) consente di evitare l'intervento manuale dell'operatore per interrompere la perfusione dell'organo durante la fase di svuotamento della vescica e riattivarlo invece a svuotamento completato per la successiva fase di riempimento: durante lo svuotamento infatti il fluido messo in moto dalla pompa viene immesso nuovamente nella linea di mandata, a monte della pompa e a valle del reservoir di mandata (linea blu in Figura 2.2).

Al fine di garantire un corretto svuotamento, per l'incannulamento è stato utilizzato un catetere funzionalizzato (catetere Surflo® Teflon I.V. 14Gx21/2", Terumo Medical Corporation, USA), mostrato in Figura 2.3.

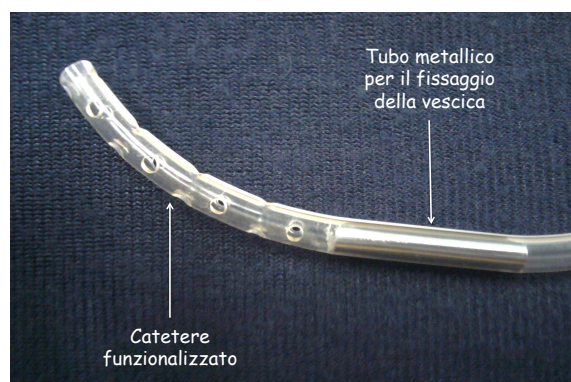


Figura 2.3: Catetere funzionalizzato per l'incannulamento delle vesciche in fase di decellularizzazione. I molteplici fori consentono uno svuotamento efficace degli organi. Il tubo cavo metallico all'interno del catetere agevola il fissaggio dell'uretra della vescica al catetere.

Il catetere contiene un tubo metallico cavo (Figura 2.3), posto al suo interno come rinforzo

per serrare l'uretra della vescica senza far collassare il tubo deformabile del catetere stesso. La lunghezza del tubo metallico definisce un margine dimensionale che permette di inserire il catetere per via uretrale sia in vesciche di piccole dimensioni (per cui l'uretra viene serrata sul catetere in corrispondenza della parte distale del tubo metallico), sia in vesciche di grandi dimensioni (per cui l'uretra è invece serrata sul catetere in corrispondenza della parte prossimale del tubo metallico). La serie di fori che caratterizza la parte terminale del catetere permette il drenaggio continuo della soluzione contenente gli agenti decellularizzanti durante le fasi del trattamento.

Le strategie adottate al fine di automatizzare l'intero processo di decellularizzazione (ossia l'utilizzo di un timer per lo switch automatico dei canali delle elettrovalvole e predisposizione del canale di ricircolo della pompa) hanno consentito la standardizzazione del protocollo sperimentale di decellularizzazione, minimizzando il numero di interventi da parte dell'operatore durante le varie fasi del processo: una singola campagna di decellularizzazione dura infatti diverse ore e, in assenza di tali sistemi di automatizzazione, richiederebbe la presenza e l'intervento continuo di un operatore, per interrompere la perfusione dell'organo durante la fase di svuotamento della vescica e riattivarlo invece a svuotamento completato per la successiva fase di riempimento. Inoltre, il fatto di utilizzare un sistema multi-canale ha permesso di ridurre i tempi di esecuzione delle campagne sperimentali e allo stesso tempo di aumentare il numero di campioni disponibili per la fase di caratterizzazione del tessuto decellularizzato.

2.1.2 Protocollo di decellularizzazione

Il protocollo di decellularizzazione dinamica messo a punto presso il μ BS Lab in collaborazione con il Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie dell'Università degli Studi di Milano si compone di un metodo combinato di tipo *fisico-chimico*. La sollecitazione meccanica (stimolo fisico), cioè la perfusione (riempimento e svuotamento ciclico dell'organo), ha come scopo la distensione della parete dell'organo durante la decellularizzazione: la distensione da un lato fa sì che l'intera superficie della parete della vescica sia esposta all'azione della soluzione decellularizzante e dall'altro, riducendo lo spessore della parete stessa, facilita la penetrazione del fluido nelle regioni più interne della parete.

La rimozione delle componenti cellulari avviene invece per mezzo di un metodo chimico, attraverso lavaggi dell'organo con 2 soluzioni decellularizzanti:

- Soluzione ipotonica: acqua deionizzata, in grado di causare la rottura della membrana cellulare per shock osmotico;
- Detergenti non ionici: 1% Triton-X 100 e 0.1% NH₄OH (Sigma-Aldrich, Co, St. Louis, MO, USA), in grado di rimuovere i residui cellulari dagli strati più profondi della matrice;

Il protocollo di decellularizzazione prevede dunque la perfusione del tessuto con le due soluzioni ed è diviso in tre fasi:

- i) Perfusione con acqua deionizzata
- ii) Perfusione con Triton X-100 e NH₄OH
- iii) Lavaggio per rimuovere i detriti cellulari restanti e gli eventuali volumi residui delle soluzioni decellularizzanti.

Sono state eseguite diverse campagne di decellularizzazione al fine di ottimizzare la durata di ciascuna fase in modo da:

- Rimuovere gli elementi cellulari e nucleici.
- Minimizzare l'alterazione delle componenti strutturali e funzionali della ECM della parete dell'organo.
- Preservare la complessa sovrastruttura della matrice, ossia l'organizzazione tridimensionale delle proteine strutturali, così da mantenere invariate le proprietà meccaniche del tessuto decellularizzato rispetto a quello nativo.

Al fine di valutare l'efficacia del protocollo dinamico è stata inoltre condotta una campagna di decellularizzazione statica, mantenendo l'organo in incubazione con gli agenti decellularizzanti senza l'applicazione della perfusione ciclica dell'organo. Nella decellularizzazione statica l'organo viene riempito con le due soluzioni decellularizzanti e incubato all'interno di un becker contenente le stesse soluzioni per una quantità di tempo pari alla durata complessiva dei lavaggi effettuati col metodo dinamico. Le campagne sperimentali (statiche e dinamiche) sono state eseguite con o senza l'utilizzo di agitatore meccanico (shaking orbitale).

In Tabella 2.1 sono riportati i parametri caratterizzanti i differenti protocolli sperimentali.

<i>Metodo</i>	Durata [h]	Portata di infusione [ml/min]	Tempo di riempimento [min]	Tempo di svuotamento [min]
<i>Dinamico</i>	4+4+1	5	4	2
	6+6+1	5	4	2
	8+8+1	5	4	2
	8+8+1	3	6 min 40 s	2
<i>Statico</i>	8+8+1	-	-	-

Tabella 2.1: Parametri dei protocolli statici e dinamici di decellularizzazione. Nella colonna “Durata” i tre numeri riportati indicano la rispettiva durata delle tre fasi caratterizzanti il protocollo (quindi: *durata fase I + durata fase II + durata fase III*). Per ciascuna prova il volume di riempimento è stato fissato a 20 ml.

Come riportato in Tabella 2.1, nel corso delle diverse campagne sono stati selettivamente variati sia la durata del trattamento (nella colonna “Durata” in Tabella 2.1 i tre numeri riportati indicano la durata delle tre fasi del protocollo di decellularizzazione), sia la portata di riempimento (e di conseguenza la durata della fase di riempimento).

La durata del trattamento deve essere funzionale a consentire una rimozione completa delle componenti cellulari dalla matrice del tessuto; il razionale dunque è quello di minimizzare la durata del trattamento, garantendo al tempo stesso una rimozione completa delle cellule dalla matrice, al fine di ridurre il grado di danneggiamento della ECM dovuto all’azione degli agenti decellularizzanti (maggiore infatti è il tempo di esposizione della matrice agli agenti decellularizzanti, maggiore è il grado di danneggiamento della matrice); è stata testata anche una portata di riempimento ridotta al fine di valutare se il processo di decellularizzazione fosse efficace anche a portate minori, applicando così una minore sollecitazione alla matrice e quindi riducendo il rischio di compromissione dell’integrità strutturale e di conseguenza delle proprietà meccaniche dell’organo.

Il volume di riempimento è stato determinato sperimentalmente (maggiori dettagli nel *Paragrafo 2.2.3.1*) ed è tale da distendere l’organo fino ad un volume minore del “volume di *overstretching*” dell’organo, definito come il valore di volume massimo che la vescica è in grado di contenere, ossia la sua capacità. Oltre tale valore, un successivo incremento del volume di fluido all’interno dell’organo determina *in vivo* lo svuotamento fisiologico della vescica grazie alla contrazione dei muscoli detrusori e all’apertura dello sfintere uretrale interno. La necessità di riempire la vescica fino ad un valore di volume inferiore alla sua capacità massima nasce dal fatto che durante la decellularizzazione la vescica non è in

grado di svuotarsi autonomamente: l'uretra infatti viene incannulata per consentire la perfusione e i due ureteri sono preventivamente suturati per impedire la fuoriuscita della soluzione infusa; l'infusione di un volume di riempimento maggiore del volume di *overstretching* comporterebbe dunque una sovrastimolazione meccanica della parete dell'organo: tale sovrastimolazione, assolutamente non fisiologica, potrebbe compromettere l'integrità delle strutture proteiche della ECM della parete dell'organo (rottura dei fasci di fibre di collagene) andando quindi ad agire negativamente sulle proprietà meccaniche del tessuto della vescica trattata.

2.2 Caratterizzazione della matrice decellularizzata

Per capire quale delle diverse varianti del protocollo di decellularizzazione (riassunte in Tabella 2.1) fosse più efficace, è stata eseguita un'analisi istologica preliminare per verificare l'assenza o la presenza di materiale cellulare residuo nel tessuto. Una volta identificato il protocollo ottimizzato di decellularizzazione, si è passati a una fase di caratterizzazione estensiva del tessuto decellularizzato, riferita esclusivamente alle matrici ottenute con il protocollo dinamico ottimizzato e con il protocollo statico della stessa durata. In dettaglio, sono state eseguite le seguenti analisi:

- analisi istologica
- analisi del contenuto di DNA e RNA residui della matrice decellularizzata
- prove di cistometria
- prove di trazione monoassiale
- prove di permeabilità

In Figura 2.4 è mostrato lo schema a blocchi che riassume il numero di campioni utilizzati per le varie prove effettuate per la caratterizzazione della matrice ottenuta in seguito a decellularizzazione. Per ogni gruppo di campioni analizzato (vescica nativa, vescica decellularizzata per via statica e vescica decellularizzata per via dinamica) vengono elencate le analisi che sono state effettuate.

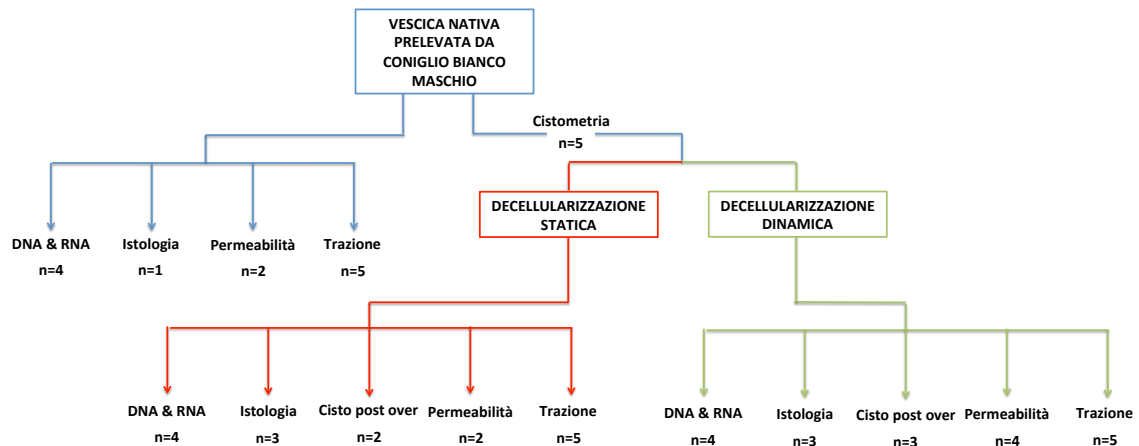


Figura 2.4: Schema a blocchi del flusso di lavoro per la caratterizzazione della matrice ottenuta in seguito a decellularizzazione. Per ogni tipo di tessuto analizzato vengono indicate le analisi che sono state fatte e quanti campioni sono stati utilizzati. Su cinque delle vesciche native sottoposte a protocollo di decellularizzazione sono state effettuate delle prove di cistometria pre-trattamento. Cisto post over si riferisce alle cistometrie post decellularizzazione con volumi di riempimento oltre il volume di *overstretching*.

Come si osserva dalla Figura 2.4, di cinque vesciche sottoposte a decellularizzazione è stata effettuata anche l'analisi di cistometria prima del processo di decellularizzazione, in modo da poter confrontare i risultati pre-trattamento con quelli post-trattamento (sia statico sia dinamico). Inoltre, per le analisi che necessitano l'utilizzo di un campione di tessuto anziché dell'organo intero (prove di trazione monoassiale, prove di permeabilità, analisi istologiche e analisi del contenuto di DNA e RNA residuo), a partire da una stessa vescica, sia essa nativa o decellularizzata, sono stati prelevati e testati più provini, in modo da ottimizzare così le risorse a disposizione e ridurre il numero di vesciche necessarie.

Nelle sezioni seguenti saranno brevemente descritti tutti i metodi utilizzati per caratterizzare il tessuto decellularizzato.

2.2.1 Analisi istologica

L'analisi istologica è molto importante, in quanto permette di definire in maniera qualitativa: i) l'efficacia nella rimozione del materiale nucleico dell'organo da parte degli agenti decellularizzanti, ii) il grado di preservazione dell'isto-architettura tridimensionale in seguito a decellularizzazione, iii) il contenuto e la distribuzione delle fibre elastiche all'interno della ECM.

Campioni di tessuto nativo e decellularizzato con i diversi protocolli sono stati estratti dalla regione basale dell'organo. I campioni sono stati poi processati presso il Dipartimento di

Scienze Cliniche Veterinarie dell'Università degli Studi di Milano per ottenere le immagini istologiche. Ci si è concentrati principalmente sulla regione basale perché è quella che maggiormente richiede l'utilizzo di chirurgia sostitutiva, dato che *in vivo* è la parte più soggetta a rischio di insorgenza di fenomeni patologici che ne compromettono la funzionalità [13].

Su questi campioni sono state condotte le seguenti analisi:

- Colorazione con Ematossilina & Eosina (*H&E*) per osservare l'eventuale presenza di nuclei all'interno della matrice. In particolare, l'ematossilina colora in blu/violetto i componenti cellulari carichi negativamente, individuabili principalmente a livello dei nuclei (acidi nucleici, proteine di membrana e membrane cellulari); l'eosina invece colora in rosso/rosa i componenti carichi positivamente (proteine cellulari, fibre di collagene), individuando quindi la ECM.
- Colorazione *tricromica di Mallory* per identificare l'organizzazione delle fibre di collagene all'interno del tessuto connettivo. La colorazione prevede l'uso di tre coloranti: la fucsina acida tinge di rosso i nuclei e le cellule muscolari, l'azzurro di anilina (o il blu di metilene) conferisce al collagene una tonalità azzurra, l'orange G colora i citoplasmici in arancione.
- Colorazione con *Orceina* per rivelare la presenza e l'orientamento delle fibre elastiche all'interno della ECM in seguito al processo di decellularizzazione. Nello specifico, le fibre elastiche per l'azione dell'Orceina appaiono di tonalità rosso-bruna intensa e spiccano su uno fondo pressoché incolore.

2.2.2 Analisi del contenuto di DNA e RNA

Oltre a identificare la composizione del tessuto da un punto di vista qualitativo con l'istologia, è importante quantificare l'eventuale presenza di residui nucleici indesiderati (come descritto nel *Paragrafo 1.3.3*), in modo da capire se la quantità di questi resti sia tale da suscitare nel tessuto ricellularizzato reazioni infiammatorie o immunitarie. Per questo motivo sono state condotte anche delle analisi per verificare la presenza e quantificare il DNA e l'RNA residuo sul tessuto decellularizzato.

Sia l'estrazione di DNA che quella di RNA sono state effettuate nei laboratori del Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie dell'Università degli Studi di Milano. Il

contenuto di entrambi gli acidi nucleici è espresso come peso dell'acido nucleico per peso di tessuto secco ($\mu\text{g}/\text{mg}$).

2.2.3 Caratterizzazione meccanica

L'obiettivo di quest'attività è di determinare sperimentalmente le proprietà meccaniche e di distensibilità del tessuto decellularizzato di vescica di coniglio, al fine di verificare che il trattamento di rimozione delle cellule non abbia indotto alterazioni funzionali delle proprietà del tessuto. Il mantenimento di proprietà biomeccaniche analoghe a quelle del tessuto nativo è fondamentale ai fini di poter utilizzare la vescica decellularizzata come substrato per la crescita cellulare, per poi procedere, terminata la fase di coltura *in vitro* del tessuto, all'impianto *in vivo* su paziente.

La caratterizzazione biomeccanica è stata condotta mettendo a punto tre diverse tipologie di prova:

- prova di cistometria dell'organo intero;
- prova di trazione monoassiale di campioni di tessuto;
- prova di permeabilità su patch di tessuto;

I test, svolti presso il μBS Lab, sono stati effettuati su campioni di tessuto nativo e sui tessuti decellularizzati, in modo da confrontare i risultati ottenuti per le diverse popolazioni.

2.2.3.1 Prova di cistometria

Il test di cistometria è un esame clinico molto comune che consente di determinare la relazione tra la variazione del volume di fluido contenuto in vescica (ΔV) e la variazione della pressione intra-vescicale (ΔP), durante il riempimento della vescica stessa [13]; il rapporto tra le due grandezze, detto *compliance* (C nell'equazione 2.1), è un indice della distensibilità della parete dell'organo e quindi funzione delle proprietà biomeccaniche del tessuto che costituisce la ECM:

$$C = \frac{\Delta V}{\Delta P} \quad (2.1)$$

I test di cistometria consentono di analizzare eventuali alterazioni delle proprietà biomeccaniche della matrice dal punto di vista "funzionale", andando cioè ad indagare la

capacità dell'organo intero decellularizzato di svolgere correttamente la propria funzione: il test, infatti, consente di valutare se l'organo decellularizzato (in analogia con quanto osservato per l'organo nativo) sia in grado di rispondere con un aumento moderato del valore della pressione ad un incremento del volume intra-vescicale, in accordo con l'andamento della curva P-V fisiologica descritto nel *Paragrafo 1.1.2* (Figura 1.3).

La prova consente inoltre di determinare la *capacità vescicale*, cioè il valore di volume massimo di fluido (volume di *overstretching*) che la vescica è in grado di immagazzinare durante la fase di riempimento, prima della minzione fisiologica.

In Figura 2.5 viene mostrato il set-up sperimentale, realizzato in precedenza presso il μ BS Lab ed utilizzato in questo lavoro di tesi per eseguire i test di cistometria.

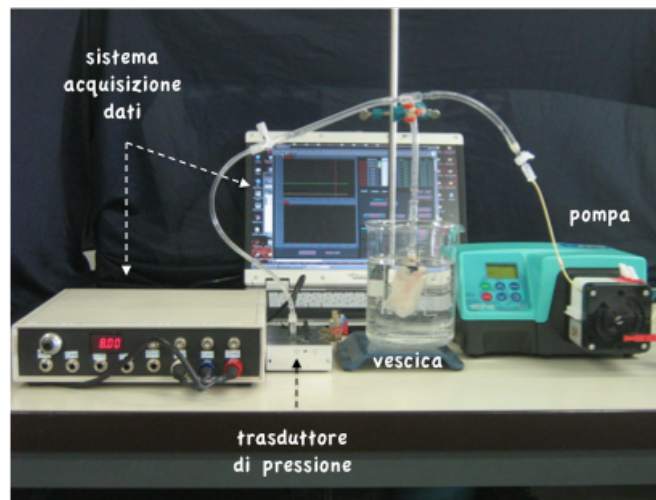


Figura 2.5: Set-up sperimentale per test di cistometria della vescica: il set-up consente di misurare la variazione di pressione intra-vescicale corrispondente ad un incremento del volume interno alla vescica al fine di stimare i valori di capacità e di compliance dell'organo.

Il sistema prevede l'utilizzo di:

- Una pompa peristaltica per il riempimento della vescica e il monitoraggio del volume di fluido (soluzione fisiologica) perfuso all'interno dell'organo; al fine di garantire una portata costante in ingresso alla vescica durante l'intera durata della prova, è stata utilizzata una pompa di tipo volumetrico (323D, Watson-Marlow, USA).
- Un trasduttore di pressione di tipo *flow through* per il monitoraggio e la misura in continua della pressione (26PC flow through, Honeywell, NJ, USA).

- Un sistema di acquisizione dati per la registrazione dei valori di variazione di pressione misurati durante la prova. Il sistema si compone di centralina *home-made* e di una scheda di acquisizione (DAQ Card-6036E, National Instruments, USA) che trasmettono il dato di ΔP rilevato dal trasduttore a un PC dedicato attraverso il quale, per mezzo di un'interfaccia utente (realizzata in ambiente LabView®, National Instruments, USA), è possibile monitorare/registrare *real-time* l'andamento della pressione.

Il protocollo di prova definito per il test di cistometria prevede l'utilizzo di un catetere bilume di diametro 9 Fr (UDCDL090, BEL Bioengineering Laboratories, Italia) utilizzato per la cateterizzazione transuretrale della vescica, in modo da avere nel circuito idraulico una linea di perfusione per riempire l'organo e una linea di misura della pressione per monitorare la variazione di pressione durante la prova (Figura 2.6).

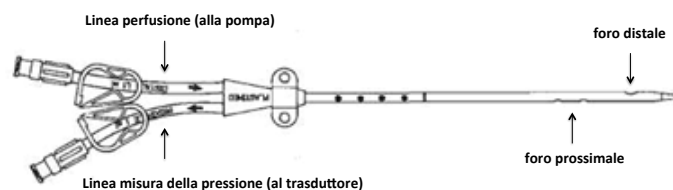


Figura 2.6: Catetere bilume utilizzato per il riempimento della vescica e la misura della pressione intra-vescicale durante le prove di cistometria. La linea di perfusione immette fluido nella vescica; la linea di misura è in collegamento con il trasduttore, permettendo di misurare il ΔP .

Uno schema idraulico del set-up sperimentale per le prove di cistometria è mostrato in Figura 2.7.

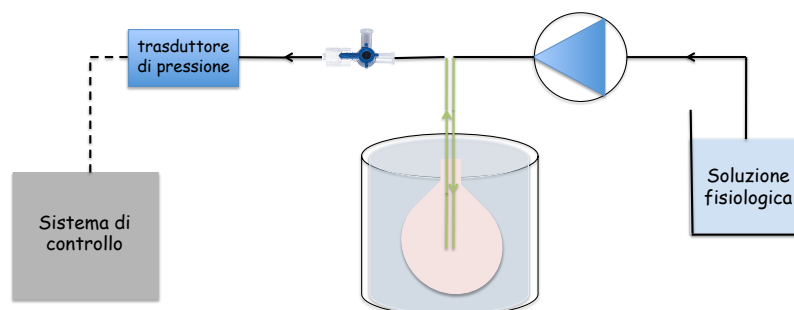


Figura 2.7: Schema idraulico del set-up sperimentale per le prove di cistometria. In verde è rappresentato il catetere bilume che permette sia di immettere soluzione fisiologica nella vescica, sia di misurare in deviazione la pressione tramite un trasduttore di pressione *flow through*. Il riempimento della linea di misura avviene tramite un rubinetto a tre vie posto a valle del catetere bilume.

La preparazione del circuito idraulico per la prova di cistometria prevede i seguenti passaggi:

- i) Riempire con soluzione fisiologica la linea di perfusione finché il liquido non esce dal foro distale in punta al catetere (Figura 2.6).
- ii) Riempire la linea di misura della pressione con soluzione fisiologica, aspirandola con una siringa tramite un apposito rubinetto tre vie (Figura 2.7) dal foro prossimale del catetere (immerso nel liquido), e in seguito collegare la linea al trasduttore di pressione. In questo modo si riesce a creare nella linea di misura un menisco di fluido in grado, durante il riempimento, di sollecitare il trasduttore e quindi di permettere la misura *real-time* della pressione.
- iii) Incannulare la vescica con il catetere per via uretrale e fissarla al catetere stesso tramite fascettatura in modo da evitare scivolamenti dell'organo durante la prova.

Nelle fasi di riempimento, è importante verificare l'assenza di bolle all'interno del circuito, principalmente nel ramo di misura della pressione, in quanto la loro presenza altera il valore di pressione misurato: infatti, essendo l'aria comprimibile, si ha una sottostima della misura, in quanto la pressione si "smorza" in presenza di bolle.

Prima del riempimento del circuito idraulico, fondamentale è la procedura di calibrazione del sensore di pressione, in modo da definire la retta di calibrazione che consenta di associare ai valori di tensione elettrica generati dal trasduttore i corrispondenti valori di pressione (equazione 2.2):

$$P = mV + q \quad (2.2)$$

Dove V [Volt] è il valore di tensione generato dal sensore in seguito all'incremento di pressione, P [mmHg] è il corrispondente valore di pressione, m [mmHg/V] e q [mmHg] sono i parametri su cui agire per calibrare il sensore.

La calibrazione è stata effettuata tramite un software realizzato in ambiente Labview©. L'interfaccia utente del software è mostrata in Figura 2.8.

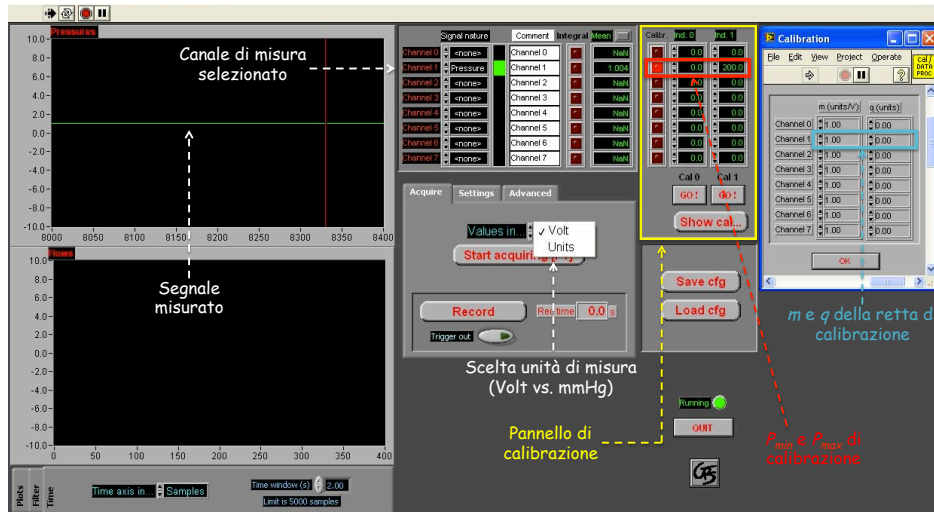


Figura 2.8: Interfaccia utente del software realizzato in ambiente Labview© per la misura *real-time* del segnale di pressione (linea verde in alto a sinistra) da uno dei 7 canali disponibili sulla centralina di acquisizione. In alto a destra si può osservare il pannello di calibrazione del software (cornice gialla): il riquadro rosso al suo interno evidenzia gli spazi in cui definire i valori di P_{\min} e P_{\max} (range all'interno del quale è eseguita la calibrazione); a lato del pannello di calibrazione c'è la finestra che mostra i valori di m e di q della retta di calibrazione (all'interno del riquadro azzurro), modificabili manualmente per annullare l'off-set di partenza che caratterizza il segnale misurato.

Come si può osservare in Figura 2.8, il software, oltre a registrare il segnale di pressione *real-time* dalla centralina a 7 canali (tramite scheda di acquisizione), presenta una sezione specifica per la calibrazione del canale utilizzato per l'acquisizione (Figura 2.8, in alto a destra). In particolare, i passaggi per calibrare il sensore di pressione sono i seguenti:

- i) Impostare sul pannello di calibrazione del software i valori di pressione minima (P_{\min}) e massima (P_{\max}) che definiscono il range di lavoro e con cui il software calibrerà il sensore (Figura 2.8). Il valore minimo generalmente è fissato alla pressione atmosferica.
- ii) Imporre al sensore la pressione atmosferica, quindi inserire il valore di pressione nel pannello di calibrazione del software in corrispondenza della colonna di P_{\min} , in modo da associare la tensione generata dal sensore al valore di pressione atmosferica.
- iii) Imporre al sensore P_{\max} tramite un manometro e inserire il valore di pressione come descritto nel punto ii), in modo da associare il nuovo valore di tensione generato dal sensore alla pressione imposta.

Così facendo, il software è in grado di definire la retta di calibrazione del sensore calcolando i valori m e q (equazione 2.2). A questo punto il sensore, calibrato, presenta ancora un valore iniziale di off-set (valore di pressione errato), dato dalla colonna d'acqua tra il sensore e il punto in cui viene misurata la pressione, che deve essere eliminato. Per rimuoverlo, basta sottrarre al valore dell'intercetta q della retta di calibrazione il valore iniziale di off-set (Figura 2.8).

Una volta terminati la calibrazione del sensore e il riempimento del circuito, la prova di cistometria prevede il riempimento della vescica attraverso la linea di perfusione del catetere collegata alla pompa: il lume interno della vescica è perfuso ad una portata costante pari a 1 ml/min e la pressione acquisita ad ogni intervallo di tempo $\Delta t = 2$ min.

Per eseguire un confronto fra la distensibilità del tessuto nativo e del tessuto decellularizzato, le prove di cistometria sono state eseguite sia su organo nativo, circa 4 ore dopo l'espianto dall'animale (Figura 2.9 a sinistra), sia su organo decellularizzato, immediatamente dopo la fine del protocollo di decellularizzazione (Figura 2.9 a destra).

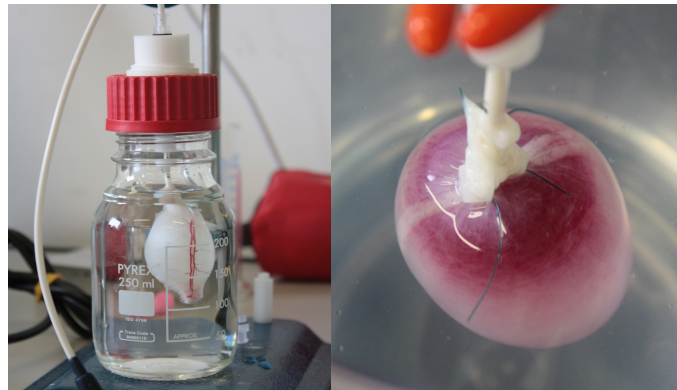


Figura 2.9: Prove di cistometria con vescica nativa (a sinistra) e matrice decellularizzata (a destra). Si può osservare come nella vescica nativa siano visibili i vasi sanguigni. Nella prova di cistometria su matrice decellularizzata il riempimento è avvenuto a volumi superiori a quello di *overstretching*: la prova è stata condotta con soluzione salina colorata per osservare l'eventuale ultrafiltrazione della matrice in seguito a *overstretching*.

I campioni nativi ($n=5$) sono stati riempiti fino ad un volume inferiore al volume di *overstretching* per non danneggiare il tessuto in quanto, come descritto nello schema a blocchi in Figura 2.4, queste vesciche avrebbero dovuto poi essere sottoposte a trattamento di decellularizzazione. Gli organi decellularizzati ($n=2$ per il caso statico, $n=3$ per il caso dinamico) sono stati invece riempiti a volumi maggiori di quello di *overstretching*

(cistometria *post over*, in accordo con la Figura 2.4) con soluzione salina colorata (Figura 2.9) Ciò per testare le proprietà di distensibilità della matrice anche in condizioni non fisiologiche, al fine di valutare il possibile verificarsi di ultrafiltrazione di liquido. L'utilizzo di soluzione colorata permette di avere un riscontro visivo immediato dell'eventuale ultrafiltrazione di fluido. Le vesciche decellularizzate sottoposte a esame cistometrico *post over*, venendo sovrasollecitate e quindi danneggiate, non sono state utilizzate poi per le successive analisi meccaniche.

2.2.3.2 Prova di trazione monoassiale

Il test di trazione monoassiale consente di eseguire la caratterizzazione del comportamento meccanico di un tessuto biologico (o in generale di un qualunque tipo di materiale).

L'obiettivo principale di quest'analisi è capire il grado di alterazione delle proprietà meccaniche della matrice da parte del processo di decellularizzazione; per questo motivo le prove di trazione monoassiale sono state condotte sia su campioni nativi sia su campioni decellularizzati, in modo da poter confrontare i risultati e vedere se presentano differenze statisticamente significative, o se invece il processo di decellularizzazione influenza le proprietà meccaniche della matrice in maniera trascurabile.

Un secondo obiettivo è quello di verificare eventuali differenze di comportamento a trazione del tessuto di vescica di coniglio in funzione della direzione di taglio del provino. Per questo, sia per il tessuto nativo sia per il tessuto decellularizzato, sono stati considerati campioni presi sia in direzione longitudinale (*apex-to-base*) sia in direzione trasversale (*circonfrenziale*) a livello basale.

La procedura di esecuzione delle prove prevede prima la preparazione dei provini di tessuto biologico, in seguito la sollecitazione e la misura della conseguente risposta dei campioni, infine la raccolta ed elaborazione dei risultati ottenuti (riportata e discussa nel *Capitolo 4*).

Per la realizzazione dei provini, la vescica, mantenuta fino a quel momento in soluzione *Eurocollins* a 4°C, è stata prima sezionata con un bisturi lungo l'asse longitudinale che corre dall'apice alla base dell'organo; i provini sono stati poi ritagliati (dimensioni di circa 4x15 mm), con l'utilizzo di una dima, dalla zona basale (B) della vescica, come schematizzato in Figura 2.10.

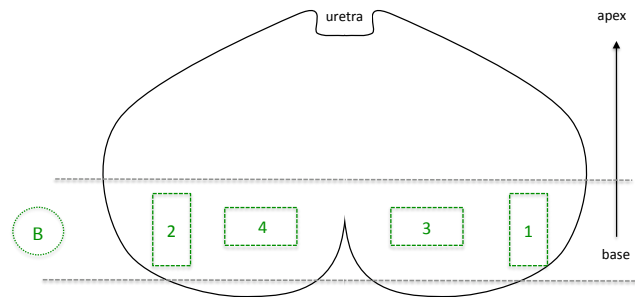


Figura 2.10: Prelievo dei provini per le prove di trazione monoassiale di tessuto della vescica; una volta sezionato l'organo (nativo o decellularizzato) in direzione longitudinale, sono stati estratti 4 provini dalla regione basale (B): 2 provini sono ricavati con direzione di taglio longitudinale (*apex-to-base*, 1 e 2) e 2 con direzione di taglio trasversale (3 e 4).

Per avere una numerosità dei dati adeguata per individuare differenze statisticamente significative tra le varie popolazioni in esame (nativo *vs.* decellularizzato; longitudinale *vs.* trasversale), sono stati ricavati per ciascuna vescica testata ($n=5$ per ogni popolazione) 4 campioni, 2 in direzione longitudinale (L) e 2 in direzione trasversale (T), rispetto all'asse apice-base dell'organo (Figura 2.10). Prima della trazione i provini sono stati ancorati ad un apposito supporto di carta vetrata (Figura 2.11A) per facilitare l'inserimento del campione negli afferraggi della macchina di prova (MTS hydraulic testing machine, MTS System Corporation, MN, USA, Figura 2.11B) e per evitare scivolamenti del campione stesso durante le prove di trazione, come suggerito in letteratura [50].

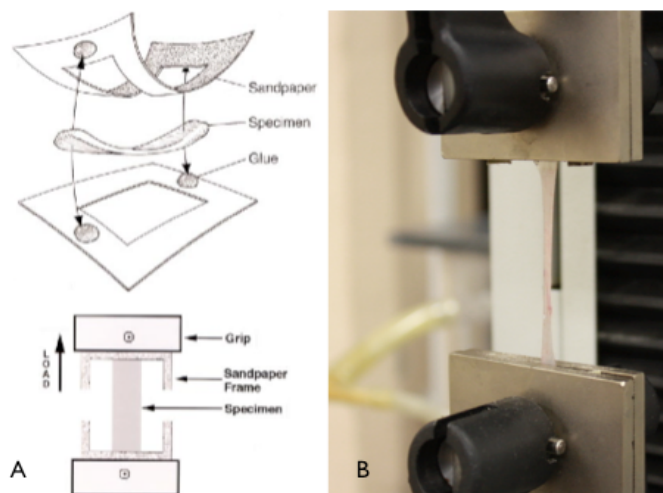


Figura 2.11: (A) il provino viene incollato ad un apposito supporto in carta vetrata (A, in alto), rimosso poi nella parte centrale (A, in basso) [50]; il supporto serve a facilitare l'inserimento e il fissaggio del provino negli afferraggi della macchina di prova (B) evitando il danneggiamento e fenomeni di scivolamento del provino.

Il protocollo utilizzato per i test di trazione monoassiale, in accordo con la letteratura [11, 68], prevede i seguenti passaggi:

- i) Posizionare il campione montato sull'apposito supporto nella macchina di prova (Figura 2.11).
- ii) Distendere il campione fino a raggiungere un pre-tensionamento di 0.02 N di carico.
- iii) Misurare tramite calibro la lunghezza del campione (l_0) e il suo spessore in tre punti (all'apice, al centro e alla base).
- iv) Applicare un pre-condizionamento del campione con 8 cicli di carico/scarico del provino fino a che le curve di carico e scarico non risultano quasi sovrapposte; deformazione applicata: 10% per i provini L, 30% per i provini T, a una velocità di deformazione di 3 mm/min.
- v) Al termine del pre-condizionamento, ripristinare il pre-tensionamento del campione a 0.02 N di carico.
- vi) Misurare nuovamente la lunghezza del campione (l).
- vii) Eseguire la prova di trazione fino a rottura del provino a una velocità di deformazione pari a 3 mm/min.

Durante la trazione, un software dedicato (Testworks®, Testworks group, Hitchin, Inghilterra) elabora i dati acquisiti durante la prova, espressi in termini di carico applicato sul campione (F) e allungamento del campione (Δl), e li converte in valori di σ e ε : σ è stato ricavato dividendo F per l'area di sezione trasversale del campione (ossia il prodotto fra larghezza e spessore del campione), ε è stato ricavato dividendo Δl per il valore di lunghezza iniziale l del campione. Si ottiene così la curva σ - ε corrispondente (Figura 2.12).

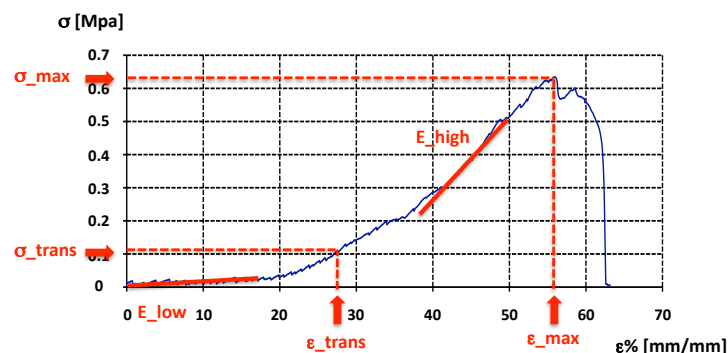


Figura 2.12: Curva σ - ε con i parametri caratteristici del comportamento biomeccanico del campione di tessuto di vescica stimati dalle curve sforzo-deformazione.

Dalla curva σ - ε si possono estrapolare dei parametri per valutare il comportamento meccanico del tessuto di vescica. In particolare, per ciascun provino sono stati valutati 6 parametri caratteristici della curva [68], indicati in Figura 2.12 e qui elencati:

- E_{low} : modulo di Young a basse deformazioni, ossia la pendenza della curva σ - ε in corrispondenza di bassi valori di deformazione, caratterizzata da un piccolo incremento dello sforzo in seguito all'incremento di deformazione delle fibre del tessuto;
- E_{high} : modulo di Young ad alte deformazioni, ossia la pendenza della curva σ - ε in corrispondenza di alti valori di deformazione, caratterizzata da un grande incremento dello sforzo in seguito all'incremento di deformazione delle fibre del tessuto;
- ε_{trans} : deformazione di transizione, stimata come il valore dell'intercetta fra la retta con pendenza E_{high} e l'asse delle ascisse; va a identificare il valore di deformazione per il quale la curva σ - ε mostra il cambiamento di pendenza.
- σ_{trans} : sforzo di transizione, ossia lo sforzo sulla curva in corrispondenza di ε_{trans} .
- σ_{max} : sforzo massimo, calcolato come il valore di sforzo corrispondente al punto di massimo della curva σ - ε .
- ε_{max} : deformazione massima, ossia la deformazione in corrispondenza della σ_{max} .

2.2.3.3 Prova di permeabilità

In seguito al processo di decellularizzazione, dal tessuto sono stati rimossi sia lo strato uroteliale, ossia la barriera che impedisce la filtrazione di fluido (urina), sia le cellule presenti nella tunica muscolare. La matrice così ottenuta ha un grado di porosità dovuto alla rimozione della componente cellulare del tessuto. In primo luogo, dal punto di vista della futura applicazione del tessuto come patch da impiantare *in vivo*, ciò comporterebbe il verificarsi di filtrazione di urina nel comparto addominale con conseguenti reazioni infiammatorie [52, 53]. Inoltre, la permeabilità della matrice comporta fenomeni di filtrazione di fluido infuso all'interno della vescica che devono essere quantificati in previsione di una successiva fase di coltura dinamica finalizzata alla ricellularizzazione della matrice. Infatti, per sollecitare la matrice *in vitro* con una pressione simile a quella che si sviluppa *in vivo* durante l'accumulo di urina, è importante tenere in considerazione i fenomeni di ultrafiltrazione del fluido, che a parità di portata in ingresso riducono i valori

di pressione ai capi della matrice rispetto al caso di tessuti completamente impermeabili (come ad esempio il tessuto di vescica nativo). Il test di permeabilità permette di valutare il coefficiente di permeabilità (K) caratteristico della matrice, definito come il rapporto tra il valore imposto di portata di perfusione del tessuto (Q) e la differenza di pressione che si genera a cavallo del tessuto (ΔP):

$$K = \frac{Q}{\Delta P} \quad (2.3)$$

La permeabilità, misurata in $\mu\text{l min}^{-1}\text{mmHg}^{-1}$, dipende dal livello di porosità del tessuto. A sua volta, la porosità deriva dall'impaccamento del tessuto connettivo all'interno della matrice extracellulare; quindi si può affermare che anche la permeabilità sia funzione delle proprietà della ECM.

Le prove di permeabilità sono state eseguite su campioni di tessuto circolari di circa 8 mm di diametro in modo da poter imporre una perfusione confinata e avere quindi una misura diretta della caduta di pressione a cavallo del tessuto, cosa difficilmente controllabile quando si ha a che fare con l'organo intero. Per realizzare i provini, dopo aver sezionato in direzione apice-base l'organo intero, conservato precedentemente in soluzione *Eurocollins*, è stata utilizzata una fustella a martello circolare, che ha permesso di ottenere il campione circolare dalla regione basale di ciascun campione di tessuto (vescica nativa, matrice decellularizzata con metodo statico e con metodo dinamico), come mostrato in Figura 2.13.

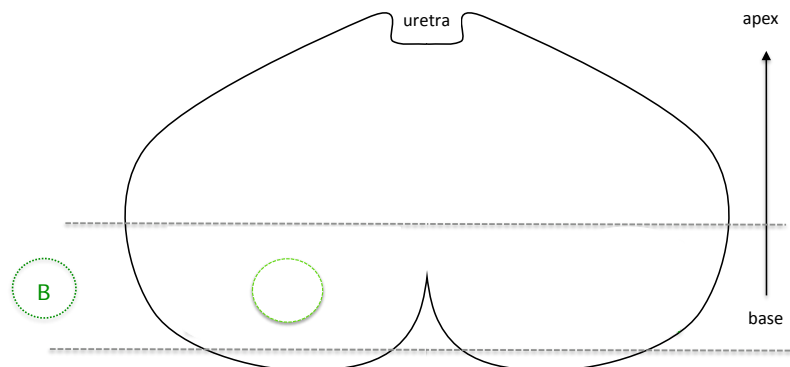


Figura 2.13: Provino circolare (diametro di circa 8 mm) per le prove di permeabilità, prelevato dalla regione basale (B) della vescica tramite fustella a martello circolare.

Da ogni vescica è stato ricavato un campione circolare. Il numero di vesciche utilizzato è pari a $n=2$ nel caso nativo e nel caso di decellularizzazione statica, $n=4$ nel caso di decellularizzazione dinamica.

Sebbene i pochi studi di letteratura disponibili [52, 53] abbiano suggerito la misura della permeabilità con prova in controllo di pressione (misura del volume o del flusso ultrafiltrato in seguito all'imposizione di una pressione idrostatica costante), in questo lavoro si è ritenuto più idoneo svolgere delle prove in controllo di portata (misura della pressione in seguito all'imposizione di una portata costante) per due motivi principali:

- Il controllo di portata è più accurato e automatizzabile rispetto al controllo di pressione: infatti, la portata con cui si perfonde il campione viene mantenuta costante dalla pompa volumetrica, senza necessità di intervento dell'operatore, che sarebbe necessario invece nelle prove in controllo di pressione [52, 53].
- Le condizioni imposte durante la prova di misura della permeabilità sono le stesse che generalmente sono utilizzate per la fase di ricellularizzazione di un tessuto in condizioni di perfusione.

In Figura 2.14 viene mostrato il set-up per le prove di permeabilità, progettato e realizzato *ad hoc* nell'ambito di questo lavoro di tesi.

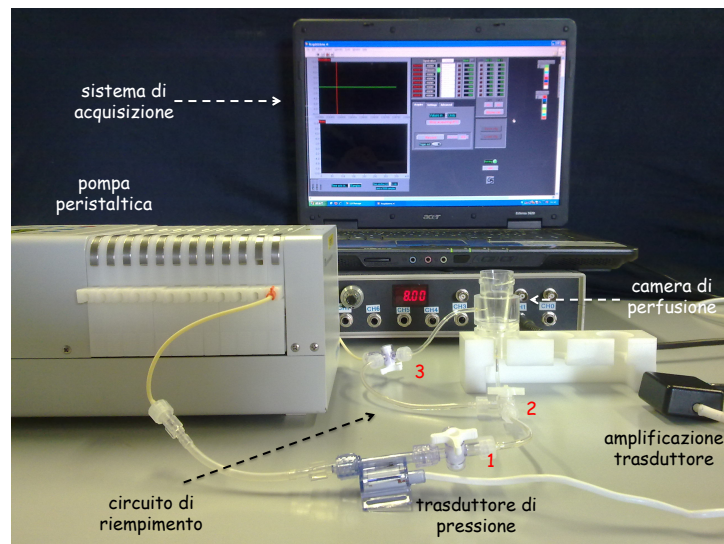


Figura 2.14: Set-up sperimentale per i test di permeabilità su patch di matrice decellularizzata. Il set-up permette di misurare la caduta di pressione (ΔP) che si crea ai capi del tessuto in seguito a perfusione con portata costante (Q). I numeri in rosso individuano i 3 rubinetti a tre vie necessari per il riempimento del circuito (1) e per il posizionamento del campione (2 e 3).

Il sistema è composto da:

- Una pompa peristaltica volta a perfondere il provino di vescica con un liquido (acqua deionizzata). Per far sì che la portata in ingresso (Q) rimanga costante per tutta la durata della prova indipendentemente dal post-carico, la pompa presa in considerazione è di tipo volumetrico (IPC-12, Ismatec, Wertheim-Mondfeld, Germania).
- Un trasduttore di pressione di tipo *flow-through* Pendotech Press-S-000 (PendoTECH, Princeton, NJ, USA) per il monitoraggio in continua della caduta di pressione ai capi del campione di vescica. Tale dispositivo è calibrato e compensato, ma non presenta un'amplificazione del segnale in uscita.
- Un circuito di amplificazione necessario per interfacciare il sensore alla centralina di cablaggio, realizzato in un precedente progetto di tesi del μ BS Lab.
- Il sistema di acquisizione già descritto per i test di cistometria (*Paragrafo 2.2.3.1*).
- Una camera di perfusione dove il campione di vescica viene alloggiato e investito dal fluido. Come camera di perfusione è stato utilizzato il sistema progettato e realizzato in un precedente lavoro di tesi presso il μ BS Lab per la coltura e l'espansione in vitro di cellule staminali ematopoietiche [69]. Il sistema, riadattato in modo da consentire l'alloggiamento e quindi la perfusione di un campione di tessuto biologico, presenta una camera inferiore adibita all'alloggiamento e alla perfusione del provino, una cartuccia in silicone per alloggiare il campione e una camera superiore che fissa il campione in sede, impone una pressione nulla a valle del patch (pressione atmosferica) e fa da reservoir da cui attingere il fluido (acqua deionizzata) che viene infusa attraverso la pompa all'interno del circuito idraulico. Le caratteristiche di questa camera saranno poi descritte nel dettaglio nel prossimo capitolo (*Paragrafo 3.1.1*).
- 3 rubinetti a tre-vie necessari per il riempimento del circuito (1) e che consentono di ottimizzare le operazioni di posizionamento del patch di vescica decellularizzata nella camera (2 e 3).

Lo schema del circuito idraulico del set-up sperimentale è mostrato in Figura 2.15. Il circuito idraulico è costituito da due circuiti principali: i) il *circuito di riempimento* che serve a consentire le operazioni di alloggiamento del campione nella camera di perfusione senza che si verifichi una caduta di pressione ai capi del provino prima dell'inizio della

prova, ii) il *circuito di perfusione* per perfondere il campione a portata costante, generare una caduta di pressione sul provino e misurare in tal modo il coefficiente di permeabilità.

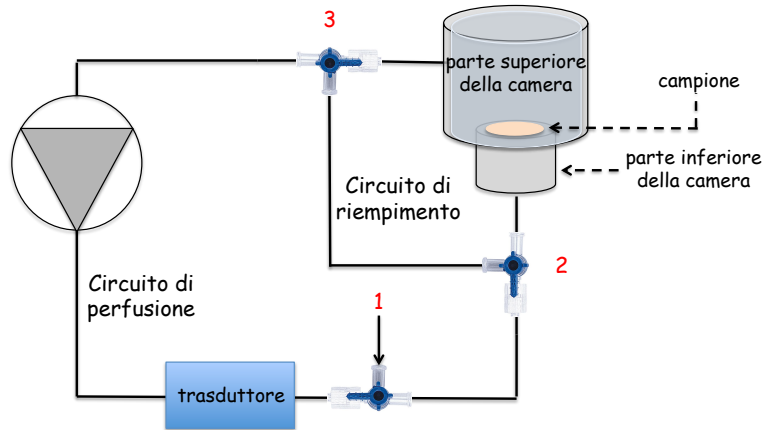


Figura 2.15: Schema del set-up sperimentale per la misura della permeabilità su provini circolari di matrice decellularizzata. I 3 rubinetti a tre-vie sono numerati e hanno funzioni differenti: il rubinetto 1 è il punto di accesso per il riempimento del circuito con il liquido utilizzato per la perfusione; i rubinetti 2 e 3 hanno il compito di isolare la camera di perfusione per favorire il corretto posizionamento del patch di vescica nella camera di coltura.

La procedura di inserimento del provino nella camera assemblata e di svolgimento della prova di permeabilità prevede di effettuare le seguenti operazioni:

- i) **Riempimento della camera e del circuito idraulico:** il rubinetto 1 (Figura 2.15) è l'accesso per il riempimento iniziale del circuito. Tramite una siringa l'acqua deionizzata è immessa in tutto il circuito assemblato in precedenza. In questa maniera si evita di dover aprire rami del circuito per consentire il riempimento, riducendo notevolmente il rischio di formazione di bolle. Questa fase prevede prima il riempimento del circuito di perfusione e della parte inferiore della camera. Durante il riempimento il rubinetto 3 ha tutte le vie aperte, mentre il rubinetto 2 è posizionato in modo da escludere il circuito di ricircolo. In seguito, il rubinetto 2 e il rubinetto 3 vengono configurati in modo da escludere rispettivamente la parte inferiore della camera e il ramo del circuito di perfusione in ingresso alla pompa, al fine di riempire anche il circuito di riempimento e completare così la prima fase.
- ii) **Alloggiamento del campione:** in questa fase, i rubinetti 2 e 3 hanno il compito di isolare la camera dal circuito di perfusione per posizionare correttamente al suo interno la cartuccia che contiene il campione di vescica. L'alloggiamento del

campione prevede l'inserimento della cartuccia, in cui il provino è collocato in configurazione luminale (ossia con la superficie uroteliale rivolta verso il basso, in modo da essere investita dal fluido durante la prova di permeabilità), all'interno della parte inferiore della camera piena d'acqua deionizzata; in seguito, viene prima montata e poi riempita di acqua deionizzata la parte superiore della camera, che chiude il sistema e va in battuta sulla cartuccia, fissandola. Per evitare che la parte superiore della camera, comprimendo il campione sul fluido presente nella parte inferiore, generi una pressione iniziale non desiderata (dovuta all'azione del fluido sul patch), in fase di fissaggio del campione i rubinetti 2 e 3 sono configurati in modo da mettere in comunicazione la camera con il solo circuito di riempimento come mostrato in Figura 2.16A; in questa maniera il fluido compresso entra nel circuito di ricircolo e sbocca nel reservoir, mantenendo così nullo il ΔP iniziale a cavallo del provino.

- iii) **Condizioni di prova:** una volta riempito il circuito e alloggiato il patch, i rubinetti 2 e 3 vengono configurati in modo da escludere il circuito di riempimento (Figura 2.16B) per permettere così la perfusione del campione e l'inizio della prova.

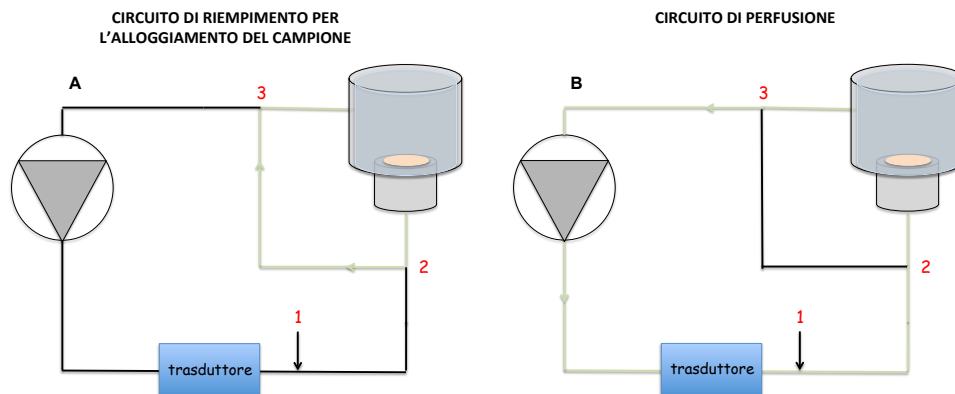


Figura 2.16: Schemi del set-up sperimentale per prove di permeabilità al variare del posizionamento dei rubinetti 2 e 3: (A) I rubinetti escludono il circuito di perfusione e permettono il mantenimento in fase di fissaggio di una pressione iniziale nulla a cavallo del campione nella camera; (B) I rubinetti escludono il circuito di ricircolo, permettendo la corretta perfusione del patch con acqua deionizzata prelevata dal reservoir.

Durante la prova, la pompa è in grado di prelevare l'acqua deionizzata presente nel reservoir e di perfondere il patch di vescica, generando una variazione fra la pressione a monte del patch (P_2) e la pressione a valle del patch ($P_1 = P_{\text{atmosferica}}$); la pressione a cavallo

del patch viene misurata dunque tramite il trasduttore di pressione montato sulla linea del circuito di perfusione (Figura 2.16).

Il protocollo per la misura della permeabilità messo a punto prevede la perfusione del patch a 3 diverse portate di fluido: 7.5 $\mu\text{l}/\text{min}$, 15 $\mu\text{l}/\text{min}$ e 30 $\mu\text{l}/\text{min}$, per ognuna delle quali è stato misurato il valore di pressione raggiunta una volta esaurito il transitorio. Plottando su un grafico i valori di pressione misurati alle varie portate, si ottiene una serie di punti che possono essere interpolati tramite una retta di regressione lineare (*retta P-Q*). L'inverso del coefficiente angolare di tale retta permette di ricavare K. Le portate utilizzate per condurre la campagna di prova sono state definite a valle di prove preliminari finalizzate a ottenere delle pressioni a cavallo del patch compatibili con il fondo scala del sensore utilizzato (pari a circa 200 mmHg). Le misure di pressione sono state eseguite a determinati set-point temporali (30 min; 60 min; 90 min; 120 min) in base alla dinamica di assestamento del valore di pressione misurato dal trasduttore. Il limite superiore temporale di 2 ore è stato definito in seguito a valutazioni basate sulle prove di letteratura [52, 53] e alle necessità di limitare la durata della prova onde evitare che il deterioramento del campione inficiasse l'analisi.

2.3 *Analisi statistica*

I dati dell'analisi del contenuto di DNA e RNA per i tre gruppi analizzati sono stati confrontati tramite test di Holm-Sidak in seguito a test ANOVA parametrico unilaterale.

Per quanto riguarda l'analisi dei dati ottenuti dalle prove di trazione monoassiale, sono stati condotti sia il test non parametrico di omogeneità della varianza, sia l'analisi della varianza tramite test di Kruskal-Wallis a una via per i seguenti confronti tra campioni non accoppiati:

- tessuto nativo vs. tessuto decellularizzato per via statica.
- tessuto nativo vs. tessuto decellularizzato per via dinamica.
- tessuto decellularizzato per via statica vs. tessuto decellularizzato per via dinamica.
- campioni trasversali vs. campioni longitudinali a livello basale (analisi anisotropica meccanica).

Sono stati inoltre condotti un test ANOVA parametrico unilaterale per verificare la presenza di differenze statisticamente significative fra i valori di spessore misurati per i campioni nativi, decellularizzati per via statica e decellularizzati per via dinamica, e un *t*-

test a una coda per dati non appaiati per il confronto, all'interno di ciascuna popolazione, fra gli spessori dei campioni ottenuti in direzione longitudinale e gli spessori di quelli ottenuti in direzione trasversale.

Per le prove di permeabilità, il confronto statistico fra le pressioni massime raggiunte sia nel caso nativo sia nelle vesciche decellularizzate con i due approcci è stato effettuato tramite test ANOVA parametrico unilaterale, in modo da effettuare i seguenti confronti:

- tessuto nativo vs. tessuto decellularizzato per via statica.
- tessuto nativo vs. tessuto decellularizzato per via dinamica.
- tessuto decellularizzato per via statica vs. tessuto decellularizzato per via dinamica.

Infine, per le prove di permeabilità la presenza di differenze significative da un punto di vista statistico tra i risultati ottenuti con tessuto nativo, matrici decellularizzate per via statica e matrici decellularizzate per via dinamica è stata valutata effettuando un *t*-test a una coda per dati non accoppiati. In particolare, sono stati confrontati i valori di *K* ottenuti per ciascuna popolazione, con confronti simili a quelli precedentemente descritti per le prove di cistometria.

In tutti i test, un *p*-value < 0.05 ha identificato delle differenze statisticamente significative.

CAPITOLO 3

PROGETTAZIONE DEL SISTEMA DI COLTURA DINAMICA DI CAMPIONI DI VESCICA DECELLULARIZZATI E RICELLULARIZZATI

Per la realizzazione di un sostituto di vescica da utilizzare in applicazioni di ingegneria del tessuto urovescicale, dopo aver determinato il materiale da utilizzare (ossia la matrice di vescica decellularizzata), deve essere definito il processo di coltura delle cellule seminate sul materiale; ciò per rendere il sostituto più efficace, in seguito all'impianto *in vivo*, al ripristino della funzionalità della vescica patologica. Da quanto emerge dalla letteratura, una coltura di tipo dinamico, rispetto a quella statica, permette di ottenere un tessuto ingegnerizzato più adatto alla sostituzione del tessuto patologico; infatti, tramite l'utilizzo di camere apposite (bioreattori), la coltura dinamica riproduce sul tessuto una sollecitazione simile a quella data dai cicli di riempimento e svuotamento fisiologico della vescica, favorendo così la vitalità e l'attività delle cellule seminate sul tessuto stesso (*Paragrafo 1.4*).

Per questo motivo, nel presente lavoro di tesi è stato definito, progettato e sviluppato un sistema per la coltura dinamica, e in particolare per la stimolazione meccanica, di un patch di tessuto di vescica da ricellularizzare. L'obiettivo del sistema di stimolazione del patch è proprio quello di sollecitare le cellule che saranno seminate sullo scaffold in condizioni il più possibile simili a quelle del tessuto *in vivo*.

In questo capitolo verranno descritti: i) i metodi utilizzati per la realizzazione del sistema di coltura dinamico, composto da un bioreattore e da un circuito idraulico per la stimolazione della matrice decellularizzata da ricellularizzare; ii) i protocolli per determinare le condizioni di lavoro in fase di coltura dinamica, ovvero di ricellularizzazione del costruito *in vitro*; iii) la messa in opera del sistema per effettuare prove di verifica del mantenimento della sterilità.

Il primo step è stato la progettazione e la realizzazione di una camera di coltura che permettesse la perfusione e la conseguente sollecitazione meccanica *in vitro* di un campione (patch) della matrice da ricellularizzare. Il bioreattore è stato progettato e realizzato presso il Laboratorio di Micro e Biofluidodinamica (μ BS Lab) del Dipartimento di Bioingegneria del Politecnico di Milano. Insieme alla camera è stato progettato il

circuito idraulico del sistema di perfusione della matrice e, a partire dal confronto con la letteratura, è stato definito un possibile protocollo di stimolazione del patch nella camera.

In seguito, sono state determinate le condizioni di lavoro per la fase di ricellularizzazione del patch attraverso la combinazione di due approcci modellistici: i) una modellizzazione analitica del comportamento meccanico della vescica, basata sulla legge di Laplace, ha consentito di mettere in relazione i valori di pressione interna e volume di riempimento ottenuti nelle prove di cistometria, ovvero il test di caratterizzazione del comportamento meccanico dell'organo intero (*Paragrafo 2.2.3.1*) con i valori di sforzo e deformazione ottenuti dalle prove di trazione monoassiale, ovvero il test usato per la caratterizzazione di una singola porzione dell'organo (*Paragrafo 2.2.3.2*); ii) con un'analisi computazionale della sollecitazione di un patch di vescica all'interno del bioreattore (tramite simulazione fluido-struttura sviluppata in ambiente Comsol©) è stato poi determinato il valore della portata da assegnare nel sistema di perfusione in grado di imporre sul patch una sollecitazione fisiologica in termini di sforzo e deformazione. Tale analisi ha consentito quindi di ricavare lo stato di sollecitazione fisiologico di un patch a partire dai dati ottenuti sull'organo intero.

Il sistema di sollecitazione è stato poi realizzato, collaudato e messo in opera; sono state svolte infine prove di verifica del mantenimento della sterilità per controllare che il sistema di coltura dinamico, sterilizzato e messo in opera all'interno di un incubatore, fosse in grado di preservare la sterilità, evitando infiltrazioni e contaminazioni batteriche.

3.1 Progettazione del sistema di coltura dinamica: definizione delle specifiche di progetto del bioreattore

In generale, un bioreattore progettato per garantire una stimolazione meccanica efficace di un tessuto biologico deve soddisfare le seguenti specifiche di progetto:

- Semplicità di utilizzo della camera, in modo da minimizzare la possibilità di commettere errori durante la messa in opera del sistema da parte dell'utilizzatore finale.
- Sterilizzabilità di tutti i componenti del sistema, in modo che questi possano essere resi sterili prima del loro utilizzo in fase di coltura cellulare. Le tecniche di sterilizzazione devono essere scelte in modo da non compromettere e danneggiare i materiali con cui sono realizzati i componenti.

- Facilità di montaggio sotto cappa, affinché il mantenimento della sterilità del sistema sia favorito senza dover effettuare manovre complesse.
- Compatibilità con le buone procedure di laboratorio (*GLP, Good Laboratory Practice*), ossia l'insieme di regole volte a promuovere la qualità della ricerca non clinica, al fine di avere dati sperimentali affidabili e riconoscibili a livello internazionale.
- Volume di priming ridotto, ossia la minimizzazione del volume di medium di coltura necessario a garantire un corretto apporto di nutrimento alle cellule, al fine di ottimizzare l'utilizzo delle risorse, riducendone lo spreco.
- Ingombro ridotto, per favorire l'inserimento in incubatore.
- Ottimizzazione degli scambi gassosi tra medium, scaffold e ambiente dell'incubatore, affinché sia garantito un opportuno apporto di ossigeno alle cellule in coltura.
- Assenza di punti di ristagno del medium, fonte di possibile contaminazione batterica.
- Automatizzazione dei processi, in modo da minimizzare gli interventi dell'operatore.
- Standardizzazione delle procedure, in modo da garantire la ripetibilità degli esperimenti.

Nella caso specifico del sistema di sollecitazione del patch di vescica, è opportuno garantire anche l'ottenimento delle seguenti specifiche:

- Alloggiamento adeguato per il patch di matrice, al fine di evitare movimenti indesiderati dello scaffold durante il periodo di stimolazione.
- Trasparenza della camera, per osservare la dinamica di sollecitazione e il comportamento del campione in tempo reale.
- Applicazione di una sollecitazione meccanica coerente con il tessuto in stimolazione, allo scopo di evitare il danneggiamento dello scaffold e favorire l'adesione e la proliferazione, nonché il mantenimento del fenotipo corretto e lo svolgimento delle corrette funzioni cellulari da parte delle cellule seminate sullo scaffold.

Il progetto del sistema sviluppato in questa tesi ha pertanto previsto la realizzazione di una camera di coltura (bioreattore) che soddisfacesse tutte le specifiche sopra indicate.

3.1.1 Progettazione del bioreattore per la perfusione di patch di vescica da ricellularizzare

La camera di coltura è stata realizzata a partire da un bioreattore a perfusione finalizzato alla co-coltura di cellule staminali ematopoietiche e cellule stromali del midollo osseo su un supporto tridimensionale, progettato e realizzato in precedenza presso il μ BS Lab del Politecnico di Milano [69].

In Figura 3.1 sono illustrati i vari elementi che costituiscono la camera di coltura di partenza.

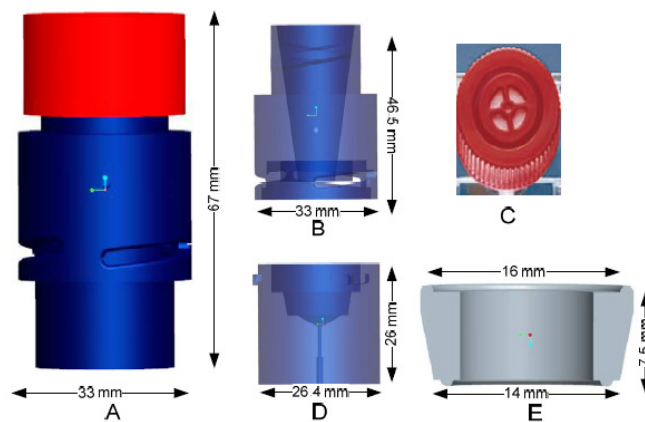


Figura 3.1: Disegni ottenuti tramite software di *Computer Aided Drafting (CAD)* della camera di coltura, realizzata in un precedente lavoro di tesi [69], con le relative dimensioni: (A) Configurazione assemblata, (B) Reservoir, (C) Tappo con integrato il filtro HEPA, (D) Housing, (E) Sezione della cartuccia porta-scaffold.

- Cartuccia portasccaffold (Figura 3.1E): ha la funzione di alloggiare uno scaffold 3D poroso, rendendolo più semplice da maneggiare durante le operazioni di semina delle cellule e di allestimento della coltura dinamica, e di confinare il fluido in modo da eseguire una perfusione confinata sullo scaffold. La cartuccia è inserita in un'apposita sede (housing) all'interno del bioreattore e compressa, provvedendo così alla tenuta idraulica della camera; questo è possibile grazie alle guarnizioni integrate sulle superfici superiore ed inferiore della cartuccia stessa. La cartuccia è stata realizzata in silicone (Sylgard® 184, Dow Corning Corporation, Midland, MI, USA).
- Housing (Figura 3.1D): è la sede per l'alloggiamento della cartuccia portasccaffold. Costituisce il modulo d'ingresso del medium, immesso nella camera tramite un canale di lume interno 0.8 mm. Il componente è stato realizzato in *Polimetilmetacrilato (PMMA)*.

- Reservoir (Figura 3.1B): ha la funzione di riserva di medium ed è sede di scambi gassosi tra ambiente interno ed esterno. È integrato nella camera di coltura e vincolato sopra l'housing con un accoppiamento "a baionetta". Questo tipo di accoppiamento è particolarmente pratico per l'operatore ed è in grado di favorire una buona compressione della cartuccia portasccaffold al fine di garantire la tenuta idraulica nel bioreattore. Il reservoir, conico al suo interno (Figura 3.1B), presenta sulla sua superficie laterale un foro e un connettore per il collegamento al circuito idraulico, in modo che la pompa prelevi medium dal reservoir per perfondere lo scaffold posizionato nell'housing del bioreattore. Anche questo componente è stato realizzato in PMMA.
- Tappo (Figura 3.1C): è stato utilizzato il tappo di una flask, da inserire sul reservoir tramite un accoppiamento filettato. La presenza di questo elemento ha lo scopo di isolare la camera di coltura dall'esterno, per garantire il mantenimento della sterilità dell'ambiente. Il filtro HEPA integrato nel tappo permette il passaggio dell'O₂, garantendo l'ossigenazione del terreno di coltura presente nel reservoir.

Partendo da questo sistema di coltura, si è passati ad identificare e successivamente ad implementare delle opportune modifiche che consentissero di adattare il sistema alle necessità richieste da questo lavoro di tesi. In particolare, il sistema di coltura dinamica che si vuole realizzare prevede che il campione di tessuto decellularizzato di vescica (scaffold), posizionato e fissato all'interno del bioreattore, venga sottoposto a cicli di perfusione che inducano una distensione ciclica dello scaffold stesso. In dettaglio, la portata di fluido (medium) all'interno della camera deve poter replicare *in vitro* la dinamica fisiologica di riempimento e svuotamento dell'organo *in vivo*; ciò al fine ultimo di favorire l'attività delle cellule che saranno seminate e la conseguente formazione di tessuto ingegnerizzato da poter utilizzare come sostituto del tessuto patologico.

Nello specifico, per quanto riguarda il sistema di coltura, le differenze principali rispetto al sistema di partenza sono due:

- i) Tipo di scaffold: il sistema di partenza prevede l'utilizzo di scaffold tridimensionali, rigidi e porosi, mentre il sistema che si vuole realizzare in questo lavoro di tesi deve sollecitare scaffold consistenti in una matrice decellularizzata di tessuto di vescica su cui sono state seminate cellule uroteliali (UCs) e cellule muscolari lisce (SMCs), e quindi con porosità ridotta, bassi spessori e soprattutto

deformabile. Il patch di tessuto inoltre crea una separazione fisica tra il fluido contenuto nell'housing e quello nel reservoir.

- ii) Sollecitazione applicata: il sistema di partenza è progettato per la perfusione confinata degli scaffold 3D porosi, mentre in questo lavoro di tesi si vuole applicare una sollecitazione ciclica che distenda la membrana.

La modifica principale per adattare il sistema è stata quindi apportata alla cartuccia portascaffold al fine di renderla adatta a poter vincolare la matrice di vescica decellularizzata. Una successiva modifica ha riguardato poi il reservoir della camera di partenza per garantire trasparenza al bioreattore in modo da poter monitorare in tempo reale lo stato di sollecitazione indotto dal sistema sul patch.

3.1.1.1 Modifica dell'alloggiamento per lo scaffold

L'alloggiamento dello scaffold di tessuto decellularizzato nella camera è un passaggio che richiede, a causa della natura flessibile della matrice, che il patch venga saldamente vincolato alla cartuccia portascaffold: posizionato a livello della sede di perfusione infatti, senza alcun tipo di fissaggio il campione di matrice decellularizzata tende a spostarsi dalla sua sede, entrando, totalmente o parzialmente, all'interno del condotto di perfusione, impedendo così la sollecitazione del patch stesso. Quello di cui necessita il bioreattore per la coltura dinamica di matrice di vescica decellularizzata dunque è un sistema in grado di:

- Fissare il campione (evitando movimenti nel condotto di perfusione).
- Mantenere il campione ben disteso per applicare efficacemente la sollecitazione meccanica (distensione ciclica).
- Non danneggiare la matrice, compromettendone l'integrità e le proprietà meccaniche: i materiali da utilizzare devono essere morbidi e senza spigoli vivi, per evitare incisioni e lacerazioni del tessuto.

Sono state così apportate modifiche al disegno di partenza della cartuccia portascaffold [69], volte a vincolare il campione di matrice all'interno della cartuccia stessa in maniera semplice ma allo stesso tempo efficace. La modifica che è stata introdotta per fissare il patch di tessuto decellularizzato di vescica prevede la creazione nella cartuccia di un profilo cavo dove poter alloggiare un o-ring in gomma siliconica. L'o-ring, inserito all'interno del profilo cavo, permette così di vincolare il patch di vescica, interposto tra la cartuccia siliconica e l'o-ring stesso, come mostrato in Figura 3.2 a destra.

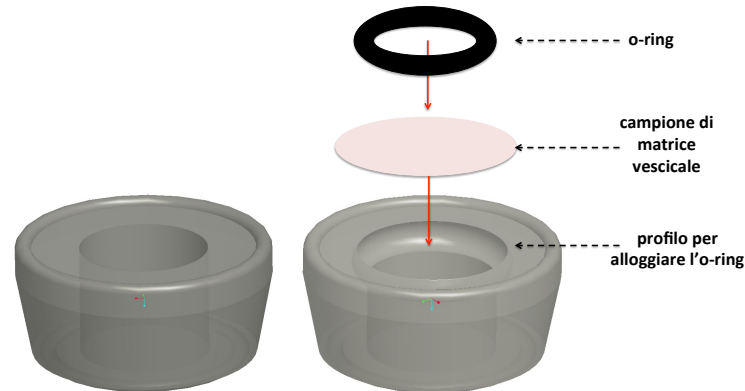


Figura 3.2: Confronto fra la cartuccia portascaffold originale (a sinistra) e quella modificata (a destra). Si può osservare che in quella modificata è presente un profilo circolare dove alloggiare un o-ring e vincolare così il campione di matrice interposto. I disegni sono stati realizzati tramite il software CAD ProEngineer©.

Per la realizzazione della cartuccia portascaffold originale, sono stati previsti degli appositi stampi di tipo modulare, realizzati in PMMA e composti da elementi che, assemblati, generassero al loro interno il profilo della cartuccia. Per ottenere la cartuccia, il silicone viene iniettato negli stampi fatto solidificare al loro interno. Gli stampi sono caratterizzati da un componente maschio e da un componente femmina, complementari e dotati di un foro passante, all'interno del quale inserire un elemento cilindrico (chiamato *spina*) necessario per generare il condotto all'interno della cartuccia portascaffold. Per realizzare nella cartuccia il profilo di alloggiamento dell'o-ring, è stata così realizzata una spina dello stampo con un profilo sporgente di tipo circolare. Il disegno CAD della spina modificata, realizzato tramite il software ProEngineer©, è mostrato in Figura 3.3.

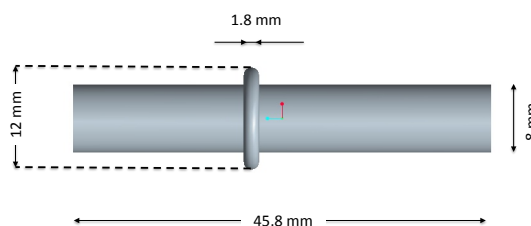


Figura 3.3: Disegno CAD della spina modificata. Si può osservare la presenza del profilo sporgente circolare necessario per realizzare nel portascaffold la sede di alloggiamento dell'o-ring.

Il profilo sporgente della spina è stato realizzato attraverso tecnica di prototipazione con una fresatrice a controllo numerico (Modela MDX-40, Roland DG Corporation,

Giappone): partendo da una barra cilindrica di PMMA (diametro = 12 mm, lunghezza = 30 mm) posizionata all'interno della fresatrice, è stata effettuata una lavorazione per asportazione di truciolo utilizzando l'asse di rotazione (detto *quarto asse*) della macchina utensile. La fresa utilizzata per questo processo ha diametro di 1 mm e punta tonda che ha consentito di ottenere un grado di finitura elevato a livello del profilo circolare della spina. La spina, insieme alle due parti dello stampo (già realizzate in precedenza [69]), è mostrata in Figura 3.4.

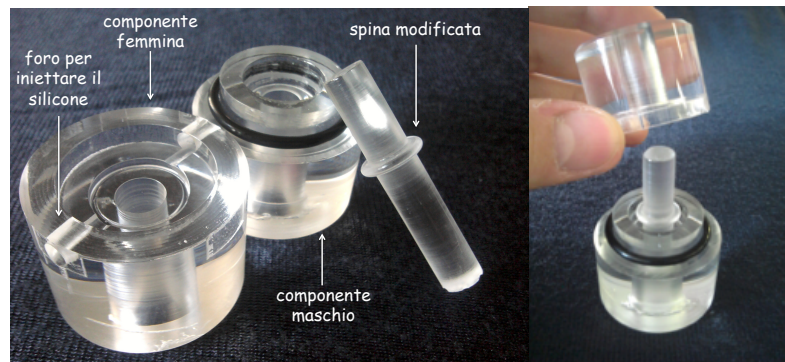


Figura 3.4: I 3 elementi dello stampo per la realizzazione della cartuccia portasccaffold tramite iniezione non assemblati (a sinistra) ed assemblati (a destra). Nel componente femmina sono presenti due fori posizionati in maniera speculare, uno per l'iniezione del silicone nella camera, l'altro per favorire la fuoriuscita di eventuali bolle di aria che possono generarsi durante l'iniezione del silicone. La spina modificata deve essere inserita nel foro presente nello stampo maschio, sul quale poi sarà posizionato il componente femmina. L'o-ring all'interfaccia fra maschio e femmina ha il compito di vincolare saldamente i due componenti, evitando fuoriuscite di silicone dallo stampo.

La realizzazione del portasccaffold per iniezione di silicone nello stampo (Figura 3.5) viene effettuata secondo il seguente protocollo:

- i) Preparare il silicone (Sylgard® 184, Dow Corning Corporation, Midland, MI, USA), miscelando il pre-polimero con un catalizzatore del processo di polimerizzazione (agente indurente) in un rapporto di peso 10:1, in modo che i gruppi di idruro di silicio presenti nell'agente indurente reagiscano con i gruppi vinilici presenti nella soluzione di base, formando il polimero in fase liquida.
- ii) Debollare il silicone prodotto ponendolo a -0.6 bar per circa trenta minuti tramite pompa da vuoto.

- iii) Assemblare i 3 elementi dello stampo e serrarli con una morsa in modo da garantire la tenuta (Figura 3.5). L'o-ring tra i due componenti complementari permette di evitare perdite di silicone durante l'iniezione.
- iv) Tramite siringa, iniettare dal foro apposito (mostrato in Figura 3.4) il silicone all'interno dello stampo, dal basso verso l'alto come mostrato in Figura 3.5, per favorire la rimozione per gravità di eventuali bolle di aria rimaste intrappolate all'interno della miscela siliconica, che possono fuoriuscire dal foro posizionato nella parte opposta dello stampo (visibile in Figura 3.4).
- v) Chiudere i due fori di accesso allo stampo tramite due tappi.
- vi) Mettere lo stampo in forno per 3 ore a 70°C per consentire la reticolazione della miscela siliconica.
- vii) Disassemblare lo stampo e prelevare la cartuccia.

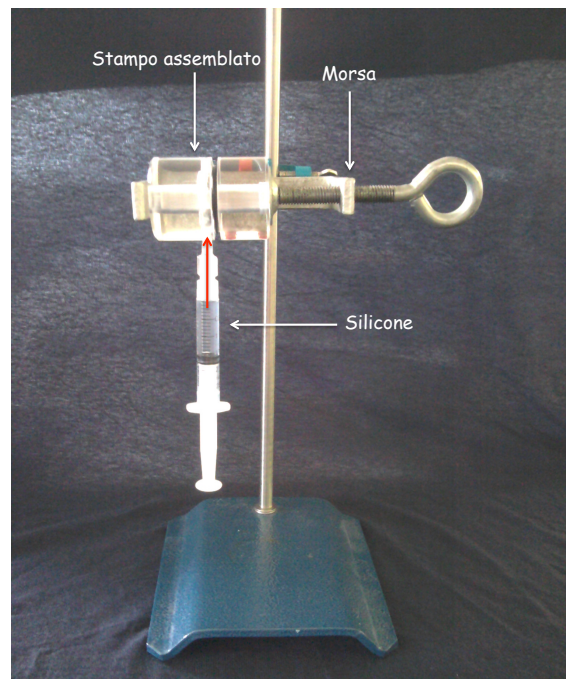


Figura 3.5: Iniezione del silicone nello stampo tramite siringa (freccia rossa). Il silicone viene iniettato dall'alto verso il basso in modo che eventuali bolle formatesi nello stampo vengano rimosse per gravità.

Una volta ottenuta la cartuccia, si può procedere all'alloggiamento del patch. Per alloggiare il patch è stato definito un protocollo specifico, semplice da applicare anche sotto cappa e in grado di vincolare il patch in maniera stabile. Durante il processo, il posizionamento dell'o-ring nel profilo di alloggiamento non deve compromettere la

sterilità del campione all'interno della cartuccia: per garantire il mantenimento della sterilità, questa procedura viene effettuata attraverso due strumenti in PMMA specificatamente progettati e realizzati tramite fresatrice a controllo numerico, mostrati in Figura 3.6.

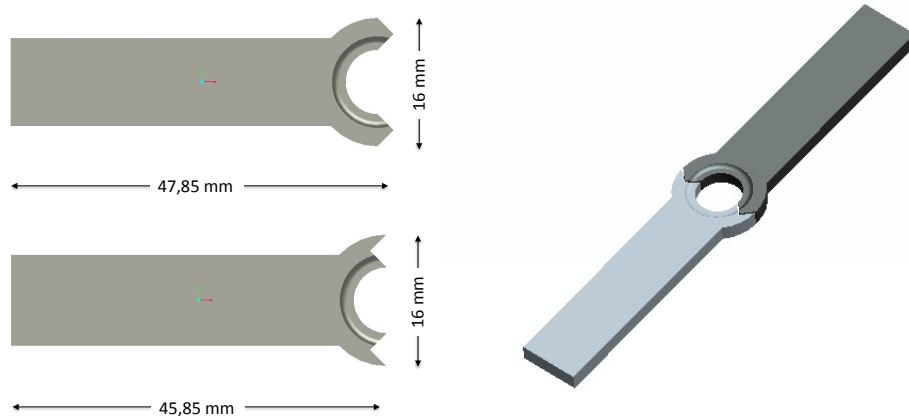


Figura 3.6: Strumenti per il posizionamento dell'o-ring nella cartuccia. I due componenti, con le rispettive dimensioni (a sinistra), hanno le estremità complementari in modo che, messi a contatto, formino un solco delle stesse dimensioni dell'o-ring, in grado di favorirne il posizionamento nel profilo di alloggiamento (a destra).

I due elementi vengono vincolati attraverso accoppiamento delle due estremità (complementari) ed hanno un profilo cavo centrale che consente di agire sull'o-ring durante l'alloggiamento del patch. In dettaglio, sotto cappa sterile, i due elementi permettono di spingere l'o-ring nella sua sede.

In riferimento alla Figura 3.7, le operazioni previste dal protocollo per l'alloggiamento del patch prevedono:

- i) Posizionamento del campione di vescica sulla cartuccia.
- ii) Posizionamento dell'o-ring sul campione in corrispondenza del profilo dove deve essere alloggiato (Figura 3.7B).
- iii) Inserimento dell'o-ring nel profilo di alloggiamento della cartuccia con gli appositi strumenti (Figura 3.7C). In questo modo, il campione è vincolato nella cartuccia.
- iv) Rimozione delle porzioni di matrice che fuoriescono dall'o-ring (figura 3.7D) tramite l'utilizzo di una forbice.

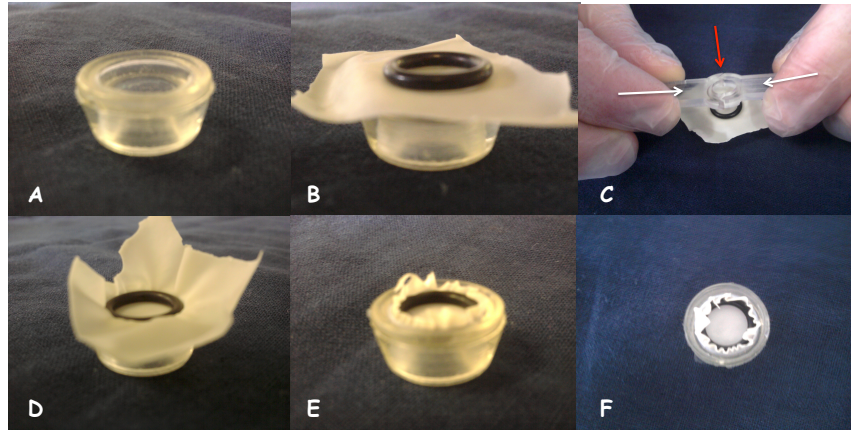


Figura 3.7: Sequenza di operazioni da eseguire per l'alloggiamento e il fissaggio del campione (simulato con un patch in lattice) nella cartuccia portasccaffold: (A) Cartuccia vuota; (B) Posizionamento del campione sopra la cartuccia e dell'o-ring sopra il campione; (C) Fissaggio del campione spingendo (secondo la direzione indicata dalla freccia rossa) l'o-ring in sede grazie all'azione degli appositi strumenti; I due elementi vengono avvicinati lateralmente (freccie bianche), garantendo il mantenimento della sterilità del patch (D) L'o-ring alloggiato nella sua sede sulla cartuccia vincola il patch, lasciando all'esterno le parti sovrabbondanti del campione; (E) Patch vincolato alla cartuccia dopo aver rimosso le parti di matrice acellulare in eccesso tramite forbice; (F) Vista dall'alto del patch vincolato alla cartuccia.

3.1.1.2 Modifica del reservoir

Le modifiche alla camera sono state necessarie principalmente per soddisfare la specifica di progetto di trasparenza per consentire il monitoraggio del patch durante la stimolazione meccanica; nel bioreattore di partenza infatti non è possibile osservare il campione (posizionato nella cartuccia portasccaffold) durante la stimolazione meccanica, né dalle superfici laterali (poiché, nonostante la trasparenza del PMMA, il patch rimane nascosto nella zona di accoppiamento tra housing e reservoir), né dall'alto dove è presente il tappo della flask. La trasparenza ha il vantaggio non solo di permettere la verifica del corretto posizionamento del campione nella cartuccia ma anche di poter osservare la dinamica di movimento del patch in fase di sollecitazione e quindi di poter verificare, in tempo reale, il comportamento della matrice decellularizzata durante la perfusione.

In letteratura è stato riportato l'utilizzo di un coperchio *Petri-like* in una camera di coltura dinamica per lo sviluppo di trachea ingegnerizzata, con buoni risultati in termini sia di ossigenazione del tessuto, sia di mantenimento della sterilità [8]. Sebbene le condizioni di sollecitazione del tessuto di trachea siano differenti rispetto a quelle previste per il patch di BAM, è stata ipotizzata in questo lavoro di tesi la possibilità di utilizzare per il bioreattore un coperchio Petri come sostituto del tappo della flask. In questo modo è possibile

garantire la trasparenza del sistema. Il disegno del reservoir modificato, realizzato tramite il software CAD ProEngineer©, è mostrato nella Figura 3.8 (il disegno tecnico di progetto è riportato in *Appendice A*).

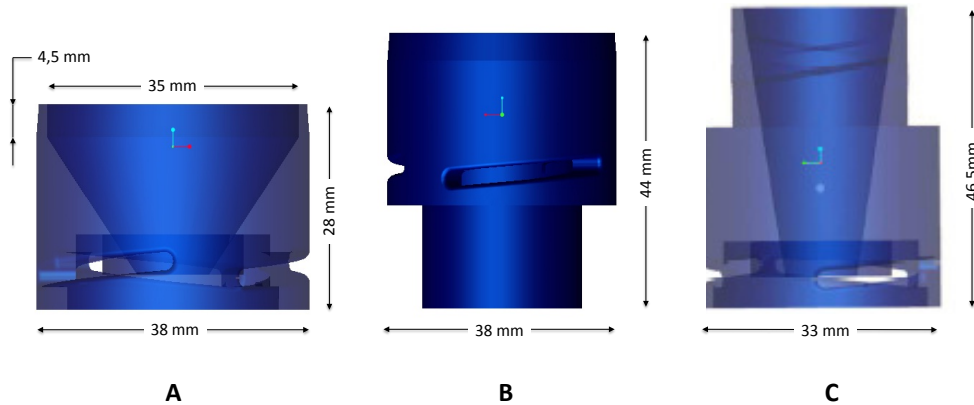


Figura 3.8: Disegni CAD (realizzati tramite software ProEngineer©) con le relative dimensioni di (A) Reservoir modificato; (B) Configurazione assemblata del reservoir modificato sull’housing; (C) Reservoir originale. L’housing è stato mantenuto identico a quello originale.

Come si può osservare in Figura 3.8, il reservoir del prototipo di bioreattore sviluppato in questo lavoro ha un diametro maggiore, rispetto al disegno della camera di partenza, per consentire il posizionamento in sommità del coperchio di una piastra Petri commerciale dal diametro interno di 35 mm (IWAKI®, Giappone). L’accoppiamento tra reservoir e housing (elemento che presenta le medesime caratteristiche geometriche e dimensionali del componente originale) è stato mantenuto “a baionetta” per la semplicità che lo caratterizza. L’esterno del reservoir rimane cilindrico (Figura 3.8A), ad esclusione della sommità dove viene posizionato il coperchio: in quel punto il reservoir ha un profilo a geometria conica per permettere l’esatto accoppiamento del reservoir con il coperchio Petri. Internamente, il reservoir (cilindrico) ha un diametro costante ($d=35$ mm) nel primo tratto, dopodiché si raccorda tramite profilo conico con la superficie inferiore che va in battuta sulla cartuccia portascaffold; tale disegno ha la funzione di garantire la tenuta idraulica del sistema durante la perfusione (Figura 3.8A). La configurazione geometrica del reservoir descritta comporta un incremento di capacità nel reservoir rispetto alla versione originale (circa 12.5 ml, rispetto ai 7 ml precedenti). Ciò minimizza le problematiche che potrebbero insorgere a causa della movimentazione del pelo libero del fluido in fase di stimolazione (come ad esempio l’eccessivo innalzamento del pelo libero con eventuale fuoriuscita di medium

dalla camera), senza richiedere un aumento del volume di priming: il reservoir infatti non deve essere riempito completamente di medium, ma fino al livello, stabilito dall'operatore, tale da garantire il nutrimento delle cellule e allo stesso tempo soddisfare la specifica di volume di priming ridotto.

Il prototipo di bioreattore con il coperchio Petri è riportato in Figura 3.9A. La visibilità del patch nella camera invece può essere apprezzata in Figura 3.9B, dove il bioreattore è stato riempito con medium di coltura.

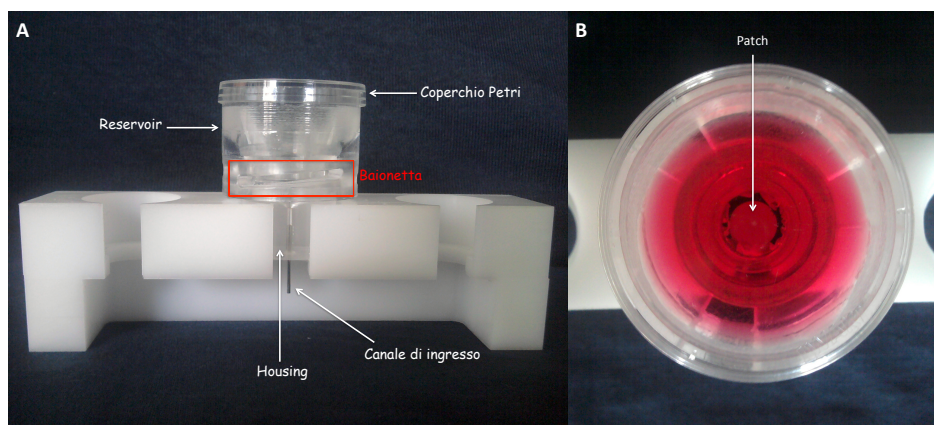


Figura 3.9: (A) Bioreattore assemblato e posto su un apposito supporto realizzato in *Poliossimetilene*. Si può osservare il coperchio di una piastra Petri posizionato sulla sommità del reservoir. (B) Bioreattore riempito di medium di coltura visto dall'alto. Si può vedere in maniera distinta il patch di vescica vincolato dall'o-ring nella cartuccia portasccaffold.

Il materiale utilizzato per la realizzazione del pezzo è il PMMA (Plasting S.r.l., Segrate, Italia), principalmente per quattro motivi:

- Permette al pezzo di essere sottoposto a diversi cicli di sterilizzazione in *perossido di idrogeno* (sistema *Sterrad*) o in *ossido di Etilene (ETO)* senza rilasciare residui tossici per i tessuti biologici, mantenendo inalterate le caratteristiche meccaniche.
- Presenta un ottimo grado di trasparenza, consentendo un'ispezione visiva dell'interno della camera durante la fase di esercizio.
- Ha un costo contenuto.
- Risulta facilmente lavorabile alle macchine utensili disponibili in laboratorio.

La fase di prototipazione è stata condotta utilizzando una fresatrice a controllo numerico presso il μ BS Lab del Politecnico di Milano. In particolare, una barra di PMMA con geometria cilindrica (diametro = 40 mm, lunghezza = 32 mm) è stata preventivamente

piallata a livello delle superfici della base superiore e inferiore tramite tornio parallelo (Opti D 240x500 G-Vario, Optimum, Germania). In seguito, è stata posta nella fresatrice e lavorata per asportazione di materiale in due fasi: la prima per ottenere tutte le geometrie esterne (accoppiamento a baionetta e profilo conico dove accoppiare il tappo Petri; le lavorazioni sono state effettuate con fresa quadra da 3 mm); la seconda per realizzare le lavorazioni delle superfici interne del reservoir (lavorate con fresa quadra da 6 mm). Un'istantanea del processo di lavorazione può essere osservata in Figura 3.10.

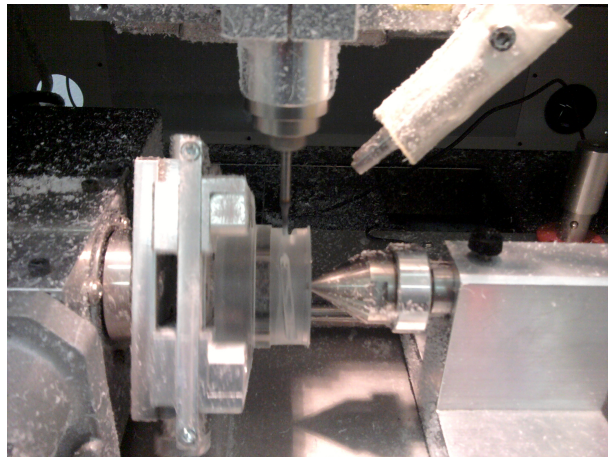


Figura 3.10: Lavorazione di PMMA tramite fresatrice a controllo numerico per la realizzazione del reservoir. In particolare, è mostrata la lavorazione delle superfici esterne tramite l'utilizzo del *quarto asse*.

Dopo aver realizzato il reservoir e fissato il campione nella cartuccia, le componenti del bioreattore possono essere assemblate. Lo schema di assemblaggio è mostrato in Figura 3.11.

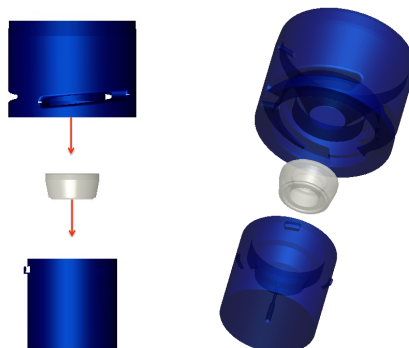


Figura 3.11: Componenti del bioreattore in vista laterale (a sinistra) e in vista 3D (a destra). Le frecce rosse indicano come inserire le varie componenti per serrare il patch nella camera di coltura.

3.1.2 Set-up del sistema di coltura

Una volta realizzata la camera di coltura, il sistema deve essere completato con il circuito idraulico per la sollecitazione meccanica del patch. Di seguito è presentato lo schema di una possibile configurazione del sistema di coltura (Figura 3.12). Questo set-up, funzionale alla stimolazione meccanica della matrice decellularizzata di vescica attraverso perfusione, non è stato ultimato alla conclusione di questa tesi. In particolare, si prevede di integrare un sistema di controllo retroazionato che comandi la pompa utilizzata per la perfusione ciclica del patch .

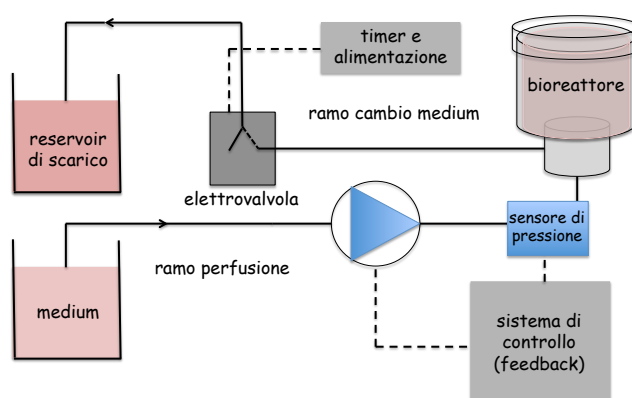


Figura 3.12: Schema del set-up per il sistema di coltura dinamico finalizzato alla sollecitazione di una patch di vescica decellularizzata.

In riferimento alla Figura 3.12, il set-up che caratterizza il sistema di perfusione è il seguente:

- Due reservoir, uno contenente medium fresco, l'altro per lo scarico del medium utilizzato.
- Una pompa in grado di invertire il verso di rotazione e quindi di attuare il ciclo di perfusione/scarico del patch, riproducendo le condizioni di riempimento e svuotamento tipiche della vescica.
- La camera di coltura (bioreattore) descritta nel paragrafo precedente.
- Un sistema di controllo, in grado di poter comandare in remoto tramite software la pompa, definendo sia il verso di rotazione, sia il valore della portata (in termini di giri al minuto della testa rotante della pompa) e permettendo la definizione di pattern prestabiliti di sollecitazione del patch.

- Allo stesso tempo il sistema di controllo deve essere in grado di fornire una retroazione al circuito a partire dai valori di pressione registrati a cavallo del patch e acquisiti tramite apposito sensore di pressione, in modo da adattare la portata imposta dalla pompa al fine di mantenere la pressione del fluido che stimola il patch a valori prestabiliti dall'utente.
- Un'elettrovalvola, in grado di permettere il ricambio del medium all'interno del sistema.
- Un sistema di alimentazione dell'elettrovalvola e un timer digitale in grado di comandare l'apertura/chiusura del canale dell'elettrovalvola ad intervalli di tempo predefiniti dall'utente per il ricambio del medium.

Inoltre, il circuito è costituito da: i) un ramo di perfusione, che prevede il prelievo di medium dal reservoir e, tramite la pompa volumetrica, la sollecitazione ciclica del patch di vescica, e ii) un ramo di ricambio medium, che permette di prelevare periodicamente il terreno di coltura dal bioreattore e riversarlo nel reservoir di scarico.

La forma d'onda di pressione da utilizzare nel protocollo di sollecitazione del patch, riportata in Figura 3.13, è stata adattata da un lavoro di letteratura [64]:

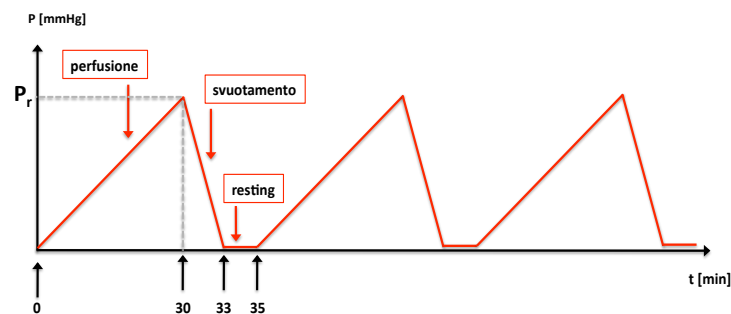


Figura 3.13: Forma d'onda pressoria da applicare per sollecitare il patch di vescica.

Il protocollo prevede un periodo di sollecitazione ciclico del patch, costituito da tre fasi:

- Fase di perfusione, dove il medium, a portata costante, investe il patch portando ad un aumento di pressione che deve raggiungere un valore massimo P_r dopo 30 minuti (Figura 3.13).
- Fase di svuotamento, dove la sollecitazione viene rimossa e la pompa, invertendo il verso di rotazione, richiama il fluido riportando in 3 minuti il patch di vescica alle condizioni di partenza (Figura 3.13).

- iii) Fase di resting, dove la pompa si ferma e il patch è mantenuto in condizioni di assenza di sollecitazione per 2 minuti.

La sollecitazione ciclica viene ripetuta un numero di volte definito dall'operatore.

Il valore di P_r , corrispondente alla pressione massima che caratterizza il riempimento fisiologico della vescica di coniglio, deve essere determinato; in letteratura infatti è stato riportato un valore di pressione massima della vescica di maiale, pari a circa 7,5 mmHg [53], ma non è mai stato definito un valore di pressione massima per il modello animale di coniglio. In questo lavoro di tesi, tale valore è stato ricavato dalle prove di cistometria, e sarà presentato nel *Capitolo 4*.

La differente dinamica delle tre fasi ha lo scopo di riprodurre nel modo più realistico possibile lo stato di sollecitazione fisiologica della vescica *in vivo* (quindi con tempi di accumulo di urina lunghi e tempi di svuotamento molto brevi).

Il sistema di controllo monitora istante per istante il valore della pressione che agisce sulla superficie del patch tramite un sensore di pressione. A partire dai valori misurati il sistema (tuttora da progettare e realizzare) è in grado di applicare sulla pompa una retroazione, ancora da sviluppare, al fine di adattare il valore di portata in modo da garantire e mantenere la forma d'onda pressoria definita e descritta in Figura 3.13.

Durante il periodo di sollecitazione, l'elettrovalvola mantiene chiuso il ramo relativo al cambio del medium.

Per il ricambio del medium, dopo un intervallo di tempo definito dall'utente, l'elettrovalvola apre il ramo di cambio medium, permettendo la raccolta nel reservoir di scarico del terreno di coltura utilizzato e la sua sostituzione con medium fresco. Durante questo periodo, la pompa rimane sempre in modalità di perfusione, in modo da direzionare il flusso di fluido verso il ramo di ricambio del medium. Il medium posto nella parte superiore della camera, disaccoppiata dal resto del circuito per la presenza del patch di tessuto all'interno del bioreattore, deve essere cambiato manualmente attraverso prelievo con siringa; la presenza del coperchio della *Petri* agevola questa fase del processo. È comunque possibile prevedere un secondo circuito analogo, in grado di ricambiare automaticamente il mezzo anche nel reservoir interno del bioreattore.

Al termine della fase di sostituzione del medium, la cui durata è definita dall'utente e comandata tramite timer, l'elettrovalvola chiude il ramo di ricambio del medium aprendo nuovamente il ramo per la perfusione e la sollecitazione del patch. Per garantire la corretta

alternanza delle fasi, timer e sistema di controllo devono essere sincronizzati nelle loro attività; per fare ciò, entrambi devono essere controllati via software, in grado di monitorare il funzionamento dell'intero sistema di coltura dinamica.

3.2 Protocollo di stimolazione del campione di tessuto nel sistema di coltura

3.2.1 Determinazione delle condizioni di lavoro del sistema di coltura

Per ottenere un tessuto funzionale tramite coltura dinamica nel sistema descritto nel paragrafo precedente, il primo passo consiste nello stabilire le condizioni di lavoro ottimizzate per la sollecitazione delle cellule seminate su patch in modo da permettere alle cellule lo svolgimento delle proprie funzioni (ad esempio la deposizione di nuova matrice extracellulare, oppure l'organizzazione per formare nuovi fasci di fibre muscolari) ed evitare fenomeni di distacco delle cellule dallo scaffold. I parametri principali che caratterizzano il processo di stimolazione all'interno del sistema sono la portata in ingresso applicata dalla pompa (Q) e la pressione che si sviluppa sulla superficie del patch (ΔP).

Dalle prove di cistometria (descritte nel *Paragrafo 2.2.3.1*) si ricavano delle curve pressione-volume (*curve P-V*) che permettono di definire il valore del volume di riempimento dell'organo e della corrispondente pressione intravesiciale che garantiscano una sollecitazione fisiologica (pressione inferiore alla pressione massima di riempimento fisiologico della vescica di coniglio, P_r , e volumi di riempimento inferiori al volume di *overstretching*; entrambi i valori saranno definiti nel *Capitolo 4*). Da queste prove, che si riferiscono alla sollecitazione dell'organo intero, è possibile risalire alle condizioni di lavoro associate alla stimolazione del patch, necessariamente differenti rispetto al caso dell'organo intero. Infatti, ad esempio, la perfusione applicata con $Q=1$ ml/min utilizzata nelle prove di cistometria, se applicata su un patch di vescica, genera un incremento del valore di pressione che va ad agire sul patch maggiore di più un ordine di grandezza rispetto a quelle misurate sull'organo intero (rispettivamente circa 100 mmHg e 3 mmHg). Per determinare dunque le condizioni di lavoro al fine di sollecitare il patch di matrice decellularizzata in maniera fisiologica, è necessario mettere in relazione i valori di P e V (nel tratto di curva che identifica il comportamento fisiologico) ricavati dalla curva cistometrica con i corrispondenti valori di sforzo (σ) e deformazione (ϵ) che si generano sulle pareti dell'organo intero.

L'approccio utilizzato per determinare le condizioni di lavoro del sistema di coltura a partire dalla corrispondenza tra queste grandezze ha previsto due fasi, schematizzate nel diagramma a blocchi di Figura 3.14.

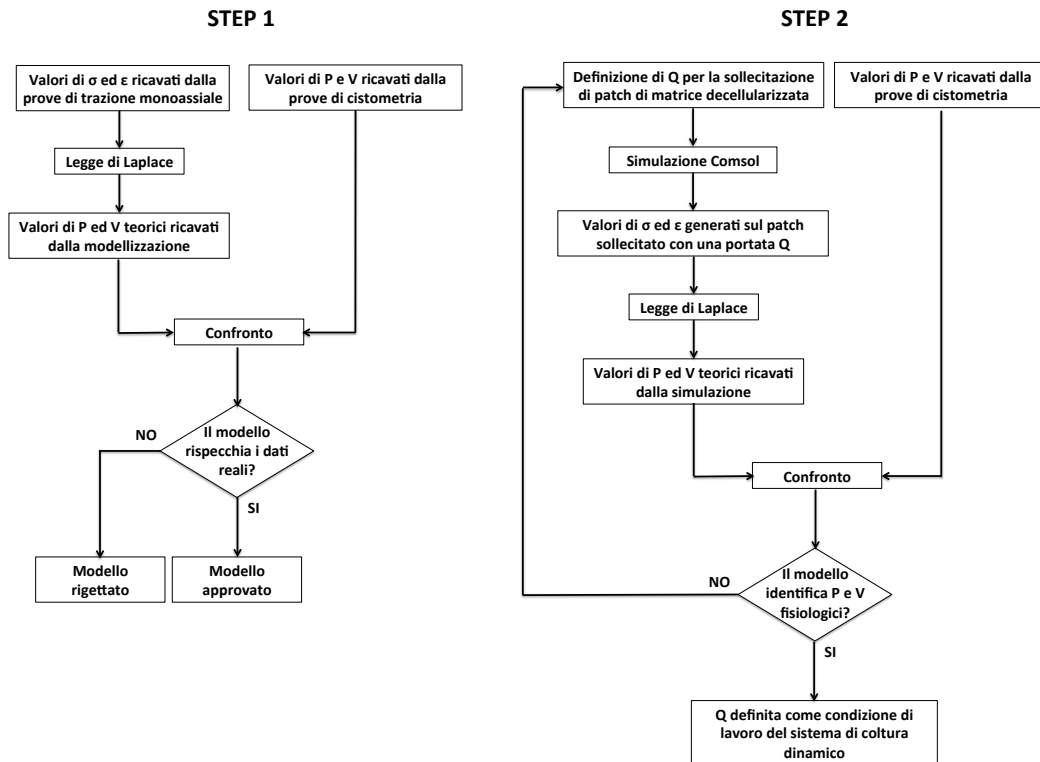


Figura 3.14: Diagrammi a blocchi dei passaggi svolti per definire le condizioni di lavoro da imporre: nel primo step si cerca il modello analitico migliore, in grado di mettere in relazione i valori di σ ed ϵ della prova di trazione monoassiale con i valori di P e V della prova cistometrica. In particolare, sono stati considerati due modelli: legge di Laplace con assunzione di geometria sferica della vescica e legge di Laplace con assunzione di geometria sferoidale della vescica. Nel secondo step, vengono testate diverse portate in un modello computazionale di sollecitazione del patch nella camera di coltura. Ciò per vedere quale di queste sia in grado di generare sul patch valori di σ ed ϵ associati a condizioni di riempimento fisiologico della vescica (e quindi a pressioni e volumi inferiori rispettivamente a P_T e al volume di *overstretching*).

- i) È stata introdotta una modellizzazione analitica, che ha permesso, tramite un modello matematico basato sulla legge di Laplace con due assunzioni geometriche differenti (sferica e sferoidale), di ottenere, a partire dai valori di σ ed ϵ delle prove di trazione monoassiale, una curva P-V teorica. Questa curva è stata confrontata poi con la curva P-V media ottenuta dalle prove di cistometria su organo intero nativo. Lo scopo di questo primo step consiste nel definire quale delle due assunzioni

geometriche (sferica o sferoidale) permette di modellizzare meglio la curva P-V cistometrica.

- ii) Il secondo step ha previsto, tramite un'analisi computazionale fluido-struttura, di valutare l'effetto di differenti portate in termini di sollecitazione meccanica indotta nel patch durante la stimolazione in bioreattore. Tra queste è stata individuata quella in grado di generare sul patch valori di σ ed ε che, convertiti in valori di P e V tramite il modello analitico determinato nella fase precedente, identificassero dei valori di pressione e volume fisiologica (quindi con pressioni inferiori a P_r e volumi inferiori al volume di *overstretching*). Tale portata è stata così definita come condizione di lavoro del sistema di coltura.

3.2.1.1 Modello analitico dello stato di sollecitazione sul patch di vescica

Una via per mettere in relazione le pressioni e i volumi che caratterizzano il riempimento della vescica con gli sforzi e le deformazioni che si generano sulle pareti dell'organo è sicuramente la modellizzazione analitica tramite legge di Laplace. Basandosi sul lavoro di *Korossis et al.* [68], è stata dunque utilizzata la legge di Laplace per mettere in relazione i risultati delle prove di trazione monoassiale (descritte nel *Paragrafo 2.2.3.2*) con i risultati delle prove di cistometria su organo intero (descritte nel *Paragrafo 2.2.3.1*). L'equazione di Laplace, che permette di definire la pressione che agisce sull'organo per generare uno stato di sollecitazione meccanica del tessuto descritto in termini di σ ed ε , nella sua forma generale è la seguente [70]:

$$P = \frac{\sigma_1 s_1}{R_1} + \frac{\sigma_2 s_2}{R_2} \quad (3.1)$$

Dove P è la pressione applicata, R_1 e R_2 sono i raggi di curvatura principali che caratterizzano la geometria considerata, σ_1 e σ_2 sono gli sforzi agenti lungo le due curvature, s_1 e s_2 sono gli spessori della parete dell'organo associati alle due curvature. Questa equazione, valida solo se l'organo soddisfa la condizione di parete sottile (ossia spessore/diametro < 0.1) [70], si riferisce a una condizione di anisotropia, quando cioè il comportamento meccanico è differente in base alla direzione considerata. In caso di isotropia, gli sforzi applicati nelle due direzioni sono equivalenti, e quindi l'equazione (3.1) si semplifica:

$$P = \sigma_s \cdot \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad (3.2)$$

Nel caso di geometria sferica, con infiniti raggi di curvatura identici, l'equazione (3.2) si riduce ulteriormente:

$$P = \frac{2\sigma_s}{R} \quad (3.3)$$

Con R il raggio della sfera. Tanto più ci si discosta dal caso sferico, tanto più i 2 raggi di curvatura principali saranno diversi, tanto più l'equazione da utilizzare sarà la (3.1).

I passaggi effettuati per eseguire la modellizzazione analitica sono i seguenti (Figura 3.14 STEP1):

- i) Considerare i valori di sforzo e deformazione ottenuti dalle prove di trazione monoassiale.
- ii) Ricavare, tramite l'equazione di Laplace (3.1), i valori di pressione e volume che descrivono una curva P-V teorica.
- iii) Confrontare le curve P-V teoriche con quelle ricavate dalle prove di cistometria per verificare che siano confrontabili (con pressioni dello stesso ordine di grandezza).

Dopo aver verificato l'ipotesi di parete sottile, sono state considerate le ipotesi di isotropia e omogeneità, in base ai risultati delle prove meccaniche effettuate sul tessuto, descritti nel *Capitolo 4*. Per quanto riguarda l'ipotesi di geometria della vescica, sono state considerate sia l'ipotesi di sfericità, sia l'ipotesi di geometria a sferoide prolato (ellissoide con due dimensioni identiche, minori della terza dimensione, come mostrato in Figura 3.15), caratterizzato da due curvature principali differenti e per questo più simile all'aspetto reale dell'organo intero di vescica. In particolare, sono state considerate due assunzioni di geometria differenti per verificare quale delle due permettesse di modellizzare meglio il comportamento dell'organo intero, ossia quale delle due geometrie permettesse di ottenere delle curve P-V teoriche più simili e più confrontabili con le curve P-V ricavate dalle prove di cistometria.

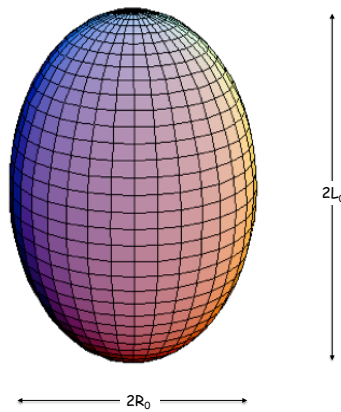


Figura 3.15: Modellizzazione geometrica a sferoide prolato con le due dimensioni principali: il diametro $D_0=2R_0$ e la lunghezza apice-base $2L_0$.

Delle vesciche utilizzate per le campagne di decellularizzazione e relativa caratterizzazione, sono state misurate la larghezza a metà altezza $2R_0$ (presa come diametro del modello sferico e come primo raggio di curvatura del modello sferoidale) e la lunghezza apice-base $2L_0$ (presa come secondo raggio di curvatura nel caso di sferoide prolato). Per la modellizzazione secondo la geometria sferica, facendo riferimento all'equazione (3.3), sono state usate le seguenti relazioni per ottenere i valori di pressione e volume a partire dai valori di sforzi e deformazioni [68]:

$$P = \frac{2\sigma s}{R_0(1 + \varepsilon)} \quad (3.4)$$

$$V = \frac{4}{3}\pi R_0^3(1 + \varepsilon)^3 \quad (3.5)$$

dove σ e ε sono lo sforzo e la deformazione ricavati dalle prove di trazione monoassiale. Nell'equazione (3.4) sono stati considerati sia i valori di trazione monoassiale ottenuti in direzione trasversale (σ_T), sia i valori ottenuti in direzione longitudinale (σ_L).

Nel caso di sferoide, ci si è attenuti invece all'equazione di Laplace nella sua versione generale (equazione (3.1)), dove le due curvature principali sono differenti, e quindi gli sforzi longitudinali misurati lungo il raggio di curvatura L_0 gli sforzi trasversali misurati lungo R_0 sono stati inseriti in un'unica equazione:

$$P = \frac{\sigma_T S_T}{R_0(1 + \varepsilon)} + \frac{\sigma_L S_L}{L_0(1 + \varepsilon)} \quad (3.6)$$

$$V = \frac{4}{3} \pi R_0^2 L_0 (1 + \varepsilon)^3 \quad (3.7)$$

In entrambe le assunzioni i termini a denominatore hanno lo scopo di tenere in conto la progressiva distensione della vescica in fase di riempimento, come suggerisce l'equazione (3.8):

$$\frac{R}{R_0} = \frac{l_0 + \Delta l}{l_0} = 1 + \varepsilon \quad (3.8)$$

dove R è il raggio della vescica corrispondente ad una distensione Δl del campione, sottoposto a trazione monoassiale, a partire da una lunghezza iniziale l_0 .

In entrambi i casi è stata considerata l'equazione di Laplace secondo la trattazione in condizioni di grandi deformazioni, in quanto i dati di deformazione presi dalle prove di trazione monoassiale e utilizzati nella modellizzazione matematica identificano delle variazioni di lunghezza Δl del campione superiori al 10% della lunghezza iniziale. Il modello è stato applicato esclusivamente a vesciche native, proprio perché ciò che interessa indagare è la risposta dell'organo, in termini di deformazioni meccaniche, prima della decellularizzazione, in modo da capire quali siano le condizioni di sforzo e deformazione che caratterizzano il tessuto cellularizzato e quindi applicare una stimolazione alle cellule seminate sul patch di vescica in grado di replicarle.

Un problema incontrato durante lo sviluppo del modello matematico è stata la parziale assenza del tratto a bassa pendenza nelle curve σ - ε ricavate dalle prove di trazione monoassiale (visibile in Figura 3.16, in alto a sinistra), dovuta principalmente al pre-condizionamento iniziale applicato al campione (in base a quanto detto nel *Paragrafo 2.2.3.2* circa il protocollo utilizzato per le prove di trazione monoassiale). Un ulteriore problema è stata la rumorosità della curva nel tratto a bassa pendenza (Figura 3.16, nello zoom). Di seguito viene descritto il metodo, schematizzato in Figura 3.16, che è stato utilizzato per risolvere il problema:

- i) Interpolare il tratto a bassa pendenza della curva σ - ε con una retta in modo da compensare l'elevata rumorosità che caratterizza i dati in quel tratto di curva.
- ii) Prolungare la retta interpolante dall'intercetta sulle ordinate fino a incontrare l'asse delle ascisse.
- iii) Noto l'off-set iniziale (a) e l'angolo α (dato dal coefficiente angolare della retta interpolante, ossia il modulo di Young a basse deformazioni E_{low}), ricavare il valore del tratto b (corrispondente al grado di deformazione applicato al campione in fase di pre-condizionamento).
- iv) Identificata la parte mancante della curva, traslare la curva verso destra di un valore pari a b in modo da far coincidere l'inizio della curva con l'origine del sistema di riferimento cartesiano considerato.
- v) Utilizzare il tratto a bassa pendenza ricavato per applicare il modello analitico tramite legge di Laplace.

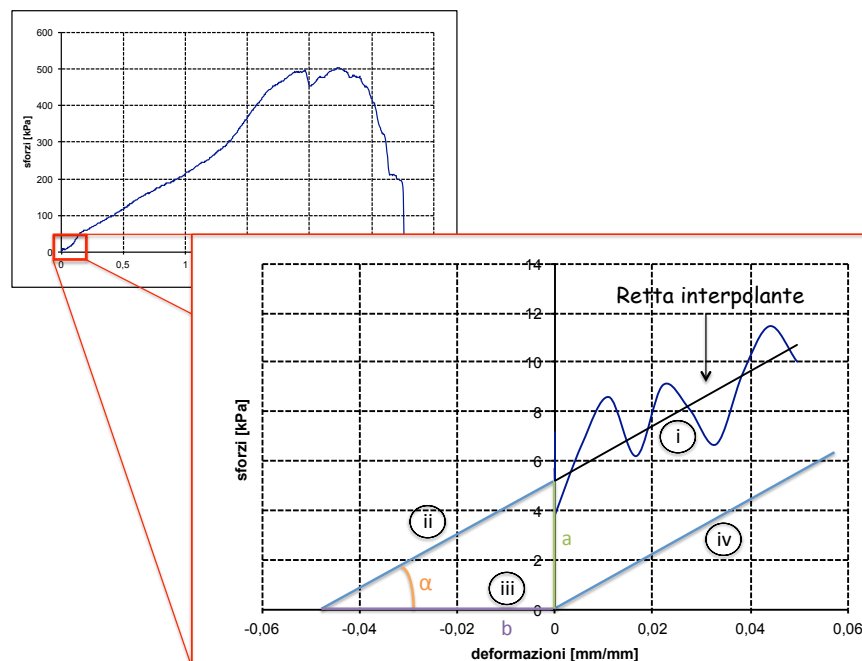


Figura 3.16: Rappresentazione dei vari passaggi svolti per identificare il tratto a bassa pendenza della curva σ - ε da utilizzare nella modellizzazione. A partire dalla curva σ - ε generica e priva di parte del tratto a bassa pendenza (in alto a sinistra): i) è stato considerato solo il tratto a bassa pendenza ed è stato interpolato con una retta; ii) la retta è stata prolungata fino a intercettare l'asse delle ascisse; iii) è stato calcolato il valore di b ; iv) il tratto a bassa pendenza completo è stato traslato a destra di un valore b tale da far coincidere il punto iniziale con l'origine degli assi cartesiani.

3.2.1.2 Modellizzazione computazionale dello stato di sollecitazione del patch di vescica nel bioreattore

Dopo aver identificato l'assunzione geometrica in riferimento alla legge di Laplace che meglio approssimi la geometria dell'organo durante il riempimento, è stato necessario definire un modo per identificare il valore di portata con cui perfondere il patch in fase di ricellularizzazione in modo da generare sulla matrice valori di σ ed ϵ corrispondenti ad una stimolazione fisiologica. La modellizzazione computazionale svolta tramite software Comsol© ha permesso di effettuare un'analisi *fluido-struttura*, in grado di simulare e caratterizzare le condizioni di perfusione (*fluido*) e la conseguente sollecitazione meccanica del patch di tessuto (*struttura*) all'interno del bioreattore, al fine di determinare le condizioni di lavoro del sistema di coltura in termini di portata. In particolare, la modellizzazione computazionale ha permesso di svolgere un'analisi di sensitività rispetto alle portate di ingresso alla camera, che prevede la variazione selettiva del valore di portata per valutare la risposta del patch in termini di sollecitazione meccanica indotta.

Oggetto della analisi computazionale sono stati l'housing del bioreattore e la cartuccia portasccaffold, di cui i modelli geometrici sono mostrati in Figura 3.17. I due componenti sono stati modellizzati con i materiali con cui sono realmente realizzati (PMMA per l'housing, silicone per la cartuccia), e di conseguenza con le proprietà di rigidità che li caratterizzano.

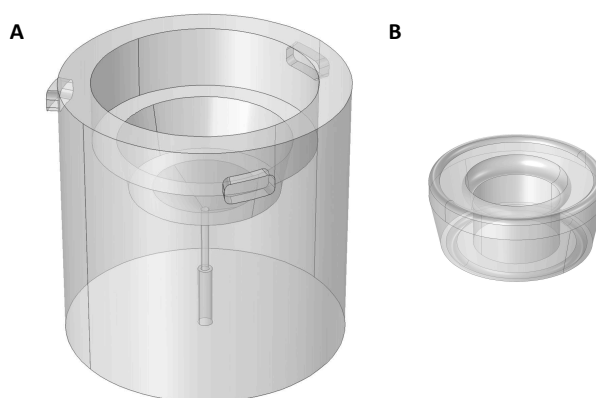


Figura 3.17: Modello geometrico dei singoli componenti utilizzati nelle simulazioni del sistema a perfusione per la sollecitazione meccanica del patch (A) e della cartuccia utilizzata per l'alloggiamento del patch (B).

La Figura 3.18 mostra la cartuccia siliconica inserita all'interno della sua sede nella camera di perfusione.



Figura 3.18: Modello geometrico assemblato utilizzato nelle simulazioni del sistema a perfusione per la sollecitazione meccanica del patch: la cartuccia viene mostrata (in rosso) all'interno dell'apposita sede all'interno della camera.

In Figura 3.19 è infine mostrato il patch di tessuto vincolato all'interno della cartuccia portasccaffold.

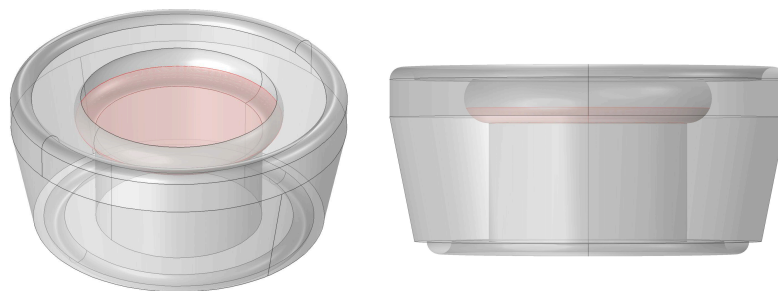


Figura 3.19: Modello geometrico del patch di tessuto (in rosa) vincolato all'interno dell'elemento di alloggiamento.

Come osservabile in Figura 3.19, il patch è stato modellizzato come un disco caratterizzato dalle seguenti dimensioni: i) diametro della superficie inferiore = 8 mm, ii) diametro della superficie superiore = 9.3 mm e iii) spessore: 0.60 mm (in sostanza, il modello geometrico realizzato corrisponde al profilo della cava che alloggia il patch nella cartuccia siliconica). Le dimensioni sono state assunte in base ai valori di spessore misurati sui campioni delle prove di trazione monoassiale (descritte nel *Paragrafo 2.2.3.2*). In particolare, lo spessore qui considerato corrisponde allo spessore medio di tutti i campioni testati con trazione monoassiale (pari a circa 0.60 mm). Le proprietà meccaniche del materiale che costituisce il patch sono state a loro volta ricavate dalle prove sperimentali di trazione monoassiale

(Modulo di Young, preso come valore medio degli E_{low} stimato per le vesciche native), oltre che da dati di letteratura (coefficiente di Poisson ν). I parametri assunti per il modello del patch sono:

- Modello costitutivo: materiale elastico lineare.
- Parametri meccanici del tessuto di vescica: $E = 0.025$ MPa, $\nu = 0.45$ [71].
- Densità del tessuto di vescica: 956 kg/m³ [71].

Le simulazioni sono state effettuate utilizzando la fisica del solutore numerico commerciale Comsol© che prende il nome di “*fluid-structure interaction*”. Questo approccio, dopo aver discretizzato il modello geometrico tramite un processo di *meshatura*, permette di modellizzare, tramite analisi agli elementi finiti, il comportamento fluidodinamico del flusso di un fluido in un condotto e il comportamento meccanico di una superficie deformabile vincolata alle sue estremità e investita dal flusso stesso. I dettagli relativi alle equazioni risolte dal solutore sono contenuti nell’*Appendice B* del presente lavoro di tesi.

Con riferimento alla Figura 3.20, le condizioni al contorno imposte per la risoluzione delle equazioni fluidodinamiche caratteristiche del processo di sollecitazione del patch sono le seguenti:

- Condizione di inlet: cinque portate considerate, pari a 1, 2, 3, 5 e 10 μ l/min (corrispondenti a velocità del fluido rispettivamente pari a circa 0.01, 0.02, 0.03, 0.05 e 0.11 mm/s)
- Condizione di outlet: pressione costante (pelo libero) pari a $P = P_{atmosferica}$.
- Condizione di vincolo della parete del patch: tra la superficie laterale del patch e il suo profilo di alloggiamento nella cartuccia portascaffold è stato imposto un vincolo di contatto (Figura 3.20, a destra), al fine di modellizzare il serraggio del patch nella cartuccia, come descritto nel *Paragrafo 3.1.1.1*. Tale condizione impedisce qualunque spostamento relativo della superficie laterale del patch in contatto con la cartuccia rispetto all’elemento stesso, modellizzando quindi il fissaggio del patch all’interno del portascaffold.
- Condizione di wall: sulle pareti della camera è stata imposta la condizione di assenza di scorrimento (no-slip).

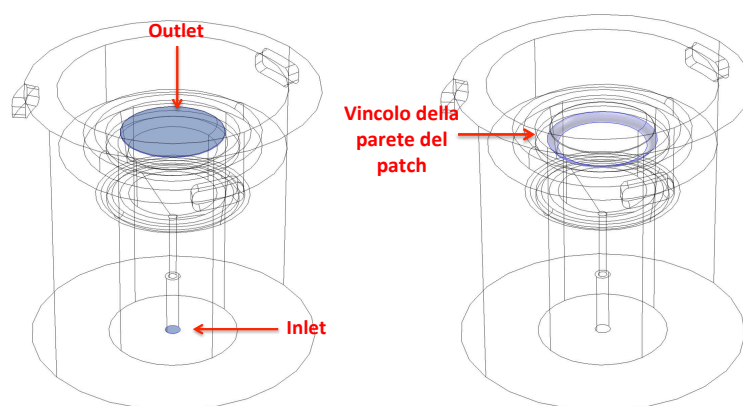


Figura 3.20: condizioni al contorno fluidodinamiche applicate al modello.

L'analisi fluidodinamica ha consentito inoltre di verificare che la configurazione di progetto della camera i) ottimizzasse la distribuzione delle linee di flusso durante la perfusione, al fine di garantire una sollecitazione omogenea ed uniforme dell'intera superficie del patch; ii) minimizzasse eventuali zone soggette a formazione di ristagno del fluido all'interno della camera di coltura.

Il fluido utilizzato nelle simulazioni è un fluido newtoniano, incomprimibile, con le proprietà reologiche dell'acqua.

È stato simulato un periodo temporale pari a 1800 s (30 minuti, in accordo con il tempo di riempimento del protocollo di sollecitazione descritto nel *Paragrafo 3.1.2*), con valore di time-step (ossia il campionamento temporale) pari a 1 s.

Le variabili tempo-dipendenti che sono state analizzate sono la velocità del fluido (con le rispettive linee di flusso), la caduta di pressione a cavallo del patch e i valori di sforzo e deformazione (calcolati secondo una distribuzione bidimensionale) che si sviluppano sul patch di vescica durante la sollecitazione. In particolare, mentre le velocità di flusso e la pressione sono state valutate rispetto a un sistema di riferimento cartesiano ortogonale, le due variabili meccaniche, vista la geometria assialsimmetrica del patch, sono state stimate rispetto ad un sistema di coordinate polari.

3.2.2 Collaudo e messa in opera del prototipo di sistema di coltura realizzato

3.2.2.1 Prove di tenuta idraulica

Per verificare l'efficacia del sistema di coltura, e in particolare del sistema di ancoraggio del patch nella cartuccia portascaffold, il collaudo ha previsto delle prove di tenuta

idraulica. Lo schema del set-up utilizzato per le prove di tenuta idraulica è mostrato in Figura 3.21:

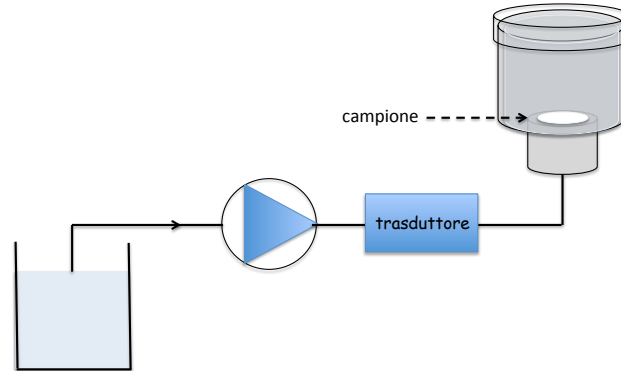


Figura 3.21: Schema del circuito per le prove di tenuta idraulica. Una portata d'acqua generata dalla pompa investe il patch deformandolo fino a rottura. Durante la prova un trasduttore di pressione monitora l'incremento del valore di pressione a cavallo del patch.

Il set-up è composto da:

- Una pompa volumetrica (323D, Watson-Marlow, USA) per immettere un flusso di liquido (acqua) all'interno della camera.
- Un trasduttore di pressione *flow-through* (Pendotech Press-S-000, PendoTECH, Princeton, NJ, USA) per monitorare il valore di pressione durante la prova.
- Il bioreattore progettato, con il portascaffold al suo interno contenente diversi materiali impermeabili (lattice, pellicola di polietilene, parafilm).

La prova di tenuta ha previsto la perfusione con acqua dei patch dei diversi materiali impermeabili fino a rottura a portata costante $Q=1$ ml/min. In caso di perdite o di fissaggio debole, il patch non raggiunge mai il punto di rottura. Se invece il sistema fa tenuta e non ci sono perdite, il patch arriva a rottura.

La pressione è stata inoltre monitorata per osservare eventuali cadute di pressione dovute a trafiletti di fluido dalla cartuccia portascaffold.

3.2.2.2 Prove di verifica del mantenimento della sterilità

Per la messa in opera del sistema di coltura, la camera è stata preliminarmente sottoposta a test di verifica del mantenimento della sterilità, per accertare che in condizioni di sollecitazione del patch la sterilità sia mantenuta all'interno del sistema di coltura. In

Figura 3.22 è mostrato il sistema per la perfusione del patch di vescica decellularizzato su cui eseguire il test di verifica del mantenimento della sterilità.

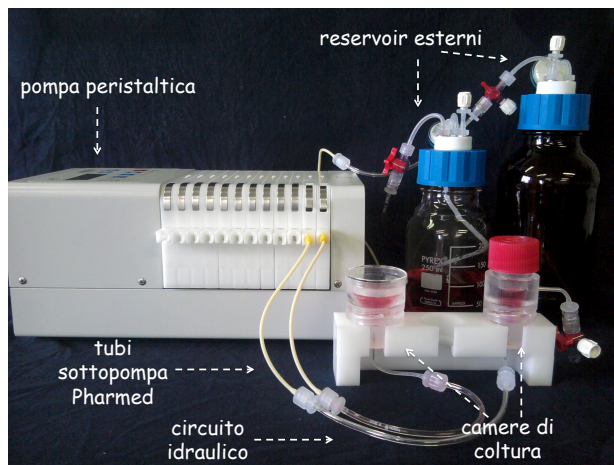


Figura 3.22: Sistema di perfusione del patch di tessuto decellularizzato assemblato.

Il sistema per la verifica del mantenimento della sterilità del bioreattore in condizioni di perfusione del patch è composto da:

- Una pompa peristaltica (IPC-12, Ismatec, Wertheim-Mondfeld, Germania) per la perfusione del medium.
- Il bioreattore originale e il bioreattore modificato, descritti in questo capitolo, nei quali è stata alloggiata la cartuccia modificata;
- Due reservoiri esterni contenenti il medium di coltura (bottiglia vetro Pyrex con tappo forato in Teflon), uno per ciascuna camera;
- Due filtri HEPA (uno per ogni reservoir esterno) per modellizzare l'ossigenazione del medium mantenendo la sterilità;
- Due patch di tessuto: per il test di sterilità è stata utilizzata una porzione di guanto sterile;
- Il circuito idraulico per la perfusione, composto da tubi sottopompa Pharmed (Carlo Erba Reagenti, Arese, Italia) e da tubi in silicone (Tygon Platinum Cured, Saint-Gobain, Courbevoie, France);
- Connettori luer-portagomma su cui sono calzati i tubi del circuito idraulico (materiale: Polipropilene);

- Rubinetti a tre vie sterili utilizzati come porte di accesso del circuito per riempimento delle camere e i prelievi del mezzo di coltura per le analisi microbiologiche;

Durante il test, ciascuna camera è stata connessa ad un circuito di perfusione (reservoir esterni, tubi e connettori) indipendente, in modo da evitare fenomeni di cross-contaminazione tra i due sistemi. La prova condotta sul bioreattore originale identifica il controllo rispetto a cui verificare il comportamento in termini di mantenimento della sterilità del coperchio Petri del bioreattore modificato. Lo schema del circuito idraulico utilizzato durante le prove di mantenimento della sterilità è presentato in Figura 3.23:

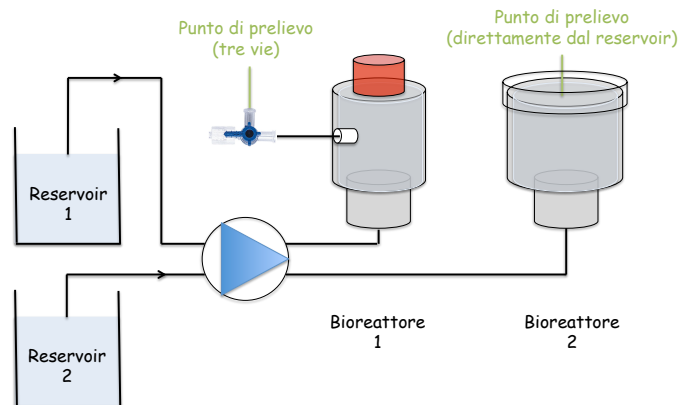


Figura 3.23: Schema del set-up sperimentale utilizzato per le prove di verifica del mantenimento della sterilità. A ciascun prototipo di bioreattore è stato associato un reservoir esterno differente, in modo da evitare fenomeni di cross-contaminazione. In verde sono indicati i punti di prelievo del medium per l'analisi microbiologica per entrambe le camere: per il bioreattore 1 il prelievo avviene lateralmente tramite un rubinetto a tre vie (collegato ad un connettore in acciaio). Per il bioreattore 2 il prelievo avviene direttamente dal reservoir interno della camera, aprendo il coperchio.

Le fasi operative del test di verifica del mantenimento della sterilità, condotte presso il Laboratorio di Colture Cellulari del Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie dell'Università degli Studi di Milano, sono riassunte nel seguente elenco:

- i) Lavaggio dei componenti del sistema con agenti chimici decontaminanti e successivi risciacqui con acqua distillata.
- ii) Sterilizzazione per i vari componenti del circuito con plasma di perossido di idrogeno (sistema di sterilizzazione *Sterrad*) o in autoclave.
- iii) Assemblaggio dei componenti sterili sotto cappa, con conseguente allestimento del circuito idraulico.

- iv) Riempimento dei due reservoir esterni con medium di coltura
- v) Riempimento del circuito col mezzo di coltura: il riempimento avviene manualmente per mezzo di una siringa sterile, sotto cappa, prelevando medium dai reservoir esterni.
- vi) Inserimento del patch all'interno delle cartucce portascaffold, seguito dall'inserimento della cartuccia nell'housing delle camera di coltura.
- vii) Chiusura delle camere con i rispettivi reservoir interni e riempimento dei reservoir interni. Il riempimento avviene sempre tramite siringa sterile.
- viii) Chiusura dei reservoir interni della camera con coperchio Petri e tappo Flask.
- ix) Messa in funzione del sistema di sollecitazione dei patch sotto cappa per 5 ore.
- x) Trasferimento del sistema dalla cappa all'incubatore, e messa in funzione per 7 giorni.

In dettaglio, le diverse fasi della prova di mantenimento della sterilità del bioreattore in condizioni di perfusione del patch sono state:

- **Lavaggio:** ogni componente del sistema, completamente disassemblato, è stato decontaminato per immersione in detergente antibatterico commerciale per quanto riguarda le due camere in PMMA, in soluzione di etanolo 70% per i tubi ed i connettori (durata pari a circa 20 minuti). Le due camere sono state decontaminate con l'ausilio di una spazzola per rimuovere le impurità sia internamente sia esternamente. Dopo la decontaminazione, i componenti del sistema sono stati accuratamente lavati e risciacquati (internamente ed esternamente) con acqua distillata. I vari componenti sono stati poi mantenuti per un breve periodo di tempo sotto cappa per l'asciugatura (circa 10 minuti). Lo scopo delle operazioni di lavaggio è quello di pulire da sostanze inorganiche e di diminuire la carica batterica iniziale presente in tutti i componenti del sistema di coltura.
- **Sterilizzazione:** sono state preparate le buste per la sterilizzazione delle componenti del circuito. Le tecniche di sterilizzazione adottate sono differenti in funzione del tipo di materiale del componente da sterilizzare. Tutti i componenti del circuito (eccetto i tubi sottopompa e il tubo di prelievo di medium nei reservoir esterni), le cartucce portascaffold e la strumentazione (forbici e pinze in metallo) sono stati sterilizzati in autoclave; i due bioreattori, gli elementi per il fissaggio del patch, gli o-ring e i tubi sottopompa, avendo temperature di transizione vetrosa prossime ai 121° raggiunti

dalla sterilizzazione in autoclave, sono stati sterilizzati con plasma di perossido di idrogeno (sistema di sterilizzazione *Sterrad*). Le buste sono state organizzate in modo da separare le componenti dei due differenti circuiti, al fine di evitare cross-contaminazione (l'organizzazione delle buste è descritta nell'*Appendice C* di questo lavoro di tesi). Le siringhe, i filtri HEPA, il guanto da cui ritagliare il patch circolare e i connettori 3-vie erano monouso e quindi disponibili sterili.

- **Assemblaggio e riempimento sotto cappa:** Una volta terminata la sterilizzazione, il sistema è stato assemblato sotto cappa e riempito attraverso siringa sterile con il mezzo di coltura *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, (*DMEM*) (Sigma Aldrich®). Al medium non sono stati aggiunti antibiotici perché ciò che interessava osservare da queste prove era l'eventuale presenza di infiltrati batterici nel sistema. Le manovre di assemblaggio sono descritte nel dettaglio nell'*Appendice C* di questo lavoro di tesi. Il circuito assemblato sotto cappa e riempito di medium è mostrato in Figura 3.24:

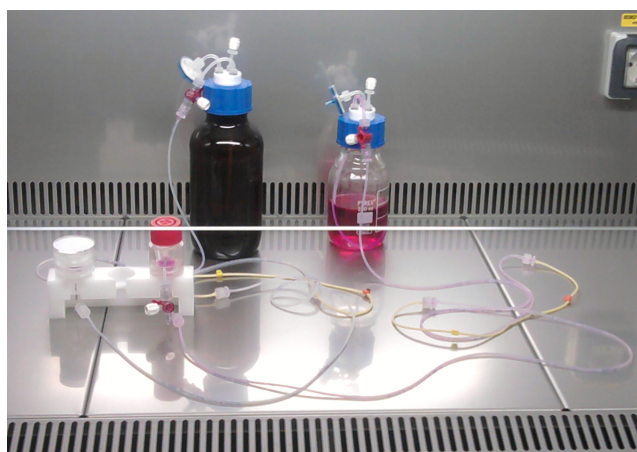


Figura 3.24: Circuito assemblato sotto cappa e riempito di medium.

Per il riempimento sono stati utilizzati i connettori a tre vie appositamente posti a valle dei reservoir esterni (Figura 3.24). Ciascuna camera, connessa ad un circuito idraulico indipendente, è stata riempita con una apposita siringa sterile. In seguito, il sistema assemblato e riempito di mezzo è stato poi collegato alla pompa peristaltica per dare inizio a una fase di perfusione dinamica del patch sotto cappa della durata di 5 ore.

- **Incubazione:** Dopo aver interrotto la stimolazione, il sistema è stato trasferito all'interno dell'incubatore, posto nuovamente in attività e incubato a 37°C per 7 giorni, come mostrato in Figura 3.25:

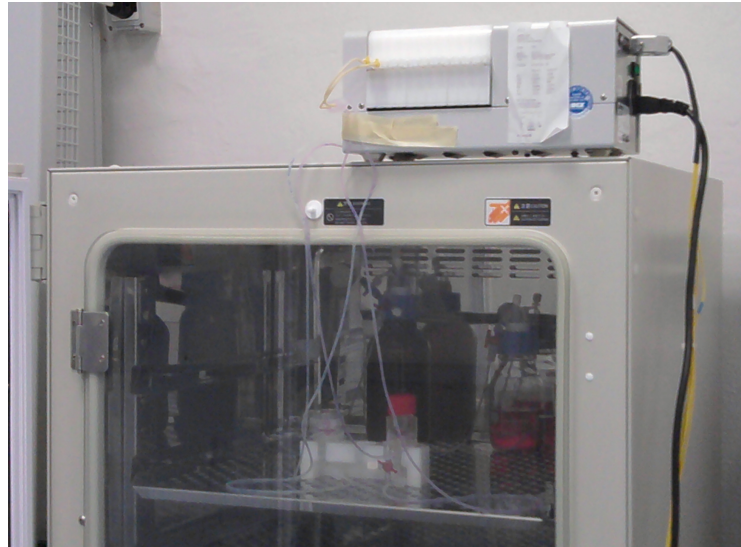


Figura 3.25: Circuito idraulico in attività posto all'interno dell'incubatore.

La verifica di mantenimento della sterilità è stata effettuata attraverso test microbiologici su campioni di medium prelevati ad intervalli di tempo prestabiliti. In particolare:

- 1 ml direttamente dal contenitore del mezzo, quindi prima del suo inserimento nel sistema di coltura, per verificare che il mezzo non fosse contaminato a priori.
- 1 ml al tempo zero, ovvero dopo aver inserito il mezzo all'interno del sistema di coltura e averlo lasciato *in situ* per qualche minuto. I prelievi sono stati fatti sia dalle camere di coltura, sia dai reservoir esterni.
- 1 ml dopo 5 ore a partire dal tempo zero di attività sotto cappa. I prelievi sono stati effettuati dalle camere di coltura.
- 1 ml dopo 7 giorni in incubatore. I prelievi sono stati fatti sia dalle camere di coltura, sia dai reservoir esterni.

Il prelievo effettuato dopo 5 ore di attività del sistema sotto cappa è stato effettuato: i) per verificare che rispetto al tempo zero la messa in attività del sistema non comportasse una contaminazione in ambiente sterile e ii) per poter avere un termine di paragone per il prelievo effettuato dopo 7 giorni di attività in incubatore, in quanto entrambi i campioni di medium sono stati prelevati in seguito a un periodo di attività del sistema di coltura.

Per i prelievi delle aliquote di medium sono state utilizzate siringhe sterili da 2 ml. I prelievi si sono verificati sotto cappa: attraverso siringa sterile connessa al connettore luer posto sulla superficie laterale della camera, nel caso della prima camera; per aspirazione

del medium presente nel reservoir della camera, rimuovendo manualmente il tappo Petri, nel caso della seconda camera (Figura 3.23).

Al giorno 3, al fine di simulare la fase di cambio del mezzo durante una coltura cellulare, è stato prelevato 1 ml di medium da ciascun reservoir interno delle camere ed è stato immesso nel sistema 1 ml di medium fresco.

I vari campioni di medium prelevati sono stati seminati in terreno tioglicolato, terreno di arricchimento liquido, universale, utilizzato per i test di sterilità e per l'isolamento e la coltura di batteri aerobi, anaerobi e di miceti.

L'obiettivo principale del test consiste nel valutare l'efficacia del sistema di chiusura della camera modificata (coperchio Petri), in confronto al controllo definito dal tappo Flask della camera originale, in termini di mantenimento della sterilità del fluido di perfusione (medium di coltura). In particolare, la perfusione genera una deformazione meccanica del patch che a sua volta è responsabile di una movimentazione del fluido all'interno del reservoir interno, possibile fonte di infiltrazione di batteri presenti nell'incubatore all'interno della camera, soprattutto durante la fase in cui viene rilasciata la deformazione applicata. Il protocollo utilizzato per sollecitare il patch segue la forma d'onda di perfusione mostrata in Figura 3.13, con alcune modifiche dovute sia al fatto che questa è una prova di mantenimento della sterilità (e quindi deve utilizzare condizioni di lavoro più gravose per definire un margine di sicurezza per il mantenimento della sterilità dello scaffold all'interno della camera in esercizio durante la fase di ricellularizzazione), sia al fatto che la sollecitazione non viene effettuata su patch decellularizzato di vescica, ma su patch di guanto in lattice (e quindi totalmente impermeabile e con proprietà meccaniche differenti). Il protocollo definito per la fase di verifica di mantenimento della sterilità prevede dunque di eseguire:

- Una fase di perfusione, ovvero di sollecitazione meccanica del patch: la pompa infonde il fluido dal reservoir esterno all'interno della camera nell'housing; in questa fase la perfusione ha una durata di 30 minuti e la portata (Q) è pari a 25 $\mu\text{l}/\text{min}$; Il valore di 25 $\mu\text{l}/\text{min}$ è stato definito a partire dall'osservazione in fase di sollecitazione dello spostamento verticale del patch nel suo punto centrale. In particolare, lo spostamento del punto centrale del patch in lattice ottenuto con la portata scelta è superiore di circa 5 volte a quello del patch di vescica

decellularizzata sollecitato in maniera fisiologica (ricavato tramite analisi computazionale e mostrato nel *Capitolo 4*).

- Una fase di rimozione della sollecitazione indotta sul patch: la pompa inverte il verso di rotazione aspirando il fluido precedentemente infuso nella camera e riversandolo nel reservoir esterno; in questa fase il patch recupera dalla deformazione precedentemente indotta dalla perfusione; in questo caso $Q = 250 \mu\text{l}/\text{min}$, $t = 3\text{min}$.
- Una fase di resting durante la quale la pompa è ferma, il fluido non viene movimentato e il patch è scarico, di durata pari a 2 min. L'inversione del verso di rotazione della pompa e la fase di resting (pompa ferma) sono effettuate attraverso controllo remoto tramite software.

CAPITOLO 4

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nel seguente capitolo saranno presentati e discussi tutti i risultati ottenuti nell'ambito del presente lavoro di tesi sia per quanto riguarda il processo di decellularizzazione e caratterizzazione della matrice decellularizzata (*Paragrafo 4.1*), sia per quanto riguarda la progettazione e la realizzazione del sistema di coltura in condizioni di perfusione e sollecitazione meccanica del patch. Inoltre saranno riportati i risultati del modello analitico e dell'analisi computazionale sviluppati per definire le condizioni di lavoro per la sollecitazione fisiologica del patch all'interno del bioreattore (*Paragrafo 4.2*). La presentazione dei risultati seguirà il percorso cronologico introdotto nei *Capitoli 2 e 3*.

4.1 Processo di decellularizzazione dell'organo intero di vescica

4.1.1 Protocollo di decellularizzazione

Come già evidenziato nei capitoli precedenti, il processo di decellularizzazione ha come scopo la rimozione del contenuto cellulare e nucleico presente nel tessuto nativo, insieme al mantenimento dell'organizzazione strutturale e delle proprietà meccaniche della matrice extracellulare. Il protocollo utilizzato in fase di decellularizzazione ha previsto una sollecitazione dinamica ciclica della vescica attraverso lavaggi successivi in soluzione ipotonica (acqua deionizzata) e con agenti non ionici (Triton X-100 e NH_4OH). Approcci simili, di cui è stata evidenziata l'efficacia, sono stati descritti in precedenza in processi di decellularizzazione di fegato, rene, pancreas e intestino di varie specie animali e di varie dimensioni [6, 72]. L'approccio dinamico qui presentato si è dimostrato efficace nel rimuovere le cellule presenti all'interno del tessuto dell'organo con significativa riduzione della durata del trattamento, rispetto agli approcci statici (assenza di perfusione) tipicamente utilizzati in letteratura [11, 12, 46]. Inoltre, rispetto ad alcuni lavori presenti in letteratura [12, 44, 45], il protocollo di decellularizzazione non ha previsto delaminazione meccanica chirurgica del tessuto prima del trattamento; in letteratura, è descritto come la delaminazione venga utilizzata nei processi di decellularizzazione per rimuovere lo strato uroteliale, ossia la barriera impermeabile della vescica, così da facilitare la rimozione delle cellule presenti negli strati più interni del tessuto e da ridurre la durata del processo [12].

L'assenza di delaminazione e una durata contenuta mostrano dunque l'efficacia del protocollo di decellularizzazione qui descritto. Inoltre, l'utilizzo di organo intero intatto consente, a valle della ricellularizzazione dello scaffold acellulare, di ottenere un patch di tessuto che preservi interamente la struttura dei vari strati della ECM dell'organo trattato. Al termine della decellularizzazione, la vescica macroscopicamente appare come mostrato in Figura 4.1.



Figura 4.1: Confronto fra vescica nativa (a sinistra) e vescica decellularizzata per via dinamica (a destra).

Come si osserva in Figura 4.1, la vescica decellularizzata (BAM) appare bianca in quanto le cellule che ne facevano parte e che conferivano il colore rosato tipico (Figura 4.1 a sinistra) sono state rimosse. Allo stesso tempo può essere osservato un notevole incremento delle dimensioni dell'organo in seguito al processo di decellularizzazione. I dettagli di questa osservazione verranno descritti più avanti all'interno del presente capitolo (*Paragrafo 4.1.2.1*).

La caratterizzazione dell'organo decellularizzato ha previsto lo svolgimento di analisi istologiche, per verificare la presenza di eventuali nuclei residui e l'integrità della matrice, e prove per caratterizzare meccanicamente il tessuto decellularizzato, in modo da valutare eventuali differenze del comportamento meccanico della BAM rispetto al tessuto nativo.

Il confronto fra matrici decellularizzate per via statica e per via dinamica ha permesso inoltre di investigare in maniera selettiva gli effetti dell'azione dei detergenti decellularizzanti e della distensione meccanica ciclica applicata all'organo durante la decellularizzazione, in modo da discriminare le potenziali differenze attribuibili all'ambiente chimico (agenti decellularizzanti) o all'applicazione ripetuta della distensione meccanica.

4.1.2 Caratterizzazione della matrice decellularizzata

4.1.2.1 Analisi istologica

L'analisi istologica si è focalizzata principalmente su tre colorazioni:

- *H&E*, per osservare l'eventuale presenza di nuclei all'interno della matrice.
- Colorazione *tricromica di Mallory*, per identificare l'organizzazione delle fibre di collagene all'interno del tessuto connettivo e la presenza di cellule muscolari.
- Colorazione con *Orceina*, per verificare la presenza e l'orientamento delle fibre elastiche all'interno della ECM in seguito al processo di decellularizzazione.

In Figura 4.2 sono mostrati i risultati dell'analisi istologica tramite *H&E* dei campioni di tessuto nativo e di tessuto decellularizzato, trattati con i diversi protocolli descritti nel *Capitolo 2* e riassunti in Tabella 2.1.

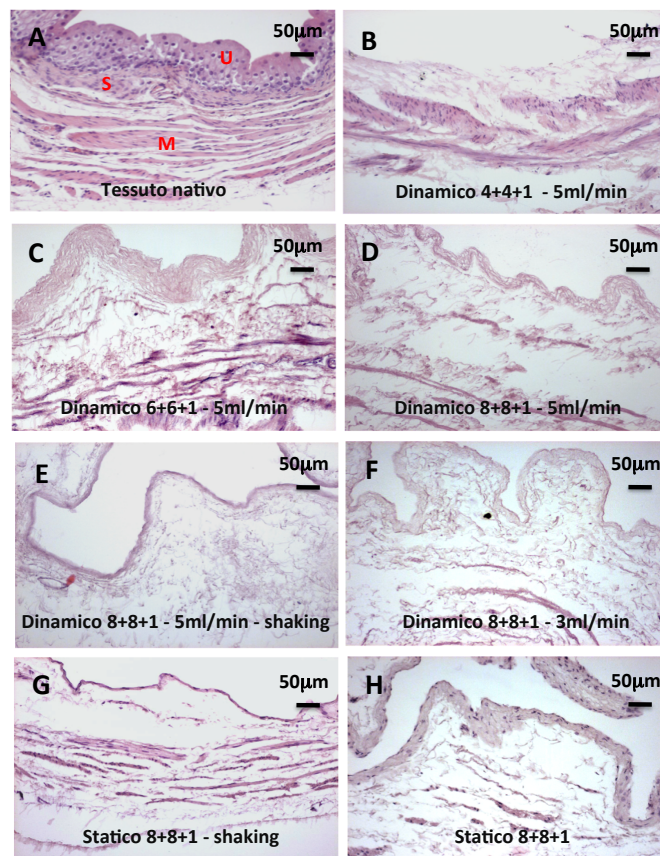


Figura 4.2: Analisi istologica di campioni di tessuto di vescica: la colorazione con *H&E* consente di visualizzare in blu i nuclei cellulari all'interno del tessuto ed in rosa le strutture proteiche costituenti la ECM; le immagini mostrano l'aspetto del tessuto nativo (A) che mostra lo strato uroteliale (U), la submucosa (S) e lo strato muscolare (M); l'aspetto del tessuto decellularizzato per via dinamica con i protocolli 4+4+1 a 5 ml/min (B), 6+6+1 a 5 ml/min (C), 8+8+1 a 5 ml/min senza (D) e con shaking (E), 8+8+1 a 3 ml/min (F); l'aspetto del tessuto decellularizzato per via statica con (G) o senza shaking orbitale (H).

Come si può osservare in Figura 4.2A, l'istologia del tessuto nativo mostra uno strato uroteliale superficiale (U in Figura 2.4A), uno strato che identifica la submucosa (S in Figura 2.4A) e la presenza nello strato sottostante di fasci muscolari (M in Figura 2.4A). In ciascuno strato, è ben visibile la presenza di nuclei cellulari. Il confronto delle istologie dei tessuti decellularizzati con quella del tessuto nativo permette di raggiungere delle conclusioni di tipo qualitativo sull'efficacia del processo di decellularizzazione. In particolare, dai risultati dell'analisi istologica si possono ricavare le seguenti osservazioni:

- I trattamenti 4+4+1 (Figura 4.2B) e 6+6+1 (Figura 4.2C) non sono in grado di rimuovere totalmente le componenti cellulari presenti nella parete della vescica (i nuclei blu infatti sono abbondantemente presenti in entrambe le istologie, soprattutto a livello delle fibre muscolari).
- Il protocollo 8+8+1 con portata di perfusione pari a 5 ml/min (Figura 4.2D) riesce a rimuovere la parte cellulare del tessuto in maniera efficace.
- A parità di durata del trattamento (protocollo 8+8+1), il tessuto decellularizzato con la portata di riempimento di 3 ml/min (Figura 4.2F) mostra la presenza di nuclei cellulari residui, assenti invece con la perfusione a 5 ml/min.
- Il protocollo 8+8+1 dinamico (Figura 4.2D) è più efficace del protocollo statico, sia in presenza (Figura 4.2G) sia in assenza (Figura 4.2H) di shaking orbitale, in termini di rimozione cellulare. Si può osservare infatti come alla fine di entrambi i processi statici di decellularizzazione i nuclei cellulari siano presenti sia a livello uroteliale, sia a livello delle fibre muscolari.
- L'utilizzo dello shaking orbitale (Figura 4.2E) associato al trattamento dinamico compromette fortemente l'integrità della struttura della parete dell'organo, in quanto, come si vede dall'immagine, viene seriamente alterata la stratigrafia delle fibre che costituiscono i fasci muscolari della parete rispetto al caso nativo.

Alla luce di queste considerazioni, il protocollo migliore per la decellularizzazione delle vesciche è risultato il protocollo 8+8+1 dinamico, con portata di riempimento pari a 5 ml/min e senza l'utilizzo dello shaking orbitale.

Inoltre, l'analisi H&E rivela una parziale degradazione dell'urotelio rispetto al caso nativo e un'alterazione della stratigrafia del tessuto della matrice in seguito a processo di decellularizzazione (Figura 4.2D, H). La perdita parziale della stratigrafia del tessuto è principalmente dovuta alla rimozione delle cellule che, nell'organo nativo, mantengono tra

loro impaccati i fasci di fibre costituenti la matrice. Ciò comporta un conseguente aumento dello spazio inter-fibrillare, che a sua volta spiega l'aumento delle dimensioni dell'organo osservate al termine del processo di decellularizzazione (Fig. 4.1). Questo effetto però si può osservare non solo nelle matrici trattate con il protocollo dinamico, ma anche in quelle decellularizzate per via statica. Ciò dunque implica che si tratti di un effetto dovuto agli agenti chimici utilizzati per rimuovere le cellule, e non correlato alla distensione ciclica applicata nel protocollo di decellularizzazione dinamico.

In Figura 4.3 sono presentati i risultati della colorazione istologica tramite *Tricromia di Mallory* e *Orceina*.

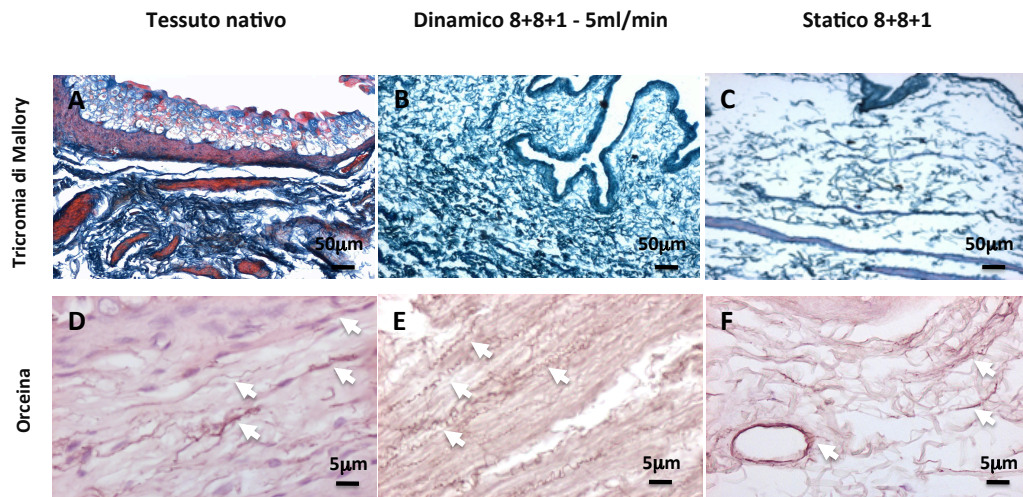


Figura 4.3: Istologie ottenute con colorazione *tricromica di Mallory* (A, B, C) e *Orceina* (D, E, F) rispettivamente per il tessuto nativo, il tessuto decellularizzato per via dinamica e il tessuto incubato staticamente. Sono stati analizzati solo i tessuti decellularizzati con il protocollo 8+8+1 perfusi a 5 ml/min. Le frecce bianche nelle colorazioni con Orceina identificano le fibre elastiche più visibili. Nell'immagine (F) è possibile osservare la presenza di un vaso.

Dalle immagini di Figura 4.3 appare che il protocollo dinamico sia più efficace nel mantenimento della organizzazione delle fibre di collagene rispetto al caso statico (Fig. 4B, C). Ciò è spiegabile dal fatto che fisiologicamente la vescica è un organo non votato a mantenere grandi volumi di urina accumulati al suo interno per lunghi intervalli di tempo; dunque, quando grandi volumi di fluido vengono mantenuti a lungo all'interno dell'organo (caso statico), la vescica subisce sollecitazioni non fisiologiche, che causano una maggiore degradazione dei fasci di fibre di collagene.

Infine, la colorazione tramite *Orceina* dimostra che l'integrità e la distribuzione delle fibre elastiche costituenti il tessuto sono ben preservate sia nel tessuto ottenuto per via dinamica sia nel tessuto incubato staticamente (Fig. 4.3E, F).

A valle di questa analisi, si può quindi concludere che la perfusione dell'organo intero prevista dal protocollo di decellularizzazione dinamica risulta essere più vantaggiosa sia in termini di rimozione cellulare sia in termini di mantenimento della sovrastruttura della matrice acellulare rispetto all'incubazione statica.

4.1.2.2 Analisi del contenuto di DNA e RNA

I risultati delle analisi del contenuto residuo di DNA e RNA all'interno degli organi decellularizzati con il protocollo dinamico 8+8+1 a 5 ml/min sono mostrati in Figura 4.4 e confrontati con il caso statico (incubazione 8+8+1).

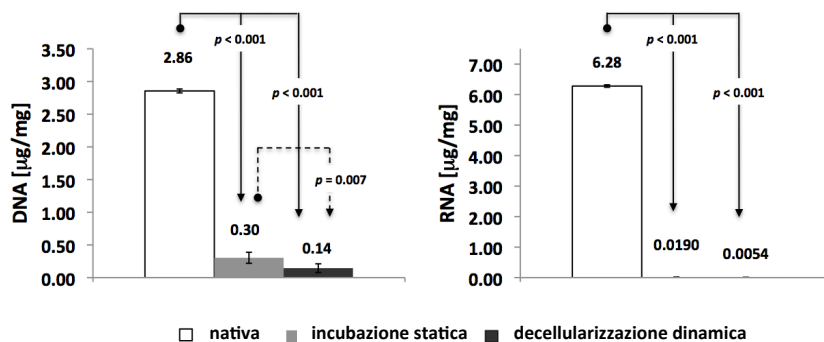


Figura 4.4: Analisi del contenuto residuo di DNA (a sinistra) e di RNA (a destra) nei campioni di tessuto di vescica nativa, decellularizzata tramite incubazione statica e decellularizzata per via dinamica. I dati sono espressi come media \pm deviazione standard in μg per mg di peso secco. In figura, le frecce indicano la presenza di differenze statisticamente significative (p -value < 0.001) fra la colonna di partenza e la colonna di arrivo (dove c'è la punta della freccia). Le frecce sono a linea continua nel confronto fra tessuto nativo e tessuto decellularizzato, sono a linea tratteggiata nel confronto fra le vesciche decellularizzate con i due metodi differenti. Per tutti i gruppi, $n=4$.

Come si può osservare in Figura 4.4, i risultati quantitativi confermano le osservazioni qualitative ricavate dall'analisi istologica. In particolare, entrambi i processi di decellularizzazione sono in grado di ridurre in maniera statisticamente significativa il contenuto di DNA ed RNA rispetto al tessuto nativo (p -value < 0.001). Il protocollo di decellularizzazione dinamica però ha un'efficacia significativamente maggiore nella rimozione del contenuto di DNA rispetto all'approccio statico (p -value < 0.01) e, sebbene

non statisticamente significativa, anche nella rimozione del contenuto di RNA (p-value = 0.588). Il contenuto di DNA è stato ridotto del 95.04% con il trattamento di decellularizzazione dinamica, mentre per via statica si ha una riduzione dell'89.38%. L'efficacia di rimozione dell'RNA è del 99.91% nel caso dinamico contro il 99.70% nel caso statico.

Il confronto con i dati di letteratura riguardo al contenuto residuo di DNA in seguito a decellularizzazione del tessuto della vescica mostra risultati simili a quelli presentati in questo lavoro. In particolare, *Rosario et al.* [41] ottengono in seguito a decellularizzazione una rimozione di DNA pari al 95%; *Bolland et al.* [11] e *Farhat et al.* [73] invece raggiungono un valore pari al 96%. I valori riportati per i tre studi di letteratura citati però sono stati raggiunti con agenti aggressivi come l'*SDS* e le *nucleasi*, che alterano le proprietà meccaniche della ECM, e con durate pari rispettivamente a 24 h, 48 h e 72 h. Il protocollo dinamico proposto nell'ambito di questo lavoro è quindi in grado di rimuovere il DNA presente nel tessuto con agenti meno aggressivi e con significativa riduzione dei tempi di trattamento. Nello studio di *Yang et al.* [12], in seguito al processo di decellularizzazione di un organo intero incubato in condizioni statiche, viene riportata la totale assenza di DNA all'interno della matrice decellularizzata. Anche questo risultato però è stato raggiunto con agenti decellularizzanti fortemente aggressivi quali la *tripsina* e le *nucleasi* e dopo 38 ore di incubazione dell'organo. Inoltre, lo studio non ha eseguito una caratterizzazione meccanica del tessuto decellularizzato ottenuto, perciò non è possibile valutare l'effettiva efficacia del trattamento in termini di mantenimento delle proprietà meccaniche del tessuto a valle della decellularizzazione.

Il lavori di letteratura riguardanti la decellularizzazione di altri organi mostrano una percentuale di efficacia di rimozione del DNA che mediamente si assesta attorno al 97%. Valori di riduzione del DNA attorno al 97% sono stati ottenuti per il rene [72], il fegato [6], il cuore [5], i polmoni [10] e l'esofago [7]. Il valore leggermente superiore rispetto a quello ottenuto in questo lavoro di tesi è probabilmente dovuto a diversi fattori, tra cui ad esempio la durata del processo di decellularizzazione molto più elevata (da 48 [6, 72] a 72 ore [7] di trattamento), l'utilizzo di agenti decellularizzanti diversi, come l'*SDS* o la *tripsina*, più efficaci nella rimozione cellulare del *Triton X-100* ma più aggressivi nei confronti della ECM [5], e infine la natura del tessuto dell'organo trattato: ad esempio esofago, polmone, rene e fegato non hanno una componente muscolare in cui le fibre sono

molto impaccate, quindi la rimozione delle cellule risulta meno difficoltosa rispetto al caso del tessuto urovescicale.

4.1.2.3 Prova di cistometria

La Figura 4.5 mostra una curva di cistometria acquisita su campione di vescica nativa di coniglio.

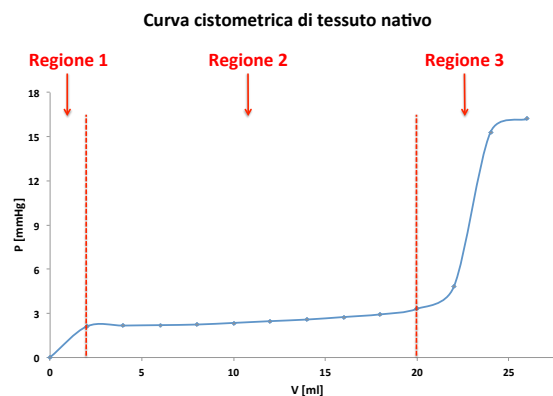


Figura 4.5: Curva cistometrica acquisita su vescica di coniglio prima del trattamento di decellularizzazione. Il volume di *overstretching*, ovvero la capacità massima fisiologica della vescica di coniglio, è a circa 20 ml.

La relazione pressione-volume rappresentata in Figura 4.5 è contraddistinta da tre diverse regioni:

- i) Una prima regione ($0 \text{ ml} < V < 2 \text{ ml}$) in cui si osserva un immediato aumento della pressione intravescicale a seguito dell'infusione di piccoli volumi di fluido.
- ii) Una seconda regione ($2 \text{ ml} < V < 20 \text{ ml}$) in cui si osserva un lieve incremento della pressione a fronte di un elevato aumento del volume interno alla vescica.
- iii) Una terza regione ($V > 20 \text{ ml}$) in cui un successivo incremento del volume genera un brusco e consistente innalzamento del valore di pressione.

Mentre le prime due regioni della curva rappresentano la fase di immagazzinamento dell'urina da parte dell'organo *in vivo* (capacità della vescica di immagazzinare grandi volumi di fluido a fronte di piccole variazioni della pressione), il brusco innalzamento della pressione osservato nell'ultima regione è del tutto non fisiologico (non osservabile *in vivo* in condizioni di normale esercizio dell'organo) e conseguenza del fatto che durante il test di cistometria la vescica non può svuotarsi autonomamente (gli ureteri vengono suturati e l'uretra utilizzata come canale per la perfusione): il valore di volume raggiunto al

gomito (circa 20 ml) rappresenta, infatti, il volume di *overstretching*, ossia il valore soglia di volume interno dell'organo oltre al quale si innesca lo svuotamento fisiologico della vescica; durante le prova, non potendo svuotarsi, l'organo risponde con un innalzamento repentino della pressione interna.

Sulla base di questa analisi è stato possibile identificare dunque un valore di capacità dell'organo testato nell'ordine dei 20 ml. Tale valore è stato utilizzato come valore limite del volume di riempimento della vescica sia per i test cistometrici effettuati sulle vesciche native, sia per la definizione del volume massimo da infondere nell'organo durante le campagne sperimentali di decellularizzazione con protocollo dinamico (in riferimento a quanto discusso precedentemente nel *Paragrafo 4.1.2.1*). In questo modo non vengono sovrastolate le strutture proteiche della ECM della parete dell'organo, evitando così di compromettere le proprietà meccaniche del tessuto della vescica trattata con protocollo di decellularizzazione dinamico.

La Figura 4.6 mostra le curve cistometriche fino a 20 ml ottenute per le vesciche native.

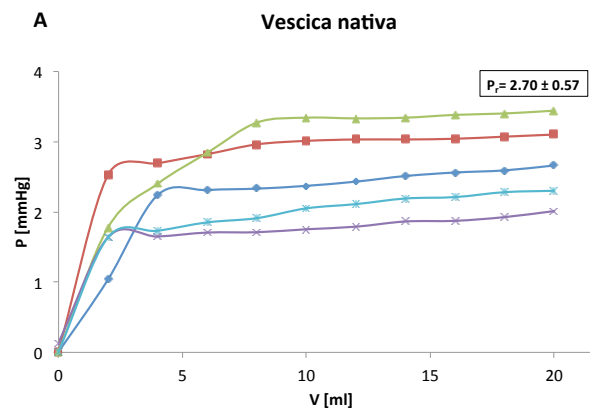


Figura 4.6: Curve cistometriche ottenute per vesciche native ($n=5$) con un riempimento fino a 20 ml (volume di *overstretching*). Il valore di pressione massima di riempimento (P_r) calcolato per le 5 curve viene riportato come valore medio \pm deviazione standard.

Come si può osservare nella Figura 4.6, la pressione massima che caratterizza il riempimento fisiologico della vescica nativa di coniglio (P_r , come definito nel *Paragrafo 3.1.2*) è circa 3 mmHg (2.70 ± 0.57 mmHg). Tale valore è stato considerato per definire le condizioni di lavoro da applicare al sistema di coltura dinamico in modo da ottenere una sollecitazione fisiologica sul patch di vescica (*Paragrafi 4.2.1.1 e 4.2.1.2*).

La Figura 4.7 mostra le curve cistometriche ottenute infondendo volumi superiori al volume di overstretching per le vesciche decellularizzate con il protocollo dinamico e con il protocollo statico, entrambe confrontate con la curva cistometrica media nativa.

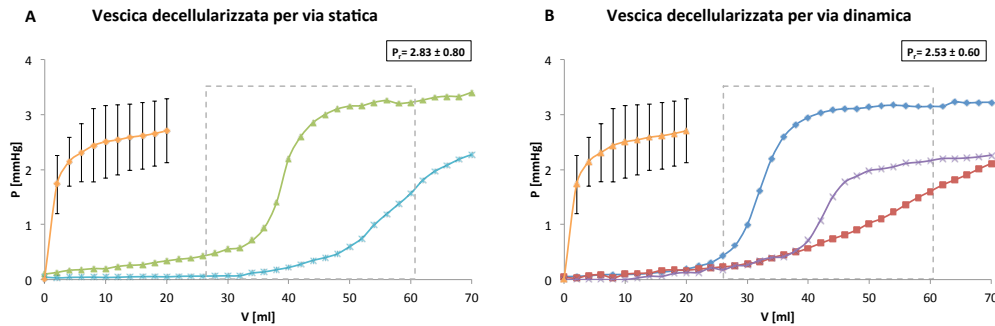


Figura 4.7: Curve cistometriche ottenute per vesciche decellularizzate per via statica, $n=2$ (A) e per via dinamica, $n=3$ (B), confrontate con la curva cistometrica media nativa. Il valore di pressione massima (P_r) calcolato per le ciascuna popolazione viene presentato come valore medio \pm deviazione standard. Il rettangolo tratteggiato in entrambi i grafici individua la regione di transizione della curva tra le due regioni a bassa pendenza; in questo tratto, la vescica decellularizzata viene effettivamente stretchata, portando quindi a un incremento di pressione.

Osservando le immagini di Figura 4.7, si nota che il comportamento delle vesciche decellularizzate in entrambi i casi (statico e dinamico) non corrisponde a quello ottenuto per le vesciche native (Figura 4.6). Le curve cistometriche delle vesciche decellularizzate infatti possono essere caratterizzate da tre fasi:

- i) Una lunga fase iniziale (fino a circa $V_1=41 \pm 10$ ml di volume intravesiciale nel caso statico, $V_1=35 \pm 6$ ml nel caso dinamico), in cui al riempimento della vescica corrisponde una bassa variazione di pressione.
- ii) Una fase di transizione (fino a circa $V_2=60 \pm 14$ ml nel caso statico, $V_2=56 \pm 13$ ml nel caso dinamico), dove all'aumento di volume corrisponde un effettivo incremento di pressione.
- iii) Una fase finale, dove la pendenza della curva pressione-volume (curva P-V) si riduce notevolmente.

Il tratto iniziale è dovuto al fatto che la vescica decellularizzata, dilatata a causa dell'azione degli agenti decellularizzanti, prima di rispondere con un incremento di pressione deve essere completamente distesa. La fase iniziale di bassa pressione dunque descrive il riempimento della vescica fino al volume limite, definito in letteratura come *Zero Pressure*

Volume (ZPV) [74], oltre il quale inizia la risposta meccanica del tessuto. Nella fase di transizione, in corrispondenza della quale la vescica decellularizzata è effettivamente distesa, gli organi decellularizzati mostrano la capacità di rispondere al riempimento con un efficace incremento della pressione che raggiunge valori massimi (P_r) non differenti statisticamente (p -value > 0.05) da quelli delle vesciche native: 2.83 ± 0.80 mmHg delle vesciche decellularizzate per via statica e 2.53 ± 0.60 di quelle decellularizzate con approccio dinamico, rispetto ai 2.70 ± 0.57 mmHg delle vesciche native. Differenze statisticamente significative non sono riscontrate neanche fra i P_r delle vesciche decellularizzate per via statica e per via dinamica (p -value > 0.05). Queste considerazioni vanno a confermare dunque il fatto che le alterazioni delle curve cistometriche non sono dovute alla sollecitazione ciclica in fase di decellularizzazione, bensì all'azione degli agenti chimici decellularizzanti.

Il volume V_2 è stato considerato il valore limite oltre il quale la vescica decellularizzata viene *overstretchata*. È importante notare che, oltre il volume di *overstretching*, le vesciche decellularizzate non rispondono con un successivo incremento di pressione (come invece fanno le vesciche native, secondo la curva di Figura 4.5), ma mantengono un valore di pressione intravesiciale pressoché costante. Questo probabilmente è dovuto al grado di porosità caratteristico della matrice decellularizzata, che porta all'ultrafiltrazione del fluido immesso attraverso le pareti della vescica. Per confermare questa ipotesi, le vesciche decellularizzate sono state perfuse con acqua colorata, come mostrato in Figura 4.8.



Figura 4.8: Prova di cistometria su vescica decellularizzata con perfusione con acqua colorata. In figura è chiaramente visibile l'ultrafiltrazione del liquido immesso attraverso le pareti della vescica, che quindi caratterizza la BAM come una matrice permeabile.

Come osservabile in Figura 4.8, dopo il riempimento della vescica decellularizzata con un volume V_2 , ciò che è stato osservato è un'ultrafiltrazione del liquido colorato, immesso nella vescica, attraverso le pareti della matrice. Questo dunque conferma che il raggiungimento di una pressione pressoché costante a grandi volumi di riempimento è dovuto al coefficiente di permeabilità della matrice decellularizzata che caratterizza il fenomeno di ultrafiltrazione del fluido immesso. Il fenomeno di incremento della permeabilità del tessuto decellularizzato rispetto a quello nativo è stato caratterizzato nel dettaglio. Nel *Paragrafo 4.1.2.5* saranno riportati i risultati dei test effettuati.

4.1.2.4 Prova di trazione monoassiale

La prova di trazione monoassiale permette di ricavare i valori di σ e ε che si sviluppano sul campione a partire dai valori di carico applicato sul campione (F) e il conseguente allungamento del provino (Δl). In particolare, i valori di sforzo sono stati ricavati dividendo la F misurata per l'area della sezione trasversale del provino (ottenuta moltiplicando la larghezza del provino per il suo spessore). La larghezza di tutti i provini è pari a 4 mm, mentre gli spessori medi misurati per i provini di ciascuna prova di trazione sono mostrati in Tabella 4.1.

SPESSORI [mm]					
Nativa		Decellularizzazione dinamica		Incubazione statica	
Trasversale	Longitudinale	Trasversale	Longitudinale	Trasversale	Longitudinale
0.56	0.52	0.83	0.85	0.46	0.8
0.29	0.59	0.78	0.97	0.73	0.37
1.45	0.7	0.59	0.64	0.44	0.5
0.81	1.18	0.34	0.33	0.26	0.38
0.75	0.82	0.47	0.38	0.44	0.37
0.77 ± 0.43	0.76 ± 0.26	0.60 ± 0.21	0.63 ± 0.28	0.47 ± 0.17	0.48 ± 0.19

Tabella 4.1: Valori di spessore misurati per ciascun provino sottoposto a trazione monoassiale. In particolare, per ciascun provino lo spessore è stato misurato in tre punti (alle due estremità e nel punto centrale). I valori riportati in tabella sono la media delle tre misurazioni. In grassetto sono riportati valore medio \pm deviazione standard per ogni popolazione.

I valori riportati in Tabella 4.1 mostrano uno spessore medio maggiore per i provini nativi, valori leggermente inferiori per i provini sottoposti a protocollo di decellularizzazione

dinamica, e valori con un ulteriore decremento nel caso di incubazione statica. Questi valori, sebbene non differenti in maniera significativa da un punto di vista statistico (p -value > 0.05), potrebbero confermare quanto osservato in precedenza dalle analisi istologiche: infatti, il differente spessore potrebbe essere dovuto al fatto che l'incubazione statica è un tipo di sollecitazione meccanica del tessuto non fisiologica, che sollecita la matrice in maniera eccessiva, distendendola e riducendone lo spessore in maniera maggiore rispetto alla decellularizzazione dinamica.

Un esempio di curva σ - ϵ ricavata in seguito all'elaborazione dei dati ottenuti dalle prove di trazione monoassiale è mostrata in Figura 4.9.

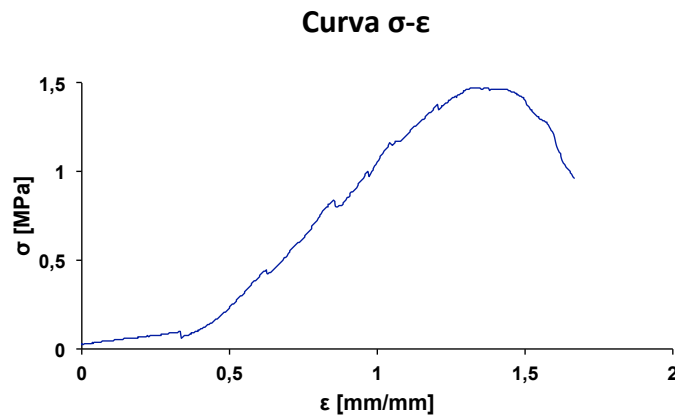


Figura 4.9: Curva σ - ϵ ricavata dalle prove di trazione monoassiale effettuate su un provino di vescica. In particolare, questa curva si riferisce a un provino ricavato da una vescica decellularizzata per via statica.

Nella curva mostrata in Figura 4.9 si possono osservare facilmente un primo tratto a bassa pendenza, seguito da un tratto lineare a pendenza maggiore prima di arrivare a rottura. Ciò a conferma del fatto che i tessuti esaminati seguono un comportamento di tipo elastico non lineare. L'elaborazione dei dati di sforzo e deformazione, al fine di ricavare i 6 parametri meccanici (E_{low} , E_{high} , ϵ_{trans} , σ_{trans} , σ_{max} , ϵ_{max}) con cui descrivere le proprietà meccaniche del tessuto, è stata effettuata utilizzando un foglio di calcolo in grado di calcolare i 6 parametri a partire da valori soglia della curva, descritti più avanti in questo paragrafo, inseriti come input dall'utente. L'interfaccia del foglio di calcolo, sviluppato in ambiente Excel, è mostrata in Figura 4.10.

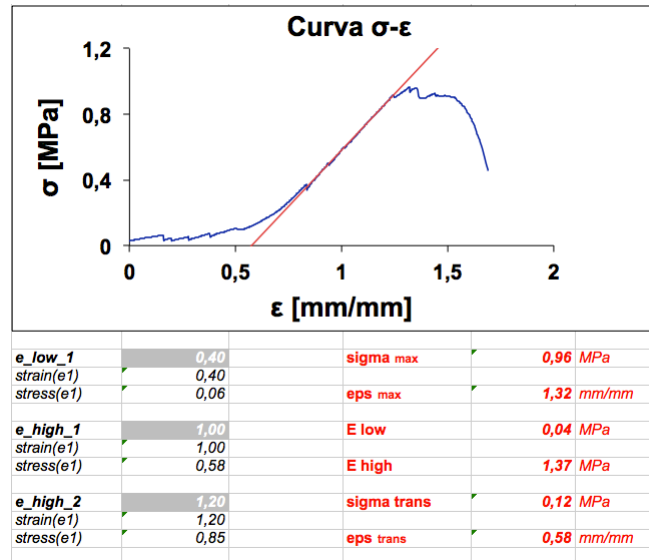


Figura 4.10: Interfaccia grafica del foglio di calcolo che permette di trovare i 6 parametri meccanici dai valori σ e ϵ della curva. La retta rossa viene definita dopo aver calcolato E_{high} . L'intercetta della retta con l'asse delle ascisse identifica il valore di ϵ_{trans} .

In particolare, il foglio di calcolo è in grado, a partire dalle colonne di dati dei valori di σ e ϵ che caratterizzano la curva, di identificare automaticamente il valore di σ_{max} (come valore massimo nella colonna dei dati di sforzo) e di ϵ_{max} (come valore di deformazione associato a σ_{max}). Per ricavare i moduli di Young invece, è sufficiente fornire come input (valori su sfondo grigio in Figura 4.10) i valori di deformazione corrispondenti alla fine del tratto della curva a bassa pendenza (e_{low_1}) e i valori di deformazione corrispondenti all'inizio e alla fine del tratto della curva ad alta pendenza (e_{high_1} e e_{high_2}). Interpolando questi valori, il foglio di calcolo è in grado di ricavare rispettivamente i valori di E_{low} e di E_{high} ; in figura, il coefficiente angolare della retta interpolante la curva σ - ϵ nel tratto ad alta pendenza corrisponde al valore del E_{high} . Il valore di ϵ_{trans} viene individuato come intercetta della retta con pendenza E_{high} sull'asse delle deformazioni (ascisse). Infine, σ_{trans} viene ricavato a partire dal valore di ϵ_{trans} , ed equivale al valore di σ sull'asse delle ordinate corrispondente a ϵ_{trans} .

I valori ottenuti in seguito all'elaborazione dei dati delle prove di trazione monoassiale, descritti tramite i 6 parametri meccanici ricavati con il foglio di calcolo, insieme al valore della mediana (in grassetto), del 25° percentile (in rosso) e del 75° percentile (in blu) relativi a ogni popolazione, sono mostrati in Tabella 4.2.

TRASVERSALE

σ_{max} [MPa]			ϵ_{max} [mm/mm]			E_{low} [MPa]		
<i>nativo</i>	<i>dinamico</i>	<i>statico</i>	<i>nativo</i>	<i>dinamico</i>	<i>statico</i>	<i>nativo</i>	<i>dinamico</i>	<i>statico</i>
0.85	0.46	0.36	0.75	1.30	1.46	0.02	0.02	0.03
0.39	0.68	-	2.02	1.51	1.80	0.03	0.02	0.05
0.45	0.48	0.77	1.80	1.74	1.38	0.03	0.04	0.03
0.62	0.95	-	1.26	1.41	1.47	0.03	-	-
0.51	0.75	0.56	1.47	1.50	1.37	-	-	-
0.51	0.68	0.56	1.47	1.50	1.42	0.03	0.02	0.03
0.45	0.48	0.46	1.26	1.41	1.38	0.03	0.02	0.03
0.62	0.75	0.67	1.80	1.51	1.47	0.03	0.03	0.04
σ_{trans} [MPa]			ϵ_{trans} [mm/mm]			E_{high} [MPa]		
<i>nativo</i>	<i>dinamico</i>	<i>statico</i>	<i>nativo</i>	<i>dinamico</i>	<i>statico</i>	<i>nativo</i>	<i>dinamico</i>	<i>statico</i>
0.06	0.16	0.07	0.13	0.61	0.75	0.99	0.95	0.59
0.13	0.07	0.10	0.17	0.30	0.39	0.51	0.97	-
0.03	0.08	0.07	0.33	0.33	0.21	0.84	0.75	1.30
0.10	0.14	-	0.12	0.73	0.18	0.64	1.18	1.54
0.20	0.15	0.09	-	0.26	0.30	1.74	1.38	0.60
0.10	0.14	0.08	0.15	0.33	0.30	0.84	0.97	0.95
0.06	0.08	0.07	0.12	0.30	0.21	0.64	0.95	0.59
0.13	0.15	0.09	0.21	0.61	0.39	0.99	1.18	1.36

LONGITUDINALE

σ_{max} [MPa]			ϵ_{max} [mm/mm]			E_{low} [MPa]		
<i>nativo</i>	<i>dinamico</i>	<i>statico</i>	<i>nativo</i>	<i>dinamico</i>	<i>statico</i>	<i>nativo</i>	<i>dinamico</i>	<i>statico</i>
0.49	0.32	0.31	1.87	2.09	1.15	0.02	0.02	0.05
0.37	0.34	0.69	1.4	1.4	-	0.05	0.03	0.04
0.54	0.49	-	1.8	1.2	1.52	0.01	0.02	0.02
0.42	0.54	0.5	1.7	1.32	1.55	0.01	-	-
0.38	0.53	0.67	1.41	1.8	1.85	0.02	0.03	-
0.42	0.49	0.59	1.7	1.36	1.55	0.02	0.02	0.04
0.38	0.34	0.45	1.41	1.32	1.43	0.01	0.02	0.03
0.49	0.53	0.68	1.8	1.8	1.62	0.02	0.03	0.04
σ_{trans} [MPa]			ϵ_{trans} [mm/mm]			E_{high} [MPa]		
<i>nativo</i>	<i>dinamico</i>	<i>statico</i>	<i>nativo</i>	<i>dinamico</i>	<i>statico</i>	<i>nativo</i>	<i>dinamico</i>	<i>statico</i>
0.12	0.11	0.09	0.23	0.47	0.55	0.99	0.77	0.82
0.16	0.07	0.14	0.36	0.52	0.44	0.6	1.18	1.63
0.1	0.1	0.16	0.3	0.38	0.77	1.27	1.37	0.66
0.10	0.12	-	0.33	0.35	-	1.39	0.73	0.73
0.1	0.13	-	0.49	0.58	-	0.73	-	1.65
0.1	0.11	0.14	0.33	0.47	0.55	0.99	0.98	0.82
0.1	0.1	0.12	0.3	0.38	0.49	0.73	0.76	0.73
0.12	0.12	0.15	0.36	0.52	0.66	1.27	1.23	1.63

Tabella 4.2: Valori dei 6 parametri che descrivono le proprietà meccaniche ottenuti dalle prove di trazione per i provini ricavati sia in direzione trasversale che in direzione longitudinale per ogni popolazione. In tabella i dati presentano anche il valore della mediana (in grassetto), del 25° (in rosso) e del 75° percentile (in blu).

I risultati di ciascuna popolazione sono presentati in Figura 4.11, in grafici che rappresentano la mediana, il 25° e il 75° percentile per ciascun parametro.

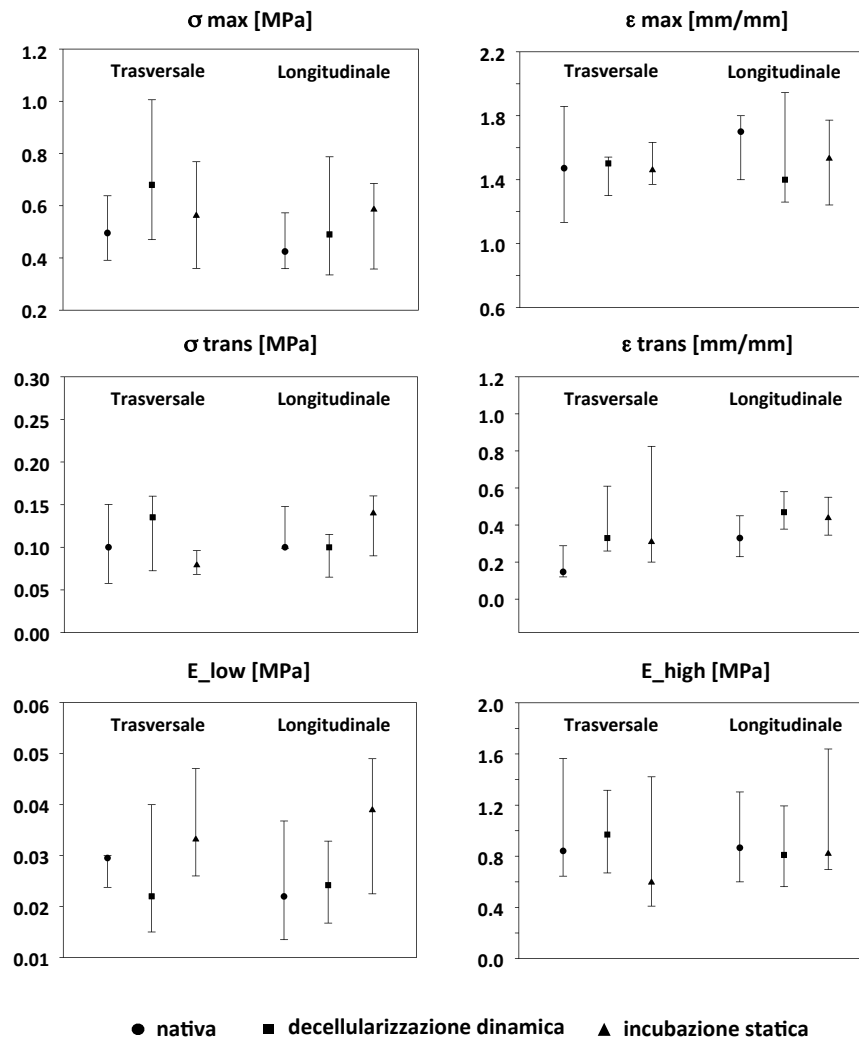


Figura 4.11: Caratterizzazione biomeccanica di tessuto nativo, tessuto decellularizzato per via dinamica e tessuto decellularizzato per via statica rappresentata dai sei parametri meccanici. I campioni sono stati prelevati per ciascun gruppo dalla regione basale della vescica, sia in direzione trasversale (a sinistra nei grafici) sia in direzione longitudinale (a destra nei grafici). I risultati sono mostrati come mediana \pm range interquartile. Per ogni gruppo $n=5$.

In Figura 4.11 si può apprezzare il confronto fra le proprietà meccaniche, espresse tramite i 6 parametri meccanici, della vescica nativa, del tessuto decellularizzato per via statica e del tessuto decellularizzato per via dinamica. I risultati provano che l'azione degli agenti chimici usati per rimuovere le cellule non ha indotto alterazioni critiche sulle proprietà meccaniche della matrice decellularizzata poiché non si identificano differenze statisticamente significative tra il comportamento meccanico della vescica nativa rispetto ai gruppi di decellularizzazione statica e dinamica (p -value > 0.05 per tutti i parametri indagati).

Differenze rilevanti da un punto di vista statistico non sono state osservate nei parametri meccanici confrontando le matrici decellularizzate per incubazione statica e le matrici trattate con approccio dinamico (p -value > 0.05 per tutti i parametri indagati). Ciò suggerisce che la distensione ciclica della parete vescicale nel protocollo di perfusione dinamica non influisce sull'integrità delle componenti strutturali che costituiscono l'ECM. Secondo questi risultati dunque, il metodo di decellularizzazione considerato in questo lavoro di tesi è efficace nel generare una BAM con le proprietà meccaniche adeguate (in quanto analoghe al tessuto nativo) per essere utilizzata come scaffold per il processo di ricellularizzazione e successivamente per impianto *in vivo*.

Un confronto diretto dei risultati ottenuti con la letteratura non è possibile, in quanto non è stato possibile risalire a studi che descrivono il comportamento meccanico della vescica di coniglio, e il confronto con i dati di letteratura associati a tessuti di specie animale differenti mostra risultati contrastanti, sia nel caso di tessuto nativo che nel caso di tessuto decellularizzato, come mostra la Tabella 4.3.

NATIVO								
Specie	Tesi	Korossis et al. [68]		Ratto	Dahms et al. [50]		Rosario et al. [41] Farhat et al. [73]	
		Coniglio	Maiale		Maiale	Uomo	Maiale	Maiale
E_low_longitudinale	[MPa]	0.02	0.025	/	/	/	/	/
E_low_trasversale	[MPa]	0.03	0.018	/	/	/	/	/
σ_{max} longitudinale	[MPa]	0.42	1.5	0.72	0.32	0.27	/	/
σ_{max} trasversale	[MPa]	0.51	0.9	0.72	0.32	0.27	/	/
ϵ_{max} longitudinale	[mm/mm]	1.70	2.50	2.03	1.66	0.69	/	/
ϵ_{max} trasversale	[mm/mm]	1.47	3.30	2.03	1.66	0.69	/	/
ϵ_{trans} longitudinale	[mm/mm]	0.33	1.5	/	/	/	/	/
ϵ_{trans} trasversale	[mm/mm]	0.15	1.75	/	/	/	/	/
σ_{trans} longitudinale	[MPa]	0.10	0.28	/	/	/	/	/
σ_{trans} trasversale	[MPa]	0.10	0.14	/	/	/	/	/
E_high_longitudinale	[MPa]	0.99	1.8	0.76	0.26	0.25	0.04	0.2
E_high_trasversale	[MPa]	0.84	0.5	0.76	0.26	0.25	0.04	0.2

DECELLULARIZZATO							
Specie	Tesi	Dahms et al. [50]		Rosario et al. [41] Farhat et al. [73]			
		Coniglio	Ratto	Maiale	Uomo	Maiale	Maiale
E_low_longitudinale	[MPa]	0.03	/	/	/	/	/
E_low_trasversale	[MPa]	0.03	/	/	/	/	/
σ_{max} longitudinale	[MPa]	0.54	0.68	0.91	0.13	/	/
σ_{max} trasversale	[MPa]	0.62	0.68	0.91	0.13	/	/
ϵ_{max} longitudinale	[mm/mm]	1.46	0.73	1.86	0.91	/	/
ϵ_{max} trasversale	[mm/mm]	1.46	0.73	1.86	0.91	/	/
ϵ_{trans} longitudinale	[mm/mm]	0.51	/	/	/	/	/
ϵ_{trans} trasversale	[mm/mm]	0.32	/	/	/	/	/
σ_{trans} longitudinale	[MPa]	0.13	/	/	/	/	/
σ_{trans} trasversale	[MPa]	0.11	/	/	/	/	/
E_high_longitudinale	[MPa]	0.90	1.43	0.40	0.60	2.24	0.65
E_high_trasversale	[MPa]	0.96	1.43	0.40	0.60	2.24	0.65

Tabella 4.3: Confronto dei risultati di questo lavoro di tesi (mediana) con i parametri medi riportati in letteratura, sia per il tessuto nativo, sia per il tessuto decellularizzato (sono stati mediati valore statico e dinamico in quanto privi di differenze statisticamente significative). I valori evidenziati sono quelli confrontabili con la letteratura.

In riferimento alla Tabella 4.3, si può osservare infatti come rispetto ai risultati ottenuti in questo lavoro, la letteratura mostri una sovrastima o una sotto stima dei parametri, a volte

riferendosi anche allo stesso modello animale: ad esempio, il valore di σ_{\max} longitudinale nel tessuto nativo (0.42 MPa), può essere confrontato con quello di maiale ottenuto da *Dahms et al.* [50] (pari a 0.32 MPa), ma è totalmente diverso rispetto al valore ottenuto sempre per maiale da *Korossis et al.* [68] (pari a 1.5 MPa). La sovrastima o sottostima dei parametri è ancora più accentuata per le vesciche decellularizzate, dove l'unico valore paragonabile con i dati di letteratura è σ_{\max} trasversale (pari a 0.62 MPa, simile a quello ottenuto da *Dahms et al.* [50] in modello di topo, pari a 0.67 MPa). Inoltre, l'assenza di differenze tra tessuto nativo e tessuto decellularizzato ottenute in questo lavoro è in contrasto con la letteratura, che invece evidenzia variazioni in termini di proprietà meccaniche del tessuto decellularizzato rispetto al tessuto nativo [11, 41, 73]. Come già accennato in precedenza, ciò può essere dovuto probabilmente agli agenti decellularizzanti aggressivi contro la ECM (*SDS*, *tripsina* e *nucleasi*) utilizzati nei lavori citati. Si può concludere dunque che il protocollo di decellularizzazione dinamico valutato nel contesto di questa tesi sembra essere più efficace rispetto a quelli presentati in letteratura non solo riguardo alla rimozione del contenuto cellulare, ma anche al mantenimento delle proprietà meccaniche della ECM ottenuta.

Il confronto fra campioni ottenuti in direzione longitudinale e quelli ottenuti in direzione trasversale inoltre non ha mostrato la presenza di anisotropie significative in termini di proprietà meccaniche in seguito a prove di trazione monoassiale, sia per la vescica nativa che per quella decellularizzata (p -value > 0.05). In letteratura non sono presenti studi che valutano la possibilità di anisotropie potenziali nel tessuto della vescica di coniglio, e anche in questo caso il confronto con i comportamenti di altre specie animali è controverso: i risultati ottenuti in questo lavoro di tesi infatti rispecchiano il comportamento meccanico isotropo individuato su vesciche di ratto da *Gloekner et al.* [76], mentre si discostano dal comportamento anisotropo osservato in diversi studi su vesciche native di maiale [11, 68]. Queste differenze di comportamento nelle specie differenti sono state spiegate nel lavoro di *Dahms et al.* [50], il quale, confrontando le proprietà meccaniche di tessuto nativo e decellularizzato di tre specie differenti (ratto, maiale e uomo), conclude che l'ECM di uno stesso tessuto o di uno stesso organo, prelevata da specie animali differenti, può mostrare un differente comportamento biomeccanico. In questo modo è possibile dunque affermare che la risposta isotropa o anisotropa della ECM di vescica è strettamente correlata alla specie animale investigata, e

quindi è possibile che, a differenza del maiale, il coniglio non presenti anisotropie significative del tessuto di vescica.

4.1.2.5 Prova di permeabilità

Le prove cistometriche su tessuto decellularizzato (*Paragrafo 4.1.2.3*) hanno mostrato come il liquido colorato, a volumi superiori del volume di overstretching V_2 , venisse filtrato dal tessuto, fuoriuscendo dall'organo attraverso le sue pareti (Figura 4.8). La quantificazione della permeabilità del tessuto, ossia la misura del volume ultrafiltrato dalla vescica rispetto alla pressione intravesicale, è stata eseguita attraverso test di permeabilità su patch di vescica decellularizzata, in modo da definire il coefficiente di permeabilità K che caratterizza la parete del tessuto. Per quanto riguarda il coefficiente di permeabilità della vescica nativa, non è stato possibile ricavarlo in maniera quantitativa poiché, per ognuno dei tre valori di portata definiti dal protocollo (7.5, 15 e 30 $\mu\text{l}/\text{min}$), il tessuto ha mostrato un repentino aumento della pressione, raggiungendo molto velocemente valori superiori rispetto a quelli misurabili con il sensore utilizzato nelle prove (il cui fondo scala è di 200 mmHg): per $Q=7.5 \mu\text{l}/\text{min}$ la saturazione è stata raggiunta in circa 10 minuti, per $Q=15 \mu\text{l}/\text{min}$ in circa 6 minuti e per $Q=30 \mu\text{l}/\text{min}$ in circa 2.5 minuti. Per nessuno di questi intervalli temporali il segnale pressorio si è stabilizzato ad un valore costante, rendendo quindi impossibile la misura del valore. Una prova aggiuntiva a portata $Q=3.75 \mu\text{l}/\text{min}$ ha comunque portato il sensore a saturazione dopo 28 minuti. Ciò fa presupporre che il tessuto nativo, grazie principalmente alla barriera definita dallo strato uroteliale, sia impermeabile, e quindi caratterizzato da un valore di K pressoché nullo, confermando quanto precedentemente osservato in letteratura [65]. In Tabella 4.4 sono mostrati invece i risultati ottenuti in seguito ai test di permeabilità effettuati su tessuti decellularizzati sia tramite incubazione statica, sia per via dinamica.

$K [\mu\text{l min}^{-1}\text{mmHg}^{-1}]$

<i>dinamico</i>	<i>statico</i>
1.22	0.46
1.74	0.65
2.22	
2.94	
2.03 ± 0.73	0.55 ± 0.14

Tabella 4.4: Dati ottenuti dalle prove di permeabilità. Sono riportati anche il valore medio \pm deviazione standard.

I dati presentati in Tabella 4.3 sono stati poi graficati in *curve pressione-portata* (*curve P-Q*), mostrate in Figura 4.12.

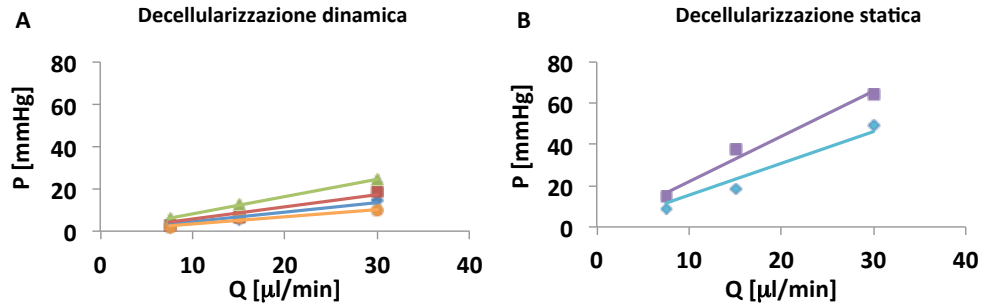


Figura 4.12: Curve P-Q ottenute in seguito a prove di permeabilità su tessuto di vescica decellularizzato con incubazione statica (A) o con perfusione dinamica (B). Per il gruppo statico $n=2$, per il gruppo dinamico $n=4$.

Come si può osservare in Figura 4.12, in ogni prova per i tre valori di portata imposta è stato misurato il corrispondente valore di pressione di regime raggiunto (cioè il valore di pressione misurato quando il segnale si assesta ad un valore costante). Secondo quanto mostrato dai risultati in Figura 4.12, si può notare che, a parità di portata, le pressioni raggiunte con matrice decellularizzata per via statica sono maggiori rispetto al caso dinamico. I dati sono stati poi interpolati tramite retta di regressione e il coefficiente K , pari al rapporto fra portata e pressione, è stato ricavato invertendo il coefficiente angolare delle rette ottenute. I risultati sono mostrati in Figura 4.13:

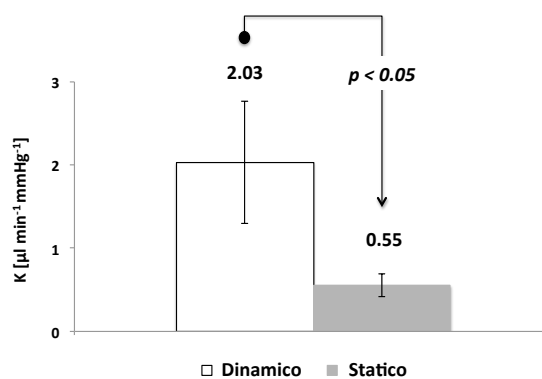


Figura 4.13: Analisi statistica (t-test) dei valori di K estrapolati dalle curve P-Q invertendo il valore di pendenza delle rette. I dati sono espressi come valore medio \pm deviazione standard in $\mu\text{l min}^{-1}\text{mmHg}^{-1}$. In figura, la freccia indica la presenza di differenze statisticamente significative (p -value < 0.05) fra la colonna di partenza e la colonna di arrivo (dove c'è la punta della freccia). Per il gruppo dinamico, $n=4$; per il gruppo statico $n=2$.

Come mostra la Figura 4.13, entrambi i gruppi analizzati hanno mostrato un coefficiente di permeabilità non nullo. Ciò è un'ulteriore conferma del fatto che successivamente all'applicazione del trattamento di decellularizzazione, il tessuto impermeabile di vescica diventa permeabile, in quanto l'assenza di cellule comporta un grado di porosità nella matrice che permette la filtrazione del fluido attraverso le sue pareti.

Inoltre, il valore del coefficiente di permeabilità medio risulta essere significativamente più elevato (p -value < 0.05) per i tessuti decellularizzati per via dinamica ($K_{\text{mean}}=2.03 \mu\text{l min}^{-1} \text{mmHg}^{-1}$) rispetto ai tessuti incubati in maniera statica ($K_{\text{mean}}=0.55 \mu\text{l min}^{-1} \text{mmHg}^{-1}$).

Questo risultato è probabilmente dovuto alla presenza, come mostrato in Figura 4.2H, di cellule residue nella matrice ottenuta per incubazione statica. È possibile infatti che la presenza di cellule residue comporti una riduzione del grado di porosità della matrice e una minore ultrafiltrazione del fluido, che in ultima analisi si traduce proprio in un più elevato valore di pressione e quindi in un coefficiente di permeabilità inferiore.

Per il confronto con i risultati di altri studi si pone lo stesso problema riscontrato con le prove di trazione monoassiale: in letteratura non ci sono riferimenti a prove di permeabilità su BAM di coniglio, e gli unici due lavori che effettuano dei test di permeabilità su BAM, lo fanno su vescica decellularizzata di maiale [52, 53]. Rispetto ai dati di letteratura, i risultati ottenuti in questo lavoro di tesi evidenziano un coefficiente di permeabilità molto più basso sia per le vesciche decellularizzate per via dinamica, sia per quelle incubate staticamente: $8 \mu\text{l min}^{-1} \text{mmHg}^{-1}$ [52] e $68 \mu\text{l min}^{-1} \text{mmHg}^{-1}$ [53] entrambe decellularizzate per via statica, rispetto a $2.03 \mu\text{l min}^{-1} \text{mmHg}^{-1}$ del processo di decellularizzazione dinamica e $0.55 \mu\text{l min}^{-1} \text{mmHg}^{-1}$ dell'incubazione statica descritti in questo lavoro di tesi. In particolare, il coefficiente di permeabilità identificato per le vesciche decellularizzate per via statica è confrontabile con quello in letteratura della BAM liofilizzata e trattata con acido ialuronico, trattamento mirato a ridurre la permeabilità del tessuto [53]. Il fatto che la matrice ottenuta per via dinamica, priva di cellule come mostrato dalle istologie, abbia un coefficiente di permeabilità molto più basso rispetto ai dati di letteratura, potrebbe essere dovuto al diverso protocollo di decellularizzazione utilizzato, probabilmente meno aggressivo nei confronti della matrice rispetto a quelli di letteratura, che quindi va a danneggiare in maniera minore la ECM trattata e a generare così un più basso grado di porosità.

4.2 Protocollo di stimolazione del campione di tessuto nel sistema di coltura

4.2.1 Determinazione delle condizioni di lavoro del sistema di coltura

4.2.1.1 Modello analitico dello stato di sollecitazione sul patch di vescica

La modellizzazione matematica tramite legge di Laplace è stata svolta per associare i valori di pressione misurati con le prove di cistometria ai valori di sforzo e deformazione ricavati tramite prove di trazione monoassiale, al fine di identificare i valori di σ e ε corrispondenti a una sollecitazione fisiologica del tessuto. Questa relazione, su cui si baserà il modello computazionale per ricavare le condizioni di lavoro da utilizzare in fase di sollecitazione di un patch di tessuto da ricellularizzare, è stata eseguita su tre campioni di vescica nativa, ipotizzando di modellizzare la vescica con un modello a geometria sferica o sferoidale, come descritto nel *Paragrafo 3.2.1.1*. Le curve P-V teoriche ricavate da entrambi i modelli sono state poi confrontate con la curva P-V media delle prove di cistometria (ricavata dagli andamenti mostrati in Figura 4.6) al fine di definire quale dei due modelli geometrici descrivesse meglio il comportamento dell'organo intero nativo in fase di riempimento dell'organo. In particolare, è stato considerato come migliore il modello che genera una curva P-V confrontabile con quelle sperimentali ottenute dalle prove cistometriche sull'organo nativo. Gli andamenti ottenuti con modellizzazione sferica, confrontati con la curva cistometrica media, sono mostrati in Figura 4.14.

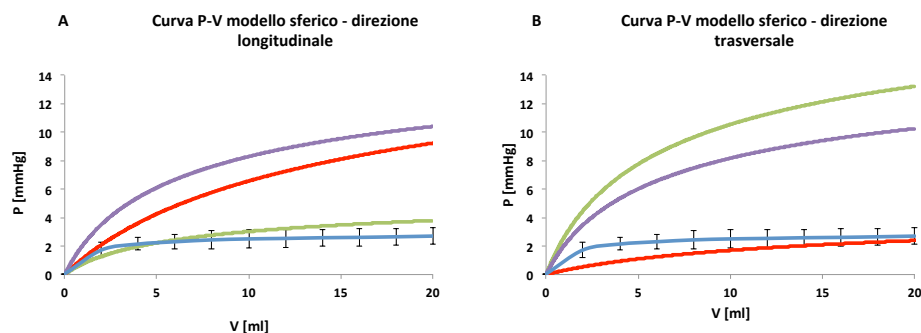


Figura 4.14: Curve P-V stimate tramite modellizzazione di Laplace con assunzione di geometria sferica su 3 campioni di vescica nativa, confrontate con la curva cistometrica media (in blu). (A) Modellizzazione a partire dai valori di σ ed ε ottenuti da trazioni monoassiali su campioni in direzione longitudinale; (B) Modellizzazione a partire dai valori di σ ed ε ottenuti da campioni in direzione trasversale.

Come si può osservare in Figura 4.14, la modellizzazione con ipotesi di geometria sferica non è riuscita a riprodurre in maniera efficace i valori di P e V risultati delle prove di cistometria su organo intero. Infatti, a partire dalle curve ottenute a partire dai dati delle

prove di trazione monoassiale di campioni sia in direzione longitudinale, sia in direzione trasversale, solo un campione su tre è riuscito a identificare una curva con valori di pressione confrontabili con quelli della curva cistometrica; la curva P-V teorica degli altri due campioni mostra invece una notevole sovrastima dei valori di pressione.

In Figura 4.15 sono presentate le curve ottenute dalla modellizzazione secondo l'ipotesi di geometria sferoidale.

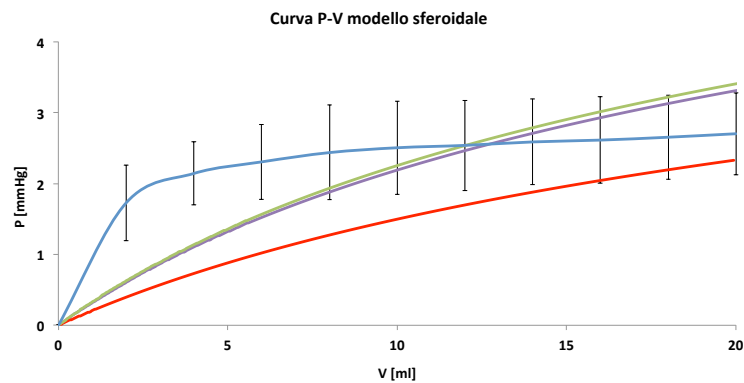


Figura 4.15: Curve P-V stimate tramite modellizzazione di Laplace con ipotesi di geometria sferoidale su campioni di vescica nativa ($n=3$), confrontate con la curva cistometrica media.

Come si osserva in Figura 4.15, il modello con geometria sferoidale ha permesso di ottenere delle curve confrontabili con la curva cistometrica media per tutti e tre i campioni analizzati. Le curve modellizzate in realtà non riescono a rappresentare in maniera corretta il primo tratto della curva di cistometria, principalmente perché i dati utilizzati per implementare il modello sono stati ricavati dalle rette interpolanti il tratto a bassa pendenza delle curve σ - ϵ di partenza (come descritto nel *Paragrafo 3.2.1.1*). L'errore introdotto dalla modellizzazione però in prima analisi può essere trascurato perché non inficia i risultati delle valutazioni qui presentate: infatti, il valore della pressione massima delle curve ottenute dalla modellizzazione analitica è confrontabile con i valori di pressione della curva P-V cistometrica.

Questi confronti permettono dunque di definire il modello analitico ricavato dalla legge di Laplace con assunzione di geometria sferoidale come modello di riferimento, e di basarsi quindi sui valori di σ ed ϵ corrispondenti al modello per definire il valore di portata da applicare nel sistema di coltura in fase di stimolazione del patch da ricellularizzare. La determinazione del valore di portata è stata effettuata, basandosi sul modello di Laplace

appena definito, tramite modellizzazione computazionale. Nel paragrafo successivo verranno riportati i risultati ottenuti da tale analisi.

Infine, dal momento che attraverso la legge di Laplace è possibile calcolare i volumi di riempimento della vescica a partire dal valore di deformazione ricavato dalle prove di trazione monoassiale, un'ulteriore utilizzo di questa modellizzazione consiste nel definire quale valore di deformazione corrisponde al volume di *overstretching*, ossia il volume soglia oltre il quale il riempimento della vescica diventa non fisiologico. Basandosi sul modello di Laplace con assunzione di geometria sferoidale, facendo riferimento all'equazione (3.7) la deformazione che corrisponde a un volume di 20 ml (deformazione di *overstretching*) è pari a circa il 40%. Questo vuol dire che il riempimento di una vescica risulta essere fisiologico fintanto che le sue pareti vengono deformate del 40%; oltre tale valore, la deformazione è non fisiologica e può portare al danneggiamento del tessuto stesso. Questo risultato è un'ulteriore conferma del fatto che la trattazione di Laplace a grandi deformazioni (ideale per descrivere stati di deformazione > 10%) è stata scelta correttamente per la modellizzazione matematica del fenomeno di riempimento della vescica. Il valore di deformazione massima pari al 40% rappresenta quindi il valore massimo di deformazione che può essere applicato sul patch di vescica durante la stimolazione in bioreattore, al fine di garantire l'applicazione di una stimolazione fisiologica del tessuto durante la coltura dinamica.

4.2.1.2 Modellizzazione computazionale dello stato di sollecitazione del patch di vescica nel bioreattore

La modellizzazione computazionale in ambiente Comsol©, svolta per definire le condizioni di lavoro ottimali da utilizzare per sollecitare in maniera fisiologica un patch di tessuto di vescica da ricellularizzare, ha permesso di esaminare cinque differenti valori di portata (1, 2, 3, 5 e 10 $\mu\text{l}/\text{min}$), in modo da valutare quali di questi fossero in grado di sollecitare il patch di vescica in maniera fisiologica, perfondendolo per il periodo di tempo di sollecitazione fissato dal protocollo di stimolazione descritto al *Paragrafo 3.1.2* (pari a 30 minuti).

Di tutte le portate testate, soltanto quella a 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ ha consentito di raggiungere la convergenza del modello. Le altre portate hanno mostrato una divergenza del modello a tempi differenti, inferiori ai 30 minuti totali della simulazione. In particolare:

- con $Q=10 \mu\text{l}/\text{min}$ il modello diverge a 4 minuti e 17 secondi
- con $Q=5 \mu\text{l}/\text{min}$ il modello diverge a 8 minuti e 31 secondi
- con $Q=3 \mu\text{l}/\text{min}$ il modello diverge a 14 minuti e 7 secondi
- con $Q=2 \mu\text{l}/\text{min}$ il modello diverge a 19 minuti e 58 secondi

Nel modello computazionale, la divergenza è dovuta al fatto che la sollecitazione applicata al modello geometrico del patch di vescica, troppo elevata, va a deformare eccessivamente la matrice, generando una discontinuità tra gli elementi della mesh che la discretizzano, simulando così la rottura del patch e quindi impedendo la successiva risoluzione delle equazioni alla base del modello. All'istante di divergenza (e quindi prima della "rottura del patch"), infatti, ciascuna portata imposta si è tradotta in un valore di pressione pari a circa 5.5 mmHg, quindi eccessiva per la sollecitazione del patch, considerando i valori di pressione ($P_r = 2.70 \text{ mmHg}$) osservati sperimentalmente nelle prove cistometriche (Figura 4.6).

La prova a $Q=1 \mu\text{l}/\text{min}$ invece ha raggiunto convergenza e ha permesso di analizzare il comportamento meccanico dello scaffold sollecitato nella camera di coltura. In Figura 4.16 viene mostrato il patch in configurazione deformata dopo 30 minuti di perfusione. La scala colorimetrica definisce l'entità dello spostamento lungo la direzione z che il patch ha subito a causa della sollecitazione imposta.

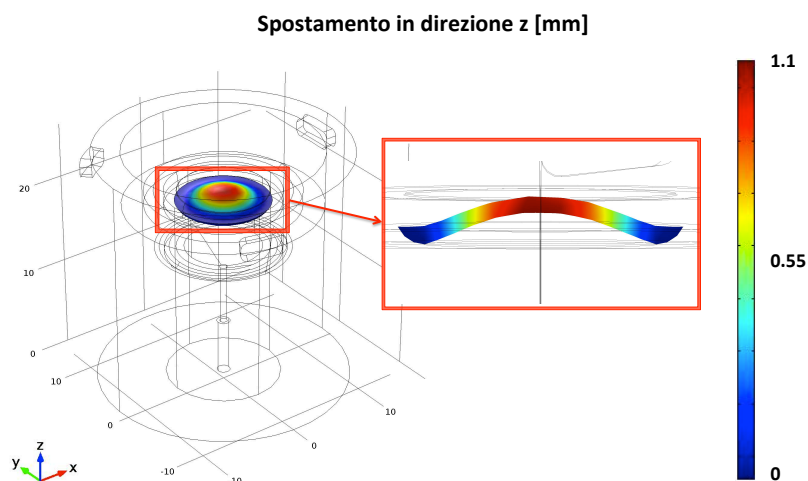


Figura 4.16: Patch deformato con configurazione tipo paraboloidale. Associata al patch è presente la mappa colorimetrica del suo spostamento lungo la coordinata z. Nel riquadro è plottata la mappa colorimetrica su un piano corrispondente alla sezione di mezzeria del modello geometrico nel piano y-z. Si osserva uno spostamento verticale massimo in corrispondenza del centro del patch circolare pari a circa 1.1 mm. Tempo di simulazione $t=30$ minuti.

Dall'immagine in Figura 4.16 si può osservare come, in seguito a deformazione, il patch assuma una configurazione tipo paraboloidale. Inoltre, lo spostamento è nullo in corrispondenza delle regioni di contatto fra patch e cartuccia portascaffold a causa della condizione di vincolo imposta. Lo spostamento massimo di 1.1 mm si osserva in corrispondenza della regione centrale del patch.

In Figura 4.17 sono mostrate le distribuzioni degli sforzi e delle deformazioni che si creano sul patch in seguito alla sollecitazione imposta con una portata di 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ per 30 minuti.

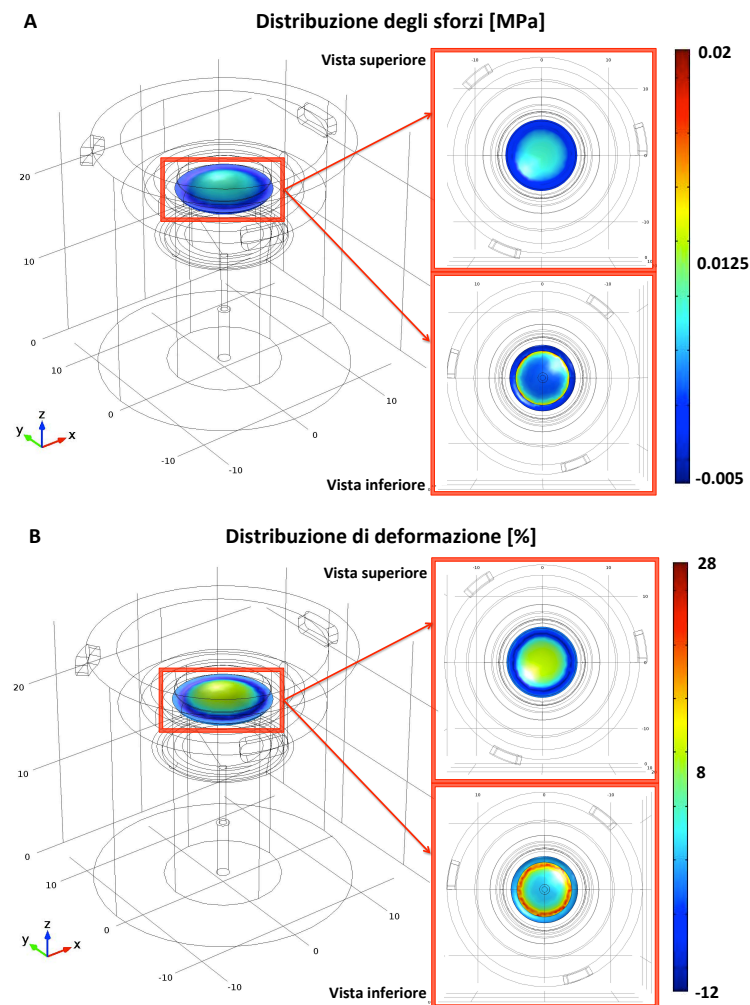


Figura 4.17: Stato di sforzo (A) e di deformazione (B) imposti sul patch all'interno della camera di coltura sollecitato da una portata di perfusione di 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ dopo 30 minuti di simulazione; in figura vengono riportate le distribuzioni degli sforzi e delle deformazioni valutate in coordinate polari. Nei riquadri sono presentate la vista dall'alto e dal basso sul patch. Il segno del valore di sforzo definisce il verso di applicazione dello sforzo. Deformazioni positive indicano trazione, deformazioni negative indicano compressione della matrice. Tempo di simulazione $t=30$ minuti.

Come si può osservare in Figura 4.17, i valori di sforzo e deformazione massimi identificati sul patch di vescica sono rispettivamente $\sigma = 0.02$ MPa e $\varepsilon = 28\%$. I valori massimi vengono raggiunti sulla superficie inferiore del patch, in corrispondenza del profilo esterno a contatto con la regione in cui il patch viene vincolato alla cartuccia portascaffold (Figura 4.17A e B, riquadro in basso). Il primo risultato a favore della portata esaminata dunque sta nel fatto che il valore di deformazione massimo identificato sul patch è molto minore del 40% corrispondente al volume di *overstretching*. Ciò significa che la sollecitazione imposta dalla portata di 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ per 30 minuti è all'interno del range fisiologico per il tessuto in esame e non va quindi a danneggiare le proprietà meccaniche della matrice. Gli sforzi e le deformazioni più bassi del modello sono invece concentrati sul profilo esterno della parte superiore del patch, quello che nella realtà è vincolato tramite o-ring nella cartuccia: da ciò consegue che il sistema progettato per vincolare il patch è in grado di fissare il campione senza indurre nella regione di vincolo deformazioni non fisiologiche, e quindi senza danneggiare la matrice decellularizzata. Invece, gli sforzi e le deformazioni medi raggiunti nella parte centrale del patch, dove si verifica il massimo spostamento, sono rispettivamente di circa $\sigma = 0.005$ MPa e circa $\varepsilon = 10\%$. Dunque, nella regione del patch investita dal fluido, è possibile identificare un range di deformazioni che va dal 10% al 28%. A partire da questi valori si possono ricavare grazie alla modellizzazione di Laplace (equazione 3.7) i corrispondenti valori di volume che caratterizzerebbero l'organo intero se sollecitato con lo stesso grado di deformazione. In particolare, basandosi sulla modellizzazione di Laplace con assunzione di geometria sferoidale descritta nel paragrafo precedente, a una deformazione del 10% corrisponde un volume di circa 5 ml, mentre a una deformazione del 28% corrisponde un volume di circa 13.5 ml. La Figura 4.18 mostra, in riferimento alle curve cistometriche di Figura 4.6, quale parte delle curve cistometriche corrisponde al range di volumi appena definito.

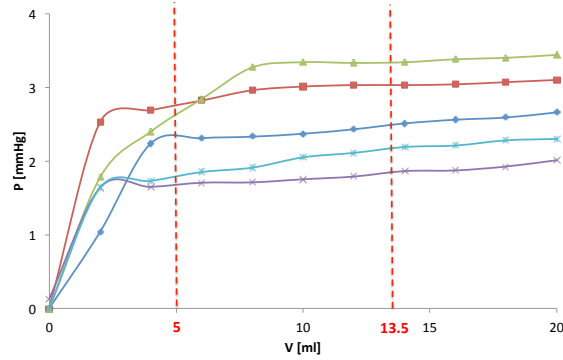


Figura 4.18: Andamento delle curve cistometriche di vesciche native all'interno del range di volumi (limitato dalle linee tratteggiate) definito dalla modellizzazione geometrica e dal modello di Laplace con geometria sferoidale. La parte di curva interessata corrisponde alla fase di riempimento della vescica ed è associata ad una sollecitazione fisiologica del tessuto.

Come si può osservare in Figura 4.18, il range di volumi ricavato dalla simulazione in ambiente Comsol© va a identificare il tratto delle curve cistometriche corrispondente alla al riempimento della vescica nel tratto fisiologico. Questo risultato è un'ulteriore conferma del fatto che la portata di $1 \mu\text{l}/\text{min}$ per 30 minuti di perfusione del patch di vescica permette di avere una sollecitazione del tessuto simile a quella che l'organo ha in fase di riempimento *in vivo*.

Per avere un'ulteriore conferma, sono stati in seguito ricavati anche i valori di pressione raggiunti nella simulazione. In Figura 4.19 è mostrata la mappa colorimetrica che descrive il profilo di pressione del fluido all'interno della camera, equivalente a una portata in ingresso di $1 \mu\text{l}/\text{min}$, dopo 30 minuti di simulazione:

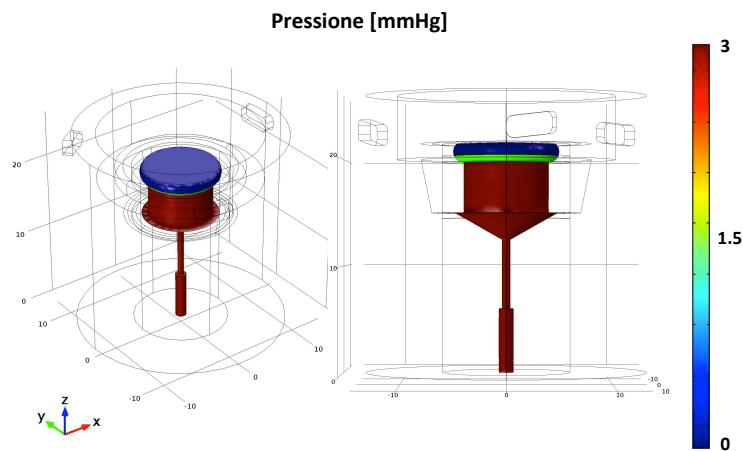


Figura 4.19: mappa colorimetrica della pressione del fluido a monte e a valle del patch, raffigurato in verde. A sinistra: vista tridimensionale, a destra: vista frontale. Tempo di simulazione $t = 30$ minuti.

In riferimento all'immagine di Figura 4.19, è possibile osservare a monte del patch un profilo di pressione uniforme all'interno del condotto di perfusione della camera pari a 3 mmHg, mentre a valle del patch un profilo di pressione uniforme pari alla pressione atmosferica. Dopo 30 minuti dunque il valore di pressione a cavallo del patch con una portata imposta di 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ è pari a circa 3 mmHg, in accordo con i risultati delle prove di cistometria (Figura 4.6).

Da tutte queste considerazioni, emerge dunque che la portata di perfusione in grado di sollecitare correttamente il tessuto di vescica da ricellularizzare e che quindi deve essere utilizzata nel protocollo del sistema di coltura descritto in questo lavoro di tesi è pari a 1 $\mu\text{l}/\text{min}$, in modo così da permettere una sollecitazione corrispondente alla fase di riempimento di almeno 30 minuti, come previsto dal protocollo descritto nel *Paragrafo 3.1.2*. Di conseguenza, la fase di svuotamento definita dal protocollo, della durata di 3 minuti, deve essere caratterizzata da una portata di 10 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Il modello computazionale ha infine permesso di analizzare anche le condizioni fluidodinamiche per valutare che il disegno della camera consentisse di distribuire le linee di flusso del fluido su tutta la superficie disponibile del patch. In Figura 4.20 è riportata la mappa colorimetrica del modulo della velocità del fluido all'interno del canale di perfusione della camera di coltura, equivalente ad una portata in ingresso di 1 $\mu\text{l}/\text{min}$, dopo 30 minuti di simulazione.

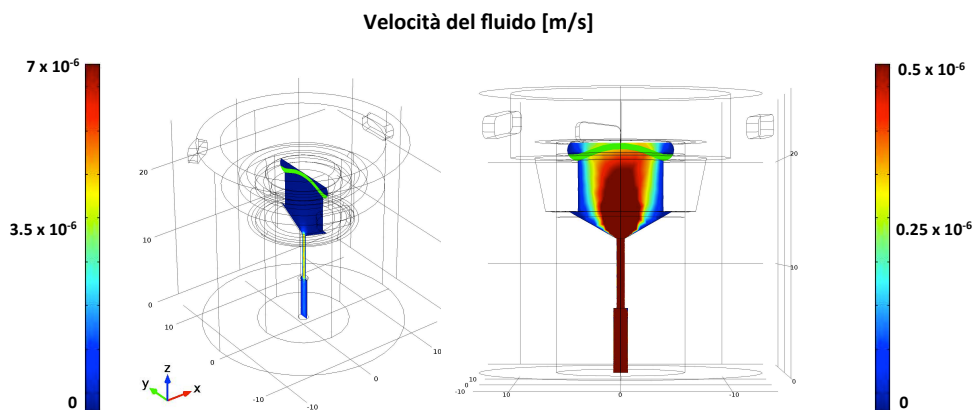


Figura 4.20: Profilo di velocità all'interno del canale di perfusione della camera: la velocità è plottata su un piano corrispondente alla sezione di mezzeria del modello geometrico nel piano $y-z$; nella figura di destra (vista frontale) il valore di soglia superiore della scala colorimetrica è fissato a 0.5 $\mu\text{m}/\text{s}$ al fine di apprezzare con maggiore dettaglio il profilo di velocità nella zona di interfaccia con il patch; in figura il patch è raffigurato in verde; tempo di simulazione $t = 30$ minuti.

Il fluido all'interno del canale di perfusione sviluppa un profilo di velocità parabolico, con velocità massime al centro del condotto cioè in prossimità del patch e velocità nulla alle pareti (per la condizione *no-slip* imposta). In particolare, all'interfaccia con il patch, la velocità raggiunge un valore massimo pari a circa $0.5 \mu\text{m/s}$ (Figura 4.21 a destra). La velocità massima all'interno della camera nel suo complesso invece viene raggiunta nel punto più stretto condotto di perfusione del patch, come osservabile in Figura 4.20 a sinistra, ed è pari a circa $7 \mu\text{m/s}$. Il regime di moto in tutta la camera comunque risulta essere di scorrimento ($Re \ll 1$); inoltre, dall'analisi del profilo di velocità non si osservano zone soggette a formazione di vortici. Il fluido è in movimento in ogni parte del condotto, pertanto non sono presenti zone di ristagno.

Le linee di flusso del fluido a monte e a valle del patch sono riportate in Figura 4.21:

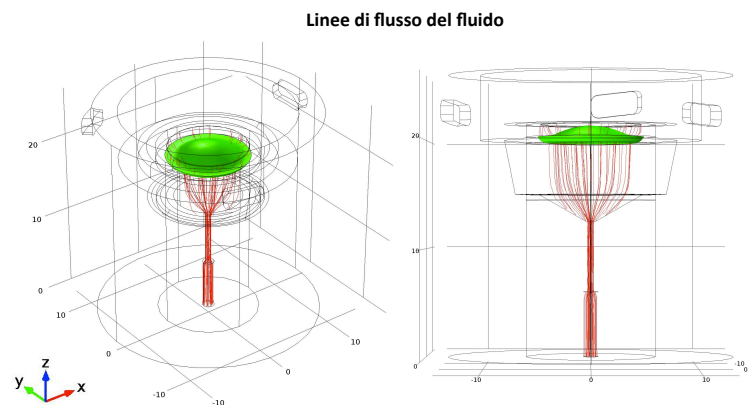


Figura 4.21: Linee di flusso (streamlines) del fluido all'interno della camera; a sinistra: vista tridimensionale, a destra: vista frontale. In figura il patch è raffigurato in verde in configurazione deformata; tempo di simulazione $t = 30$ minuti.

Come mostrato in Figura 4.21, la distribuzione delle linee di flusso all'interno della camera appare uniforme nella zona di interfaccia con il patch: in questo modo è garantita la perfusione dell'intera superficie disponibile del patch.

4.2.2 Collaudo e messa in opera del prototipo di sistema di coltura realizzato

Dopo aver definito le condizioni di lavoro da applicare all'interno del bioreattore in fase di ricellularizzazione del tessuto di vescica, un altro step fondamentale consiste nel collaudo e nella messa in opera del prototipo del sistema di coltura descritto nel *Paragrafo 3.1.2*. In

particolare, il collaudo prevede la verifica della tenuta idraulica del bioreattore, in modo che durante la fase di sollecitazione del patch con medium di coltura non si verifichino trafiletti di fluido verso l'esterno della camera, che potrebbero causare sia contaminazione batterica, sia lo svuotamento del circuito e quindi la perdita di funzionalità del sistema.

In seguito il sistema è stato messo in opera, al fine di effettuare una prova di verifica del mantenimento della sterilità che confermasse la capacità del sistema in esercizio di evitare infiltrazioni batteriche all'interno della camera, garantendo così le condizioni sterili necessarie per la coltura cellulare. Nelle seguenti sezioni sono riportati i risultati ottenuti dalle prove di tenuta idraulica e della verifica del mantenimento di sterilità.

4.2.2.1 Prove di tenuta idraulica

Le prove di tenuta idraulica hanno permesso di verificare l'assenza di trafiletti di fluido nel bioreattore in fase di perfusione soprattutto nelle regioni critiche del bioreattore stesso, ossia all'interfaccia fra housing e cartuccia portascaffold e nella regione del portascaffold in cui viene fissato il patch di vescica tramite o-ring. Per tutti i materiali testati (lattice, pellicola di polipropilene, parafilm) la prova ha mostrato rottura del campione. In Figura 4.22 viene mostrato il patch vincolato nella cartuccia durante una prova di tenuta idraulica eseguita su un campione in lattice, con risultato finale la rottura del patch.

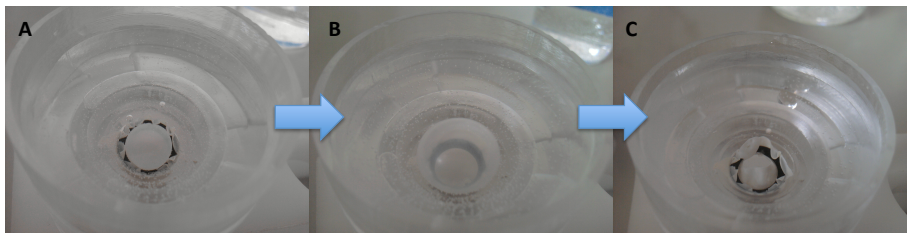


Figura 4.22: Prova di tenuta idraulica applicato su patch in lattice. Il campione, vincolato nel portascaffold e inserito nel bioreattore, è stato perfuso e deformato (A, B) fino a rottura (C).

Durante ciascuna prova è stata misurata la pressione ai capi del campione per verificare che non si verificassero trafiletti di fluido a livello della cartuccia portascaffold o del punto di vincolo del patch alla cartuccia tramite o-ring. Per ogni campione è stato rilevato un continuo aumento di pressione. I valori di pressione rilevati non vengono riportati: infatti, per ciascuna prova la pressione ha raggiunto il valore di saturazione del sensore

(pari a 200 mmHg) prima della rottura del campione: per tale motivo non è stato possibile monitorare la pressione per tutta la durata della prova ovvero fino alla rottura del patch, ma solo nella fase iniziale.

I risultati del test di tenuta idraulica dimostrano quindi l'efficacia del sistema di perfusione progettato per la stimolazione del patch di tessuto.

4.2.2.2 Prove di verifica del mantenimento della sterilità

Le prove di verifica del mantenimento della sterilità hanno permesso di verificare se il sistema di coltura, in condizioni di sollecitazione in incubatore per una durata di 7 giorni, fosse in grado di preservare la sterilità di tutti i suoi componenti (camera di coltura e circuito idraulico di perfusione, tra loro disaccoppiati a causa della presenza di un patch in lattice e quindi impermeabile). Le prove sono state effettuate sia sul bioreattore modificato, realizzato in questo lavoro di tesi, sia sul bioreattore non modificato. In entrambi è stata inserita la cartuccia portascaffold modificata, con alloggiato al suo interno un patch di guanto in lattice per simulare la presenza del patch di tessuto nella camera. I risultati del bioreattore originale sono stati considerati come controllo per valutare l'efficacia in termini di mantenimento della sterilità del prototipo progettato nel contesto di questo lavoro di tesi. I prelievi, effettuati ai set-point definiti nel *Paragrafo 3.2.2.2*, sono stati analizzati attraverso test microbiologici per valutare l'eventuale presenza di batteri aerobi o anaerobi o di miceti. Il referto delle analisi microbiologiche, allegato in *APPENDICE D*, ha mostrato i seguenti risultati:

- Tempo 0: assenza di contaminazione sia nel contenitore di medium, sia nei due bioreattori, sia nei reservoir esterni.
- Tempo 1 (dopo 5 ore di attività del sistema sotto cappa): assenza di contaminazione all'interno dei due bioreattori.
- Tempo 2 (dopo 7 giorni di attività del sistema in incubatore): assenza di contaminazione, sia nei due bioreattore, sia nei reservoir esterni

Le prove dunque hanno dimostrato che il sistema di coltura progettato in questo lavoro di tesi è in grado di preservare la sterilità in condizioni di sollecitazione all'interno di un ambiente non sterile, sia nel circuito idraulico, sia nel reservoir interno della camera grazie alla presenza del coperchio Petri.

Le prove di verifica del mantenimento della sterilità sono da intendersi anche come collaudo funzionale del sistema di coltura dinamico progettato, al fine di valutare che la sollecitazione all'interno del bioreattore sia stata applicata sul patch in maniera corretta. Da questo punto di vista, durante la prova è stato osservato un progressivo svuotamento del tratto di circuito idraulico a monte del patch, impedendo così al medium di sollecitare direttamente il patch nella camera. Il problema non sembra essere dovuto a perdite del circuito in quanto non è stato osservato trafileamento di medium né dalle camere, né da nessuno dei connettori *luer* utilizzati. La causa principale che potrebbe aver portato a questo effetto indesiderato dunque consiste nell'evaporazione del medium di coltura a causa di un livello di umidità all'interno dell'incubatore non appropriato. Al giorno 3 infatti, durante la procedura di cambio del medium, è stato osservato che il serbatoio d'acqua dell'incubatore era vuoto. L'assenza di acqua deionizzata può aver creato dunque all'interno dell'incubatore un ambiente più secco, il quale può aver così accelerato il processo di evaporazione del medium dalle pareti dei tubi, permeabili al fine di permettere l'ossigenazione del medium al loro interno.

Nonostante ciò, il sistema nei primi tre giorni di attività è stato in grado di sollecitare il patch sterile posizionato nella camera in maniera conforme con le aspettative, e anche nei restanti quattro giorni ha portato il patch a deflessione, inferiore a quella desiderata, ma comunque in grado di simulare la distensione di un patch di tessuto decellularizzato e seminato posto in coltura all'interno della camera.

Questo risultato dunque è un'ulteriore conferma che il sistema di coltura progettato e realizzato in questo lavoro di tesi può essere considerato un possibile candidato per la coltura dinamica *in vitro* di un patch di tessuto di vescica decellularizzato.

CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

Nel presente lavoro di tesi, svolto presso il μ BS Lab del Dipartimento di Bioingegneria del Politecnico di Milano in collaborazione con il Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie dell'Università degli Studi di Milano, gli obiettivi principali prefissati sono stati i) la caratterizzazione, principalmente meccanica, del tessuto di vescica decellularizzato in seguito all'applicazione di un nuovo protocollo di decellularizzazione dinamica, ideato e messo a punto presso il μ BS Lab e il Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, al fine di valutarne l'efficacia; ii) la progettazione, realizzazione e il collaudo di una camera di perfusione dinamica in grado di sollecitare un patch di tessuto da ricellularizzare; nell'ambito di questa parte del lavoro sono state anche definite le condizioni di lavoro della camera di perfusione per applicare una stimolazione meccanica fisiologica in grado di replicare la dinamica di riempimento e svuotamento tipica della vescica.

Il protocollo di decellularizzazione di una vescica intera, finalizzato all'ottenimento di una matrice utilizzabile come scaffold per la semina di cellule uroteliali (UCs) e cellule muscolari lisce (SMCs), è stato messo a punto in modo da preservare le proprietà strutturali e funzionali delle componenti della ECM.

Il protocollo di decellularizzazione, applicato su vescica di coniglio, consiste di cicli ripetuti di perfusione dinamica dell'organo con i) soluzione ipotonica per causare lisi della membrana cellulare per shock osmotico e ii) detergenti non ionici per rompere le interazioni tra cellule ed ECM (in particolare le interazioni lipide-lipide e lipide-proteina), mantenendo intatte le interazioni proteina-proteina della matrice.

Dall'analisi istologica è emerso che la matrice ottenuta con il protocollo di decellularizzazione dinamico 8+8+1 con portata di 5 ml/min e volume massimo infuso di 20 ml non mostra evidenza di nuclei cellulari residui. L'analisi quantitativa del DNA residuo del tessuto al termine del processo di decellularizzazione mostra un valore inferiore al 5%, valore in linea con i dati di letteratura riportati per scaffold biologici decellularizzati. La matrice ottenuta, inoltre, è caratterizzata da una buona conservazione delle fibre del tessuto connettivo. Il metodo di decellularizzazione statico, simile a protocolli già descritti in letteratura [11, 12, 41, 43-45], applicato per la stessa durata di tempo ha mostrato la presenza di nuclei residui nel tessuto e una alterazione evidente

dell'organizzazione delle fibre di collagene nella matrice. In seguito ad entrambi i processi di decellularizzazione (statico e dinamico), la parziale disorganizzazione delle fibre del connettivo ha determinato un aumento delle dimensioni dell'organo decellularizzato, richiedendo così una caratterizzazione meccanica meglio mirata a determinare in maniera più dettagliata l'efficacia del protocollo di decellularizzazione valutato.

Dalla caratterizzazione meccanica è emerso che la matrice decellularizzata mantiene le stesse proprietà di distensibilità dell'organo nativo, a meno di un volume iniziale (*ZPV*) richiesto per distendere le pareti in seguito alla dilatazione dell'organo provocata durante il trattamento di decellularizzazione. Questa dilatazione è dovuta principalmente all'azione degli agenti decellularizzanti i quali, rimuovendo le cellule dal tessuto, vanno a alterare leggermente la stratigrafia delle fibre della matrice, incrementando così la porosità del tessuto.

Il test di trazione monoassiale ha mostrato che le proprietà meccaniche del tessuto sono state preservate. Inoltre, le prove di permeabilità hanno evidenziato un coefficiente *K* della matrice in seguito al processo di decellularizzazione dinamica, pari a $2.03 \mu\text{l min}^{-1}\text{mmHg}^{-1}$, valore questo inferiore rispetto a quelli riportati in letteratura, ottenuti però per tessuti trattati con processi di decellularizzazione differenti rispetto a quelli utilizzati in questo lavoro [52, 53].

Da tutte queste considerazioni dunque si può concludere che il nuovo protocollo di decellularizzazione dinamica di vescica proposto consente di ottenere una matrice adatta all'utilizzo come scaffold per impianto in applicazioni di ingegneria del tessuto vescicale, in quanto priva di materiale cellulare e contenuto nucleico in grado di generare risposte immunitarie avverse da parte delle cellule seminate e con proprietà meccaniche adeguate. Uno sviluppo del lavoro di caratterizzazione della matrice che può essere svolto consiste nell'esecuzione di un'analisi immunologica sul tessuto di vescica decellularizzato al fine di verificare che effettivamente il quantitativo di DNA residuo non generi risposte infiammatorie e che le proteine residue nella matrice non generino risposte immunitarie avverse. In particolare, a breve termine possono essere effettuati studi di ricellularizzazione *in vitro* della matrice ottenuta in seguito al processo di decellularizzazione, mentre a lungo termine si possono prevedere prima degli impianti *in vivo* sottocutanei in modello animale, poi degli impianti funzionali, andando a inserire il patch di vescica a livello della vescica dell'animale (coniglio).

Un ulteriore sviluppo a breve termine per quanto riguarda la caratterizzazione della matrice potrebbe consistere in un'analisi più approfondita della composizione del tessuto in seguito al processo di decellularizzazione, sia andando a verificare tramite analisi immunostochimica diverse componenti proteiche di interesse della matrice quali i diversi tipi di collagene presenti, vimentina, desmina e α -actina dei muscoli lisci, sia andando ad effettuare delle analisi per confrontare le quantità di collagene e di glicosamminoglicani presenti nel tessuto decellularizzato rispetto a quelle del tessuto nativo.

In una seconda fase del lavoro di tesi, si è passati alla progettazione e alla realizzazione di un prototipo di bioreattore per la sollecitazione dinamica di patch di vescica da ricellularizzare, a partire da un bioreattore a perfusione già esistente finalizzato alla co-coltura di cellule staminali ematopoietiche e cellule stromali del midollo osseo [69]. Sono state necessarie delle modifiche al progetto originale per adattare il bioreattore sia all'utilizzo di uno scaffold di matrice decellularizzata, bidimensionale e flessibile (a differenza dello scaffold 3D e poroso utilizzato in precedenza), sia a un tipo di sollecitazione ciclica volta a riprodurre le condizioni di riempimento e svuotamento della vescica (a differenza della perfusione confinata prevista in precedenza). Le modifiche principali hanno riguardato la cartuccia portascaffold della camera, in modo da permettere il fissaggio del patch al suo interno, e il sistema di chiusura del reservoir, affinché fosse possibile utilizzare un coperchio Petri trasparente anziché (come nel sistema originale) un tappo di una Flask. Le tecnologie utilizzate per la realizzazione della cartuccia portascaffold e del reservoir del bioreattore hanno permesso di ottenere una camera in grado di garantire la tenuta idraulica del sistema evitando trafiletti di fluido, di agevolare e garantire il fissaggio del patch per la successiva stimolazione e di soddisfare la specifica di trasparenza, assente nel prototipo di partenza, specifica questa funzionale per l'ispezione visiva del patch durante la stimolazione nel bioreattore. Una volta realizzato il bioreattore, sono stati utilizzati un modello analitico e un modello computazionale per la determinazione delle condizioni di lavoro del bioreattore ed in particolare del valore di portata di perfusione da utilizzare in fase di coltura dinamica per applicare una sollecitazione fisiologica al patch di vescica. L'utilizzo combinato dei due modelli ha permesso di determinare che una portata di 1 $\mu\text{l}/\text{min}$, applicata per 30 minuti in base al protocollo di stimolazione descritto nel *Paragrafo 3.1.2*, sia il valore di portata che consente di distendere il patch in maniera fisiologica e di applicare sulla matrice una

pressione di circa 3 mmHg, in accordo con i risultati delle prove di cistometria effettuate sull'organo intero. Una volta definito il valore di portata di perfusione, il protocollo di stimolazione è stato completato definendo una fase di svuotamento, effettuato con una portata di 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ applicata per 3 minuti. Il modello computazionale inoltre ha confermato, analizzando le linee di flusso del fluido, che il patch nella camera di coltura viene investito dal fluido in tutta la superficie disponibile, massimizzando così l'efficacia della sollecitazione.

Una criticità riscontrata in fase di determinazione delle condizioni di lavoro della camera di coltura può essere rappresentata dalla non perfetta riproducibilità della curva P-V sperimentale di cistometria da parte del modello analitico basato sulla legge di Laplace. Il modello, infatti, pur riproducendo la curva cistometrica media nella regione ad alto volume di riempimento, non è in grado di rappresentare correttamente il primo tratto di curva. Ciò è probabilmente dovuto all'interpolazione con retta di regressione del tratto iniziale della curva σ - ε ricavata dalle prove di trazione monoassiale; il tratto iniziale infatti era molto rumoroso e ridotto, a causa del pre-condizionamento imposto ai provini testati. Per verificare se il modello sia in grado di riprodurre meglio le curve P-V cistometriche, si potrebbero svolgere delle prove di trazione monoassiale senza eseguire il pre-condizionamento, per ricavare così direttamente dalla curva sperimentale i dati del tratto a bassa pendenza da utilizzare nel modello analitico.

La messa in opera del sistema per la prova di sterilità infine ha mostrato la capacità del sistema di coltura di mantenere la sterilità dopo 7 giorni di attività in ambiente non sterile (incubatore), individuando nel bioreattore progettato un possibile candidato per la rigenerazione *in vitro* di tessuto ingegnerizzato su patch di vescica.

Una criticità emersa dalla messa in opera del sistema consiste nel progressivo svuotamento del circuito idraulico durante l'applicazione della sollecitazione. Ciò può essere dovuto principalmente all'evaporazione del medium di coltura presente nel circuito dovuta al non corretto livello di umidità presente nell'incubatore. Al fine di evitare situazioni simili in cui la stimolazione del patch di vescica viene a mancare, uno sviluppo a breve termine di questo lavoro di tesi può essere la realizzazione di un sistema retroazionato che sia in grado di mantenere sempre una condizione di sollecitazione fisiologica sul patch. In particolare, dovrà essere sviluppato il software che permette di imporre alla pompa delle portate prestabilite, volte a sollecitare la matrice di vescica da ricellularizzare, e di

controllare il livello di sollecitazione del patch, in modo così da retroazionare il sistema. Per il controllo, può essere utilizzata una delle due possibili soluzioni qui descritte:

- Controllo della caduta di pressione sul patch: il software per mezzo di un sensore di pressione acquisisce istante per istante il valore di pressione che si sviluppa a livello del patch durante la sollecitazione; una volta raggiunta la pressione di 3 mmHg (valore fisiologico desiderato in accordo con le analisi cistometriche) il software interrompe la perfusione ed abilita automaticamente la fase di scarico del patch invertendo il senso di rotazione della pompa.
- Controllo del valore di deformazione imposta sulla matrice sollecitata: un sensore apposito deve essere in grado di misurare istante per istante il valore di deformazione di un punto della matrice (scelto come riferimento) durante la stimolazione; una volta raggiunto il valore soglia (determinabile grazie all'utilizzo del modello computazionale sviluppato in questo lavoro di tesi) il software inverte il senso di rotazione della pompa, iniziando così la fase di svuotamento rimozione della sollecitazione.

Un interessante sviluppo del presente lavoro potrebbe essere la contemporanea messa in opera dei due sistemi di sensorizzazione della camera: mentre una delle due variabili (pressione o deformazione) può essere utilizzata come variabile di controllo del sistema di retroazione, l'altra può essere utilizzata come monitoraggio del corretto funzionamento del sistema, in modo così da permettere all'operatore di verificare in tempo reale che il processo di stimolazione sia efficace e/o di poter eventualmente intervenire e modificare i parametri di sollecitazione anche in caso di malfunzionamento del sistema di retroazione.

Per quanto riguarda il sensore di monitoraggio della deformazione, una ricerca di mercato ha permesso di individuare come possibile soluzione il distanziometro laser ATLAS 5 (LAP, Lueneburg, Germany), mostrato in Figura 5.1:

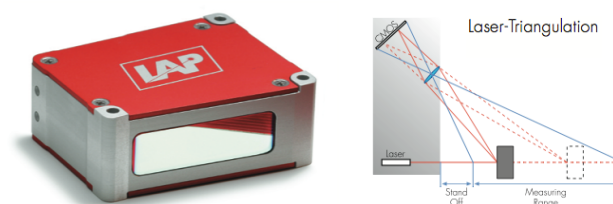


Figura 5.1: Distanziometro laser LAP (a sinistra) e uno schema del principio di funzionamento del distanziometro (a destra).

Il sensore, molto compatto e leggero, è in grado di identificare spostamenti massimi di 5 mm, con una risoluzione nell'ordine dei nanometri e con una frequenza di campionamento del valore di spostamento superiore ai 10 kHz; per questo motivo risulta essere un'ottima soluzione per il monitoraggio *real-time* delle deflessioni della matrice in fase di sollecitazione. A partire dalla misura della deflessione di un punto del patch è infatti possibile, eventualmente tramite la progettazione di un software integrato, determinare il valore di deformazione imposto. Prima dell'utilizzo, il sensore deve essere calibrato, in modo da eliminare l'eventuale disturbo dato dalla presenza del medium di coltura interposto tra il sensore stesso e il patch. A tal riguardo, dovrà essere anche valutato che lo spostamento di medium di coltura dato dalla distensione del patch non sia fonte di rumore per la misura della deflessione del patch.

Un ulteriore sviluppo a breve termine di questo lavoro di tesi potrebbe consistere inoltre nella sostituzione della pompa utilizzata per la prova di collaudo del sistema di coltura dinamico (IPC-12, Ismatec, Wertheim-Mondfeld, Germania), pesante e voluminosa, con una pompa peristaltica miniaturizzata, leggera e portatile, in grado di soddisfare la specifica di progetto relativa all'ingombro ridotto e di generare il range di portate, definito in questo lavoro di tesi in seguito a simulazioni tramite modello computazionale, che va da 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ a 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ per la sollecitazione del patch. Un'ulteriore indagine di mercato ha permesso di identificare nella pompa P625/10K.143 (Instech laboratories, Plymouth Meeting, PA, USA), mostrata in Figura 5.2, un candidato ideale:

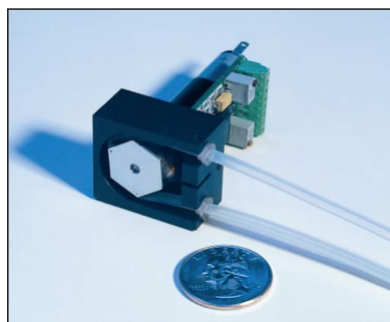


Figura 5.2: Pompa P625/10K.143, confrontata con una moneta per mostrare il grado di miniaturizzazione della pompa.

La pompa P625/10K.143 infatti è in grado, con un tubo sottopompa di 0.51 mm di diametro interno, di generare un range di portate che va da 0.6 a 12 $\mu\text{l}/\text{min}$, che include al suo interno al range definito in questo lavoro di tesi per sollecitare il patch di vescica. La

pompa inoltre può essere azionata e controllata in remoto attraverso software: in questo modo può essere applicata una retroazione sulla pompa, in modo così da mantenere sempre uno stato di sollecitazione fisiologico del patch di tessuto decellularizzato.

Una volta apportate le modifiche sopra descritte al set-up del sistema di coltura, un ulteriore sviluppo potrebbe essere la realizzazione di un sistema multi-canale che consenta di svolgere in parallelo più campagne sperimentali. La presenza di più canali permetterebbe di condurre in parallelo diverse campagne sperimentali di stimolazione del patch da ricellularizzare, indipendenti tra di loro così da garantire a tutti i tessuti coltivati le stesse condizioni ambientali di lavoro, permettendo per questo motivo un confronto più attendibile dei risultati raggiunti in seguito al processo di coltura dinamica.

Un passaggio successivo a lungo termine del lavoro consiste nell'effettuare delle campagne sperimentali su tessuti ricellularizzati con cellule primarie quali UCs e SMCs, per verificare che effettivamente la sollecitazione applicata sul tessuto con le condizioni di lavoro definite in questo lavoro di tesi favorisca vitalità, adesione e proliferazione cellulare, così come la sintesi da parte delle cellule di nuova matrice e quindi la formazione di un tessuto ingegnerizzato funzionale, tale da poter essere impiantato *in vivo* nel modello animale. Questa fase potrebbe permettere quindi un'eventuale ottimizzazione del protocollo di stimolazione al fine di favorire una sollecitazione migliore da applicare alle cellule. Inoltre, un altro aspetto di sicuro interesse nel campo dell'ingegneria dei tessuti, consiste nel prevedere la semina sul patch di cellule staminali e la determinazione di un corretto protocollo di differenziamento verso il fenotipo uroteliale e muscolare, attraverso l'utilizzo del sistema di coltura realizzato nell'ambito del presente lavoro.

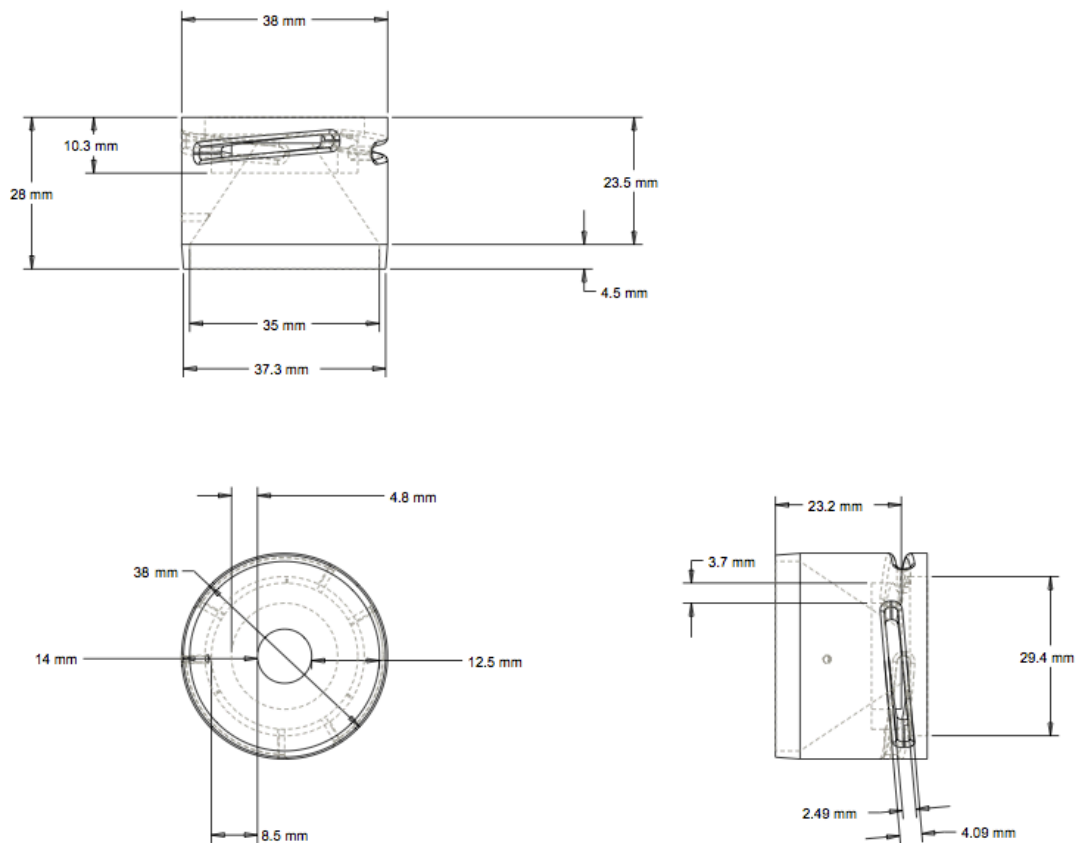
Infine, in futuro, una volta definiti i parametri di semina (ad esempio la densità di semina sul tessuto) e di stimolazione delle cellule sulla matrice di tessuto decellularizzato grazie alle campagne sperimentali su patch, sarebbe interessante riuscire a effettuare campagne sperimentali di ricellularizzazione dell'organo intero, in modo da verificare se le conclusioni tratte dalle analisi sulla patch di tessuto possano essere estese anche alla condizione di organo intero. Idealmente, un candidato come sistema di coltura dinamico per organo intero di vescica ricellularizzato potrebbe essere un sistema simile al set-up multicanale utilizzato per il protocollo di decellularizzazione dinamica dell'organo intero di vescica, in grado però di mantenere la sterilità dell'organo trattato. Il set-up infatti, oltre a consentire l'esecuzione del processo di decellularizzazione dell'organo, è in grado anche

di fornire una sollecitazione adeguata per l'ingegnerizzazione del tessuto in seguito a ricellularizzazione. Gli studi sull'organo interno potrebbero essere un primo ma notevole passo al fine un domani di permettere il ripristino della funzionalità del sistema urovescicale anche in pazienti che richiedono un intervento di cistectomia totale.

APPENDICE A

DISEGNO TECNICO

Di seguito è riportato il disegno tecnico del reservoir modificato della bioreattore per la perfusione di patch di vescica decellularizzato.



APPENDICE B

FISICA “FLUID-STRUCTURE INTERACTION” (FSI) UTILIZZATA NELLA MODELLIZZAZIONE COMPUTAZIONALE DI PERFUSIONE DEL PATCH DI VESCICA RICELLULARIZZATO

Equazioni alla base della FSI

La fisica considerata per l’analisi computazionale in ambiente Comsol© permette di accoppiare (all’interfaccia) il comportamento fluidodinamico del liquido all’eventuale deformazione meccanica che questo va ad applicare sulla parte solida del modello. Per fare ciò, giacché il software Comsol utilizza l’approccio agli elementi finiti per ogni dominio della geometria (sia esso fluido o solido), è importante considerare una discretizzazione a moving mesh, in modo che i vari movimenti sia del fluido sia del solido vengano non solo simulati, ma anche tenuti in conto, in modo da predire un eventuale cambio di comportamento fisico dovuto alle variazioni geometriche.

La componente fluidodinamica viene descritta dall’equazione di Navier-Stokes, la quale permette di definire in maniera globale il comportamento del fluido (incomprimibile) in moto (ricavando in particolare il campo di velocità in tutto il volume fluido, così come i valori di pressione):

$$\rho \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} + \rho(\mathbf{u} \cdot \nabla)\mathbf{u} = \nabla \cdot [-p\mathbf{I} + \mu(\nabla\mathbf{u} + (\nabla\mathbf{u})^T)] + \mathbf{F} \quad (1)$$

$$\rho \nabla \cdot \mathbf{u} = 0 \quad (2)$$

dove p è la pressione, μ è la viscosità dinamica del fluido, ρ è la densità del fluido, \mathbf{F} sono le forze di volume, \mathbf{u} è la velocità del fluido, \mathbf{I} la matrice identità (i vettori sono rappresentati in grassetto).

Noto ciò, all’interfaccia fluido-solido è possibile ricavare la forza totale esercitata dal fluido in moto sul solido (\mathbf{f}) a partire dalla velocità di partenza del fluido stesso (\mathbf{u}_{fluid}). Questa forza non è nient’altro che il negativo della reazione vincolare che si ha nel liquido a contatto con il solido:

$$\mathbf{f} = \mathbf{n} \cdot \left\{ -p\mathbf{I} + \left(\mu(\nabla\mathbf{u}_{fluid} + (\nabla\mathbf{u}_{fluid})^T) - \frac{2}{3}\mu(\nabla \cdot \mathbf{u}_{fluid})\mathbf{I} \right) \right\} \quad (3)$$

dove \mathbf{n} è la normale all'interfaccia (diretta verso l'esterno del fluido).

Visto che le equazioni di Navier-Stokes sono risolte nel frame spaziale (deformato) mentre le interfacce del solido sono definite in un frame fisso chiamato “*frame materiale*”, è necessaria una trasformazione di forze, ottenuta a partire dalla seguente relazione:

$$\mathbf{F} = \mathbf{f} \cdot \frac{dv}{dV} \quad (4)$$

dove dv e dV sono i fattori di scala per gli elementi delle mesh per il frame spaziale e il frame materiale, rispettivamente.

Nel dominio solido, l'accoppiamento è dato dalle variazioni di posizione del solido nel tempo, che si possono definire come la velocità di movimento del solido:

$$\frac{\partial \mathbf{u}_{solid}}{\partial t} \quad (5)$$

In particolare, la *FSI* impone come condizione di interfaccia che alla velocità del fluido corrisponda uno spostamento della parete, e che questo vada ad imporre la velocità di movimento del solido, causando quindi degli stress interni al solido che corrispondono fondamentalmente al contributo della forza \mathbf{f} definita nell'equazione (3). Tutto ciò è descritto dalle seguenti equazioni:

$$\mathbf{u}_{fluid} = \mathbf{u}_w \quad (6)$$

$$\mathbf{u}_w = \frac{\partial \mathbf{u}_{solid}}{\partial t} \quad (7)$$

$$\boldsymbol{\sigma} \cdot \mathbf{n} = \boldsymbol{\Gamma} \cdot \mathbf{n}, \quad \boldsymbol{\Gamma} = \left[-p\mathbf{I} + \left(\mu(\nabla\mathbf{u}_{fluid} + (\nabla\mathbf{u}_{fluid})^T) \right) \right] \quad (8)$$

La componente di meccanica del solido dunque parte da questa velocità di movimento della parte solida \mathbf{du}_{solid}/dt (che a sua volta varia nel tempo, definendo così

un'accelerazione) data dalla forza del fluido per calcolare il tensore di sforzi che agisce all'interno del solido stesso:

$$\rho \frac{\partial^2 \mathbf{u}_{solid}}{\partial t^2} - \nabla \cdot \boldsymbol{\sigma} = \mathbf{F}_v, \quad \boldsymbol{\sigma} = j^{-1} \mathbf{F} \mathbf{S} \mathbf{F}^T, \quad \mathbf{F} = (\mathbf{I} + \nabla \mathbf{u}_{solid}), \quad j = \det(\mathbf{F}) \quad (9)$$

Noto il tensore degli sforzi \mathbf{S} , è possibile ottenere il tensore di deformazioni:

$$\mathbf{S} - \mathbf{S}_0 = \mathbf{C} : (\boldsymbol{\varepsilon} - \boldsymbol{\varepsilon}_0 - \boldsymbol{\varepsilon}_{inel}) \quad (10)$$

Dove \mathbf{S}_0 ed $\boldsymbol{\varepsilon}_0$ sono sforzi e deformazioni iniziali, $\boldsymbol{\varepsilon}_{inel}$ sono le deformazioni inelastiche, \mathbf{C} è il tensore di elasticità (ottenuto a partire dai valori di E e ν caratteristici del materiale utilizzato), che nel caso di iperelasticità si riduce al tensore simmetrico D :

$$D = \frac{E}{(1+\nu)(1-2\nu)} \begin{bmatrix} 1-\nu & \nu & \nu & 0 & 0 & 0 \\ \nu & 1-\nu & \nu & 0 & 0 & 0 \\ \nu & \nu & 1-\nu & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \frac{1-2\nu}{2} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & \frac{1-2\nu}{2} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \frac{1-2\nu}{2} \end{bmatrix} \quad (11)$$

A questo punto, note le deformazioni, è possibile ricalcolare le variazioni di posizione del solido:

$$\boldsymbol{\varepsilon} = \frac{1}{2} (\nabla \mathbf{u} + \nabla \mathbf{u}^T) \quad (12)$$

Condizioni al contorno della interfaccia FSI

Per far sì che la simulazione fornisca risultati significativi, è importante definire delle condizioni al contorno ottimali. Essendo un'interfaccia multi-fisica, le condizioni al

contorno sono riferite sia alla parte fluidodinamica, sia alla parte di meccanica del continuo. Le principali condizioni al contorno qui considerate sono:

- Velocità di ingresso del fluido nello spazio considerato
- Valore di pressione all'uscita dello spazio considerato
- Vincoli di fissaggio del solido all'interno dello spazio considerato
- Assenza di scorrimento a livello delle pareti (*no slip condition*)
- Materiali: è importante definire i materiali per avere i valori corretti dei parametri che saranno usati nelle equazioni (tra cui ad esempio la densità, la viscosità dinamica, il modulo di Young, ecc). Nella simulazione compiuta in questo lavoro di tesi, come materiali sono stati presi l'acqua (presente nella libreria dei materiali di Comsol) per la parte fluida, e la vescica (materiale creato *ad hoc*, di cui sono state definite la densità, il modulo di Young e il coefficiente di Poisson) per la parte solida. Anche la camera e la cartuccia portascaffold sono stati associati a dei materiali (PMMA e Silicone, rispettivamente), ma non sono stati considerati nella simulazione.
- Tipo di fluido: Il fluido è stato considerato incomprimibile.

Risolutore

Le equazioni nella simulazione specifica di questo lavoro di tesi sono state sviluppate con un risolutore tempo-dipendente completamente accoppiato: tempo dipendente principalmente perché compiere uno studio stazionario risultava essere difficile in quanto nel modello analizzato non c'è una vera e propria condizione di regime a cui puntare (si potrebbe paradossalmente dire che l'unica condizione di regime possibile in questo specifico caso corrisponde alla rottura del patch); completamente accoppiato perché le due fisiche considerate sono interdipendenti tra di loro, e quindi una non può essere risolta senza l'altra e viceversa.

APPENDICE C

PROTOCOLLO DI ASSEMBLAGGIO DEL CIRCUITO SOTTO CAPP A PER LE PROVE DI VERIFICA DEL MANTENIMENTO DELLA STERILITÀ

Di seguito sono riportati: i) l'organizzazione delle buste per la sterilizzazione; ii) il protocollo per l'assemblaggio del sistema di coltura per le prove di verifica del mantenimento della sterilità.

Componenti e strumenti per l'assemblaggio del sistema di coltura

- Componenti sterilizzati dei due bioreattori, quello di partenza (*bioreattore 1*) e quello modificato (*bioreattore 2*) (housing, reservoir interno).
- Supporto per i bioreattori.
- coperchio Petri e tappo Flask sterilizzati.
- Cartucce portascaffold sterilizzate con i rispettivi o-ring per il fissaggio del campione.
- Circuiteria sterilizzata (4 tubi in silicone di lunghezza $l=80$ cm, 9 tubi in silicone di lunghezza variabile inferiore ai 10 cm, 2 tubi sottopompa Pharmed, 2 tubi per la raccolta del medium dai reservoir esterni) con i connettori non calzati.
- Reservoir esterni con relativi tappi.
- Guanti sterili da cui prelevare il patch per la prova.
- Pinze e forbice sterilizzate.
- Siringa sterile senza ago da 10 ml.
- Pompa peristaltica.

Organizzazione delle buste di sterilizzazione

- Busta *AUTOCLAVE 1*: contiene il reservoir esterno, il tappo del reservoir esterno, la cartuccia portascaffold, la circuiteria e i connettori associati al Bioreattore 1.
- Busta *AUTOCLAVE 2*: contiene il reservoir esterno, il tappo del reservoir esterno, la cartuccia portascaffold la circuiteria e i connettori associati al Bioreattore 2.
- Busta *AUTOCLAVE 3*: contiene le pinze metalliche e le forbici metalliche.

- Busta *STERRAD 1*: contiene le componenti del bioreattore 1 (housing, reservoir interno, tappo Flask).
- Busta *STERRAD 2*: contiene sottopompa, tubo interno del reservoir esterno, o-ring, filetti con rispettiva guarnizione associati al bioreattore 1. Contiene anche gli strumenti per l'alloggiamento del campione.
- Busta *STERRAD 3*: contiene le componenti del bioreattore 2 (housing, reservoir interno, coperchio Petri).
- Busta *STERRAD 4*: contiene sottopompa, tubo interno del reservoir esterno, o-ring, filetti con rispettiva guarnizione associati al Bioreattore 2.

Procedura di montaggio

- i) Collocare le buste contenenti i componenti sterilizzati sotto cappa a flusso laminare;
- ii) Individuare la busta *AUTOCLAVE 1*;
- iii) Prelevare il reservoir esterno e riempirlo di mezzo di coltura per travaso dal contenitore;
- iv) Prelevare dalla busta *AUTOCLAVE 1* il tappo del reservoir esterno associato al bioreattore 1;
- v) Individuare la busta *STERRAD 2*;
- vi) Prelevare dalla busta *STERRAD 2* il tubo interno del reservoir esterno e inserirlo le foro interno del tappo del reservoir esterno;
- vii) Avvitare il tappo sul reservoir esterno;
- viii) Prelevare dalla busta *AUTOCLAVE 1* un tubo corto di silicone;
- ix) Prelevare dalla busta *STERRAD 2* un filetto con rispettiva guarnizione montata, calzarlo su un'estremità del tubo corto e inserirlo in uno dei fori del tappo del reservoir esterno;
- x) Ripetere i passaggi viii) e ix) per altre due volte, in modo da occupare tutti i fori del tappo del reservoir esterno;
- xi) Calzare sull'estremità libera di due dei tre tubi un connettore femmina, sull'estremità libera dell'ultimo tubo un connettore maschio; uno dei due connettori femmina deve essere posizionato in corrispondenza del tubo interno del reservoir esterno;

- xii) Prendere un rubinetto a tre vie sterile e collegarlo al tubo con connettore femmina corrispondente al foro di inserimento del tubo interno del reservoir esterno;
- xiii) Prendere un filtro HEPA e collegarlo al tubo con connettore maschio;
- xiv) Chiudere il tubo con connettore femmina rimanente con tappo sterile;
- xv) Posizionare il supporto per i bioreattori sotto cappa;
- xvi) Individuare la busta contenente le componenti del bioreattore 1 (busta *STERRAD 1*);
- xvii) Aprire la busta, prelevare l'housing maneggiandolo sulla parte inferiore tenendolo con il connettore verso il basso e posizionarlo sul supporto;
- xviii) prelevare dalla busta *AUTOCLAVE 1* un tubo corto di silicone e calzare un'estremità del tubo sul connettore dell'housing;
- xix) Prelevare dalla busta un connettore femmina e calzarlo nella parte opposta del tubo;
- xx) Prelevare dalla busta un tubo di l=80 cm, calzare alle estremità due connettori (uno maschio e una femmina) e collegarlo al tubo dell'housing;
- xxi) Prelevare dalla busta *STERRAD 2* il tubo sottopompa, calzare alle estremità due connettori (uno maschio e uno femmina) e collegarlo al tubo di l=80 cm collegato all'housing;
- xxii) Prelevare dalla busta *AUTOCLAVE 1* un tubo di l=80 cm, calzare alle estremità due connettori (uno maschio e una femmina) e collegarlo al sottopompa;
- xxiii) Collegare l'estremità opposta del rubinetto a tre vie presente sul tappo del reservoir esterno con la circuiteria appena montata;
- xxiv) Prelevare dalla busta *AUTOCLAVE 1* la cartuccia portasccaffold in silicone;
- xxv) Identificare la busta *AUTOCLAVE 3* e prelevare una pinza e una forbice;
- xxvi) Prendere il guanto sterile con una pinza e rimuovere con la forbice una parte di un dito del guanto;
- xxvii) Rimuovere tramite forbice la cupola del dito tagliato;
- xxviii) Tramite forbice, aprire la parte del dito tagliandola longitudinalmente;
- xxix) Ridurre quanto possibile la superficie del campione tramite forbice;
- xxx) Posizionare il campione sulla cartuccia portasccaffold tramite pinza;
- xxxi) Prelevare dalla busta *STERRAD 2* un o-ring;
- xxxii) Posizionare l'o-ring sul campione tramite pinza;
- xxxiii) Prelevare dalla busta *STERRAD 2* gli strumenti per l'alloggiamento del campione;

- xxxiv) Forzare l'o-ring all'interno del profilo di alloggiamento, in modo da fissare il campione nella cartuccia;
- xxxv) Rimuovere tramite forbici le parti di campione in eccesso che escono dall'o-ring;
- xxxvi) Prendere la siringa sterile da 10 ml e inserirla nell'accesso del rubinetto a tre vie libero a livello del reservoir esterno;
- xxxvii) Mettere in comunicazione tramite rubinetto a tre vie il reservoir esterno e l'accesso della siringa dal circuito idraulico;
- xxxviii) Prelevare tramite siringa dal reservoir esterno 10 ml di mezzo di coltura;
- xxxix) Configurare il rubinetto a tre vie in modo da mettere in comunicazione circuito idraulico e siringa dal reservoir esterno;
 - xl) Riempire lentamente tramite siringa il circuito con il mezzo di coltura (fino a quando il medium riempie la cavità di alloggiamento della cartuccia portascaffold all'interno dell'housing);
 - xli) Posizionare la cartuccia nell'housing evitando accuratamente di creare bolle sotto il campione;
 - xlii) Rimuovere aspirando dalla siringa il medium in eccesso all'interno dell'housing;
 - xliii) Prelevare dalla busta *STERRAD 1* il reservoir interno della camera;
 - xliv) Montare il reservoir interno sull'housing, serrando così il bioreattore;
 - xlv) Rimuovere la siringa dal rubinetto a tre vie e riempire il reservoir interno con il mezzo di coltura tramite siringa;
 - xlvi) Prelevare dalla busta *STERRAD 2* il tappo Flask della camera;
 - xlvii) Chiudere il reservoir interno con il tappo Flask;
 - xlviii) prelevare dalla busta *AUTOCLAVE 1* un tubo corto di silicone e calzare un'estremità del tubo sul connettore del reservoir interno;
 - xlix) Prelevare dalla busta un connettore femmina e calzarlo nella parte opposta del tubo;
 - l) Prendere un rubinetto a tre vie sterile per i futuri prelievi e collegarlo al tubo con connettore femmina;
 - li) Ripetete tutti i passaggi (a parte i passaggi xlviii), xlvix) e l)) per il bioreattore 2, considerando le buste *AUTOCLAVE 2*, *STERRAD 3* e *STERRAD 4*. Nei passaggi xlvi) e xlvii) al posto di del tappo Flask considerare il coperchio Petri.
 - lii) Collegare i tubi sottopompa alla testa pompante nell'apposita cassetta;
 - liii) Azionare la pompa;

APPENDICE D

REFERTO DELLE ANALISI MICROBIOLOGICHE

Di seguito è riportato il referto relativo alle analisi microbiologiche effettuate sui campioni di medium prelevati durante la prova di mantenimento della sterilità eseguita sui due bioreattori considerati (quello di partenza e quello modificato). In particolare, nel referto i vari componenti a cui sono stati effettuati i prelievi sono così contrassegnati:

C1: Camera non modificata (*Bioreattore 1*)

C2: Camera modificata (*Bioreattore 2*)

R1: Reservoir esterno associato alla camera C1

R2: Reservoir esterno associato alla camera C1

Bottiglia medium

I tempi di prelievo sono i seguenti:

T0: tempo 0, appena dopo il riempimento del sistema, prima del suo azionamento

T1: dopo 5 ore dal tempo 0 di attività sotto cappa

T2: dopo 7 giorni dal tempo 0 di attività in incubatore.



Egr. Dott.ri
Fabio Acocella; Stefano Brizzola
Dip. Scienze Veterinarie per la Salute, la
Produzione Animale e la Sicurezza
Alimentare
Filippo Consolo
Dip. Di Bioingegneria -Politecnico di
Milano

Oggetto: test di sterilità su **“Sistema per la perfusione del patch di vescica decellularizzato”** . Protocollo PC 129/12 del 02/07/12

I campioni sono stati così contrassegnati:

1 - Bottiglia medium T0

2 - C1 - T0

8 - C1 – T2

3 - C1 - T1

9 - C2 - T2

4 - C2 - T0

10 - R1 - T2

5 - C2 - T1

11 - R2 - T2

6 - R1 - T0

7 - R2 - T0

Reperto Batteriologico

Tutti i campioni sono risultati sterili per batteri aerobi, anaerobi e per miceti.

Milano, 08/07/2012

Per il laboratorio

Guido Grilli

Bibliografía

1. Atala, A., *Engineering organs. Curr Opin Biotechnol*, 2009. **20**(5): p. 575-92.
2. Boyce, S.T., et al., *Comparative assessment of cultured skin substitutes and native skin autograft for treatment of full-thickness burns. Ann Surg.*, 1995. **222**(6): p. 743-52.
3. Kon, E., et al., *Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. Journal of Biomedical Materials Research*, 2000. **49**(3): p. 328-337.
4. Marcacci, M., et al., *Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. Tissue Eng*, 2007. **13**(5): p. 947-55.
5. Ott, H.C., et al., *Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. Nat Med*, 2008. **14**(2): p. 213-21.
6. Baptista, P.M., et al., *The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid. Hepatology*, 2011. **53**(2): p. 604-617.
7. Ozeki, M., et al., *Evaluation of decellularized esophagus as a scaffold for cultured esophageal epithelial cells. J Biomed Mater Res A*, 2006. **79**(4): p. 771-8.
8. Asnaghi, M.A., et al., *A double-chamber rotating bioreactor for the development of tissue-engineered hollow organs: From concept to clinical trial. Biomaterials*, 2009. **30**(29): p. 5260-5269.
9. Taylor, D.A. and M.J. Robertson, *The Basics of Cell Therapy to Treat Cardiovascular Disease: One Cell Does Not Fit All. Revista Española de Cardiología*, 2009. **62**(09): p. 1032-1044.
10. Petersen, T.H., et al., *Tissue-engineered lungs for in vivo implantation. Science*, 2010. **329**(5991): p. 538-41.

11. Bolland, F., et al., *Development and characterisation of a full-thickness acellular porcine bladder matrix for tissue engineering*. *Biomaterials*, 2007. **28**(6): p. 1061-70.
12. Yang, B., et al., *Development of a porcine bladder acellular matrix with well-preserved extracellular bioactive factors for tissue engineering*. *Tissue Eng Part C Methods*, 2010. **16**(5): p. 1201-11.
13. Tanagho, E.A. and J.W. McAninch, *Smith's general urology*, ed. F. Di Silverio. Vol. XX. 1994, Padova: Piccin. 760.
14. Atala, A., *Tissue engineering of human bladder*. *Br Med Bull*, 2011. **97**: p. 81-104.
15. Spence, A.P. and E.B. Mason, *Human anatomy and physiology*. 4th ed, ed. W.P. Company. Vol. XXV. 1992, Saint Paul. 956.
16. McKinley, M.P. and V. O'Loughlin, *Human Anatomy*, ed. M.-H.H. Education2006, Boston.
17. Engelhardt, E.M., et al., *A collagen-poly(lactic acid-co-varepsilon-caprolactone) hybrid scaffold for bladder tissue regeneration*. *Biomaterials*, 2011. **32**(16): p. 3969-76.
18. Biers, S.M., S.N. Venn, and T.J. Greenwell, *The past, present and future of augmentation cystoplasty*. *BJU Int*, 2012. **109**(9): p. 1280-93.
19. Danielsson, C., et al., *Polyesterurethane foam scaffold for smooth muscle cell tissue engineering*. *Biomaterials*, 2006. **27**(8): p. 1410-5.
20. Chun, Y.W., et al., *Nanostructured bladder tissue replacements*. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2010.
21. Lai, J.Y., P.Y. Chang, and J.N. Lin, *Bladder autoaugmentation using various biodegradable scaffolds seeded with autologous smooth muscle cells in a rabbit model*. *J Pediatr Surg*, 2005. **40**(12): p. 1869-73.

22. Lai, J.Y., P.Y. Chang, and J.N. Lin, *A comparison of engineered urinary bladder and intestinal smooth muscle for urinary bladder wall replacement in a rabbit model. J Pediatr Surg*, 2006. **41**(12): p. 2090-4.
23. Basu, J., et al., *Regeneration of native-like neo-urinary tissue from nonbladder cell sources. Tissue Eng Part A*, 2012. **18**(9-10): p. 1025-34.
24. Baker, S.C., et al., *The relationship between the mechanical properties and cell behaviour on PLGA and PCL scaffolds for bladder tissue engineering. Biomaterials*, 2009. **30**(7): p. 1321-8.
25. Pennisi, C.P., et al., *Nanoscale topography reduces fibroblast growth, focal adhesion size and migration-related gene expression on platinum surfaces. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2011. **85**(2): p. 189-197.
26. Dalby, M.J., et al., *Changes in fibroblast morphology in response to nano-columns produced by colloidal lithography. Biomaterials*, 2004. **25**(23): p. 5415-5422.
27. Thapa, A., T.J. Webster, and K.M. Haberstroh, *Polymers with nano-dimensional surface features enhance bladder smooth muscle cell adhesion. Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2003. **67A**(4): p. 1374-1383.
28. Chun, Y.W., et al., *The role of polymer nanosurface roughness and submicron pores in improving bladder urothelial cell density and inhibiting calcium oxalate stone formation. Nanotechnology*, 2009. **20**(8): p. 085104.
29. Atala, A., *Engineering tissues, organs and cells. J Tissue Eng Regen Med*, 2007. **1**(2): p. 83-96.
30. Mudera, V., et al., *Ultra-rapid engineered collagen constructs tested in an in vivo nursery site. J Tissue Eng Regen Med*, 2007. **1**(3): p. 192-8.
31. Brown, R.A., et al., *Ultraprapid Engineering of Biomimetic Materials and Tissues: Fabrication of Nano- and Microstructures by Plastic Compression. Advanced Functional Materials*, 2005. **15**(11): p. 1762-1770.

32. Becker, C., et al., "UroMaix" scaffolds : Novel collagen matrices for application in tissue engineering of the urinary tract. *Int J Artif Organs*, 2006. **29**(8): p. 764-71.
33. Hattori, K., et al., Bladder reconstruction using a collagen patch prefabricated within the omentum. *International Journal of Urology*, 2006. **13**(5): p. 529-537.
34. Engelhardt, E.M., et al., Compressed collagen gel: a novel scaffold for human bladder cells. *J Tissue Eng Regen Med*, 2010. **4**(2): p. 123-130.
35. Atala, A., et al., Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *The Lancet*, 2006. **367**(9518): p. 1241-1246.
36. Pariente, J.-L., B.-S. Kim, and A. Atala, In vitro biocompatibility assessment of naturally derived and synthetic biomaterials using normal human urothelial cells. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2001. **55**(1): p. 33-39.
37. Southgate, J., et al., Bladder reconstruction—from cells to materials. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, 2003. **217**(4): p. 311-316.
38. Badylak, S.F., *The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2002. **13**(5): p. 377-383.
39. Badylak, S.F., D.O. Freytes, and T.W. Gilbert, Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomater*, 2009. **5**(1): p. 1-13.
40. Kropp, B.P., et al., Regenerative Urinary Bladder Augmentation Using Small Intestinal Submucosa: Urodynamic and Histopathologic Assessment in Long-term Canine Bladder augmentations. *The Journal of urology*, 1996. **155**(6): p. 2098-2104.
41. Rosario, D.J., et al., Decellularization and sterilization of porcine urinary bladder matrix for tissue engineering in the lower urinary tract. *Regenerative Medicine*, 2008. **3**(2): p. 145-156.

42. Freytes, D.O., R.M. Stoner, and S.F. Badylak, *Uniaxial and biaxial properties of terminally sterilized porcine urinary bladder matrix scaffolds. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2008. **84B**(2): p. 408-414.
43. Kim, B.S., A. Atala, and J.J. Yoo, *A collagen matrix derived from bladder can be used to engineer smooth muscle tissue. World J Urol*, 2008. **26**(4): p. 307-14.
44. Probst, M., et al., *Reproduction of functional smooth muscle tissue and partial bladder replacement. British Journal of Urology*, 1997. **79**(4): p. 505-515.
45. Gabouev, A.I., et al., *In vitro construction of urinary bladder wall using porcine primary cells reseeded on acellularized bladder matrix and small intestinal submucosa. Int J Artif Organs*, 2003. **26**(10): p. 935-942.
46. Chen, B.S., et al., *Ex vivo functional evaluation of isolated strips in BAMG tissue-engineered bladders. Int J Artif Organs*, 2009. **32**(3): p. 159-165.
47. Piechota, et al., *Functional rat bladder regeneration through xenotransplantation of the bladder acellular matrix graft. British Journal of Urology*, 1998. **81**(4): p. 548-559.
48. Crapo, P.M., T.W. Gilbert, and S.F. Badylak, *An overview of tissue and whole organ decellularization processes. Biomaterials*, 2011. **32**(12): p. 3233-43.
49. Gratzner, P.F., R.D. Harrison, and T. Woods, *Matrix alteration and not residual sodium dodecyl sulfate cytotoxicity affects the cellular repopulation of a decellularized matrix. Tissue Eng*, 2006. **12**(10): p. 2975-83.
50. Dahms, et al., *Composition and biomechanical properties of the bladder acellular matrix graft: comparative analysis in rat, pig and human. British Journal of Urology*, 1998. **82**(3): p. 411-419.
51. Gilbert, T.W., T.L. Sellaro, and S.F. Badylak, *Decellularization of tissues and organs. Biomaterials*, 2006. **27**(19): p. 3675-83.

52. Farhat, W., et al., Porosity of porcine bladder acellular matrix: Impact of ACM thickness. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2003. **67A**(3): p. 970-974.
53. Cartwright, L.M., et al., Porcine bladder acellular matrix porosity: impact of hyaluronic acid and lyophilization. *J Biomed Mater Res A*, 2006. **77**(1): p. 180-4.
54. Korossis, S., et al., Tissue engineering of the urinary bladder: considering structure-function relationships and the role of mechanotransduction. *Tissue Eng*, 2006. **12**(4): p. 635-644.
55. Redaelli, A. and F. Montecvecchi, *Biomeccanica. Analisi multiscala di tessuti biologici* 2007: Pàtron.
56. Mooney, D., et al., Switching from differentiation to growth in hepatocytes: Control by extracellular matrix. *Journal of Cellular Physiology*, 1992. **151**(3): p. 497-505.
57. Grinnell, F., Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *The Journal of cell biology*, 1994. **124**(4): p. 401-4.
58. Schwachtgen, J.L., et al., Fluid shear stress activation of *egr-1* transcription in cultured human endothelial and epithelial cells is mediated via the extracellular signal-related kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase pathway. *The Journal of clinical investigation*, 1998. **101**(11): p. 2540-9.
59. Hung, C.T., et al., Mitogen-activated protein kinase signaling in bovine articular chondrocytes in response to fluid flow does not require calcium mobilization. *J Biomech*, 2000. **33**(1): p. 73-80.
60. Haberstroh, K.M., et al., A novel in-vitro system for the simultaneous exposure of bladder smooth muscle cells to mechanical strain and sustained hydrostatic pressure. *Journal of biomechanical engineering*, 2002. **124**(2): p. 208-13.
61. Hubschmid, U., et al., In vitro growth of human urinary tract smooth muscle cells on laminin and collagen type I-coated membranes under static and dynamic conditions. *Tissue Eng*, 2005. **11**(1-2): p. 161-71.

62. Ram-Liebig, G., et al., *New approaches in the modulation of bladder smooth muscle cells on viable detrusor constructs*. *World J Urol*, 2006. **24**(4): p. 429-437.
63. Heise, R.L., et al., *Generating elastin-rich small intestinal submucosa-based smooth muscle constructs utilizing exogenous growth factors and cyclic mechanical stimulation*. *Tissue Eng Part A*, 2009. **15**(12): p. 3951-60.
64. Wallis, M.C., et al., *Feasibility study of a novel urinary bladder bioreactor*. *Tissue Eng Part A*, 2008. **14**(3): p. 339-48.
65. Bouhout, S., et al., *Bladder substitute reconstructed in a physiological pressure environment*. *J Pediatr Urol*, 2011. **7**(3): p. 276-82.
66. Wei, X., et al., *A novel bioreactor to simulate urinary bladder mechanical properties and compliance for bladder functional tissue engineering*. Vol. 124. 2011. 568-73.
67. Davis, N.F., et al., *Construction and evaluation of urinary bladder bioreactor for urologic tissue-engineering purposes*. *Urology*, 2011. **78**(4): p. 954-60.
68. Korossis, S., et al., *Regional biomechanical and histological characterisation of the passive porcine urinary bladder: Implications for augmentation and tissue engineering strategies*. *Biomaterials*, 2009. **30**(2): p. 266-75.
69. Piola, M., *Sviluppo e test preliminare di un bioreattore a perfusione destinato all'espansione di cellule staminali ematopoietiche*, Relatori: Fiore G.B., Soncini M., in *Tesi di laurea in Ingegneria biomedica 2009*, Politecnico di Milano: Milan. p. 121.
70. Fung, Y.C., *Biomechanics : mechanical properties of living tissues* 1981, New York: Springer-Verlag.
71. Bangash, Y.H., F.N. Bangash, and T. Bangash, *Trauma - An Engineering Analysis: With Medical Case Studies Investigation* 2007: Springer.

72. *Baptista, P.M., et al. Whole organ decellularization - a tool for bioscaffold fabrication and organ bioengineering. in Engineering in Medicine and Biology Society, 2009. EMBC 2009. Annual International Conference of the IEEE. 2009.*
73. *Farhat, W.A., et al., Porcine bladder acellular matrix (ACM): protein expression, mechanical properties. Biomedical materials (Bristol, England), 2008. 3(2): p. 025015.*
74. *Rohrmann, D., et al., Compliance of the obstructed fetal rabbit bladder. Neurourol Urodyn, 1997. 16(3): p. 179-189.*
75. *Bouhout, S., et al., In vitro reconstruction of an autologous, watertight, and resistant vesical equivalent. Tissue Engineering Part A, 2010. 16(5): p. 1539-1548.*
76. *Gloeckner, D.C., et al., Passive Biaxial Mechanical Properties of the Rat Bladder Wall After Spinal Cord Injury. The Journal of urology, 2002. 167(5): p. 2247-2252.*

Al termine di questo lavoro di tesi vorrei ringraziare tutti coloro che mi hanno aiutato e supportato durante questo lungo percorso.

Per primo, un sentito ringraziamento va alla Professoressa Monica Soncini, la quale, nonostante gli impegni da neomamma e i malanni fisici, è riuscita con grande disponibilità a seguirmi nel processo di scrittura della tesi con scrupolo, chiarezza e schiettezza, aiutandomi a redigere un lavoro ben fatto, cercando di stimolare il mio senso critico e incoraggiandomi nei momenti di maggiore difficoltà.

Un fondamentale ringraziamento va all'Ing. Filippo Consolo, il quale mi ha accompagnato per tutto il lavoro di tesi, accollandosi in pratica un corso da 60 crediti di "meccanica e fluidodinamica" per colmare tutte le mie lacune in materia e avendo la pazienza di seguirmi giorno per giorno, con disponibilità e spirito di sacrificio, anche nei periodi in cui era in trasferta.

Un ringraziamento particolare va all'Ing. Marco Piola, per la grandissima disponibilità nel prestarmi tutto il suo materiale necessario per il mio lavoro di tesi e per l'aiuto che mi ha dato quando l'incertezza mi attanagliava nelle varie fasi del lavoro.

Un ringraziamento va anche al Prof. Beniamino Fiore, per la sua capacità di affrontare problemi e di trovare sempre la soluzione giusta al momento giusto, e a tutti i componenti del μ BS Lab.

Un ringraziamento dovuto infine va allo staff del Dipartimento di Veterinaria, per il supporto e l'aiuto riguardo alla parte di caratterizzazione del tessuto decellularizzato di vescica. E quindi grazie a Stefano Brizzola, Fabio Acocella e Giovanni Tremolada per il lavoro svolto in fase di decellularizzazione delle vesciche e per la disponibilità mostrata per le prove di verifica del mantenimento della sterilità; un grazie a Federica Riva per l'aiuto circa le analisi di DNA ed RNA; un grazie a Valeria Giudice e Chiara Greco per le analisi istologiche; infine, un grazie a Guido Grilli per la disponibilità nel fornire i risultati microbiologici delle prove di verifica del mantenimento della sterilità.

Per concludere, un grazie globale a tutte le persone che mi hanno accompagnato in questo periodo della mia vita, supportandomi e incoraggiandomi a dare sempre il meglio.

Grazie di cuore a tutti.

Alberto